

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 315**

51 Int. Cl.:

C07J 63/00 (2006.01)

A61K 31/565 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2013 PCT/US2013/038064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13163344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2013 E 13720708 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2841445**

54 Título: **Derivados de 2.2-difluoropropionamida de bardoxolona metilo, formas polimórficas y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

27.04.2012 US 201261687669 P

08.03.2013 US 201361775288 P

13.03.2013 US 201361780444 P

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

27.09.2017

73 Titular/es:

**REATA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
2801 Gateway Drive, Suite 150
Irving, TX 75063-2648, US**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, ERIC;
DECKER, ANDREA y
LIU, XIAOFENG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 634 315 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

Derivados de 2,2-difluoropropionamida de bardoxolona metilo, formas polimórficas y métodos de uso de los mismos

Antecedentes de la invención

I. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al compuesto:

N-((4a*S*,6a*R*,6b*S*,8a*R*,12a*S*,14a*R*,14b*S*)-11-ciano-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametil-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-octadecahidropicen-4a-il)-2,2-difluoropropionamida,

también referido en la presente como RTA 408, 63415, o PP415. La presente invención también se refiere a formas polimórficas del mismo, métodos para la preparación y uso del mismo, composiciones farmacéuticas del mismo, y kits y artículos de fabricación del mismo.

II. Descripción de la técnica relacionada

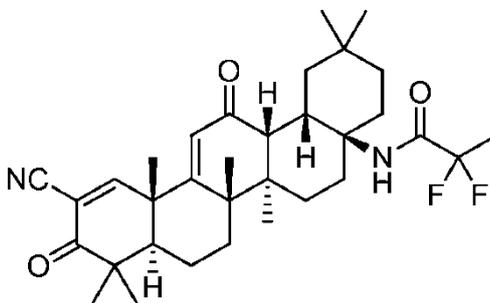
La actividad anti-inflamatoria y anti-proliferativa del triterpenoide, ácido oleanólico, de origen natural, han sido mejoradas por modificaciones químicas. Por ejemplo, se han desarrollado ácido 2-ciano-3,12-diooxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) y compuestos relacionados. Ver Honda *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 2000a; Honda *et al.*, 2000b; Honda *et al.*, 2002; Suh *et al.*, 1998; Suh *et al.*, 1999; Place *et al.*, 2003; Liby *et al.*, 2005; y Patentes U.S. 8.129.429, 7.915.402, 8.124.799, y 7.943.778. El éster de metilo, bardoxolona metilo (CDDO-Me), se ha evaluado en ensayos clínicos fase II y III para el tratamiento y prevención de la nefropatía diabética y enfermedad renal crónica. Ver Pergola *et al.*, 2011.

Los análogos de triterpenoide sintético de ácido oleanólico también han mostrado ser inhibidores de procesos inflamatorios celulares, tales como la inducción por IFN- γ y de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de COX-2 en los macrófagos de ratón. Ver Honda *et al.*, (2000a), Honda *et al.* (2000b), Honda *et al.* (2002), y Patentes de Estados Unidos 8.129.429, 7.915.402, 8.124.799, y 7.943.778. Se ha mostrado que los compuestos derivados de ácido oleanólico afectan la función de múltiples dianas proteicas y por lo tanto modulan la actividad de varias vías de señalización celular importantes relacionadas con el estrés oxidativo, control del ciclo celular, y la inflamación (por ejemplo, Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2008; Liby *et al.*, 2007a, y Patentes U.S. 8.129.429, 7.915.402, 8.124.799, y 7.943.778).

Dado que los perfiles de actividad biológica de derivados de triterpenoide conocidos varían, y a la vista de la amplia variedad de enfermedades que pueden ser tratadas o prevenidas con compuestos que tienen potentes efectos antioxidantes y anti-inflamatorios, y el alto grado de necesidad médica no satisfecha representada dentro de esta variedad de enfermedades, es deseable sintetizar nuevos compuestos con diferentes perfiles de actividad biológica para el tratamiento o prevención de una o más indicaciones.

Resumen de la invención

En algunos aspectos de la presente invención, se proporciona un compuesto de la fórmula (también referido en la presente como RTA 408, 63415, o PP415):



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, el compuesto está en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el compuesto no está en la forma de una sal.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan formas polimórficas del compuesto anterior. En algunas realizaciones, la forma polimórfica tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende un pico de halo a aproximadamente 14 $^{\circ}2\theta$. En algunas realizaciones, el patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) comprende además un pico de hombro a aproximadamente 8 $^{\circ}2\theta$. En algunas realizaciones, el patrón de difracción

- en polvo de rayos X (CuK α) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 59. En algunas realizaciones, la forma polimórfica tiene una T_g de aproximadamente 150°C a aproximadamente 155°C, incluyendo, por ejemplo, una T_g de aproximadamente 153°C o una T_g de aproximadamente 150°C. En algunas realizaciones, la forma polimórfica tiene una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que comprende una endoterma centrada desde aproximadamente 150°C a aproximadamente 155°C. En algunas realizaciones, la endoterma está centrada a aproximadamente 153°C. En algunas realizaciones, la endoterma está centrada a aproximadamente 150°C. En algunas realizaciones, la curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 62.
- En algunas realizaciones, la forma polimórfica es un solvato que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende picos a aproximadamente 5,6, 7,0, 10,6, 12,7, y 14,6 °2 θ . En algunas realizaciones, el patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 75, patrón superior.
- En algunas realizaciones, la forma polimórfica es un solvato que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende picos a aproximadamente 7,0, 7,8, 8,6, 11,9, 13,9 (pico doble), 14,2, y 16,0 °2 θ . En algunas realizaciones, el patrón de difracción de rayos X (CuK α) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 75, segundo patrón desde la parte superior.
- En algunas realizaciones, la forma polimórfica es un hemisolvato de acetonitrilo que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende picos a aproximadamente 7,5, 11,4, 15,6 y 16,6 °2 θ . En algunas realizaciones, el patrón de difracción de rayos X (CuK α) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 75, segundo patrón desde la parte inferior. En algunas realizaciones, la forma polimórfica tiene una T_g de aproximadamente 196°C. En algunas realizaciones, la forma polimórfica tiene una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que comprende una endoterma centrada a aproximadamente 196 C. En algunas realizaciones, la curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 116.
- En algunas realizaciones, la forma polimórfica es un solvato que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende picos a aproximadamente 6,8, 9,3, 9,5, 10,5, 13,6, y 15,6 °2 θ . En algunas realizaciones, el patrón de difracción de rayos X (CuK α) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 75, patrón inferior.
- En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un ingrediente activo que consiste en el compuesto anterior o una forma polimórfica del mismo (tal como, por ejemplo, una cualquiera de las formas polimórficas descritas en la presente antes y a continuación), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración: oral, intraadiposal, intraarterial, intraarticular, intracraneal, intradérmica, intralesional, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrarrectal, intratecal, intratraqueal, intratumoral, intraumbilical, intravaginal, intravenosa, intravesicular, intravítrea, liposomal, local, mucosal, parenteral, rectal, subconjuntival, subcutánea, sublingual, tópica, transbucal, transdérmica, vaginal, en cremas, en composiciones lipídicas, vía un catéter, vía un lavado, vía infusión continua, vía infusión, vía inhalación, vía inyección, vía suministro local, o vía perfusión localizada. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración oral, intraarterial, intravenosa, o tópica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración oral.
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula como una cápsula dura o blanda, un comprimido, un jarabe, una suspensión, una emulsión, una disolución, una dispersión sólida, una oblea, o un elixir. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende además un agente que potencia la solubilidad y dispersabilidad. (Por ejemplo, los agentes que potencian la solubilidad y dispersabilidad incluyen, pero no se limitan a, PEG, ciclodextranos, y derivados de celulosa). En algunas realizaciones, el compuesto o forma polimórfica se suspende en aceite de sésamo.
- En otras realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración tópica. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se formula como una loción, una crema, un gel, un aceite, un ungüento, un bálsamo, una emulsión, una disolución, o una suspensión. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula como una loción, como una crema, o como un gel. En algunas realizaciones, la cantidad del ingrediente activo es desde aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5% en peso, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 3% en peso, ó 0,01%, 0,1%, 1%, ó 3% en peso.
- En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para tratar o prevenir una afección asociada con la inflamación o estrés oxidativo en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica como se describe antes o a continuación. La invención se refiere igualmente al compuesto *N*-((4a*S*,6a*R*,6b*S*,8a*R*,12a*S*,14a*R*,14b*S*)-11-ciano-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametil-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-octadecahidropicen-4a-il)-2,2-difluoropropanamida (o RTA 408) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, o una forma polimórfica de este compuesto (tal como, por ejemplo, una cualquiera de las formas polimórficas descritas en la presente antes o a continuación), o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades mencionadas antes y un vehículo farmacéuticamente aceptable (incluyendo, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente), para el uso en el tratamiento o prevención de una afección asociada con la inflamación o estrés

oxidativo. La invención también se refiere al uso del compuesto mencionado anteriormente, forma polimórfica o composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección asociada con la inflamación o estrés oxidativo. En algunas realizaciones, la afección está asociada con la inflamación. En otras realizaciones, la afección está asociada con el estrés oxidativo. En algunas realizaciones, la afección es una enfermedad o trastorno de la piel, sepsis, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, una complicación de la exposición localizada o total del cuerpo a radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad hepática, pancreatitis, un trastorno ocular, una enfermedad pulmonar o diabetes.

La presente invención se refiere además al compuesto *N*-((4a*S*,6a*R*,6b*S*,8a*R*,12a*S*,14a*R*,14b*S*)-11-ciano-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametil-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-octadecahidropicen-4a-ii)-2,2-difluoropropanamida (o RTA 408) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, o una forma polimórfica de este compuesto (tal como, por ejemplo, una cualquiera de las formas polimórficas descritas en la presente antes o a continuación), o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades mencionadas anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable (incluyendo, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente), para el uso en el tratamiento o prevención de una afección seleccionada de una enfermedad o trastorno de la piel, sepsis, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, una complicación de la exposición localizada o total del cuerpo a radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad hepática, pancreatitis, un trastorno ocular, una enfermedad pulmonar o diabetes. Por consiguiente, la invención se refiere al uso del compuesto mencionado anteriormente, forma polimórfica o composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada de una enfermedad o trastorno de la piel, sepsis, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, una complicación de la exposición localizada o total del cuerpo a radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad hepática, pancreatitis, un trastorno ocular, una enfermedad pulmonar, o diabetes. La invención también se refiere a un método para tratar o prevenir una afección seleccionada de una enfermedad o trastorno de la piel, sepsis, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, una complicación de la exposición localizada o total del cuerpo a radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad hepática, pancreatitis, un trastorno ocular, una enfermedad pulmonar, o diabetes en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto mencionado anteriormente, forma polimórfica o composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la afección es una enfermedad o trastorno de la piel tal como dermatitis, una quemadura térmica o química, una herida crónica, acné, alopecia, otros trastornos del folículo piloso, epidermólisis bullosa, quemaduras de sol, complicaciones de quemaduras solares, trastornos de la pigmentación de la piel, una afección de la piel relacionada con el envejecimiento; una herida post-quirúrgica, una cicatriz de una lesión o quemadura de la piel, psoriasis, una manifestación dermatológica de una enfermedad autoinmune o una enfermedad de injerto contra huésped, cáncer de piel, o un trastorno que implica la hiperproliferación de células de la piel. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la piel es dermatitis. En algunas realizaciones, la dermatitis es dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis debida a la exposición química, o dermatitis inducida por radiación. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno de la piel es una herida crónica. En algunas realizaciones, la herida crónica es una úlcera diabética, una llaga por presión, o una úlcera venosa. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno de la piel es alopecia. En algunas realizaciones, la alopecia se selecciona de calvicie o alopecia inducida por fármacos. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno de la piel es un trastorno de la pigmentación de la piel. En algunas realizaciones, el trastorno de la pigmentación de la piel es vitiligo. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno de la piel es un trastorno que implica la hiperproliferación de células de la piel. En algunas realizaciones, el trastorno que implica la hiperproliferación de células de la piel es hiperqueratosis.

En otras realizaciones, la afección es una enfermedad autoinmune, tales como artritis reumatoide, lupus, enfermedad de Crohn, o psoriasis. En otras realizaciones, la afección es una enfermedad hepática, tal como la enfermedad de hígado graso o hepatitis.

En otras realizaciones, la afección es un trastorno ocular, tal como uveítis, degeneración macular, glaucoma, edema macular diabético, blefaritis, retinopatía diabética, una enfermedad o trastorno del endotelio corneal, inflamación post-quirúrgica, ojo seco, conjuntivitis alérgica o una forma de conjuntivitis. En algunas realizaciones, el trastorno ocular es degeneración macular. En algunas realizaciones, la degeneración macular es la forma seca. En otras realizaciones, la degeneración macular es la forma húmeda. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno del endotelio corneal es distrofia corneal endotelial de Fuchs.

En otras realizaciones, la afección es una enfermedad pulmonar, tal como inflamación pulmonar, fibrosis pulmonar, COPD, asma, fibrosis quística, o fibrosis pulmonar idiopática. En algunas realizaciones, la COPD es inducida por el humo del cigarrillo.

En otras realizaciones, la afección es sepsis. En otras realizaciones, la afección es mucositis resultante de la terapia de radiación o quimioterapia. En algunas realizaciones, la mucositis se presenta por vía oral. En otras realizaciones, la afección está asociada con la exposición a la radiación. En algunas realizaciones, la exposición a la radiación conduce a dermatitis. En algunas realizaciones, la exposición a la radiación es aguda. En otras realizaciones, la

exposición a la radiación se fracciona.

En otras realizaciones, la afección es cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, o seminoma. En otras realizaciones, el cáncer es de la vejiga, sangre, hueso, cerebro, mama, sistema nervioso central, cuello uterino, colon, endometrio, esófago, vesícula biliar, genitales, tracto genitourinario, cabeza, riñón, laringe, hígado, pulmón, tejido muscular, cuello, mucosa oral o nasal, ovario, páncreas, próstata, piel, bazo, intestino delgado, intestino grueso, estómago, testículo, o tiroides.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra antes o inmediatamente después de que un sujeto se trata con una terapia de radiación o quimioterapia en donde la quimioterapia no comprende RTA 408 o sus formas polimórficas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra tanto antes como después de que el sujeto se trata con terapia de radiación, quimioterapia o ambas. En algunas realizaciones, el tratamiento reduce un efecto secundario de la terapia de radiación o la quimioterapia. En algunas realizaciones, el efecto secundario es mucositis y dermatitis. En algunas realizaciones, el tratamiento potencia la eficacia de la terapia de radiación o la quimioterapia. En algunas realizaciones, la quimioterapia comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de 5-fluorouracilo o docetaxel.

La terapia de tratamiento de combinación adicional también se contempla por la presente descripción. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos de tratamiento de cáncer en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la presente descripción, los métodos pueden comprender además uno o más tratamientos seleccionados del grupo que consiste en la administración de una cantidad farmacéuticamente efectiva de un segundo fármaco, radioterapia, inmunoterapia, terapia génica, y cirugía. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender además (1) poner en contacto una célula de tumor con el compuesto antes de poner en contacto la célula de tumor con el segundo fármaco, (2) poner en contacto una célula de tumor con el segundo fármaco antes de poner en contacto la célula de tumor con el compuesto, o (3) poner en contacto una célula de tumor con el compuesto y el segundo fármaco al mismo tiempo. El segundo fármaco puede, en ciertas realizaciones, ser un antibiótico, anti-inflamatorio, anti-neoplásico, anti-proliferativo, anti-viral, inmunomodulador, o inmunosupresor. En otras realizaciones, el segundo fármaco puede ser un agente alquilante, modulador del receptor de andrógenos, disruptor de citoesqueleto, modulador del receptor de estrógeno, inhibidor de histona-desacetilasa, inhibidor de HMG-CoA reductasa, inhibidor de proteína prenil transferasa, modulador del receptor de retinoide, inhibidor de topoisomerasa, o inhibidor de tirosina quinasa. En ciertas realizaciones, el segundo fármaco es 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, ácido 9-cis-retinoico, actinomicina D, alitretinoína, ácido todo-trans-retinoico, anamicina, axitinib, belinostat, bevacizumab, bexaroteno, bosutinib, busulfán, capecitabina, carboplatino, carmustina, CD437, cediranib, cetuximab, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dasatinib, daunorrubicina, decitabina, docetaxel, dolastatina-10, doxifluridina, doxorubicina, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, etopósido, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab, ozogamicina, hexametilmelamina, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, isotretinoína, ixabepilona, lapatinib, LBH589, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, MS-275, neratinib, nilotinib, nitrosourea, oxaliplatino, paclitaxel, plicamicina, procarbazona, semaxanib, semustina, butirato de sodio, fenilacetato de sodio, estreptoizotocina, ácido suberoilánilida hidroxámico, sunitinib, tamoxifeno, tenipósido, tiopeta, tioguanina, topotecán, TRAIL, trastuzumab, tretinoína, tricostatina A, ácido valproico, valrubicina, vandetanib, vinblastina, vincristina, vindesina, o vinorelbina.

También se contemplan métodos para tratar o prevenir una enfermedad con un componente inflamatorio en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la presente descripción. En algunas realizaciones, la enfermedad puede ser, por ejemplo, lupus o artritis reumatoide. En otras realizaciones, la enfermedad puede ser una enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa. En otras realizaciones, la enfermedad con un componente inflamatorio puede ser una enfermedad cardiovascular. En otras realizaciones, la enfermedad con un componente inflamatorio puede ser diabetes, tales como diabetes tipo 1 o tipo 2. En otras realizaciones, RTA 408, sus polimorfos, y composiciones farmacéuticas también se pueden utilizar para tratar complicaciones asociadas con la diabetes. Tales complicaciones son bien conocidas por una persona experta en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la obesidad, hipertensión, aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, apoplejía, enfermedad vascular periférica, hipertensión, nefropatía, neuropatía, mionecrosis, retinopatía y síndrome metabólico (síndrome X). En otras realizaciones, la enfermedad con un componente inflamatorio puede ser una enfermedad de la piel, tal como psoriasis, acné o dermatitis atópica. La administración de RTA 408, sus polimorfos, y composiciones farmacéuticas en los métodos de tratamiento de tales enfermedades de la piel puede ser, pero no se limita a, por ejemplo, tópica u oral.

En otras realizaciones, la enfermedad con un componente inflamatorio puede ser el síndrome metabólico (síndrome X). Un paciente que tiene este síndrome se caracteriza por tener tres o más síntomas seleccionados del siguiente grupo de cinco síntomas: (1) obesidad abdominal; (2) hipertrigliceridemia; (3) bajo colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL); (4) alta presión arterial; y (5) glucosa en ayunas elevada, la cual puede estar en el intervalo característico de la diabetes tipo 2 si el paciente también es diabético. Cada uno de estos síntomas se define en el Tercer Informe del Panel de Expertos del Programa Nacional de Educación del Colesterol sobre la Detección, Evaluación y Tratamiento de Alto Colesterol en Sangre en Adultos (Panel de Tratamiento de Adultos III, o ATP III),

Institutos Nacionales de Salud, 2001, NIH Publicación No. 01-3670. Los pacientes con síndrome metabólico, ya tengan o desarrollen o no diabetes mellitus evidente, tienen un mayor riesgo de desarrollar las complicaciones macrovasculares y microvasculares que se enumeran anteriormente que ocurren con la diabetes tipo 2, tal como aterosclerosis y enfermedad cardíaca coronaria.

5 Otro método general de la presente descripción implica un método para tratar o prevenir una enfermedad cardiovascular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la presente descripción. En algunas realizaciones, la enfermedad cardiovascular puede ser, pero no se limita a, por ejemplo, aterosclerosis, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, enfermedad cardíaca reumática, enfermedad de la válvula, enfermedad de la arteria coronaria, endocarditis, o infarto de miocardio. La terapia de combinación también se contempla para métodos para tratar o prevenir una enfermedad cardiovascular en un sujeto. Por ejemplo, tales métodos pueden comprender además administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de uno o más fármacos cardiovasculares. El fármaco cardiovascular puede ser, pero no se limita a, por ejemplo, un fármaco para reducir el colesterol, un anti-hiperlipidémico, un bloqueador del canal de calcio, un anti-hipertensivo, o un inhibidor de de HMG-CoA reductasa. En algunas realizaciones, los ejemplos no limitantes de fármacos cardiovasculares incluyen amlodipina, aspirina, ezetimiba, felodipina, lacidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina o nitrendipina. En otras realizaciones, otros ejemplos no limitantes de fármacos cardiovasculares incluyen atenolol, bucindolol, carvedilol, clonidina, doxazosina, indoramina, labetalol, metildopa, metoprolol, nadolol, oxprenolol, fenoxibenzamina, fentolamina, pindolol, prazosin, propranolol, terazosin, timolol o tolazolina. En otras realizaciones, el fármaco cardiovascular puede ser, por ejemplo, una estatina, tales como atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina o simvastatina.

También se contemplan métodos para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la presente descripción. En algunas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica. En realizaciones particulares, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer. En realizaciones particulares, la enfermedad neurodegenerativa es la EM, tal como EM progresiva primaria, progresiva secundaria con recidiva-remisión o recidiva progresiva. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser, por ejemplo, un primate. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un ser humano.

30 En realizaciones particulares de los métodos para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la presente descripción, el tratamiento suprime la desmielinización de las neuronas en el cerebro o médula espinal del sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento suprime la desmielinización inflamatoria. En ciertas realizaciones, el tratamiento suprime la transección de los axones de las neuronas en el cerebro o médula espinal del sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento suprime la transección de neuritas en el cerebro o médula espinal del sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento suprime la apoptosis neuronal en el cerebro o médula espinal del sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento estimula la remielinización de los axones de las neuronas en el cerebro o médula espinal del sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento restaura la función perdida después de un ataque de EM. En ciertas realizaciones, el tratamiento previene un nuevo ataque de EM. En ciertas realizaciones, el tratamiento previene una discapacidad como consecuencia de un ataque de EM.

Un aspecto general de la presente descripción contempla un método para tratar o prevenir un trastorno caracterizado por la sobreexpresión de los genes de iNOS en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de RTA 408, formas polimórficas, o una composición farmacéutica de la presente descripción.

45 Otro aspecto general de la presente descripción contempla un método para inhibir la producción de óxido nítrico inducida por IFN- γ en células de un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de RTA 408, formas polimórficas, o una composición farmacéutica de la presente descripción.

50 Todavía otro método general de la presente descripción contempla un método para tratar o prevenir un trastorno caracterizado por la sobreexpresión de los genes de COX-2 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de RTA 408, formas polimórficas, o una composición farmacéutica de la presente descripción.

También se contemplan los métodos de tratamiento de enfermedad renal/del riñón (RKD) en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la presente descripción. Véase la Patente U.S. 8.129.429. La RKD puede ser consecuencia de, por ejemplo, una agresión tóxica. La agresión tóxica puede ser consecuencia de, pero no se limita a, por ejemplo, un agente de imágenes o un fármaco. El fármaco puede ser un agente quimioterapéutico, por ejemplo. La RKD puede ser consecuencia de la lesión por isquemia/reperfusión, en ciertas realizaciones. En ciertas realizaciones, la RKD es consecuencia de la diabetes o hipertensión. En algunas realizaciones, la RKD puede ser consecuencia de una enfermedad autoinmune. La RKD puede definirse adicionalmente como RKD crónica o RKD aguda.

5 En ciertos métodos para tratar la enfermedad renal/del riñón (RKD) en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la presente descripción, el sujeto se ha sometido o se está sometiendo a diálisis. En ciertas realizaciones, el sujeto se ha sometido o es un candidato para someterse a trasplante de riñón. El sujeto puede ser un primate. El primate puede ser un ser humano. El sujeto en éste o cualquier otro método puede ser, por ejemplo, una vaca, caballo, perro, gato, cerdo, ratón, rata o cobaya.

También se contempla por la presente descripción un método para mejorar la tasa de filtración glomerular o aclaramiento de creatinina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de RTA 408, formas polimórficas, o una composición farmacéutica de la presente descripción.

10 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una dosis única al día. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra en más de una dosis al día. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad farmacéuticamente efectiva.

En algunas realizaciones, la dosis es desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2.000 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis es desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis es aproximadamente 3, 10, 30, ó 100 mg/kg.

15 En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía tópica. En algunas realizaciones, la administración tópica se administra en la piel. En otras realizaciones, la administración tópica se administra en el ojo.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía oral. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía intraocular.

20 Otros objetos, características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada. Téngase en cuenta que simplemente porque un compuesto particular se atribuya a una fórmula genérica particular, no quiere decir que no pueda también pertenecer a otra fórmula genérica.

Breve descripción de los dibujos

30 Los dibujos siguientes forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente descripción. Una o más palabras alemanas se pueden encontrar en los dibujos incluyendo "Masseänderung" y "temperatur", las cuales significan "cambio en la masa" y "temperatura", respectivamente. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en la presente.

FIG. 1 - Efecto de RTA 408 en la producción de óxido nítrico inducida por IFN γ y la viabilidad celular en células RAW264.7.

35 FIGS. 2a y b - Efecto de RTA 408 en la activación del elemento de respuesta antioxidante (ARE): (a) actividad de luciferasa NQO1-ARE; (b) actividad de luciferasa GSTA2-ARE.

40 FIGS. 3a-f - Veces de incremento relativo de Nrf2 GST ARE después del tratamiento celular con (a) RTA 402; (b) 63415 (RTA 408); (c) 63170; (d) 63171; (e) 63179; y (f) 63189. Las gráficas también muestran la viabilidad de las células como se ensaya utilizando el reactivo de proliferación celular WST1 y midiendo la absorbancia después de 1 hora. Todos los fármacos se administraron en DMSO y las células se cultivaron a 10.000 células/pocillo en placas de 384 pocillos en DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% FBS, 1% penicilina estreptomycin, y 0,8 mg/ml de geneticina.

FIGS. 4a-d - Efecto de RTA 408 en la expresión de gen diana de Nrf2 en fibroblastos de pulmón HFL1. (a) NQO1; (b) HMOX1; (c) GCLM; (d) TXNRD1.

45 FIGS. 5a-d - Efecto de RTA 408 en la expresión de gen diana de Nrf2 en células epiteliales bronquiales BEAS-2B. (a) NQO1; (b) HMOX1; (c) GCLM; (d) TXNRD1.

FIGS. 6a y b - Efecto de RTA 408 en los niveles de proteína diana Nrf2. (a) células SH-SY5Y; (b) células BV2.

FIG. 7 - Efecto de RTA 408 en la actividad enzimática de NQO1 en células RAW264.7.

FIG. 8 - Efecto de RTA 408 en los niveles de glutatión total en la línea celular de hepatocitos AML-12.

FIG. 9 - Efecto de RTA 408 en la absorbancia de WST-1 como un marcador de NADPH.

50 FIGS. 10a-d - Efecto de RTA 408 en la expresión de genes implicados en la síntesis de NADPH. (a) H6PD; (b) PGD; (c) TKT; (d) ME1.

FIGS. 11a y b - (a) Efecto de RTA 408 en la activación inducida por TNF- α de un informador de luciferasa NF- κ B en la línea celular de ratón NIH3T3 con viabilidad de WST1 y viabilidad superpuesta de WST1/2. (b) activación inducida por TNF- α de un informador de luciferasa NF- κ B en la línea celular de ratón NIH3T3. La gráfica muestra las veces de cambio relativo como una función de los cambios logarítmicos en la concentración de RTA 408.

5 FIG. 12 - Efecto de RTA 408 en la activación inducida por TNF- α de una construcción informadora de luciferasa NF- κ B.

FIGS. 13a y b - (a) Efecto de RTA 408 en la activación inducida por TNF- α de un informador de luciferasa NF- κ B en la línea celular A549 humana con viabilidad de WST1 y viabilidad superpuesta de WST1/2. (b) Activación inducida por TNF- α de un informador de luciferasa NF- κ B en la línea celular A549 humana. La gráfica muestra las veces de cambio relativo como una función del cambio logarítmico en la concentración de RTA 408.

10

FIG. 14 - Efecto de RTA 408 en la fosforilación inducida por TNF- α de I κ B α .

FIGS. 15a-d - Efecto de RTA 408 en la expresión de genes de transaminasa: (a) ALT1 (GPT1); (b) ALT2 (GPT2); (c) AST1 (GOT1); (d) AST1 (GOT2). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control (* P <0,05; ** P <0,01).

15 FIG. 16 - Efecto de RTA 408 en los niveles de piruvato en las células musculares cultivadas (* P <0,05).

FIG. 17 - Efecto de 63415 en un modelo de inflamación pulmonar mediada por LPS (% de cambio en las citoquinas pro-inflamatorias en relación con el tratamiento de LPS). El compuesto 63415 se administró QD x 3 en el tiempo 0, 24, y 48 h seguido de LPS una h después de la última dosis de 63415 en ratones BALB/c hembras. Los animales se sacrificaron 20 h después de la administración de LPS. BALF se examinó para la expresión de citoquinas proinflamatorias. El compuesto 63415 redujo las citoquinas pro-inflamatorias de una manera dependiente de la dosis, con reducciones máximas que varían desde 50%-80% en TNF- α , IL-6, e IL-12.

20

FIGS. 18a y b - Efecto de RTA 408 en la inflamación pulmonar inducida por LPS en ratones. (a) citoquinas inflamatorias; (b) dianas de Nrf2. El RTA 408 se administró a ratones BALB/c hembras (n = 10) QDx6 en el tiempo 0, 24, 48, 72, 96, y 120 h seguido por LPS a 121 h con animales sacrificados a 141 h. La expresión de proteína citoquina pro-inflamatoria se sometió a ensayo en BALF. Los biomarcadores de Nrf2 se sometieron a ensayo en el pulmón. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control de disolución salina (* P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001).

25

FIGS. 19a y b - Efecto de 63415 en infiltrados de BALF en la inflamación pulmonar inducida por bleomicina: (a) recuento de células de fluido de BAL; (b) peso corporal. El compuesto 63415 se administró QDx39 en los días -10 a 28 en ratones C57BL/6. La bleomicina se administró en el día 0. Se midieron los pesos diariamente. Los recuentos de células de BALF se obtuvieron en el sacrificio. Se observó una notable reducción de infiltrado inflamatorio. No se observaron mejoras significativas en la puntuación de la inflamación crónica, fibrosis intersticial, o número de focos fibróticos.

30

FIGS. 20a y b - Efecto de RTA 408 en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratas: (a) PMN; (b) hidroxiprolina. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control de bleomicina (* P <0,05).

35

FIG. 21 - Efecto de RTA 408 en las enzimas diana de Nrf2 en los pulmones de ratas con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control de disolución salina (* P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001).

40 FIGS. 22a-e - Efecto de RTA 408 en COPD inducida por humo de cigarrillo en ratones. (a) KC; (b) IL-6; (c) TNF- α ; (d) IFN- γ ; (e) RANTES. RTA 408 (63415) se ensayó a niveles de dosis de 3 mg/kg (bajo), 10 mg/kg (medio), y 30 mg/kg (alto). Un análogo de AIM (63355) se ensayó en el mismo estudio para comparación. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control de CS.

FIG. 23 - Efecto de RTA 408 en las enzimas diana de Nrf2 en los pulmones de ratones con COPD inducida por humo de cigarrillo. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control de disolución salina (* P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001). Las dagas representan una diferencia estadísticamente significativa de la exposición de ratones al humo de cigarrillo y vehículo administrado ($\dagger P$ <0,05).

45

FIGS. 24a-d - Efectos de 63415 (RTA 408) en el peso corporal en un modelo de ratón BALB/c de sepsis. Se administró LPS a todos los animales en el día 0. (a) Peso corporal: 63415 (RTA 408); (b) Peso corporal: RTA 405; (c) LPS sistémico: % de supervivencia: 63415 (RTA 408); (d) LPS sistémico: % de supervivencia: RTA 405. Tanto RTA 405 como 63415 (RTA 408) se administraron QDx5 en los días -2 a 2. El compuesto 63415 (RTA 408) mejoró la supervivencia. El peso corporal como una función del tiempo en ratones BALB/c tratados con 63415 sirve como un modelo para la sepsis.

50

FIG. 25 - Efecto de 63415 en un modelo de mucositis oral inducida por radiación. RTA 405 o 63415 (RTA 408) se

administró BID×20 en los Días -5 a -1 y Días 1 a 15 a hámsteres dorados sirios machos. La radiación ocurrió en el día 0. Las puntuaciones de mucositis varían desde 0 a 5 con base en las manifestaciones clínicas (0: completamente sanos; 1-2: eritema ligero a severo; 3-5: diversos grados de ulceración). 63415 mejoró la mucositis a 30 mg/kg y 100 mg/kg, con una reducción de hasta 36% en la ulceración.

5 FIG. 26 - Efecto de 63415 en la inducción de gen diana de Nrf2 en un estudio de toxicidad en ratones de 14 días en ratones C57BL/6. Los ARNm de genes diana de Nrf2 se evaluaron en los hígados de ratones tratados PO QD×14. Se observaron aumentos sustanciales en la expresión de los ARNm para múltiples genes diana de Nrf2 y fueron consistentes con la exposición del tejido.

10 FIGS. 27a y b - Efecto de 63415 en la inducción de gen diana de Nrf2 en hígados de ratas: (a) Genes diana; (b) Reguladores negativos. Los ARNm de los genes diana de Nrf2 se evaluaron en los hígados de ratas tratadas PO QD×14.

FIGS. 28a y b - Efecto de 63415 en los genes diana de Nrf2 en tejidos de monos: (a) Hígado; (b) Pulmón. Los ARNm de genes diana de Nrf2 se evaluaron en monos tratados PO QD×14 utilizando tecnología Panomics QuantiGene® 2.0 Plex.

15 FIGS. 29a y b - Efecto de 63415 en la actividad enzimática diana de Nrf2 en el hígado de ratón: (a) Actividad de NQO1; (b) Actividad de GST. La actividad enzimática diana de Nrf2 se evaluó en hígados de ratones tratados PO QD×14. Las actividades enzimáticas de NQO1 y GST fueron inducidas de una manera dependiente de la dosis.

20 FIGS. 30a y b - Efecto de 63415 en la actividad enzimática diana de Nrf2 en hígado de rata: (a) Actividad de NQO1; (b) Actividad de GST. La actividad enzimática diana de Nrf2 se evaluó en hígados de ratas tratadas PO QD×14. Las actividades enzimáticas de NQO1 y GST fueron inducidas de una manera dependiente de la dosis.

FIGS. 31a y b - Efectos de 63415 en la inducción de la actividad enzimática diana de Nrf2 en diversos tejidos de monos cynomolgus: (a) Actividad de NQO1; (b) Actividad de GSR.

25 FIGS. 32a y b - Concentración de RTA 408 en el hígado, pulmón y cerebro de ratón, y actividad de NQO1 en hígado de ratón después de 14 días de administración oral diaria. (a) Distribución de tejido de RTA 408 en ratones después de 14 días de administración oral diaria. Los datos representan la media ± SD de concentraciones de RTA 408 en el tejido recogido 4 h después de la dosis final del estudio. Los números encima de las barras de error son representativos de la media. (b) Correlación de contenido de RTA 408 en hígado de ratón con la actividad enzimática de NQO1. El contenido de RTA 408 en hígado de ratón individual se representó frente a la actividad enzimática individual de este informe.

30 FIGS. 33a y b - Concentración de RTA 408 en plasma, hígado, pulmón y cerebro de rata, y actividad de NQO1 en hígado de rata después de 14 días de administración oral diaria. (a) Distribución de tejido de RTA 408 en ratas después de 14 días de administración oral diaria. Los datos representan la media ± SD de concentraciones de RTA 408 en el tejido recogido 4 h después de la dosis final del estudio. Los números encima de las barras de error son representativos de la media. * Dos valores fueron excluidos del cálculo de la media, debido a que son valores atípicos, definidos como valores que causan que el conjunto de datos falle en el ensayo de normalidad de Shapiro-Wilk. (b) Correlación de contenido de RTA 408 en hígado de rata con actividad enzimática de NQO1. El contenido de RTA 408 en hígado de rata individual se representó frente a la actividad enzimática individual de este informe. Los tejidos del grupo de dosis de 100 mg/kg de RTA 408 se recogieron en el día 6, y las toxicidades observadas en este grupo impidieron las evaluaciones de la actividad enzimática de NQO1 en hígado.

40 FIGS. 34a y b - Efecto del tratamiento con 63415 en la activación de Nrf2 en PBMC de monos: (a) NQO1 en PMBC frente a Concentración en Plasma; (b) NQO1 en Pulmón frente a NQO1 en PMBC.

FIG. 35 - Resumen de estudio de toxicidad en monos de 14 días de 63415. Todas las dosis fueron bien toleradas sin signos clínicos adversos. Los datos de la química clínica no sugieren toxicidad obvia.

45 FIG. 36 - Efecto del tiempo de dosificación en la concentración en plasma de RTA 408 después de la administración oral y ocular tópica. La concentración en plasma de RTA 408 también se midió después de 5 días de la administración ocular tópica diaria de RTA 408 y se determinó que permanecía relativamente consistente de las mediciones tomadas después del primer día.

FIGS. 37a y b - Correlación de la exposición a RTA 408 en plasma de mono con expresión de ARNm de NQO1 y SRXN1 en PBMC: (a) NQO1; (b) SRXN1.

50 FIG. 38 - Concentración de RTA 408 en varios tejidos o fluidos dentro del ojo como una función del tiempo después de 5 días de dosificación ocular tópica. La concentración de RTA 408 en plasma también se midió después de la administración ocular tópica.

FIG. 39 - Efecto de RTA 408 en la incidencia de dermatitis grado 3 causada por exposición a la radiación aguda para diferentes concentraciones de RTA 408 administrado tópicamente.

- FIG. 40 - Efecto de RTA 408 en la incidencia de dermatitis grado 2 causada por exposición a la radiación aguda durante un curso de tratamiento de 30 días para diferentes concentraciones de RTA 408 administrado tópicamente.
- FIG. 41 - Efecto de RTA 408 en la incidencia de dermatitis grado 2 causada por exposición a la radiación aguda durante un curso de tratamiento de 28 días para diferentes concentraciones de RTA 408 administrado oralmente.
- 5 FIGS. 42a y b - (a) Análisis del área bajo la curva de la puntuación clínica de la dermatitis como una función del tiempo para cada uno de los diferentes grupos de control, incluyendo todos los animales utilizados en el ensayo. (b) Análisis del área bajo la curva de la puntuación clínica de la dermatitis como una función de la duración de esta puntuación para cada uno de los diferentes grupos de control, incluyendo sólo los animales que completaron los 30 días completos en el ensayo.
- 10 FIG. 43 - 1ª puntuación ciega promedio de la dermatitis por radiación aguda como una función del tiempo para no tratado, no tratado sin exposición a la radiación, vehículo solamente y tres cantidades orales de RTA 408 a 3, 10, y 30 mg/kg. La puntuación de dermatitis se basó en una escala que 0 fue completamente sano, 1-2 exhibieron eritema leve a moderado con descamación mínima a ligera, 3-4 exhibieron descamación y eritema moderado a severo, y 5 exhibieron una úlcera franca.
- 15 FIG. 44 -Puntuación media de la dermatitis por radiación aguda como una función del tiempo para no tratado, no tratado sin exposición a la radiación, vehículo solamente y tres cantidades orales de RTA 408 a 3, 10 y 30 mg/kg medidos cada dos días desde el día 4 al día 30. La puntuación de dermatitis se basó en una escala que 0 fue completamente sano, 1-2 exhibieron eritema leve a moderado con descamación mínima a ligera, 3-4 exhibieron descamación y eritema moderado a severo, y 5 exhibieron una úlcera franca.
- 20 FIG. 45 - Puntuación media de la dermatitis por radiación aguda como una función del tiempo para no tratado, no tratado sin exposición a la radiación, vehículo solamente y tres cantidades tópicas de RTA 408 a 0,01%, 0,1% y 1% medidos cada dos días desde el día 4 al día 30. La puntuación de dermatitis se basó en una escala que 0 fue completamente sano, 1-2 exhibieron eritema leve a moderado con descamación mínima a ligera, 3-4 exhibieron descamación y eritema moderado a severo, y 5 exhibieron una úlcera franca.
- 25 FIG. 46 - Puntuaciones clínicas de dermatitis por radiación fraccional representadas frente al tiempo y los cambios en la puntuación de dermatitis para cada grupo de ensayo. La puntuación de dermatitis se basó en una escala que 0 fue completamente sano, 1-2 exhibieron eritema leve a moderado con descamación mínima a ligera, 3-4 exhibieron descamación y eritema moderado a severo, y 5 exhibieron una úlcera franca.
- 30 FIG. 47 - Gráfica del análisis de AUC que muestra la puntuación de dermatitis (severidad × días) para cada uno de los grupos de ensayo durante el período completo de observación. Las puntuaciones de dermatitis se evaluaron cada dos días desde el día 4 al día 30 del estudio.
- 35 FIGS. 48a y b - (a) Gráfica de la absorbancia a 595 nm para la línea celular de cáncer de próstata LNCaP tratada que muestra el efecto citotóxico relativo en las células tratadas con un agente quimioterapéutico y RTA 408 frente a RTA 408 solo. (b) Gráfica de la absorbancia a 595 nm para la línea celular de cáncer de próstata DU-145 tratada que muestra el efecto citotóxico relativo en las células tratadas con un agente quimioterapéutico y RTA 408 frente a RTA 408 solo.
- 40 FIG. 49 - Versiones en blanco y negro de fotografías a color de formación de imágenes de ratones que muestran la actividad de luciferasa de los tumores de tres ratones: un animal de control sin tratamiento, un animal sometido sólo a radiación ionizante (una dosis única, 18 Gy), y un animal al que se administró tanto radiación ionizante (dosis única, 18 Gy, día 0) como RTA 408 (17,5 mg/kg ip, una vez al día en los días -3 a -1, luego dosis únicas en los días 1, 3 y 5). Los colores indicados por las flechas son indicativos de la intensidad, representándose las intensidades por rojo, amarillo, verde, y azul en orden de intensidad más alta a más baja.
- 45 FIG. 50 - Reducción de las concentraciones de proteínas de humor acuoso para diferentes formulaciones de RTA 408 (barras oscuras) en comparación con los valores de la bibliografía para MaxiDex® (0,1% dexametasona) y mapracorat (barras claras) después de la inducción de paracentesis.
- FIG. 51 - Supresión dependiente de la dosis de NO *in vivo* por 63415. Ratones CD-1 (n = 6) se dosificaron con DMSO o AIM por sonda oral. LPS (5 mg/kg) se administró 24 h más tarde. Veinticuatro horas después de la administración de LPS, se recogió sangre completa para ensayo de NO. La inhibición de NO se determinó por reacción de Griess de plasma desproteínado, reducido.
- 50 FIG. 52 - Distribución extensa de 63415 (RTA 408) en tejidos de ratón. Los ratones se dosificaron PO QD×3, ya sea con 25 mg/kg de 63415 (RTA 408) ó 25 mg/kg de RTA 405. Sangre (plasma y sangre completa) y tejidos (cerebro, hígado, pulmón y riñón) se recogieron 6 h después de la última dosis. Se realizó un análisis semi-cuantitativo del contenido de fármaco. Se observaron niveles notables en el SNC.
- 55 FIG. 53 - Inducción de la actividad de NQO1 en el hígado, pulmón y riñón de ratón por 63415. Los ratones se dosificaron PO QD×3 con 25 mg/kg. Los tejidos se recogieron 6 h después de la última dosis, y se realizó el análisis

de la actividad de NQO1. Se observó activación significativa de NQO1 en múltiples tejidos.

FIG. 54 - Resumen del estudio de toxicidad en ratón de 14 días de 63415. Ratones C57BL/6 fueron dosificados PO QD×14. Los puntos finales incluyeron la supervivencia, peso y químicas clínicas. Todos los animales sobrevivieron a los 14 días. No ocurrieron cambios de peso significativos en comparación con el grupo de vehículo, y no hubo evidencia de toxicidad a ninguna dosis sobre la base de las químicas clínicas.

FIG. 55 - Distribución de tejido de 63415 del estudio de toxicidad en ratón de 14 días en ratones C57BL/6. Se recogieron muestras de cerebro, pulmón e hígado 4 h después de la dosis final y se cuantificó para el contenido de 63415 utilizando el método de LC/MS/MS sensible. Las exposiciones a 10 y 100 mg/kg en pulmón excedieron la Cl_{50} *in vitro* para la inducción de NO por 55 y 1.138 veces, respectivamente. La exposición a 10 y 100 mg/kg en el cerebro excedieron la Cl_{50} *in vitro* para la inducción de NO por 29 y 541 veces, respectivamente.

FIG. 56 - Distribución de tejido de 63415 en ratas Sprague Dawley. Los tejidos se recogieron cuatro horas después de la dosificación final en el día 14 o día 6 (100 mg/kg), se extrajeron, y se cuantificaron para contenido de 63415 utilizando un método de LC/MS/MS sensible. El compuesto 63415 se distribuye bien en los tejidos diana. Las exposiciones a 10 mg/kg en el pulmón y cerebro excedieron la Cl_{50} *in vitro* para la inhibición de NO por 294 y 240 veces, respectivamente.

FIG. 57 - Distribución de tejido diana del compuesto 63415 en monos cynomolgus. Los tejidos se recogieron cuatro horas después de la dosificación final en el Día 14. El contenido de compuesto 63415 se extrajo y cuantificó utilizando un método de LC/MS/MS sensible.

FIG. 58 - Espectro de FT-Raman ($3.400-50\text{ cm}^{-1}$) de la muestra PP415-P1, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1).

FIG. 59 – Patrón de PXRD ($1,5-55,5^\circ 2\theta$) de la muestra PP415-P1, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1).

FIG. 60 - Termograma de TG-FTIR ($25-350^\circ\text{C}$) de la muestra PP415-P1, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1).

FIG. 61 - Espectro de $^1\text{H-RMN}$ en DMSO-d_6 de la muestra PP415-P1, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1).

FIG. 62 - Termograma de DSC de la muestra PP415-P1, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1).

FIG. 63 - Isotherma de DVS de la muestra PP415-P1, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1).

FIG. 64 - El espectro de FT-Raman de la muestra PP415-P1, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1), después de la medición de DVS (parte superior) está inalterado en comparación con el material antes de la medición de DVS (parte inferior). Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 65 - El patrón de PXRD de la muestra PP415-P1, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1), después de la medición de DVS (parte superior) está inalterado en comparación con el material antes de la medición de DVS (parte inferior). Los patrones no se han escalado pero están desplazados en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 66 – El patrón de PXRD de la muestra PP415-P40 (parte superior) corresponde al patrón de la forma de solvato (Clase 2) (parte inferior, muestra PP415-P19). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para propósito de comparación.

FIG. 67 – Los patrones de PXRD de las muestras de estabilidad de PP415-P2a (parte superior), PP415-P3a (2° desde la parte superior), PP415-P4a (parte media), y PP415-P5a (2° desde la parte inferior), que corresponde a la forma amorfa (Clase 1), después de una semana no muestran diferencias en comparación con el material de partida en el punto de tiempo t_0 (parte inferior, muestra PP415-P1). Los patrones no son escalados, pero están desplazados en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 68 – Los patrones de PXRD de las muestras de estabilidad de PP415-P2b (parte superior), PP415-P3b (2° desde la parte superior), PP415-P4b (parte media), y PP415-P5b (2° desde la parte inferior), que corresponde a la forma amorfa (Clase 1), después de dos semanas no muestran diferencias en comparación con el material de partida en el punto de tiempo t_0 (parte inferior, muestra PP415-P1). Los patrones no son escalados, pero están desplazados en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 69 – Los patrones de PXRD de las muestras de estabilidad de PP415-P2c (parte superior), PP415-P3c (2° desde la parte superior), PP415-P4c (parte media), y PP415-P5c (2° desde la parte inferior), que corresponde a la forma amorfa (Clase 1), después de cuatro semanas no muestran diferencias en comparación con el material de partida en el punto de tiempo t_0 (parte inferior, muestra PP415-P1). Los patrones no son escalados, pero están desplazados en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 70 – Los espectros de FT-Raman ($2.400-50\text{ cm}^{-1}$) de las muestras de la forma de solvato (Clase 2) (PP415-P7:

parte superior; PP415-P8: 2° desde la parte superior; PP415-P9: 3° desde la parte superior; PP415-P10: 4° desde la parte superior; PP415-P11: parte media; PP415-P15: 4° desde la parte inferior; PP415-P17: 3° desde la parte inferior; PP415-P21: 2° desde la parte inferior; PP415-P24: parte inferior). Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

5 FIG. 71 – El espectro de FT-Raman ($1.750-1.000\text{ cm}^{-1}$) de la forma de solvato (Clase 2) (PP415-P7: parte superior) claramente difiere del espectro de la forma amorfa (Clase 1) (PP415-P1: parte inferior). Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

10 FIG. 72 – Los espectros de FT-Raman ($1.750-1.000\text{ cm}^{-1}$) de la clase 2 (muestra PP415-P19: parte superior), clase 3 (muestra PP415-P6: 2° desde la parte superior), clase 4 (muestra PP415-P13: 2° desde la parte inferior), y clase 5 (muestra PP415-P14: parte inferior) difieren significativamente entre sí. Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

15 FIG. 73 – Los patrones de PXRD ($2-32\text{ }^{\circ}2\theta$) de las muestras de la forma de solvato (Clase 2) (PP415-P7: parte superior; PP415-P8: 2° desde la parte superior; PP415-P10: 3° desde la parte superior; PP415-P15: 4° desde la parte superior; PP415-P17: parte media; PP415-P18: 4° desde la parte inferior; PP415-P19: 3° desde la parte inferior; PP415-P21: 2° desde la parte inferior; PP415-P24: parte inferior). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

20 FIG. 74 - Los patrones de PXRD ($11-21\text{ }^{\circ}2\theta$) de algunas muestras de la forma de solvato (Clase 2) (PP415-P7: parte superior; PP415-P8: 2° desde la parte superior; PP415-P10: parte media; PP415-P21: 2° desde la parte inferior; PP415-P24: parte inferior). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 75 – Los patrones de PXRD ($2-32\text{ }^{\circ}2\theta$) de la clase 2 (muestra PP415-P19: parte superior), clase 3 (muestra PP415-P6: 2° desde la parte superior), clase 4 (muestra PP415-P13: 2° desde la parte inferior), y clase 5 (muestra PP415-P14: parte inferior) son claramente diferentes. Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

25 FIG. 76 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P7, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).

FIG. 77 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P21, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).

FIG. 78 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P24, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).

FIG. 79 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P29, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).

FIG. 80 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P47, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).

30 FIG. 81 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P48, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).

FIG. 82 – Los espectros de FT-Raman ($1.800-700\text{ cm}^{-1}$) de la forma de solvato (Clase 2) (parte inferior, muestra PP415-P7) y de la forma seca de solvato (Clase 2) (parte superior, muestra PP415-P30) son similares y muestran sólo pequeñas diferencias que apenas se pueden distinguir dentro de la gráfica. Los espectros son escalados para el propósito de comparación.

35 FIG. 83 – El patrón de PXRD de la forma seca de solvato (Clase 2), muestra PP415-P30 (parte superior) en comparación con el patrón de la forma de solvato (Clase 2), muestra PP415-P7 (parte inferior). Los patrones no son escalados, pero están desplazados en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 84 - Termograma de TG-FTIR de la muestra seca PP415-P30, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).

40 FIG. 85 – El espectro de FT-Raman de la muestra seca PP415-P18 (gris claro) es idéntico al espectro de la muestra original PP415-P15 (gris oscuro) y muestra sólo pequeñas diferencias que difícilmente se pueden distinguir dentro de la gráfica. Los espectros se han escalado para el propósito de comparación.

45 FIG. 86 – El patrón de PXRD de la muestra seca PP415-P18 (parte superior) muestra pequeñas diferencias del patrón de la muestra original PP415-P15 (parte inferior), aunque ambas formas de solvato (Clase 2). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 87 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P18, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).

50 FIG. 88 – El espectro de FT-Raman de la muestra PP415-P17 (parte superior) es casi idéntico a los espectros de las muestras secas PP415-P19 (parte media) y PP415-P32 (parte inferior) y muestra sólo pequeñas diferencias que difícilmente se pueden distinguir dentro de la gráfica. Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

- 5 FIG. 89 – El patrón de PXRD de la muestra seca PP415-P19 (parte media) es diferente del patrón de la muestra original PP415-P17 (parte superior) pero aún corresponde a la forma clase 2. El patrón de la muestra adicionalmente seca PP415-P32 (parte inferior) muestra picos más amplios con una menor relación de S/N. El material es menos cristalino, pero aún corresponde a forma clase 2. Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- FIG. 90 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P19, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).
- FIG. 91 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P32A, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).
- 10 FIG. 92 – El espectro de FT-Raman de la muestra PP415-P21 (parte superior) es idéntico a los espectros de las muestras secas PP415-P28 (parte media) y PP415-P34 (parte inferior). Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- 15 FIG. 93 – Los patrones de PXRD de las muestras secas PP415-P28 (parte media) y PP415-P34 (parte inferior) muestran picos más amplios con una relación inferior de S/N, que indica una menor cristalinidad de las muestras en comparación con el patrón de la muestra original PP415-P21 (parte superior). Los patrones son algo diferentes, pero aún corresponden a la forma clase 2. Se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- FIG. 94 - Termograma de TG-FTIR de la muestra seca PP415-P28, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).
- FIG. 95 - Termograma de TG-FTIR de la muestra seca PP415-P34, que corresponde a una forma de solvato (Clase 2).
- 20 FIG. 96 – Los espectros de FT-Raman ($2.400-50\text{ cm}^{-1}$) de las muestras de la forma de solvato (Clase 3) (PP415-P6: parte superior; PP415-P12: parte media; PP415-P20: parte inferior) Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- 25 FIG. 97 – Los espectros de FT-Raman ($1.750-1.000\text{ cm}^{-1}$) de las muestras de la forma de solvato (Clase 3) (PP415-P6: parte superior; PP415-P12: 2° desde la parte superior; PP415-P20: 2° desde la parte inferior) son muy similares entre sí, con sólo pequeñas diferencias, por ejemplo, a $\sim 1.690\text{ cm}^{-1}$, pero son claramente diferentes de la clase 1 (PP415-P1: parte inferior). Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- 30 FIG. 98 – Los patrones de PXRD ($2-32\text{ }^\circ 2\theta$) de las muestras de la forma de solvato (Clase 3) (PP415-P6: parte superior; PP415-P12: parte media; PP415-P20: parte inferior). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- FIG. 99 – Los patrones de PXRD ($13,5-18,5\text{ }^\circ 2\theta$) de las muestras de forma de solvato (Clase 3) (PP415-P6: parte superior; PP415-P12: parte media; PP415-P20: parte inferior) muestran pequeñas diferencias. Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- FIG. 100 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P6, que corresponde a la forma de solvato (Clase 3).
- 35 FIG. 101 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P12, que corresponde a la forma de solvato (Clase 3).
- FIG. 102 - Termograma de TG-FTIR de la forma seca de solvato (Clase 3), muestra PP415-P25.
- FIG. 103 - Termograma de TG-FTIR de la forma adicionalmente seca de solvato (Clase 3), muestra PP415-P33.
- 40 FIG. 104 - Los espectros de FT-Raman ($1.800-700\text{ cm}^{-1}$) de la forma de solvato (Clase 3) (parte superior, muestra PP415-P6), de la forma seca de solvato (Clase 3) (parte media, muestra PP415-P25), y de la forma adicionalmente seca de solvato (Clase 3) (parte inferior, muestra PP415-P33) son idénticos. Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- 45 FIG. 105 - Los patrones de PXRD ($4-24\text{ }^\circ 2\theta$) de la forma de solvato (Clase 3) (parte superior, muestra PP415-P6), de la forma seca de solvato (Clase 3) (parte media, muestra PP415-P25), y de la forma adicionalmente seca de solvato (Clase 3) (parte inferior, muestra PP415-P33). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- FIG. 106 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P13, que corresponde a una forma de solvato de acetonitrilo (Clase 4).
- 50 FIG. 107 – Los espectros de FT-Raman ($1.800-700\text{ cm}^{-1}$) de la forma de solvato de acetonitrilo (Clase 4) (gris oscuro, muestra PP415-P13) y del material seco de una forma de solvato de acetonitrilo (Clase 4) (gris claro, muestra PP415-P26) son idénticos y se superponen perfectamente. Los espectros se han escalado para propósitos de comparación.

- FIG. 108 - Patrón de PXRD de la forma seca de solvato de acetonitrilo (Clase 4), muestra PP415-P26 (parte inferior), en comparación con el patrón de referencia de la forma de solvato de acetonitrilo (Clase 4), muestra PP415-P13 (parte superior). Los patrones no se han escalado pero se desplazaron en la dirección y para propósitos de comparación.
- 5 FIG. 109 - Termograma de TG-FTIR de la forma seca de solvato de acetonitrilo (Clase 4), muestra PP415-P26.
- FIG. 110 – Los espectros de FT-Raman ($1.800-700\text{ cm}^{-1}$) de la forma de solvato de acetonitrilo (Clase 4) (parte superior, muestra PP415-P35), y de la forma seca de solvato de acetonitrilo (Clase 4) (parte media, muestra PP415-P36 y parte inferior, muestra PP415-P37) corresponden entre sí. Los espectros se han escalado y desplazado en la dirección y para propósitos de comparación.
- 10 FIG. 111 – Los patrones de PXRD ($4-24\text{ }^{\circ}2\theta$) de la forma de solvato de acetonitrilo (Clase 4) (parte superior, muestra PP415-P35) y de la forma seca de solvato de acetonitrilo (Clase 4) (parte media, muestra PP415-P36 y parte inferior, muestra PP415-P37) concuerdan entre sí. Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- FIG. 112 - Termograma de TG-FTIR de la forma seca de solvato de acetonitrilo (Clase 4), muestra PP415-P36.
- 15 FIG. 113 - Termograma de TG-FTIR de la forma seca de solvato de acetonitrilo (Clase 4), muestra PP415-P37.
- FIG. 114 - Isotherma de DVS de la forma desolvatada de solvato de acetonitrilo (Clase 4) muestra PP415-P37).
- FIG. 115 – El patrón de PXRD de la muestra PP415-P37, una forma de solvato de acetonitrilo (Clase 4) después de la medición de DVS (parte inferior) está inalterado en comparación con el material antes de la medición de DVS (parte superior). Los patrones no se han escalado sino que son desplazados en la dirección y para el propósito de comparación.
- 20 FIG. 116 - Termograma de DSC de la forma desolvatada de solvato de acetonitrilo (Clase 4) (muestra PP415-P37).
- FIG. 117 - Termograma de DSC de una mezcla ~ 1:1 de la forma amorfa (Clase 1), muestra PP415-P1, con la forma desolvatada de solvato de acetonitrilo (Clase 4), muestra PP415-P36.
- FIG. 118 - Termograma de DSC de una mezcla ~ 1:1 de la forma amorfa (Clase 1), muestra PP415-P1, con la forma desolvatada de solvato de acetonitrilo (Clase 4), muestra PP415-P36 (número de experimento: PP415-P39). El barrido de calentamiento (Etapa 1) se detuvo durante 30 min a 173°C (Etapa 2) y luego se reanudó (Etapa 3).
- 25 FIG. 119 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P14, que corresponde a una forma de solvato de THF (Clase 5).
- FIG. 120 – Los espectros de FT-Raman ($1.800-1.100\text{ cm}^{-1}$) de una forma de solvato de THF (Clase 5) (línea discontinua, muestra PP415-P 14), material seco de una forma de solvato de THF (Clase 5) (línea de puntos, muestra PP415-P27), y de la forma amorfa (Clase 1) (línea continua, muestra PP415-P1). Los espectros se han escalado para el propósito de comparación y muestran pequeños cambios de magnitud, pero poco cambio correspondiente de forma espectral.
- 30 FIG. 121 - Patrón de PXRD de la forma de solvato de THF seca (Clase 5), muestra PP415-P27 (parte superior) en comparación con el patrón de la forma de solvato de THF (Clase 5), muestra PP415-P14 (parte inferior). Los patrones no se han escalado sino son desplazados en la dirección y para el propósito de comparación.
- 35 FIG. 122 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P27, que corresponde a un solvato de THF seco (Clase 5).
- FIG. 123 – El patrón de PXRD de la muestra PP415-P41 (parte superior) corresponde al patrón de la forma de solvato de THF (Clase 5) (parte media, muestra PP415-P14) y no al patrón de la forma de solvato de heptano, (Clase 2) (parte inferior, muestra PP415-P19). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para propósitos de comparación.
- 40 FIG. 124 – El patrón de PXRD de la muestra PP415-P45 (parte superior) corresponde al patrón de la forma de solvato de THF (Clase 5) (parte media, muestra PP415-P14) y no al patrón de la forma de solvato de heptano (Clase 2) (parte inferior, muestra PP415-P19). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.
- 45 FIG. 125 – El patrón de PXRD de la muestra PP415-P41 (parte superior) corresponde a una forma de solvato de THF (Clase 5). Después de secar la muestra PP415-P41 durante 1 día (2° desde la parte superior, muestra: PP415-P44), el material es principalmente amorfo. Permanecen algunos picos amplios con baja intensidad. Después del secado adicional durante la noche (2° desde la parte inferior, muestra PP415-P44a) la intensidad de estos picos amplios se reduce adicionalmente. La forma amorfa (Clase 1) se muestra como una referencia (parte inferior, muestra: PP415-P42). Los patrones no se han escalado sino son desplazados en la dirección y para el propósito de
- 50

comparación.

FIG. 126 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P44a, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1).

FIG. 127 – El patrón de PXRD de la muestra PP415-P45 (parte superior) corresponde a una forma de solvato de THF (Clase 5). Después de secar la muestra PP415-P45 durante 1 día (2° desde la parte superior, muestra PP415-P46), el material es principalmente amorfo. Permanecen algunos picos amplios con baja intensidad. Después de un total de 4 días de secado (2° desde la parte inferior, muestra PP415-P46a), el patrón permanece inalterado. La forma amorfa (Clase 1) se muestra como referencia (parte inferior, muestra PP415-P42). Los patrones no se han escalado sino son desplazados en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 128 - Termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P46a, que corresponde a la forma amorfa (Clase 1).

FIG. 129 – El patrón de PXRD de la muestra PP415-P42 (parte superior) corresponde al patrón de la forma amorfa (Clase 1) (parte inferior, muestra PP415-P1). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 130 – El patrón de PXRD de la muestra PP415-P43 (parte superior) corresponde al patrón de la forma de solvato isoestructural (Clase 2) (parte inferior, muestra PP415-P19) y no al patrón de la forma de solvato de THF (Clase 5) (parte media, muestra PP415-P14). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 131 – Los patrones de PXRD de las muestras PP415-P47 (parte superior) y PP415-P48 (parte media) corresponden esencialmente al patrón de las formas de solvato isoestructurales (Clase 2) (parte inferior, muestra PP415-P19), aunque hay algunas diferencias. Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

FIG. 132 - El patrón de PXRD de la muestra PP415-P49 (parte superior) corresponde al patrón de la forma amorfa (Clase 1) (parte inferior, muestra PP415-P1). Los patrones se han escalado y desplazado en la dirección y para el propósito de comparación.

Descripción de realizaciones ilustrativas

La presente invención proporciona en un aspecto el compuesto:

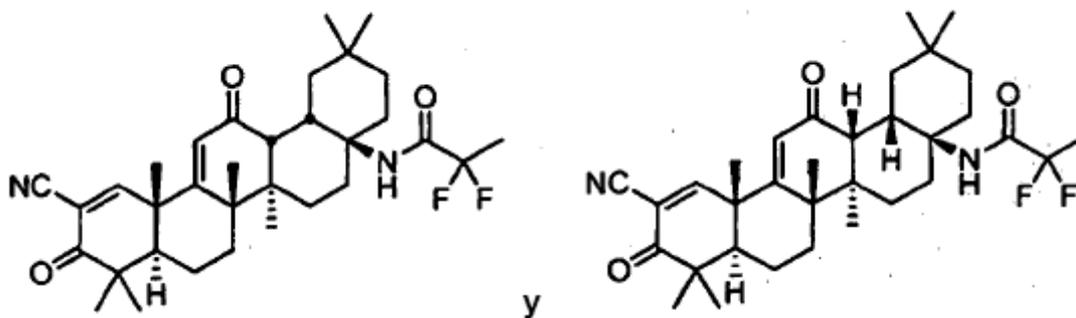
N-((4a*S*,6a*R*,6b*S*,8a*R*,12a*S*,14a*R*,14b*S*)-11-ciano-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametil-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-octadecahidropicen-4a-il)-2,2-difluoropropanamida,

que también es referido en la presente como RTA 408, 63415, o PP415. En otros aspectos no limitantes, la presente invención también proporciona formas polimórficas del mismo, incluyendo solvatos del mismo. En otros aspectos no limitantes, la invención también proporciona sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En otros aspectos no limitantes, también se proporcionan métodos para la preparación, composiciones farmacéuticas y kits y artículos de fabricación de estos compuestos y formas polimórficas de los mismos.

I. Definiciones

Cuando se utiliza en el contexto de un grupo químico: “hidrógeno” significa -H; “hidroxi” significa -OH; “oxo” significa =O; “carbonilo” significa -C(=O)-; “carboxi” significa -C(=O)OH (también escrito como -COOH o -CO₂H); “halo” significa independientemente -F, -Cl, Br o -I; “amino” significa -NH₂; “hidroxiamino” significa -NHOH; “nitro” significa -NO₂; imino significa =NH; “ciano” significa -CN; “isocianato” significa -N=C=O; “azido” significa -N₃; en un contexto monovalente “fosfato” significa -OP(O)(OH)₂ o una forma desprotonada del mismo; en un contexto divalente “fosfato” significa -OP(O)(OH)O- o una forma desprotonada del mismo; “mercapto” significa -SH; y “tio” significa =S; “sulfonilo” significa -S(O)₂-; y “sulfonilo” significa -S(O)-. Cualquier valencia no definida en un átomo de una estructura mostrada en esta solicitud representa implícitamente un átomo de hidrógeno unido al átomo.

En el contexto de esta descripción, las fórmulas:



representan las mismas estructuras. Cuando un punto se dibuja en un carbono, el punto indica que el átomo de hidrógeno unido a ese carbono está saliendo del plano de la página.

5 El uso de la palabra “un” o “uno”, cuando se utiliza junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.

10 A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio. Cuando se utiliza en el contexto de la difracción en polvo de rayos X, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar un valor de $\pm 0.2^\circ 2\theta$ del valor reportado, preferiblemente un valor de $\pm 0,1^\circ 2\theta$ del valor reportado. Cuando se utiliza en el contexto de las temperaturas de transición vítrea o calorimetría de barrido diferencial, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar un valor de $\pm 10^\circ\text{C}$ con respecto al máximo del pico, preferiblemente un valor de $\pm 2^\circ\text{C}$ con respecto al máximo del pico. Cuando se utiliza en otros contextos, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar un valor de $\pm 10\%$ del valor reportado, preferiblemente un valor de $\pm 5\%$ del valor reportado. Debe entenderse que, siempre que se utilice el término “aproximadamente”, también se incluye una referencia específica al valor numérico exacto indicado.

20 Los términos “comprender”, “tener” e “incluir” son verbos copulativos ilimitados. Cualesquiera formas o tiempos de uno o más de estos verbos, tales como “comprende”, “que comprende”, “tiene”, “que tiene”, “incluye” y “que incluye”, también son ilimitados. Por ejemplo, cualquier método que “comprende”, “tiene” o “incluye” una o más etapas no se limita a sólo aquellos que poseen una o más etapas y también cubre otras etapas no listadas.

25 El término “efectivo”, como ese término se utiliza en la especificación y/o reivindicaciones, significa adecuado para lograr un resultado deseado, esperado, o pretendido. “Cantidad efectiva”, “cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad farmacéuticamente efectiva” cuando se utiliza en el contexto de tratamiento de un paciente o sujeto con un compuesto significa que la cantidad de compuesto que, cuando se administra a un sujeto o paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad.

El término “pico de halo” en el contexto de la difracción en polvo de rayos X significaría un pico amplio, a menudo abarcando $> 10^\circ 2\theta$ en un difractograma de polvo de rayos X, típicamente característico de un sistema o sólido amorfo.

30 El término “hidrato” cuando se utiliza como un modificador para un compuesto significa que el compuesto tiene menos de una (por ejemplo, hemihidrato), una (por ejemplo, monohidrato), o más de una (por ejemplo, dihidrato) moléculas de agua asociadas con cada molécula de compuesto, como en formas sólidas del compuesto.

35 Como se utiliza en la presente, el término “ CI_{50} ” se refiere a una dosis inhibidora que es 50% de la respuesta máxima obtenida. Esta medición cuantitativa indica cuánto de un fármaco particular u otra sustancia (inhibidor) se necesita para inhibir a la mitad un proceso biológico, bioquímico, o químico dado (o componente de un proceso, es decir, una enzima, célula, receptor de células o microorganismo).

Un “isómero” de un primer compuesto es un compuesto separado en el cual cada molécula contiene los mismos átomos constituyentes que el primer compuesto, pero donde la configuración de esos átomos en tres dimensiones difiere.

40 Como se utiliza en la presente, el término “paciente” o “sujeto” se refiere a un organismo mamífero vivo, tal como un ser humano, mono, vaca, oveja, cabra, perro, gato, ratón, rata, cobaya, o especie transgénica de los mismos. En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto es un animal no humano. En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto es un primate. En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto es un ser humano. Los ejemplos no limitantes de sujetos humanos son adultos, jóvenes, lactantes y fetos.

45 Como se utiliza en la presente generalmente “farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para

el uso en contacto con los tejidos, órganos, y/o fluidos corporales de los seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones proporcionadas con una relación razonable de beneficio/riesgo.

5 “Sales farmacéuticamente aceptables” significa sales de los compuestos de la presente invención que son farmacéuticamente aceptables, como se define anteriormente, y que poseen la actividad farmacológica deseada. Tales sales incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o con ácidos orgánicos tales como ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 3-fenilpropiónico, 4,4'-metilbis(ácido 3-hidroxi-2-en-1-carboxílico), ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-en-1-carboxílico, ácido acético, ácidos
10 mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos sulfúricos alifáticos, ácidos sulfúricos aromáticos, ácido bencensulfónico, ácido benzoico, ácido canforsulfónico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido etanosulfónico, ácido fumárico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido hidroxinaftoico, ácido láctico, ácido laurilsulfúrico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido mucónico, ácido *o*-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido
15 oxálico, ácido *p*-clorobenzenosulfónico, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácido propiónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido terciariobutilacético, ácido trimetilacético, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición de bases que se pueden formar cuando los protones ácidos presentes son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de sodio, carbonato de sodio,
20 hidróxido de potasio, hidróxido de aluminio e hidróxido de calcio. Las bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, *N*-metilglucamina y similares. Debe reconocerse que el anión o catión particular que forma parte de cualquier sal de esta invención no es crítico, siempre que la sal, como un todo, sea farmacológicamente aceptable. Los ejemplos adicionales de sales farmacéuticamente aceptables y sus métodos de preparación y uso se presentan en *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use* (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002).

“Prevención” o “prevenir” incluye: (1) inhibir el comienzo de una enfermedad en un sujeto o paciente que puede estar en riesgo y/o predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta o muestra alguna o toda la patología o sintomatología de la enfermedad, y/o (2) ralentizar el comienzo de la patología o sintomatología de una enfermedad en un sujeto o paciente que puede estar en riesgo y/o predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta o muestra alguna o toda la patología o sintomatología de la enfermedad.
30

“Profármaco” significa un compuesto que es convertible *in vivo* metabólicamente en un inhibidor de acuerdo con la presente invención. El propio profármaco puede o no puede también tener actividad con respecto a una proteína diana dada. Por ejemplo, un compuesto que comprende un grupo hidroxilo se puede administrar como un éster que se convierte por hidrólisis *in vivo* en el compuesto hidroxilo. Los ésteres adecuados que se pueden convertir *in vivo* en compuestos hidroxilo incluyen acetatos, citratos, lactatos, fosfatos, tartratos, malonatos, oxalatos, salicilatos, propionatos, succinatos, fumaratos, maleatos, metileno-bis- β -hidroxinaftoato, gentisatos, isetonatos, di-*p*-toluoliltartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, *p*-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos, quinatos, ésteres de aminoácidos, y similares. De manera similar, un compuesto que comprende un grupo amina se puede administrar como una amida que se convierte por hidrólisis *in vivo* en el compuesto amina.
35

Un “estereoisómero” o “isómero óptico” es un isómero de un compuesto dado en el cual los mismos átomos están unidos a los mismos otros átomos, pero donde la configuración de esos átomos en tres dimensiones difiere. Los “enantiómeros” son estereoisómeros de un compuesto dado que son imágenes especulares entre sí, como las manos izquierda y derecha. Los “diastereómeros” son estereoisómeros de un compuesto dado que no son enantiómeros. Las moléculas quirales contienen un centro quiral, también referido como un estereocentro o centro estereogénico, que es cualquier punto, aunque no necesariamente un átomo, en una molécula que porta grupos de tal manera que un intercambio de cualquiera de los dos grupos conduce a un estereoisómero. En los compuestos orgánicos, el centro quiral es típicamente un átomo de carbono, fósforo o azufre, aunque también es posible que otros átomos sean estereocentros en los compuestos orgánicos e inorgánicos. Una molécula puede tener múltiples estereocentros, dándole muchos estereoisómeros. En los compuestos cuyo estereoisomerismo se debe a los centros estereogénicos tetraédricos (por ejemplo, carbono tetraédrico), el número total de estereoisómeros hipotéticamente posibles no excederá 2^n , donde n es el número de estereocentros tetraédricos. Las moléculas con simetría con frecuencia tienen menos del número máximo posible de estereoisómeros. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se refiere como una mezcla racémica. Alternativamente, una mezcla de enantiómeros puede ser enantioméricamente enriquecida de modo que un enantiómero está presente en una cantidad mayor de 50%.
40 Típicamente, los enantiómeros y/o diastereómeros se pueden resolver o separar utilizando técnicas conocidas en la técnica. Se contempla que para cualquier estereocentro o eje de quiralidad para el cual no se ha definido la estereoquímica, este estereocentro o eje de quiralidad puede estar presente en su forma *R*, forma *S*, o como una mezcla de las formas *R* y *S*, incluyendo mezclas racémicas y no racémicas. Como se utiliza en la presente, la frase “sustancialmente libre de otros estereoisómeros” significa que la composición contiene $\leq 15\%$, más preferiblemente $\leq 10\%$, incluso más preferiblemente $\leq 5\%$, o lo más preferiblemente $\leq 1\%$ de otro(s) estereoisómero(s).
45
50
55
60

“Tratamiento” o “tratar” incluye (1) inhibir una enfermedad en un sujeto o paciente que experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, deteniendo el desarrollo adicional de la patología y/o

sintomatología), (2) mejorar una enfermedad en un sujeto o paciente que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, revertir la patología y/o sintomatología), y/o (3) efectuar cualquier disminución mensurable en una enfermedad en un sujeto o paciente que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad.

- 5 Las definiciones anteriores sustituyen cualquier definición en conflicto en cualquier referencia citada en la presente. El hecho de que ciertos términos se definan, sin embargo, no debe ser considerado como indicativo de que cualquier término que no se define es indefinido. Más bien, todos los términos utilizados se cree que describen la invención en términos tales que un experto puede apreciar el alcance y la práctica de la presente invención.

II. RTA 408 y Métodos Sintéticos

- 10 El RTA 408 se puede preparar de acuerdo con los métodos descritos en la sección de Ejemplos a continuación. Estos métodos se pueden modificar y optimizar adicionalmente utilizando los principios y técnicas de la química orgánica como se aplica por una persona experta en la técnica. Tales principios y técnicas se enseñan, por ejemplo, en *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure* (2007).

- 15 Debe reconocerse que el anión o catión particular, que forma parte de cualquier sal de esta invención no es crítico, siempre que la sal, como un todo, sea farmacológicamente aceptable. Los ejemplos adicionales de sales farmacéuticamente aceptables y sus métodos de preparación y uso se presentan en *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use* (2002).

- 20 Además, se pretende que los átomos que integran el RTA 408 de la presente invención incluyan todas las formas isotópicas de estos átomos. Los isótopos, como se utiliza en la presente, incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio, y los isótopos de carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C . De manera similar, se contempla que uno o más átomos de carbonos de un compuesto de la presente invención se puedan reemplazar por un átomo o átomos de silicio. Además, se contempla que uno o más átomos de oxígeno de RTA 408 se puedan reemplazar por un átomo o átomos de azufre o selenio.

- 25 El RTA 408 y forma polimórfica del mismo también pueden tener la ventaja de que pueden ser más eficaces que, ser menos tóxicos que, ser de acción más prolongada que, ser más potentes que, producir menos efectos secundarios que, ser más fácilmente absorbidos que, y/o tener un mejor perfil farmacocinético (por ejemplo, mayor biodisponibilidad oral y/o menor aclaramiento) que, y/o tener otras ventajas farmacológicas, físicas o químicas útiles sobre compuestos conocidos en la técnica anterior para el uso en las indicaciones establecidas en la presente.

30 III. Formas Polimórficas de RTA 408

- En algunas realizaciones, la presente invención proporciona diferentes formas sólidas de RTA 408, incluyendo solvatos del mismo. Se realizó un estudio de preformulación y polimorfismo preliminar, y se encontró que el RTA 408 tiene una alta tendencia a la formación de solvato. Las formas cristalinas de las clases 2, 3, 4 y 5 son consistentes con los solvatos. Para una descripción de las clases, véase la Tabla 1 a continuación. Los intentos de secar las clases 2 y 3 (dos grupos de solvatos isoestructurales) no fueron exitosos, lo cual es consistente con las moléculas de solvente fuertemente unidas. En algunas realizaciones, el secado de un sólido de clase 4 (solvato de acetonitrilo) condujo a una forma desolvatada isoestructural. En algunas realizaciones, el secado de un sólido de clase 5 (solvato de THF) resultó en la forma amorfa clase 1. Las formas no solvatadas de RTA 408 incluyen la forma amorfa (clase 1) y el solvato desolvatado cristalino de la clase 4 (isoestructural al solvato de acetonitrilo clase 4). En algunas realizaciones, la forma amorfa tiene una alta transición vítrea con $T_g \approx 153^\circ\text{C}$ ($\Delta\text{CP} = 0,72 \text{ J/g}^\circ\text{C}$) y es sólo ligeramente higroscópica ($\Delta\text{m} = +0,4\% \text{ 50\%} \rightarrow 85\% \text{ de h.r.}$). En algunas realizaciones, la forma amorfa es estable durante al menos cuatro semanas bajo condiciones de temperatura y humedad elevadas (es decir, abierto a $40^\circ\text{C}/75\% \text{ de h.r.}$ o cerrado a 80°C). En algunas realizaciones, la forma amorfa (clase 1) se preparó con éxito a partir de material clase 2 en un proceso de dos etapas (transformación en la clase 5 y posterior secado de la clase 5 para obtener la forma amorfa), así como en un método de una etapa directa (precipitación a partir de una disolución de acetona en un baño de agua fría). El solvato cristalino desolvatado de la clase 4 (isoestructural al solvato clase 4) es ligeramente higroscópico (ganancia de masa de $\sim 0,7\%$ en peso de 50% de h.r. a 85% de h.r.) y tiene un posible punto de fusión a $196,1^\circ\text{C}$ ($\Delta\text{H} = 29,31 \text{ J/g}$).

- 50 Una muestra de la forma amorfa de 63415, clase 1, se caracterizó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, titulación de Karl Fischer, ^1H -RMN, DSC, y DVS (véase la sección de Ejemplos para detalles adicionales). Se encontró que la muestra contiene $\sim 0,9\%$ en peso de EtOH con trazas de H_2O (de acuerdo con la TG-FTIR). Un contenido de agua de 0,5% en peso se determinó por titulación de Karl Fischer. La DSC muestra una alta temperatura de transición vítrea con $T_g \approx 153^\circ\text{C}$ ($\Delta\text{CP} = 0,72 \text{ J/g}^\circ\text{C}$). De acuerdo con DVS, el material es ligeramente higroscópico ($\Delta\text{m} = +0,4\% \text{ 50\%} \rightarrow 85\% \text{ de h.r.}$). No se observó cristalización en los experimentos de DSC o DVS.

- 55 La estabilidad química de la forma amorfa se investigó en solventes orgánicos, incluyendo acetona, EtOAc, MeOH, y MeCN, así como diferentes medios acuosos (por ejemplo, 1% Tween 80 ac., 1% SDS ac., 1% CTAB ac.) a una concentración de 1 mg/mL en puntos de tiempo de 6 h, 24 h, 2 d, y 7 d. Se observó descomposición $\geq 1\%$ solamente para disoluciones en MeCN después de 7 días y para suspensiones en el medio de Tween 80 acuoso al 1% (en

ES 2 634 315 T3

todos los puntos de tiempo a 254 nm y después de 24 h, 2 d, y 7 d a 242 nm).

Además, la estabilidad de la forma amorfa se investigó por el almacenamiento bajo condiciones de temperatura y humedad elevadas (abierto a 25°C/62% h.r. y 40°C/75% h.r. y cerrado a 60°C y 80°C). Después de una semana, dos semanas, y cuatro semanas, las muestras almacenadas se analizaron por PXRD. Ninguna de las muestras difirió del material de partida amorfo.

5

Se realizaron más de 30 experimentos de cristalización y secado, incluyendo el equilibrio de suspensión, enfriamiento lento, evaporación, y precipitación. Se obtuvieron cuatro nuevas formas cristalinas (clases 2, 3, 4 y 5), además de la forma amorfa (clase 1).

Las cuatro formas nuevas (clases 2, 3, 4 y 5) se caracterizaron por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR. Todas las formas corresponden a solvatos (Tabla 1). Los experimentos de secado bajo vacío o flujo de N₂ se realizaron con el objetivo de obtener una forma cristalina, no solvatada de 63415.

10

Tabla 1. Resumen de las Clases Obtenidas

| Clase | Características | Resultado de los Experimentos de Secado |
|---------|--|---|
| Clase 1 | forma amorfa | -- |
| Clase 2 | solvatos isoestructurales (por ejemplo, heptano) | secado no exitoso |
| Clase 3 | solvatos isoestructurales (por ejemplo, etanol) | secado no exitoso |
| Clase 4 | solvato de MeCN y solvato desolvatado | secado exitoso, estructura inalterada |
| Clase 5 | solvato de THF | el secado resultó en forma amorfa |

- Clase 2:** La mayoría de los experimentos de cristalización que se realizaron dieron como resultado el material sólido de la clase 2 (véase la sección de Ejemplos a continuación). Sus miembros pueden corresponder a solvatos no estequiométricos isoestructurales (<0,5 eq.) (de heptano, ciclohexano, isopropil éter, 1-butanol, trietilamina, y posiblemente otros solventes, tales como hexano, otros éteres, etc) con moléculas de solvente fuertemente unidas. Los espectros de Raman y patrones de PXRD dentro de esta clase son muy similares entre sí, por lo tanto, las estructuras podrían ser esencialmente idénticas con sólo pequeñas diferencias debido a los diferentes solventes que se incorporaron.
- Los experimentos de secado en las muestras de la clase 2 no han resultado en una forma no solvatada cristalina. Incluso las temperaturas elevadas (80°C) y un alto vacío (<1x10⁻³ mbares) no pudieron eliminar las moléculas de solvente fuertemente unidas por completo; siempre se mantuvo un contenido de solvente > 2% en peso. La cristalinidad de estas muestras parcialmente secas se redujo, pero no se observó ni la transformación en una estructura diferente ni la amorfización sustancial.
- Clase 3:** El material sólido de la clase 3 se puede obtener a partir de varias cristalizaciones (véase la sección de Ejemplos a continuación). Las muestras de la clase 3 son solvatos probablemente isoestructurales de 2PrOH, EtOH, y probablemente acetona con moléculas de solvente fuertemente unidas. Podrían corresponder ya sea a hemisolvatos estequiométricos o solvatos no estequiométricos con un contenido de solvente de ~0,5 eq. Como con la clase 2, los espectros de Raman y patrones de PXRD dentro de esta clase son muy similares entre sí, lo que indica estructuras similares que incorporan diferentes solventes.
- Similar a la clase 2, los experimentos de secado no tuvieron éxito. Las moléculas de solvente muy fuertemente unidas sólo pudieron ser eliminadas parcialmente (es decir, ~5,4% en peso a ~4,8% en peso después de hasta 3 d a 1x10⁻³ mbares y 80°C). Los patrones de PXRD se mantuvieron inalterados.
- La **Clase 4** se puede obtener a partir de un sistema de solventes de 7:3 MeCN/H₂O (véase la sección de Ejemplos a continuación). Muy probablemente corresponde a un hemisolvato de acetonitrilo cristalino. Por secado (bajo vacío o flujo de N₂ a temperaturas elevadas) la mayoría de las moléculas de solvente pidieron eliminarse sin cambiar o destruir la estructura cristalina (la PXRD se mantuvo inalterada). Así, se obtuvo una forma no solvatada cristalina (o más bien solvato desolvatado). Es ligeramente higroscópica (ganancia de masa del ~0,7% en peso de 50% de h.r. a 85% de h.r.) y tiene un posible punto de fusión a 196,1°C (ΔH = 29,31 J/g).
- La **Clase 5** se puede obtener a partir de un sistema de solventes de ~1:1 THF/H₂O. La clase 5 contiene THF unido (y tal vez H₂O). Como el contenido de los dos componentes no se puede cuantificar fácilmente por separado, la naturaleza exacta de este solvato cristalino no se ha determinado.
- El secado de la clase 5 resultó en desolvatación y transformación significativas en la dirección de la forma amorfa (clase 1). En algunas realizaciones, la forma amorfa de RTA 408 se puede preparar suspendiendo el solvato de heptano clase 2 en 1:1 THF/H₂O para formar un sólido clase 5, seguido de secado y amorfización.
- Los experimentos con el objetivo de preparar la forma amorfa (clase 1) se realizaron utilizando el material de partida clase 2. El material principalmente amorfo (clase 1) se preparó partiendo del material de la clase 2 en un proceso de dos etapas a través de la clase 5 en una escala de 100 mg y 3 g (secado a 100 mbares, 80°C, varios días). La preparación de material totalmente amorfo (clase 1) se encontró que es posible en un proceso de una etapa evitando el solvente THF por precipitación directa de la forma amorfa (clase 1) de una disolución en acetona de material de la clase 2 en un baño de agua fría.

IV. Enfermedades Asociadas con la Inflamación y/o Estrés Oxidativo

- La inflamación es un proceso biológico que proporciona resistencia a organismos infecciosos o parasitarios y la reparación de tejido dañado. La inflamación se caracteriza comúnmente por vasodilatación localizada, enrojecimiento, hinchazón, y dolor, el reclutamiento de leucocitos al sitio de la infección o lesión, la producción de citoquinas inflamatorias, tal como TNF-α e IL-1, y la producción de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, tal

como peróxido de hidrógeno, superóxido, y peroxinitrito. En los estadios posteriores de inflamación, la remodelación de tejido, angiogénesis y formación de cicatrices (fibrosis) pueden presentarse como parte del proceso de cicatrización de la herida. Bajo circunstancias normales, la respuesta inflamatoria está regulada, es temporal, y se resuelve de una manera orquestada una vez que la infección o lesión se ha tratado adecuadamente. Sin embargo, la inflamación aguda puede llegar a ser excesiva y potencialmente mortal si fallan los mecanismos de regulación. Alternativamente, la inflamación puede llegar a ser crónica y causar daño de tejido acumulativo o complicaciones sistémicas. Sobre la base de al menos la evidencia presentada en la presente, el RTA 408 se puede utilizar en el tratamiento o prevención de la inflamación o enfermedades asociadas con la inflamación.

Muchas enfermedades humanas graves e intratables implican la desregulación de los procesos inflamatorios, incluyendo enfermedades tales como el cáncer, aterosclerosis y diabetes, que no se vieron tradicionalmente como afecciones inflamatorias. En el caso del cáncer, los procesos inflamatorios están asociados con los procesos que incluyen la formación, progresión, metástasis y resistencia del tumor a la terapia. En algunas realizaciones, el RTA 408 se puede utilizar en el tratamiento o prevención de cánceres incluyendo un carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, o seminoma, o cáncer de la vejiga, sangre, huesos, cerebro, mama, sistema nervioso central, cuello uterino, colon, endometrio, esófago, vesícula biliar, genitales, tracto genitourinario, cabeza, riñón, laringe, hígado, pulmón, tejido muscular, cuello, mucosa oral o nasal, ovario, páncreas, próstata, piel, bazo, intestino delgado, intestino grueso, estómago, testículos, o tiroides. La aterosclerosis, vista desde hace tiempo como un trastorno del metabolismo de lípidos, se entiende ahora que es principalmente una afección inflamatoria, con macrófagos activados que juegan un papel importante en la formación y eventual ruptura de las placas ateroscleróticas. La activación de vías de señalización inflamatorias también se ha mostrado que desempeña un papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina, así como en el daño de tejido periférico asociado con la hiperglucemia diabética. La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, tales como superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito, es un sello distintivo de las afecciones inflamatorias. La evidencia de la producción de peroxinitrito desregulada se ha reportado en una amplia variedad de enfermedades (Szabo et al., 2007; Schulz et al., 2008; Forstermann, 2006; Pall, 2007).

Las enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, lupus, psoriasis, y esclerosis múltiple implican la activación inapropiada y crónica de los procesos inflamatorios en los tejidos afectados, que surge de la disfunción del reconocimiento de lo propio frente a lo no propio y los mecanismos de respuesta en el sistema inmune. En las enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedades de Alzheimer y Parkinson, el daño neuronal se correlaciona con la activación de la microglía y los niveles elevados de proteínas pro-inflamatorias, tales como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La insuficiencia orgánica crónica, tales como insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca, insuficiencia hepática y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, está estrechamente asociada con la presencia de estrés oxidativo crónico e inflamación, conduciendo al desarrollo de fibrosis y pérdida eventual de la función del órgano. El estrés oxidativo en las células endoteliales vasculares, que revisten los vasos sanguíneos mayores y menores, puede conducir a la disfunción endotelial y se cree que es un importante factor contribuyente en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular sistémica, complicaciones de la diabetes, enfermedad renal crónica y otras formas de insuficiencia orgánica, y un número de otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento, incluyendo enfermedades degenerativas del sistema nervioso central y la retina.

Muchos otros trastornos implican el estrés oxidativo e inflamación en los tejidos afectados, incluyendo la enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedades inflamatorias de la piel; mucositis y dermatitis relacionada con la terapia de radiación y quimioterapia; enfermedades oculares, tales como la uveítis, glaucoma, degeneración macular, y diversas formas de retinopatía; fallo y rechazo del trasplante; lesión por reperfusión isquémica; dolor crónico; afecciones degenerativas de los huesos y articulaciones, incluyendo la osteoartritis y osteoporosis; asma y fibrosis quística; trastornos convulsivos; y afecciones neuropsiquiátricas, incluyendo la esquizofrenia, depresión, trastorno bipolar, trastorno de estrés postraumático, trastornos de déficit de atención, trastornos del espectro autista, y trastornos de la alimentación, tales como la anorexia nerviosa. Se cree que la desregulación de las vías de señalización inflamatorias es un factor importante en la patología de las enfermedades de desgaste muscular, incluyendo la distrofia muscular y diversas formas de caquexia.

Una variedad de trastornos agudos potencialmente mortales también implica la señalización inflamatoria desregulada, incluyendo insuficiencia orgánica aguda que involucra el páncreas, riñones, hígado o pulmones, infarto de miocardio o síndrome coronario agudo, apoplejía, choque séptico, trauma, quemaduras graves, y anafilaxia.

Muchas complicaciones de enfermedades infecciosas también implican la desregulación de las respuestas inflamatorias. Aunque una respuesta inflamatoria puede matar a los patógenos invasores, una respuesta inflamatoria excesiva también puede ser muy destructiva y en algunos casos puede ser una fuente primaria de daños en los tejidos infectados. Además, una respuesta inflamatoria excesiva también puede conducir a complicaciones sistémicas debido a la sobreproducción de citoquinas inflamatorias, tales como TNF- α e IL-1. Esto se cree que es un factor en la mortalidad derivada de la influenza severa, síndrome respiratorio agudo severo, y sepsis.

La expresión aberrante o excesiva ya sea de iNOS o ciclooxigenasa-2 (COX-2) ha sido implicada en la patogénesis de muchos procesos patológicos. Por ejemplo, está claro que el NO es un mutágeno potente (Tamir y Tannebaum, 1996), y que el óxido nítrico también puede activar la COX-2 (Salvemini et al., 1994). Además, hay un marcado

aumento en la iNOS en los tumores de colon de rata inducidos por el carcinógeno, azoximetano (Takahashi et al., 1997). Se ha mostrado que una serie de análogos sintéticos de triterpenoide de ácido oleanólico son potentes inhibidores de los procesos inflamatorios celulares, tales como la inducción por IFN- γ de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de COX-2 en los macrófagos de ratón. Véase Honda et al. (2000a), Honda et al. (2000b), y Honda et al. (2002), las cuales se incorporan en la presente por referencia.

En un aspecto, el RTA 408 descrito en la presente se caracteriza en parte por su capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7 derivadas de macrófagos inducida por la exposición a γ -interferón. El RTA 408 se caracteriza además por la capacidad para inducir la expresión de proteínas antioxidantes, tal como NQO1, y reducir la expresión de proteínas pro-inflamatorias, tales como COX-2 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Estas propiedades son relevantes para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades y trastornos que implican el estrés oxidativo y la desregulación de los procesos inflamatorios, incluyendo cáncer, complicaciones de la exposición localizada o total del cuerpo a radiación ionizante, mucositis y dermatitis resultante de la terapia de radiación o quimioterapia, enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, incluyendo aterosclerosis, lesión por reperfusión isquémica, insuficiencia orgánica aguda y crónica, incluyendo insuficiencia renal e insuficiencia cardíaca, enfermedades respiratorias, diabetes y complicaciones de la diabetes, alergias severas, rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades de los ojos y retina, dolor agudo y crónico, enfermedades óseas degenerativas, incluyendo la osteoartritis y osteoporosis, enfermedades inflamatorias del intestino, dermatitis y otras enfermedades de la piel, sepsis, quemaduras, trastornos convulsivos, y trastornos neuropsiquiátricos.

En otro aspecto, el RTA 408 se puede utilizar para tratar a un sujeto que tiene una afección tales como enfermedades de los ojos. Por ejemplo, uveítis, degeneración macular (tanto la forma seca como forma húmeda), glaucoma, edema macular diabético, blefaritis, retinopatía diabética, enfermedades y trastornos del endotelio corneal tal como distrofia corneal endotelial de Fuchs, inflamación post-quirúrgica, ojo seco, conjuntivitis alérgica y otras formas de conjuntivitis son ejemplos no limitantes de enfermedades de los ojos que podrían ser tratadas con RTA 408.

En otro aspecto, el RTA 408 se puede utilizar para tratar a un sujeto que tiene una afección tales como enfermedades o trastornos de la piel. Por ejemplo, dermatitis, incluyendo dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis debida a la exposición química, y dermatitis inducida por la radiación; quemaduras térmicas o químicas; heridas crónicas incluyendo úlceras diabéticas, llagas por presión y úlceras venosas; acné; alopecia incluyendo la calvicie y alopecia inducida por fármacos; otros trastornos del folículo piloso; epidermolisis bullosa; quemaduras solares y sus complicaciones; trastornos de la pigmentación de la piel incluyendo vitiligo; afecciones de la piel relacionadas con el envejecimiento; cicatrización de heridas post-quirúrgicas; prevención o reducción de las cicatrices de las lesiones de la piel, cirugía o quemaduras; psoriasis; manifestaciones dermatológicas de enfermedades autoinmunes o enfermedad de injerto contra huésped; prevención o tratamiento de cáncer de la piel; trastornos que implican la hiperproliferación de células de la piel tales como hiperqueratosis es un ejemplo no limitante de enfermedades de la piel que podrían ser tratadas con RTA 408.

Sin estar ligado por la teoría, se cree que la activación de la vía de Keap1/Nrf2/ARE antioxidante/anti-inflamatoria está implicada en ambas propiedades antiinflamatorias y anti-cancerígenas del compuesto descrito en la presente.

En otro aspecto, el RTA 408 se puede utilizar para tratar a un sujeto que tiene una afección causada por niveles elevados de estrés oxidativo en uno o más tejidos. El estrés oxidativo resulta de los niveles anormalmente altos o prolongados de especies reactivas de oxígeno, tales como superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito (formado por la reacción de óxido nítrico y superóxido). El estrés oxidativo puede estar acompañado por inflamación ya sea aguda o crónica. El estrés oxidativo puede ser causado por la disfunción mitocondrial, por la activación de las células inmunes, tales como macrófagos y neutrófilos, por la exposición aguda a un agente externo, tal como radiación ionizante o un agente quimioterapéutico citotóxico (por ejemplo, doxorubicina), por trauma u otra lesión aguda de los tejidos, por isquemia/reperfusión, por mala circulación o anemia, por hipoxia o hiperoxia localizada o sistémica, por niveles elevados de citocinas inflamatorias y otras proteínas relacionadas con la inflamación, y/o por otros estados fisiológicos anormales, tales como hiperglucemia o hipoglucemia.

En modelos animales de muchas de estas afecciones, la estimulación de la expresión de hemo oxigenasa inducible (HO-1), un gen diana de la vía de Nrf2, se ha mostrado que tiene un efecto terapéutico significativo incluyendo en modelos de infarto de miocardio, insuficiencia renal, fallo y rechazo de trasplante, apoplejía, enfermedad cardiovascular, y enfermedad autoinmune (por ejemplo, Sacerdoti et al., 2005; Abraham y Kappas, 2005; Bach, 2006; Araujo et al., 2003; Liu et al., 2006; Ishikawa et al., 2001; Kruger et al., 2006; Satoh et al., 2006; Zhou et al., 2005; Morse y Choi, 2005; Morse y Choi, 2002). Esta enzima descompone la hemo libre en hierro, monóxido de carbono (CO), y biliverdina (que posteriormente se convierte a la molécula antioxidante potente, bilirrubina).

En otro aspecto, el RTA 408 se puede utilizar para prevenir o tratar el daño de tejido o la insuficiencia orgánica, aguda y crónica, resultante del estrés oxidativo exacerbado por la inflamación. Los ejemplos de enfermedades que caen en esta categoría incluyen la insuficiencia cardíaca, insuficiencia hepática, fallo y rechazo de trasplante, insuficiencia renal, pancreatitis, enfermedades pulmonares fibróticas (fibrosis quística, COPD, y fibrosis pulmonar idiopática, entre otras), diabetes (incluyendo las complicaciones), aterosclerosis, lesión por reperfusión isquémica,

glaucoma, apoplejía, enfermedad autoinmune, autismo, degeneración macular, y distrofia muscular. Por ejemplo, en el caso del autismo, los estudios sugieren que el aumento de estrés oxidativo en el sistema nervioso central puede contribuir al desarrollo de la enfermedad (Chauhan y Chauhan, 2006).

5 La evidencia también vincula el estrés oxidativo y la inflamación con el desarrollo y patología de muchos otros trastornos del sistema nervioso central, incluyendo trastornos psiquiátricos, tales como la psicosis, depresión mayor y trastorno bipolar; trastornos convulsivos, tales como la epilepsia; dolor y síndromes sensoriales, tales como la migraña, dolor neuropático, o tinnitus; y síndromes del comportamiento, tales como los trastornos de déficit de atención. Véase, por ejemplo, Dickerson et al., 2007; Hanson et al., 2005; Kendall-Tackett, 2007; Lencz et al., 2007; Dudhgaonkar et al., 2006; Lee et al., 2007; Morris et al., 2002; Ruster et al., 2005; McIver et al., 2005; Sarchielli et al., 2006; Kawakami et al., 2006; Ross et al., 2003. Por ejemplo, los niveles elevados de citoquinas inflamatorias, incluyendo TNF- α , interferón- γ , e IL-6, se asocian con enfermedades mentales graves (Dickerson et al., 2007). La activación microglial también se ha vinculado con enfermedades mentales graves. Por lo tanto, la regulación a la baja de las citoquinas inflamatorias y la inhibición de la activación excesiva de la microglía podrían ser beneficiosas en los pacientes con esquizofrenia, depresión mayor, trastorno bipolar, trastornos del espectro autista y otros trastornos neuropsiquiátricos.

Por consiguiente, en patologías que implican el estrés oxidativo solo o estrés oxidativo exacerbado por la inflamación, el tratamiento puede comprender administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de esta invención, tales como las descritas anteriormente o en toda esta especificación. El tratamiento se puede administrar de forma preventiva, antes de un estado predecible de estrés oxidativo (por ejemplo, trasplante de órganos o la administración de terapia de radiación a un paciente con cáncer), o se puede administrar terapéuticamente en entornos que implican el estrés oxidativo y la inflamación establecidos. En algunas realizaciones, cuando se utiliza un compuesto de la presente invención para tratar un paciente que recibe terapia de radiación y/o quimioterapia, el compuesto de la invención se puede administrar antes, al mismo tiempo, y/o después de la radiación o quimioterapia, o el compuesto se puede administrar en combinación con las otras terapias. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención puede prevenir y/o reducir la severidad de los efectos secundarios asociados con la terapia de radiación o quimioterapia (utilizando un agente diferente) sin reducir los efectos anticancerígenos de la terapia de radiación o quimioterapia. Debido a que tales efectos secundarios pueden ser limitantes de la dosis para la terapia de radiación y/o quimioterapia, en algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención se puede utilizar para permitir una mayor y/o más frecuente dosificación de la terapia de radiación y/o quimioterapia, por ejemplo, resultando en una mayor eficacia del tratamiento. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención cuando se administra en combinación con la terapia de radiación y/o quimioterapia puede mejorar la eficacia de una dosis dada de la radiación y/o quimioterapia. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención cuando se administra en combinación con la terapia de radiación y/o quimioterapia puede mejorar la eficacia de una dosis dada de la radiación y/o quimioterapia y reducir (o, como mínimo, no añadir) los efectos secundarios de la radiación y/o quimioterapia. En algunas realizaciones, y sin estar limitados por la teoría, esta eficacia combinatoria puede resultar de la inhibición de la actividad del factor de transcripción pro-inflamatorio NF- κ B por el compuesto de la invención. El NF- κ B a menudo se activa crónicamente en las células cancerosas, y tal activación se asocia con la resistencia a la terapia y la promoción de la progresión del tumor (por ejemplo, Karin, 2006; Aghajan et al., 2012). Otros factores de transcripción que promueven la inflamación y el cáncer, tal como STAT3 (por ejemplo, He y Karin 2011; Grivennikov y Karin, 2010), también se pueden inhibir por el compuesto de la invención en algunas realizaciones.

El RTA 408 se puede utilizar para tratar o prevenir afecciones inflamatorias, tales como sepsis, dermatitis, enfermedad autoinmune, y osteoartritis. El RTA 408 también se puede utilizar para tratar o prevenir el dolor inflamatorio y/o dolor neuropático, por ejemplo, induciendo Nrf2 y/o inhibiendo NF- κ B.

45 El RTA 408 también se puede utilizar para tratar o prevenir enfermedades, tales como el cáncer, inflamación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, autismo, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, lupus, enfermedad de Crohn, y psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, todas las otras enfermedades cuya patogénesis se cree que implica la producción excesiva ya sea de óxido nítrico o prostaglandinas, y patologías que implican el estrés oxidativo solo o estrés oxidativo exacerbado por la inflamación. El RTA 408 se puede utilizar en el tratamiento o la prevención de cánceres incluyendo carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, o seminoma, o cáncer de la vejiga, sangre, huesos, cerebro, mama, sistema nervioso central, cuello del útero, colon, endometrio, esófago, vesícula biliar, genitales, tracto genitourinario, cabeza, riñón, laringe, hígado, pulmón, tejido muscular, cuello, mucosa oral o nasal, ovario, páncreas, próstata, piel, bazo, intestino delgado, 55 intestino grueso, estómago, testículos, o tiroides.

Otro aspecto de la inflamación es la producción de prostaglandinas inflamatorias, tal como la prostaglandina E. El RTA 408 se puede utilizar para promover la vasodilatación, extravasación de plasma, dolor localizado, temperatura elevada, y otros síntomas de la inflamación. La forma inducible de la enzima COX-2 se asocia con su producción, y los altos niveles de COX-2 se encuentran en los tejidos inflamados. En consecuencia, la inhibición de la COX-2 puede aliviar muchos síntomas de la inflamación y una serie de importantes fármacos anti-inflamatorios (por ejemplo, ibuprofeno y celecoxib) actúan inhibiendo la actividad de COX-2. Se ha demostrado que una clase de prostaglandinas de ciclopentenona (cyPG) (por ejemplo, 15-desoxi prostaglandina J2, también conocida como

PGJ2) desempeña un papel en la estimulación de la resolución orquestada de la inflamación (por ejemplo, Rajakari et al., 2007). La COX-2 también se asocia con la producción de prostaglandinas de ciclopentenona. En consecuencia, la inhibición de la COX-2 puede interferir con la resolución completa de la inflamación, promoviendo potencialmente la persistencia de las células inmunes activadas en los tejidos y conduciendo a la inflamación “latente” crónica. Este efecto puede ser responsable de la incidencia aumentada de enfermedad cardiovascular en pacientes que utilizan inhibidores selectivos de la COX-2 durante largos periodos de tiempo.

En un aspecto, el RTA 408 se puede utilizar para controlar la producción de citoquinas pro-inflamatorias dentro de la célula activando selectivamente los residuos de cisteína reguladores (RCR) en las proteínas que regulan la actividad de factores de transcripción sensibles a redox. La activación de RCR por cyPG se ha mostrado que inicia un programa de pro-resolución en el cual la actividad del factor de transcripción antioxidante y citoprotector Nrf2 se induce de forma potente y las actividades de los factores de transcripción pro-oxidantes y pro-inflamatorios NF-κB y STAT se suprimen. En algunas realizaciones, el RTA 408 se puede utilizar para aumentar la producción de moléculas antioxidantes y reductoras (NQO1, HO-1, SOD1, γ-GCS) y disminuir el estrés oxidativo y la producción de moléculas pro-oxidantes y pro-inflamatorias (iNOS, COX-2, TNF-α). En algunas realizaciones, el RTA 408 se puede utilizar para causar que las células que albergan el evento inflamatorio reviertan a un estado no inflamatorio promoviendo la resolución de la inflamación y limitando el daño de tejido excesivo al huésped.

A. Cáncer

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y métodos de la presente descripción se pueden utilizar para inducir la apoptosis en las células de tumor, inducir la diferenciación celular, inhibir la proliferación de células cancerosas, inhibir una respuesta inflamatoria, y/o funcionar en una capacidad quimiopreventiva. Por ejemplo, la invención proporciona nuevas formas polimórficas que tienen una o más de las siguientes propiedades: (1) una capacidad para inducir la apoptosis y diferenciar células tanto malignas como no malignas, (2) una actividad a niveles sub-micromolares o nanomolares como un inhibidor de proliferación de muchas células malignas o premalignas, (3) una capacidad para suprimir la síntesis *de novo* de la enzima inflamatoria óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), (4) una capacidad para inhibir la activación de NF-κB, y (5) una capacidad para inducir la expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1).

Los niveles de iNOS y COX-2 están elevados en ciertos cánceres y han sido implicados en la carcinogénesis y se ha mostrado que los inhibidores de la COX-2 reducen la incidencia de adenomas de colon primarios en los seres humanos (Rostom et al., 2007; Brown y DuBois, 2005; Crowel et al., 2003). La iNOS se expresa en las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) (Angulo et al., 2000) y se ha mostrado que la actividad de COX-2 en células cancerosas resulta en la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), que se ha mostrado que induce la expresión de la arginasa en MDSC (Sinha et al., 2007). La arginasa e iNOS son enzimas que utilizan L-arginina como sustrato y producen L-ornitina y urea, y L-citrulina y NO, respectivamente. El agotamiento de la arginina del microambiente del tumor por MDSC, combinado con la producción de NO y peroxinitrito se ha mostrado que inhibe la proliferación e induce la apoptosis de las células T (Bronte et al., 2003). La inhibición de la COX-2 e iNOS se ha mostrado que reduce la acumulación de MDSC, restaura la actividad citotóxica de células T asociadas a tumores, y retrasa el crecimiento del tumor (Sinha et al., 2007; Mazzoni et al., 2002; Zhou et al., 2007).

La inhibición de las vías de señalización de NF-κB y JAK/STAT se ha implicado como una estrategia para inhibir la proliferación de células epiteliales cancerosas e inducir su apoptosis. La activación de STAT3 y NF-κB se ha mostrado que resulta en la supresión de la apoptosis en las células cancerosas, y la promoción de la proliferación, invasión y metástasis. Muchos de los genes diana implicados en estos procesos han mostrado estar transcripcionalmente regulados tanto por NF-κB como STAT3 (Yu et al., 2007).

Además de sus papeles directos en las células epiteliales cancerosas, NF-κB y STAT3 también tienen papeles importantes en otras células que se encuentran en el microambiente tumoral. Los experimentos en modelos animales han demostrado que NF-κB se requiere tanto en las células cancerosas como en las células hematopoyéticas para propagar los efectos de la inflamación en la iniciación y la progresión del cáncer (Greten et al., 2004). La inhibición de NF-κB en células cancerosas y mieloides reduce el número y tamaño, respectivamente, de los tumores resultantes. La activación de STAT3 en células cancerosas resulta en la producción de varias citoquinas (IL-6, IL-10), que suprimen la maduración de las células dendríticas asociadas a tumores (DC). Además, STAT3 se activa por estas citoquinas en las propias células dendríticas. La inhibición de STAT3 en modelos de ratón de cáncer restaura la maduración de DC, promueve la inmunidad antitumoral, e inhibe el crecimiento tumoral (Kortylewski et al., 2005). En algunas realizaciones, el RTA 408 y sus formas polimórficas se pueden utilizar para tratar el cáncer, incluyendo, por ejemplo, el cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el RTA 408 y sus formas polimórficas se pueden utilizar en una terapia de combinación para tratar el cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de próstata. Véase, por ejemplo, el Ejemplo H a continuación.

B. Esclerosis Múltiple y Otras Afecciones Neurodegenerativas

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y los métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes para la esclerosis múltiple (EM) u otras afecciones neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, o esclerosis lateral amiotrófica. La EM se sabe que es una

afección inflamatoria del sistema nervioso central (Williams et al., 1994; Merrill y Benveniste, 1996; Genain y Nauser, 1997). Sobre la base de varias investigaciones, la evidencia sugiere que los mecanismos inflamatorios, oxidativos, y/o inmunes están involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), y EM (Bagasra et al., 1995; McGeer y McGeer, 1995; Simonian y Coyle, 1996; Kaltschmidt et al., 1997). Los datos epidemiológicos indican que el uso crónico de NSAID que bloquean la síntesis de prostaglandinas del araquidonato, disminuye notablemente el riesgo para el desarrollo de la AD (McGeer et al., 1996; Stewart et al., 1997). Por lo tanto, los agentes que bloquean la formación de NO y prostaglandinas, se pueden utilizar en procedimientos para prevenir y tratar enfermedades neurodegenerativas. Los candidatos terapéuticos exitosos para el tratamiento de dicha enfermedad requieren típicamente una capacidad para penetrar la barrera hematoencefálica. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente U.S. 2009/0060873.

C. Neuroinflamación

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes con neuroinflamación. La neuroinflamación encapsula la idea de que las respuestas y acciones microgliales y astrocíticas en el sistema nervioso central tienen un carácter de tipo fundamentalmente de inflamación, y que estas respuestas son fundamentales para la patogénesis y la progresión de una amplia variedad de trastornos neurológicos. Estas ideas se han extendido de la enfermedad de Alzheimer a otras enfermedades neurodegenerativas (Eikelenboom et al., 2002; Ishizawa y Dickson, 2001), a las enfermedades isquémicas/tóxicas (Gehrmann et al., 1995; Touzani et al., 1999), a la biología del tumor (Graeber et al., 2002) e incluso al desarrollo normal del cerebro. La neuroinflamación incorpora un amplio espectro de respuestas celulares complejas que incluyen la activación de la microglía y astrocitos y la inducción de citoquinas, quimioquinas, proteínas del complemento, proteínas de fase aguda, daño oxidativo y procesos moleculares relacionados, y los eventos pueden tener efectos perjudiciales sobre la función neuronal, conduciendo a la lesión neuronal, activación glial adicional, y en última instancia la neurodegeneración.

D. Enfermedades Renales

En algunas realizaciones, el RTA 408, así como las formas polimórficas del mismo, se pueden utilizar para tratar pacientes con enfermedades y trastornos renales, incluyendo insuficiencia renal y enfermedad renal crónica (CKD), con base, por ejemplo, en los métodos enseñados por US 8.129.429. La insuficiencia renal, que resulta en el aclaramiento inadecuado de los productos de desecho metabólicos de la sangre y concentraciones de electrolitos anormales en la sangre, es un problema médico significativo en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados. La diabetes y la hipertensión están entre las causas más importantes de insuficiencia renal crónica, también conocida como enfermedad renal crónica (CKD), pero también se asocia con otras afecciones tal como lupus. La insuficiencia renal aguda puede surgir de la exposición a ciertos fármacos (por ejemplo, acetaminofeno) o productos químicos tóxicos, o de la lesión por reperfusión isquémica asociada con el choque o procedimientos quirúrgicos como el trasplante, y puede resultar en insuficiencia renal crónica. En muchos pacientes, la insuficiencia renal avanza a una etapa en la que el paciente requiere diálisis regular o trasplante de riñón para seguir viviendo. Ambos procedimientos son altamente invasivos y asociados con efectos secundarios significativos y problemas en la calidad de vida. Aunque existen tratamientos efectivos para algunas complicaciones de la insuficiencia renal, tales como hiperparatiroidismo e hiperfosfatemia, ningún tratamiento disponible ha mostrado detener o revertir la progresión subyacente de la insuficiencia renal. Por lo tanto, los agentes que pueden mejorar la función renal alterada representarían un avance significativo en el tratamiento de la insuficiencia renal.

La inflamación contribuye significativamente a la patología de la CKD. También hay una fuerte relación mecanicista entre el estrés oxidativo y la disfunción renal. La vía de señalización de NF- κ B juega un papel importante en la progresión de la CKD ya que NF- κ B regula la transcripción de MCP-1, una quimioquina que es responsable del reclutamiento de monocitos/macrófagos que resulta en una respuesta inflamatoria que en última instancia daña el riñón (Wardle, 2001). La vía de Keap1/Nrf2/ARE controla la transcripción de varios genes que codifican enzimas antioxidantes, incluyendo hemo oxigenasa-1 (HO-1). La ablación del gen Nrf2 en ratones hembra resulta en el desarrollo de la nefritis glomerular similar al lupus (Yoh et al., 2001). Además, varios estudios han demostrado que la expresión de HO-1 es inducida en respuesta al daño renal y la inflamación y que esta enzima y sus productos - bilirrubina y monóxido de carbono - juegan un papel protector en el riñón (Nath et al., 2006).

La lesión renal aguda (AKI) puede ocurrir después de la reperfusión isquémica, el tratamiento con ciertos agentes farmacológicos, tales como cisplatino y rapamicina, y la inyección intravenosa de medios de contraste radiológicos utilizados en la formación de imágenes médicas. Como en la CKD, la inflamación y estrés oxidativo contribuyen a la patología de la AKI. Los mecanismos moleculares que fundamentan la nefropatía inducida por contraste radiológico (RCN) no se entienden bien; sin embargo, es probable que una combinación de eventos, incluyendo la vasoconstricción prolongada, autorregulación del riñón alterada, y la toxicidad directa de los medios de contraste todos contribuyan a la insuficiencia renal (Tumlin et al., 2006). La vasoconstricción resulta en el flujo sanguíneo renal disminuido y causa reperfusión isquémica y la producción de especies reactivas de oxígeno. La HO-1 es fuertemente inducida en estas afecciones y se ha demostrado que previene la lesión por reperfusión isquémica en varios órganos diferentes, incluyendo el riñón (Nath et al., 2006). Específicamente, la inducción de HO-1 se ha mostrado que es protectora en un modelo de rata de RCN (Goodman et al., 2007). La reperfusión también induce una respuesta inflamatoria, en parte, a través de la activación de la señalización de NF- κ B (Nichols, 2004). La toma

como diana de NF- κ B se ha propuesto como una estrategia terapéutica para prevenir el daño de órganos (Zingarelli et al., 2003).

E. Enfermedad Cardiovascular

5 En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas y métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes con enfermedad cardiovascular. La etiología de la enfermedad CV es compleja, pero la mayoría de las causas están relacionadas con el suministro inadecuado o completamente interrumpido de sangre a un órgano o tejido crítico. Frecuentemente, tal afección surge de la ruptura de uno o más placas ateroscleróticas, lo que conduce a la formación de un trombo que bloquea el flujo de sangre en un vaso crítico.

10 En algunas incidencias, la aterosclerosis puede ser tan extensa en los vasos sanguíneos críticos que se desarrolla estenosis (estrechamiento de las arterias) y el flujo sanguíneo a órganos críticos (incluyendo el corazón) es crónicamente insuficiente. Tal isquemia crónica puede conducir a daño de órganos de muchos tipos, incluyendo la hipertrofia cardíaca asociada con la insuficiencia cardíaca congestiva.

15 La aterosclerosis, el defecto subyacente que conduce a muchas formas de enfermedad cardiovascular, se produce cuando un defecto físico o lesión en el revestimiento (endotelio) de una arteria desencadena una respuesta inflamatoria que implica la proliferación de células vasculares del músculo liso y la infiltración de leucocitos en el área afectada. En última instancia, puede formarse una lesión complicada conocida como una placa aterosclerótica, compuesta por las células mencionadas anteriormente combinadas con los depósitos de lipoproteínas que portan colesterol y otros materiales (por ejemplo, Hansson et al., 2006). A pesar de los beneficios significativos ofrecidos por los tratamientos terapéuticos actuales, la mortalidad por enfermedad cardiovascular sigue siendo alta y permanece una necesidad insatisfecha significativa en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

20 La inducción de HO-1 ha mostrado ser beneficiosa en una variedad de modelos de enfermedad cardiovascular, y bajos niveles de expresión de HO-1 se han correlacionado clínicamente con riesgo elevado de enfermedad CV. El RTA 408, las formas polimórficas y métodos de la invención, por lo tanto, se pueden utilizar en el tratamiento o la prevención de una variedad de trastornos cardiovasculares, incluyendo, pero no limitado a, la aterosclerosis, hipertensión, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica, apoplejía, hemorragia subaracnoidea, y restenosis. En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas y métodos de la invención se pueden utilizar como terapia de combinación con otras terapias cardiovasculares conocidas, tales como, pero no limitado a
25 anticoagulantes, trombolíticos, estreptoquinasa, activadores de plasminógeno de tejido, cirugía, injerto de derivación de arteria coronaria, angioplastia con balón, el uso de endoprótesis vascular, fármacos que inhiben la proliferación celular, o fármacos que disminuyen los niveles de colesterol.

F. Diabetes

30 En algunas realizaciones, el RTA 408, así como las formas polimórficas del mismo, se pueden utilizar para tratar pacientes con diabetes, con base, por ejemplo, en los métodos enseñados por US 8.129.429. La diabetes es una enfermedad compleja caracterizada por la insuficiencia del cuerpo para regular los niveles circulantes de glucosa. Esta insuficiencia puede ser el resultado de una ausencia de insulina, una hormona peptídica que regula tanto la producción como la absorción de la glucosa en diversos tejidos. La insulina deficiente compromete la capacidad de los músculos, grasa y otros tejidos para absorber la glucosa adecuadamente, lo que conduce a la hiperglucemia (niveles anormalmente altos de glucosa en la sangre). Más comúnmente, tal deficiencia de insulina resulta de la producción inadecuada de las células de islotes del páncreas. En la mayoría de los casos esto surge de la destrucción autoinmune de estas células, una afección conocida como diabetes de inicio juvenil o tipo 1, pero también puede ser debido a un traumatismo físico o alguna otra causa.

40 La diabetes también puede surgir cuando las células de músculos y grasa se vuelven menos sensibles a la insulina y no absorben la glucosa adecuadamente, dando lugar a la hiperglucemia. Este fenómeno se conoce como resistencia a la insulina, y la afección resultante se conoce como diabetes tipo 2. La diabetes tipo 2, el tipo más común, está muy asociada con la obesidad y la hipertensión. La obesidad está asociada con un estado inflamatorio del tejido adiposo que se cree que desempeña un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina (por ejemplo, Hotamisligil, 2006; Guilherme et al., 2008).

45 La diabetes está asociada con el daño a muchos tejidos, en gran parte porque la hiperglucemia (y la hipoglucemia, que puede resultar de dosis excesivas o mal sincronizadas de insulina) es una fuente importante de estrés oxidativo. Debido a su capacidad para proteger contra el estrés oxidativo, en particular por la inducción de la expresión de HO-1, el RTA 408, las formas polimórficas, y los métodos de la presente invención se pueden utilizar en tratamientos para muchas complicaciones de la diabetes. Como se señaló anteriormente (Cai et al., 2005), la inflamación crónica y estrés oxidativo en el hígado son sospechosos de ser factores contribuyentes principales en el desarrollo de la diabetes tipo 2. Además, los agonistas de PPAR γ tales como tiazolidindionas son capaces de reducir la resistencia a la insulina y son conocidos por ser tratamientos efectivos para la diabetes tipo 2. En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y los métodos de la presente invención se pueden utilizar como terapias de
50 combinación con agonistas de PPAR γ tales como tiazolidindionas.

G. Artritis

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes con una forma de artritis. En algunas realizaciones, las formas de artritis que podrían ser tratadas con RTA 408 y las formas polimórficas de esta invención son la artritis reumatoide (RA), artritis psoriásica (PsA), espondiloartropatías (SpAs), incluyendo espondilitis anquilosante (AS), artritis reactiva (ReA), y artritis enteropática (EA), la artritis reumatoide juvenil (JRA), y artritis inflamatoria temprana.

Para la artritis reumatoide, los primeros signos aparecen típicamente en la capa de revestimiento sinovial, con la proliferación de los fibroblastos sinoviales y su unión a la superficie articular en el margen de articulación (Lipsky, 1998). Posteriormente, los macrófagos, células T y otras células inflamatorias son reclutadas en la articulación, donde producen un número de mediadores, incluyendo las citoquinas interleuquina-1 (IL-1), que contribuye a las secuelas crónicas que conducen a la destrucción del cartílago y huesos, y factor de necrosis tumoral (TNF- α), que desempeña un papel en la inflamación (Dinarello, 1998; Arend y Dayer, 1995; van den Berg, 2001). La concentración de IL-1 en plasma es significativamente mayor en pacientes con RA que en individuos sanos y, en particular, los niveles de IL-1 en plasma se correlacionan con la actividad de la enfermedad RA (Eastgate et al., 1988). Por otra parte, los niveles de fluido sinovial de IL-1 se correlacionan con diferentes características radiográficas e histológicas de RA (Kahle et al., 1992; Rooney et al., 1990).

Otras formas de artritis incluyen la artritis psoriásica (PsA), que es una artropatía inflamatoria crónica caracterizada por la asociación de la artritis y psoriasis. Los estudios han revelado que la PsA comparte una serie de características genéticas, patogénicas y clínicas con otras espondiloartropatías (SpAs), un grupo de enfermedades que comprenden la espondilitis anquilosante, artritis reactiva y artritis enteropática (Wright, 1979). La noción de que la PsA pertenece al grupo de SpA ha ganado recientemente un mayor apoyo a partir de los estudios de formación de imágenes que demuestran la entesitis generalizada en la PsA pero no RA (McGonagle et al., 1999; McGonagle et al., 1998). Más específicamente, la entesitis se ha postulado como uno de los primeros eventos que ocurren en las SpAs, conduciendo a la remodelación ósea y anquilosis de la columna vertebral, así como a la sinovitis articular cuando las entesis inflamadas están cerca de las articulaciones periféricas. Las cantidades incrementadas de TNF- α se han reportado tanto en la piel psoriásica (Ettehad et al., 1994) como en el líquido sinovial (Parsch et al., 1997). Los ensayos recientes han mostrado un beneficio positivo del tratamiento anti-TNF tanto en PsA (Mease et al., 2000) como en la espondilitis anquilosante (Brandt et al., 2000).

La artritis reumatoide juvenil (JRA), un término para la forma más frecuente de la artritis en los niños, se aplica a una familia de enfermedades caracterizadas por inflamación crónica y la hipertrofia de las membranas sinoviales. El término se superpone, pero no es totalmente sinónimo, con la familia de enfermedades referidas como artritis juvenil crónica y/o artritis idiopática juvenil en Europa.

La JRA poliarticular es un subtipo clínico distinto caracterizado por la inflamación y la proliferación sinovial en múltiples articulaciones (cuatro o más), incluyendo las articulaciones pequeñas de las manos (Jarvis, 2002). Este subtipo de JRA puede ser grave, debido tanto a su implicación en múltiples articulaciones como a su capacidad para avanzar rápidamente con el tiempo. Aunque clínicamente distinta, la JRA poliarticular no es homogénea, y los pacientes varían en las manifestaciones de la enfermedad, la edad de comienzo, pronóstico y respuesta terapéutica. Estas diferencias muy probablemente reflejan un espectro de variación en la naturaleza del ataque inmune e inflamatorio que puede ocurrir en esta enfermedad (Jarvis, 1998).

La espondilitis anquilosante (AS) es un subconjunto de la enfermedad dentro de una clasificación más amplia de la enfermedad de espondiloartropatía. Los pacientes afectados con los distintos subconjuntos de espondiloartropatía tienen etiologías de enfermedades que son a menudo muy diferentes, que varían de infecciones bacterianas a la herencia. Sin embargo, en todos los subgrupos, el resultado final del proceso de la enfermedad es la artritis axial.

La AS es un trastorno reumático inflamatorio sistémico crónico del esqueleto axial con o sin manifestaciones extraesqueléticas. Las articulaciones sacroilíacas y la columna vertebral están afectadas principalmente, pero las articulaciones de la cadera y hombro, y menos comúnmente las articulaciones periféricas o ciertas estructuras extra-articulares tal como el ojo, vasculatura, sistema nervioso y aparato gastrointestinal también pueden estar implicadas. La etiología de la enfermedad aún no se entiende completamente (Wordsworth, 1995; Calin y Taurog, 1998). La etiología está fuertemente asociada con el alelo HLA-B27 de histocompatibilidad mayor clase I (MHC I) (Calin y Taurog, 1998). La AS afecta a los individuos en la flor de su vida y se teme debido a su potencial para causar dolor crónico y daño irreversible de los tendones, ligamentos, articulaciones y huesos (Brewerton et al., 1973a; Brewerton et al., 1973b; Schlosstein et al., 1973).

H. Colitis Ulcerativa

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas y métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes con colitis ulcerativa. La colitis ulcerativa es una enfermedad que causa inflamación y llagas, llamadas úlceras, en el revestimiento del intestino grueso. La inflamación ocurre normalmente en el recto y la parte inferior del colon, pero puede afectar a todo el colon. La colitis ulcerativa también se puede llamar colitis o proctitis. La inflamación hace que el colon se vacíe con frecuencia, causando diarrea. Las úlceras se forman en lugares

donde la inflamación ha matado a las células que recubren el colon y las úlceras sangran y producen pus.

La colitis ulcerativa es una enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), el nombre general para enfermedades que causan inflamación en el intestino delgado y el colon. La colitis ulcerativa puede ser difícil de diagnosticar porque sus síntomas son similares a otros trastornos intestinales y a otro tipo de IBD, enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn difiere de la colitis ulcerativa debido a que causa inflamación más profunda dentro de la pared intestinal. Además, la enfermedad de Crohn por lo general ocurre en el intestino delgado, aunque la enfermedad también puede ocurrir en la boca, esófago, estómago, duodeno, intestino grueso, apéndice, y ano.

I. Enfermedad de Crohn

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes con enfermedad de Crohn. Los síntomas de la enfermedad de Crohn incluyen inflamación intestinal y el desarrollo de estenosis intestinal y fístulas; la neuropatía a menudo acompaña a estos síntomas. Los medicamentos anti-inflamatorios, tales como 5-aminosalicilatos (por ejemplo, mesalamina) o corticosteroides, generalmente se prescriben, pero no siempre son eficaces (revisado en Botoman et al., 1998). La inmunosupresión con ciclosporina a veces es beneficiosa para los pacientes resistentes o intolerantes a los corticosteroides (Brynskov et al., 1989).

En casos activos de la enfermedad de Crohn, se secretan concentraciones elevadas de TNF- α e IL-6 en la circulación sanguínea, y se producen TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 en exceso localmente por las células de la mucosa (*id.*; Funakoshi et al., 1998). Estas citoquinas pueden tener efectos de largo alcance en los sistemas fisiológicos, incluyendo el desarrollo óseo, hematopoyesis, y función hepática, de tiroides y neuropsiquiátrica. Además, un desequilibrio de la relación de IL-1 β /IL-1ra, a favor de IL-1 β pro-inflamatoria, se ha observado en pacientes con enfermedad de Crohn (Rogler y Andus, 1998; Saiki et al., 1998; Dionne et al., 1998, pero véase Kuboyama, 1998).

Los tratamientos que se han propuesto para la enfermedad de Crohn incluyen el uso de varios antagonistas de citoquinas (por ejemplo, IL-1ra), inhibidores (por ejemplo, de la enzima convertidora de IL-1 β y antioxidantes) y anticuerpos anti-citoquinas (Rogler y Andus, 1998; van Hogezaand y Verspaget, 1998; Reimund et al., 1998; Lugerling et al., 1998; McAlindon et al., 1998). En particular, los anticuerpos monoclonales frente a TNF- α se han intentado con cierto éxito en el tratamiento de la enfermedad de Crohn (Targan et al., 1997; Stack et al., 1997; van Dullemen et al., 1995). Estos compuestos se pueden utilizar en terapia de combinación con RTA 408, las formas polimórficas, y los métodos de la presente descripción.

J. Lupus Eritematoso Sistémico

En algunas realizaciones, El RTA 408, las formas polimórficas y métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes con SLE. El lupus eritematoso sistémico (SLE) es una enfermedad reumática autoinmune caracterizada por la deposición en tejidos de autoanticuerpos y complejos inmunes que conducen a la lesión de tejido (Kotzin, 1996). A diferencia de las enfermedades autoinmunes, tal como la EM y diabetes mellitus tipo 1, el SLE potencialmente involucra múltiples sistemas de órganos directamente, y sus manifestaciones clínicas son diversas y variables (revisado por Kotzin y O'Dell, 1995). Por ejemplo, algunos pacientes pueden demostrar principalmente erupciones en la piel y dolor en las articulaciones, mostrar remisiones espontáneas, y requerir poca medicación. En el otro extremo del espectro están los pacientes que demuestran involucramiento renal severo y progresivo que requiere terapia con altas dosis de esteroides y fármacos citotóxicos tal como ciclofosfamida (Kotzin, 1996).

Uno de los anticuerpos producidos por SLE, IgG anti-ADNs, desempeña un papel importante en el desarrollo de glomerulonefritis lúpica (GN) (Hahn y Tsao, 1993; Ohnishi et al., 1994). La glomerulonefritis es una afección seria en la cual las paredes de capilares de los glomérulos de purificación de la sangre de los riñones se vuelven gruesas por acumulaciones en el lado epitelial de las membranas basales glomerulares. La enfermedad a menudo es crónica y progresiva y puede conducir a insuficiencia renal eventual.

K. Síndrome del Intestino Irritable

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes con síndrome de intestino irritable (IBS). El IBS es un trastorno funcional caracterizado por dolor abdominal y hábitos intestinales alterados. Este síndrome puede comenzar en la edad adulta joven y puede estar asociado con una discapacidad significativa. Este síndrome no es un trastorno homogéneo. Más bien, los subtipos de IBS se han descrito sobre la base de síntomas predominantes - diarrea, estreñimiento, o dolor. En la ausencia de síntomas de "alarma", tal como fiebre, pérdida de peso y sangrado gastrointestinal, es necesario un estudio diagnóstico limitado.

Cada vez más, la evidencia de los orígenes de IBS sugiere una relación entre la enteritis infecciosa y el desarrollo subsecuente de IBS. Las citoquinas inflamatorias pueden desempeñar un papel. En una encuesta de pacientes con un historial de gastroenteritis bacteriana confirmada (Neal et al., 1997), el 25% reportó alteración persistente de los hábitos intestinales. La persistencia de los síntomas puede ser debido a estrés psicológico en el momento de la infección aguda (Gwee et al., 1999).

Los datos recientes sugieren que el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado también puede tener un papel en los síntomas del IBS. En un estudio (Pimentel et al., 2000), 157 (78%) de 202 pacientes con IBS referidos para las pruebas de aliento de hidrógeno tuvieron hallazgos de las pruebas que fueron positivos para el sobrecrecimiento bacteriano. De los 47 sujetos que tenían pruebas de seguimiento, 25 (53%) reportaron mejora de los síntomas (es decir, dolor abdominal y diarrea) con el tratamiento con antibióticos.

L. Síndrome de Sjögren

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes con síndrome de Sjögren. El síndrome de Sjögren primario (SS) es una enfermedad autoinmune sistémica lentamente progresiva, crónica, que afecta predominantemente a las mujeres de mediana edad (relación de mujer a hombre 9:1), aunque se puede ver en todas las edades incluyendo la infancia (Jonsson et al., 2002). La enfermedad se caracteriza por la infiltración linfocítica y la destrucción de las glándulas exocrinas, que están infiltradas con células mononucleares, incluyendo linfocitos CD4+, CD8+ y células B (Jonsson et al., 2002). Además, las manifestaciones extraglandulares (sistémicas) se observan en un tercio de los pacientes (Jonsson et al., 2001).

En otras enfermedades autoinmunes sistémicas, tal como RA, se han identificado factores críticos para centros germinales ectópicos (GC). Los tejidos sinoviales reumatoides con GC, se mostró que producen quimioquinas CXCL13, CCL21, y linfotoxina (LT)- β (detectadas en el centro folicular y células B de zona de manto). El análisis de regresión multivariada de estos analitos identificó CXCL13 y LT- β como las citoquinas solitarias que predicen GC en la sinovitis reumatoide (Weyand y Goronzy, 2003). Recientemente, se ha mostrado que CXCL13 y CXCR5 en las glándulas salivales juegan un papel esencial en el proceso inflamatorio reclutando células B y T, por lo tanto, contribuyendo a la neogénesis linfoide y la formación GC ectópica en SS (Salomonsson et al., 2002).

M. Psoriasis

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y métodos de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes con psoriasis. La psoriasis es una enfermedad crónica de la piel de descamación e inflamación que afecta a 2 a 2,6 por ciento de la población de Estados Unidos, o entre 5,8 y 7,5 millones de personas. La psoriasis ocurre cuando las células de la piel crecen rápidamente desde su origen por debajo de la superficie de la piel y se acumulan en la superficie antes de que tengan la oportunidad de madurar. Por lo general, este movimiento (también llamado recambio) tarda aproximadamente un mes, pero en la psoriasis el recambio puede ocurrir en sólo unos pocos días. En su forma típica, la psoriasis resulta en parches de piel roja (inflamada) gruesa, cubiertos con escamas plateadas. Estos parches, que se refieren a veces como placas, generalmente pican o se sienten doloridas. Las placas ocurren con mayor frecuencia en los codos, rodillas, otras partes de las piernas, cuero cabelludo, espalda baja, cara, palmas, y plantas de los pies, pero pueden aparecer en la piel en cualquier parte del cuerpo. La enfermedad también puede afectar las uñas de las manos, las uñas de los pies, y los tejidos blandos de los genitales y dentro de la boca.

La psoriasis es un trastorno de la piel dirigido por el sistema inmune, que implica especialmente un tipo de glóbulo blanco llamado célula T. Normalmente, las células T ayudan a proteger al cuerpo frente a infección y enfermedad. En el caso de la psoriasis, las células T se ponen en acción por error y se vuelven tan activas que desencadenan otras respuestas inmunes, que conducen a la inflamación y al recambio rápido de las células de la piel.

N. Enfermedades Infecciosas

En algunas realizaciones, el RTA 408, las formas polimórficas, y métodos de la presente descripción pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo infecciones virales y bacterianas. Como se señaló anteriormente, estas infecciones pueden estar asociadas con respuestas inflamatorias localizadas o sistémicas graves. Por ejemplo, la influenza puede causar inflamación grave del pulmón y la infección bacteriana puede causar respuesta hiperinflamatoria sistémica, incluyendo la producción excesiva de múltiples citoquinas inflamatorias, que es el sello distintivo de la sepsis. Además, los compuestos de la invención pueden ser útiles en la inhibición directa de la replicación de patógenos virales. Estudios anteriores han demostrado que los compuestos relacionados tal como CDDO pueden inhibir la replicación del VIH en los macrófagos (Vázquez et al., 2005). Otros estudios han indicado que la inhibición de la señalización de NF- κ B puede inhibir la replicación del virus de influenza, y que las prostaglandinas de ciclopentenona pueden inhibir la replicación viral (por ejemplo, Mazur et al., 2007; Pica et al., 2000).

La presente invención se refiere al tratamiento o prevención de cada una de las enfermedades/trastornos/afecciones referidas anteriormente en la sección IV utilizando el compuesto RTA 408 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, o una forma polimórfica de este compuesto (tal como, por ejemplo, una cualquiera de las formas polimórficas descritas en la presente antes o a continuación), o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades mencionadas anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable (incluyendo, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente).

V. Formulaciones Farmacéuticas y Rutas de Administración

5 El RTA 408 se puede administrar por una variedad de métodos, por ejemplo, por vía oral o por inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, etc.). Dependiendo de la ruta de administración, los compuestos activos se pueden revestir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. También se pueden administrar por perfusión/infusión continua de una enfermedad o sitio de herida.

10 Para administrar el RTA 408 por una administración diferente de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto terapéutico se puede administrar a un paciente en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen disolución salina y disoluciones tampones acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de agua-en-aceite-en-agua CGF, así como liposomas convencionales (Strejan et al., 1984).

15 El RTA 408 también se puede administrar por vía parenteral, intraperitoneal, intraespinal, o intracerebral. Las dispersiones se pueden preparar en glicerol, polietilén glicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservador para prevenir el crecimiento de microorganismos.

20 Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando RTA 408 en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto terapéutico en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado bajo vacío y liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo (es decir, el compuesto terapéutico) más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución previamente filtrada estéril del mismo.

25 El RTA 408 puede volverse totalmente amorfo utilizando un procedimiento de secado por pulverización directa. El RTA 408 se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto terapéutico y otros ingredientes también se pueden encerrar en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto terapéutico se puede incorporar, por ejemplo, con excipientes y utilizarse en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas incluyendo cápsulas duras o blandas, elixires, emulsiones, dispersiones sólidas, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. El porcentaje del compuesto terapéutico en las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse. La cantidad del compuesto terapéutico en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

35 Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se utiliza en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto terapéutico calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto terapéutico y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto terapéutico para el tratamiento de una afección seleccionada en un paciente.

40 El RTA 408 también se puede administrar por vía tópica en la piel, ojos o mucosa. En algunas realizaciones, el compuesto se puede preparar en una loción, crema, gel, aceite, ungüento, bálsamo, disolución, suspensión, o emulsión. Alternativamente, si se desea el suministro local a los pulmones el compuesto terapéutico se puede administrar por inhalación en una formulación para aerosol o polvo seco.

50 El RTA 408 se administrará típicamente a una dosificación terapéuticamente efectiva suficiente para tratar una afección asociada con un paciente dado. Por ejemplo, la eficacia de un compuesto puede ser evaluada en un sistema modelo animal que puede ser predictivo de la eficacia en el tratamiento de la enfermedad en los seres humanos, tales como los sistemas de modelos que se muestran en los ejemplos y figuras.

55 La cantidad de dosificación real de RTA 408 o la composición que comprende RTA 408 administrada a un paciente se puede determinar por factores físicos y fisiológicos, tales como la edad, sexo, peso corporal, severidad de la afección, tipo de enfermedad a tratar, intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, idiopatía del paciente, y la ruta de administración. Estos factores se pueden determinar por un experto en la materia. El médico responsable de la administración determinará típicamente la concentración de ingrediente(s) activo(s) en una composición y dosi(s) apropiada(s) para el paciente individual. La dosificación se puede ajustar por el médico individual en el caso de cualquier complicación.

Una cantidad efectiva variará típicamente desde aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg,

desde aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, desde aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, desde aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, desde aproximadamente 10,0 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días (dependiendo por supuesto del modo de administración y los factores discutidos más arriba). Otros intervalos de dosis adecuados incluyen 1 mg a 10.000 mg al día, 100 mg a 10.000 mg al día, 500 mg a 10.000 mg al día, y 500 mg a 1.000 mg al día. En algunas realizaciones particulares, la cantidad es menor de 10.000 mg al día con un intervalo de 750 mg a 9.000 mg al día.

La cantidad efectiva puede ser menos de 1 mg/kg/día, menos de 500 mg/kg/día, menos de 250 mg/kg/día, menos de 100 mg/kg/día, menos de 50 mg/kg/día, menos de 25 mg/kg/día, o menos de 10 mg/kg/día. Alternativamente, puede estar en el intervalo de 1 mg/kg/día a 200 mg/kg/día. En algunas realizaciones, la cantidad podría ser 10, 30, 100, ó 150 mg/kg formulada como una suspensión en aceite de sésamo como se describe a continuación en el Ejemplo C1. En algunas realizaciones, la cantidad podría ser 3, 10, 30 ó 100 mg/kg administrada diariamente a través de una sonda oral como se describe a continuación en los Ejemplos C2 y C3. En algunas realizaciones, la cantidad podría ser 10, 30, ó 100 mg/kg administrada por vía oral como se describe a continuación en el Ejemplo C6. Por ejemplo, con respecto al tratamiento de pacientes diabéticos, la dosificación unitaria puede ser una cantidad que reduce la glucosa en sangre al menos un 40% en comparación con un paciente no tratado. En otra realización, la dosificación unitaria es una cantidad que reduce la glucosa en sangre hasta un nivel que es de \pm 10% del nivel de glucosa en la sangre de un paciente no diabético.

En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 μ g/kg de peso corporal, aproximadamente 5 μ g/kg de peso corporal, aproximadamente 10 μ g/kg de peso corporal, aproximadamente 50 μ g/kg de peso corporal, aproximadamente 100 μ g/kg de peso corporal, aproximadamente 200 μ g/kg de peso corporal, aproximadamente 350 μ g/kg de peso corporal, aproximadamente 500 μ g/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, hasta aproximadamente 1.000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de éstos. En los ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números listados en la presente, un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 μ g/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, etc., se puede administrar, con base en los números descritos anteriormente.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente descripción puede comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,01% de RTA 408. En otras realizaciones, el RTA 408 puede comprender entre aproximadamente 0,01% a aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable de éstos. En algunas realizaciones, el RTA 408 se puede utilizar en una formulación tal como una suspensión en aceite de sésamo de 0,01%, 0,1%, ó 1% como se describe a continuación en los Ejemplos F y G. En algunas realizaciones, el RTA 408 se puede formular para la administración tópica en la piel u ojos, utilizando un vehículo farmacéuticamente adecuado, o como una suspensión, emulsión o disolución en concentraciones que varían desde aproximadamente 0,01% a 10%. En algunas realizaciones, la concentración varía desde aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5%. La concentración óptima puede variar dependiendo del órgano diana, la preparación específica, y la afección a tratar.

Se contemplan dosis únicas o múltiples del agente que comprenden el RTA 408. Los intervalos de tiempo deseados para el suministro de múltiples dosis se pueden determinar por un experto en la técnica que emplea no más que experimentación de rutina. Como un ejemplo, se pueden administrar a los pacientes dos dosis diarias a intervalos de aproximadamente 12 horas. En algunas realizaciones, el agente se administra una vez al día. El o los agentes se pueden administrar en un programa de rutina. Como se utiliza en la presente, un programa de rutina se refiere a un período de tiempo designado predeterminado. El programa de rutina puede abarcar períodos de tiempo que son idénticos o que difieren en longitud, siempre y cuando el programa sea predeterminado. Por ejemplo, el programa de rutina puede implicar la administración dos veces al día, cada día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanalmente, mensualmente, o cualquier conjunto de números de días o semanas entre éstos. Alternativamente, el programa de rutina predeterminado puede implicar la administración sobre una base de dos veces al día durante la primera semana, seguida por una base diaria durante varios meses, etc. En otras realizaciones, la invención provee que el o los agentes se pueden tomar por vía oral y que la sincronización de éstos depende o no de la ingesta de alimentos. Así, por ejemplo, el agente se puede tomar cada mañana y/o todas las noches, independientemente del momento en que el paciente haya comido o vaya a comer.

55 VI. Terapia de Combinación

Además de ser utilizado como monoterapia, el RTA 408 y las formas polimórficas descritas en la presente invención también pueden encontrar uso en terapias de combinación. La terapia de combinación efectiva se puede lograr con una composición o formulación farmacológica única que incluye ambos agentes, o con dos composiciones o formulaciones distintas, administradas al mismo tiempo, en donde una composición incluye RTA 408 o sus formas polimórficas, y la otra incluye el segundo o segundos agentes. La otra modalidad terapéutica se puede administrar antes de, simultáneamente con, o después de la administración de RTA 408 o sus formas polimórficas. La terapia

utilizando RTA 408 o sus formas polimórficas puede preceder o seguir a la administración del otro u otros agentes por intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones donde el otro agente y RTA 408 o sus formas polimórficas se administran por separado, uno en general aseguraría que un período de tiempo significativo no expira entre el momento de cada suministro, de tal manera que cada agente todavía sería capaz de ejercer un efecto ventajosamente combinado. En tales casos, se contempla que uno típicamente administraría el RTA 408 o las formas polimórficas y el otro agente terapéutico dentro de aproximadamente 12-24 horas uno del otro y, más preferiblemente, dentro de aproximadamente 6-12 horas uno del otro, siendo el más preferido un retraso de tiempo de sólo aproximadamente 12 horas. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el período de tiempo para el tratamiento significativamente, sin embargo, donde varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) transcurren entre las administraciones respectivas.

También es concebible que se deseará más de una administración de RTA 408 o sus formas polimórficas, o el otro agente. A este respecto, se pueden emplear varias combinaciones. A modo de ilustración, donde el RTA 408 o sus formas polimórficas es "A" y el otro agente es "B", las siguientes permutaciones basadas en 3 y 4 administraciones totales son ejemplares:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B
 A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A
 A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

Otras combinaciones se contemplan igualmente. Los ejemplos no limitantes de agentes farmacológicos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen cualquier agente farmacológico conocido por ser de beneficio en el tratamiento de un cáncer. En algunas realizaciones, se contemplan combinaciones de RTA 408 o sus formas polimórficas con una inmunoterapia dirigida a un cáncer, terapia génica, radioterapia, agente quimioterapéutico, o cirugía. También se contempla una combinación de RTA 408 o sus formas polimórficas con más de uno de los métodos mencionados anteriormente que incluyen más de un tipo de una terapia específica. En algunas realizaciones, la inmunoterapia puede ser otros anticuerpos dirigidos al cáncer tales como, pero no limitados a, trastuzumab (Herceptin®), alemtuzumab (Campath®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Eribitux®), y panitumumab (Vectibix®) o anticuerpos conjugados tales como ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), brentuximab vedotin (Adcetris®), ado-trastuzumab emtansina (Kadcyla™), o denileuquina dititox (ONTAK®). Además, en algunas realizaciones, el RTA 408 o sus formas polimórficas se contemplan para ser utilizados en terapias de combinación con inmunoterapias basadas en células dendríticas, tal como Sipuleucel-T (Provenge®) o inmunoterapias de células T adoptivas.

Además, se contempla que el RTA 408 o sus formas polimórficas se utilicen en combinación con un agente quimioterapéutico tal como, pero no limitado a, antraciclinas, taxanos, metotrexato, mitoxantrona, estramustina, doxorubicina, etopósido, vinblastina, carboplatino, vinorelbina, 5-fluorouracilo, cisplatino, topotecán, ifosfamida, ciclofosfamida, epirubicina, gemcitabina, vinorelbina, irinotecán, etopósido, vinblastina, pemetrexed, melfalán, capecitabina y oxaliplatino. En algunas realizaciones, el RTA 408 o sus formas polimórficas se utilizan en combinación con terapia de radiación incluyendo, pero no limitado a, el uso de radiación ionizante. En algunas realizaciones, los efectos del agente terapéutico del cáncer se potencian sinérgicamente través de la administración con RTA 408 y sus formas polimórficas. En algunas realizaciones, las terapias de combinación las cuales incluyen RTA 408 se utilizan para tratar el cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de próstata. Véase, por ejemplo, Ejemplo H a continuación.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender además (1) poner en contacto una célula de tumor con el compuesto antes de poner en contacto la célula de tumor con el segundo agente quimioterapéutico, (2) poner en contacto una célula de tumor con el segundo agente quimioterapéutico antes de poner en contacto la célula de tumor con el compuesto, o (3) poner en contacto una célula de tumor con el compuesto y el segundo agente quimioterapéutico al mismo tiempo. El segundo agente quimioterapéutico puede, en ciertas realizaciones, ser un antibiótico, antiinflamatorio, anti-neoplásico, anti-proliferativo, anti-viral, inmunomodulador o inmunosupresor. En otras realizaciones, el segundo agente quimioterapéutico puede ser un agente alquilante, modulador del receptor de andrógenos, disruptor de citoesqueleto, modulador del receptor de estrógenos, inhibidor de histona-desacetilasa, inhibidor de HMG-CoA reductasa, inhibidor de proteína prenial transferasa, modulador del receptor de retinoide, inhibidor de topoisomerasa, o inhibidor de tirosina quinasa. En ciertas realizaciones, el segundo agente quimioterapéutico es 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, ácido 9-cis-retinoico, actinomicina D, alitretinoína, ácido todo-trans-retinoico, anamicina, axitinib, belinostat, bevacizumab, bexaroteno, bosutinib, busulfán, capecitabina, carboplatino, carmustina, CD437, cediranib, cetuximab, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dasatinib, daunorubicina, decitabina, docetaxel, dolastatina-10, doxifluridina, doxorubicina, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, etopósido, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, hexametilmelamina, idarubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, isotretinoína, ixabepilona, lapatinib, LBH589, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, MS-275, neratinib, nilotinib, nitrosourea, oxaliplatino, paclitaxel, plicamicina, procarbazona, semaxanib, semustina, butirato de sodio, fenilacetato de sodio, estreptoizotocina, ácido suberoilánilida hidroxámico, sunitinib, tamoxifeno, tenipósido, tiopeta, tioguanina, topotecán, TRAIL, trastuzumab, tretinoína, tricotostatina A, ácido valproico, valrubicina, vandetanib,

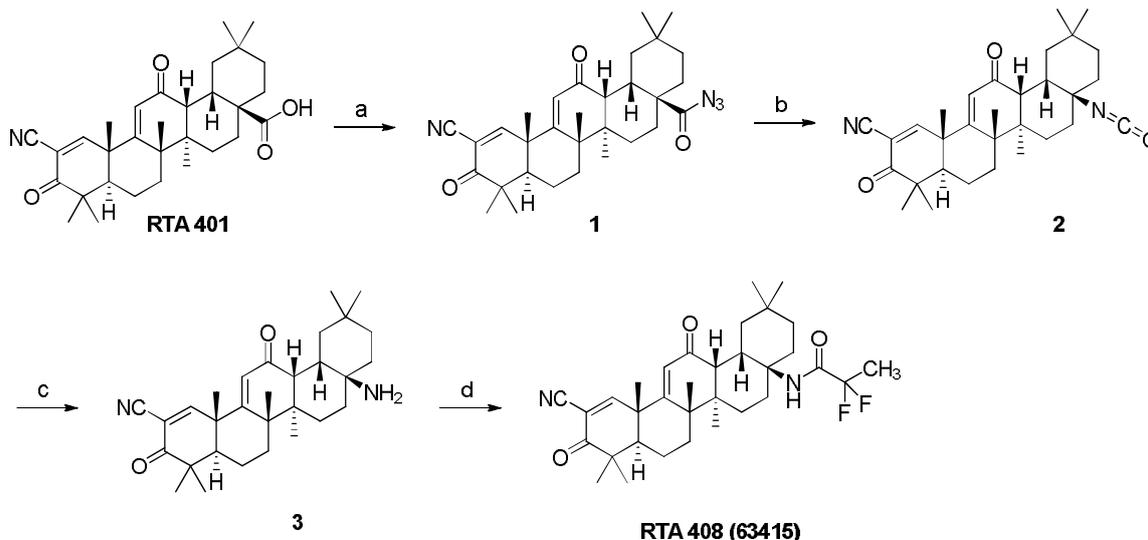
vinblastina, vincristina, vindesina, o vinorelbina.

Adicionalmente, se contemplan las terapias de combinación para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular utilizando RTA 408, formas polimórficas, y composiciones farmacéuticas de la presente descripción. Por ejemplo, tales métodos pueden comprender además administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de uno o más fármacos cardiovasculares, además de RTA 408, formas polimórficas, y composiciones farmacéuticas de la presente descripción. El fármaco cardiovascular puede ser, pero no se limita a, por ejemplo, un fármaco para reducir el colesterol, un anti-hiperlipidémico, un bloqueador del canal de calcio, un anti-hipertensivo, o un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En algunas realizaciones, los ejemplos no limitantes de fármacos cardiovasculares incluyen amlodipina, aspirina, ezetimiba, felodipina, lacidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina o nitrendipina. En otras realizaciones, otros ejemplos no limitantes de fármacos cardiovasculares incluyen atenolol, bucindolol, carvedilol, clonidina, doxazosina, indoramina, labetalol, metildopa, metoprolol, nadolol, oxprenolol, fenoxibenzamina, fentolamina, pindolol, prazosin, propranolol, terazosin, timolol o tolazolina. En otras realizaciones, el fármaco cardiovascular puede ser, por ejemplo, una estatina, tales como atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina o simvastatina.

VII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Se debe apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y por lo tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y todavía obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

A. Síntesis de RTA 408 (63415)



Reactivos y condiciones: (a) $(\text{PhO})_2\text{PON}_3$ (DPPA), Et_3N , tolueno, 0°C durante 5 min, luego t.a. durante la noche, $\sim 94\%$; (b) benceno, 80°C durante 2 h; (c) HCl , CH_3CN , t.a. durante 1 h; (d) $\text{CH}_3\text{CF}_2\text{CO}_2\text{H}$, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , t.a. durante la noche, 73% de **RTA 401** (4 etapas).

Compuesto 1: A una disolución de tolueno (400 mL), se añadió **RTA 401** (que se puede preparar de acuerdo con los métodos enseñados, por ejemplo, por Honda, et al., 1998; Honda et al., 2000b; Honda et al., 2002; Yates et al., 2007, y Patentes U.S. 6.326.507 y 6.974.801) (20,0 g, 40,6 mmoles) y Et_3N (17,0 ml, 122,0 mmoles) en un reactor y se enfrió hasta 0°C con agitación. Se añadió difenilfosforilazida (DPPA) (13,2 ml, 61,0 mmoles) con agitación a 0°C durante 5 min y la mezcla se agitó continuamente a temperatura ambiente durante la noche (la verificación de HPLC-MS no muestra **RTA 401** remanente). La mezcla de reacción se cargó directamente en una columna de gel de sílice y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 0% a 5% de EtOAc en CH_2Cl_2) para producir el compuesto **1** (19,7 g, $\sim 94\%$, parcialmente convertido en el compuesto **2**) como una espuma blanca.

Compuesto 2: El compuesto **1** (19,7 g, $\sim 38,1$ mmoles) y benceno (250 mL) se añadieron a un reactor y se calentaron hasta 80°C con agitación durante 2 h (la verificación de HPLC-MS no muestra compuesto **1** remanente). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto crudo **2** como un residuo sólido, que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación.

Compuesto 3: El compuesto crudo **2** ($\leq 38,1$ mmoles) y CH_3CN (200 mL) se añadieron a un reactor y se enfriaron

hasta 0°C con agitación. Se añadió HCl (12 N, 90 mL) a 0°C durante 1 min y la mezcla se agitó continuamente a temperatura ambiente durante 1 h (la verificación de HPLC-MS no muestra compuesto **2** remanente). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se añadió 10% de NaOH (~500 mL) con agitación. Luego, se añadió NaHCO₃ saturado (1 L) con agitación. La fase acuosa se extrajo por EtOAc (2x500 mL). La fase orgánica combinada se lavó con H₂O (200 mL), NaCl saturado (200 mL), se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró para proporcionar el compuesto crudo **3** (16,62 g) como una espuma de color amarillo claro, que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación.

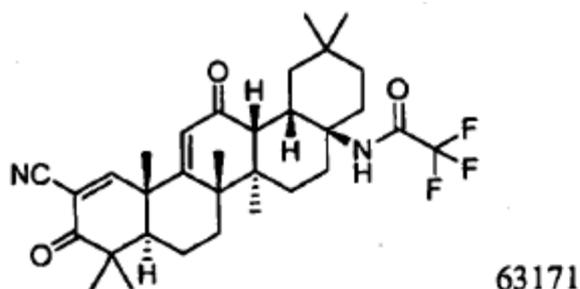
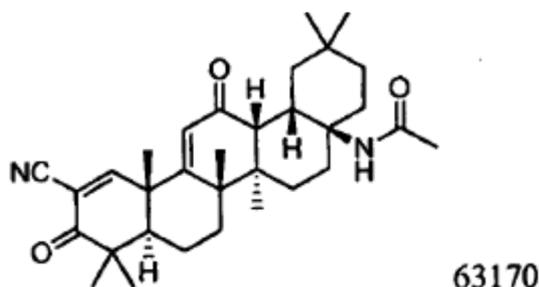
RTA 408: La amina cruda **3** (16,62 g, 35,9 mmoles), CH₃CF₂CO₂H (4,7388 g, 43,1 mmoles), y CH₂Cl₂ (360 mL) se añadieron a un reactor con agitación a temperatura ambiente. Luego, se añadieron dicitohexilcarbodiimida (DCC) (11,129 g, 53,9 mmoles) y 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (1,65 g, 13,64 mmoles) y la mezcla se agitó continuamente a temperatura ambiente durante la noche (la verificación de HPLC-MS no muestra compuesto **3** remanente). La mezcla de reacción se filtró para remover los subproductos sólidos y el filtrado se cargó directamente en una columna de gel de sílice y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 0% a 20% de EtOAc en hexanos) dos veces para producir el compuesto **RTA 408** (16,347 g, 73% de **RTA 401** en 4 etapas) como una espuma blanca: ¹H RMN (400 MHz, CD₃Cl) δ 8,04 (s, 1H), 6,00 (s, 1H), 5,94 (s, br, 1H), 3,01 (d, 1H, J = 4,8 Hz), 2,75-2,82 (m, 1H), 1,92-2,18 (m, 4H), 1,69-1,85 (m, 7H), 1,53-1,64 (m, 1H), 1,60 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,42 (s, 3H), 1,11-1,38 (m, 3H), 1,27 (s, 3H), 1,18 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 1,04 (s, 3H), 0,92 (s, 3H); m/z 555 (M+1).

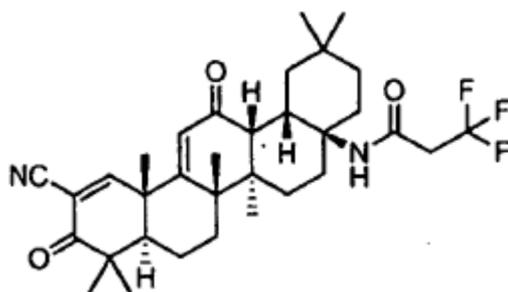
B. Farmacodinámica

Un resumen de los estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar los efectos farmacodinámicos primarios de RTA 408 se proporciona a continuación.

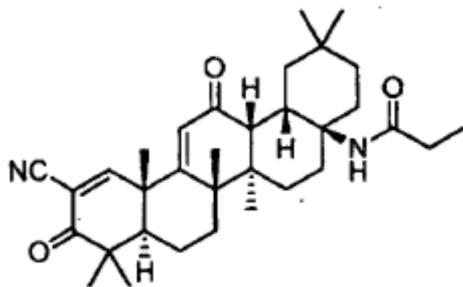
1. Efectos de RTA 408 en Keap1-Nrf2 y NF-κB *in Vitro*

La inhibición de la producción de NO inducida por IFN γ por AIM es dependiente de Nrf2 (Dinkova-Kostova, 2005). Macrófagos de ratón RAW264.7 se plaquearon en placas de 96 pocillos a 30.000 células/pocillo por triplicado en RPMI 1640 suplementado con 0,5% de FBS y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se pre-trataron con DMSO (vehículo) o RTA 408 durante 2 h, seguido por tratamiento con 20 ng/ml de IFN γ de ratón durante 24 h. Los niveles de nitrito (NO₂⁻) en los medios se midieron como un sustituto para el óxido nítrico utilizando el sistema de reactivo de Griess (cat # G2930, Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, ya que el nitrito es un producto de degradación estable primario de NO. La viabilidad celular se evaluó utilizando Reactivo de Proliferación de Células WST-1 (cat # 11644807001, Roche Applied Science) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de CI₅₀ se determinaron con base en la supresión de la producción de óxido nítrico inducida por IFN γ normalizada a la viabilidad celular. El tratamiento con RTA 408 dio como resultado una supresión dependiente de la dosis de producción de NO inducida por IFN γ , con un valor de CI₅₀ promedio de 3,8 ± 1,2 nM. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la FIG. 1. El valor de CI₅₀ para RTA 408 se encontró que es 45% -65% menor que los valores de CI₅₀ para los compuestos 63170 (8 ± 3 nM), 63171 (6,9 ± 0,6 nM), 63179 (11 ± 2 nm), y 63189 (7 ± 2 nM). 63170, 63171, 63179 y 63189 son compuestos de las fórmulas:





63179



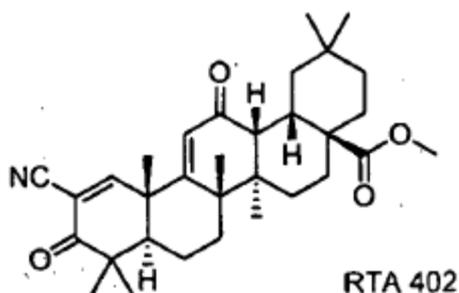
63189.

2. Efecto de RTA 408 en Genes Diana Nrf2

El RTA 408 se ensayó en dos ensayos informadores de luciferasa diferentes para evaluar la activación de ARE. El primer informador de luciferasa ensayado estuvo bajo el control de un ARE único derivado del promotor del gen humano NQO1, que permite la evaluación cuantitativa de la actividad endógena del factor de transcripción Nrf2 en células de mamífero cultivadas. La expresión de luciferasa de luciérnaga de plásmido informador de luciferasa NQO1-ARE se controla por la unión de Nrf2 a una secuencia potenciadora específica correspondiente al elemento de respuesta antioxidante (ARE) que se identificó en la región promotora del gen humano de NADPH:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) (Xie et al., 1995). El plásmido informador de luciferasa NQO1-ARE se construyó insertando el NQO1-ARE humano (5'-CAGTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG-3') en el vector pLuc-MCS utilizando sitios de clonación HindIII/XhoI (GenScript Corp, Piscataway, NJ). La línea celular de hepatoma humano Huh-7, mantenida en DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% FBS y 100 U/mL (cada una) de penicilina y estreptomina, se transfectó transitoriamente utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con el plásmido informador de luciferasa NQO1-ARE y el plásmido pRL-TK, que expresa constitutivamente la luciferasa de *Renilla* y se utilizó como un control interno para la normalización de los niveles de transfección. A las treinta horas desde la transfección, las células se trataron con RTA 408 durante 18 h. La actividad de luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* se ensayó por ensayo de luciferasa Dual-Glo (cat # E2920, Promega), y la señal de luminiscencia se midió en un luminómetro L-Max II (Molecular Devices). La actividad de luciferasa de luciérnaga se normalizó a la actividad de *Renilla*, y se calculó las veces de inducción sobre un control de vehículo (DMSO) de la actividad de luciérnaga normalizada. FIG. 2a muestra una inducción dependiente de la dosis de la actividad de luciferasa por RTA 408 en esta línea celular. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes. Se requirió un veinte por ciento menos de RTA 408 (12 nM) que de 63189 (14,9 nM) para aumentar la transcripción de NQO1 ARE en células HuH-7 2 veces. De manera similar, se requirió 2,1-2,4 veces menos de RTA 408 que de 63170 (25,2 nM) y 63179 (29,1 nM), respectivamente, para aumentar la transcripción de NQO1 ARE en células HuH-7 2 veces.

El efecto de RTA 408 en la activación de informador de luciferasa también se evaluó en la línea celular de informador AREc32. Esta línea celular deriva de células MCF-7 de carcinoma de mama humano y se transfecta de forma estable con un gen informador de luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional de ocho copias de la secuencia GSTA2 ARE de rata (Wang, et al., 2006). Después del tratamiento con RTA 408 durante 18 h, se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga utilizando el sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo (Promega, Catálogo # E6110) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se observó una respuesta dependiente de la dosis en la línea celular de informador AREc32 (FIG. 2b). Una inducción de ~ 2 veces de actividad de luciferasa fue evidente después del tratamiento con 15,6 nM RTA 408, tanto en el sistema de informador NQO1-ARE como GSTA2-ARE. Cuando se observan los resultados del estudio de actividad de luciferasa de GSTA2-ARE (AREc32), los efectos de 63415 (RTA 408) en la inducción de GSTA2-ARE se pueden comparar directamente con los de RTA 402, 63170, 63171, 63179, y 63189, junto con los estudios de viabilidad de WST1 (FIGS. 3a-f). En comparación con los valores de RTA 402, el 63415 mostró la inducción más rápida de la transcripción mediada por GSTA2-ARE de los cinco compuestos de comparación con una concentración de 93 nM necesaria para lograr la inducción de 4 veces en el ensayo de informador de luciferasa. Todos los otros compuestos mostraron una inducción similar solamente con concentraciones mucho más altas con 63170 necesitando una concentración de 171 nM, 63171 necesitando una concentración de 133 nM, 63179 necesitando una concentración de 303 nM y 63189 necesitando una concentración de 174 nM para lograr una inducción de 4 veces de la actividad de luciferasa. Estos valores corresponden a un

aumento de 1,86 (63415), 3,40 (63170), 2,65 (63171), 6,05 (63179) y 3,47 (63189) veces en la cantidad del compuesto activo necesaria en comparación con RTA 402 para conducir a la misma cantidad de actividad.



También se ha mostrado que RTA 408 aumenta los niveles de transcrito de genes diana conocidos de Nrf2 en los fibroblastos de pulmón fetal humano HFL1 y líneas celulares epiteliales bronquiales humanas BEAS-2B. Las células HFL1 se cultivaron en medio F-12K suplementado con 10% suero bovino fetal y 1% penicilina-estreptomicina. Las células BEAS-2B se cultivaron en medio DMEM/F-12 suplementado con 10% suero bovino fetal y 1% penicilina-estreptomicina. Las células se plaquearon en placas de 6 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo. Al día siguiente, las células se trataron con DMSO (vehículo) o RTA 408 (7,8, 15,6, 31,3, 62,5, ó 125 nM) durante 18 h. Cada pocillo recibió la misma cantidad de vehículo. Después del tratamiento, el medio se retiró y las células se recogieron utilizando tampón RLT (Qiagen). Los lisados se homogeneizaron utilizando columnas QIAshredder (Qiagen, Catálogo # 79654) y el ARN se aisló utilizando kits RNeasy Mini (Qiagen, Catálogo # 74104). Para la transcripción inversa, el ARN (1 µg) se combinó con cebador Oligo(dT)₁₂₋₁₈ y H₂O en un volumen final de 23,25 µL. La mezcla se calentó hasta 70°C durante 10 min y luego se colocó en hielo. Una mezcla maestra que contiene 8 µL 5X tampón de 1^{era} cadena, 2 µL de 1 mg/ml de BSA, 2 µL de 20 mM DTT, 4 µL de mezcla de 5 mM dNTP, 0,25 µL de RNaseOUT™ y 0,5 µL de transcriptasa inversa Superscript® II se añadieron a la mezcla de ARN y se incubaron a 42°C durante 1 h. La reacción se inactivó por calentamiento hasta 70°C durante 10 min. La mezcla de reacción se diluyó 1:3 con H₂O antes de su uso en la qPCR. Se combinaron 2,5 µL de la reacción de transcripción inversa diluida con un conjunto de cebadores de PCR (0,36 µM de concentración final), 2X iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, catálogo # 170-8885) y H₂O a un volumen final de 20 µL. Las secuencias para los cebadores de PCR son las siguientes: *Glutamato-cisteína ligasa, subunidad modificadora (GCLM)*, cebador directo 5'-GCTGTGGCTACTGCGGTATT-3' (SEC ID NO: 1), cebador inverso 5'-ATCTGCCTCAATGACACCAT-3' (SEC ID NO: 2); *Hemo oxigenasa-1 (HMOX1)* cebador directo 5'-TCCGATGGGTCCTTACTACTC-3' (SEC ID NO: 3), cebador inverso 5'-TAGGCTCCTTCCTCCTTTCC-3' (SEC ID NO: 4); *NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1 (NQO1)* cebador directo 5'-AAAACACTGCCCTCTTGTGG-3' (SEC ID NO: 5), cebador inverso 5'-GTGCCAGTCAGCATCTGGTA-3' (SEC ID NO: 6); *Proteína ribosomal S9 (RPS9)* cebador directo 5'-GATGAGAAGGACCCACGGCGTCTG-3' (SEC ID NO: 7), cebador inverso 5'-GAGACAATCCAGCAGCCAGGAGGG-3' (SEC ID NO: 8); *Tiorredoxina reductasa 1 (TXNRD1)* cebador directo 5'-ATTGCCACTGGTGAAAGACC-3' (SEC ID NO: 9), cebador inverso 5'-ACCAATTTTGTGGCCATGT-3' (SEC ID NO: 10). Todos los cebadores previamente se han validado para la especificidad y eficiencia de amplificación. El ADNc se amplificó utilizando las siguientes condiciones de ciclo: (95°C durante 3 min, 44 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 15 segundos, 72°C durante 15 segundos, seguido por una curva de fusión de 55°C a 95°C en incrementos de 0,5°C). La abundancia relativa de cada gen diana de Nrf2 se determinó utilizando el método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$). Las reacciones de PCR se realizaron en pocillos por triplicado para cada muestra. Dos experimentos independientes se realizaron utilizando las condiciones descritas anteriormente. El tratamiento de fibroblastos de pulmón HFL1 con RTA 408 durante 18 h resultó en un aumento de la expresión de varios genes diana de Nrf2, incluyendo NQO1, HMOX1, GCLM, y TXNRD1, como se mide por PCR cuantitativa (FIGS. 4a- d). Para todos los genes ensayados, la inducción por RTA 408 fue dependiente de la dosis y evidente a concentraciones tan bajas como 15,6 nM. El tratamiento de células epiteliales bronquiales BEAS-2B con RTA 408 durante 18 h dio como resultado un aumento dependiente de la dosis similar de todos los genes diana de Nrf2 evaluados (FIGS. 5a-d). El RTA 408 también aumentó la expresión de los genes diana de Nrf2 en las células mesangiales humanas normales (nHMC), la línea celular microglial BV2 de ratón, y la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y humano a concentraciones similares.

Los niveles de proteína de las dianas de Nrf2, NQO1 y HMOX1 se midieron en células SH-SY5Y y BV-2 por transferencia Western después del tratamiento con RTA 408. Las células SH-SY5Y se plaquearon en placas de 6 pocillos a una densidad de 4×10^5 células por pocillo. Las células BV-2 se plaquearon en placas de 6 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células por pocillo. Veinticuatro (BV-2) ó 48 (SH-SY5Y) h después del plaqueo, las células se trataron con RTA 408 durante 24 horas. Después del tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se recogieron en tampón de lisis. Las células se sometieron a sonicación y los residuos se aclararon por centrifugación (10 min a 18.000 rcf, Beckman Coulter, centrífuga microfuge 18). La proteína total en el sobrenadante se cuantificó utilizando el reactivo de proteínas Bio-Rad con BSA como estándar. Cantidades iguales de proteína celular total se separaron en SDS-PAGE, y las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1 h en TBST (1 x TBS con 0,1% Tween-20) que contenía 5% leche, se lavaron 3 veces con TBST, y se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. El anticuerpo NQO1 fue de Abcam (#

AB2346); el anticuerpo HMOX1 (HO-1) fue de Santa Cruz (#sc-10789); el anticuerpo actina fue de Millipore (#MAB 1501). Después del lavado con TBST, se añadieron anticuerpos secundarios en TBST + 5% leche durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios de IgG de anti-ratón o anti-conejo de cabra AffiniPure fueron de Jackson ImmunoResearch (catálogo # 111-035-144 y # 115-035-146, respectivamente). Las membranas se lavaron en TBST, se desarrollaron utilizando ECL, y se expusieron a película de rayos X. El tratamiento con RTA 408 también aumentó los niveles de proteína NQO1 en células SH-SY5Y en una forma dependiente de la dosis (FIG. 6a). La proteína HMOX1 no se detectó en células SH-SY5Y no tratadas o tratadas con RTA 408. En las células BV2, el tratamiento con RTA 408 aumentó los niveles de proteína NQO1 y HMOX1 a concentraciones hasta 125 nM (FIG. 6b). El valor de CE_{50} para la inducción de expresión de proteína Nrf2 en las células SK-N-SH por RTA 408 (56,4 nM) fue 45%-65% menor que los valores de CE_{50} para 63171 (122 nM), 63189 (102 nM), y 63179 (126 nM). Se requirió la misma cantidad de 63170 (54,6 nM).

La CE_{50} se midió utilizando un ensayo de NQO1 de análisis western en células donde las células se incubaron con el compuesto bajo evaluación durante tres días. Después de la incubación con el compuesto de interés, las células se hicieron reaccionar con anticuerpo NQO1 de ratón y luego al día siguiente, las células se hicieron reaccionar con anticuerpo de IgG IRDye-800CW-anti-ratón. Las señales diana se visualizaron y luego se analizaron.

Consistente con la inducción de genes diana de Nrf2 y productos de proteína correspondientes, el tratamiento de células de macrófagos de ratón RAW264.7 durante 24 h aumentó la actividad enzimática de NQO1 de una manera dependiente de la dosis, con aumentos evidentes a 7,8 nM (FIG. 7). La actividad enzimática de NQO1 se midió por un ensayo de Prochaska modificado (Prochaska y Santamaria, Anal Biochem 169:328-336, 1988).

Tomados en conjunto, estos datos de múltiples líneas celulares demuestran que el tratamiento con RTA 408 aumenta la actividad transcripcional controlada por elementos de respuesta antioxidante, aumenta la expresión de los genes diana de Nrf2, y aumenta la actividad de NQO1, un producto de gen diana de Nrf2.

3. Efecto de RTA 408 en Marcadores de la Capacidad Redox Celular

El glutatión y NADPH son factores críticos requeridos para el mantenimiento de la capacidad redox celular. Se ha mostrado que varios genes implicados en la síntesis de glutatión (por ejemplo, GCLC y GLCM) y NADPH [por ejemplo, hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (H6PD) y enzima málica 1 (ME1)] están regulados por Nrf2 (Wu, 2011). El efecto del tratamiento con RTA 408 en los niveles de glutatión totales se evaluó en la línea celular de hepatocitos AML-12 de ratón utilizando el kit de ensayo de glutatión GSH-Glo™ (Promega, Catálogo # V6912) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tratamiento de células AML-12 durante 24 h con RTA 408 aumentó los niveles de glutatión celular totales de una manera dependiente de la dosis (FIG. 8). Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes. Se observó un aumento > 2 veces en el glutatión total a concentraciones de RTA 408 tan bajas como 15,6 nM. El valor de CE_{50} utilizando un modelo de ratón RAW264.7 para la inducción de los niveles de glutatión por RTA 408 (9,9 nM) fue 22%-57% menor que los valores de CE_{50} para 63170 (12,1 nM), 63171 (23,2 nM), y 63189 (16 nM).

El efecto del tratamiento con RTA 408 en los niveles de NADPH, como se mide por la absorbancia de un tinte sensible a redox, WST-1 (Roche Applied Science, Catálogo # 11644807001), se evaluó en células HCT-116. La absorbancia de WST-1 se utiliza comúnmente para evaluar la viabilidad celular midiendo la producción glicolítica de NAD(P)H por las células viables. Por lo tanto, en situaciones donde aumenta la producción de NADPH en la ausencia de cualquier efecto en la viabilidad celular, la absorbancia de WST-1 también aumenta (Berridge et al., 1996). Varios genes clave implicados en la producción de NADPH también se ha mostrado que están regulados por Nrf2 (Thimmulappa et al., 2002; Wu, et al., 2011). El tratamiento con RTA 408 durante 24 h aumentó la absorbancia de WST-1 de una manera dependiente de la dosis (FIG. 9), lo que sugiere que se aumentaron los niveles de NADPH.

El efecto de RTA 408 en la expresión de genes implicados en las vías de síntesis de NADPH también fue evaluado en este estudio. Las células HCT-116 se trataron con RTA 408 durante 24 h, y los niveles de ARNm de H6PD, fosfogluconato deshidrogenasa (PGD), transcetolasa (TKT), y ME1 se midieron utilizando PCR cuantitativa. Las células HCT-116 se plaquearon en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo. Al día siguiente, las células se trataron con DMSO (vehículo), 10 nM RTA 408, ó 50 nM RTA 408 durante 24 h. Cada pocillo recibió la misma cantidad de vehículo. Después del tratamiento, el medio se retiró y las células se recogieron utilizando tampón RLT (Qiagen). Los lisados se homogeneizaron utilizando columnas QIAshredder (Qiagen, Catálogo # 79654) y el ARN se aisló utilizando kits RNeasy Mini (Qiagen, Catálogo # 74104). Para la transcripción inversa, el ARN (1 µg) se combinó con cebador Oligo(dT)12-18 y H₂O en un volumen final de 23,25 µL. La mezcla se calentó hasta 70°C durante 10 min y luego se colocó en hielo. Una mezcla maestra que contiene 8 µL 5X tampón de 1^{era} cadena, 2 µL de 1 mg/ml de BSA, 2 µL de 20 mM DTT, 4 µL de mezcla 5 mM dNTP, 0,25 µL de RNaseOUT™ y 0,5 µL de transcriptasa inversa Superscript® II se añadieron a la mezcla de ARN y se incubaron a 42°C durante 1 h. La reacción se inactivó por calentamiento hasta 70°C durante 10 min. La mezcla de reacción se diluyó 1:3 con H₂O antes de su uso en la qPCR. Se combinaron 2,5 µl de la reacción de transcripción inversa diluida con un conjunto de cebadores de PCR (0,36 µM de concentración final), 2X iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Catálogo # 170-8885) y H₂O a un volumen final de 20 µL. Las secuencias para los cebadores de PCR son como sigue: *Proteína ribosomal S9 (RPS9)* cebador directo 5'-GATGAGAAGGACCCACGGCGTCTG-3' (SEC ID NO: 7), cebador inverso

5'-GAGACAATCCAGCAGCCCAGGAGGG-3' (SEC ID NO: 8); *Hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (H6PD)* cebador directo 5'-GAGGCCGTGTACACCAAGAT-3' (SEC ID NO: 11), cebador inverso 5'-AGCAGTGGGGTGAAAATACG-3' (SEC ID NO: 12), *Fosfogluconato deshidrogenasa (PGD)* cebador directo 5'-AAGGCACTCTACGCTTCCAA-3' (SEC ID NO: 13), cebador inverso 5'-AGGAGTCCTGGCAGTTTTCA-3' (SEC ID NO: 14), *Transcetolasa (TKT)* cebador directo 5'-CATCTCCGAGAGCAACATCA-3' (SEC ID NO: 15), cebador inverso 5'-TTGTATTGGCGGCTAGTTCC-3' (SEC ID NO: 16); *Enzima málica 1 (ME1)* cebador directo 5'-TATATCCTGGCCAAGGCAAC-3' (SEC ID NO: 17) cebador inverso 5'-GGATAAAGCCGACCCTCTTC-3' (SEC ID NO: 18). Todos los cebadores previamente se han validado para la especificidad y eficiencia de amplificación. El ADNc se amplificó utilizando las siguientes condiciones de ciclo: (95°C durante 3 min, 44 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 15 segundos, 72°C durante 15 segundos, seguido por una curva de fusión de 55°C a 95°C en incrementos de 0,5°C). La abundancia relativa de cada gen diana se determinó utilizando el método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$). Las reacciones de PCR se realizaron en pocillos por triplicado para cada muestra. Dos experimentos independientes se realizaron utilizando las condiciones descritas anteriormente. El tratamiento con RTA 408 resultó en un aumento dependiente de la dosis en la expresión de genes implicados en la síntesis de NADPH (FIGS. 10a-d).

En resumen, el tratamiento con RTA 408 aumentó los niveles totales de glutatión en hepatocitos AML-12 y aumentó la absorbancia de WST-1, un marcador de la producción de NADPH, en células HCT-116. Esta observación se correlaciona con un aumento en la expresión de varios genes clave que codifican enzimas implicadas en la síntesis de NADPH.

4. Efecto de RTA 408 en la Señalización de NF- κ B Inducida por TNF α

NF- κ B es un factor de transcripción que juega un papel central en la regulación de muchas respuestas inmunes e inflamatorias. Se ha mostrado que RTA 402 y otros AIM inhiben la señalización de NF- κ B pro-inflamatoria en una variedad de líneas celulares (Shishodia, 2006; Ahmad, 2006; Yore, 2006). Utilizando la línea celular NIH3T3/NF- κ B-luc de ratón (Panomics), se exploraron los efectos de RTA 408 y los compuestos 63171, 63179, 63170, y 63189 en el informador NF- κ B-luc fueron explorados. La línea celular NIH3T3/NF- κ B-luc mantiene una integración cromosómica de una construcción informadora de la luciferasa de luciérnaga regulada por ocho copias del elemento de respuesta de NF- κ B. Los efectos de estos compuestos se pueden cuantificar midiendo el valor de CI_{50} de NF- κ B. El RTA 408 mostró una CI_{50} de 1,2 μ M, que cuando se normalizó para la viabilidad mostró una CI_{50} de 1,4 μ M. Los otros cuatro compuestos mostraron valores de CI_{50} de NIH3T3/NF- κ B de 1,7, 0,2, 1,1, y 1,1 μ M, que cuando se normalizó la viabilidad mostró valores de CI_{50} de 1,8, 0,6, 1,1, y 1,0 μ M, respectivamente. El RTA 408 y sus efectos en NF- κ B se representaron como una función de la dosificación y las veces de cambio relativo, así como WST1 y WST1/2 se muestran en las FIGS. 11a y b. El efecto de RTA 408 en la señalización de NF- κ B inducida por TNF α se evaluó en células HeLa/NF- κ B-luc, una línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano transfectada establemente con un construcción informadora de luciferasa bajo el control de múltiples elementos de respuesta transcripcional de NF- κ B. Las células HeLa/NF- κ B-luc fueron pretratadas durante 1 h con RTA 408, seguido de tratamiento con TNF- α (10 ng/mL) durante 5 h adicionales. Después del tratamiento, se midió la luminiscencia, y se determinó el efecto del pre-tratamiento con RTA 408 en la actividad de luciferasa inducida por TNF- α . Los resultados promedio y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes se muestran en la FIG. 12. El RTA 408 inhibió de manera dependiente de la dosis la activación de NF- κ B inducida por TNF- α con un valor de CI_{50} de 517 ± 83 nM. Se observaron resultados similares en otra línea celular de informador de NF- κ B (A549/NF- κ B-Luc) donde el RTA 408 inhibió la activación de NF- κ B inducida por TNF- α con un valor de CI_{50} de 627 nm (intervalo de 614-649 nM). El RTA 408 fue 1,6-1,8 veces más eficiente en la reducción de la expresión del informador promotor de NF- κ B en células HeLa/NF- κ B-Luc que 63189 (854 nM) y 63170 (953 nM), respectivamente. La experimentación adicional con la línea celular A549 humana mostró una CI_{50} de RTA 408 como 1,7 μ M y un valor que ha sido normalizado para la viabilidad a 1,7 μ M. La CI_{50} de RTA 408 mostró una actividad similar a 63189, 63179, 63171, y 63170 que mostró valores de CI_{50} de 1,1, 1,4, 2,0 y 1,0, respectivamente. Cuando los valores fueron de variabilidad normalizada, el ensayo mostró CI_{50} de 1,2, 1,5, 2,1 y 1,1 μ M, respectivamente. Las veces de cambio para NF- κ B como una función de la concentración de RTA 408 junto con curvas de WST1 y WST1/2, se representaron y se muestran en las FIGS. 13a y b.

El efecto de RTA 408 en la fosforilación inducida por TNF- α de I κ B α , una etapa clave en la activación de la vía de NF- κ B, también se evaluó en células HeLa. Las células HeLa se pretrataron con RTA 408 durante 6 h, seguido de tratamiento con TNF- α (20 ng/mL) durante 5 min. Los niveles totales y fosforilados de I κ B α se evaluaron por transferencia Western. Los anticuerpos I κ B α primarios fueron de Santa-Cruz (sc-371), el anticuerpo pI κ B α fue de Cell Signaling (9246), el anticuerpo actina fue de Millipore (MAB 1501). Los anticuerpos secundarios anti-conejo de cabra de affini-pure conjugado con peroxidasa (IgG) e IgG anti-ratón de cabra de affini-pure conjugado con peroxidasa se compraron de Jackson ImmunoResearch. Las transferencias de proteínas se desarrollaron utilizando ECL, y se expusieron a película de rayos X. Consistente con los resultados del ensayo de informador de luciferasa, el RTA 408 inhibió la fosforilación de I κ B α inducida por TNF- α de una manera dependiente de la dosis (FIG. 14).

También se ha demostrado que el RTA 408 inhibe otras vías de señalización pro-inflamatorias, tal como transductor de señal inducida por IL-6 y activador de la fosforilación de transcripción 3 (STAT3) y activador del receptor de osteoclastogénesis inducida por ligando de NF- κ B (RANKL). En las células HeLa, el pretratamiento con 1 μ M RTA 408 durante 6 h inhibió la fosforilación de STAT3 inducida por IL-6. Los anticuerpos monoclonales STAT3 (124H6) y fosfo-STAT3 (Tyr705) fueron de Cell Signaling Technology. IgG anti-conejo de cabra Affini-pure conjugado con

peroxidasa e IgG anti-ratón de cabra Affini-pure conjugado con peroxidasa fueron de Jackson ImmunoResearch. La osteoclastogénesis es un proceso de diferenciación de múltiples etapas que resulta de la unión de RANKL a su receptor, RANK, en las células de origen hematopoyético. Esto resulta en la activación de NF- κ B y MAPK, que a su vez aumentan la transcripción de genes diana específicos de osteoclastos, incluyendo la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). El efecto de RTA 408 en la osteoclastogénesis inducida por RANKL se evaluó en la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7. Las células RAW 264.7 se plaquearon en placas de 24 pocillos a una densidad de 5.000 células/pocillo. Al día siguiente, las células se trataron con RTA 408 durante 2 horas y luego se trataron con 50 ng/mL de RANKL de ratón recombinante (R&D systems). Las células tratadas se incubaron durante cuatro días para permitir la diferenciación en osteoclastos. La diferenciación en osteoclastos se evaluó por medición de la actividad de TRAP. Brevemente, 90 μ L de medio de cultivo celular condicionado se retiraron de cada pocillo de ensayo y se alicuotaron en pocillos triplicados (30 μ L/pocillo) de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 170 μ L de tampón de ensayo TRAP (Kamiya Biomedical) a cada pocillo y la placa se incubó a 37°C durante 3 horas. Después de la incubación, la absorbancia a 540 nm se determinó utilizando un espectrofotómetro de lectura de placas Spectramax M2. El RTA 408 inhibió de manera dependiente de la dosis la actividad de TRAP inducida por RANKL y la formación de osteoclastos, con una CI_{50} de ~5-10 nM.

5. Efecto de RTA 408 en la Expresión de Genes que Codifican Enzimas Transaminasas

Se observaron elevaciones de transaminasa en los estudios de toxicidad de 28 días con RTA 408 en ratas y, a un grado mucho menor, en monos. Hallazgos similares se han observado después de administración oral de un AIM relacionado (bardoxolona metilo) en los seres humanos (Pergola, 2011). Una hipótesis para este efecto es que los AIM directa o indirectamente aumentan la expresión de genes de transaminasa en la ausencia de toxicidad celular. Para evaluar si el tratamiento con RTA 408 afecta los niveles de ARNm de transaminasa, los hepatocitos AML-12 de ratón se trataron con RTA 408 durante 18 h, y los niveles de ARNm de los genes que codifican las transaminasas se midieron utilizando PCR cuantitativa. Las células AML-12 se plaquearon en placas de cultivo de 6 pocillos a 3 x 10⁵ células por pocillo utilizando 2 mL de medio por pocillo. Al siguiente día, las células se trataron con DMSO (vehículo) ó 250 nM y 500 nM RTA 408 durante 18 horas a 37°C. Cada pocillo recibió 0,1% DMSO. Se realizaron tres experimentos replicados independientes. Después del tratamiento, el medio se retiró y las células se recogieron utilizando tampón RLT (Qiagen). Los lisados se homogeneizaron utilizando columnas QIAshredder (Qiagen, Catálogo # 79654) y el ARN se aisló utilizando kits RNeasy Mini (Qiagen, Catálogo # 74104). Para la transcripción inversa, el ARN (1 μ g) se combinó con cebador Oligo(dT)12-18 y H₂O en un volumen final de 23,25 μ L. La mezcla se calentó hasta 70°C durante 10 min y luego se colocó en hielo. Una mezcla maestra que contiene 8 μ L 5X tampón de 1^{era} cadena, 2 μ L de 1 mg/mL de BSA, 2 μ L de 20 mM DTT, 4 μ L de mezcla de 5 mM dNTP, 0,25 μ L de RNaseOUT™ y 0,5 μ L de transcriptasa inversa Superscript® II se añadieron a la mezcla de ARN y se incubaron a 42°C durante 1 h. La reacción se inactivó por calentamiento hasta 70°C durante 10 min. La mezcla de reacción se diluyó 1:3 con H₂O antes de su uso en la qPCR. Se combinaron 2,5 μ L de la reacción de transcripción inversa diluida con un conjunto de cebadores de PCR (0,36 μ M de concentración final), 2X iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, catálogo # 170-8885) y H₂O a un volumen final de 20 μ L. Las secuencias para los cebadores de PCR son como sigue: *Proteína ribosomal L19 (Rp119)* cebador directo 5'-TCAGGCTACAGAAGAGGCTTGC-3' (SEC ID NO: 19), cebador inverso 5'-ACAGTCACAGGCTTGC GGATG-3' (SEC ID NO: 20); *NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1 (Nqo1)* cebador directo 5'-TCGGGCTAGTCCAGTTAGA-3' (SEC ID NO: 21), cebador inverso 5'-AAAGAGCTGGAGAGCCAACC-3' (SEC ID NO: 22); *Glutámico pirúvico transaminasa 1 (Gpt1 o Alt1)* cebador directo 5'-CACGGAGCAGGTCTTCAACG-3' (SEC ID NO: 23), cebador inverso 5'-AGAATGGTCATCCGGAAATG-3' (SEC ID NO: 24); *Glutámico pirúvico transaminasa 2 (GPT2 o Alt1)* cebador directo 5'-CGCGGTGCAGGTCAACTACT-3' (SEC ID NO: 25), cebador inverso 5'-CCTCATCAGCCAGGAGAAAA-3' (SEC ID NO: 26); *Glutamato oxaloacetato transaminasa 1 (Got1 o Ast1)* cebador directo 5'-GGCTATTCGCTATTTTGTGT-3' (SEC ID NO: 27), cebador inverso 5'-GACCAGGTGATTCGTACAAT-3' (SEC ID NO: 28); *Glutamato oxaloacetato transaminasa 2 (Got2 o Ast1)* cebador directo 5'-AGAGTCTCTTCAGTCATTG-3' (SEC ID NO: 29), cebador inverso 5'-ATGATTAGAGCAGATGGTGG-3' (SEC ID NO: 30). Todos los cebadores previamente se han validado para la especificidad y eficiencia de amplificación. El ADNc se amplificó utilizando las siguientes condiciones de ciclo: (95°C durante 3 min, 44 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 15 segundos, 72°C durante 15 segundos, seguido por una curva de fusión de 55°C a 95°C en incrementos de 0,5°C). La abundancia relativa de cada gen diana se determinó utilizando el método comparativo CT ($\Delta\Delta$ CT). Las reacciones de PCR se realizaron en pocillos por triplicado para cada muestra. El tratamiento con RTA 408 aumentó los niveles de ARNm de alanina transaminasa 1 (Alt1 o Gpt1) y aspartato transaminasa 1 (Ast1 o Got1) (FIGS. 15a,c). El RTA 408 no tuvo efecto en los niveles de ARNm de alanina transaminasa 2 (Alt2 o Gpt2) y redujo los niveles de ARNm de aspartato transaminasa 2 (Ast2 o Got2) (FIGS. 15b,d). Estos resultados demuestran que RTA 408, a las concentraciones ensayadas (250 nM ó 500 nM), afecta la expresión de genes transaminasa *in vitro*.

6. Efecto de RTA 408 en los Niveles de Intermediarios Glucolíticos

Los estudios en ratones diabéticos han demostrado que bardoxolona metilo aumenta la captación de glucosa estimulada por la insulina específica de los músculos (Saha, 2010). En los seres humanos, un mayor porcentaje de pacientes que reciben bardoxolona metilo reportó que experimentaron calambres musculares en comparación con los pacientes que recibieron placebo (Pergola, 2011). Los espasmos musculares también se han reportado en pacientes diabéticos después de la administración de insulina, lo que sugiere una posible asociación con el metabolismo de glucosa en el músculo. El efecto de RTA 408 en el metabolismo glucolítico se evaluó a través de la

evaluación de los niveles de lactato y piruvato en las células musculares C2C12 de roedores cultivadas. Para medir los niveles de lactato, los miotubos de C2C12 diferenciadas se trataron con 1 μ M ó 2 μ M RTA 408 o insulina durante 3 horas a 37°C. El tampón se retiró y se guardó para la medición de los niveles de lactato extracelulares. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación (10 min a 14.000 rpm) antes de la medición de lactato. Para medir el lactato intracelular, las células se suspendieron en 0,1% Tritón X-100 en PBS y se lisaron por cizallamiento con una aguja de calibre 25. El lisado celular se centrifugó (10 min a 14.000 rpm, 4°C) y el lactato se midió en el sobrenadante. El lactato intracelular y extracelular se midió utilizando el kit de ensayo de lactato (BioVision, Catálogo # K607-100). Similar al tratamiento con insulina, el tratamiento de miotubos de C2C12 diferenciados con 1 μ M ó 2 μ M RTA 408 durante 3 h aumentó significativamente los niveles de lactato intracelular y extracelular de una manera dependiente de la dosis.

Para medir los niveles de piruvato, los miotubos de C2C12 diferenciados se trataron con 250 ó 500 nM RTA 408 ó 100 nM insulina durante 18 h. Después del tratamiento con fármacos, el medio se retiró y las células se lavaron con PBS. Las células se lisaron en tampón de ensayo de piruvato (Piruvate Assay Kit, BioVision, Catálogo # K609-100). Los lisados celulares se centrifugaron (10 min a 14.000 rpm, 4°C) y los niveles de piruvato se midieron en el sobrenadante. El tratamiento de miotubos de C2C12 diferenciados con 250 nM ó 500 nM RTA 408 durante 18 h también aumentó significativamente ($P < 0,0001$, señalado con asteriscos) los niveles de piruvato intracelular en una forma dependiente de la dosis (FIG. 16). Conjuntamente, estos resultados demuestran que RTA 408, a las concentraciones ensayadas, puede afectar los intermediarios glicolíticos musculares *in vitro*; sin embargo, no está claro cómo los resultados de este sistema *in vitro* a las concentraciones de RTA 408 ensayadas se relacionan con los efectos potenciales en el metabolismo de la glucosa a niveles de dosis clínicamente relevantes en los seres humanos.

7. Evaluación *In Vitro* del Eflujo de RTA 408 por MRP-1

Una característica de un fármaco candidato es la relación de eflujo del compuesto. La relación de eflujo mide cómo de fácilmente se transporta el compuesto través de una membrana. La proteína MRP-1, o la proteína 1 de asistencia a la resistencia de múltiples fármacos, es una de una familia de proteínas que ayudan a facilitar el transporte de aniones orgánicos y otras moléculas pequeñas a través de membranas celulares. Una relación de eflujo más grande normalmente significa que el fármaco candidato se transporta más fácilmente fuera de la membrana y está menos disponible para modular los procesos intracelulares. Las proteínas similares también regulan el transporte de compuestos a través de la barrera hematoencefálica. La relación de eflujo de MRP-1 para RTA 408 (1,3) se determinó experimentalmente que es aproximadamente diez veces menor que 63170 (10) y 63171 (11,2) y más de 40 veces menor que 63179 (56,5) y 63189 (57,1). Sin estar ligado por la teoría, el RTA 408 puede no ser un buen sustrato para MRP-1 y/o un candidato para el eflujo mediado por la p-glicoproteína en la barrera hematoencefálica. En algunas realizaciones, el RTA 408 se puede utilizar para tratar trastornos del sistema nervioso central (SNC).

C. Efectos Protectores de RTA 408 en Modelos Animales de la Enfermedad Pulmonar

El RTA 408 se ensayó en varios modelos animales de enfermedad pulmonar para evaluar su potencial eficacia en el pulmón. Para todos los estudios, el RTA 408 se administró por vía oral diariamente en aceite de sésamo a niveles de dosis en el intervalo de 3 a 150 mg/kg. En la mayoría de los casos, el RTA 408 se administró empezando varios días antes de la inducción de la respuesta de la lesión pulmonar.

1. Inflamación Pulmonar inducida por LPS en Ratones

El RTA 408 se ensayó en dos estudios de inflamación pulmonar inducida por LPS en ratones. En el primer estudio, propuesto para ser un buscador preliminar de intervalo de dosis, el RTA 408 (30, 100, ó 150 mg/kg) se administró por vía oral una vez al día durante tres días, seguido de la administración de LPS 1 h después de la dosis final. El fluido de lavado broncoalveolar (BALF) se recogió 20 h después de la administración de LPS (21 h después de la dosis final de RTA 408) y se evaluó para los niveles de marcadores pro-inflamatorios (es decir, IL-6, IL-12p40, TNF- α , y RANTES) utilizando tecnología Luminex™. El tratamiento con RTA 408 resultó en una reducción significativa de IL-12p40 a todas las dosis y en TNF- α a las dosis de 100 y 150 mg/kg (FIG. 17). En el segundo estudio, el RTA 408 (10, 30, ó 100 mg/kg) se administró diariamente durante seis días, seguido de la administración de LPS 1 h después de la dosis final. En este estudio, se observaron disminuciones significativas del peso corporal al nivel de dosis de 100 mg/kg empezando en el Día 3. Se observaron reducciones significativas de TNF- α a la dosis de 10 mg/kg, y se observaron reducciones significativas de IL-12p40, TNF- α , y RANTES a la dosis de 30 mg/kg (FIG. 18a). La evaluación adicional de los pulmones de ratones en este estudio reveló una participación significativa de los genes de diana de Nrf2 relevantes, incluyendo la inducción significativa de la actividad enzimática de NQO1 (por medición de la tasa de reducción de 2,6-diclorofenol-indofenol) y aumentos de GSH total (GSH-Glo™, Promega, Madison, WI) a 10 y 30 mg/kg (FIG. 18b).

2. Fibrosis Pulmonar Inducida por Bleomicina

El efecto de RTA 408 también se evaluó en modelos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones y ratas. En el primer estudio preliminar, el RTA 408 (10, 30, ó 100 mg/kg) se administró a ratones diariamente a través de sonda oral durante 39 días, con pulso de bleomicina (intranasal) en el día 10. En el último día de la dosificación,

el tejido de pulmón se recogió y la histología se realizó para evaluar el grado de inflamación y fibrosis intersticial. En este modelo, no se observaron efectos estadísticamente significativos a las dosis de RTA 408 ensayadas (FIGS. 19a y b). La evaluación adicional se realizó utilizando un modelo de rata de fibrosis pulmonar que se ha caracterizado ampliamente en el Lovelace Respiratory Research Institute. En este estudio, las ratas se pulsaron con bleomicina o disolución salina por administración intratraqueal en el día 0. Después del pulso, los animales recibieron RTA 408 (3, 10, ó 30 mg/kg) diariamente a través de sonda oral durante 28 días. La administración de la dosis de 30 mg/kg se detuvo en el día 14 debido a la deshidratación excesiva y diarrea en los animales. Para los animales restantes, el fluido de lavado broncoalveolar se recogió en el día 28 para la evaluación de los infiltrados proinflamatorios por citometría de flujo, y el tejido de pulmón se analizó para los niveles de hidroxiprolina por LC-MS e histopatología. El pulso con sulfato de bleomicina indujo una liberación sustancial de los neutrófilos y un aumento en el colágeno soluble en el BALF, así como un aumento de la hidroxiprolina en el pulmón. El tratamiento con 3 y 10 mg/kg de RTA 408 suprimió de forma significativa la infiltración de células polimorfonucleares (PMN) en los pulmones y también produjo una reducción significativa (~10%-20%) en la deposición de hidroxiprolina (FIGS. 20a y b).

De manera importante, la evaluación histopatológica reveló una disminución significativa en la deposición de colágeno, como se evalúa por tinción tricrómica, en ratas tratadas con RTA 408. Mientras que los animales control de bleomicina principalmente exhibieron tinción moderada, los animales tratados con 10 mg/kg de RTA 408 tuvieron tinción predominantemente mínima a leve (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto de RTA 408 en la deposición de colágeno en el pulmón de rata como se evalúa por la intensidad de la tinción tricrómica

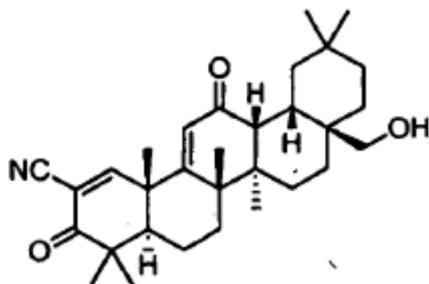
| Intensidad de Tinción ^a | Control de Bleomicina | RTA 408 (3 mg/kg) | RTA 408 (10 mg/kg) |
|------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Mínima | 0 | 0 | 3 |
| Leve | 1 | 0 | 4 |
| Moderada | 7 | 7 | 1 |

^a Los valores representan la intensidad de la tinción en los animales con tinción tricrómica intersticial en áreas de alteraciones pulmonares inducidas por bleomicina.

La evaluación adicional de los pulmones de las ratas en este estudio también reveló una participación significativa de los genes diana de Nrf2 relevantes como se sometió a ensayo por el ensayo Quantigene Plex 2.0 Multiplex (Affymetrix, Santa Clara, CA) (FIG. 21). El RTA 408 de manera significativa y dependiente de la dosis aumentó la actividad enzimática de NQO1, Txnrd, Gsr, y Gst en los pulmones de las ratas expuestas a la bleomicina, lo que demuestra la activación de Nrf2 por RTA 408 en esta configuración de la enfermedad. La actividad enzimática de NQO1 se evaluó midiendo la tasa de reducción de DCPIP. Las actividades enzimáticas de Txnrd, Gsr, y Gst se midieron utilizando kits disponibles comercialmente de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

3. COPD inducida por Humo de Cigarillo en Ratones

El RTA 408 también se ensayó en un modelo de ratón de COPD inducida por humo de cigarrillo. Los ratones recibieron RTA 408 (3, 10, ó 30 mg/kg) diariamente a través de una sonda oral durante dos semanas y se expusieron a humo de cigarrillo cinco días por semana durante el período de dosificación de RTA 408. Al final del estudio, el tejido de pulmón y BALF se recogieron para el análisis de infiltrados inflamatorios y citoquinas. En este experimento, la administración de dosis múltiples de RTA 408 a dosis tan bajas como 3 mg/kg de RTA 408 dio lugar a una supresión significativa de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo KC (homólogo funcional de ratón de IL-8 humana) y TNF- α como se mide utilizando tecnología Luminex™. Un resumen de los resultados de este estudio se presenta en las FIGS. 22a-e. Un análogo de AIM (63355) se ensayó en el mismo estudio para comparación. 63355 es un compuesto de la fórmula:



La evaluación adicional de los pulmones de los ratones en este estudio también reveló una participación significativa

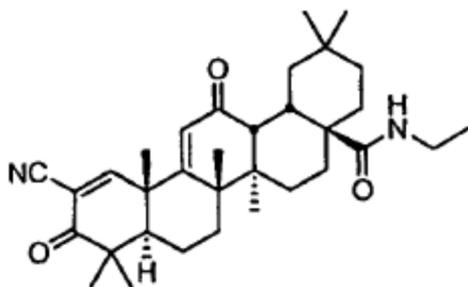
de genes diana de Nrf2 relevantes (FIG. 23). La actividad enzimática de NQO1 en el pulmón, medida como la tasa de reducción de DCPIP, se disminuyó significativamente por la exposición a humo de cigarrillo; la administración de RTA 408 rescató esta pérdida. La actividad enzimática de Txnrd también se indujo por la dosis de 30 mg/kg de RTA 408. En general, la actividad enzimática de Gsr no se alteró, y la actividad enzimática de Gst se disminuyó con el tratamiento - ambas fueron probablemente la consecuencia de una respuesta temporal para estas enzimas. Las actividades enzimáticas de Txnrd, Gsr, y Gst se midieron utilizando kits disponibles comercialmente de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

4. Asma inducido por Ovoalbúmina en Ratones

La actividad potencial de RTA 408 también se evaluó en un estudio piloto en un modelo de ratón de asma inducido por ovoalbúmina. Los ratones se sensibilizaron con una inyección IP de ovoalbúmina e hidróxido de aluminio en el Día 0 y Día 14 y se pulsaron intranasalmente con ovoalbúmina en disolución salina en los días 14, 25, 26, y 27. Los ratones recibieron RTA 408 (3, 10, ó 30 mg/kg) diariamente a través de una sonda oral en los días 1-13 y 15-27. Después de la sensibilización y el pulso con ovoalbúmina, los ratones tratados con vehículo tuvieron un aumento significativo en el número total de leucocitos en comparación con los ratones tratados con control positivo (dexametasona). Un aumento en el número de células T y células B también se observó en los ratones tratados con vehículo. El tratamiento con RTA 408 a 30 mg/kg redujo significativamente el número y porcentaje de células B dentro de las vías respiratorias. El RTA 408 (3 y 30 mg/kg) también redujo significativamente el número de macrófagos, pero no el porcentaje medio de macrófagos, detectados en las vías respiratorias. Estas observaciones son indicativas de la eficacia potencial en este modelo.

5. Efectos de RTA 408 en Sepsis inducida por LPS en Ratones

La sepsis se indujo en el día 0 con una inyección IP de LPS (21 mg/kg), y la supervivencia fue seguida hasta el día 4. El RTA 408 (10, 30, ó 100 mg/kg) se administró diariamente a través de una sonda oral desde el día -2 al día 2. En el grupo de control de vehículo, el 60% de los animales sobrevivió hasta el día 4 (mayor que la tasa de supervivencia de ~40% esperada en este modelo). En los grupos de tratamiento de RTA 408, el 80% de los animales en el grupo de dosis de 10 mg/kg y el 90% de los animales en el grupo de dosis de 30 mg/kg sobrevivieron hasta el día 4 (FIGS. 24c y d). Para el grupo de dosis de 100 mg/kg, el 90% de los animales sobrevivió hasta el día 4, con una sola muerte ocurrida en el Día 4. Aunque estos efectos inducidos por RTA 408 son indicativos de la eficacia profunda en este modelo, la tasa de supervivencia relativamente alta en el grupo de control de vehículo impide una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de control y tratados con RTA 408. Los resultados obtenidos utilizando el compuesto RTA 405 también se presentan (FIGS. 24a y b). El RTA 405 es un compuesto de la fórmula:



6. Efectos de RTA 408 frente a la Mucositis Oral Inducida por Radiación

La exposición a la radiación aguda dirigida a la bolsa de la mejilla bucal de hámsteres produce efectos similares a los observados en la mucositis ulcerativa oral en seres humanos. Estos efectos incluyen mucositis moderada a grave caracterizada por un eritema grave y vasodilatación, erosión de la mucosa superficial, y formación de úlceras. Se realizó un estudio único para evaluar los efectos de RTA 408 en este modelo. En el Día 0, se administró a cada hámster una dosis de radiación aguda de 40 Gy dirigida a la bolsa de la mejilla bucal izquierda. El RTA 408 (10, 30, ó 100 mg/kg) se administró por vía oral dos veces al día desde el Día -5 al Día -1 y Día 1 al Día 15. Empezando en el día 6 y continuando hasta el día 28 en días alternos, la mucositis oral se evaluó utilizando una escala de puntuación estándar de 6 puntos. Las dosis tanto de 30 como 100 mg/kg de RTA 408 causaron una reducción significativa en la duración de la mucositis ulcerativa (FIG. 25). Además, también se observó una disminución dependiente de la dosis en el porcentaje de animales con puntuaciones de mucositis ≥ 3 . Sin embargo, la administración de RTA 408 a 30 ó 100 mg/kg causó reducciones significativas dependientes de la dosis en la ganancia de peso en hámsteres irradiados. Debido a la pérdida de peso en exceso de 20%, dos de los ocho hámsteres en el grupo de dosis de 100 mg/kg se sacrificaron en el Día 2.

7. Efecto de RTA 408 en la Inducción de Biomarcadores de Nrf2 *In Vivo*

Como se describió anteriormente, una diana molecular clave de RTA 408 es Nrf2, un regulador transcripcional

central de la protección celular antioxidante. La activación de Nrf2 induce la regulación al alza de una batería de genes citoprotectores, incluyendo NQO1, enzimas implicadas en la síntesis de GSH [es decir, subunidades modificadoras y catalíticas de glutamato-cisteína ligasa (Gclc y Gclm)], enzimas implicadas en la desintoxicación (es decir, glutatión S-transferasas [Gsts]), y transportadores de eflujo [es decir, proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (Mrps)]. La inducción de estos genes da como resultado un esfuerzo coordinado celular para protección contra el insulto oxidativo, resaltado por el aumento de la capacidad antioxidante, inducción de la síntesis de glutatión, y conjugación y exportación de moléculas potencialmente dañinas de la célula. Además de los puntos finales de eficacia y expresión de gen diana de Nrf2 evaluada en los diversos modelos animales descritos anteriormente, la capacidad de RTA 408 para inducir la expresión de genes diana de Nrf2 también se evaluó utilizando tejidos recogidos de ratones, ratas y monos sanos tratados con RTA 408.

Como parte de los estudios de toxicidad de 14 días sin GLP de RTA 408 en ratones, ratas y monos, los tejidos se recogieron para los propósitos de medición de ARNm y niveles de actividad enzimática de genes diana de Nrf2 seleccionados. Para los ratones y ratas, se recogieron muestras de hígado 4 h después de la dosis final en el Día 14. Para los monos, se recogieron sangre (para el aislamiento de PBMC), tejidos de hígado, pulmón, y cerebro 24 h después de la dosis final en el Día 14. La actividad enzimática de NQO1, Gst, y glutatión reductasa (Gsr), como se describió anteriormente, se midieron en homogenados de tejido. Los niveles de ARNm se determinaron utilizando la tecnología QuantiGene Plex 2.0 de acuerdo con el protocolo del fabricante, lo que implica un ensayo basado en hibridación utilizando perlas magnéticas xMAP® Luminex® para la cuantificación directa de ARNm diana. Además, se midieron las concentraciones de RTA 408 en plasma y tejidos por métodos de LC/MS/MS en un espectrómetro de masas TQD (Waters, Milford, MA).

El RTA 408 generalmente aumentó la expresión de varios genes diana de Nrf2 de una manera dependiente de la dosis a dosis de 10, 30, y 100 mg/kg (FIG. 26, FIG. 27a, FIGS. 28a y b). La regulación al alza transcripcional de genes diana de Nrf2 por RTA 408 también resultó en aumentos funcionales en la respuesta antioxidante, como se manifiesta por los aumentos dependientes de la dosis en la actividad enzimática de NQO1, Gst, y Gsr en el hígado de roedores, así como del hígado y pulmón de monos (FIGS. 29a y b, FIGS. 30a y b, FIGS. 31a y b). Además, en roedores, la exposición del hígado a RTA 408 se correlacionó con el nivel de actividad enzimática de NQO1, el gen diana prototipo de Nrf2 (FIG. 32b, FIG. 33b). En los monos, el nivel de expresión de ARNm en PBMC tanto de NQO1 como sulfirredoxina 1 (SRXN1) se correlacionó con la exposición de plasma a RTA 408 (FIGS. 37a y b). En general, el RTA 408 aumentó los niveles de ARNm y la actividad de dianas de Nrf2, y tales aumentos generalmente se correlacionan con las exposiciones de tejido y plasma, lo que sugiere que las dianas de Nrf2 pueden servir como biomarcadores factibles para la activación de Nrf2 (FIGS. 34a y b) y pueden ser útiles para evaluar la actividad farmacológica de RTA 408 en sujetos humanos sanos.

D. Farmacología de Seguridad

Un programa de farmacología de seguridad conforme a GLP se completó utilizando RTA 408. Éste incluyó estudios (monos) *in vitro* e *in vivo* sobre el sistema cardiovascular, así como estudios sobre el sistema respiratorio y sistema nervioso central en ratas.

1. Evaluación de los Efectos de RTA 408 en Canales de hERG Clonados Expresados en células HEK293

Este estudio se realizó para evaluar los efectos de RTA 408 en la corriente de potasio rectificante hacia dentro de activación rápida (I_{Kr}) realizado por canales de hERG (gen humano relacionado con éter-a-go-go) expresados de forma estable en la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293). Los efectos de RTA 408 en la corriente de potasio relacionada con hERG se evaluaron utilizando métodos de electrofisiología de pinzamiento zonal de células completas. Se determinó que el RTA 408 tiene un valor de CI_{50} de 12,4 μ M en un ensayo QPatch_Kv11.1 de hERG. Este valor fue 2,5-3 veces mayor que los valores para 63170 (4,9 μ M) y 63189 (3,8 μ M), respectivamente. El valor de CI_{50} de RTA 408 fue similar al valor de 63171 (15,7 μ M).

2. Evaluación Cardiovascular de RTA 408 en el Mono Cynomolgus

Se realizó un estudio único para evaluar los efectos cardiovasculares potenciales de RTA 408 en monos cynomolgus conscientes con movimiento libre. Se administró a los mismos cuatro monos cynomolgus macho y cuatro monos cynomolgus hembra el vehículo (aceite de sésamo) y RTA 408 a niveles de dosis de 10, 30 y 100 mg/kg de acuerdo con un diseño cuadrado latino, con un animal/sexo/tratamiento dosificado cada semana seguido por un período de reposo farmacológico de 14 días entre las administraciones, hasta que cada animal recibió todos los tratamientos. El vehículo y RTA 408 se administraron a todos los animales por sonda oral en un volumen de dosis de 5 mL/kg.

Los animales fueron equipados con transmisores de telemetría para la medición de la temperatura corporal, presión arterial, frecuencia cardíaca, y evaluación del electrocardiograma (ECG). La temperatura corporal, presión arterial sistólica, diastólica y media, frecuencia cardíaca, y parámetros del ECG (duración de QRS e intervalos de RR, PR y QT) se monitorizaron continuamente desde al menos 2 horas antes de la dosis hasta al menos 24 horas después de la dosis. Los trazados ECG se imprimieron en los puntos de tiempo designados de los datos de monitorización cardiovascular y se evaluaron cualitativamente por un cardiólogo veterinario certificado por el consejo. Antes de la primera administración en el estudio, los animales no tratados se monitorizaron continuamente para los puntos

5 finales cardiovasculares durante al menos 24 h, y estos datos se utilizaron en el cálculo del intervalo de QT corregido a lo largo del estudio.

Las observaciones de la morbilidad, mortalidad, lesiones y disponibilidad de alimentos y agua se realizaron al menos dos veces al día para todos los animales. Las observaciones clínicas se realizaron antes de la dosis, aproximadamente 4 horas después de la dosis, y después de la finalización del período de monitorización cardiovascular. Los pesos corporales se midieron y registraron en el día antes de cada administración del tratamiento.

10 El RTA 408 a niveles de dosis de 10, 30 y 100 mg/kg no produjo mortalidad, signos clínicos adversos, o resultó en cambios significativos en el peso corporal, temperatura corporal, presión arterial, o parámetros de ECG cualitativos o cuantitativos (intervalos de PR, RR, QRS, QT) (FIG. 35; Tabla 45). En el grupo de dosis de 100 mg/kg, se observó un aumento pequeño (1,6% en promedio) pero estadísticamente significativo en el intervalo de QT corregido; sin embargo, los datos de animales individuales no mostraron aumentos consistentes de QTc que indicarían un efecto relacionado con el artículo de ensayo. En consecuencia, debido a la pequeña magnitud de cambio y la falta de una respuesta consistente en animales individuales, estos ligeros aumentos de QTc no fueron considerados relacionados con el tratamiento con RTA 408. Por lo tanto, la administración oral de RTA 408 no produjo efectos en la función cardiovascular en monos cynomolgus a dosis de hasta e incluyendo 100 mg/kg.

3. Evaluación Neuroconductual de RTA 408 en Ratas

20 La potencial toxicidad neuroconductual aguda de RTA 408 se evaluó en ratas. Tres grupos de tratamiento de ratas CD[®] [CrI:CD[®] (SD)] 10 machos y 10 hembras recibieron RTA 408 a niveles de dosis de 3, 10, ó 30 mg/kg. Un grupo adicional de 10 animales/sexo sirvió como control y recibió vehículo (aceite de sésamo). El vehículo o RTA 408 se administró a todos los grupos a través de sonda oral una vez en el día 1 a un volumen de dosis de 10 mL/kg.

25 Las observaciones de morbilidad, mortalidad, lesiones y disponibilidad de alimentos y agua se realizaron dos veces al día para todos los animales. Las observaciones de los signos clínicos se realizaron antes de la dosificación en el día 1 y después de cada evaluación de batería observacional funcional (FOB). Las evaluaciones FOB se realizaron antes de la dosis (Día -1) y a aproximadamente 4 y 24 h después de la dosis. Los pesos corporales se midieron y se registraron antes de la dosis en el día 1.

30 El RTA 408 a dosis de 3, 10 y 30 mg/kg no produjo mortalidad, observaciones clínicas adversas, o efectos en cualquiera de las medidas neuroconductuales ensayadas. Las ligeras disminuciones de la ganancia de peso corporal se observaron aproximadamente 24 h después de la dosificación en el grupo de 30 mg/kg que pueden estar potencialmente relacionadas con el artículo de ensayo. Con respecto a los puntos finales neuroconductuales básicos evaluados en este estudio, el RTA 408 no produjo ningún efecto adverso en ratas a dosis de hasta e incluyendo 30 mg/kg.

4. Evaluación Pulmonar de RTA 408 en Ratas

35 El efecto potencial de RTA 408 en la función pulmonar se evaluó en ratas. Tres grupos de tratamiento de ratas CD[®] [CrI:CD[®] (SD)] ocho machos y ocho hembras recibieron RTA 408 a niveles de dosis de 3, 10, ó 30 mg/kg. Un grupo adicional de 8 animales/sexo sirvió como control y recibió vehículo (aceite de sésamo). El vehículo o RTA 408 se administró a todos los grupos a través de una sonda oral una vez en el día 1 a un volumen de dosis de 10 mL/kg.

40 Las observaciones de mortalidad, morbilidad, lesiones y disponibilidad de alimentos y agua se realizaron dos veces al día para todos los animales. Las observaciones clínicas se realizaron antes de la dosificación, aproximadamente 4 h después de la dosis, y después de la finalización del período de monitorización pulmonar de 8-h. Los pesos corporales se midieron y se registraron en el día de la administración de RTA 408. La función pulmonar (tasa respiratoria, volumen tidal y volumen por minuto) se monitorizó durante al menos 1 h antes de la dosificación para establecer un valor basal y durante al menos 8 h después de la dosis.

45 El RTA 408 a dosis de 3, 10 y 30 mg/kg no produjo mortalidad, observaciones clínicas adversas, o efectos en cualquiera de los parámetros pulmonares evaluados. Por lo tanto, con respecto a los puntos finales pulmonares básicos evaluados en este estudio, el RTA 408 no produjo ningún efecto adverso en ratas a dosis de hasta e incluyendo 30 mg/kg.

E. Descripción General No Clínica

1. Farmacocinética

50 El RTA 408 se ha investigado tanto *in vitro* como *in vivo* para evaluar sus propiedades PK y metabolismo. Se han realizado estudios *in vitro* para determinar la unión a proteínas plasmáticas de RTA 408 y la partición de sangre/plasma, inhibición e inducción del citocromo P450 (CYP450), y para identificar los metabolitos formados por microsomas de hígado de ratones, ratas, monos y seres humanos. Los datos relativos a la absorción y la distribución *in vivo* después de la administración repetida de RTA 408 se han obtenido principalmente a través de la monitorización de los niveles de fármaco en plasma y tejidos selectos de los estudios de toxicología. Los métodos

bioanalíticos sensibles y selectivos basados en cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC/MS/MS) se han utilizado para medir las concentraciones de RTA 408 en plasma, sangre y tejidos con exactitud y precisión apropiadas. Las mediciones se realizaron en espectrómetros de masas TQD y QTof (Waters).

a. Absorción

5 La absorción y el comportamiento farmacocinético sistémico de RTA 408 se estudiaron en ratones, ratas y monos después de la administración oral única y repetida (diariamente). Después de la administración oral de una formulación de suspensión a dosis de 10 a 100 mg/kg, las concentraciones máximas se observaron dentro de 1 a 2 h en ratones, y dentro de 1 a 24 h en ratas y monos. La exposición sistémica a RTA 408 tendió a ser más alta en ratas, con niveles inferiores observados en ratones y monos. Las estimaciones de la vida media terminal aparente de RTA 408 observada después de la administración oral estuvieron generalmente en el intervalo de 6 a 26 h, aunque la fase de absorción prolongada aparente en algunos casos impidió el cálculo de una estimación de la vida media definitiva.

15 La exposición sistémica a RTA 408 fue generalmente similar en machos y hembras. La exposición a RTA 408 después de la administración oral diaria repetida tendió a ser ligeramente mayor (≤ 2 veces) que la exposición observada después de una dosis única. La administración de RTA 408 en un intervalo de dosis de 3 a 100 mg/kg en una formulación de suspensión generalmente dio lugar a aumentos proporcionales a la dosis en la exposición sistémica. Sin embargo, la administración de dosis mayores (100 a 800 mg/kg en monos, 500 a 2.000 mg/kg en ratas) no dio lugar a aumentos similares en la exposición, lo que sugiere la saturación de la absorción a dosis superiores a 100 mg/kg. Después de la administración oral de una formulación de cápsula (relleno suelto) no optimizada de RTA 408 (3 mg/kg) a monos, la exposición sistémica normalizada por la dosis tendió a ser un poco menor que la observada con una formulación de suspensión.

20 La absorción y el comportamiento farmacocinético sistémico de RTA 408 se estudiaron en ratas utilizando la administración tópica única y repetida. La administración de RTA 408 en un intervalo de 0,01% a 3% mostró concentraciones en plasma menores en relación con la dosificación oral similar. La exposición sistémica a RTA 408 generalmente aumentó de una manera dependiente de la dosis. La administración tópica se formuló como una suspensión en aceite de sésamo.

25 Utilizando conejos, se evaluó la absorción ocular y el comportamiento farmacocinético sistémico de RTA 408. El RTA 408 se administró tópicamente al ojo una vez al día durante cinco días. La administración ocular mostró concentración en plasma menor de RTA 408 con relación a cuando el RTA 408 se administró por vía oral (FIG. 36). La cantidad de RTA 408 en el plasma incluso después de cinco días consecutivos mostró sólo un pequeño cambio en comparación con la concentración después de la primera dosis con respecto a cuando el RTA 408 se administró por vía oral, donde las concentraciones en plasma fueron casi 100 veces mayores (FIG. 36).

b. Distribución

35 La unión a proteínas plasmáticas de RTA 408 se evaluó en plasma de ratón, rata, conejo, perro, cerdo enano, mono, y humano a concentraciones de RTA 408 de 10-2.000 ng/mL utilizando la metodología de ultracentrifugación. El RTA 408 se unió extensamente a las proteínas plasmáticas. La unión a proteínas plasmáticas en la especie no clínica varió desde 93% (ratón) a >99% (cerdo enano), con la unión de 95% en la especie de toxicología (rata y mono) y 97% en seres humanos. No hubo evidencia de la unión a proteína dependiente de la concentración en ninguna especie ensayada. Los resultados de los experimentos de partición de sangre a plasma indican que el RTA 408 tendió a distribuirse principalmente en la fracción de plasma de la sangre de una manera lineal, con relaciones de sangre:plasma < 1,0 para todas las especies y todas las concentraciones ensayadas.

40 La distribución de RTA 408 en los tejidos se ha investigado después de la administración oral a ratones, ratas y monos. En los estudios de toxicidad sin GLP de 14 días, tejidos selectos (hígado, pulmón y cerebro) se recogieron en un punto de tiempo único (4 h para la rata y ratón; 24 h para el mono) después que la dosis final del estudio se administró y se analizaron para contenido de RTA 408 utilizando LC/MS/MS. El RTA 408 se distribuye fácilmente en el pulmón, hígado y cerebro. En el pulmón, las concentraciones de RTA 408 a 4 h en ratones y ratas fueron similares o ligeramente mayores (<2 veces) que las concentraciones en plasma, mientras que, a 24 h en monos, las concentraciones de RTA 408 en el pulmón fueron 6 a 16 veces mayores que las concentraciones en plasma. Un patrón similar se observó para el cerebro. En contraste, las concentraciones de RTA 408 en el hígado fueron 5 a 17 veces mayores que el plasma para ratones y ratas a 4 h, y 2 a 5 veces mayores que el plasma a 24 h en monos.

45 Los efectos farmacodinámicos de RTA 408 en los tejidos se evaluaron en ratones, ratas y monos, monitorizando la inducción de genes diana de Nrf2 en los mismos tejidos recogidos para la exposición al fármaco de los estudios de toxicidad de 14 días. La inducción de genes diana de Nrf2 por RTA 408 dio lugar a aumentos en la respuesta antioxidante como se manifiesta por los aumentos dependientes de la dosis en la actividad enzimática de NQO1, glutatión S-transferasa (Gst) y glutatión reductasa (Gsr) en los tejidos examinados. Se midieron las actividades enzimáticas como se describe anteriormente. Además, en roedores, el contenido de RTA 408 en el hígado se correlacionó con el nivel de la actividad enzimática de NQO1, el gen diana prototípico de Nrf2. En los monos, el nivel de la expresión de ARNm en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tanto para NQO1 como

sulfirredoxina 1 (SRXN1) se correlacionó con la exposición plasmática de RTA 408 (FIGS. 37a y b). En general, el RTA 408 indujo biomarcadores de Nrf2 en roedores y monos, y tales inducciones en general se correlacionaron bien con la exposición de tejido y plasma a RTA 408.

5 Cuando el RTA 408 se administró a conejos vía la administración tópica ocular, las concentraciones más altas del compuesto se encontraron en la córnea, retina o iris mientras que el humor vítreo, humor acuoso, y plasma mostraron concentraciones significativamente menores de RTA 408 (FIG. 38).

c. Metabolismo

10 El metabolismo de RTA 408 se ha investigado después de la incubación *in vitro* de RTA 408 durante 60 minutos con microsomas de hígado de ratones, ratas, monos y seres humanos en la presencia de un sistema de regeneración de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y una mezcla de reacción de uridina difosfato glucuroniltransferasa (UGT). El recambio extenso de RTA 408 se observó con microsomas de primates, con <10% de la molécula parental permaneciendo al final de la incubación de 60 min en microsomas tanto de monos como humanos. En contraste, el grado de metabolismo fue menor en los microsomas de roedores, con > 65% de la molécula parental permaneciendo al final de la incubación. La falta de estándares auténticos disponibles para los distintos metabolitos potenciales de RTA 408 impidió la evaluación cuantitativa de los metabolitos observados. Desde una perspectiva cualitativa, se observó un patrón similar de metabolitos de RTA 408 a través de especies, y se incluyeron picos con masas consistentes con la reducción e hidroxilación de RTA 408, así como la glucuronidación de RTA 408, o de sus metabolitos de reducción/hidroxilación. No se observaron metabolitos humanos únicos, con todos los picos en las incubaciones de microsomas humanos también siendo observados en una o más de las especies preclínicas. En particular, con base en los datos de microsomas *in vitro*, todos los metabolitos humanos estuvieron presentes en la rata o mono, las especies de toxicidad de roedor y no roedor seleccionadas.

d. Interacciones de Fármaco Farmacocinéticas

25 El potencial de RTA 408 para inhibir el metabolismo mediado por citocromo P450 (CYP450) se evaluó utilizando microsomas hepáticos humanos combinados y sustratos estándares para las enzimas CYP450 específicas. El RTA 408 directamente inhibió CYP2C8 y CYP3A4/5 con valores K_i de aproximadamente 0,5 μ M para cada enzima. No se observó inhibición significativa para las otras enzimas ensayadas (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, o CYP2D6), con inhibición <50% a la concentración más alta ensayada (3 μ M). Además, hubo poca o ninguna evidencia de inhibición dependiente del metabolismo de cualquiera de las enzimas ensayadas. Los futuros estudios que investigan el potencial de las interacciones de fármaco-fármaco mediadas por CYP3A4/5 se pueden garantizar con base en estos datos, y las concentraciones potencialmente altas que se pueden lograr localmente en el tracto gastrointestinal (GI) después de la administración oral.

35 El potencial de RTA 408 para inducir la expresión de la enzima CYP450 se evaluó utilizando hepatocitos humanos cultivados. Bajo condiciones donde los inductores prototípicos causaron los aumentos esperados en la actividad de CYP, el RTA 408 (hasta 3 μ M) no fue un inductor de la actividad enzimática de CYP1A2, CYP2B6 o CYP3A4 en hepatocitos humanos cultivados. La actividad enzimática se midió monitorizando la conversión de sustrato de fenacetina, bupropión, y testosterona para CYP1A2, CYP2B6, y CYP3A4, respectivamente, en microsomas aislados.

F. Efectos de RTA 408 en la Dermatitis por Radiación Aguda

40 Se han examinado los efectos de RTA 408 como un preventivo tópico u oral para la dermatitis por radiación aguda. Utilizando ratones macho BALB/c, una dosis de radiación de 30 Gy se administró en el día 0 (Tabla 3). El vehículo aceite de sésamo o RTA 408 se administró a las ratas en el día -5 a -1 y días 1 a 30. El RTA 408 se administró tanto por vía oral en 3, 10, y 30 mg/kg de aceite de sésamo como por vía tópica en el porcentaje de composición de 0,01%, 0,1% y 1% en aceite de sésamo. La dermatitis se evaluó a ciegas cada dos días desde el día 4 al día 30. En el día 12, se observó el pico típico de dermatitis y 4 ratones se sacrificaron 4 horas después de la administración de la dosis. Los ratones restantes se sacrificaron en el día 30 a 4 h después de la dosis. El plasma se recogió en los días 12 y 30 así como las muestras de piel irradiadas para examen de ARNm e histológico.

Tabla 3: Diseño del Estudio del Modelo de Dermatitis por Radiación Aguda

| Grupo | Número de Animales | Radiación (Día 0) | Tratamiento | Programa de Tratamiento |
|-------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|
| 1 | 9 machos | --- | No tratado | --- |
| 2 | 10 machos | 30 Gy | No tratado | --- |
| 3 | 14 machos | 30 Gy | Control de Vehículo | Día -5 a -1 y Día 1 a 30 |

ES 2 634 315 T3

| | | | | |
|---|-----------|-------|------------------------------|--------------------------|
| | | | (aceite de sésamo) | |
| 4 | 14 machos | 30 Gy | RTA 408 – 0,01% o 3 mg/kg | Día -5 a -1 y Día 1 a 30 |
| 5 | 14 machos | 30 Gy | RTA 408 – 0,1% o 10 mg/kg | Día -5 a -1 y Día 1 a 30 |
| 6 | 14 machos | 30 Gy | RTA 408 – 1% o 30 mg/kg | Día -5 a -1 y Día 1 a 30 |

5 En los grupos de ensayo donde los ratones se trataron con RTA 408, la incidencia de dermatitis pareció ser disminuida ligeramente en gravedad cuando el RTA 408 se dio ya sea en una administración oral o tópica (FIGS. 39-42). Además, las curvas que representan la puntuación clínica de dermatitis media para los grupos de ensayo como una función del tiempo muestran algún cambio con la administración de RTA 408 ya sea en forma oral o tópica de los grupos de ensayo no tratados (FIGS. 43-45) particularmente en el caso donde el RTA 408 se da a través de una administración oral. Además, como se puede ver en las Tablas 4 y 5 a continuación, el porcentaje de ratones que sufren de dermatitis con una puntuación clínica por encima de 3 fue significativamente menor para los ratones tratados con RTA 408 a través de una administración oral, mientras que el porcentaje de ratones que sufren de dermatitis con una puntuación clínica por encima de 2 fue ligeramente menor para los grupos de ensayo que recibieron una administración tópica de RTA 408.

10

Tabla 4: Porcentaje de ratones por grupo de prueba que puntuó por encima de 2 en su examen de dermatitis clínica y administrados con un tratamiento tópico que contiene RTA 408

| | Día 12 | Día 14 | Día 16 | Día 18 | Día 20 | Día 22 | Día 24 | Día 26 | Día 28 | Día 30 | % animal-días >=2 | % animal-días >=3 |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------|-------------------|
| 1 sin radiación, no tratado | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 irradiado, no tratado | 0,0 | 50,0 | 83,3 | 83,3 | 83,3 | 100,0 | 66,7 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 35,6 | 0,0 |
| 3 irradiado, aceite de sésamo | 21,4 | 45,0 | 60,0 | 50,0 | 40,0 | 40,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 16,6 | 0,0 |
| 4 irradiado, RTA 408-0,01% | 0,0 | 0,0 | 20,0 | 50,0 | 10,0 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 20,0 | 10,0 | 14,4 | 0,0 |
| 5 irradiado, RTA 408-0,1 % | 7,1 | 10,0 | 20,0 | 80,0 | 60,0 | 40,0 | 30,0 | 10,0 | 0,0 | 0,0 | 16,3 | 0,0 |
| 6 irradiado, RTA 408-1,0% | 10,7 | 20,0 | 10,0 | 70,0 | 30,0 | 10,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 9,7 | 0,0 |

Tabla 5: Porcentaje de ratones por grupo de prueba que puntuó por encima de 3 en su examen de dermatitis clínica y administrados con un tratamiento oral que contiene RTA 408

| | Día 16 | Día 18 | Día 20 | Día 22 | Día 24 | Día 26 | Día 28 | % animal-días >=2 | % animal-días >=3 |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------|-------------------|
| 1 sin radiación, no tratado | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 irradiado, no tratado | 20 | 40 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 39,0 | 8,8 |
| 3 irradiado, aceite de sésamo | 35 | 50 | 40 | 30 | 20 | 0 | 0 | 45,6 | 10,9 |
| 4 irradiado, RTA 408-3 mg/kg | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32,5 | 1,3 |
| 5 irradiado, RTA 408-10 mg/kg | 10 | 25 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33,8 | 4,1 |
| 6 irradiado, RTA 408-30 mg/kg | 10 | 20 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 28,8 | 2,5 |

G. Efectos de RTA 408 en la Dermatitis por Radiación Fraccionada

Utilizando RTA 408 a través de la administración tópica, se midieron los efectos de RTA 408 hacia la mejora de los efectos de la dermatitis por radiación fraccionada. Utilizando ratones Balb/c, el RTA 408 en una preparación tópica se administró a los ratones diariamente desde el día -5 al día 30 en tres dosis que varían desde 0,01% a 1%. Los ratones fueron irradiados en los días 0-2 y 5-7 con seis dosis de 10 Gy al día. Las puntuaciones de dermatitis clínica para los ratones se evaluaron a ciegas cada dos días desde el día 4 hasta el final del estudio. En la FIG. 46, la gráfica muestra el cambio en la puntuación clínica promedio para cada grupo representado como una función del tiempo. La gráfica muestra una mejora estadísticamente significativa en las puntuaciones de los ratones tratados con 0,1% a 1% de formulaciones tópicas de RTA 408. Los parámetros del estudio y tratamiento se pueden encontrar en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones del Estudio para Dermatitis Inducida por Radiación Fraccionada

| Grupo | Número de animales | Radiación (Días 0-2, 5-7) | Tratamiento | Programa del tratamiento |
|-------|--------------------|---------------------------|--|--------------------------|
| 1 | 9 machos | --- | No tratado | --- |
| 2 | 14 machos | 6x 10 Gy | No tratado | --- |
| 3 | 18 machos | 6x 10 Gy | Control de vehículo (aceite de sésamo) | QD Días -5 a 30 |
| 4 | 18 machos | 6x 10 Gy | RTA 408 – 0,01% | QD Días -5 a 30 |
| 5 | 18 machos | 6x 10 Gy | RTA 408 – 0,1% | QD Días -5 a 30 |
| 6 | 18 machos | 6x 10 Gy | RTA 408 – 1% | QD Días -5 a 30 |

Analizando las puntuaciones clínicas promedio que se muestran en la FIG. 46, se realizó un análisis de área bajo la curva (AUC), que produjo la severidad de la dermatitis con respecto a cuánto tiempo persistió la dermatitis. Este análisis de AUC permitió la comparación directa entre los diferentes grupos de ratones y el efecto de los diferentes porcentajes de composiciones de RTA 408 (FIG. 47 y Tabla 7). La administración de formulaciones tópicas de RTA 408 redujo las lesiones Grado 2 y Grado 3 de 60% y 33% cuando los ratones se expusieron sólo al vehículo a 21% y 6% con RTA 408 a concentración de 1%, respectivamente. La otra composición de RTA mostró alguna actividad, pero no fue tan significativa como la mostrada por la formulación de 1%.

Tabla 7: Porcentaje de Puntuación de Dermatitis para Cada Grupo de Tratamiento

| Grupo | %Días ≥ 2 | %Días ≥ 3 |
|------------------------|----------------|----------------|
| Sin Rad., Sin Tx | 0% | 0% |
| Rad., Sin Tx | 66% | 31% |
| Rad., Aceite de sésamo | 60% | 33% |
| Rad., RTA 408 (0,01%) | 54% | 29% |
| Rad., RTA 408 (0,1%) | 40% | 13% |
| Rad., RTA 408 (1%) | 21% | 6% |

H. Efectos Sinérgicos de RTA 408 y Agentes Terapéuticos contra el Cáncer en el Crecimiento de Tumor

Un estudio de los efectos de RTA 408 utilizado en combinación con agentes quimioterapéuticos tradicionales se

realizó para determinar la eficacia del tratamiento potencial. Los estudios *in vitro* se realizaron para determinar los efectos de RTA 408 en dos diferentes líneas celulares de cáncer de próstata, LNCaP y DU-145. Como se puede ver en la FIG. 48a, el tratamiento de las líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP) *in vitro* con 5-fluorouracilo muestra un aumento estadísticamente significativo en la citotoxicidad cuando se combinó con RTA 408 a dosis que varían desde 0,125 a 0,5 μM . Utilizando la línea celular de próstata DU-145 y docetaxel, el RTA 408 amplificó la citotoxicidad del agente quimioterapéutico de una manera estadísticamente significativa para la dosificación de RTA 408 desde 0,125 a 0,75 μM como se muestra en la FIG. 48b. Esta evidencia apoya el concepto de que el RTA 408 podría actuar sinérgicamente con agentes terapéuticos de cáncer y se puede utilizar en algunas realizaciones para proporcionar una mayor eficacia en el tratamiento de pacientes con cáncer.

Después de los resultados exitosos del ensayo *in vitro*, se realizó un ensayo *in vivo* piloto utilizando cáncer de próstata humano LNCaP/C4-2B y DU145 modificado genéticamente para expresar luciferasa de luciérnaga (referido después como C4-2B-Luc y DU145-Luc, respectivamente). Es de destacar que ambas líneas celulares crecen de una manera independiente de andrógenos. Las células se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% FBS. Las células se recogieron utilizando TrypLE Express (Invitrogen) y se lavaron en PBS y se contaron. Las células se reconstituyeron en PBS para llegar a una concentración final de 3×10^6 células por 30 μL (a menos que se indique lo contrario) y se alícuotó en tubos separados. Se descongeló Matrigel reducido de factor de crecimiento (BD Bioscience) durante la noche a $+4^\circ\text{C}$ y se transfirió en los tubos en alícuotas de 30 μL . Las disoluciones de célula/Matrigel se transfirieron al vivero y se mezclaron justo antes de la inyección a una relación de 1:1. Cada ratón ($n = 1$ por grupo para un total de tres animales) recibió una inyección subcutánea única de las células de tumor. Los tumores se preestablecieron durante 4 semanas. Luego, un animal se trató con RTA 408 (17,5 mg/kg, i.p.) una vez al día durante 3 días (días -3 a -1). Al día siguiente (Día 0), los animales tratados con RTA 408 y otro animal se trataron con una dosis única de IR 18 Gy, localizada en la región pélvica donde se implantaron los tumores. El ratón que se trató previamente con RTA 408 recibió tres dosis adicionales de RTA 408 (17,5 mg/kg, i.p.), una vez cada dos días, durante la semana siguiente. El tercer animal no recibió tratamiento y sirvió como un control positivo. La progresión de tumor se monitorizó semanalmente a través de formación de imágenes *in vivo*. Para detectar células de tumor que expresan luciferasa, los ratones se inyectaron IP con D-luciferina 5 min antes de la formación de imágenes de acuerdo con el protocolo del fabricante (Caliper LifeScience). Antes de la formación de imágenes, los ratones se anestesiaron por inhalación de isoflurano y se tomaron las imágenes en el sistema IVIS Lumina XR (Caliper LifeScience). Para la estandarización, el tiempo de exposición mínimo necesario para tomar imágenes del tumor de control se determinó y se tomaron imágenes de todos los animales bajo estas condiciones. En el Día 7, ninguna reducción aparente del tamaño del tumor fue visible en el animal tratado con IR en comparación con el control, mientras que el animal que recibió tanto RTA 408 como IR mostró una imagen de tumor más pequeño. En el Día 14 y Día 21, el animal de control mostró crecimiento y desarrollo de tumor continuo mientras que el animal tratado con radiación ionizante mostró alguna mejora, muy notablemente en el Día 21. Por otro lado, el animal tratado con RTA 408 y radiación ionizante no mostró progresión desde el día 7 al día 14 y no tuvo tumor visible en el Día 21. El progreso del tumor por semana se puede ver en la FIG. 49. Los datos tanto *in vitro* como *in vivo* muestran que el RTA 408 parece complementar la actividad de diferentes agentes terapéuticos contra el cáncer aumentando así la eficacia del agente.

I. Efectos de RTA 408 en un Modelo de Inflamación Ocular

Un estudio de los efectos de RTA 408 en la inflamación ocular se realizó utilizando conejos de la cepa albino de Nueva Zelanda. Los conejos se dividieron en 5 grupos de 12 conejos a los cuales se administraron tres concentraciones diferentes de RTA 408 (0,01%, 0,1% y 1%), Colirio Voltarene® a 0,1% y el vehículo (aceite de sésamo). Se administraron a cada conejo tres instilaciones dentro de 60 minutos antes de la inducción de paracentesis y dos instilaciones dentro de 30 minutos después de la inducción de paracentesis. Cada instilación fue de 50 μL y se administraron en ambos ojos. El humor acuoso para 6 animales por punto de tiempo se recogió 30 min y de nuevo 2 h después de la inducción de paracentesis. La cantidad de inflamación se determinó por la concentración de proteína en el humor acuoso. Como se muestra en la FIG. 50, el RTA 408 mostró una reducción en la proteína de humor acuoso similar a la de la concentración más alta de cualquiera de los otros compuestos de referencia (MaxiDex o mapracorat) a sólo 0,01% RTA 408 en la formulación. Los efectos de concentración creciente de RTA 408 parecieron ser despreciables, ya que todas las concentraciones de RTA 408 parecieron mostrar efectos relativamente similares dentro del error en la reducción de la concentración de proteína en humor acuoso.

J. Cribado de Polimorfo

Un estudio de pre-formulación y polimorfismo se realizó para el compuesto 63415. Como parte de este estudio, un programa de polimorfismo preliminar se realizó con el objetivo de identificar la forma anhidra más estable a temperatura ambiente e hidratos posibles con una probabilidad razonablemente alta. Se realizaron un total de 30 experimentos de cristalización, incluyendo equilibrios de fase, experimentos de secado y otras técnicas. Todos los sólidos obtenidos se caracterizaron por espectroscopia de FT-Raman. Todas las nuevas formas se caracterizaron por PXRD y TG-FTIR, y opcionalmente por DSC y DVS.

Además, la forma amorfa se preparó y caracterizó. Varios experimentos utilizando diferentes técnicas y procedimientos se realizaron para preparar la forma amorfa. La forma amorfa se caracterizó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, DSC, DVS, y titulación de Karl-Fischer. La estabilidad de la forma amorfa se ensayó en

condiciones de humedad y temperatura elevadas durante el transcurso de cuatro semanas.

1. Material de Partida y Nomenclatura

5 Dos lotes de 63415 se utilizaron como materiales de partida (Tabla 8). El 63415 también es referido como PP415 en esta descripción. Todas las muestras recibidas o generadas durante este proyecto recibieron un código de identificación único de la forma PP415-Px, donde Px se refiere al número de muestra/experimento ($x = 1, 2, \dots, n$).

Tabla 8: Materiales de Partida

| Muestra | Material | Cantidad | Recibido |
|-----------|--|----------|-------------------|
| PP415-P1 | 63415, lote #: 0141-66-1; PM = 554,7 g/mol, $C_{33}H_{44}F_2N_2O_3$ | 5,0 g | 25 de marzo, 2011 |
| PP415-P40 | 63415, lote #: 2083-69-DC; PM = 554,7 g/mol, $C_{33}H_{44}F_2N_2O_3$ | 5,0 g | 27 de mayo, 2011 |

2. Compuesto 63415, lote #0414-66-1 (PP415-P1): La Forma Amorfa

10 El material de partida 63415, lote #0414-66-1, se caracterizó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, titulación de Karl-Fischer, 1H -RMN, DSC, DVS, y mediciones de solubilidad aproximadas. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Caracterización del material de partida 63415 (PP415-P1)

| Método | Resultados |
|--------------|---|
| FT-Raman | se utilizará como la referencia |
| PXRD | sin patrón de pico agudo, el material es amorfo |
| TG-FTIR | ~0,9% en peso (~0,1 eq.) de EtOH con trazas de H_2O desde 25°C a 200°C, descomposición a $T > 290^\circ C$ |
| Karl-Fischer | 0,5% en peso de H_2O |
| 1H -RMN | de acuerdo con la estructura, ~0,08 eq. de EtOH |
| DSC | 1 ^{er} barrido de calentamiento: transición vítrea $T_g = 152,7^\circ C$ ($\Delta C_p = 0,72 J/g^\circ C$); 2 ^o barrido de calentamiento: transición vítrea $T_g = 149,7^\circ C$ ($\Delta C_p = 0,45 J/g^\circ C$) |
| DVS | ligeramente higroscópica; $\Delta m = +0,4\%$ (50%→85% h.r.); FT-Raman y PXRD sin cambio |

15 El espectro de FT-Raman (FIG. 58) se utilizará como el espectro de referencia para el material de partida. PXRD (FIG. 59) no muestra patrón de pico agudo. El halo amplio de ~10-20 $^\circ 2\theta$ es característico de los materiales amorfos.

El termograma de TG-FTIR (FIG. 60) muestra la pérdida gradual ~0,9% en peso de EtOH (es decir, ~0,1 eq.) con trazas de H_2O entre 25 y 200°C. La descomposición se inicia a $T > 290^\circ C$.

Un contenido de agua de 0,5% en peso se determinó por titulación de Karl-Fischer.

20 El espectro de 1H -RMN (FIG. 61) concuerda con la estructura y muestra ~0,08 eq. de EtOH, en concordancia con el termograma de TG-FTIR.

El termograma de DSC (FIG. 62) muestra en un primer barrido de calentamiento una transición vítrea del material amorfo a $T_g = 152,7^\circ C$ ($\Delta C_p = 0,72 J/g^\circ C$). En un segundo barrido después del enfriamiento rápido, la transición vítrea ocurre a $T_g = 149,7^\circ C$ ($\Delta C_p = 0,45 J/g^\circ C$).

25 La isoterma de DVS (FIG. 63) muestra que una pérdida de masa gradual de 1,0% en peso ocurrió al disminuir la humedad relativa de 50% h.r. a 0% h.r.; el equilibrio se alcanzó a 0% h.r. Al aumentar la humedad relativa a 95% h.r. ocurrió una ganancia de masa gradual de 2,1% en peso (con respecto a la masa a 0% de h.r.); el equilibrio se alcanzó a 95% h.r. Al disminuir la humedad relativa desde 95% h.r. a 50% h.r., la masa final fue de 0,2% en peso por debajo de la masa de partida. El aumento de la masa de 0,4% en peso a 85% h.r. (con respecto a la masa de partida) clasifica la muestra como ligeramente higroscópica.

El espectro de FT-Raman (FIG. 64) y el patrón de PXRD (FIG. 65) de la muestra después de la medición de DVS están inalterados en comparación con el espectro y patrón de la muestra antes de la medición.

5 La solubilidad aproximada del material de partida PP415-P1 se midió en doce solventes y cuatro mezclas de solventes a t.a. por dilución manual combinada con la observación visual (Tabla 10). Debido al error experimental inherente en este método, los valores de solubilidad están destinados a ser considerados como estimaciones aproximadas y están para ser utilizados únicamente para el diseño de experimentos de cristalización. Todas las mezclas de solventes se enumeran como relaciones en volumen (v/v).

Tabla 10: Solubilidad aproximada del material de partida PP415-P1 (amorfo)

| Solvente | Solubilidad S [mg/mL] |
|---|-----------------------|
| tolueno | S > 200 |
| DCM | S > 200 |
| EtOAc | S > 210 |
| acetona | S > 230 |
| MeCN | S > 230 |
| DMF | S > 210 |
| MeOH | S < 210 |
| EtOH ^a | 105 < S < 210 |
| 2PrOH | 16 < S < 19 |
| DEE | S ≥ 1 ^d |
| heptano | S < 1 |
| H ₂ O | S < 1 |
| 2PrOH / H ₂ O (9:1) ^b | 7,9 < S < 8,5 |
| MeCN / H ₂ O (2:3) ^c | S < 1 |
| EtOAc / heptano (1:1) ^a | 100 < S < 200 |
| tolueno / DEE (1:1) ^a | S > 220 |

^aprecipitación observada después de ~1d;

10 ^bactividad del agua a(H₂O) ~0,7 a 25°C;

^cactividad del agua a(H₂O) > 0,9 a 50°C; ^ddisolución incompleta al principio (S < 1), pero el residuo sólido se disolvió completamente durante la noche (S > 1).

3. Compuesto 63415, lote #2083-69-DC (PP415-P40): Clase 2

15 El 63415, lote #2083-69-DC, es un solvato de heptano. Este material (PP415-P40) se caracterizó por PXRD y se encontró que corresponde a la clase 2 (FIG. 66).

La clase 2 probablemente corresponde a solvatos isoestructurales no estequiométricos (< 0,5 eq.) (de heptano, ciclohexano, isopropil éter, 1-butanol, trietilamina, y posiblemente otros solventes, tales como hexano y otros éteres) con solvente fuertemente unido.

20 Los pequeños picos visibles en el patrón de PP415-P40 a 7,9 °2θ y 13,8 °2θ no corresponden a los picos de las clases 3, 4, ó 5. Su origen no está claro en este punto.

4. Estabilidad Química de la Forma Amorfa

La estabilidad química de la forma amorfa se investigó en diferentes solventes durante el transcurso de siete días.

Se prepararon disoluciones/suspensiones con una concentración de 1 mg/mL en cuatro solventes orgánicos (acetona, MeOH, MeCN, EtOAc) y tres medios tensioactivos acuosos (1% SDS ac., 1% Tween 80 ac., 1% CTAB

ac.).

Se prepararon cuatro disoluciones/suspensiones separadas para cada solvente, se equilibraron durante 6 h, 24 h, 2 d, y 7 d y posteriormente se analizaron por HPLC.

- 5 El % de área relativa obtenido de los cromatogramas de HPLC se proporciona en la Tabla 11. El compuesto parece ser algo inestable en el diluyente (0,1% ácido fórmico en MeCN); durante el transcurso de la secuencia (es decir, dentro de ~24 horas) el % de área de una muestra de referencia (PP415-P1, corrida al inicio y al final de la secuencia) disminuyó desde 99,9% a 99,3% a 254 nm y desde 99,9% a 99,5% a 242 nm. Debido a este efecto, las muestras medidas hacia el final de la secuencia (establecidas en el siguiente orden: 7 d, 2 d, 24 h, 6 h), podrían estar afectadas y el % de área obtenido se podría subestimar.

10 **Tabla 11: Experimentos de estabilidad química con la forma amorfa de 63415 (PP415-P1)^a**

| Solvente | a 254 nm | | | | a 242 nm | | | |
|-----------------------|----------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|
| | 7 d | 2 d | 24 h | 6 h | 7 d | 2 d | 24 h | 6 h |
| acetona | 99,6% | 99,6% | 99,6% | 99,6% | 99,7% | 99,7% | 99,6% | 99,6% |
| EtOAc | 99,8% | 99,8% | 99,8% | 99,7% | 99,8% | 99,9% | 99,8% | 99,7% |
| MeOH | 99,8% | 99,8% | 99,7% | 99,8% | 99,8% | 99,9% | 99,7% | 99,8% |
| MeCN | 97,7% | 99,5% | 99,3% | 99,4% | 97,4% | 99,5% | 99,3% | 99,3% |
| Tween 1% ^b | 97,7% | 97,1% | 95,1% | 97,6% | 98,7% | 98,7% | 96,2% | 99,1% |
| SDS 1% ^c | 99,7% | 99,6% | 99,7% | 99,7% | 99,8% | 99,7% | 99,7% | 99,7% |
| CTAB 1% | 99,3% | 99,4% | 99,4% | 99,6% | 99,3% | 99,4% | 99,4% | 99,7% |

^a a la tercera longitud de onda (210 nm), la intensidad de la señal fue débil y la relación de señal a ruido grande, por lo tanto, la integración no se realizó

^bsuspensiones, no todo el material se disolvió para todos los puntos de tiempo

^csuspensiones, no todos los sólidos se disolvieron para los puntos de tiempo de 24 h y 6 h

- 15 Se observó descomposición $\geq 1\%$ para disoluciones en MeCN después de siete días y para suspensiones en el medio Tween 80 acuoso al 1% (en todos los puntos de tiempo a 254 nm y después de 24 h, 2 d, y 7 d a 242 nm).

5. Estabilidad en Almacenamiento de la Forma Amorfa

Para aprender más acerca de sus propiedades fundamentales y estabilidad física, la forma amorfa de 63415 se estresó por almacenamiento a temperaturas y humedades relativas elevadas.

- 20 Las muestras de la forma amorfa (el material de partida PP415-P1) se almacenaron abiertas a 25°C/~62% h.r. (en disolución acuosa saturada de NH₄NO₃) y 40°C/~75% h.r. (en disolución acuosa saturada de NaCl) y se cerraron a 60°C y 80°C (Tabla 12). En los puntos de tiempo 0 s, 1 s, 2 s, y 4 s las muestras se examinaron por PXRD y se compararon con el material de partida, PP415-P1.

Tabla 12. Experimentos de estabilidad en almacenamiento con la forma amorfa de 63415 (PP415-P1)

| Muestra | Condiciones | Punto de tiempo | Resultado de PXRD |
|-----------|----------------------------|-----------------|-------------------|
| PP415-P2a | abiertas, 25°C / ~62% h.r. | 1 s | amorfa |
| PP415-P2b | abiertas, 25°C / ~62% h.r. | 2 s | amorfa |
| PP415-P2c | abiertas, 25°C / ~62% h.r. | 4 s | amorfa |
| PP415-P3a | abiertas, 40°C / ~75% h.r. | 1 s | amorfa |
| PP415-P3b | abiertas, 40°C / ~75% h.r. | 2 s | amorfa |
| PP415-P3c | abiertas, 40°C / ~75% h.r. | 4 s | amorfa |

| Muestra | Condiciones | Punto de tiempo | Resultado de PXRD |
|-----------|----------------|-----------------|-------------------|
| PP415-P4a | cerradas, 60°C | 1 s | amorfa |
| PP415-P4b | cerradas, 60°C | 2 s | amorfa |
| PP415-P4c | cerradas, 60°C | 4 s | amorfa |
| PP415-P5a | cerradas, 80°C | 1 s | amorfa |
| PP415-P5b | cerradas, 80°C | 2 s | amorfa |
| PP415-P5c | cerradas, 80°C | 4 s | amorfa |

Después de una semana (punto de tiempo de 1 s, FIG. 67), dos semanas (punto de tiempo de 2 s, FIG. 68), y cuatro semanas (punto de tiempo 4 s, FIG. 69) todas las cuatro muestras eran todavía amorfas, ya que los difractogramas de rayos X en polvo no muestran diferencias en comparación con el material de partida en el punto de tiempo de 0 s.

5 6. Experimentos de Cristalización y Secado

a. Experimentos de Cristalización

Los experimentos de equilibrios de fase, cristalizaciones de disoluciones calientes, y evaporación se realizaron partiendo de la forma amorfa para identificar con probabilidad razonablemente alta la forma anhidra más estable a t.a. y posibles hidratos. Todos los materiales obtenidos se caracterizaron por espectroscopia de FT-Raman; las muestras seleccionadas también se caracterizaron por PXRD.

Los espectros de FT-Raman se agruparon en clases de acuerdo con la similitud de sus posiciones de picos. La muestra original (PP415-P1, véase la Tabla 8) se clasificó junto con los productos de cristalización. Los espectros dentro de una clase, sin embargo, no son estrictamente idénticos, sino similares. Pueden existir pequeñas diferencias y desplazamientos de pico. Considerando los espectros de FT-Raman solos, es difícil determinar si los espectros de una clase pertenecen a la misma forma polimórfica.

Los picos en los patrones de PXRD se determinaron y los patrones luego se clasificaron en grupos utilizando el software *PANalytical X'Pert (Highscore Plus)*. Estos grupos identifican patrones de una alta similitud. Sin embargo, existen diferencias pequeñas pero significativas dentro de un grupo. Por lo tanto, los patrones dentro de un grupo no corresponden necesariamente a los mismos polimorfos, sino que representan diferentes formas con estructuras moleculares muy similares. Las clases de FT-Raman corresponden en todos los casos a los grupos de PXRD.

b. Experimentos de Equilibrio de Suspensión

Los experimentos de equilibrio de suspensión se realizaron en un solvente y once mezclas de solventes (Tabla 13). Las suspensiones de ~100 mg de PP415-P1 en 0,2-2,0 ml de los solventes seleccionados se prepararon y agitaron durante 4-15 días a 22-24°C. Los sólidos se recuperaron y caracterizaron por espectroscopia de FT-Raman; la mayoría se caracterizó también por PXRD.

Tabla 13. Experimentos de equilibrio de suspensión partiendo de la forma amorfa (PP415-P1)

| Muestra | Solvente/Mezcla | Clase de FT-Raman | Grupo de PXRD |
|-----------|--|-------------------|---------------|
| PP415-P6 | 2PrOH | 3 | 3 |
| PP415-P7 | 1:2 EtOAc/heptano | 2 | 2 |
| PP415-P8 | 1:2 acetona/hexano | 2 | 2 |
| PP415-P9 | 1:3 tolueno/DEE | 2 ^d | -- |
| PP415-P10 | 1:3 MeOH/TBME | 2 | 2 |
| PP415-P11 | 1:2 MEK/ciclohexano | 2 ^d | -- |
| PP415-P12 | 9:1 EtOH/H ₂ O ^a | 3 | 3 |
| PP415-P13 | 7:3 MeCN/H ₂ O ^b | 4 ^d | 4 |

| Muestra | Solvente/Mezcla | Clase de FT-Raman | Grupo de PXRD |
|-----------|--|-------------------|---------------|
| PP415-P14 | ~1:1 THF/H ₂ O ^c | 5 ^d | 5 |
| PP415-P29 | 1:2 EtOAc/TEA | 2 | 2 |
| PP415-P31 | 9:1 PEG/H ₂ O | 1 | 1 |
| PP415-P35 | 7:3 MeCN/H ₂ O ^b | 4 ^d | 4 |

actividades acuosas: ^a a(H₂O) ~0,5 a 50°C; ^b a(H₂O) ~0,85 a 50°C; ^c a(H₂O) > 0,99 a 64°C; ^d el espectro contiene señales de solvente

c. Cristalizaciones de Disoluciones Calientes

- 5 Las disoluciones calientes de PP415-P1 se prepararon en un solvente y cuatro mezclas de solventes (Tabla 14). Después de enfriamiento lento a 5°C a una velocidad de ~0,2 K/min, se observó precipitación en tres casos (-P20, -P21, -P24). En dos casos (-P22, -P23) no precipitaron sólidos, incluso después del almacenamiento a 4-5°C durante dos días. Aquí, el solvente se evaporó bajo flujo de N₂ a t.a. Los sólidos se recuperaron y caracterizaron por espectroscopia de FT-Raman y para aquellos con espectros diferentes del material de partida amorfo, clase 1 de FT-Raman, también por PXRD.

10 **Tabla 14: Experimentos de enfriamiento lento partiendo de la forma amorfa (PP415-P1)**

| Muestra | Solvente/Mezcla | Condiciones | Clase de FT-Raman | Grupo de PXRD |
|-----------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------|
| PP415-P20 | ~2:1 acetona/H ₂ O | 55°C → 5°C | 3 ^b | 3 |
| PP415-P21 | ~1:5 EtOH/ciclohexano | 75°C → 5°C | 2 | 2 |
| PP415-P22 | ~1:3 MeCN/tolueno | 75°C → 5°C ^a | 1 ^b | -- |
| PP415-P23 | 1:3 EtOAc/dioxano | 75°C → 5°C ^a | 1 ^b | -- |
| PP415-P24 | 1BuOH | 75°C → 5°C | 2 ^b | 2 |

^a sin precipitación después de enfriamiento lento y agitación a 5°C durante 2 días; solvente evaporado bajo flujo de N₂ a t.a.

^b el espectro contiene señales de solvente

d. Experimentos de Evaporación/Precipitación

- 15 Se prepararon disoluciones claras de PP415-P1 en tres mezclas de solventes (Tabla 15). Los solventes luego se evaporaron lentamente a t.a. bajo condiciones ambientales. Sin embargo, en dos de los tres experimentos (-P15 y -P17) precipitó un sólido blanco antes que comenzará la evaporación. Los sólidos obtenidos se examinaron por espectroscopia de FT-Raman y PXRD.

Tabla 15. Experimentos de evaporación lenta con la forma amorfa (PP415-P1)

| Muestra | Solvente/Mezcla | Clase de FT-Raman | Grupo de PXRD |
|-----------|-------------------|-------------------|---------------|
| PP415-P15 | 1:2 DCM/IPE | 2 ^a | 2 |
| PP415-P16 | 1:2 MeOH/tolueno | 1 ^a | -- |
| PP415-P17 | 1:3 EtOAc/heptano | 2 ^a | 2 |

- 20 ^a el espectro contiene señales de solvente

e. Experimentos de Secado

Al menos una muestra de cada clase se secó bajo vacío para desolvatar los solvatos y obtener formas cristalinas no solvatadas de 63415 (Tabla 16). Los materiales secos se caracterizaron adicionalmente por FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR.

Tabla 16. Experimentos de secado realizados en muestras obtenidas de los experimentos de cristalización

| Muestra | Material de Partida (Clase) | Condiciones | Resultado |
|------------|-----------------------------|---|----------------|
| PP415-P18 | PP415-P15 (2) | t.a., 2-10 mbares, ~2 h | 2 |
| PP415-P19 | PP415-P17 (2) | t.a., 2-10 mbares, ~2 h | 2 |
| PP415-P25 | PP415-P6 (3) | t.a., ~3 mbares, ~5 d; 60°C, 5-10 mbares, 2×1 h; 40-50°C, 5-20 mbares, ~1 d | 3 |
| PP415-P26 | PP415-P13 (4) | t.a., ~3 mbares, ~5 d; 60°C, 5-10 mbares, 2×1 h; 40-50°C, 5-20 mbares, ~1 d | 4 |
| PP415-P27 | PP415-P14 (5) | t.a., ~3 mbares, ~5 d; 60°C, 5-10 mbares, 2×1 h; 40-50°C, 5-20 mbares, ~1 d | 1 ^a |
| PP415-P28 | PP415-P21 (2) | t.a., ~3 mbares, ~5 d; 60°C, 5-10 mbares, 2×1 h; 40-50°C, 5-20 mbares, ~1 d | 2 ^b |
| PP415-P30 | PP415-P7 (2) | 50-70°C, 1-10 mbares, 3 d | 2 |
| PP415-P32 | PP415-P19 (2) | 80°C, <1×10 ⁻³ mbares, 3 d | 2 ^b |
| PP415-P33 | PP415-P25 (3) | 80°C, <1×10 ⁻³ mbares, 3 d | 3 |
| PP415-P34 | PP415-P28 (2) | 80°C, <1×10 ⁻³ mbares, 3 d | 2 ^b |
| PP415-P36 | PP415-P35 (4) | 80°C, <1×10 ⁻³ mbares, 3 d | 4 ^c |
| PP415-P37 | PP415-P35 (4) | 80°C, flujo de N ₂ , 3 d | 4 ^c |
| PP415-P44a | PP415-P41 (5) | 80°C, 100 mbares, 2 d | 1 ^a |
| PP415-P46a | PP415-P45 (6) | 80°C, 100 mbares, 4 d | 1 ^a |

^a desolvatación exitosa, reducción significativa de contenido de solvente, muestra principalmente amorfa; sólo pocos picos amplios en PXRD

^b muestra menos cristalina, como se indica por los picos más amplios en PXRD

5 ^c desolvatación exitosa, reducción significativa de contenido de solvente, muestra todavía cristalina; ningún cambio en la estructura

7. Caracterización de Nuevas Formas (Clases)

a. Resumen de Nuevas Clases

Además de la forma amorfa de 63415, cuatro nuevas formas cristalinas se obtuvieron en este estudio (Tabla 17).

10 **Tabla 17. Resumen de las clases obtenidas**

| Clase | Características | Resultado de los experimentos de secado |
|---------|--|---|
| Clase 1 | forma amorfa | -- |
| Clase 2 | solvatos isoestructurales (por ejemplo, heptano) | secado no exitoso |
| Clase 3 | solvatos isoestructurales (por ejemplo, etanol) | secado no exitoso |
| Clase 4 | Solvato de MeCN y solvato desolvatado | secado exitoso, estructura sin cambio |
| Clase 5 | Solvato de THF | secado resultó en forma amorfa |

15 **Clase 2:** La mayoría de los experimentos de cristalización resultaron en material sólido de la clase 2. Estas muestras probablemente corresponden a solvatos no estequiométricos isoestructurales (<0,5 eq) (de heptano, ciclohexano, isopropil éter, 1-butanol, trietilamina, y posiblemente hexano y otros éteres, etc.) con las moléculas de solvente fuertemente unidas. Los espectros de Raman y patrones de PXRD dentro de esta clase son muy similares entre sí, por lo tanto, las estructuras podrían ser esencialmente idénticas con sólo pequeñas diferencias debido a los diferentes solventes que se incorporaron.

20 Los experimentos de secado en muestras de la clase 2 no han resultado en una forma no solvatada cristalina. Incluso las temperaturas elevadas (80°C) y un alto vacío (<1×10⁻³ mbares) no pudieron eliminar las moléculas de solvente fuertemente unidas por completo; siempre permaneció un contenido de solvente > 2% en peso. La cristalinidad de estas muestras se redujo, pero no se observó transformación en una estructura diferente ni

amorfización sustancial.

Clase 3: El material sólido de la clase 3 se obtuvo de varios experimentos de cristalización. Las muestras de la clase 3 son probablemente solvatos isoestructurales de 2PrOH, EtOH, y probablemente acetona con moléculas de solvente fuertemente unidas. Podrían corresponder ya sea a hemisolvatos estequiométricos o solvatos no estequiométricos con un contenido de solvente de ~0,5 eq. Como con la clase 2, los espectros de Raman y patrones de PXRD dentro de esta clase son muy similares entre sí, lo que indica estructuras similares que incorporan diferentes solventes.

Similar a la clase 2, los experimentos de secado tampoco fueron exitosos. Las moléculas de solvente muy fuertemente unidas sólo pudieron ser eliminadas parcialmente (~5,4% en peso a ~4,8% en peso, hasta 3 d a 1×10^{-3} mbares y 80°C). El patrón de PXRD permaneció sin cambios.

Clase 4: El material de la clase 4 sólo se obtuvo de un sistema de solventes 7:3 MeCN/H₂O. Muy probablemente corresponde a un hemisolvato de acetonitrilo cristalino.

Por secado (bajo vacío o flujo de N₂ a temperaturas elevadas) la mayoría del solvente se pudo eliminar sin cambiar o destruir la estructura cristalina (el PXRD permaneció sin cambios). Por lo tanto, se obtuvo una forma no solvatada cristalina (o más bien solvato desolvatado). Es ligeramente higroscópica (ganancia de masa de ~0,7% en peso desde 50% h.r. a 85% h.r.) y tiene un posible punto de fusión a 196,1°C ($\Delta H = 29,31$ J/g).

Clase 5: La clase 5 también se obtuvo de sólo un sistema de solventes (~1:1 THF/H₂O) y contiene THF unido (y tal vez H₂O). Como el contenido de los dos componentes no se puede cuantificar por separado, la naturaleza exacta de este solvato cristalino no se puede determinar.

El secado de la clase 5 resultó en la desolvatación completa y transformación en la forma amorfa (clase 1). Un proceso posible para preparar la forma amorfa a partir de material de la clase 2 es una transformación de la clase 2 a la clase 5, seguida por secado y amorfización.

b. Clase 1 - La Forma Amorfa

La Clase 1, la forma amorfa de 63415, se obtuvo de unos cuantos experimentos de cristalización (Tabla 18). La mayoría de los experimentos de cristalización resultaron en material cristalino de las clases 2, 3, 4, ó 5.

El material de partida, PP415-P1, es amorfo y pertenece a la clase 1. Se realizaron experimentos adicionales, dirigidos exclusivamente a la preparación de la forma amorfa (clase 1).

Tabla 18. Experimentos de cristalización resultantes en material sólido de la clase 1

| Muestra | Método | Solvente | Caracterización | Secado |
|-----------|---------------------------------|--------------------------|------------------|--------|
| PP415-P31 | equil. de susp. | 9:1 PEG/H ₂ O | Raman, PXRD | -- |
| PP415-P22 | enfriamiento lento ^a | ~1:3 MeCN/tolueno | obs. vis., Raman | -- |
| PP415-P23 | enfriamiento lento | 1:3 EtOAc/dioxano | obs. vis., Raman | -- |
| PP415-P16 | evap./precip. | 1:2 MeOH/tolueno | obs. vis., Raman | -- |

^a sin precipitación después del enfriamiento lento y agitación a 5°C durante 2 días; solvente evaporado bajo flujo de N₂ a t.a.

c. Clase 2 – Solvatos Isoestructurales (por ejemplo, Heptano)

La mayoría de los experimentos de cristalización resultaron en material sólido de la clase 2 (Tabla 19). Además, un lote de un solvato de heptano clase 2, PP415-P40, se utilizó como material de partida (véase Tabla 8).

Los espectros de FT-Raman de la clase 2 son claramente similares entre sí (FIG. 70), pero muestran pequeñas diferencias. Difieren significativamente del espectro del material de partida amorfo, clase 1 (FIG. 71) y de los espectros de las clases 3, 4 y 5 (FIG. 72).

Los patrones de PXRD de la clase 2 (FIG. 73) confirman la cristalinidad de los materiales. Los patrones de las muestras son muy similares entre sí, pero muestran pequeñas diferencias (Fig. 74). Los patrones de la clase 2 difieren claramente de los patrones de las clases 3, 4 y 5 (FIG. 75).

El termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P7 (FIG. 76) muestra la pérdida de ~7,5% en peso de EtOAc y heptano en dos etapas desde ~100°C a 290°C y descomposición a temperaturas $T > 290^\circ\text{C}$. Antes de los experimentos de TG-FTIR, las muestras se secaron brevemente (durante ~5 min) bajo vacío (10-20 mbares) para remover el exceso de solvente no unido. La pérdida tanto de EtOAc como heptano ocurre conjuntamente en el

mismo intervalo de temperatura; ambos solventes parecen estrechamente unidos dentro de la estructura. El contenido teórico de EtOAc (p.e. = 76°C) de un hemisolvato es 7,4% en peso, el contenido teórico de heptano (p.e. = 98°C) de un hemisolvato es 8,3% en peso. Desafortunadamente, el contenido de los dos componentes no se puede cuantificar por separado.

- 5 El termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P21 (FIG. 77) muestra la pérdida de ~5,8% en peso de ciclohexano en dos etapas desde ~140°C a ~250°C y descomposición a temperaturas $T > 250^\circ\text{C}$. Con el punto de ebullición de ciclohexano a 81°C, el solvente parece fuertemente unido dentro de la estructura. El contenido teórico de ciclohexano de un hemisolvato es 7,1% en peso. Por lo tanto, la muestra PP415-P18 posiblemente corresponde a un solvato de ciclohexano no estequiométrico (con $< 0,5$ eq. de contenido de solvente).
- 10 El termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P24 (FIG. 78) muestra la pérdida de ~16,6% en peso de 1BuOH en una etapa desde ~50°C a ~160°C, pérdida adicional de 1BuOH (6,6% en peso) en una segunda etapa desde 160°C a 230°C y descomposición a temperaturas $T > 230^\circ\text{C}$. Con el punto de ebullición de 1BuOH a 117°C, el solvente de al menos la segunda etapa parece fuertemente unido dentro de la estructura. El contenido teórico de 1BuOH de un hemisolvato es 6,3% en peso.
- 15 El termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P29 (FIG. 79) muestra la pérdida de ~5,1% en peso de EtOAc y TEA desde ~50°C a ~220°C, la mayoría en una etapa desde 180°C a 210°C. La descomposición ocurre a temperaturas $T > 220^\circ\text{C}$. La pérdida tanto de EtOAc como TEA ocurre conjuntamente en el mismo intervalo de temperatura; ambos solventes parecen fuertemente unidos dentro de la estructura (con el punto de ebullición de EtOAc a 77°C y de TEA a 89°C).
- 20 El termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P47 (FIG. 80) muestra la pérdida de masa de dos etapas típica para la clase 2 (total de ~7,9% en peso EtOAc) a temperaturas de hasta 240°C, lo que indica moléculas de solvente muy fuertemente unidas.

El termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P48 (FIG. 81) muestra la pérdida de masa de ~3,5% en peso de formiato de etilo y agua, primero gradualmente y luego en una etapa clara entre 180°C y 200°C. Puede haber pérdida adicional de formiato de etilo concomitante con la descomposición a $T > 240^\circ\text{C}$.

- 25 Por lo tanto, las muestras de la clase 2 pueden corresponder todas a solvatos isoestructurales no estequiométricos ($< 0,5$ eq.), con moléculas de solvente fuertemente unidas. Como los espectros Raman y patrones de PXRD dentro de esta clase son muy similares entre sí, las estructuras pueden ser esencialmente idénticas entre sí con sólo pequeñas distorsiones de las dimensiones de célula unitaria o pequeños cambios de posiciones atómicas dentro de la célula unitaria, debido a los diferentes tamaños y formas de las moléculas de solvente incorporadas.
- 30

Tabla 19: Experimentos de cristalización resultantes en material sólido de la clase 2

| Muestra | Método | Solvente | Caracterización | Secado |
|------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|--------|
| PP415-P7 | equil. de susp. | 1:2 EtOAc/heptano | Raman, PXRD, TG-FTIR | x |
| PP415-P8 | equil. de susp. | 1:2 acetona/hexano | Raman, PXRD | -- |
| PP415-P9 | equil. de susp. | 1:3 tolueno/DEE | Raman, PXRD | -- |
| PP415-P10 | equil. de susp. | 1:3 MeOH/TBME | Raman, PXRD | -- |
| PP415-P11 | equil. de susp. | 1:2 MEK/ciclohexano | Raman | -- |
| PP415-P29 | equil. de susp. | EtOAc/TEA | Raman, PXRD, TG-FTIR | -- |
| PP415-P15 | evap./precip. | 1:2 DCM/IPE | Raman, PXRD | x |
| PP415-P17 | evap./precip. | 1:3 EtOAc/heptano | Raman, PXRD | x |
| PP415-P21 | enfriamiento lento | ~1:5 EtOH/ciclohexano | Raman, PXRD, TG-FTIR | x |
| PP415-P24 | evap./precip. | 1BuOH | Raman, PXRD, TG-FTIR | -- |
| PP415-P43 ^a | evaporación | (8:2) THF/hexano | PXRD | -- |

| Muestra | Método | Solvente | Caracterización | Secado |
|------------------------|-------------|------------------|-----------------|--------|
| PP415-P47 ^a | evaporación | EtOAc | PXRD, TG-FTIR | -- |
| PP415-P48 ^a | evaporación | formato de etilo | PXRD, TG-FTIR | -- |

^amaterial de partida: PP415-P40, clase 2; en todos los otros experimentos se utilizó PP415-P1, clase 1, como material de partida.

d. Experimentos de Secado en Muestras de la Clase 2

5 Varias muestras de la clase 2 se secaron bajo vacío (y algunas a temperaturas elevadas) y en un intento de desolvatarlas con el propósito de obtener una forma anhidra de 63415. Los detalles y caracterizaciones de las muestras secadas se proporcionan a continuación en la Tabla 20.

10 Sin embargo, incluso el secado durante tres días a 80°C y un vacío $<1 \times 10^{-3}$ mbares no pudo eliminar las moléculas de solvente fuertemente unidas por completo; se mantuvo un contenido de solvente $> 2\%$ en peso (ver muestras -P32 y -P34). Los patrones de PXRD muestran una cristalinidad reducida de estas muestras, pero no se observó transformación en una estructura diferente.

Tabla 20. Experimentos de secado en muestras clase 2

| Material de Partida | | Secado | Material secado | | |
|------------------------|--------------------------------|---|-----------------|-----------------------|----------------|
| Muestra | Contenido de solvente | Condiciones | Muestra | Contenido de solvente | Clase |
| PP415-P7 | EtOAc/heptano (~7,5%) | 50-70°C, 1-10 mbares, 3 d | PP415-P30 | heptano (~2,5%) | 2 |
| PP415-P15 | IPE (desconocido) | t.a., 2-10 mbares, ~2 h | PP415-P18 | IPE (~7,0%) | 2 |
| PP415-P17 | EtOAc(?)/heptano (desconocido) | t.a., 2-10 mbares, ~2 h | PP415-P19 | heptano (~7,6%) | 2 |
| PP415-P19 | heptano (~7,6%) | 80°C, $<1 \times 10^{-3}$ mbares, 3 d | PP415-P32 | heptano (~2,2%) | 2 ^a |
| PP415-P21 | ciclohexano (~5,8%) | t.a., ~3 mbares, ~5 d; 60°C, 5-10 mbares, 2x1 h; 40-50°C, 5-20 mbares, ~1 d | PP415-P28 | ciclohexano (~3,0%) | 2 ^a |
| PP415-P28 ^a | ciclohexano (~3,0%) | 80°C, $<1 \times 10^{-3}$ mbares, 3 d | PP415-P34 | ciclohexano (~2,3%) | 2 ^a |

^a de acuerdo con PXRD un poco menos cristalina

De este modo, los solvatos clase 2 parecen tener moléculas de solvente muy fuertemente unidas. Son difíciles de desolvatar o transformar/amorfizar.

15 e. PP415-P7 → PP415-P30

El material sólido de la muestra PP415-P7, clase 2, obtenido de un experimento de equilibrio de suspensión en 1:2 EtOAc/heptano se secó (como PP415-P30) bajo vacío durante varios días (1-10 mbares, 50-70°C).

El espectro de FT-Raman del material secado de la clase 2 (PP415-P30) muestra pequeñas diferencias del espectro original (muestra PP415-P7, FIG. 82), pero aún corresponde a la clase 2.

20 El patrón de PXRD del material secado de la clase 2 (PP415-P30) muestra picos menos intensos ligeramente más amplios (FIG. 83), pero aún corresponde a la clase 2.

25 El termograma de TG-FTIR de la muestra secada PP415-P30 (FIG. 84) muestra la pérdida de ~2,5% en peso de heptano (y algo de EtOAc) en dos etapas desde ~50°C a ~250°C y descomposición a temperaturas $T > 250^\circ\text{C}$. En comparación con el TG-FTIR de la muestra PP415-P7 (FIG. 76), las dos etapas de pérdida de solvente se conservan, pero la cantidad total de solvente en la muestra ha disminuido desde ~7,5% en peso de PP415-P7 a

~2,5% en peso de PP415-P30.

Por lo tanto, el intento de desolvatar este solvato a temperaturas elevadas (50-70°C) y un vacío de 1-10 mbares) ha causado sólo una pérdida parcial de solvente.

f. PP415-P15 → PP415-P18

5 El material sólido de la muestra PP415-P15, clase 2, obtenido de un experimento de precipitación en 1:2 DCM/IPE se secó (como PP415-P18) bajo vacío (~2-20 mbares) a t.a. durante ~2 h.

El espectro de FT-Raman de PP415-P18 es idéntico al espectro de la muestra PP415-P15 (FIG. 85), ambos corresponden a la clase 2.

10 El patrón de PXRD de PP415-P18 muestra pequeñas diferencias con el patrón de PP415-P15 (FIG. 86). PP415-P18 aún corresponde a la clase 2.

El termograma de TG-FTIR (FIG. 87) muestra la pérdida de ~7,0% en peso de IPE en dos etapas desde ~140°C a ~250°C y descomposición a temperaturas $T > 250^\circ\text{C}$. Con el punto de ebullición de IPE siendo 67°C, el solvente parece fuertemente unido dentro de la estructura. El contenido teórico de IPE de un hemisolvato es 8,4% en peso.

15 Desafortunadamente, no se registró el TG-FTIR del material antes de la etapa de secado. Sin embargo, como el solvente parece tan fuertemente unido dentro de la estructura y no se observaron cambios (o sólo pequeños) en los espectros de FT-Raman y patrones de PXRD, se asume que el secado no ha tenido ningún efecto significativo en la estructura o contenido de solvente.

g. PP415-P17 → PP415-P19 → PP415-P32

20 El material sólido de la muestra PP415-P17, clase 2, obtenido de un experimento de precipitación en 1:3 EtOAc/heptano se secó (como PP415-P19) bajo vacío (~2-20 mbares) a t.a. durante ~2 h.

El espectro de FT-Raman de PP415-P19 es idéntico al espectro de la muestra PP415-P17 (FIG. 88); no se pueden observar cambios, y ambos corresponden a la clase 2.

El patrón de PXRD de PP415-P19 difiere ligeramente del patrón de PP415-P17 (FIG. 89), pero aún corresponde a la clase 2.

25 El termograma de TG-FTIR (FIG. 90) muestra la pérdida de ~7,6% en peso de heptano en dos etapas desde ~140°C a ~270°C y descomposición a temperaturas $T > 270^\circ\text{C}$. Con el punto de ebullición de heptano siendo 98°C, el solvente parece fuertemente unido dentro de la estructura. El contenido teórico de heptano de un hemisolvato es 8,3% en peso.

30 Un experimento de secado adicional (80°C, $< 1 \times 10^{-3}$ mbares, 3 días) se realizó en la misma muestra como PP415-P32.

El espectro de FT-Raman permaneció sin cambios (FIG. 88). El patrón de PXRD aún correspondió a la clase 2 (FIG. 89), pero la muestra fue menos cristalina (ya que los picos fueron más amplios y tuvieron una relación de S/N menor).

35 El termograma de TG-FTIR (FIG. 90) muestra la pérdida de ~2,2% en peso de heptano, la mayor parte en una etapa de 170°C a 200°C y descomposición a temperaturas $T > 250^\circ\text{C}$.

Por lo tanto, el contenido de heptano se redujo sólo desde 7,6% en peso a 2,2% en peso, confirmando la unión fuerte de las moléculas de solvente.

h. PP415-P21 → PP415-P28 → PP415-P34

40 El material sólido de la muestra PP415-P21, clase 2, obtenido de un experimento de enfriamiento lento en ~1:5 EtOH/ciclohexano se secó (como PP415-P28) bajo vacío durante varios días (2-20 mbares, t.a. a 60°C).

El espectro de FT-Raman del material secado de la clase 2 (PP415-P28) muestra pequeñas diferencias con el espectro de la clase 2 (muestra PP415-P21, FIG. 92), pero aún corresponde a la clase 2.

45 El patrón de PXRD del material secado de la clase 2 (PP415-P28) muestra picos menos intensos más amplios en comparación con el patrón de PP415-P21 (FIG. 93), lo que indica que la muestra secada es menos cristalina. Sin embargo, el patrón aún corresponde a la clase 2.

El termograma de TG-FTIR de la muestra secada PP415-P28 (FIG. 94) muestra la pérdida de ~3,0% en peso de ciclohexano en dos etapas desde ~140°C a ~250°C y descomposición a temperaturas $T > 250^\circ\text{C}$. En comparación con el TG-FTIR de la muestra PP415-P21 (FIG. 77), las dos etapas de la pérdida de

solvente se conservan, pero la cantidad total de solvente en la muestra ha disminuido desde ~5,8% en peso en PP415-P21 a ~3,0% en peso en PP415-P28.

Por lo tanto, la desolvatación de este solvato parece haber causado sólo una pérdida parcial de solvente, paralelo a una pérdida parcial de la cristalinidad.

- 5 El secado adicional de esta muestra (a 80°C, 1×10^{-3} mbares, 3 días) se realizó como PP415-P34.

El espectro de FT-Raman permaneció sin cambios (FIG. 92). El patrón de PXRD aún correspondió a la clase 2 (FIG. 93), pero la muestra fue menos cristalina (ya que los picos fueron más amplios y tuvieron una relación de S/N menor).

- 10 El termograma de TG-FTIR (FIG. 95) muestra la pérdida de ~2,3% en peso de ciclohexano, en dos etapas desde 25°C a 270°C y descomposición a temperaturas $T > 270^\circ\text{C}$.

Por lo tanto, el contenido de ciclohexano se redujo sólo desde 3,0% en peso a 2,3% en peso confirmando la unión fuerte de las moléculas de solvente.

i. Clase 3 – Solventes Isoestructurales (por ejemplo, Etanol)

- 15 Varios experimentos de cristalización resultaron en material sólido de la clase 3 y se caracterizaron por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR (Tabla 21).

Los espectros de FT-Raman de la clase 3 son claramente similares entre sí (FIG. 96) pero muestran pequeñas diferencias (Fig. 97). Los espectros de la clase 3 difieren significativamente del espectro del material de partida amorfo, clase 1 (FIG. 98), y de los espectros de las clases 2, 4, y 5 (FIG. 72).

- 20 Los patrones de PXRD de la clase 3 (FIG. 99) confirman la cristalinidad de los materiales. Los patrones de las tres muestras son similares entre sí, pero muestran diferencias pequeñas pero significativas (Fig. 100). El patrón de la clase 3 difiere claramente de los patrones cristalinos de las clases 2, 4, y 5 (FIG. 75).

- 25 El termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P6 (FIG. 100) muestra la pérdida de ~5,4% en peso de 2PrOH desde 25°C a 250°C, la mayor parte en una etapa desde ~170°C a 190°C. La descomposición comienza a temperaturas $T > 250^\circ\text{C}$. Antes de los experimentos de TG-FTIR, las muestras se secaron brevemente (durante ~5 min) bajo vacío (10-20 mbares) para eliminar el exceso de solvente no unido. El contenido teórico de 2PrOH (p.e. = 82°C) de un hemisolvato es 5,1% en peso.

El termograma de TG-FTIR de la muestra PP415-P12 (FIG. 101) muestra la pérdida de ~4,9% en peso de EtOH (con trazas de agua) desde 25°C a 250°C, la mayor parte en una etapa desde ~160°C a 190°C. La descomposición comienza a temperaturas $T > 250^\circ\text{C}$. El contenido teórico de EtOH (p.e. = 78°C) de un hemisolvato es 4,0% en peso.

- 30 Por lo tanto, las muestras de la clase 3 parecen ser solvatos isoestructurales de 2PrOH, EtOH, y probablemente acetona con contenido de solvente fuertemente unido. Podrían corresponder a hemisolvatos estequiométricos. No se puede descartar, sin embargo, que estas formas sean solvatos no estequiométricos.

- 35 Como los espectros Raman y patrones de PXRD dentro de esta clase son muy similares entre sí, las estructuras pueden ser esencialmente idénticas con sólo pequeñas distorsiones de las dimensiones de célula unitaria o pequeños cambios de posiciones atómicas dentro de la célula unitaria debido a la incorporación de diferentes moléculas de solvente.

Tabla 21. Experimentos de cristalización resultantes en material sólido de la clase 3

| Muestra | Método | Solvente / Mezcla | Caracterización | Secado |
|-----------|----------------------|-------------------------------|----------------------|----------|
| PP415-P6 | equil. de suspensión | 2PrOH | Raman, PXRD, TG-FTIR | X |
| PP415-P12 | equil. de suspensión | 9:1 EtOH/H ₂ O | Raman, PXRD, TG-FTIR | -- |
| PP415-P20 | enfriamiento lento | ~2:1 acetona/H ₂ O | Raman, PXRD | -- |

j. Experimentos de Secado en Muestras de la Clase 3

- 40 Una de las muestras de la clase 3 (PP415-P6), obtenida de un experimento de equilibrio de suspensión en 2PrOH, se secó (como PP415-P25) bajo vacío durante varios días (2-20 mbares, t.a. a 60°C, Tabla 22).

El termograma de TG-FTIR de este material secado de la clase 3, la muestra PP415-P25 (FIG. 102), muestra la pérdida de ~5,4% en peso de 2PrOH desde 50°C a 250°C, la mayor parte en una etapa desde 170°C a 190°C, otra

pérdida de ~1,0% en peso de 2PrOH desde 290°C a 320°C, y descomposición a temperaturas $T > 320^\circ\text{C}$. En comparación con el TG-FTIR de la muestra PP415-P6 original clase 3 (Fig. 103), con un contenido de solvente de ~5,4% en peso de 2PrOH, el contenido de solvente no parece haber disminuido significativamente.

- 5 Este material se secó adicionalmente (como PP415-P33, Tabla 22) durante tres días bajo alto vacío y temperaturas elevadas ($<1 \times 10^{-3}$ mbares, 80°C) con el objetivo de desolvatar el solvato y obtener una forma anhidra no solvatada de 63415.

- 10 El termograma de TG-FTIR de este material adicionalmente secado de la clase 3, muestra PP415-P33 (FIG. 103) muestra la pérdida de ~4,2% en peso de 2PrOH desde 50°C a 210°C , la mayor parte en una etapa desde 160°C a 190°C , otra pérdida de ~0,5% en peso de 2PrOH desde 210°C a 290°C , y descomposición a temperaturas $T > 290^\circ\text{C}$.

En comparación con el contenido de solvente de las muestras PP415-P6 y PP415-P25, el contenido de solvente ha disminuido sólo desde ~5,4% en peso a ~4,8% en peso.

Tabla 22. Experimentos de secado en muestras de la clase 3

| Material de Partida | | Secado | Material secado | | |
|---------------------|-----------------------|--|-----------------|-----------------------|-------|
| Muestra | Contenido de solvente | Condiciones | Muestra | Contenido de solvente | Clase |
| PP415-P6 | 2PrOH (~5,4%) | t.a., ~3 mbares, ~5 d; 60°C , 5-10 mbares, 2×1 h; 40 - 50°C , 5-20 mbares, ~1 d | PP415-P25 | 2PrOH (~5,4%) | 3 |
| PP415-P25 | 2PrOH (~5,4%) | 80°C , $<1 \times 10^{-3}$ mbares, 3 d | PP415-P33 | 2PrOH (~4,8%) | 3 |

- 15 Los espectros de FT-Raman de la clase 3 (muestra PP415-P6), del material secado de la clase 3 (muestra PP415-P25), y del material adicionalmente secado de la clase 3 (muestra PP415-P33) son idénticos y no muestran cambios (FIG. 104).

- 20 Los patrones de PXRD de la clase 3 (muestra PP415-P6) y del material adicionalmente secado de la clase 3 (muestra PP415-P33) no muestran diferencias significativas, mientras que hay pocos desplazamientos pequeños y diferencias con el patrón del material inicialmente secado de la clase 3 (muestra PP415-P25, FIG. 105). Todos los patrones corresponden a la clase 3.

Ya que el secado no tuvo efecto principal en el contenido de solvente, no es sorprendente que los espectros de FT-Raman y patrones de PXRD de los materiales secados no muestren diferencias en comparación con el material no secado.

- 25 Por lo tanto, la clase 3 es una clase de solvatos isoestructurales (2PrOH, EtOH, y probablemente acetona) con moléculas de solvente muy fuertemente unidas que se pudieron eliminar sólo parcialmente (~5,4% en peso a ~4,8% en peso) por las condiciones de secado aplicadas aquí (hasta 3 d a 1×10^{-3} mbares y 80°C).

k. Clase 4 - Solvato de Acetonitrilo

- 30 Se obtuvo la clase 4 sólo de una mezcla de solventes 7:3 MeCN/H₂O (Tabla 23). El experimento que resulta en la clase 4 (PP415-P 13) se repitió como PP415-P35 para preparar más material para estudios de secado adicionales.

El espectro de FT-Raman (FIG. 72) y el patrón de PXRD (FIG. 75) de la clase 4 (muestra PP415-P13) difieren significativamente de los espectros y patrones de las clases 2, 3 y 5.

- 35 El termograma de TG-FTIR de la clase 4 (muestra PP415-P13, FIG. 106) muestra la pérdida de ~3,4% en peso de MeCN (con trazas de agua) desde 25°C a 270°C , la mayor parte en una etapa desde ~ 180°C a 210°C . La descomposición comienza a temperaturas $T > 270^\circ\text{C}$. Antes de los experimentos de TG-FTIR, las muestras se secaron brevemente (durante ~5 min) bajo vacío (10-20 mbares) para eliminar el exceso de solvente no unido. El contenido teórico de MeCN (p.e. = 81°C) de un hemisolvato es 3,6% en peso.

Tabla 23. Experimentos de cristalización resultantes en material sólido de la clase 4

| Muestra | Método | Solvente | Caracterización | Secado |
|-----------|--------------------------|---------------------------|----------------------|--------|
| PP415-P13 | equilibrio de suspensión | 7:3 MeCN/H ₂ O | Raman, PXRD, TG-FTIR | X |
| PP415-P35 | equilibrio de suspensión | 7:3 MeCN/H ₂ O | Raman, PXRD, TG-FTIR | X |

I. Experimentos de Secado en la Clase 4

5 Las muestras de la clase 4 obtenidas de los experimentos de equilibrio de suspensión en ~7:3 MeCN/H₂O se secaron bajo vacío durante varios días o bajo flujo de N₂ (Tabla 24).

Tabla 24. Experimentos de secado en las muestras de la clase 4

| Material de Partida | | Secado | Material secado | | |
|---------------------|-----------------------|---|-----------------|--|-------|
| Muestra | Contenido de solvente | Condiciones | Muestra | Contenido de solvente | Clase |
| PP415-P13 | MeCN (~3,4%) | t.a., ~3 mbares, ~5 d; 60°C, 5-10 mbares, 2×1 h; 40-50°C, 5-20 mbares, ~1 d | PP415-P26 | MeCN (~2,8%) | 4 |
| PP415-P35 | MeCN (~2,9%) | 80°C, <1×10 ⁻³ mbares, 3 d | PP415-P36 | MeCN/H ₂ O ^a (~0,6%) | 4 |
| PP415-P35 | MeCN (~2,9%) | 80°C, flujo de N ₂ , 3 d | PP415-P37 | MeCN/H ₂ O ^a (~0,9%) | 4 |

^a contenido de solvente posiblemente MeCN y H₂O, pero difícil de determinar ya que las cantidades son pequeñas

El espectro de FT-Raman del material secado de la clase 4 (PP415-P26) es idéntico al espectro de la clase 4 (PP415-P13, FIG. 107).

10 El patrón de PXRD del material secado de la clase 4 (PP415-P26) muestra sólo diferencias muy pequeñas con el patrón de la clase 4, muestra PP415-P13 (FIG. 108). Algunos picos parecen mejor resueltos, y las intensidades de pico se han desplazado. No se observó amorfización. El patrón de PP415-P26 corresponde a la clase 4.

15 El termograma de TG-FTIR del material secado de la clase 4, muestra PP415-P26 (FIG. 109) muestra la pérdida de ~2,8% en peso de MeCN desde 170°C a 250°C y descomposición a temperaturas T > 300°C. En comparación con el TG-FTIR de la muestra PP415-P13 (FIG. 106), el contenido de solvente de la muestra ha disminuido desde 3,4% en peso a 2,8% en peso.

20 Por lo tanto, la muestra parece ser un solvato parcialmente desolvatado. Ya que no permaneció suficiente material para un segundo experimento de secado con la subsecuente caracterización, el experimento de PP415-P13 se repitió (como PP415-P35). Más material de la clase 4 se preparó y dos experimentos de secado se realizaron con este material recién preparado:

- PP415-P36: secado bajo vacío (<1×10⁻³ mbares) a 80°C durante tres días
- PP415-P37: secado bajo flujo de N₂ a 80°C durante tres días

Los espectros de FT-Raman de estas muestras secadas de clase 4 (PP415-P36 y -P37) corresponden con el espectro de la clase 4 (es decir, PP415-P35, FIG. 110).

25 Los patrones de PXRD (FIG. 111) del material de la clase 4 (muestra PP415-P35) y las muestras secadas de la clase 4 (muestras PP415-P36 y PP415-P37) son idénticos. Las muestras secadas son cristalinas.

30 Los termogramas de TG-FTIR de estas muestras secadas de la clase 4 (FIG. 112 para PP415-P36 y FIG. 113 para PP415-P37) muestran sólo un pequeño contenido de solvente (MeCN y/o H₂O) de ~0,6% en peso y ~0,9% en peso para PP415-P36 y PP415-P37, respectivamente, en dos etapas desde 25°C a 280°C. El contenido de solvente es posiblemente MeCN y H₂O, pero es difícil de determinar ya que las cantidades son pequeñas. La descomposición comienza a temperaturas T > 280°C.

Por lo tanto, la mayoría del solvente de este solvato se podría eliminar sin destruir la estructura cristalina. Se obtuvo

una forma no solvatada cristalina (o más bien solvato desolvatado).

m. Caracterización Adicional de la Clase 4 Secada y Desolvatada

El secado de la clase 4 (solvato de MeCN) resultó en un solvato desolvatado con el contenido de solvente reducido a <1% en peso (TG-FTIR).

- 5 Ningún cambio en la estructura ocurrió en la desolvatación (FT-Raman y PXRD). No se observó pérdida significativa de la cristalinidad.

Por lo tanto, se obtuvo una forma no solvatada cristalina de 63415, la única conocida hasta la fecha.

Este material desolvatado de clase 4 se caracterizó adicionalmente por DVS y DSC.

- 10 La isoterma de DVS (FIG. 114) muestra que durante el tiempo de equilibración inicial a 50% h.r. ocurrió una ganancia de masa de ~0,4% en peso. Durante la medición, una pérdida de masa gradual reversible de ~1,3% en peso ocurrió al disminuir la humedad relativa desde 50% h.r. a 0% h.r. Se alcanzó el equilibrio. Al aumentar la humedad relativa a 95% h.r., se observó una ganancia de masa gradual de ~0,8% en peso (con respecto a la masa de equilibración a 50% h.r.). Se alcanzó el equilibrio. Después de disminuir la humedad relativa a 50% h.r., la masa final permaneció como 0,1% en peso por debajo de la masa de partida equilibrada. La ganancia de masa de ~0,7% en peso al aumentar la humedad relativa desde 50% h.r. a 85% h.r. clasificó la muestra como ligeramente higroscópica.

El patrón de PXRD de la muestra después de la medición está inalterado en comparación con el patrón antes de la medición (FIG. 1 15).

- 20 El termograma de DSC de una muestra de material desolvatado de la clase 4 (FIG. 116) no muestra transición vítrea atribuible a la forma amorfa, que se hubiera esperado a ~150°C, pero en su lugar, un pico endotérmico agudo con un máximo a $T = 196,1^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 29,31 \text{ J/g}$), probablemente correspondiente a la fusión, y no descomposición hasta 270°C.

- 25 Además, un experimento de DSC se realizó con una mezcla ~1:1 del material amorfo, clase 1, con el material desolvatado de la clase 4 para investigar si el material amorfo se transformaría y cristalizaría en la clase 4 desolvatada, ocurrió un evento esperado (si es en absoluto) por encima de la temperatura de transición vítrea de la forma amorfa ($T_g \approx 150^{\circ}\text{C}$) y por debajo de la de la fusión de la clase 4 desolvatada ($T_m \approx 196^{\circ}\text{C}$).

- 30 El termograma de DSC de la mezcla (FIG. 117) muestra un evento endotérmico con un pico a $T = 156,7^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 1,47 \text{ J/g}$) y un segundo evento endotérmico con un pico a $197,0^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 14,1 \text{ J/g}$). El primer evento podría ser atribuible al material amorfo (transición vítrea a $T_g \approx 150^{\circ}\text{C}$). El segundo evento podría corresponder a la fusión de la clase 4 desolvatada a $T_m \approx 196^{\circ}\text{C}$. El calor de fusión ($\Delta H = 14,1 \text{ J/g}$) de la mezcla se correlaciona bien con la mitad del calor de fusión ($\Delta H = 29,3 \text{ J/g}$) de la clase 4 desolvatada pura.

No se pueden observar eventos exotérmicos en el intervalo de temperatura entre la de transición vítrea y la de fusión correspondiente a una posible cristalización del material amorfo. Por lo tanto, ninguna transformación de la forma amorfa en la forma desolvatada de la clase 4 pareció haber ocurrido en este plazo de tiempo.

- 35 En todavía otro experimento de DSC con una mezcla de ~1:1 del material amorfo, clase 1, con el material desolvatado de la clase 4, se detuvo el calentamiento a 173°C (entre la transición vítrea y la fusión) para dar tiempo para una posible cristalización.

- 40 El termograma de DSC de la mezcla (FIG. 118) muestra un evento endotérmico con un pico a $T = 161,4^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 0,31 \text{ J/g}$) y un segundo evento endotérmico con un pico a $201,4^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 11,4 \text{ J/g}$). Como en el primer experimento, el calor de fusión del segundo pico no aumentó; no son visibles indicaciones de una transformación de la forma amorfa en la forma desolvatada de la clase 4.

El valor basal curvado (-50°C a 150°C) es más probablemente un artefacto (debido a una tapa doblada de soporte de muestra)

n. Clase 5 - Solvato de THF

- 45 Se obtuvo la clase 5 sólo de una mezcla de solventes 1:1 THF/H₂O (Tabla 25).

El espectro de FT-Raman (FIG. 71) y patrón de PXRD (FIG. 75) de la clase 5 difiere significativamente de los espectros y patrones de las clases 2, 3 y 4.

- 50 El termograma de TG-FTIR de la clase 5 (muestra PP415-P14, FIG. 119) muestra la pérdida de ~36,1% en peso de THF y H₂O desde 25 a 200°C , la mayor parte en una etapa desde ~ 100°C a 130°C . Antes de los experimentos de TG-FTIR, las muestras se secaron brevemente (durante ~5 min) bajo vacío (10-20 mbares) para remover el exceso de solvente no unido. La pérdida tanto de THF como H₂O ocurre conjuntamente en el mismo intervalo de

temperatura. La descomposición comienza a temperaturas $T > 300^{\circ}\text{C}$. El contenido teórico de THF (p.e. = 66°C) de un trisolvato es 28., % en peso. Desafortunadamente, como el contenido de los dos componentes no se puede cuantificar por separado, el estado de solvatación exacto no se puede determinar.

Se proporcionan detalles sobre los experimentos y caracterizaciones de las muestras PP415-P41 y PP415-P45.

5 **Tabla 25. Experimentos de cristalización resultantes en material sólido de la clase 5**

| Muestra | Método | Solvente | Caracterización | Secado |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|--------|
| PP415-P14 | equilibrio de suspensión | 1:1 THF/H ₂ O | Raman, PXR, TG-FTIR | X |
| PP415-P41 ^b | equilibrio de suspensión | 1:1 THF/H ₂ O | PXR | X |
| PP415-P45 ^{b,c} | equilibrio de suspensión | 1:1 THF/H ₂ O | PXR | X |

^b material de partida: PP415-P40, clase 2; en todos los otros experimentos en esta tabla PP415-P1, clase 1, se utilizó como el material de partida

^c experimento de escala de 3 g en lugar de escala de 100 mg

o. Experimentos de Secado en Muestras de la Clase 5

- 10 La muestra de la clase 5 (PP415-P14), obtenida de un experimento de equilibrio de suspensión en ~1:1 THF/H₂O, se secó (como PP415-P27) bajo vacío durante varios días (2-20 mbares, t.a. a 60°C , Tabla 26).

Tabla 26. Experimentos de secado de muestras de la Clase 5

| Material de Partida | | Secado | Material secoado | | |
|---------------------|---------------------------------------|---|------------------|-----------------------|---------------------|
| Muestra | Contenido de solvente | Condiciones | Muestra | Contenido de solvente | Clase |
| PP415-P14 | THF y H ₂ O (~36% en peso) | t.a., ~3 mbares, ~5 d; 60°C , 5-10 mbares, 2x1 h; $40-50^{\circ}\text{C}$, 5-20 mbares, ~1 d | PP415-P27 | -- (~0,3 % en peso) | 1 (+5) ^a |

^a principalmente amorfa, sólo algunos picos amplios con relación de S/N baja

- 15 El espectro de FT-Raman del material secoado (PP415-P27) es diferente del espectro de la clase 5 (PP415-P14, FIG. 120) y, con sus picos ampliados, se asemeja más al espectro de la clase 1, el material de partida amorfo, PP415-P1.

El patrón de PXR del material secoado de la clase 5 (PP415-P27) sólo muestra algunos picos amplios de baja intensidad con una relación de S/N baja, que indica la baja cristalinidad de la muestra (FIG. 121). Algunos de los picos podrían corresponder a la clase 5, mientras que otros, es decir, a $7,35^{\circ}2\theta$, son nuevos o desplazados.

- 20 El termograma de TG-FTIR del material secoado de clase 5 (FIG. 122) muestra una pérdida de masa de ~0,3% en peso desde 25°C a 290°C y descomposición a temperaturas $T > 290^{\circ}\text{C}$. La muestra es anhidra.

Por lo tanto, por secado bajo vacío, el material ha perdido su contenido de solvente y también mucha de su cristalinidad.

8. Experimentos para preparar la forma amorfa

- 25 Los experimentos con el propósito de preparar la forma amorfa, clase 1, se realizaron utilizando el material de clase 2 (PP415-P40, Tabla 8) como material de partida. Se intentaron varias estrategias y métodos:

- Transformación de la clase 2 en la clase 5, seguida por secado de la clase 5 para obtener la forma amorfa, clase 1.
- Preparación de la forma amorfa, clase 1, directamente de la clase 2, si es posible utilizando solventes de clase ICH.

Se preparó material principalmente amorfo partiendo del material de la clase 2 en un proceso de dos etapas a través de la clase 5 en una escala de 100 mg y 3 g.

- 30 Se realizaron experimentos adicionales con el propósito de simplificar el procedimiento a un proceso de una etapa, para evitar el solvente de THF de ICH clase 2, y para obtener material completamente amorfo. Se encontró que el

método más prometedor es la precipitación de una disolución de acetona en un baño de agua fría. Este método directo da resultados mucho mejores que el método de dos etapas a través de la clase 5.

a. Preparación de la Forma Amorfa a través de la Clase 5

5 Se realizaron experimentos de cristalización utilizando la clase 2, PP415-P40, como el material de partida con el propósito de transformar este solvato de heptano en la clase 5 (probablemente solvato de THF), seguido por secado de la clase 5 para obtener el material amorfo (Tabla 27).

Se cree que la clase 5 es una buena etapa intermedia, ya que es más fácil de desolvatar y amorfizar que las clases 2 ó 3.

10 **Tabla 27. Resumen de los experimentos encaminados a la preparación de la forma amorfa, clase 1, a través de material de la clase 5**

| Etapa | Muestra | Método | Condiciones | Resultados |
|-------|------------|----------------------|-------------------------------------|---|
| 1 | PP415-P41 | equil. de suspensión | 1:1 THF/H ₂ O, 24°C, 3 d | clase 5 |
| " | PP415-P45 | equil. de suspensión | 1:1 THF/H ₂ O, t.a. 1 d | clase 5 |
| 2 | PP415-P44a | secado | 100 mbares, 80°C, 2 d | clase 1 ^a ; 0,9 % en peso THF |
| " | PP415-P46a | secado | 100 mbares, 80°C, 4 d | clase 1 ^a ; 0,4 % en peso H ₂ O |

^a principalmente amorfa, sólo algunos picos amplios con relación de S/N baja.

b. Etapa 1: Transformación de la Clase 2 en la Clase 5

15 La transformación del solvato de heptano, clase 2, en el solvato de THF, clase 5, se realizó con éxito suspendiendo el material PP415-P40 (solvato de heptano) en una mezcla (1:1) THF/H₂O y equilibrando la suspensión a t.a. (PP415-P41, escala de 100 mg). El material sólido resultante corresponde con el solvato de THF, clase 5 (FIG. 123).

Un primer experimento de escalamiento de la escala de mg a la escala de g (x30, es decir, escala de 3 g) se realizó análogo a PP415-P41: el material de partida de solvato de heptano de clase 2 (PP415-P40) se equilibró en THF/H₂O (1:1) durante un día y se transformó con éxito en la clase 5, el solvato de THF (PP415-P45, FIG. 124).

c. Etapa 2: Amorfización del Material de la Clase 5 por Secado

20 El material de la clase 5 (solvato de THF) se secó a temperatura elevada (80°C) bajo vacío (~100 mbares) teniendo en cuenta las condiciones que se pueden utilizar en el sitio de MFG del API.

25 Después de secar el material del experimento de escala de 100 mg, el PP415-P41, durante un día a 80°C y 100 mbares se transformó en material principalmente amorfo (PP415-P44, FIG. 125). El patrón de PXRD sólo muestra algunos picos amplios con baja intensidad. Después del secado adicional (80°C, 100 mbares) durante la noche, la intensidad de estos picos amplios se reduce adicionalmente (PP415-P44a). El TG-FTIR de este material muestra la pérdida de ~0,9% en peso de THF (con trazas de agua) gradualmente desde 25°C a 280°C y descomposición a temperaturas T > 300°C (FIG. 126).

30 El material del experimento de escala de 3 g, PP415-P45, también se secó a 80°C y 100 mbares (como PP415-P46). Se transformó durante la noche en material principalmente amorfo con sólo algunos picos amplios con baja intensidad (FIG. 127). Después de un total de cuatro días de secado (80°C, 100 mbares), estos picos amplios todavía están presentes (-P46a, FIG. 128). El TG-FTIR de este material no muestra contenido de THF, sino la pérdida de ~0,4% en peso de agua gradualmente desde 25°C a 250°C y descomposición a temperaturas T > 250°C (FIG. 129).

d. Obtención de la Forma Amorfa Directamente

35 La preparación de la forma amorfa partiendo del material de la clase 2 en el proceso de dos etapas a través de la clase 5 fue en gran medida, pero no completamente, exitosa. Por lo tanto, se realizaron experimentos adicionales con el propósito de simplificar el procedimiento a un proceso de una etapa, para evitar el uso de solvente de THF de ICH clase 2, y obtener material completamente amorfo (Tabla 28).

La forma amorfa, clase 1, se preparó directamente del material de la clase 2 en un experimento de evaporación de

una disolución de la clase 2 en THF bajo flujo de N₂ (PP415-P42, FIG. 129).

5 En un intento de simular un solvato de heptano/hexano incompletamente seco con una cantidad significativa de solvente restante, se realizó una evaporación de una disolución de la clase 2 en una disolución 8:2 THF/hexano (se utilizó hexano en lugar de heptano para tener puntos de ebullición similares en la mezcla de solventes). Sin embargo, el sólido resultante corresponde a la clase 2, la clase de los solvatos isoestructurales, no a la clase 5 (PP415-P43, FIG. 130).

Para evitar el solvente de THF de ICH clase 2, los experimentos de evaporación se realizaron en solventes de ICH clase 3.

10 La evaporación de una disolución de clase 2 en EtOAc bajo flujo de N₂ resultó en material cristalino con un patrón de PXRD correspondiente a la clase 2 (PP415-P47, FIG. 130). El TG-FTIR (FIG. 80) muestra la pérdida de masa en dos etapas típica de la clase 2 (total de ~7,9% en peso de EtOAc) a temperaturas de hasta 240°C, lo que indica moléculas de solvente muy fuertemente unidas.

15 La evaporación en formato de etilo también produjo material cristalino de clase 2 y no la forma amorfa (PP415-P48, FIG. 131). El TG-FTIR (FIG. 78) muestra la pérdida de masa de ~3,5% en peso de formato de etilo, primero gradualmente y luego en una etapa clara entre 180°C y 200°C. Puede haber pérdida adicional de formato de etilo concomitante con la descomposición a T > 240°C.

Sin embargo, el material de clase 2 se transformó con éxito en la forma amorfa, clase 1, añadiendo una disolución de acetona a un baño de agua fría (5°C) (PP415-P49, FIG. 132).

20 Este método directo para la preparación de la forma amorfa produce mejores resultados y es una ruta más prometedora que el proceso de dos etapas.

Tabla 28. Resumen de experimentos encaminados a la obtención de la forma amorfa directamente del material de partida de la clase 2

| Muestra | Método | Solvente | Condition | Result |
|-----------|---------------|------------------|--------------------------------|---------|
| PP415-P42 | evaporación | THF | flujo de N ₂ , 1 d | clase 1 |
| PP415-P43 | evaporación | 8:2 THF/hexano | flujo de N ₂ , 1 d | clase 2 |
| PP415-P47 | evaporación | EtOAc | flujo de N ₂ , 1 d | clase 2 |
| PP415-P48 | evaporación | formato de etilo | flujo de N ₂ , 1 d | clase 2 |
| PP415-P49 | precipitación | acetona | baño de H ₂ O a 5°C | clase 1 |

9. Instrumentos – Condiciones Típicas de Medición

25 **Espectroscopia de FT-Raman:** *Bruker RFS100* con software OPUS 6.5; Nd: YAG de excitación de 1.064 nm, detector Ge, intervalo de 3.500-100 cm⁻¹; condiciones típicas de medición: potencia láser nominal de 100-300 mW, 64-128 barridos, resolución de 2 cm⁻¹.

30 **PXRD:** *Stoe Stadi P; Detector Mythen1K*, radiación Cu-K α ; condiciones estándar de medición: transmisión; potencia de tubo de 40 kV y 40 mA; monocromador Ge curvado; tamaño de etapa de 0,02 °2 θ , tiempo de etapa de 12 s ó 60 s, intervalo de barrido de 1,5-50,5 °2 θ ó 1,0-55 °2 θ ; modo de detector: barrido por etapa; etapa de detector de 1 °2 θ ó 6 °2 θ ; preparación de la muestra estándar: 10 a 20 mg de la muestra se colocaron entre dos láminas de acetato; soporte de la muestra: soporte de muestra de transmisión Stoe; la muestra se giró durante la medición.

TG-FTIR: *Microbalanza Térmica Netzsch TG 209* con *Espectrómetro FT-IR Bruker Vector 22*; crisol de aluminio (con microagujero), atmósfera de N₂, velocidad de calentamiento de 10 K/min, intervalo de 25-250°C o 25-350°C.

35 **DSC:** *Perkin Elmer DSC 7*; crisoles de oro (cerrados o con microagujero), muestra rellena en un ambiente de N₂, velocidad de calentamiento de 10 K/min, intervalo de -50 a 250°C ó 350°C, a tiempos de enfriamiento rápido (a -200 K/min) a -50°C entre barridos.

40 **DVS:** *Projekt Messtechnik Sorptions Prüfsystem SPS 11 – 100n* o *Sistemas de Medición de Superficie DVS-1*. La muestra se colocó en un soporte de aluminio o platino en la parte superior de una microbalanza y se dejó equilibrar durante 2 h a 50% h.r. antes de comenzar el programa de humedad predefinido:

(1) 50 → 0% h.r. (5%/h); 5 h a 0% h.r.

(2) 0 → 95% h.r. (5%/h); 5 h a 95% h.r.

(3) 95 → 50% h.r. (5%/h); 2 h a 50% h.r.

5 La higroscopicidad se clasificó con base en la ganancia de masa a 85% h.r. con respecto a la masa inicial como sigue: delicuescente (suficiente agua adsorbida para formar un líquido), muy higroscópica (aumento de la masa \geq 15%), higroscópica (aumento de la masa $<$ 15% pero \geq 2%), ligeramente higroscópica (aumento de la masa $<$ 2% pero \geq 0,2%), o no higroscópica (aumento de la masa $<$ 0,2%).

Solventes: Para todos los experimentos, se utilizaron solventes de grado analítico Fluka, Merck o ABCR.

10 **Determinación de Solubilidad Aproximada:** Las solubilidades aproximadas se determinaron por una dilución por etapas de una suspensión de aproximadamente 10 mg de sustancia en 0,05 ml de solvente. Si la sustancia no se disolvió por adición de un total de $>$ 10 ml de solvente, la solubilidad se indica como $<$ 1 mg/ml. Debido al error experimental inherente en este método, los valores de solubilidad están destinados a ser considerados como estimaciones aproximadas y serán utilizados únicamente para el diseño de experimentos de cristalización.

15 **Determinación de la Estabilidad Química:** Se prepararon cuatro muestras de 1,0 mg del material PP415-P1 en 1,0 mL del solvente respectivo. Las suspensiones/disoluciones resultantes se equilibraron en un agitador *Eppendorf Thermomixer Comfort* de temperatura controlada durante 7 d, 2 d, 24 h, y 6 h a 25°C a una velocidad de agitación de 500 rpm. Si es necesario, la fase sólida se separó por centrifugación por filtro (membrana de PVDF de 0,5 μ m). Los filtrados se diluyeron en el diluyente (0,1% ácido fórmico en MeCN) a concentraciones \leq 0,2 mg/mL (desconocidas y probablemente inferiores para las suspensiones) y se examinaron utilizando el método de HPLC dado en la Tabla 29. Como referencia, el material PP415-P1 se diluyó en el diluyente a una concentración de 0,25 mg/mL y se añadió al principio y al final de la secuencia de HPLC.

Resultados de la HPLC

Tabla 29. Método de HPLC utilizado para las determinaciones de estabilidad química

| | | | |
|----------------------------------|--|-------|--------|
| Columna | Zorbax Eclipse XDB-C18, 3×150 mm, 5 μ m (CC19) | | |
| Eluyente A | H ₂ O + 0,1% ácido fórmico | | |
| Eluyente B | MeCN + 0,1% ácido fórmico | | |
| Gradiente | 0 min | 50% A | 50% B |
| | 10,0 min | 10% A | 90% B |
| | 15,0 min | 0% A | 100% B |
| | 15,1 min | 50% A | 50% B |
| | 20,0 min | 50% A | 50% B |
| Flujo | 0,75 mL/min | | |
| Volumen de inyección | 10 μ L | | |
| Longitud de onda | 254 nm, 242 nm, 210 nm | | |
| Tiempo de adquisición | 20 min | | |
| Tiempo de operación | 20 min | | |
| Temperatura de la columna | 25°C | | |
| Tiempo de retención | 8,9-9,0 min | | |

25 10. abreviaturas

Métodos:

AUC análisis del área bajo la curva

| | | |
|---|--------------------|---|
| | DSC | calorimetría de barrido diferencial |
| | DVS | sorción dinámica de vapor |
| | FT Raman | espectroscopia Raman por transformada de Fourier |
| | ¹ H-RMN | espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón |
| 5 | HPLC | cromatografía líquida de alta resolución |
| | PXRD | difracción de rayos X en polvo |
| | TG-FTIR | termogravimetría acoplada a espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier |

Productos Químicos:

| | | |
|----|----------|--|
| | 1BuOH | 1-butanol |
| 10 | CTAB | bromuro de cetil trimetilamonio |
| | DCM | diclorometano |
| | DEE | dietil éter |
| | DMF | <i>N,N</i> -dimetilformamida |
| | EtOAc | acetato de etilo |
| 15 | EtOH | etanol |
| | IPE | isopropil éter |
| | MeCN | acetonitrilo |
| | MEK | metil etil cetona |
| | MeOH | metanol |
| 20 | PEG | propilenglicol |
| | PTFE | politetrafluoroetileno, Teflón |
| | 2PrOH | 2-propanol, isopropanol |
| | SDS | dodecil sulfato de sodio |
| | TBME | <i>terc</i> -butil metil éter |
| 25 | TEA | trietilamina |
| | THF | tetrahidrofurano |
| | Tween 80 | monooleato de polioxietilen(80)sorbitán o polisorbato 80 |

Genes, Proteínas y Parámetros Biológicos:

| | | |
|----|--------|---|
| | AIM | modulador de inflamación antioxidante |
| 30 | Akr1c1 | miembro c1 de la familia 1 de aldo-ceto reductasa |
| | ALP | fosfatasa alcalina |
| | ALT | alanina transaminasa |
| | ARE | elemento de respuesta antioxidante |
| | AST | aspartato transaminasa |
| 35 | AUC | área bajo la curva |
| | BAL | lavado broncoalveolar |

| | | |
|----|-----------------------|--|
| | BALF | fluido de lavado broncoalveolar |
| | Bil | bilirrubina |
| | BUN | nitrógeno ureico en sangre |
| | COPD | enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| 5 | COX-2 | ciclooxigenasa-2 |
| | Cr | creatina |
| | CYP450 | citocromo P450 |
| | Eh-1 | epóxido hidrolasa 1 |
| | G6PD | glucosa-6-fosfato deshidrogenasa |
| 10 | Gclc | glutamato-cisteína ligasa, subunidad catalítica |
| | Gclm | glutamato-cisteína ligasa, subunidad modificadora |
| | Ggt1 | gamma-glutamyltransferasa |
| | Glrx | glutarredoxina-1 |
| | Glu | glucosa |
| 15 | GOT | glutámico-oxalacética transaminasa |
| | GPT1 | glutámico-piruvato transaminasa |
| | Gpx3 | glutación peroxidasa 3 |
| | GSH | glutación |
| | GSR | glutación reductasa |
| 20 | GSs | glutación sintetasa |
| | GST | glutación S-transferasa |
| | GSTa1 | glutación S-transferasa alfa 1 |
| | GSTp1 | glutación S-transferasa pi 1 |
| | Gy | Gray |
| 25 | H6PD | hexosa-6-fosfato deshidrogenasa |
| | hERG | gen humano relacionado con éter a-go-go |
| | HMOX1 | hemo oxigenasa (desciclada) 1 |
| | HO-1 | hemo oxigenasa |
| | IFN γ | interferón-gamma |
| 30 | IL | interleuquina |
| | iNOS | óxido nítrico sintasa inducible |
| | I κ B α | factor nuclear de potenciador de gen de polipéptido ligero kappa en inhibidor de células B, alfa |
| | KC | proteína relacionada con IL-8 de ratón |
| | Keap1 | proteína-1 asociada con ECH tipo Kelch |
| 35 | LPS | lipopolisacárido |
| | ME1 | enzima málica 1 |

ES 2 634 315 T3

| | | |
|----|----------------|---|
| | MPCE | eritrocitos policromáticos micronucleados |
| | Mrp | proteínas relacionadas con metG |
| | Mrps | proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos |
| | NADPH | nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, reducido |
| 5 | NFκB | factor nuclear de potenciador de cadena ligera kappa de células B activadas |
| | NO | óxido nítrico |
| | NQO1 | NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 |
| | Nrf2 | semejante a factor nuclear (derivado de eritroides) 2 |
| | p-IκBα | IκBα fosforilado |
| 10 | PBMC | células mononucleares de sangre periférica |
| | PCE | eritrocitos policromáticos |
| | PGD | fosfogluconato deshidrogenasa |
| | PMN | polimorfonuclear |
| | RANTES | células T reguladas y normales expresadas y secretadas |
| 15 | SOD1 | superóxido dismutasa 1 |
| | SRXN1 | sulfirredoxina-1 |
| | TG | glicéridos totales |
| | TKT | transcetolasa |
| | TNFα | factor de necrosis tumoral alfa |
| 20 | Txn | tiorredoxina |
| | TXNRD1 | tiorredoxina reductasa 1 |
| | xCT | familia 7 de portador de soluto, miembro 11 |
| | Varios: | |
| | API | ingrediente farmacéutico activo |
| 25 | ac. | acuoso |
| | p.e. | punto de ebullición |
| | crist. | cristalina |
| | descomp. | descomposición |
| | d | día(s) |
| 30 | eq. | equivalente |
| | equil. | equilibrio |
| | evap. | evaporación |
| | h | hora(s) |
| | mat. | material |
| 35 | min | minuto(s) |
| | p.f. | punto de fusión |

ES 2 634 315 T3

| | | |
|----|----------------|----------------------------------|
| | MS | tamices moleculares |
| | part. | parcialmente |
| | precip. | precipitación |
| | h.r. | humedad relativa |
| 5 | rpm | revoluciones por minuto |
| | t.a. | temperatura ambiente (~25°C) |
| | S/N | señal a ruido (relación) |
| | solv. | solvente |
| | susp. | suspensión |
| 10 | T | temperatura |
| | T _g | temperatura de transición vítrea |
| | teo. | teórico |
| | obs. vis. | observación visual |
| | s | semana(s) |
| 15 | % en peso | porcentaje en peso |

K. Otras Tablas

Tabla 30: Lista de Muestras y Experimentos Realizados

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|----------|--|--|---|
| PP415-P1 | se recibieron ~5 g de 63415, lote # 0141-66-1, el 25 de marzo, 2011; PM = 554,7 g/mol, $C_{33}H_{44}F_2N_2O_3$ | FT-Raman: PP415P1.0 PP415P1.1 PXRD: 117a TG-FTIR: a4285 ¹ H-RMN: Mar30-2011-ktr/30 DSC: d_9840 DVS: #0305_02 post-DVS Raman: PP415P1_aDVS post-DVS PXRD: 179a | FT-Raman: utilizado como referencia para P1 PXRD: patrón de pico no cristalino amorfo TG-FTIR: pérdida de ~0,9 % en peso (~0,1 eq.) de EtOH con trazas de H ₂ O desde 25°C a 200°C, descomposición a T > 290°C ¹ H-RMN: de acuerdo con la estructura, ~0,08 eq. de EtOH DSC: 1er barrido: Tg = 152,7°C ($\Delta C_p = 0,72$ J/g°C); 2o barrido: Tg = 149,7°C ($\Delta C_p = 0,45$ J/g°C) DVS: ligeramente higroscópico; $\Delta m = +0,4\%$ (50% → 85% h.r.); ganancia de masa total de 2,1% en peso desde 0% h.r. a 95% h.r. post-DVS Raman y PXRD: sin cambio |
| PP415-P2 | se almacenó material de PP415-P1 a 25°C abierto sobre una disolución saturada de NH ₄ NO ₃ (es decir, a ~62% h.r.); las muestras se examinaron después de 1 s (PP415-P2a), 2 s (PP415-P2b), y 4 s (PP415-P2c). | PXRD: 132a (-P2a) 191a (-P2b) 262a (-P2c) | PXRD: toda amorfa, corresponde a P1 |
| PP415-P3 | se almacenó material de PP415-P1 a 40°C abierto sobre una disolución saturada de NaCl (es decir, a ~75% h.r.); las muestras se examinaron después de 1 s (PP415-P3a), 2 s (PP415-P3b), y 4 s (PP415-P3c). | PXRD: 133a (-P3a) 192a (-P3b) 263a (-P3c) | PXRD: toda amorfa, corresponde a P1 |
| PP415-P4 | se almacenó material de PP415-P1 a 60°C en un recipiente cerrado; las muestras se examinaron después de 1 s (PP415-P4a), 2 s (PP415-P4b), y 4 s (PP415-P4c). | PXRD: 134a (-P4a) 193a (-P4b) 264a (-P4c) | PXRD: toda amorfa, corresponde a P1 |
| PP415-P5 | se almacenó material de PP415-P1 a 80°C en un recipiente cerrado; las muestras se examinaron después de 1 s (PP415-P5a), 2 s (PP415-P5b), y 4 s (PP415-P5c). | PXRD: 135a (-P5a) 194a (-P5b) 265a (-P5c) | PXRD: toda amorfa, corresponde a P1 |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|----------|---|---|--|
| PP415-P6 | se suspendieron 97,7 mg de PP415-P1 en 0,4 mL de 2PrOH; se obtuvo una suspensión blanca; la suspensión se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; se añadió por etapas un total de 0,5 mL del solvente durante el siguiente par de días; después de 15 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD; el material se secó durante 5 min bajo vacío (10-20 mbares); el material se examinó por TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P6.0 PXRD: 225a TG-FTIR: a4323 | Raman: corresponde a clase 3 PXRD: corresponde a clase 3 TG-FTIR: pérdida de ~5,4 % en peso de 2PrOH desde 25°C a 250°C, la mayor parte en una etapa desde ~170°C a 190°C; la descomposición comienza a T >250°C |
| PP415-P7 | se suspendieron 104,3 mg de PP415-P1 en 0,6 mL de 1:2 EtOAc/heptano; se obtuvo una suspensión blanca; la suspensión se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; se añadió por etapas un total de 0,2 mL de la mezcla de solventes durante el siguiente par de días; después de 15 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD; el material se secó durante 5 min bajo vacío (10-20 mbares); el material se examinó por TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P7.0 PXRD: 227a TG-FTIR: a4338 | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a una clase 2 TG-FTIR: pérdida de ~7,5 % en peso de EtOAc y heptano en dos etapas desde ~100°C a 290°C; la descomposición comienza a T > 290°C |
| PP415-P8 | se suspendieron 102,0 mg de PP415-P1 en 0,4 mL de 1:2 acetona/hexano; se obtuvo una suspensión blanca; la suspensión se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; se añadió por etapas un total de 0,2 mL de la mezcla de solventes durante el siguiente par de días; después de 15 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD. | FT-Raman: PP415P8.0 PXRD: 228a | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a clase 2 |
| PP415-P9 | se suspendieron 102,6 mg de PP415-P1 en 0,4 mL de 1:3 tolueno/dietil éter; se obtuvo una suspensión blanca; la suspensión se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; se añadió por goteo un total de 0,2 mL de la mezcla de solventes durante el siguiente par de días; después de 15 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman. | FT-Raman: PP415P9.0 | Raman: corresponde a clase 2, contiene señales de solvente |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|-----------|---|--|--|
| PP415-P10 | se suspendieron 102,5 mg de PP415-P1 en 0,2 mL de 1:3 MeOH/TBME; se obtuvo una solución clara; la solución se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; después de 1 d se observó una suspensión espesa; se añadieron 0,2 mL de la mezcla de solventes; se continuó el equilibrio de la suspensión a 22°C agitando a 400 rpm; después de un total de 15 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD. | FT-Raman: PP415P10.0 PXRD: 229a | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a clase 2 |
| PP415-P11 | se suspendieron 97,1 mg de PP415-P1 en 0,4 mL de 1:2 MEK/ciclohexano; se obtuvo una suspensión blanca; la suspensión se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; después de 15 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman. | FT-Raman: PP415P11.0 | Raman: corresponde a clase 2, contiene señales de solvente |
| PP415-P12 | se suspendieron 98,6 mg de PP415-P1 en 0,2 mL de 9:1 EtOH/H ₂ O; se obtuvo una suspensión blanca; la suspensión se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; se añadió por etapas un total de 0,2 mL de la mezcla de solventes durante el siguiente par de días; después de 15 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD; el material se secó durante 5 min bajo vacío (10-20 mbares); el material se examinó por TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P12.0 PXRD: 230a TG-FTIR: a4324 | Raman: corresponde a una clase 3 PXRD: corresponde a una clase 3 TG-FTIR: pérdida de ~4,9 % en peso de EtOH (con trazas de agua) desde 25°C a 250°C, la mayor parte en una etapa desde ~160°C a 190°C; la descomposición comienza a T >250°C |
| PP415-P13 | se suspendieron 95,9 mg de PP415-P1 en 0,2 mL de 7:3 MeCN/H ₂ O; se obtuvieron dos fases separadas claras; la solución se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; después de 1 d se observó una suspensión espesa; se añadieron 0,2 mL de la mezcla de solventes; se continuó el equilibrio de la suspensión a 22°C agitando a 400 rpm; después de un total de 15 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD; el material se secó durante 5 min bajo vacío (10-20 mbares); el material se examinó por TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P13.0 PXRD: 231a TG-FTIR: a4321 | Raman: corresponde a clase 4, contiene señales de solvente PXRD: corresponde a clase 4 TG-FTIR: pérdida de ~3,4 % en peso de MeCN (con trazas de agua) desde 25°C a 270°C, la mayor parte en una etapa desde ~180°C a 210°C; la descomposición comienza a T >270°C |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|-----------|---|--|---|
| PP415-P14 | se suspendieron 95,8 mg de PP415-P1 en 0,2 mL de 9:1 THF/H ₂ O; se obtuvieron dos fases separadas claras; la solución se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; después de 1 d se observó una fase clara; se añadieron 0,2 mL de H ₂ O; se observó un precipitado blanco; la suspensión se equilibró a 22°C agitando a 400 rpm; después de un total de 15 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD; el material se secó durante 5 min bajo vacío (10-20 mbares); el material se examinó por TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P14.0 PXRD: 232a TG-FTIR: a4322 | Raman: corresponde a clase 5, contiene señales de solvente PXRD: corresponde a clase 5 TG-FTIR: pérdida de ~36,1 % en peso de THF y H ₂ O desde 25°C a 200°C, la mayor parte en una etapa desde ~100°C a 130°C; la descomposición comienza a T > 300°C |
| PP415-P15 | se disolvieron 100,6 mg de PP415-P1 en 0,2 mL de 1:2 DCM/IPE; se obtuvo una solución clara; se observó la precipitación de sólido blanco en < 1 min; se añadieron 0,2 mL de mezcla de solventes; el vial se cubrió con tejido de capa única y el solvente se dejó evaporar bajo condiciones ambientales; se obtuvo un material sólido blanco húmedo después de varias horas; el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD. | FT-Raman: PP415P15.0 PXRD: 137a | Raman: corresponde a clase 2, contiene señales de solvente PXRD: corresponde a clase 2 |
| PP415-P16 | se disolvieron 100,3 mg de PP415-P1 en 0,2 mL de 1:2 MeOH/tolueno; se obtuvo una solución clara; el vial se cubrió con tejido de capa única y el solvente se dejó evaporar bajo condiciones ambientales; se obtuvo un material vítreo después de varios días; el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman. | FT-Raman: PP415P16.0 | FT-Raman: corresponde a clase 1, contiene picos de solvente de tolueno |
| PP415-P17 | se disolvieron 101,0 mg de PP415-P1 en 0,3 mL de 1:3 EtOAc/heptano; se obtuvo una solución clara; se observó la precipitación de sólido blanco en < 1 min; se añadieron 0,2 mL de mezcla de solventes; el vial se cubrió con tejido de capa única y el solvente se dejó evaporar bajo condiciones ambientales; se obtuvo un material sólido blanco húmedo después de varias horas; el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD. | FT-Raman: PP415P17.0 PXRD: 138a | Raman: corresponde a clase 2, contiene señales de solvente PXRD: corresponde a una clase 2 |
| PP415-P18 | se secó el material de PP415-P15 bajo vacío (2-20 mbares) a t.a. durante ~2 h; el sólido blanco seco se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P18.0 PXRD: 149a TG-FTIR: a4301 | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a clase 2 TG-FTIR: pérdida de ~7,0 % en peso de IPE en dos etapas desde ~140°C a ~250°C; descomposición a T > 250°C |
| PP415-P19 | se secó el material de PP415-P17 bajo vacío (2-20 mbares) a t.a. durante ~2 h; el sólido blanco seco se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P19.0 PXRD: 150a TG-FTIR: a4302 | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a clase 2 TG-FTIR: pérdida de ~7,6 % en peso de heptano en dos etapas desde ~140°C a ~270°C; |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|-----------|--|---|--|
| PP415-P20 | se suspendieron 98,8 mg de PP415-P1 en 2,0 mL de H ₂ O; la suspensión se calentó a 50°C; lentamente y por etapas se añadieron 4,0 mL de acetona; se obtuvo una solución clara; la solución se calentó a 55°C y se mantuvo a 55°C durante 30 min; se enfrió lentamente en 4 h 10 min a 5°C (a ~0,2 K/min); el sólido se recuperó por filtración en vacío (Tamaño de poro P4); el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD. | FT-Raman: PP415P20.0 PXRD: 226a | descomposición a T > 270°C Raman: corresponde a clase 3, contiene señales de solvente PXRD: corresponde a clase 3 |
| PP415-P21 | se suspendieron 100,9 mg de PP415-P1 en 2,0 mL de ciclohexano; la suspensión se calentó a 70°C; lentamente y por etapas se añadieron 0,5 mL de ciclohexano y 0,5 mL de EtOH; la suspensión delgada llegó a ser más espesa debido a una precipitación adicional durante el transcurso de la adición de solvente; la suspensión se calentó a 75°C y se mantuvo a 75°C durante 30 min; se enfrió lentamente en 5 h a 5°C (a ~0,23 K/min); el sólido se recuperó por filtración en vacío (Tamaño de poro P4); el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD; el material se secó durante 5 min bajo vacío (10-20 mbares); el material se examinó por TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P21.0 PXRD: 218a TG-FTIR: a4326 | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a clase 2 TG-FTIR: pérdida de ~5,8 % en peso de ciclohexano en dos etapas desde ~140°C a ~250°C; descomposición a T > 250°C |
| PP415-P22 | se suspendieron 151,1 mg de PP415-P1 en 1,5 mL de tolueno; la suspensión se calentó a 70°C; se obtuvo una solución clara; se añadieron 0,5 mL de MeCN; la solución se calentó a 75°C y se mantuvo a 75°C durante 30 min; se enfrió lentamente en 5 h a 5°C (a ~0,23 K/min); se observó una solución clara y sin precipitación; la solución clara se agitó a 5°C durante 2 d; no se observó precipitación; el solvente se evaporó bajo flujo de N ₂ a t.a.; se obtuvo una sustancia vítrea; se examinó por espectroscopia de FT-Raman. | FT-Raman: PP415P22.0 | Raman: corresponde a clase 1, contiene señales de solvente |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|-----------|---|---|--|
| PP415-P23 | se suspendieron 150,6 mg de PP415-P1 en 1,5 mL de dioxano; la suspensión se calentó a 70°C; se obtuvo una solución clara; se añadieron 0,5 mL de EtOAc; la solución se calentó a 75°C y se mantuvo a 75°C durante 30 min; se enfrió lentamente en 5 h a 5°C (a ~0,23 K/min); se observó una solución clara y sin precipitación; la solución clara se agitó a 5°C durante 2 d; no se observó precipitación; el solvente se evaporó bajo flujo de N ₂ a t.a.; se obtuvo una sustancia vítrea; se examinó por espectroscopia de FT-Raman. | FT-Raman: PP415P23.0 | Raman: corresponde a clase 1, contiene señales de solvente |
| PP415-P24 | se suspendieron 99,4 mg de PP415-P1 en 0,3 mL de 1BuOH; la suspensión se calentó a 70°C; se obtuvo una solución clara; se observó poco después la precipitación del sólido blanco; se añadieron 0,5 mL de 1BuOH; siguió en suspensión; la suspensión se calentó a 75°C y se mantuvo a 75°C durante 30 min; se enfrió lentamente en 5 h a 5°C (a ~0,23 K/min); el sólido se recuperó por filtración en vacío (Tamaño de poro P4); el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD; el material se secó durante 5 min bajo vacío (10-20 mbares); el material se examinó por TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P24.0 PXRD: 219a TG-FTIR: a4325 | Raman: corresponde a clase 2, contiene señales de solvente PXRD: corresponde a clase 2 TG-FTIR: pérdida de ~16,6 % en peso de 1BuOH en una etapa desde ~50°C a ~160°C, pérdida adicional de 1BuOH (6,6 % en peso) en una segunda etapa desde 160°C a 230°C; descomposición a T > 230°C |
| PP415-P25 | se secó el material de PP415-P25 bajo vacío: a 60°C y ~5 mbares durante ~1 h; a t.a. y ~3 mbares durante 4,5 d; a 60°C y ~10 mbares durante 1 h; a 40-50°C y 5-20 mbares durante ~20 h, el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P25.0 PXRD: 258a TG-FTIR: a4337 | Raman: corresponde a clase 3 PXRD: corresponde a clase 3 TG-FTIR: pérdida de ~5,4 % en peso de 2PrOH desde 50°C a 250°C, la mayor parte en una etapa desde 170°C a 190°C, otra pérdida de ~1,0 % en peso de 2PrOH desde 290°C a 320°C; descomposición a T > 320°C |
| PP415-P26 | se secó el material de PP415-P13 bajo vacío: a 60°C y ~5 mbares durante ~1 h; a t.a. y ~3 mbares durante 4,5 d; a 60°C y ~10 mbares durante 1 h; a 40-50°C y 5-20 mbares durante ~20 h, el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P26.0 PXRD: 259a TG-FTIR: a4335 | Raman: corresponde a clase 4 PXRD: corresponde a clase 4 TG-FTIR: pérdida de ~2,8 % en peso de MeCN desde 170°C a 250°C; descomposición a T > 300°C |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|-----------|---|--|--|
| PP415-P27 | se secó el material de PP415-P14 bajo vacío: a 60°C y ~5 mbares durante ~1 h; a t.a. y ~3 mbares durante 4,5 d; a 60°C y ~10 mbares durante 1 h; a 40-50°C y 5-20 mbares durante ~20 h, el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P27.0 PXRD: 260a TG-FTIR: a4336 | Raman: parece que corresponde a una mezcla de clase 1 y clase 5 PXRD: la muestra sólo es parcialmente cristalina; los pocos picos amplios corresponden a una clase 5; por lo tanto corresponde a una mezcla de la clase 1 y clase 5 amorfa TG-FTIR: pérdida de ~0,3 % en peso desde 25°C a 290°C; descomposición a T > 290°C |
| PP415-P28 | se secó el material de PP415-P21 bajo vacío: a 60°C y ~5 mbares durante ~1 h; a t.a. y ~3 mbares durante 4,5 d; a 60°C y ~10 mbares durante 1 h; a 40-50°C y 5-20 mbares durante ~20 h, el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P28.0 PXRD: 261a TG-FTIR: a4334 | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a clase 2, muestra menos cristalina, como se indica por los picos más amplios TG-FTIR: pérdida de ~3,0 % en peso de ciclohexano en dos etapas desde ~140°C a ~250°C; descomposición a T > 250°C |
| PP415-P29 | se suspendieron 132,2 mg de PP415-P1 en 0,8 mL de 1:2 EtOAc/TEA; se observó un cambio de apariencia de la fase sólida; se agitó y se sometió a sonicación; la suspensión se equilibró a 24°C agitando a 500 rpm; después de 4 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD; el material se secó durante 5 min bajo vacío (10-20 mbares); el material se examinó por TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P29.0 PXRD: 282a TG-FTIR: a4346 | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a clase 2 TG-FTIR: pérdida de ~5,1 % en peso de EtOAc y TEA desde ~50°C a ~220°C, la mayor parte en una etapa desde 180°C a 210°C; descomposición a T > 220°C |
| PP415-P30 | se secó el material de PP415-P7 bajo vacío a 50-70°C y 1-10 mbares durante 3 días; el sólido se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P30.0 PXRD: 290a TG-FTIR: a4347 | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a una clase 2 TG-FTIR: pérdida de ~2,1 % en peso de heptano (y algo de EtOAc) en dos etapas desde ~50°C a ~250°C; descomposición a T > 250°C |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|-----------|--|---|--|
| PP415-P31 | se suspendieron 137,6 mg de PP415-P1 en 2 mL de 9:1 H ₂ O/PEG 400; se obtuvo una suspensión blanca; la suspensión se equilibró a 24°C agitando a 400 rpm; después de 5 d el material sólido se recuperó por filtración en vacío; el sólido se lavó tres veces con una pequeña cantidad de H ₂ O; el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman y PXRD. | FT-Raman: PP415P31.0 PXRD: 320a | Raman: corresponde a clase 1 PXRD: amorfa, corresponde a clase 1 |
| PP415-P32 | se secó el material de PP415-P19 bajo vacío a 80°C y <1×10 ⁻³ mbares; después de 1 d el material se examinó por TG-FTIR (a4362); el secado se continuó; después de un total de 3 d el material se examinó por TG-FTIR (a4365), Espectroscopia de FT-Raman, y PXRD como P32A. | FT-Raman: PP415P32.0 PXRD: 331a (P32A) TG-FTIR: a4362(P32) a4365 (P32A) | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a clase 2, menos cristalina TG-FTIR P32: pérdida de 2,8 % en peso de Heptano (25-250°C), la mayor parte en una etapa desde 170°C a 200°C; descomposición a T > 250°C TG-FTIR P32A: pérdida de 2,2 % en peso de Heptano (25-250°C), la mayor parte en una etapa desde 170°C a 200°C; descomposición a T > 250°C |
| PP415-P33 | se secó el material de PP415-P19 bajo vacío a 80°C y <1×10 ⁻³ mbares; después de 3 d el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P33.0 PXRD: 332a TG-FTIR: a4366 | Raman: corresponde a clase 3 PXRD: corresponde a clase 3 TG-FTIR: pérdida de ~4,2 % en peso de 2PrOH (50-210°C), la mayor parte en una etapa desde 160°C a 190°C, otra pérdida de ~0,5 % en peso de 2PrOH (210°C a 290°C); descomposición a T > 290°C |
| PP415-P34 | se secó el material de PP415-P19 bajo vacío a 80°C y <1×10 ⁻³ mbares; después de 3 d el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P34.0 PXRD: 333a TG-FTIR: a4367 | Raman: corresponde a clase 2 PXRD: corresponde a clase 2, menos cristalina TG-FTIR: pérdida de ~2,3 % en peso de ciclohexano en dos etapas desde 25°C a 270°C; descomposición a T > 270°C |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|-----------|--|---|---|
| PP415-P35 | se suspendieron 158,4 mg de PP415-P1 en 0,2 mL de MeCN/H ₂ O; se obtuvieron dos fases separadas claras; la solución se equilibró a 24°C agitando a 400 rpm; después de 3 d se observó una suspensión espesa; se añadieron 0,1 mL de la mezcla de solventes; se continuó el equilibrio de la suspensión a 24°C agitando a 400 rpm; después de un total de 5 d el material sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,20-µm); el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman; el material se secó durante 10 min bajo vacío (10-20 mbares); el material se examinó por PXRD y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P35.0 PXRD: 326a TG-FTIR: a4363 | Raman: corresponde a clase 4, contiene señales de solvente PXRD: corresponde a clase 4 TG-FTIR: pérdida de 2,9 % en peso de MeCN desde 25°C a 250°C; descomposición a T > 250°C |
| PP415-P36 | se secó el material de PP415-P35 bajo vacío a 80°C y <1×10 ⁻³ mbares; después de 3 d el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD y TG-FTIR. | FT-Raman: PP415P36.0 PXRD: 339a TG-FTIR: a4369 | Raman: corresponde a clase 4 PXRD: corresponde a clase 4 TG-FTIR: pérdida de ~0,6 % en peso (probablemente H ₂ O y/o MeCN) en dos etapas desde 25°C a 280°C; descomposición a T > 280°C |
| PP415-P37 | se secó el material de PP415-P35 flujo de N ₂ a 80°C; después de 3 d el material se examinó por espectroscopia de FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, DSC, y DVS. | FT-Raman: PP415P37.0 PXRD: 340a TG-FTIR: a4370 DSC: d_9907 DVS: dvs1176 post-DVS PXRD: 363a | Raman: corresponde a clase 4 PXRD: corresponde a clase 4 TG-FTIR: pérdida de ~0,9 % en peso (probablemente H ₂ O y/o MeCN) en dos etapas desde 25°C a 280°C; descomposición a T > 280°C DSC: pico endotérmico agudo a T = 196,1°C (ΔH = 29,31 J/g); sin descomposición hasta 270°C DVS: ligeramente higroscópico; Δm = +0,7% (50%→85% h.r.); ganancia de masa total de 2,1% en peso desde 0% h.r. a 95% h.r. post-DVS PXRD: corresponde a clase 4 |
| PP415-P38 | Experimento de DSC: se combinaron 1,275 mg de PP415-P1 y 1,344 mg de PP415-P36: se equilibraron durante 3 min bajo N ₂ ; la muestra se calentó desde -50°C a 270°C a 10 K/min. | DSC: d_9917 | DSC |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|-----------|---|------------------------------------|--|
| PP415-P39 | Experimento de DSC: se combinaron 2,17 mg de PP415-P1 y 2,20 mg de PP415-P36; los sólidos se mezclaron utilizando una espátula; se equilibraron durante 3 min bajo N ₂ ; la muestra se calentó desde -50°C a 173°C a 10K/min; se mantuvo a 173°C durante 30 min; se calentó desde 173°C a 270°C a 10 K/min. | DSC: d_9923 | DSC |
| PP415-P40 | recibido ~5 g de 63415, lote #: 2083-69-DC el 27 de mayo, 2011; PM = 554,7 g/mol, C ₃₃ H ₄₄ F ₂ N ₂ O ₃ | PXRD: 390a | PXRD: corresponde a clase 2 |
| PP415-P41 | se suspendieron 101,3 mg de PP415-P40 en 0,20 mL de THF/H ₂ O (1:1); se obtuvo una suspensión blanca; la suspensión se equilibró a 24°C; después de 3 días el sólido se recuperó por centrifugación en filtro (membrana de PTFE de 0,2 µm); el material sólido se secó bajo vacío durante 5 min; el sólido se examinó por PXRD. | PXRD: 400a | PXRD: corresponde a clase 5 |
| PP415-P42 | se disolvieron 104,6 mg de PP415-P40 en 0,20 mL de THF; se obtuvo una solución clara; el solvente se evaporó bajo flujo de N ₂ durante la noche; se obtuvo un sólido blanco; el sólido se examinó por PXRD. | PXRD: 405a | PXRD: amorfa (clase 1) |
| PP415-P43 | se disolvieron 101,8 mg de PP415-P40 en 0,20 mL de THF/hexano (8:2); se obtuvo una solución clara; el solvente se evaporó bajo flujo de N ₂ durante la noche; se obtuvo un sólido blanco; el sólido se examinó por PXRD. | PXRD: 429a | PXRD: corresponde a clase 2 |
| PP415-P44 | se secó el material de PP415-P41 bajo vacío (~100 mbares) a 80°C; el sólido se examinó después de 1 día por PXRD (474a); el secado se continuó durante la noche; el sólido se examinó de nuevo por PXRD (482a) y TG-FTIR. | PXRD: 474a, 482a TG-FTIR: a4401 | PXRD: ambas picos principalmente amorfas (clase 1), algunos picos amplios con baja intensidad TG-FTIR: ~0,9 % en peso de THF 25-280°C, descomposición a T > 300°C |
| PP415-P45 | se suspendieron 3,03 g de PP415-P40 en 6,0 mL de THF/H ₂ O (1:1); se obtuvo una suspensión blanca; la suspensión se equilibró a t.a.; después de 1 día se recuperó una pequeña alícuota por centrifugación en filtro y se examinó por PXRD; se recuperó el sólido de la muestra completa por filtración en vacío; la muestra se secó durante 10 min bajo vacío (~10 mbares). | PXRD: 471a | PXRD: corresponde a clase 5 |

| Muestra | Descripción Experimental | Métodos de Prueba | Resultado / Observaciones |
|-----------|---|------------------------------------|---|
| PP415-P46 | se secó el material de PP415-P45 bajo vacío (~100 mbares) a 80°C; el sólido se examinó después del secado durante la noche por PXRD (481a); el secado se continuó; después de 4 días el sólido se examinó como PP415-P46a por PXRD (496a) y TG-FTIR. | PXRD: 481a, 496a TG-FTIR: a4410 | PXRD: ambas principalmente amorfas (clase 1), algunos picos amplios con baja intensidad TG-FTIR: ~0,4 % en peso de H ₂ O 25-250°C, descomposición a T > 250°C |
| PP415-P47 | se disolvieron 101,8 mg de PP415-P40 en 0,4 mL de EtOAc; se obtuvo una solución clara; el solvente se evaporó bajo flujo de N ₂ durante la noche; se obtuvo un sólido blanco; el sólido se examinó por PXRD y TG-FTIR. | PXRD: 492a TG-FTIR: a4412 | PXRD: corresponde a clase 2 TG-FTIR: ~6,2 % en peso de EtOAc 25-170°C, 1,7 % en peso de EtOAc 170-240°C, descomposición a T > 240°C |
| PP415-P48 | se disolvieron 101,1 mg de PP415-P40 en 0,4 mL de formiato de etilo; se obtuvo una solución clara; el solvente se evaporó bajo flujo de N ₂ durante la noche; se obtuvo un sólido blanco; el sólido se examinó por PXRD y TG-FTIR. | PXRD: 493a TG-FTIR: a4413 | PXRD: corresponde a clase 2 TG-FTIR: ~3,5 % en peso de formiato de etilo 25-200°C, descomposición a T > 200°C |
| PP415-P49 | se disolvieron 205,3 mg de PP415-P40 en 0,3 mL de acetona; se obtuvo una solución clara; se añadieron por goteo unos 30,0 mL de H ₂ O (pre-enfriado a 5°C); se obtuvo una suspensión blanca ligera; la suspensión ligera se agitó a 5°C durante la noche; se obtuvo una suspensión blanca más espesa; el sólido se recuperó por filtración en vacío (tamaño de poro P4); se obtuvieron 188,3 mg de sólido blanco; el sólido se examinó por PXRD. | PXRD: 593a | PXRD: amorfa (clase 1) |

Tabla 31. Parámetros de la FIG. 51

| Compuesto | Niveles de NOx (% frente a Controles de LPS) | | |
|-----------|--|----------|----------|
| | | 13 mg/kg | 25 mg/kg |
| RTA 405 * | 44% | 26% | 18% |
| 63415 | 30% | 18% | 16% |

Tabla 32. 63415: ADMET Primario *In Vivo* – Ensayo de ADMET Primario Clave y Puntos Finales

| Ensayo | Puntos Finales Claves |
|-------------------------------|--|
| toxicidad en ratón de 14 días | Tolerabilidad, peso corporal, química clínica Distribución de tejido Expresión de ARNm de gen diana de Nrf2 y activación enzimática en el hígado |
| toxicidad en ratas de 14 días | Tolerabilidad, peso corporal, química clínica, e histopatología limitada Distribución de tejido y TK de plasma Expresión de ARNm de gen diana de Nrf2 y activación enzimática en el hígado |
| toxicidad en monos de 14 días | Tolerabilidad, peso corporal, química clínica, e histopatología limitada Distribución de tejido y TK de plasma Expresión de ARNm de gen diana de Nrf2 y activación enzimática en tejidos múltiples y PBMCs |

Tabla 33. Parámetros de la FIG. 54

| | Vehículo | 63415 | | |
|-----------------|----------|-------|------|------|
| Dosis (mg/kg) | 0 | 10 | 30 | 100 |
| ALT (U/L) | 100 | 39 | 63 | 91 |
| AST (U/L) | 156 | 98 | 147 | 167 |
| ALP (U/L) | 120 | 131 | 110 | 98 |
| Bil Tot (mg/dL) | <0,2 | <0,2 | <0,2 | <0,2 |
| BUN (mg/dL) | 17 | 15 | 15 | 15 |
| Cr (mg/dL) | <0,2 | <0,2 | <0,2 | <0,2 |
| Glu (mg/dL) | 288 | 307 | 285 | 273 |

Tabla 34. 63415 es Negativo para la Genotoxicidad en el Estudio de Micronúcleo In Vivo

| Tratamiento (n=5/grupo) | PCE/Eritrocitos (Media +/- SD) | totales | Cambio del Control (%) | Número de (Media +/- SD) | MPCCE/1000 PCE | Número de MPCCE/PCE Calificado |
|----------------------------|-----------------------------------|---------|------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------------------|
| punto de tiempo de 24 h | | | | | | |
| Aceite de sésamo | 0,588 ± 0,04 | | - | 0,2 ± 0,27 | | 2/10.000 |
| 125 mg/kg | 0,543 ± 0,03 | | -8 | 0,3 ± 0,27 | | 3/10.000 |
| 250 mg/kg | 0,520 ± 0,06 | | -12 | 0,3 ± 0,27 | | 3/10.000 |
| 500 mg/kg | 0,426 ± 0,07 | | -28 | 0,0 ± 0,00 | | 0/10.000 |
| 1.000 mg/kg | 0,498 ± 0,05 | | -15 | 0,2 ± 0,27 | | 2/10.000 |
| 1.500 mg/kg | 0,499 ± 0,06 | | -15 | 0,4 ± 0,22 | | 4/10.000 |
| 2.000 mg/kg | 0,531 ± 0,05 | | -10 | 0,2 ± 0,27 | | 2/10.000 |
| punto de tiempo de 48 h | | | | | | |
| Aceite de sésamo | 0,526 ± 0,05 | | - | 0,3 ± 0,27 | | 3/10.000 |
| 125 mg/kg | 0,453 ± 0,03 | | -14 | 0,2 ± 0,27 | | 2/10.000 |
| 250 mg/kg | 0,391 ± 0,02 | | -26 | 0,2 ± 0,27 | | 2/10.000 |
| 500 mg/kg | 0,339 ± 0,05 | | -36 | 0,3 ± 0,45 | | 3/10.000 |
| 1.000 mg/kg | 0,344 ± 0,04 | | -35 | 0,1 ± 0,22 | | 1/10.000 |
| 1.500 mg/kg | 0,376 ± 0,05 | | -39 | 0,4 ± 0,42 | | 4/10.000 |
| 2.000 mg/kg | 0,360 ± 0,03 | | -32 | 0,1 ± 0,22 | | 1/10.000 |

Tabla 35. Parámetros de la FIG. 35

| Tratamiento | Día | ALT (U/L) | AST (U/L) | ALP (U/L) | Bil (mg/dL) | Tot (mg/dL) | BUN (mg/dL) | Cr (mg/dL) | Prot Tot (g/dL) | Albúmina (g/dL) | Glucosa (mg/dL) | Colesterol (mg/dL) | TG (mg/dL) |
|-------------|--------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|------------|
| Vehículo | BL | 30 | 29 | 320 | 0,15 | | 23 | 0,63 | 7,2 | 4,1 | 87 | 124 | 52 |
| | Día 14 | 37 | 37 | 345 | 0,23 | | 18 | 0,63 | 6,9 | 4,1 | 63 | 130 | 64 |
| 10 mg/kg | BL | 46 | 32 | 351 | 0,18 | | 35 | 0,78 | 7,4 | 4 | 74 | 146 | 51 |
| | Día 14 | 46 | 38 | 382 | 0,23 | | 27 | 0,68 | 7,2 | 4 | 39 | 144 | 82 |
| 30 mg/kg | BL | 32 | 32 | 409 | 0,18 | | 23 | 0,7 | 7,3 | 4,2 | 85 | 125 | 47 |
| | Día 14 | 47 | 43 | 416 | 0,2 | | 20 | 0,58 | 7,2 | 4 | 53 | 122 | 64 |
| 100 mg/kg | BL | 32 | 35 | 381 | 0,15 | | 24 | 0,7 | 6,9 | 4 | 96 | 137 | 37 |
| | Día 14 | 43 | 37 | 390 | 0,18 | | 24 | 0,55 | 6 | 3,2 | 32 | 93 | 61 |

Tabla 36. Actividad In Vitro de 63415 y 63355

| | 63415 | 63355 |
|--|-----------|-------------|
| CI ₅₀ de NO (nM), RAW264.7 | 4,0 ±1 | 0,63 ± 0,06 |
| CI ₅₀ de WST-1 (nM), RAW264.7 | 125 | 150 |
| NQO1-ARE (veces a 62,5 nM en HuH7) | 5,3 ± 1,0 | 6,5 ± 0,9 |

Tabla 37. Parámetros de la FIG. 52

| Compuesto | Plasma | Sangre Entera | Cerebro | Hígado | Pulmón | Riñón |
|--------------|--------|---------------|---------|--------|--------|-------|
| RTA 405 (nM) | 130 | 1.165 | 93 | 1.143 | 1.631 | 2.357 |
| 63415 (nM) | 51 | 679 | 1.081 | 985 | 533 | 1.604 |

Tabla 38. Parámetros de la FIG. 53

| Compuesto | Hígado | Pulmón | Riñón |
|-----------|--------|--------|-------|
| RTA 405 | 1,93 | 1,48 | 8,25 |
| 63415 | 10,9 | 1,75 | 10,9 |

Referencias

Las siguientes referencias se proporcionan en la medida en que proporcionen procedimientos ejemplares u otros detalles suplementarios a los descritos en la presente.

- Patente de Estados Unidos 6.326.507
- 5 Patente de Estados Unidos 6.974.801
 Patente de Estados Unidos 7.915.402
 Patente de Estados Unidos 7.943.778
 Patente de Estados Unidos 8.124.799
 Patente de Estados Unidos 8.129.429
- 10 Publicación de Patente de Estados Unidos 2009/0060873
 Abraham y Kappas, *Free Radical Biol. Med.*, 39:1-25, 2005.
 Aghajan *et al.*, *J Gastroenterol Hepatol.*, Supl 2:10-14, 2012.
 Ahmad *et al.*, *Cancer Res.*, 68:2920-2926, 2008.
 Ahmad *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281:35764-9, 2006.
- 15 Angulo *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 30:1263-1271, 2000.
 Araujo *et al.*, *J. Immunol.*, 171(3):1572-1580, 2003.
 Arend y Dayer, *Arthritis Rheum.*, 38:151-160, 1995.
 Bach, *Hum. Immunol.*, 67(6):430-432, 2006.
 Bagasra *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:12041-12045, 1995.
- 20 Blake *et al.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42:524-36, 2010.
 Berridge *et al.*, *Biochemica*, 4: 14-19, 1996.
 Botoman *et al.*, *Am. Fam. Physician*, 57(1):57-68, 1998.
 Brandt *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 43:1346-1352, 2000.
 Brewerton *et al.*, *Lancet.*, 1:904-907, 1973a.
- 25 Brewerton *et al.*, *Lancet.*, 1:956-957, 1973b.
 Bronte *et al.*, *Trends Immunol.*, 24:302-306, 2003.
 Brown y DuBois *J. Clin. Oncol.*, 23:2840-2855, 2005.
 Brynskov *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 321(13):845-850, 1989.
 Cantin *et al.*, *J Clin Invest*, 79:1665-73, 1987.
- 30 Cai *et al.*, *Nat. Med.*, 11(2):183-190, 2005.
 Calin y Taurog, En: *The Spondylarthritides*, Calin *et al.* (Eds.), Oxford, UK. Oxford University Press, 179, 1998.
 Car *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med*, 149:655-9, 1994.
 Cernuda-Morollon *et al.*, *J Biol Chem*, 276:35530-6, 2001.
 Chan y Kan, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:12731-6, 1999.
- 35 Chauhan y Chauhan, *Pathophysiology*, 13(3):171-181. 2006.
 Chen y Kunsch, *Curr Pharm Des*, 10:879-91, 2004.
 Cho *et al.*, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26:175-82, 2002.

- Crowell *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2:815-823, 2003.
- Cuzzocrea *et al.*, *Mol Pharmacol*, 61:997-1007, 2002.
- Dickerson *et al.*, *Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*, 6 de marzo, 2007.
- Dinarelli, *Int. Rev. Immunol.*, 16:457-499, 1998.
- 5 Dinkova-Kostova *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(12):4584-4589, 2005.
- Dionne *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 112(3):435-442, 1998.
- Douglas *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med*, 158:220-5, 1998.
- Dudhgaonkar *et al.*, *Eur. J. Pain*, 10(7):573-9, 2006.
- Eastgate *et al.*, *Lancet*, 2(8613):706-9, 1988.
- 10 Eikelenboom *et al.*, *Glia*, 40(2):232-239, 2002.
- Ettehadi *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 96(1):146-151, 1994.
- Fischer *et al.*, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 6:413-21, 2011.
- Forstermann, *Biol. Chem.*, 387:1521, 2006.
- Funakoshi *et al.*, *Digestion*, 59(1):73-78, 1998.
- 15 Gebel *et al.*, *Toxicol Sci*, 115:238-52, 2010.
- Gehrmann *et al.*, *Glia*, 15(2):141-151, 1995.
- Genain y Nauser, *J. Mol. Med.*, 75:187-197, 1997.
- Goodman *et al.*, *Kidney Int.*, 72(8):945-953, 2007.
- Graeber *et al.*, *Glia*, 40(2):252-259, 2002.
- 20 Greten *et al.*, *Cell*, 118:285-296, 2004.
- Grivennikov y Karin, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21(1):11-19, 2010.
- Guilherme *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(5):367-77, 2008.
- Gwee *et al.*, *Gut*, 44(3):400-406., 1999.
- Hallgren *et al.*, *Am Rev Respir Dis*, 139:373-7, 1989.
- 25 Hahn y Tsao, En: *Dubois' Lupus Erythematosus*, 4^a Ed, Wallace y Hahn (Eds.), Lea y Febiger, Filadelfia, 195-201, 1993.
- Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use*, Stahl y Wermuth Eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002.
- Hanson *et al.*, *BMC Medical Genetics*, 6(7), 2005.
- Hansson *et al.*, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1:297-329, 2006.
- 30 Hayden y Ghosh, *Cell*, 132:344-62, 2008.
- He y Karin, *Cell Res.*, 21(1):159-168, 2011.
- Honda *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12:1027-1030, 2002.
- Honda *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(24):6306-6309, 2006.
- Honda *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7:1623-1628, 1997.
- 35 Honda *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8(19):2711-2714, 1998.
- Honda *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9(24):3429-3434, 1999.

- Honda *et al.*, *J. Med. Chem.*, 43:4233–4246, 2000a.
- Honda *et al.*, *J. Med. Chem.*, 43:1866–1877, 2000b.
- Hotamisligil, *Nature*, 444(7121):860-7, 2006.
- Iizuka *et al.*, *Genes Cells*, 10:1113-25, 2005.
- 5 Ikezaki *et al.*, *Food Chem Toxicol*, 34:327-35, 1996.
- Ishii *et al.*, *J Immunol*, 175:6968-75, 2005.
- Ishikawa *et al.*, *Circulation*, 104(15):1831-1836, 2001.
- Ishizawa y Dickson, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60(6):647-657, 2001.
- Jarvis, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 10(5):459-467, 1998.
- 10 Jarvis, *Pediatr. Ann.*, 31(7):437-446, 2002.
- Jonsson *et al.*, *Oral Dis.*, 8(3):130-140, 2002.
- Jonsson *et al.*, *Trends Immunol.*, 22(12):653-654, 2001.
- Kahle *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 51:731–734, 1992.
- Kaltschmidt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2642–2647, 1997.
- 15 Karin, *Nature*, 441(7092):431-436, 2006.
- Kawakami *et al.*, *Brain Dev.*, 28(4):243-246, 2006.
- Kawamoto *et al.*, *J Biol Chem*, 275:11291-9, 2000.
- Kendall-Tackett, *Trauma Violence Abuse*, 8(2):117-126, 2007.
- Kensler *et al.*, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:89-116, 2007.
- 20 Kikuchi *et al.*, *Respir Res*, 11:31, 2010.
- Kim *et al.*, *Mutat Res*, 690:12-23, 2010.
- King *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med*, 184:92-99, 2011.
- Kinnula *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med*, 172:417-22, 2005.
- Klingsberg *et al.*, *Respirology*, 15:19-31, 2010.
- 25 Kortylewski *et al.*, *Nat. Med.*, 11:1314-1321, 2005.
- Kotzin y O'Dell, En: *Samler's Immunologic Diseases*, 5^a Ed., Frank *et al.* (Eds.), Little Brown & Co., Boston, 667-697, 1995.
- Kotzin, *Cell*, 85:303-306, 1996.
- Kruger *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 319(3):1144-1152, 2006.
- Kuboyama, *Kurume Med. J.*, 45(1):33-37, 1998.
- 30 Lee *et al.*, *Mol Cell*, 36:131-40, 2009.
- Lee *et al.*, *Glia.*, 55(7):712-22, 2007.
- Lencz *et al.*, *Mol. Psychiatry*, 12(6):572-80, 2007.
- Levonen *et al.*, *Biochem J*, 378:373-82, 2004.
- Li y Kong, *Mol Carcinog*, 48:91-104, 2009.
- 35 Liby *et al.*, *Cancer Res.*, 65(11):4789-4798, 2005.
- Liby *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 6(7):2113-9, 2007b.

- Liby *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 7(5):357-356, 2007a.
- Lipsky, En: *Harrison's principles of internal medicine*, Fauci *et al.*(Eds.), 14^a Ed., NY, McGraw-Hill, 1880–1888, 1998.
- Liu *et al.*, *FASEB J.*, 20(2):207-216, 2006.
- Lu *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 121(10):4015-29, 2011.
- 5 Luger *et al.*, *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 30(3):338-344, 1998.
- Malhotra *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med*, 178:592-604, 2008.
- March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 2007.
- Mazur *et al.*, *Cell Microbiol.*, 9(7):1683-94, 2007.
- Mazzoni *et al.*, *J. Immunol.*, 168:689-695, 2002.
- 10 McAlindon *et al.*, *Gut*, 42(2):214-219, 1998.
- McGeer y McGeer, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 21:195–218, 1995.
- McGeer *et al.*, *Neurology*, 19:331–338, 1996.
- McGonagle *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 41:694-700, 1998.
- McGonagle *et al.*, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 11:244-250, 1999.
- 15 Mclver *et al.*, *Pain*, 120(1-2):161-9, 2005.
- Mease *et al.*, *Lancet*, 356:385–390, 2000.
- Merrill y Benvenist, *Trends Neurosci.*, 19:331–338, 1996.
- Mochizuki *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med*, 171:1260-6, 2005.
- Morbidity & Mortality: 2009 Chart Book on Cardiovascular, Lung, and Blood Diseases. National Heart, Lung, and Blood Institute, 2009.
- 20 Morris *et al.*, *J. Mol. Med.*, 80(2):96-104, 2002.
- Morse y Choi, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 172(6):660-670, 2005.
- Morse y Choi, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 27(1):8-16, 2002.
- Nath *et al.*, *Neurology*, 66(1):149-150, 2006.
- Neal *et al.*, *BMJ.*, 314(7083):779-782, 1997.
- 25 Nichols, *Drug News Perspect.*, 17(2):99-104, 2004.
- Ohnishi *et al.*, *Int. Immunol.*, 6:817-830, 1994.
- Ogushi *et al.*, *J Med Invest*, 44:53-8, 1997.
- Pall, *Med. Hypoth.*, 69:821-825, 2007.
- Parambil *et al.*, *Chest*, 128:3310-5, 2005.
- 30 Partsch *et al.*, *Br. J. Rheumatol.*, 24:518–523, 1997.
- Pergola *et al.*, *N Engl J Med*, 365:327-336, 2011.
- Pica *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.*, 44(1):200-4, 2000.
- Pimentel *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 95(12):3503-3506, 2000.
- Place *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 9(7):2798-806, 2003.
- 35 Prochaska y Santamaria, *Anal Biochem.*, 169:328–336, 1988.
- Rajakariar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(52):20979-84, 2007.

- Rangasamy *et al.*, *J Clin Invest*, 114:1248-59, 2004.
- Rangasamy *et al.*, *J Exp Med*, 202:47-59, 2005.
- Reimund *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.*, 28(2):145-150, 1998.
- Renauld, *J Clin Pathol*, 54:577-89, 2001.
- 5 Rogler y Andus, *World J. Surg.*, 22(4):382-389, 1998.
- Rooney *et al.*, *Rheumatol. Int.*, 10:217-219, 1990.
- Ross *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 120(Suppl): S53-71, 2003.
- Ross *et al.*, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 3(5):573-585, 2003.
- Rossi *et al.*, *Nature*, 403:103-8, 2000.
- 10 Rostom *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 146, 376-389, 2007.
- Ruster *et al.*, *Scand. J. Rheumatol.*, 34(6):460-3, 2005.
- Sacerdoti *et al.*, *Curr Neurovasc Res.*, 2(2):103-111, 2005.
- Saha *et al.*, *J Biol Chem*, 285:40581-92, 2010.
- Saiki *et al.*, *Scand. J. Gastroenterol.*, 33(6):616-622, 1998.
- 15 Salomonsson *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 55(4):336-342, 2002.
- Salvemini *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 93(5):1940-1947, 1994.
- Sarchielli *et al.*, *Cephalalgia*, 26(9):1071-1079, 2006.
- Satoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(3):768-773, 2006.
- Schlosstein *et al.*, *NE J. Medicine*, 288:704-706, 1973.
- 20 Schulz *et al.*, *Antioxid. Redox. Sig.*, 10:115, 2008.
- Selman *et al.*, *Ann Intern Med*, 134:136-51, 2001.
- Sheppard, *J Clin Invest*, 107:1501-2, 2001.
- Shishodia *et al.*, *Clin Cancer Res*, 12:1828-38, 2006.
- Simonian y Coyle, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36:83-106, 1996.
- 25 Singh *et al.*, *Free Rad Biol Med*, 46:376-386, 2009.
- Sinha *et al.*, *Cancer Res.*, 67:4507-4513, 2007.
- Sporn *et al.*, *J Nat Prod*, 74:537-45, 2011.
- Sriram *et al.*, *Pulm Pharmacol Ther*, 22:221-36, 2009.
- Stack *et al.*, *Lancet*, 349(9051):521-524, 1997.
- 30 Standiford *et al.*, *Chest*, 103:121S, 1993.
- Standiford *et al.*, *J Immunol*, 151:2852-63, 1993.
- Stewart *et al.*, *Neurology*, 48:626-632, 1997.
- Straus *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:4844-9, 2000.
- Strejan *et al.*, *J. Neuroimmunol.*, 7:27, 1984.
- 35 Strieter, *Am J Respir Crit Care Med*, 165:1206-7, 2002.
- Suh *et al.*, *Cancer Res.*, 58:717-723, 1998.
- Suh *et al.*, *Cancer Res.*, 59(2):336-341, 1999.

- Sussan *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:250-5, 2009.
- Szabo *et al.*, *Nature Rev. Drug Disc.*, 6:662-680, 2007.
- Takahashi *et al.*, *Cancer Res.*, 57:1233–1237, 1997.
- Tamir y Tannebaum, *Biochim. Biophys. Acta*, 1288: F31-F36, 1996.
- 5 Taniguchi *et al.*, *Eur Respir J*, 35:821-9, 2010.
- Targan *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 337(15):1029-1035, 1997.
- Thimmulappa *et al.*, *Cancer Research*, 62: 5196-5203, 2002.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III, or ATP III), National Institutes of Health, 2001, Publicación NIH No. 01-3670.
- 10 Touzani *et al.*, *J. Neuroimmunol.*, 100(1-2):203-215, 1999.
- Tumlin *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 98(6A):14K-20K, 2006.
- van den Berg, *Semin. Arthritis Rheum.*, 30(5S-2):7–16, 2001.
- van Dullemen *et al.*, *Gastroenterol.*, 109(1):129-135, 1995.
- van Hogezaand y Verspaget, *Drugs*, 56(3):299-305, 1998.
- 15 Vazquez *et al.*, *J. Virol.*, 79(7):4479-91, 2005.
- Wakabayashi, *et al.*, *Antioxid Redox Signal*, 13:1649-63, 2010.
- Wang *et al.*, *Cancer Res.*, 66:10983-10994, 2006.
- Wardle, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16(9):1764-8, 2001.
- Weyand y Goronzy, *Ann. NY Acad. Sci.*, 987:140-149, 2003.
- 20 Williams *et al.*, *Clin. Neurosci.*, 2(3-4):229–245, 1994.
- Wordsworth, En: *Genes and Arthritis*, Brit. Medical Bulletin, 51:249-266, 1995.
- Wright, *Clin. Orthop. Related Res.*, 143:8-14, 1979.
- Wu *et al.*, *Toxicol Sci*, 123:590-600, 2011.
- Xie *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270(12):6894-6900, 1995.
- 25 Yates *et al.*, *Mol. Cancer Ther*, 6(1):154-162, 2007.
- Yore *et al.*, *Mol Cancer Ther*, 5:3232-9, 2006.
- Yoh *et al.*, *Kidney Int.*, 60(4):1343-1353, 2001.
- Yu *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, 7:41-51, 2007.
- Zhou *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 166(1):27-37, 2005.
- 30 Zhou *et al.*, *Cancer Sci.*, 98:882-889, 2007.
- Zingarelli *et al.*, *J. Immunol.*, 171(12):6827-6837, 2003.

Listado de secuencias

<110> Reata Pharmaceuticals, Inc.

<120> DERIVADOS DE 2,2-DIFLUOROPROPIONAMIDA DE BARDOXOLONA METILO, FORMAS POLIMÓRFICAS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> REAT.P0073WO

<150> 61/780.444
<151> 13-03-2013

<150> 61/775.288
<151> 08-03-2013

<150> 61/687.669
<151> 27-04-2012

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 1

gctgtggcta ctgcggtatt 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 2

atctgcctca atgacacat 20

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 3

tccgatgggt cttacactc 20

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

ES 2 634 315 T3

<400> 4
 taggctcctt cctccttcc 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 5
 aaaacactgc cctcttggtg 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 6
 gtgccagtca gcatctggta 20
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 7
 gatgagaagg accccacggc gtctg 25
 <210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 8
 gagacaatcc agcagcccag gaggg 25
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 9
 attgccactg gtgaaagacc 20
 <210> 10
 <211> 20

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 10

accaattttg ttggccatgt 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 11

gaggccgtgt acaccaagat 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 12

agcagtgggg tgaaaatcg 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 13

aaggcactct acgcttcaa 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 14

aggagtcttg gcagtttca 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

ES 2 634 315 T3

<400> 15
catctccgag agcaacatca 20
<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador sintético
<400> 16
ttgtattggc ggctagtcc 20
<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador sintético
<400> 17
tatatcctgg ccaaggcaac 20
<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador sintético
<400> 18
ggataaagcc gaccctctc 20
<210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador sintético
<400> 19
tcaggctaca gaagaggctt gc 22
<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador sintético
<400> 20
acagtcacag gcttgccgat g 21
<210> 21
<211> 20

ES 2 634 315 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 21

 tcgggctagt cccagttaga 20

 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 22

 aaagagctgg agagccaacc 20

 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 23

 cacggagcag gtctcaacg 20

 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 24

 agaatgtca tccgaaatg 20

 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 25

 cgcggtgcag gtcaactact 20

 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

ES 2 634 315 T3

<400> 26

cctcatcagc caggagaaa 20

<210> 27

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 27

ggctattcgc tattttgtg 20

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 28

gaccaggtga ttcgtacaat 20

<210> 29

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 29

agagtcctct tcagtcattg 20

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

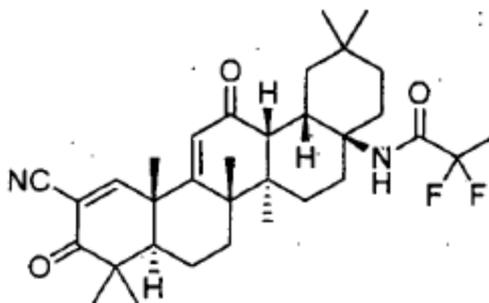
<400> 30

atgattagag cagatggtgg 20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:

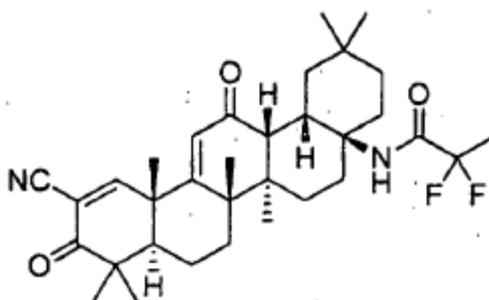
5



10 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

2. El compuesto según la reivindicación 1, que es un compuesto de la fórmula:

15



3. Una forma polimórfica del compuesto según la reivindicación 1 ó 2,

20 en el que la forma polimórfica tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende un pico de halo a aproximadamente 14 °2 θ ; o

en el que la forma polimórfica es un solvato que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende picos a aproximadamente 5,6, 7,0, 10,6, 12,7, y 14,6 °2 θ ; o

en el que la forma polimórfica es un solvato que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende picos a aproximadamente 7,0, 7,8, 8,6, 11,9, 13,9 (pico doble), 14,2, y 16,0 °2 θ ; o

25 en el que la forma polimórfica es un hemisolvato de acetonitrilo que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende picos a aproximadamente 7,5, 11,4, 15,6, y 16,6 °2 θ ; o

en el que la forma polimórfica es un solvato que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X (CuK α) que comprende picos a aproximadamente 6,8, 9,3, 9,5, 10,5, 13,6, y 15,6 °2 θ .

4. El compuesto según la reivindicación 1 ó 2 o la forma polimórfica según la reivindicación 3 para uso en un medicamento.

5. Una composición farmacéutica que comprende:

30 un ingrediente activo que consiste en un compuesto según la reivindicación 1 ó 2 o una forma polimórfica según la reivindicación 3, y

un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica se formula para la administración: vía oral, intraadiposal, intraarterial, intraarticular, intracraneal, intradérmica, intralesional, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleurales, intraprostática, intrarrectal, intratecal, intratraqueal, intratumoral, intraumbilical, intravaginal, intravenosa, intravesicular, intravítrea, liposomal, local, mucosal, parenteral, rectal, subconjuntival, subcutánea, sublingual, tópica, transbucal, transdérmica, vaginal, en cremas, en composiciones de lípidos, a través de un catéter, a través un lavado, a través de infusión continua, a través de infusión, a través de inhalación, a través de inyección, a través de suministro local, o a través de perfusión localizada.

7. La composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que la composición farmacéutica se formula como una cápsula dura o blanda, un comprimido, un jarabe, una suspensión, una emulsión, una disolución, una dispersión sólida, una oblea, o un elixir.
- 5 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 5 ó 6, en la que la composición farmacéutica se formula para administración tópica, en una forma seleccionada de una loción, una crema, un gel, un aceite, un ungüento, un bálsamo, una emulsión, una disolución, y una suspensión.
9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que la cantidad del ingrediente activo es desde 0,01% a 5% en peso.
10. El compuesto según la reivindicación 1 ó 2 o la forma polimórfica según la reivindicación 3 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para uso en el tratamiento o prevención de una afección asociada con la inflamación o estrés oxidativo.
- 10 11. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 10, en el que la afección es una enfermedad o trastorno de la piel, sepsis, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, una complicación de la exposición localizada o total del cuerpo a la radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad hepática, pancreatitis, un trastorno ocular, una enfermedad pulmonar, o diabetes.
- 15 12. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en el que la afección es una enfermedad o trastorno de la piel seleccionado de dermatitis, una quemadura térmica o química, una herida crónica, acné, alopecia, otros trastornos del folículo piloso, epidermolisis bullosa, quemaduras solares, complicaciones de las quemaduras solares, un trastorno de la pigmentación de la piel, una afección de la piel relacionada con el envejecimiento, una herida post-quirúrgica, una cicatriz de una lesión o quemadura de la piel, psoriasis, una manifestación dermatológica de una enfermedad autoinmune o una enfermedad de injerto contra huésped, cáncer de piel, y un trastorno que implica la hiperproliferación de células de la piel.
13. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en el que la afección es dermatitis, que es dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis debida a la exposición química, o dermatitis inducida por radiación.
- 20 14. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en el que la afección es una enfermedad autoinmune seleccionada de artritis reumatoide, lupus, enfermedad de Crohn, y psoriasis.
15. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en el que la afección es una enfermedad hepática seleccionada de enfermedad del hígado graso y hepatitis.
16. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en el que la afección es un trastorno ocular seleccionado de uveítis, degeneración macular, glaucoma, edema macular diabético, blefaritis, retinopatía diabética, una enfermedad o trastorno del endotelio corneal, inflamación post-quirúrgica, ojo seco, conjuntivitis alérgica, y una forma de conjuntivitis.
- 25 17. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en el que la afección es una enfermedad pulmonar seleccionada de inflamación pulmonar, fibrosis pulmonar, COPD, asma, fibrosis quística, y fibrosis pulmonar idiopática.
18. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en el que la afección es mucositis resultante de la terapia de radiación o quimioterapia.
- 30 19. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en el que la afección es cáncer seleccionado de un carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, y seminoma.
20. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 19, en el que la afección es melanoma.
- 35 21. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en el que la afección es cáncer y el cáncer es de la vejiga, sangre, hueso, cerebro, mama, centro sistema nervioso, cuello uterino, colon, endometrio, esófago, vesícula biliar, genitales, tracto genitourinario, cabeza, riñón, laringe, hígado, pulmón, tejido muscular, cuello, mucosa oral o nasal, ovario, páncreas, próstata, piel, bazo, intestino delgado, intestino grueso, estómago, testículos, o tiroides.
22. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 21, en el que la afección es cáncer de pulmón.
23. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las

reivindicaciones 10 a 22, en el que el compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica se administra tanto antes como después de que el sujeto se trata con la terapia de radiación o quimioterapia.

24. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 23, en el que el tratamiento reduce un efecto secundario de la terapia de radiación o la quimioterapia.

5 25. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 24, en el que el efecto secundario es mucositis y dermatitis.

26. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica se administra en combinación con una inmunoterapia.

27. El compuesto, la forma polimórfica, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 26, en el que la inmunoterapia es un anticuerpo frente al cáncer.

10 28. El compuesto según la reivindicación 1 ó 2 o la forma polimórfica según la reivindicación 3 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

15

20

25

30

35

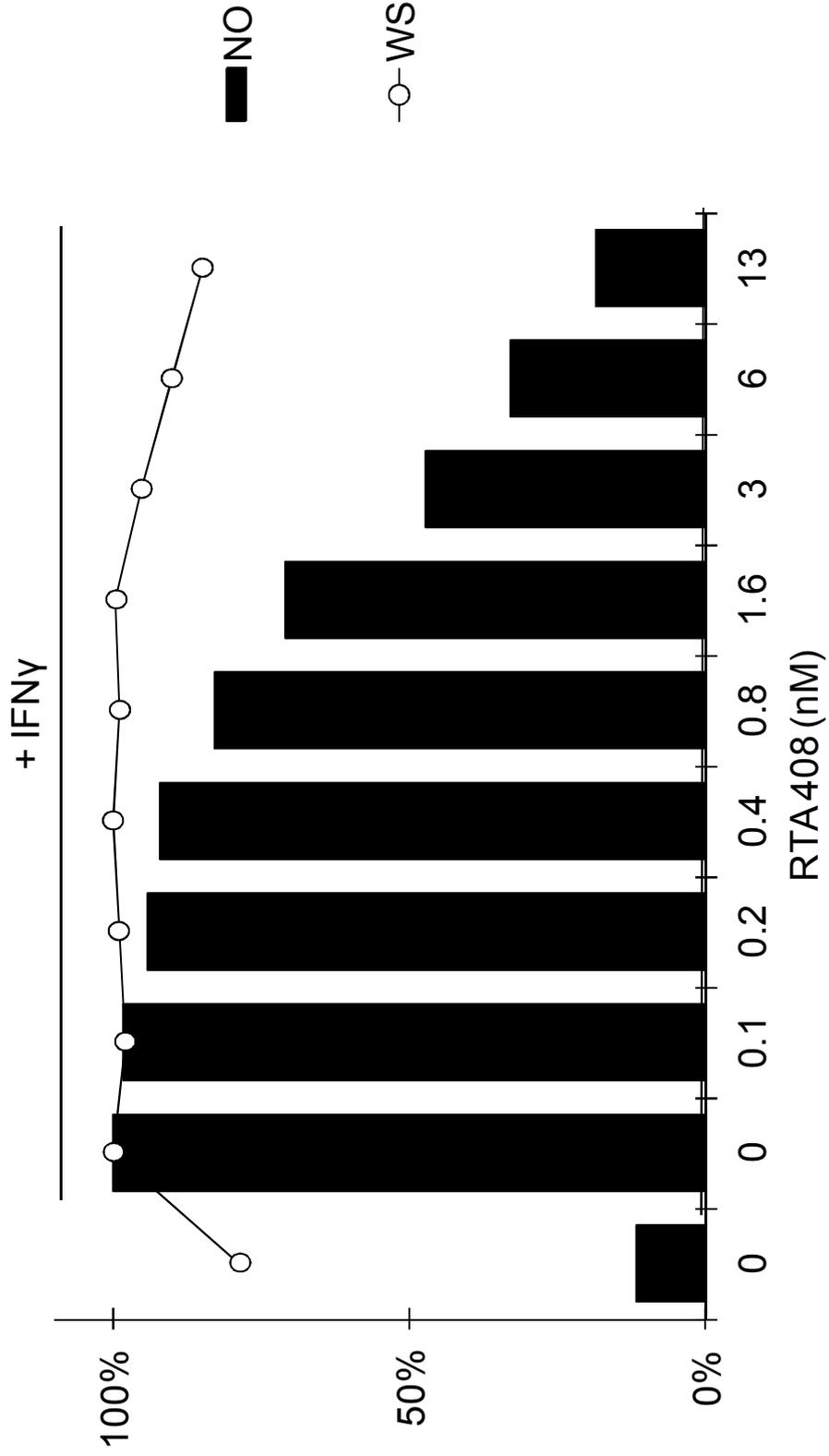
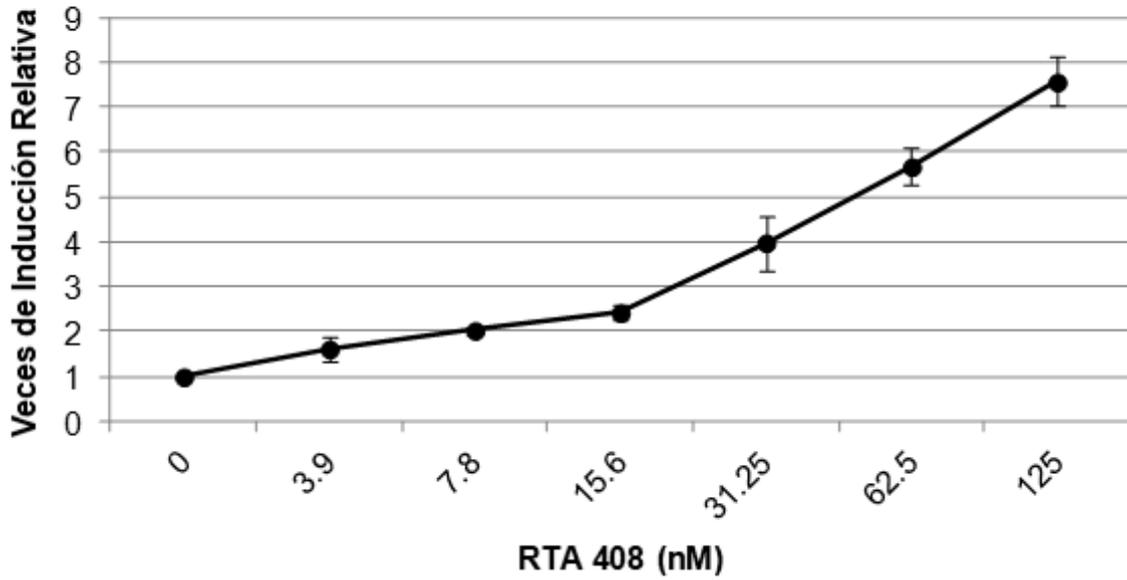


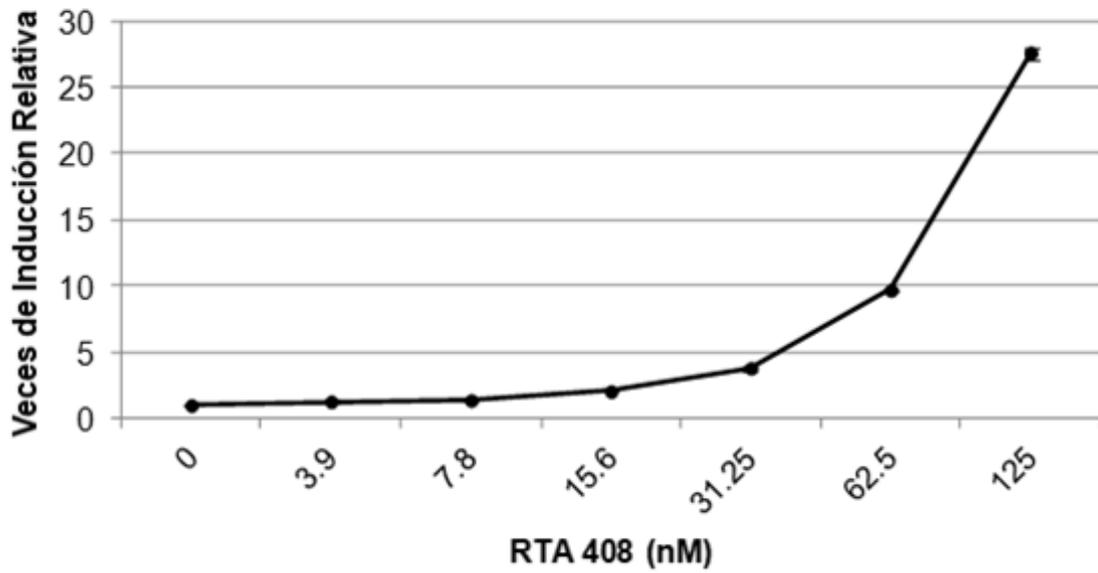
FIG. 1

Actividad de Luciferasa NQO1-ARE



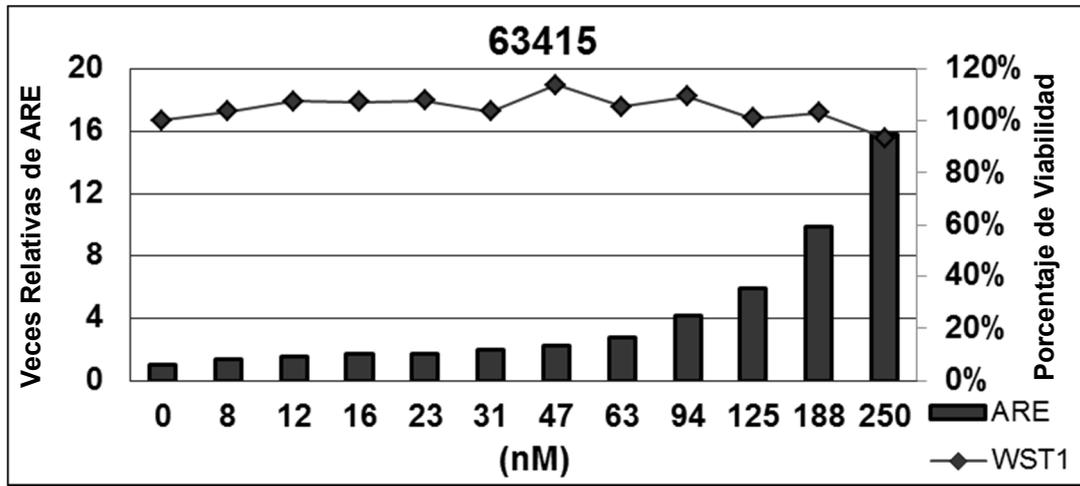
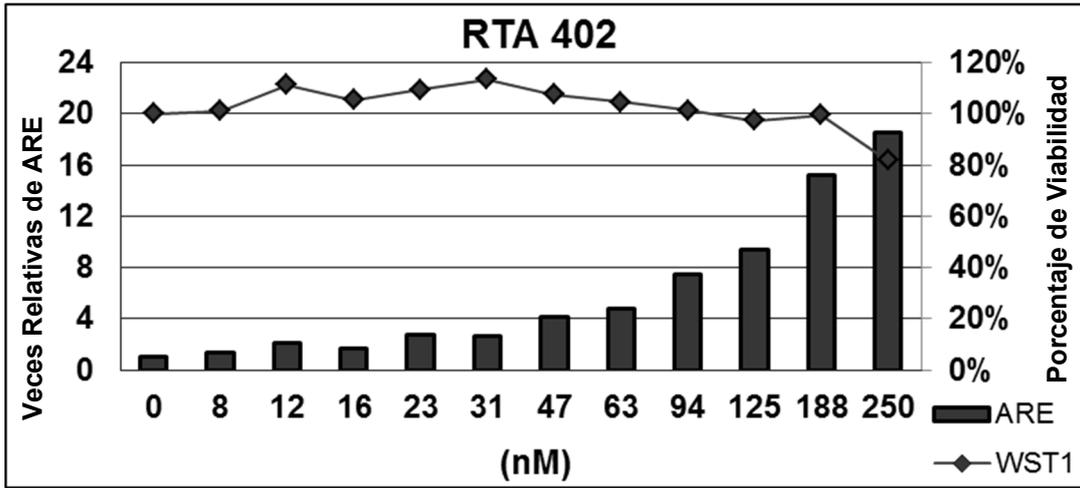
(a)

Actividad de Luciferasa GSTA2-ARE

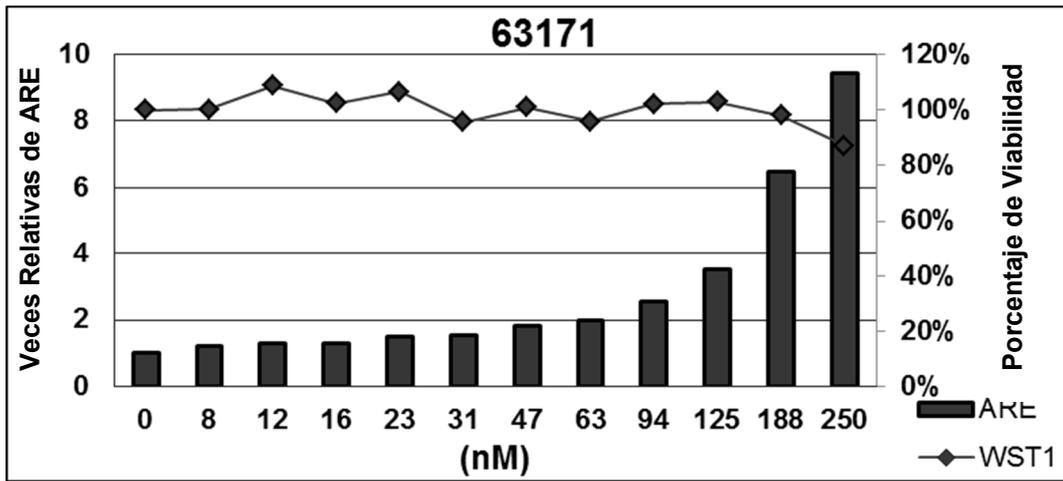
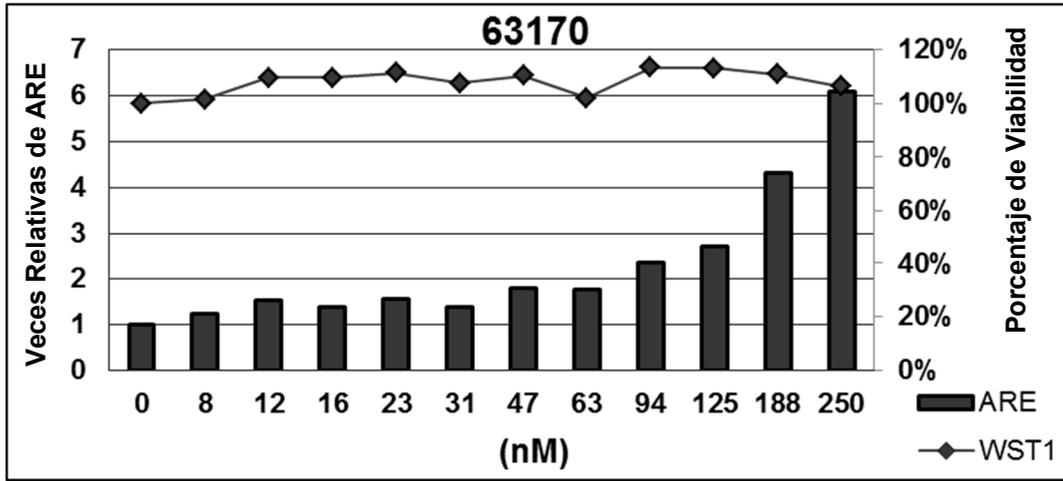


(b)

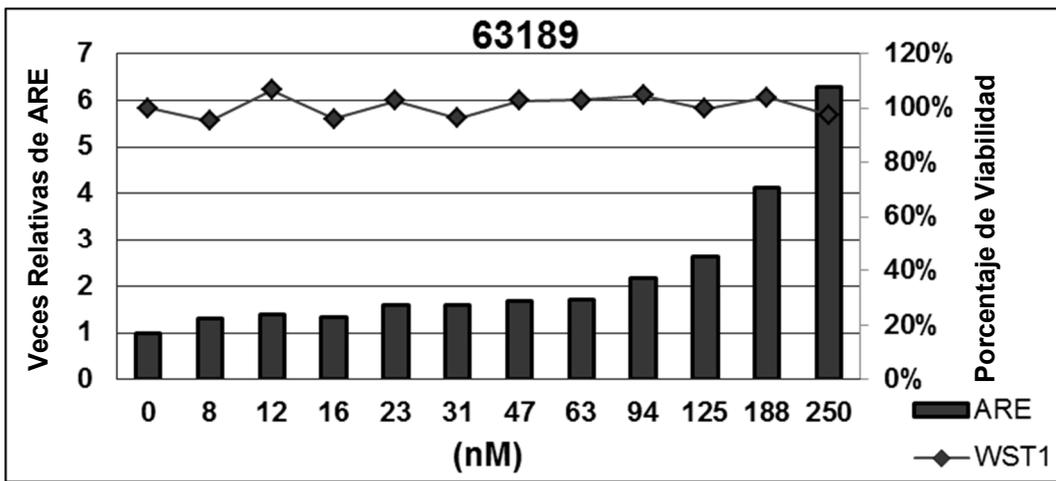
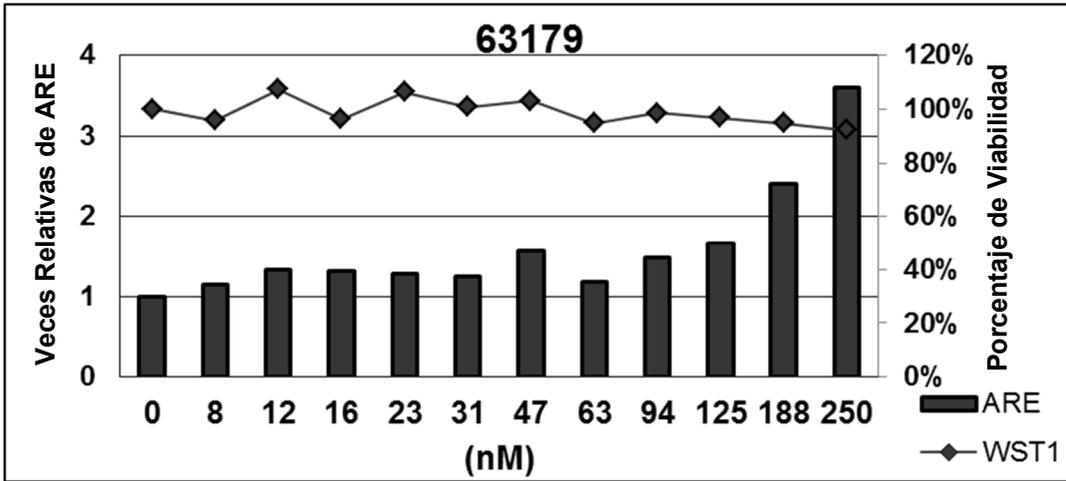
FIGS. 2a y b



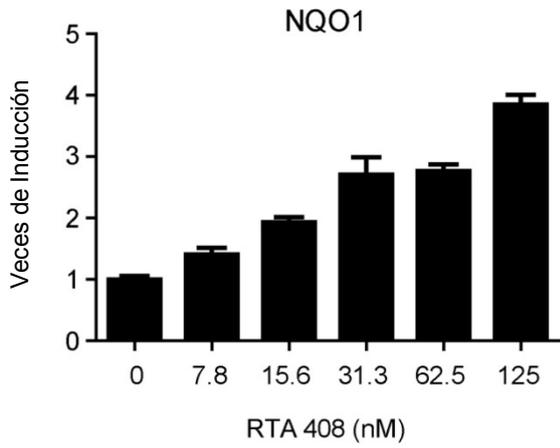
FIGS. 3a y b



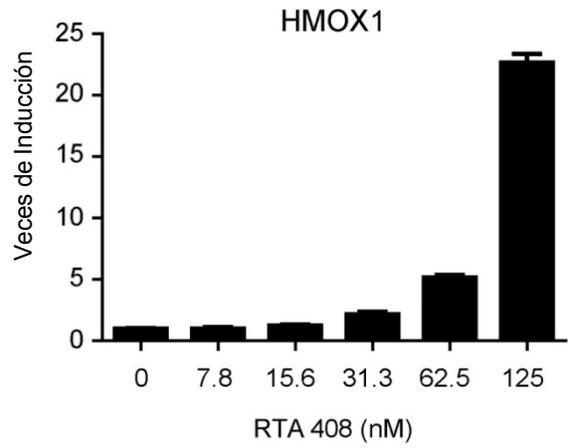
FIGS. 3c y d



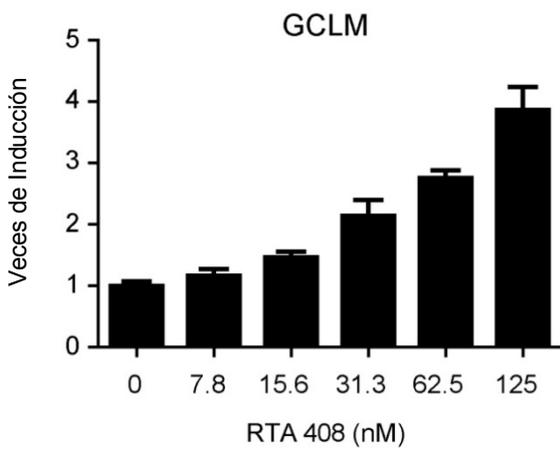
FIGS. 3e y f



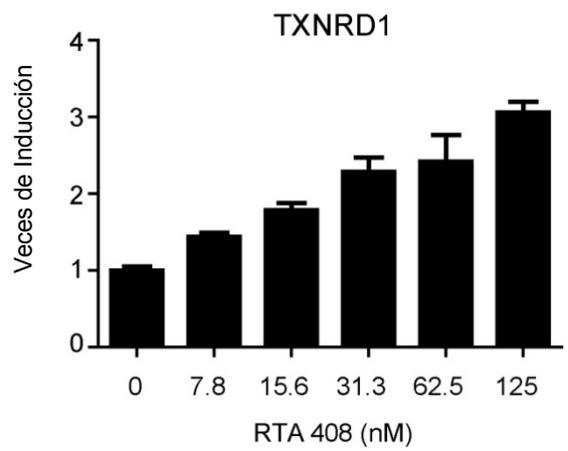
(a)



(b)

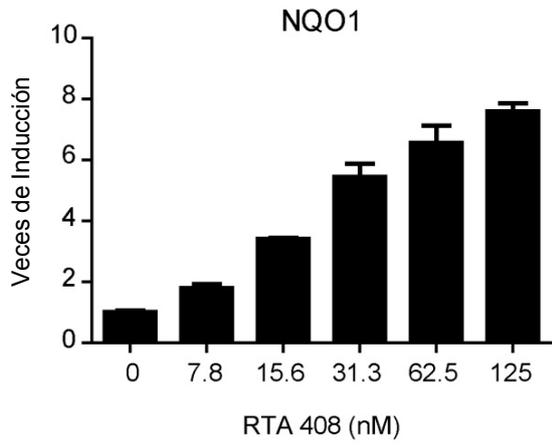


(c)

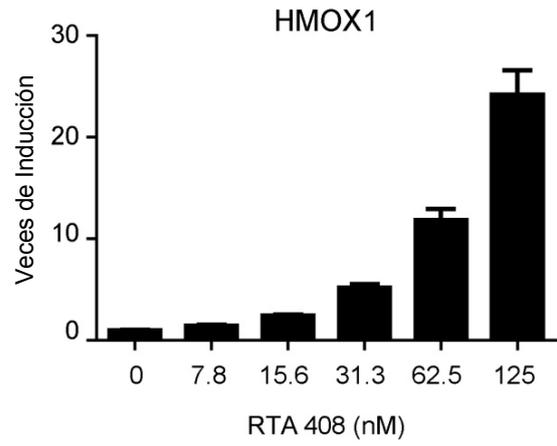


(d)

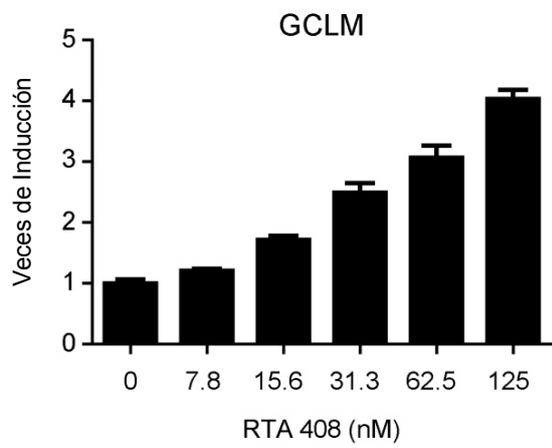
FIGS. 4a – d



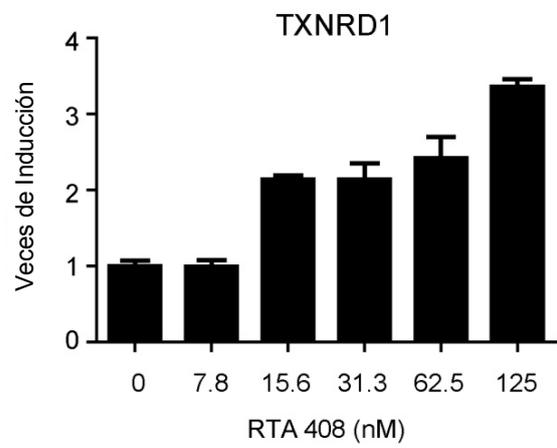
(a)



(b)

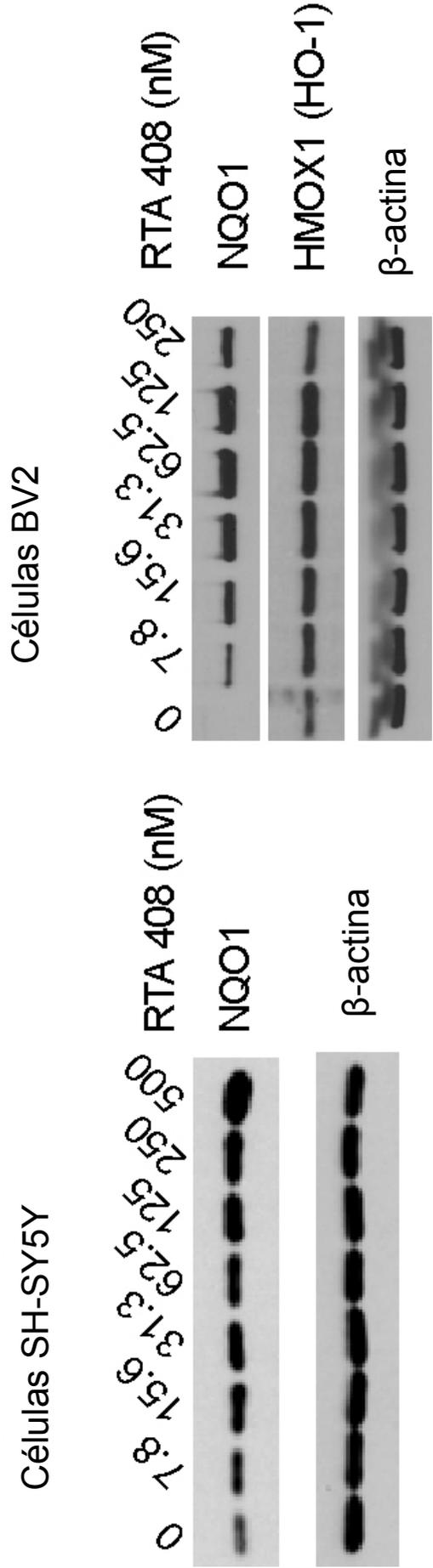


(c)



(d)

FIGS. 5a – d



(b)

FIGS. 6a y b

(a)

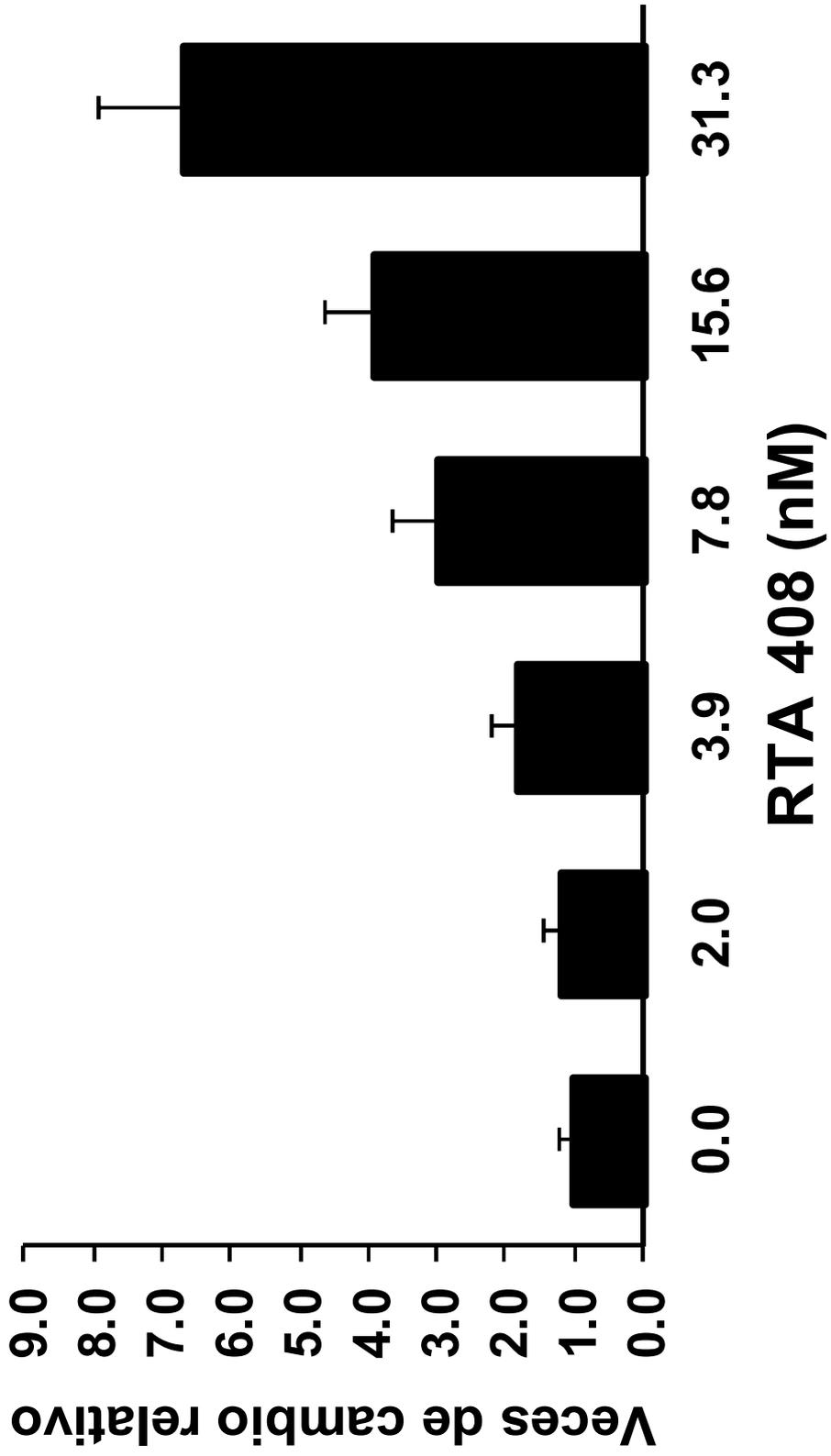


FIG. 7

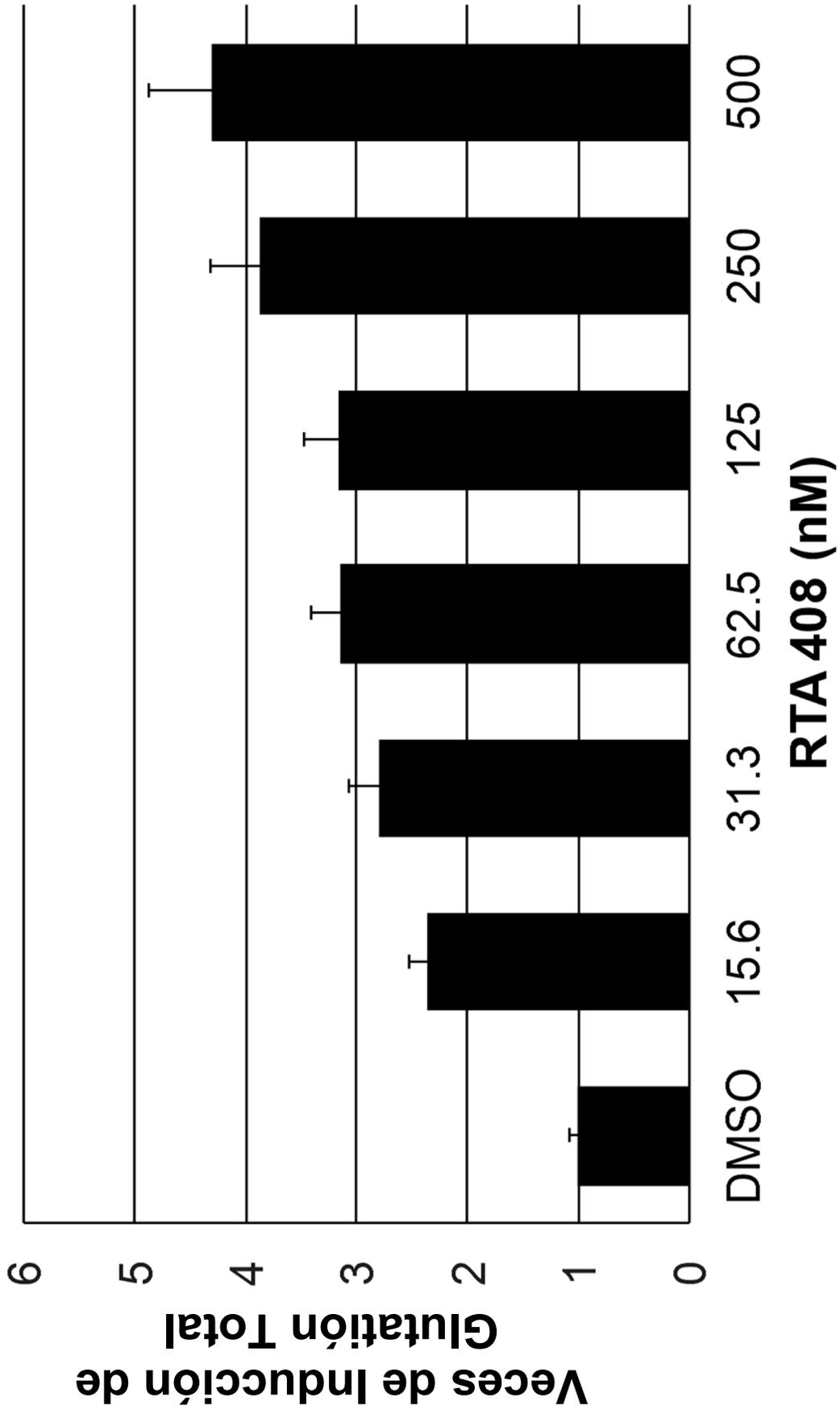


FIG. 8

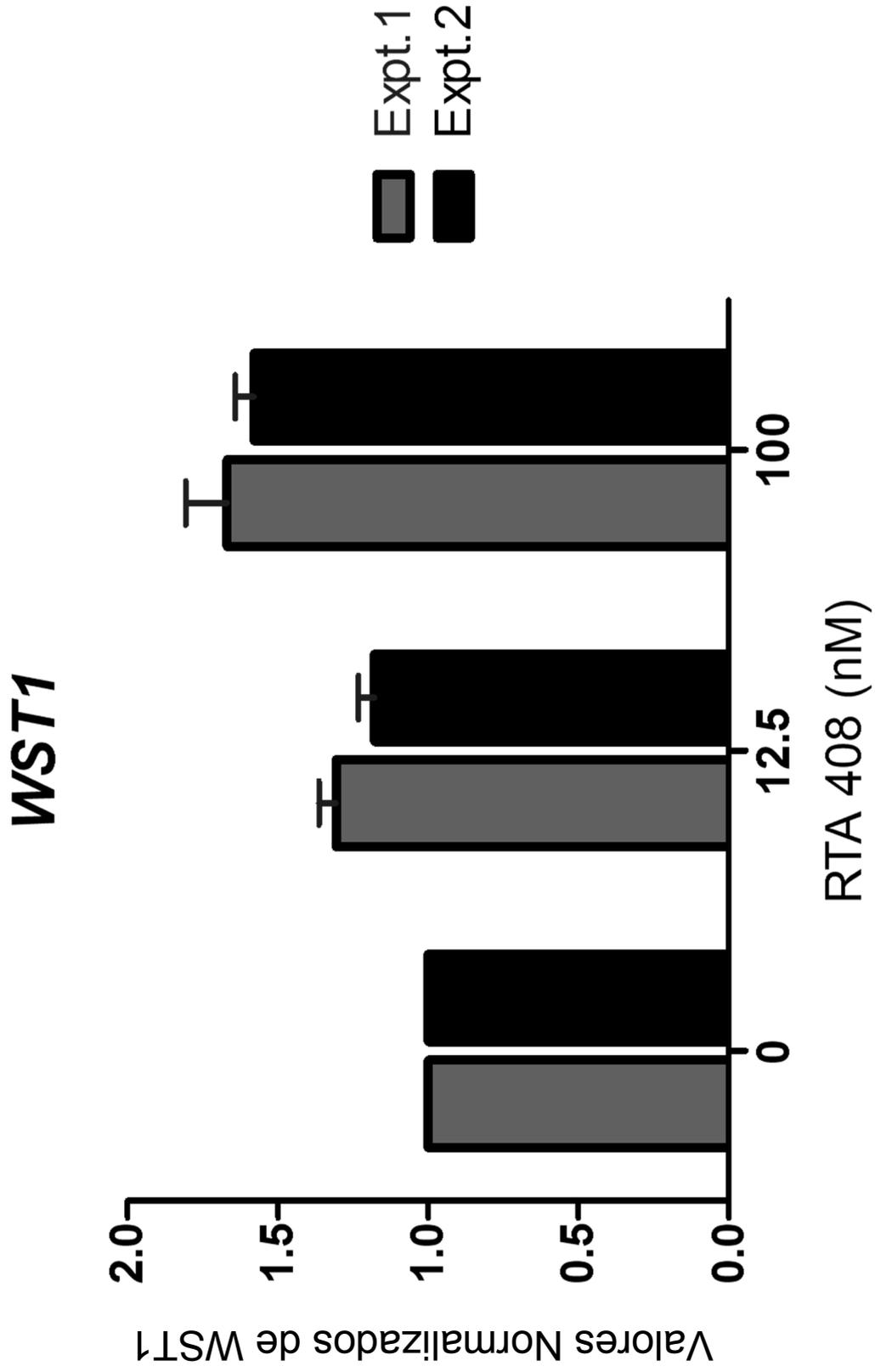
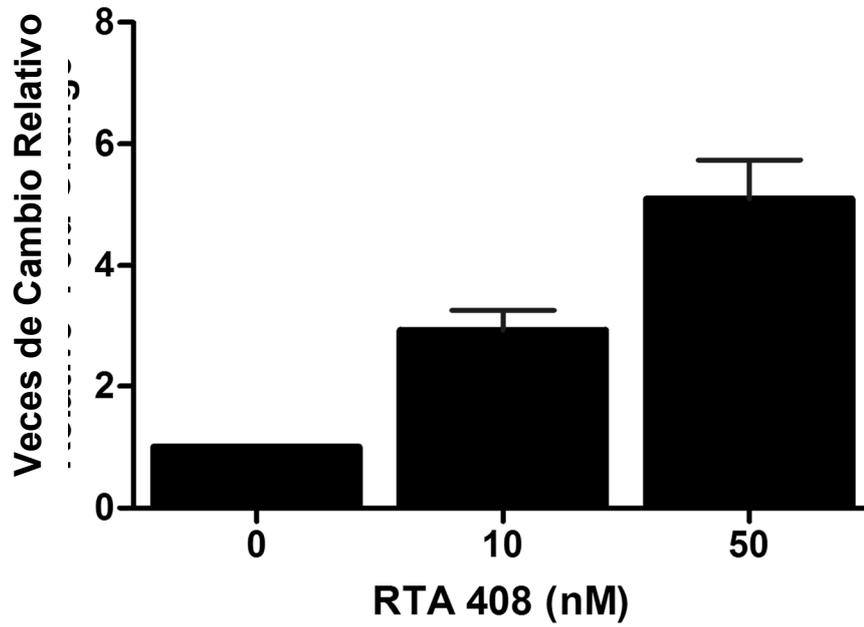


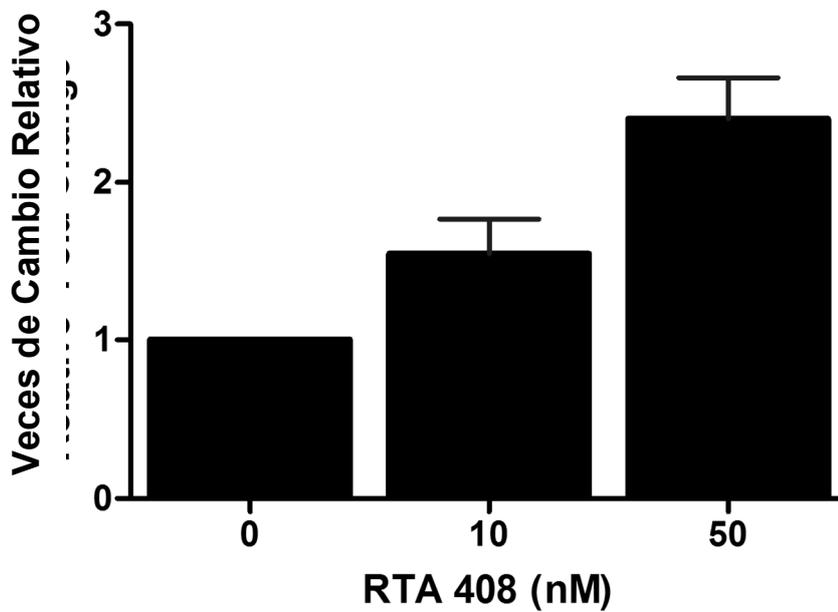
FIG. 9

H6PD



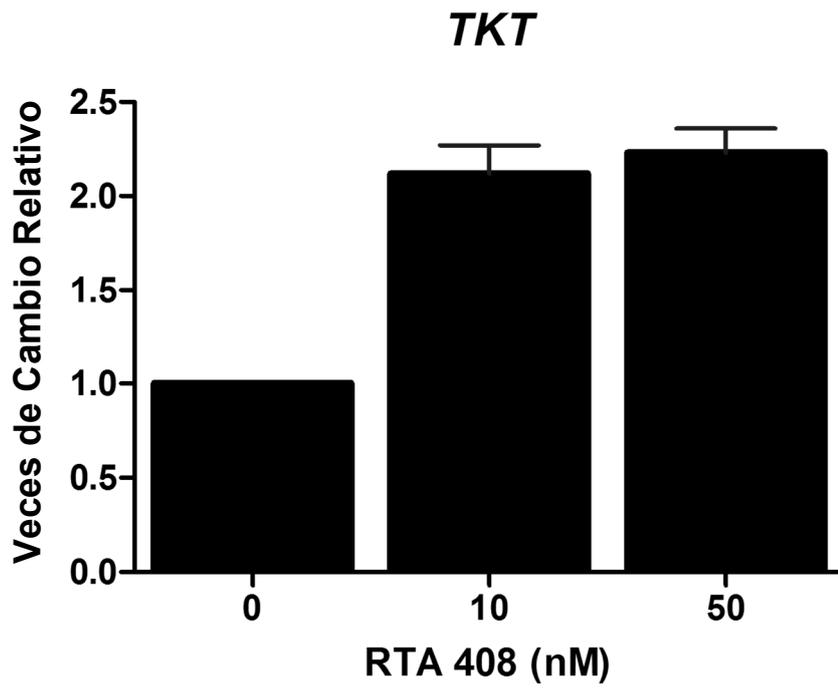
(a)

PGD

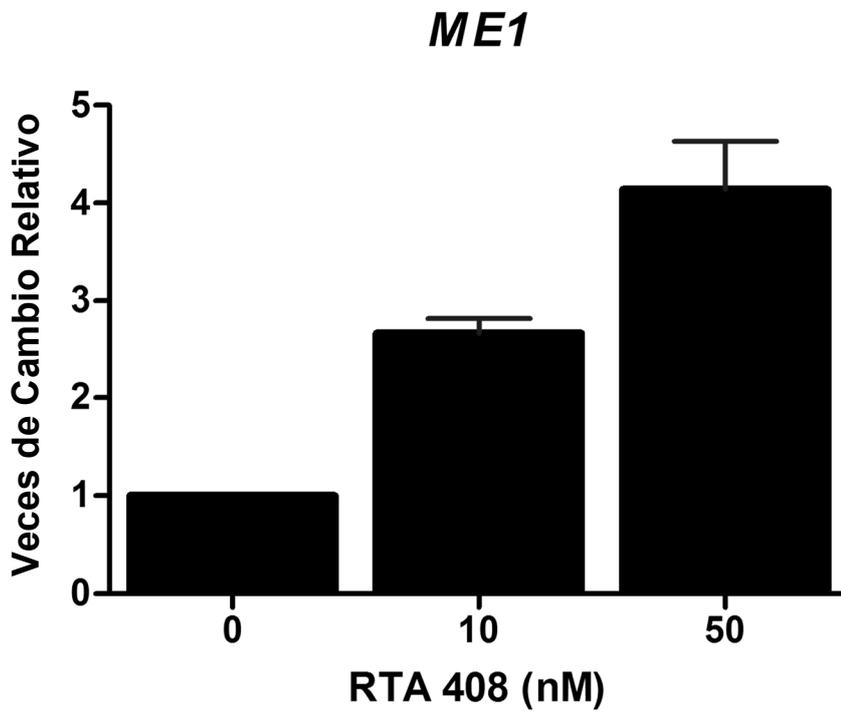


(b)

FIGS. 10a y b

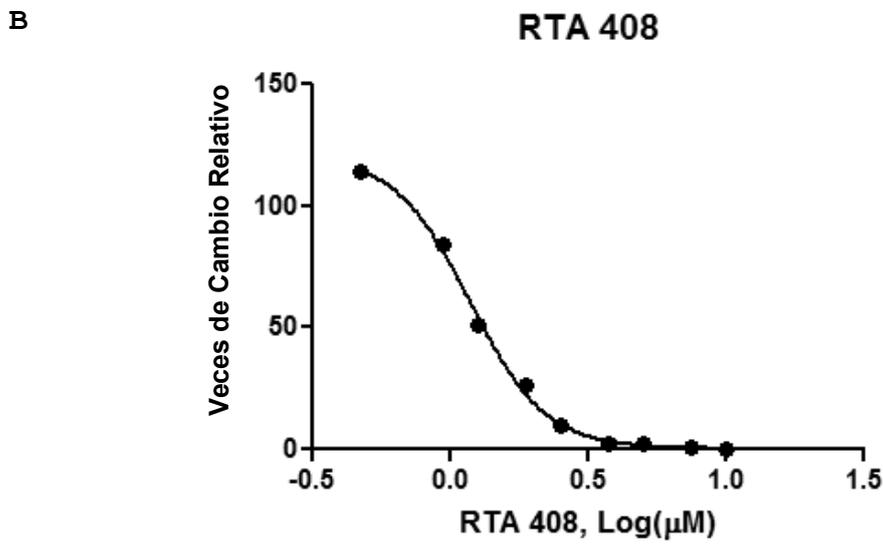
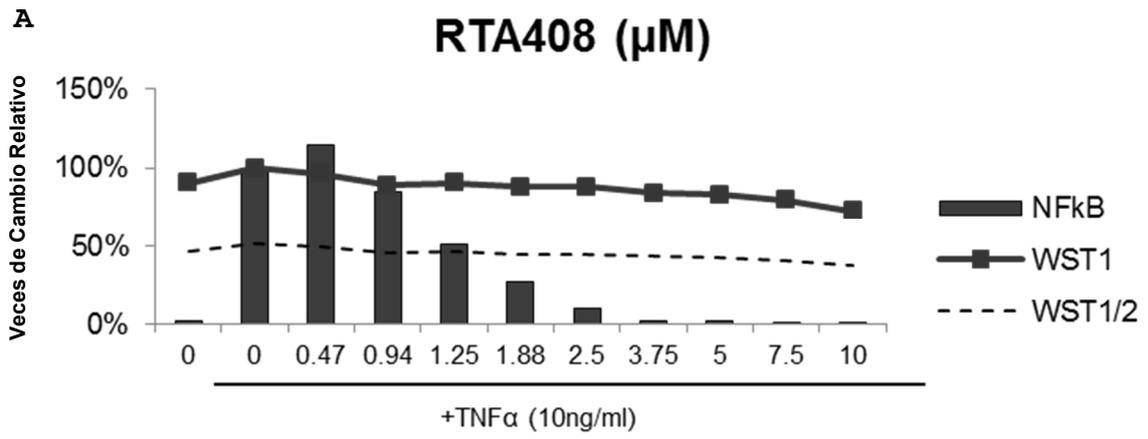


(c)



(d)

FIGS. 10c y d



FIGS. 11a y b

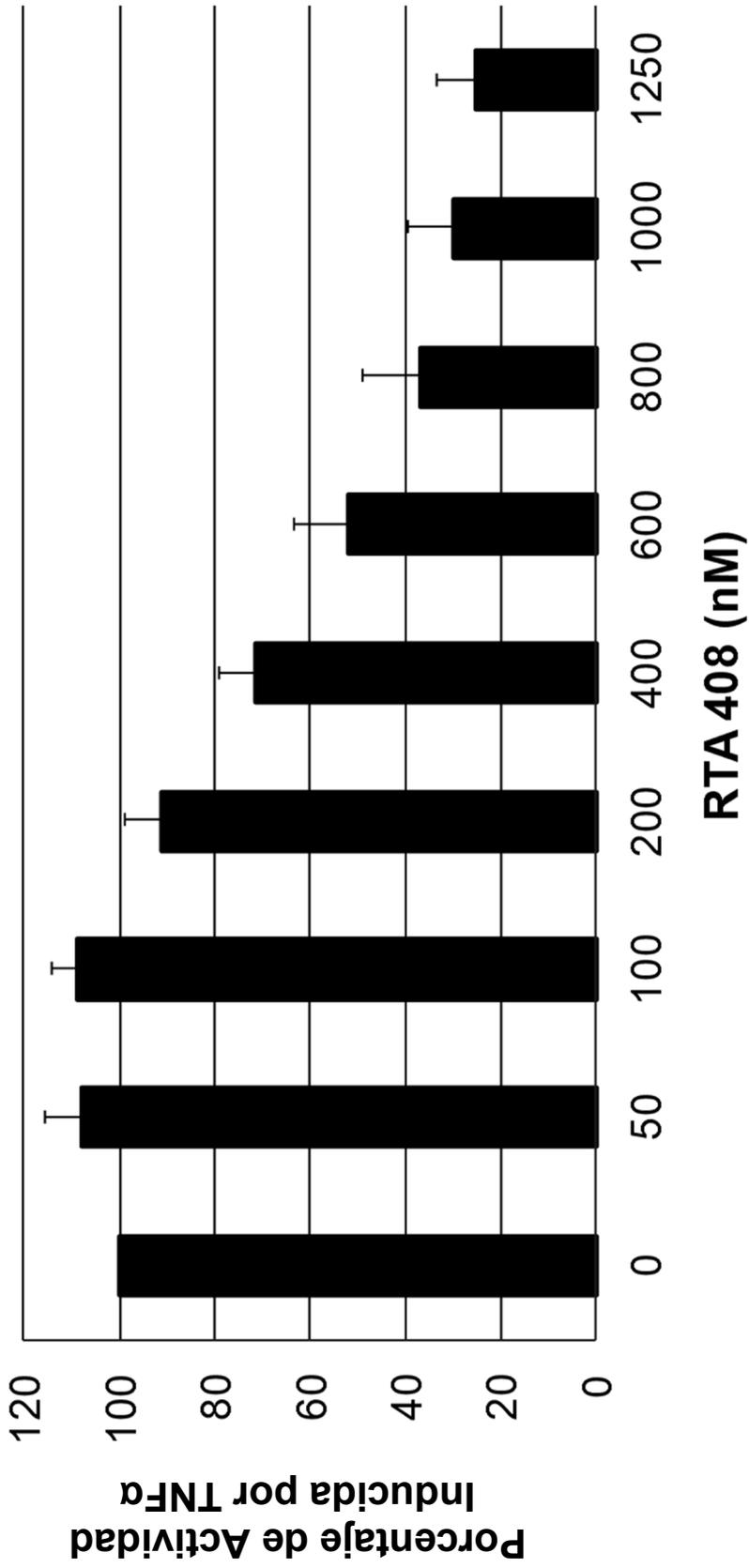
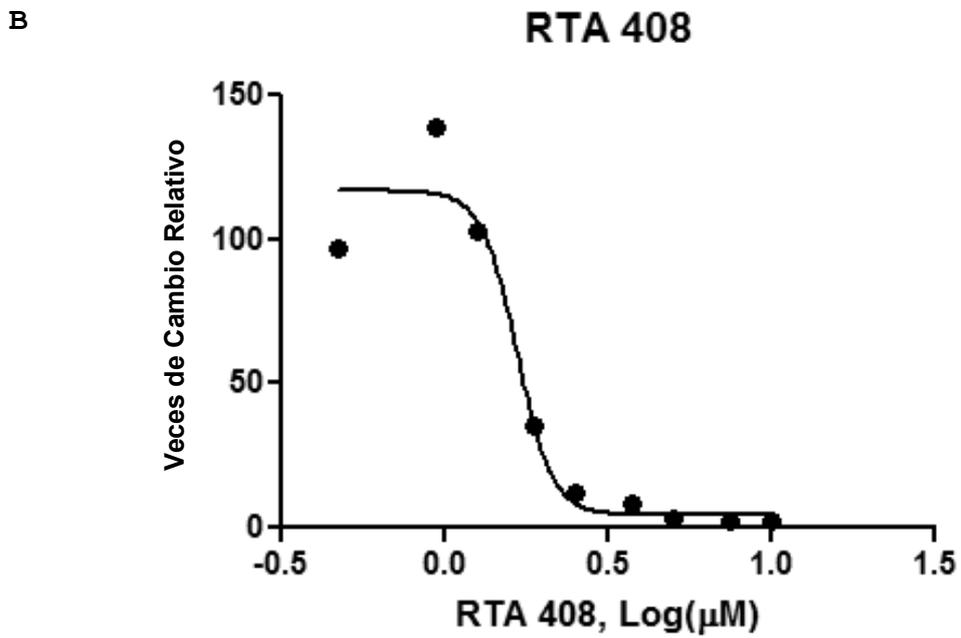
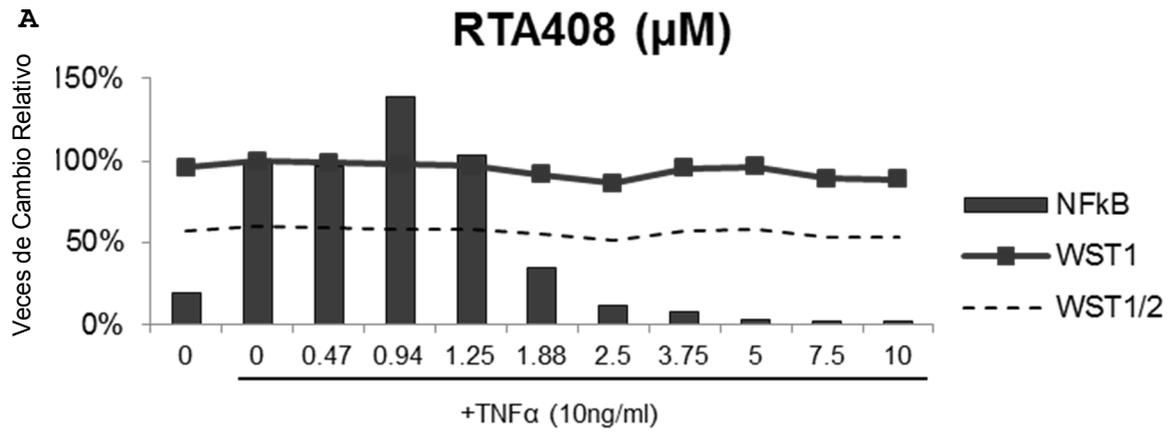


FIG. 12



FIGS. 13a y b

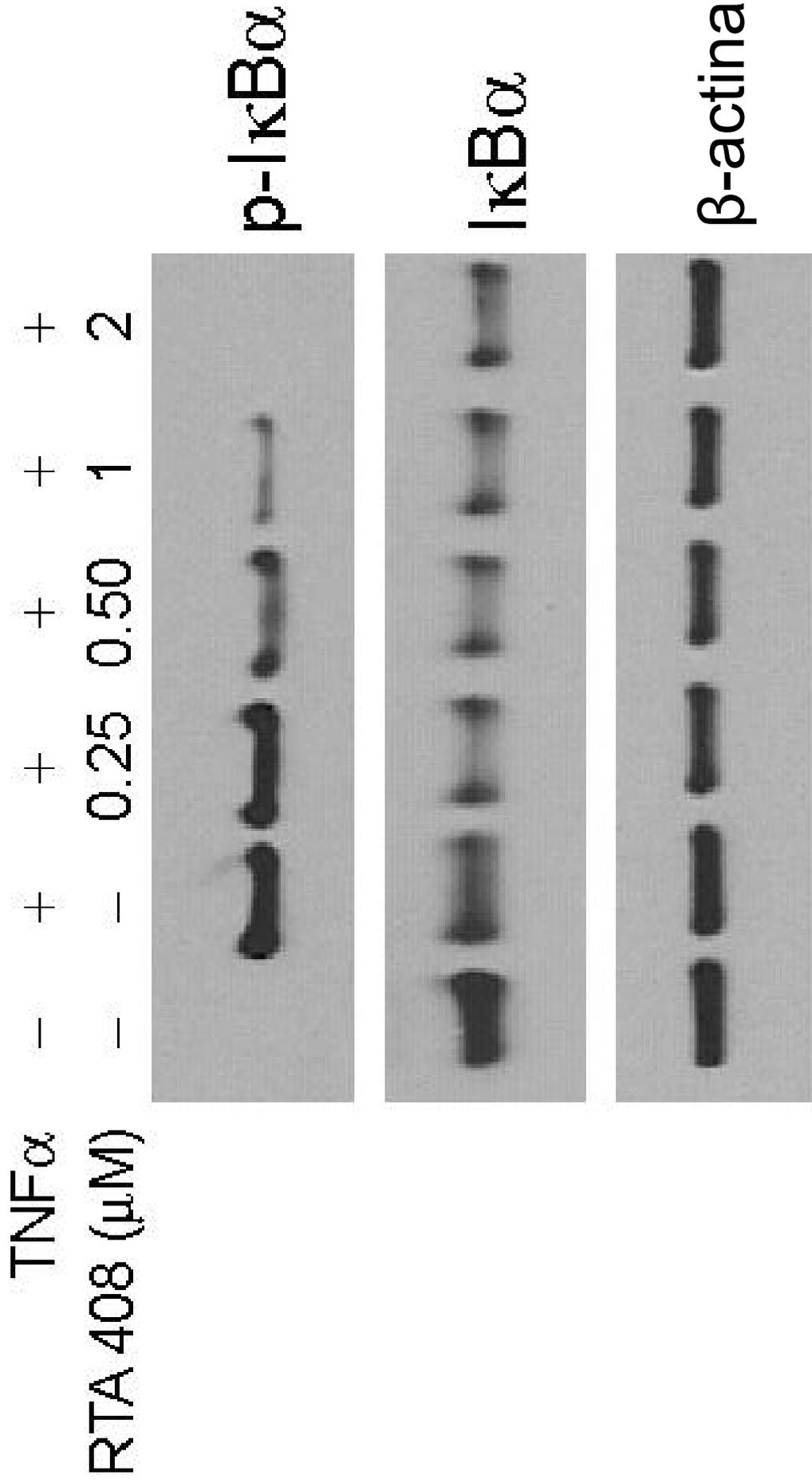
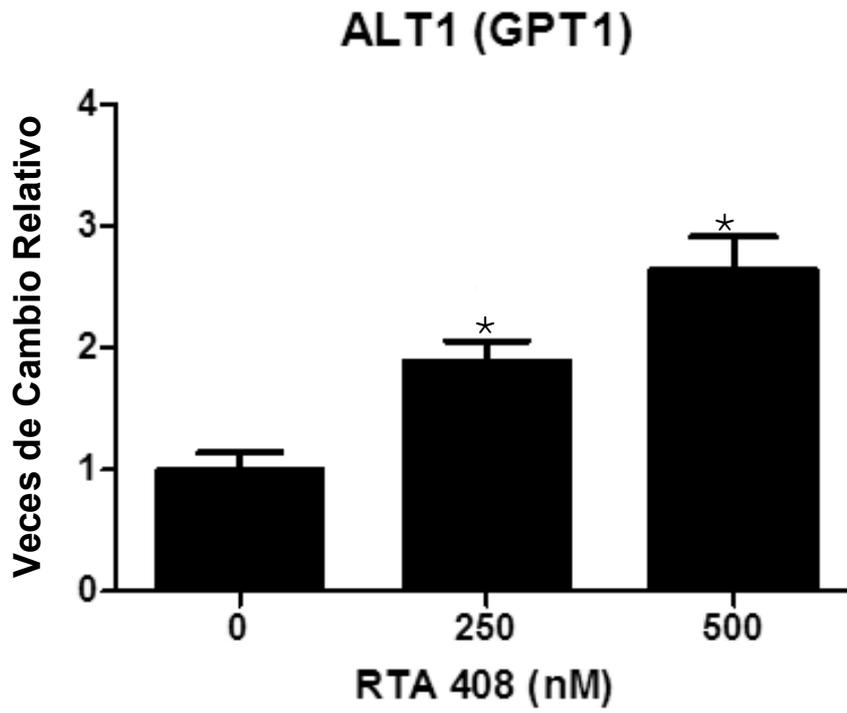
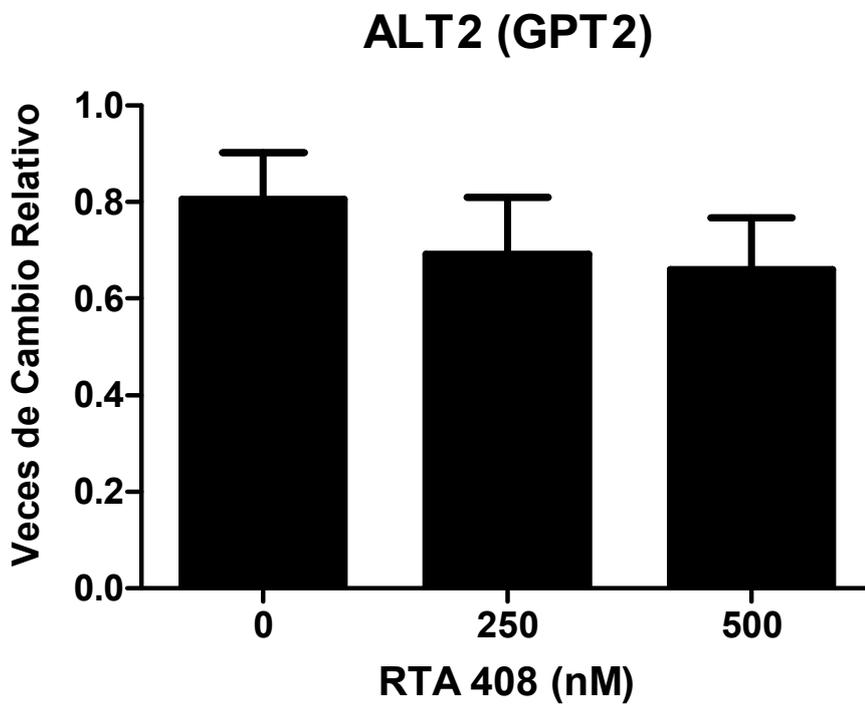


FIG. 14

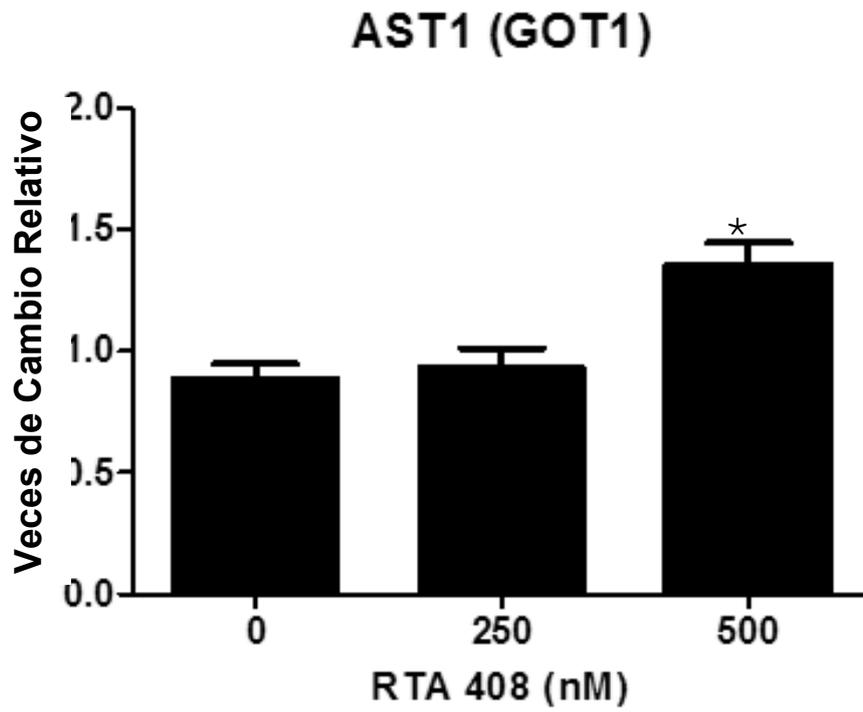


(a)

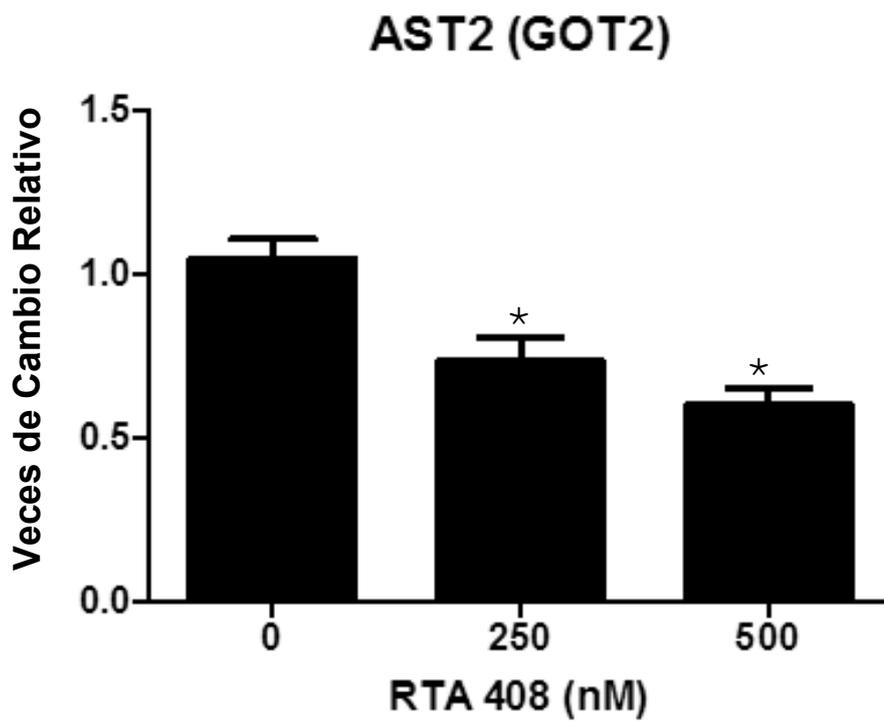


(b)

FIGS. 15a y b

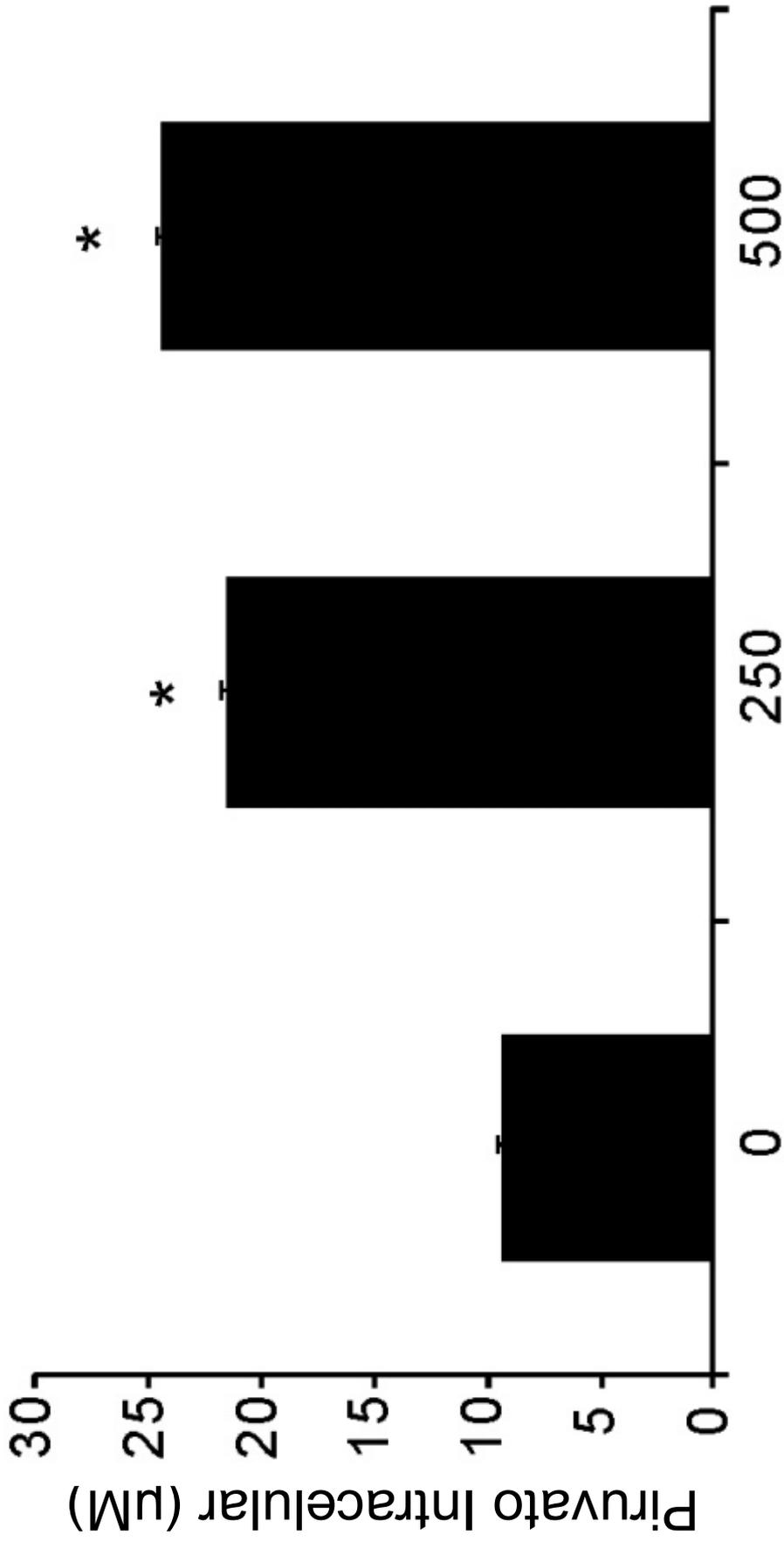


(c)



(d)

FIGS. 15c y d



RTA 408 (nM)

FIG. 16

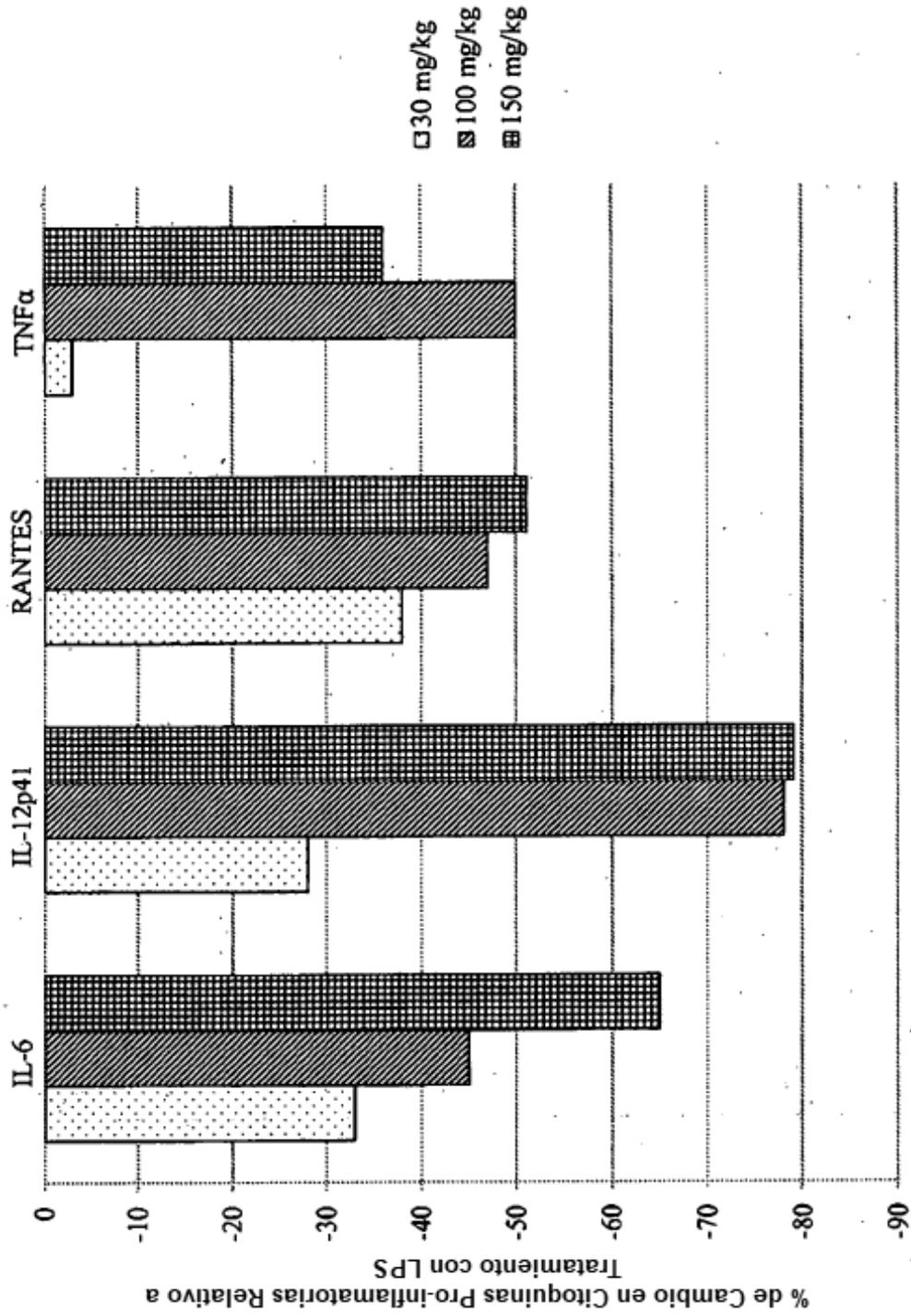
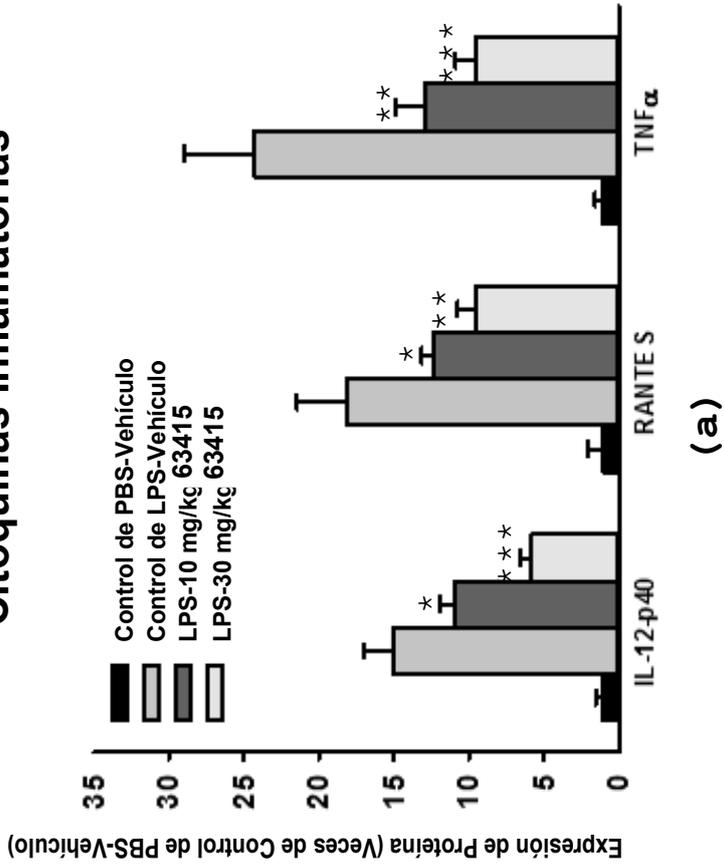
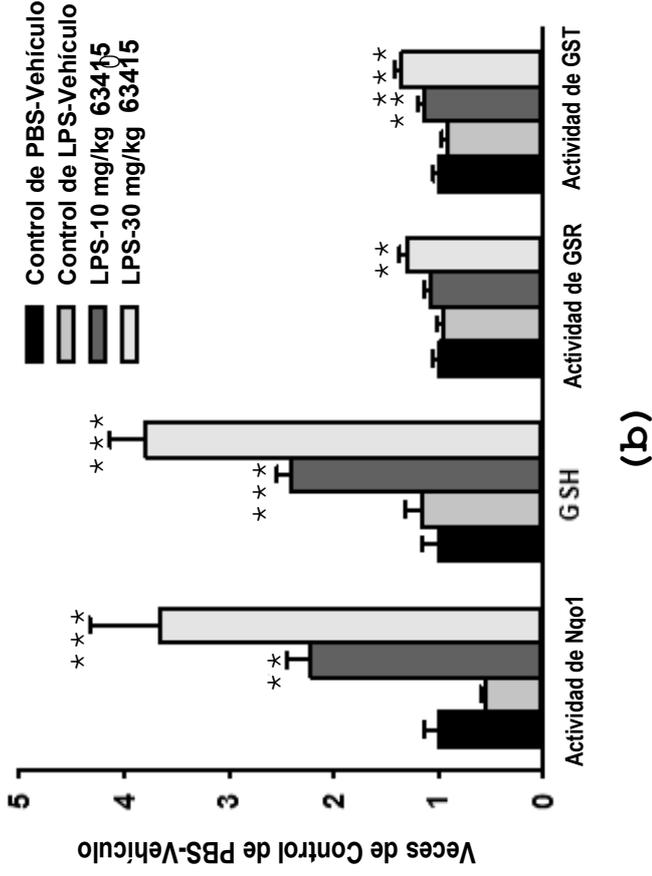


FIG. 17

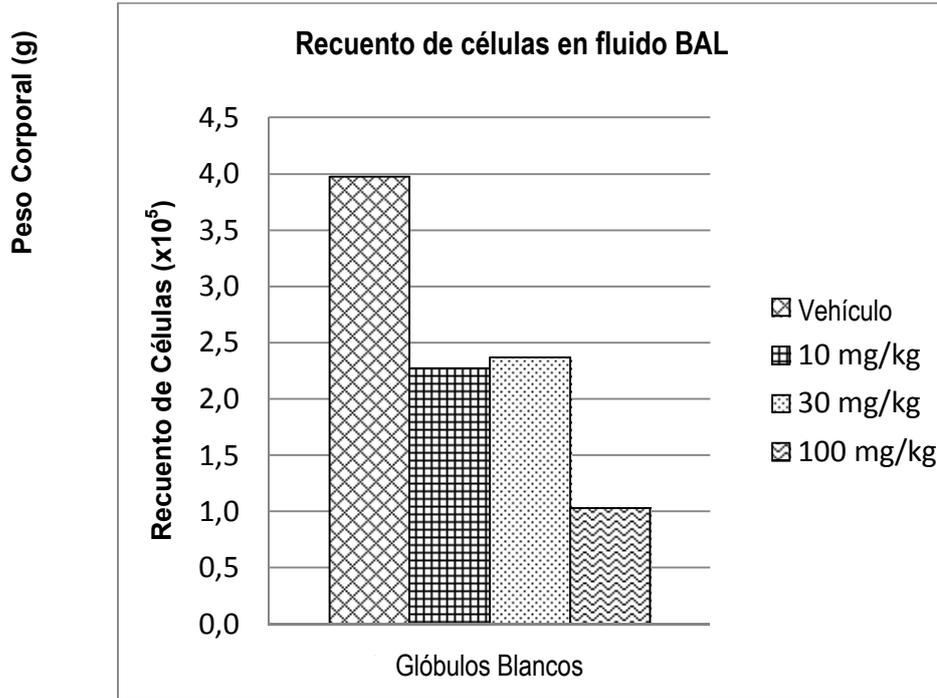
Citoquinas Inflamatorias



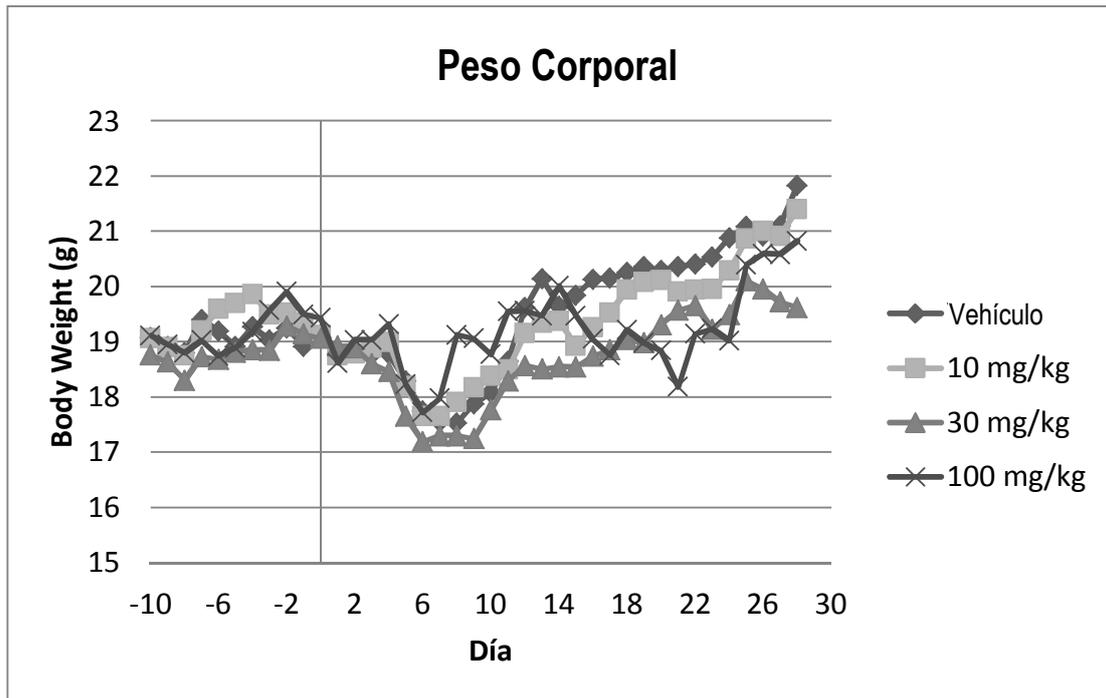
Dianas de Nrf2



FIGS. 18a y b

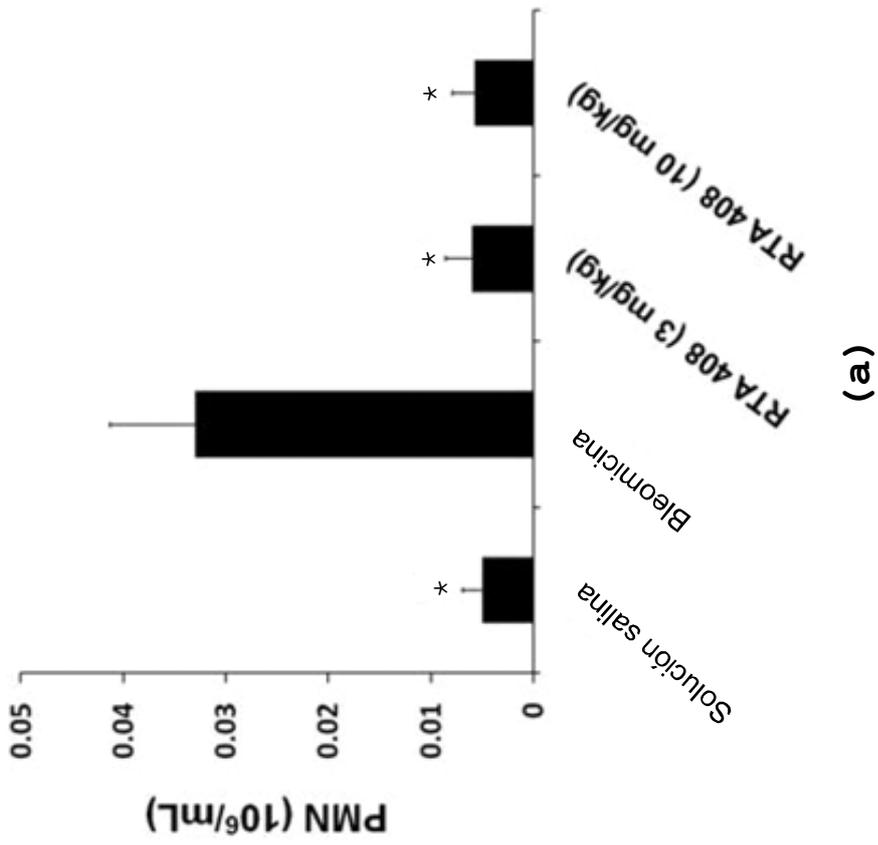
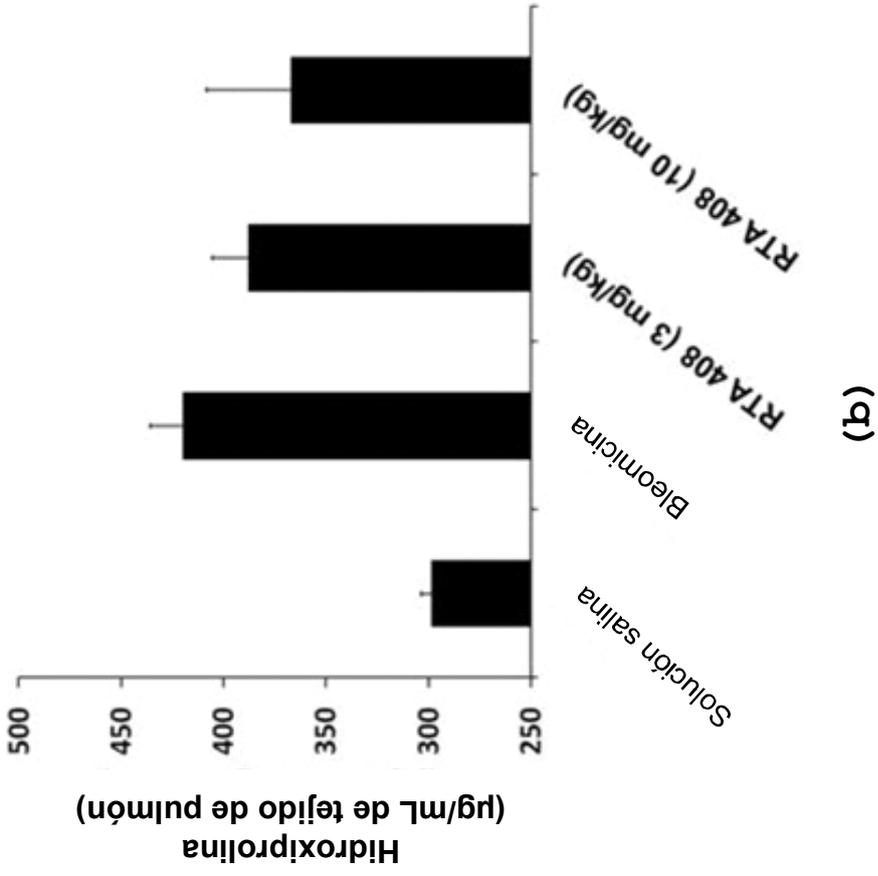


(a)



(b)

FIGS. 19a y b



FIGS. 20a y b

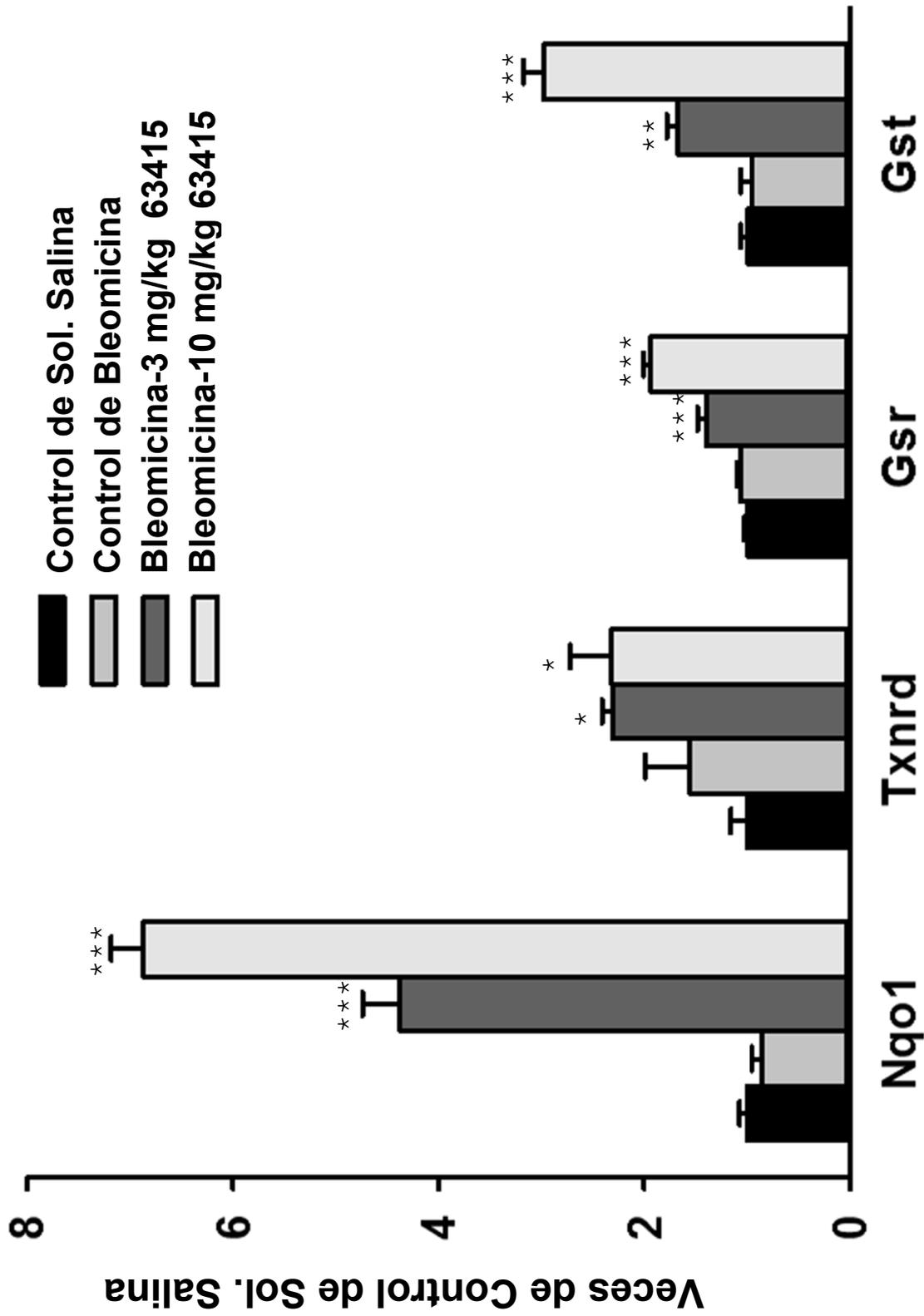
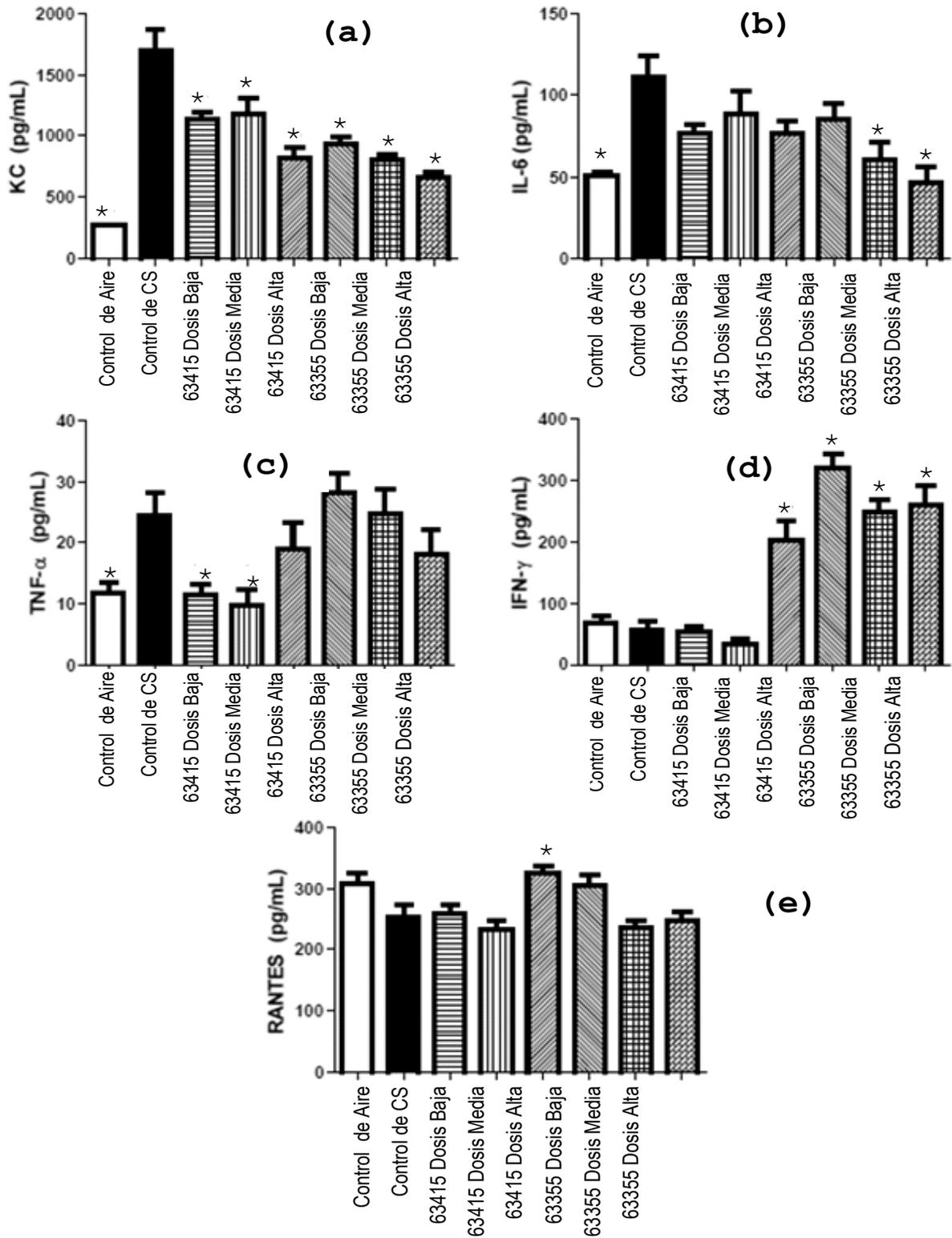


FIG. 21



FIGS. 22a – e

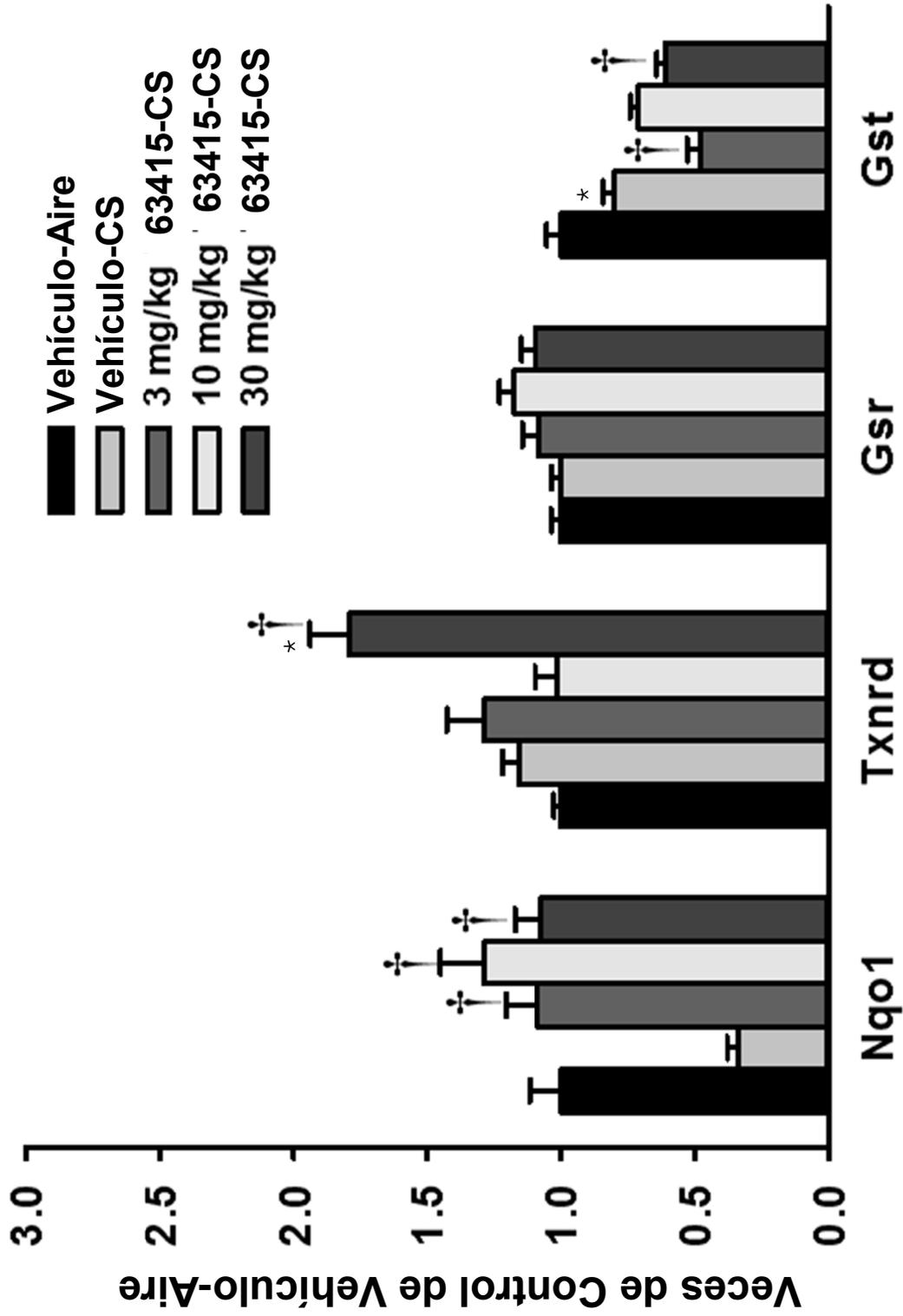
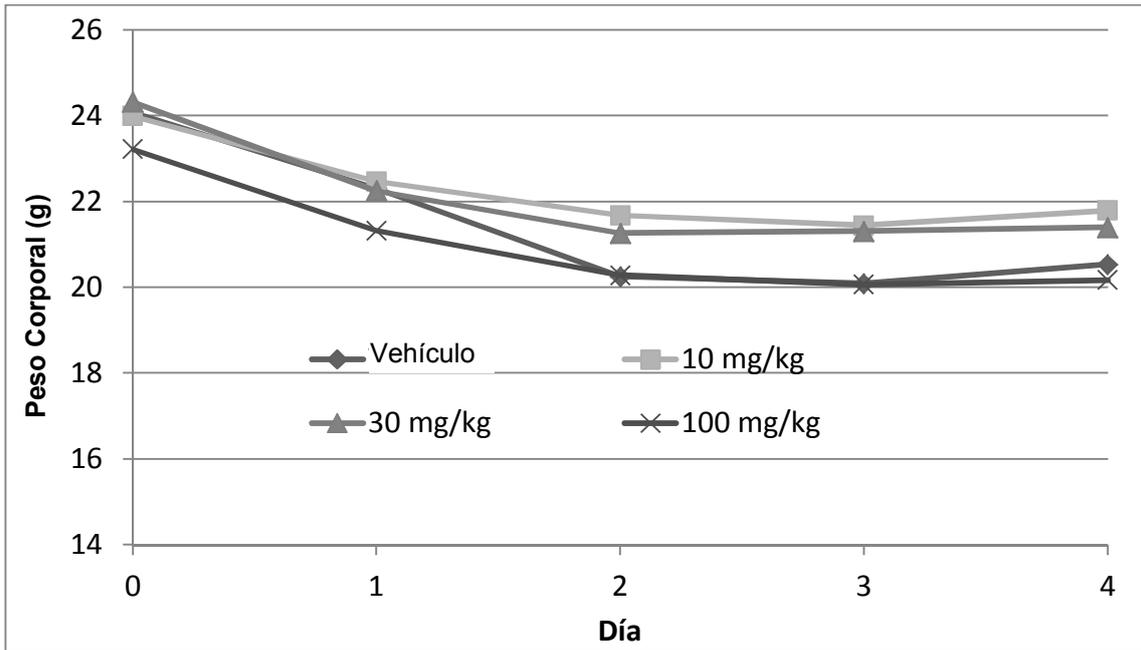


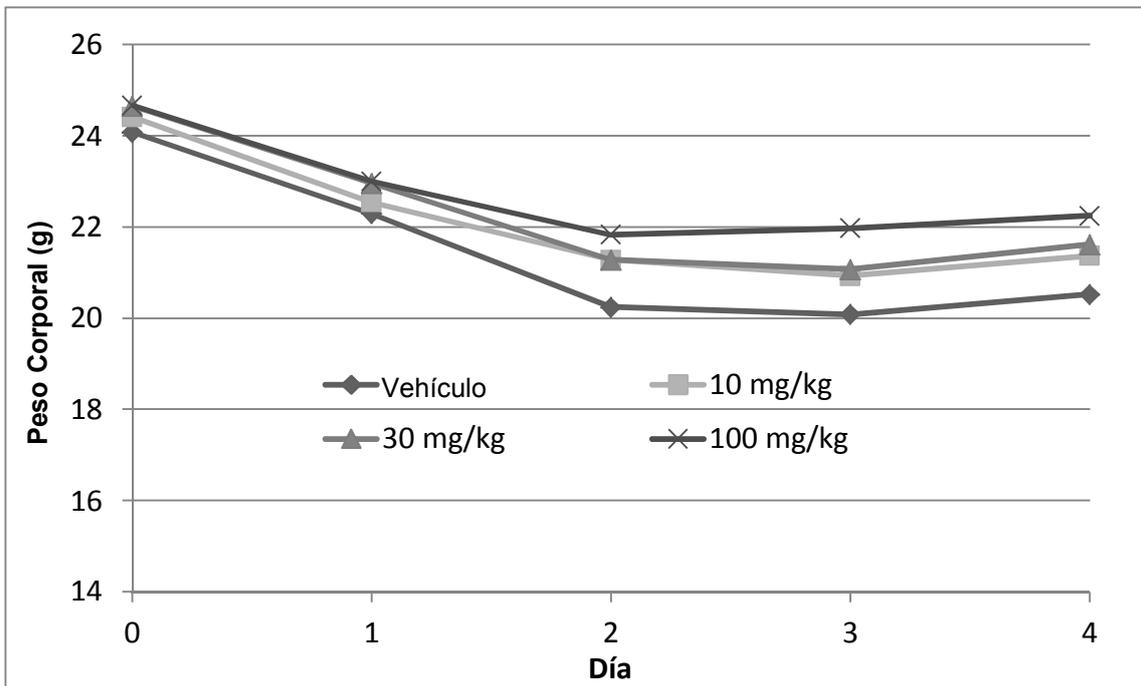
FIG. 23

LPS Sistémico: Peso corporal: 63415



(a)

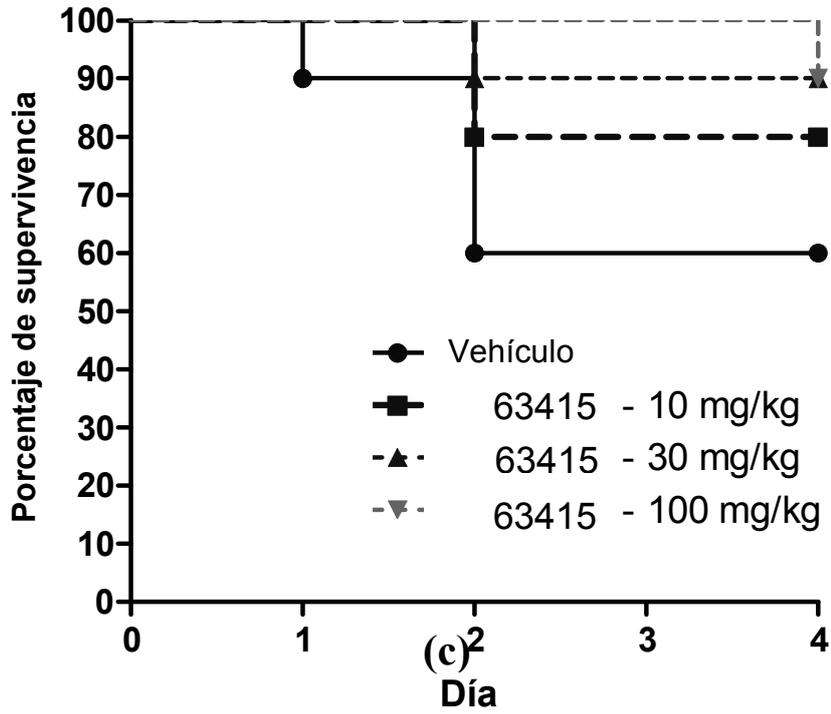
LPS Sistémico: Peso corporal: RTA 405



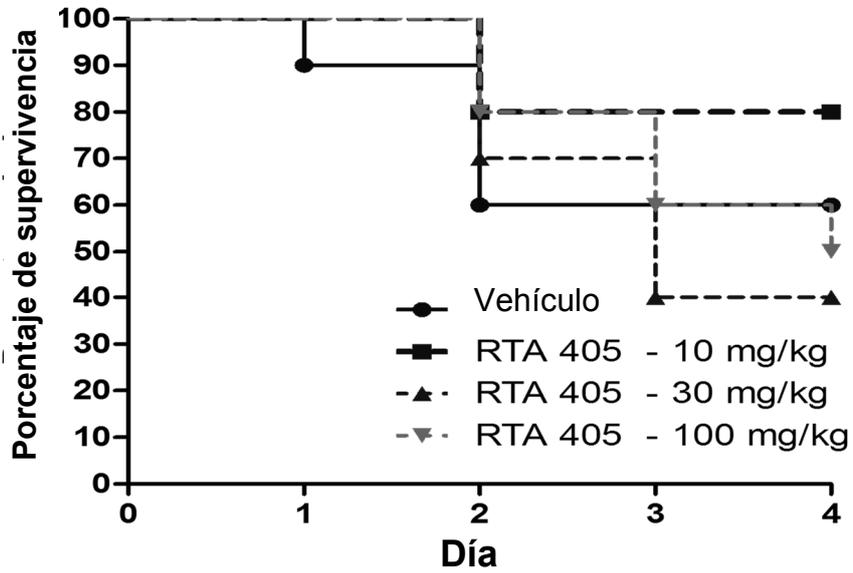
(b)

FIGS. 24a y b

LPS Sistémico: % de supervivencia: 63415



LPS Sistémico: % de supervivencia: RTA 405



(d)

FIGS. 24c y d

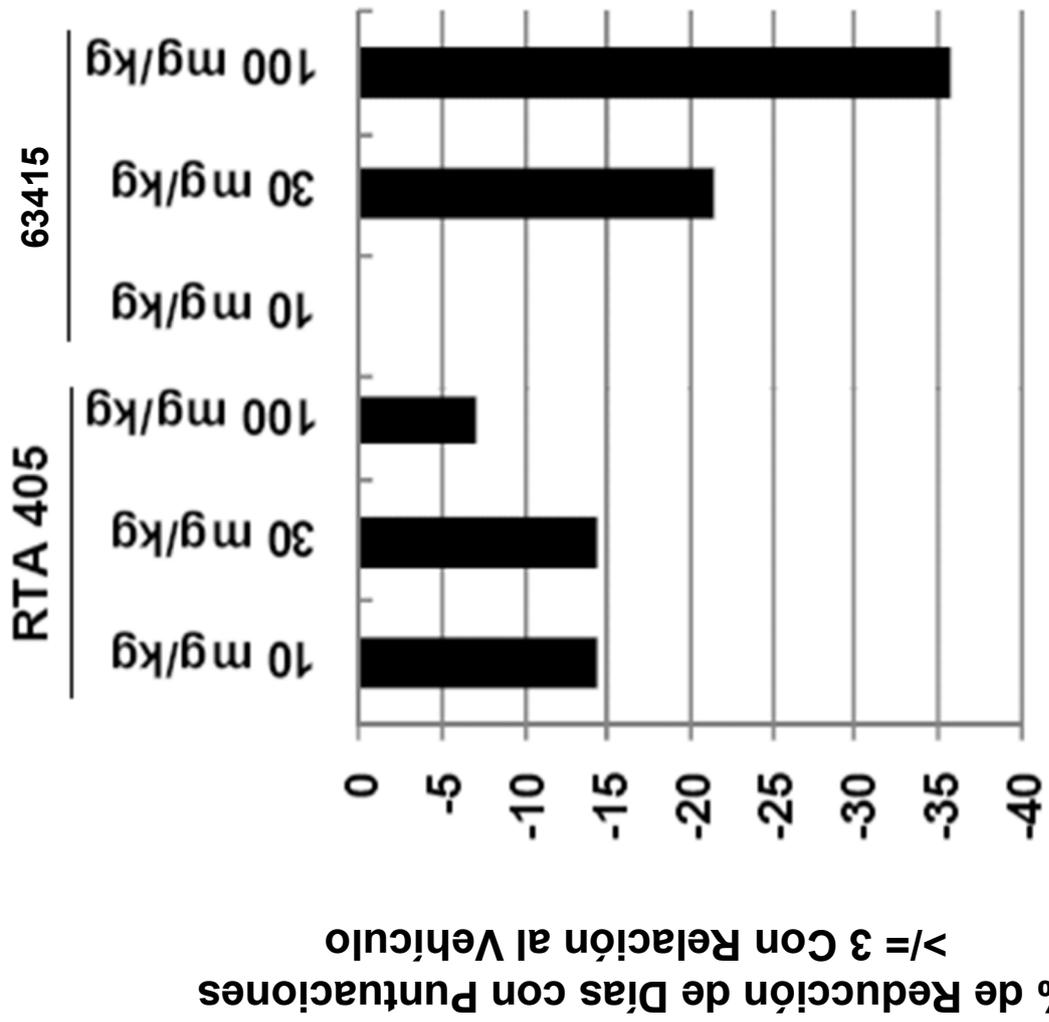


FIG. 25

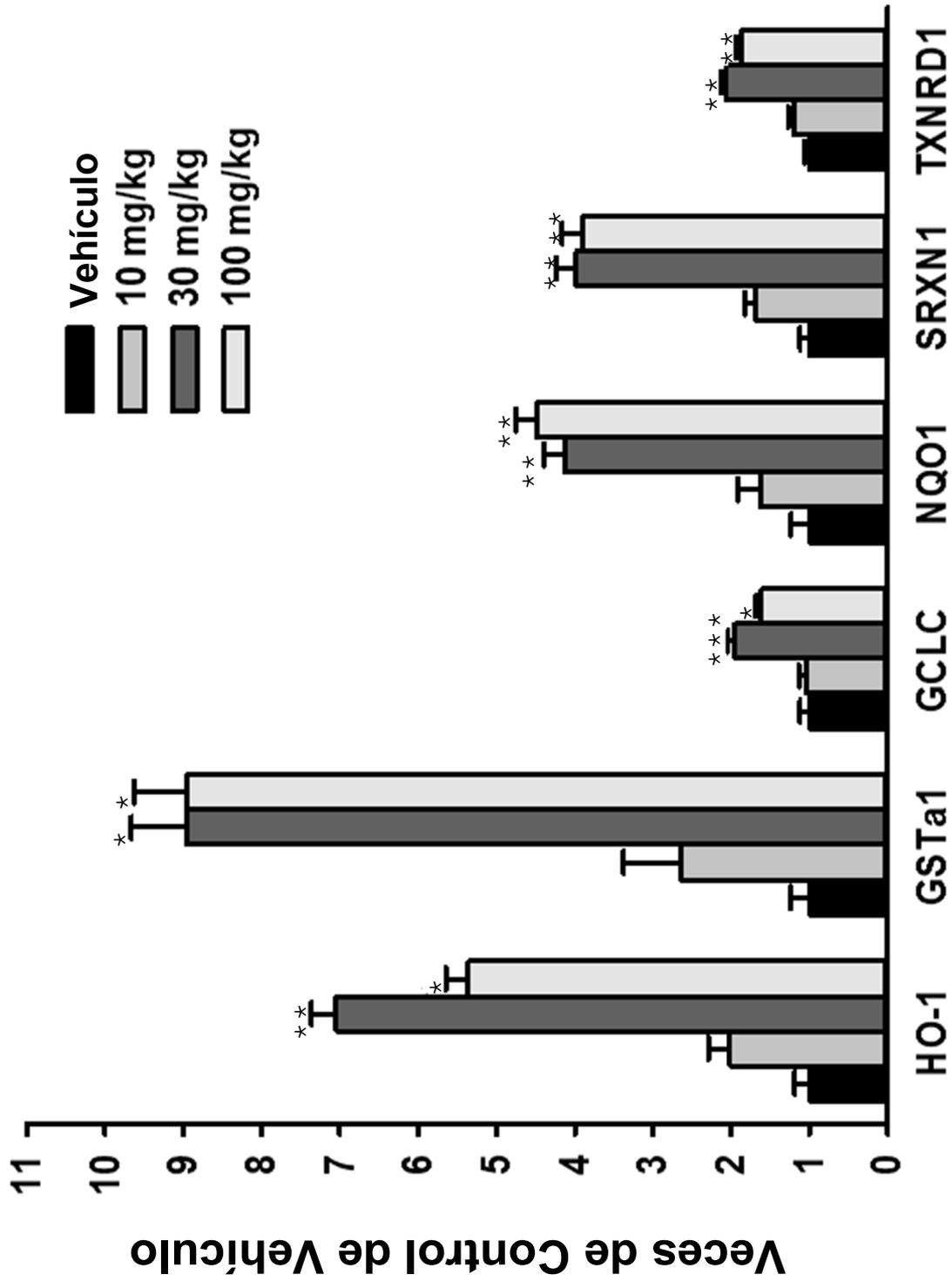
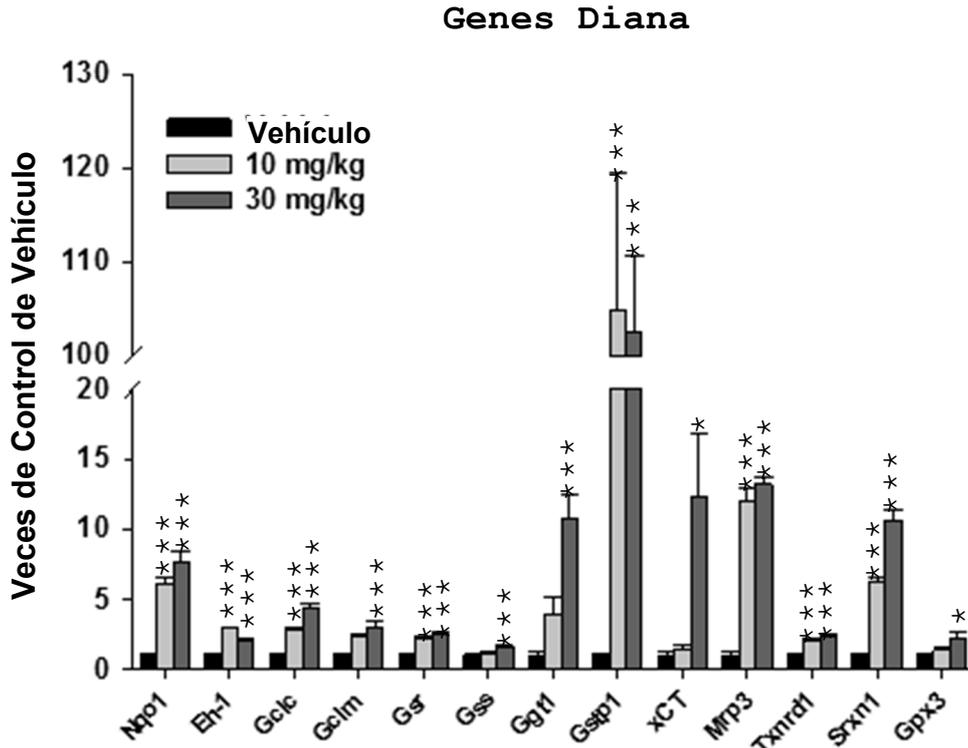
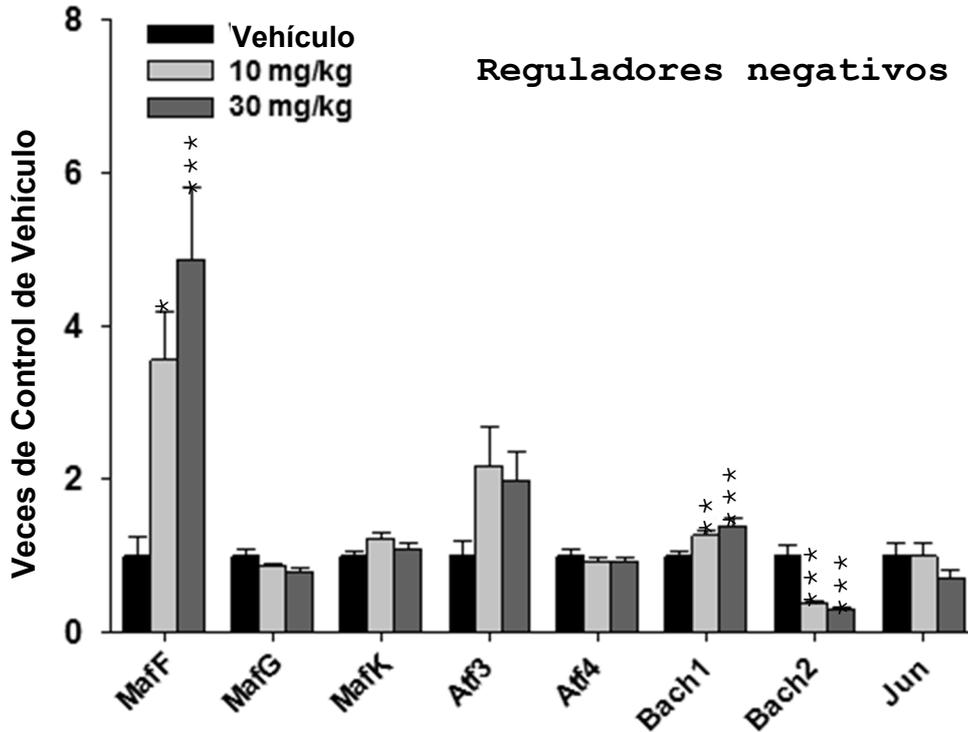


FIG. 26

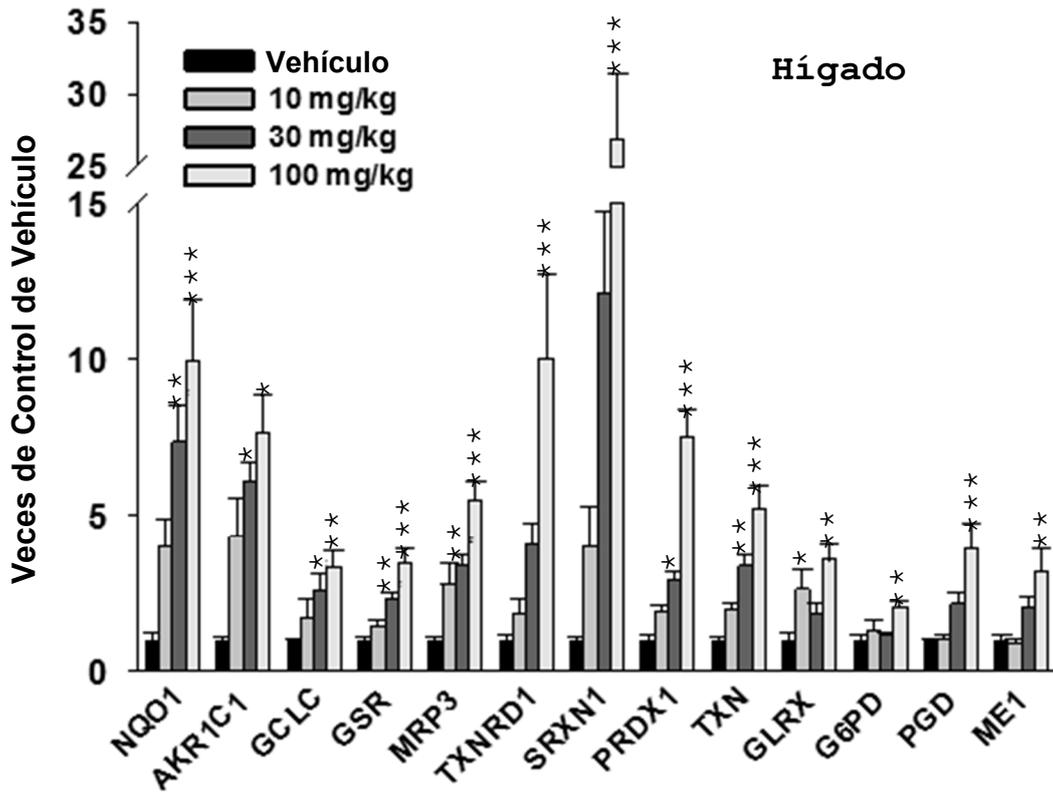


(a)

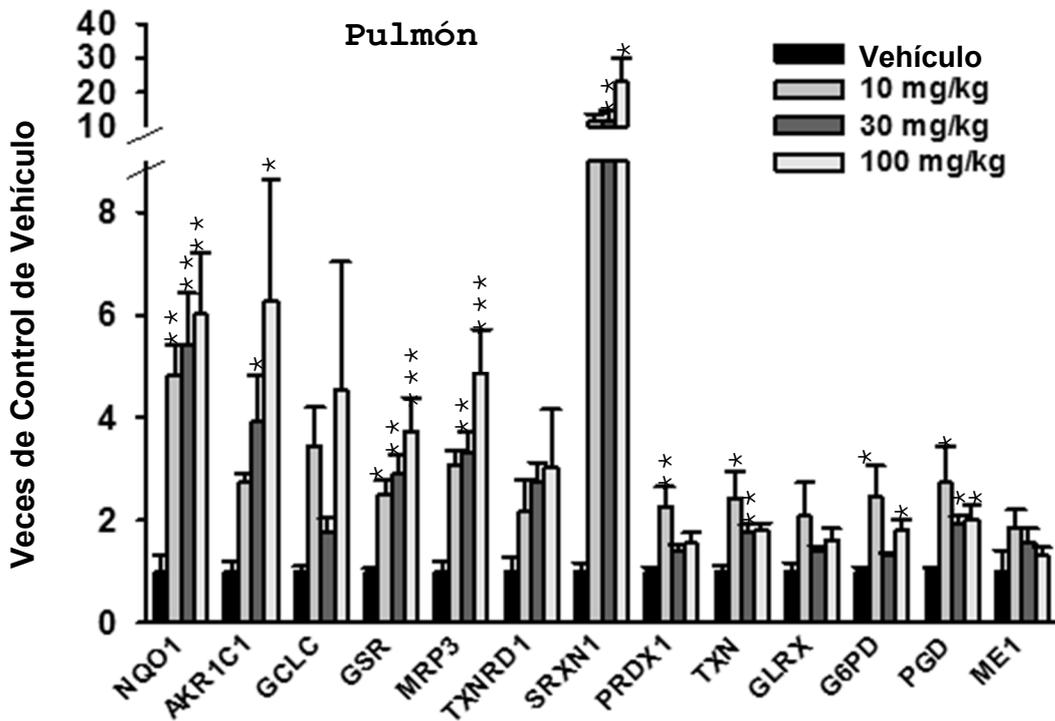


(b)

FIGS. 27a y b

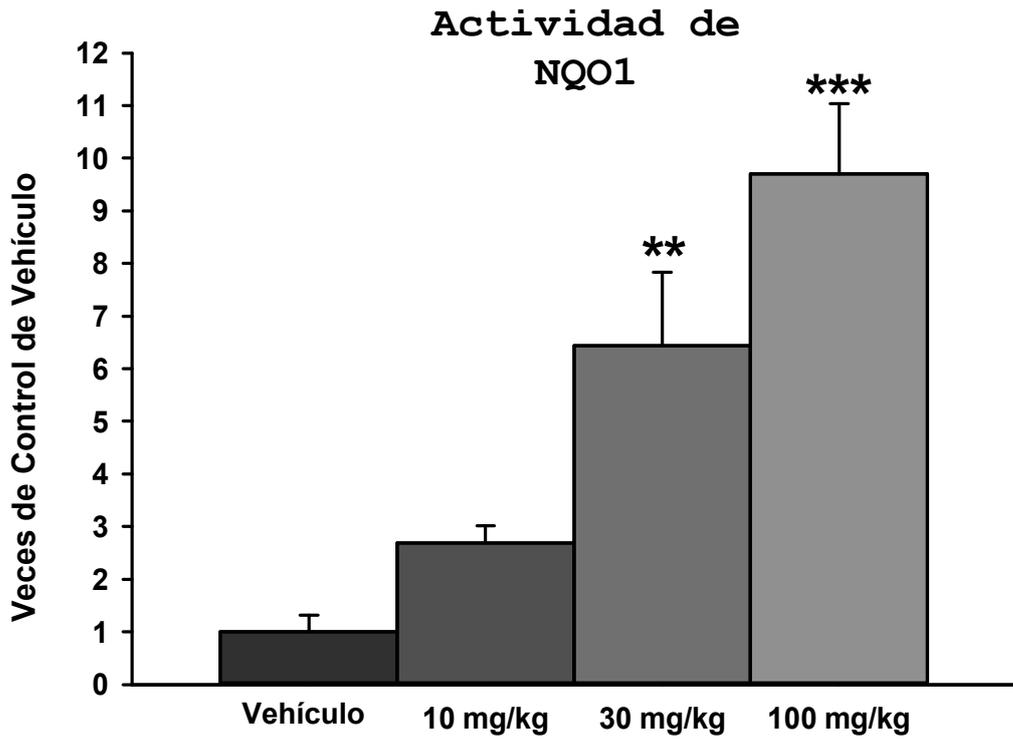


(a)

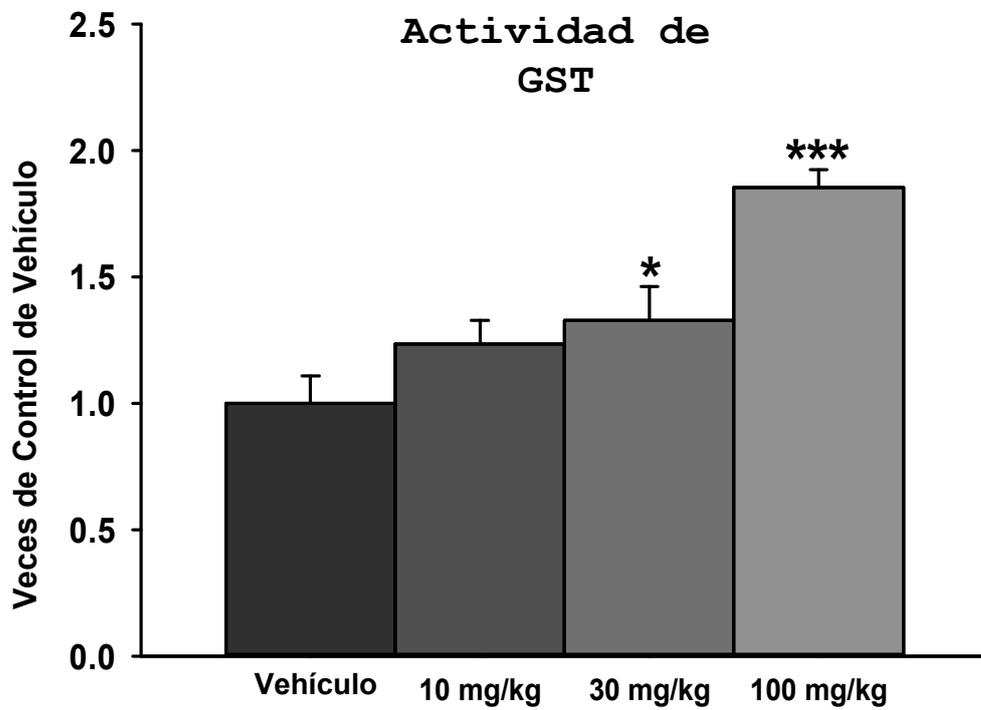


(b)

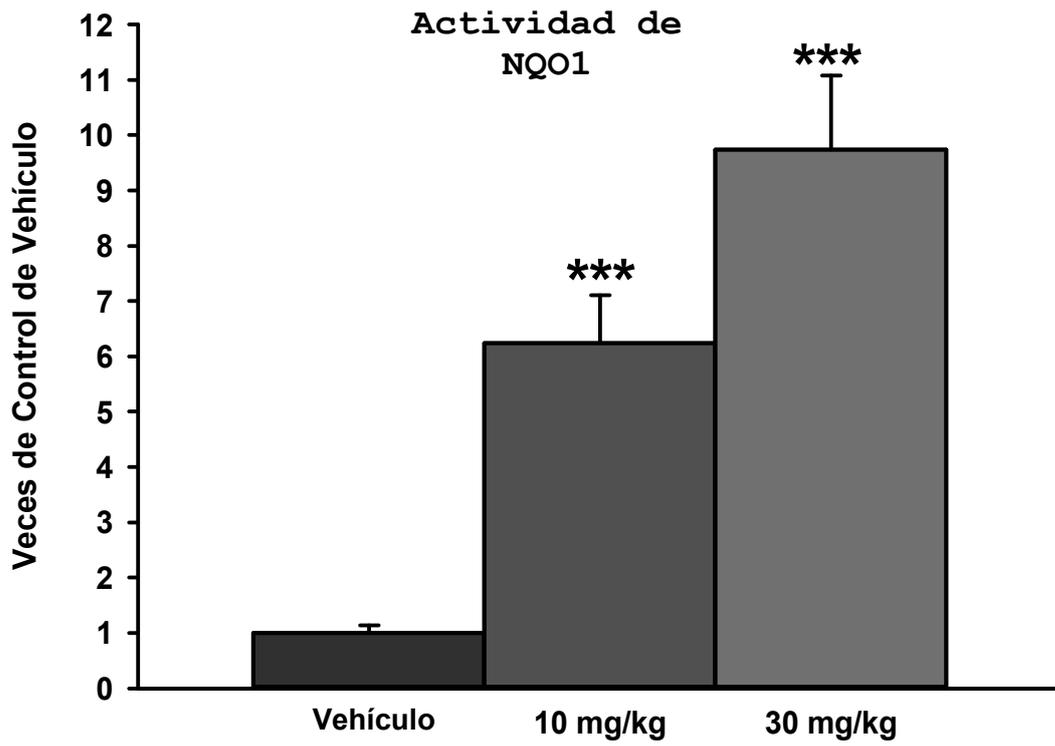
FIGS. 28a y b



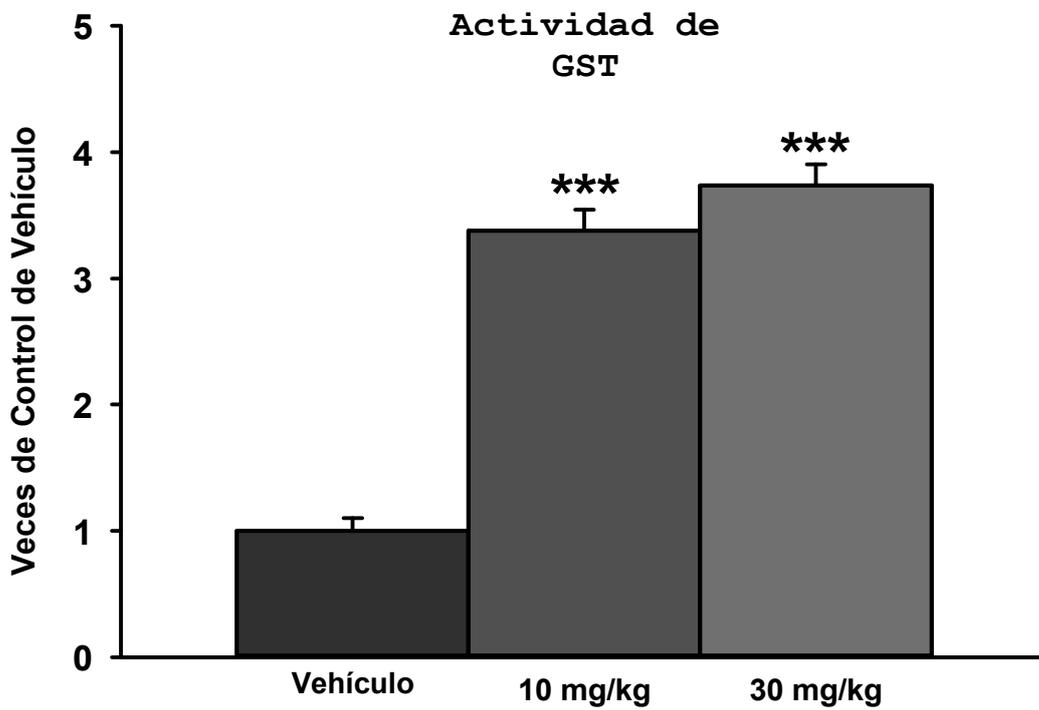
(a)



(b) FIGS. 29a y b

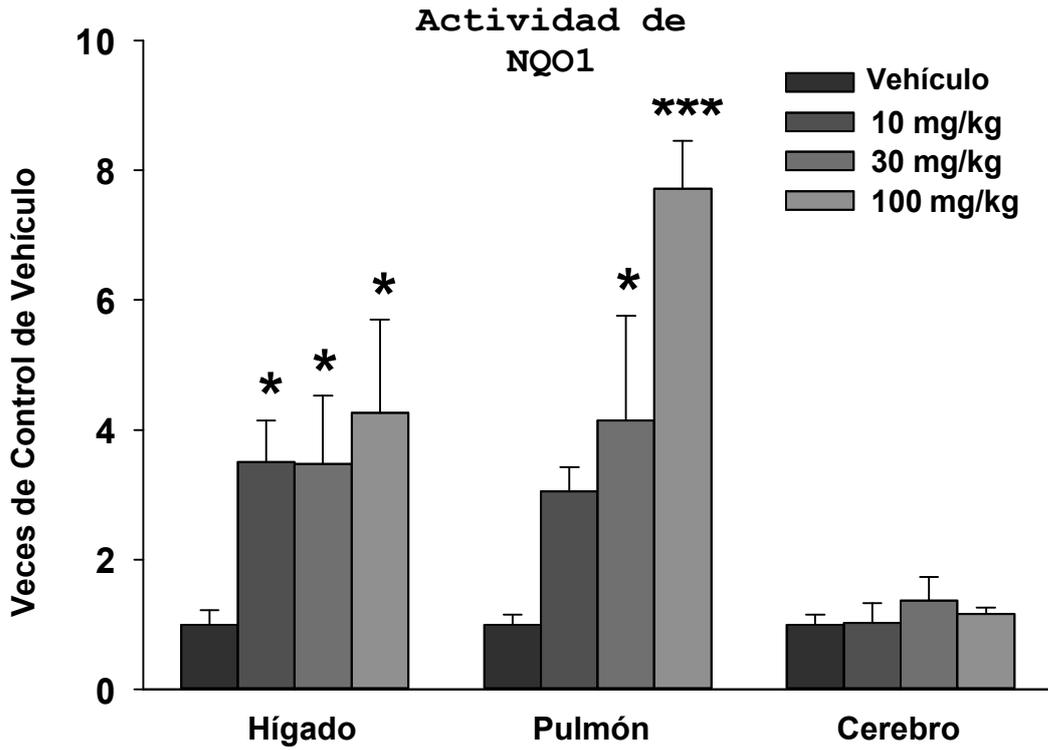


(a)

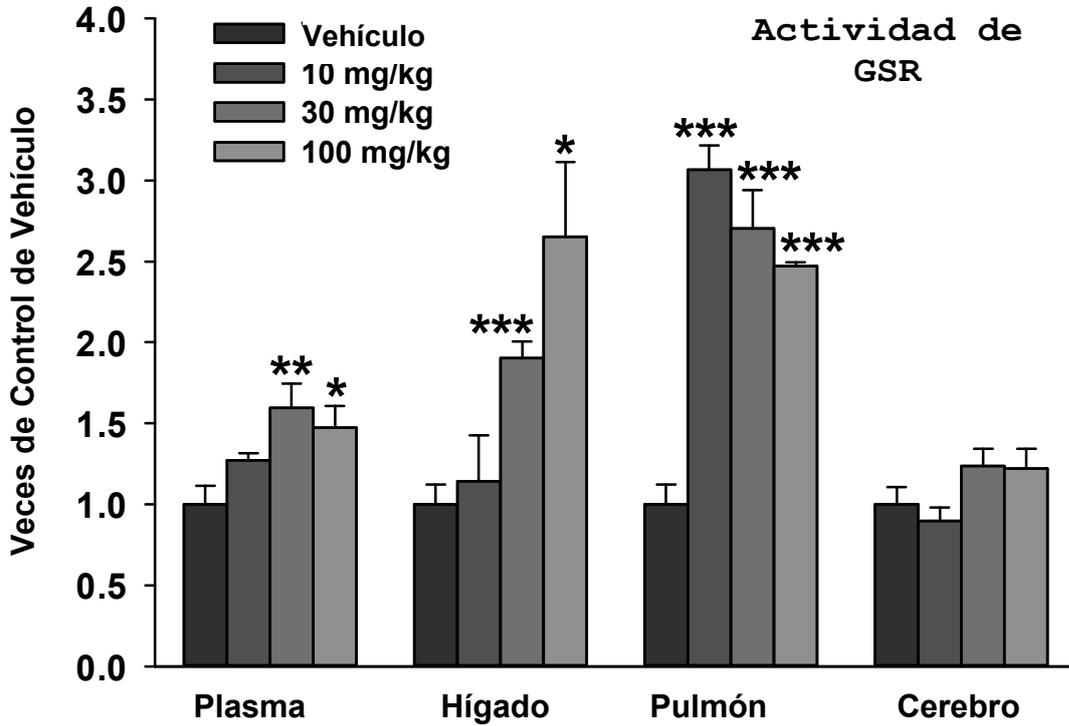


(b)

FIGS. 30a y b

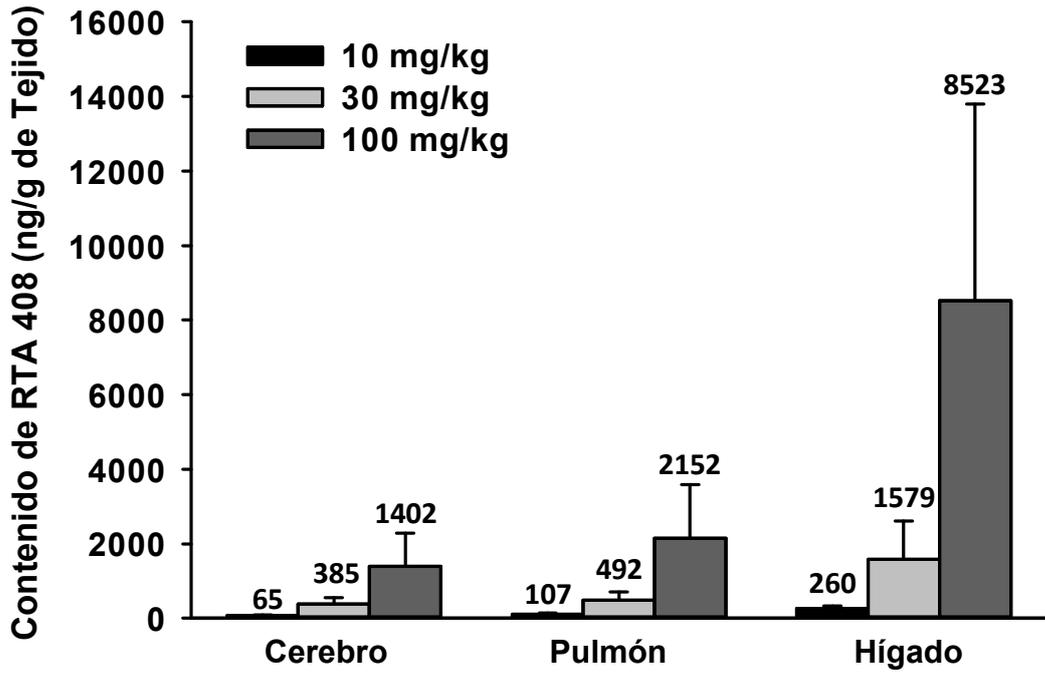


(a)

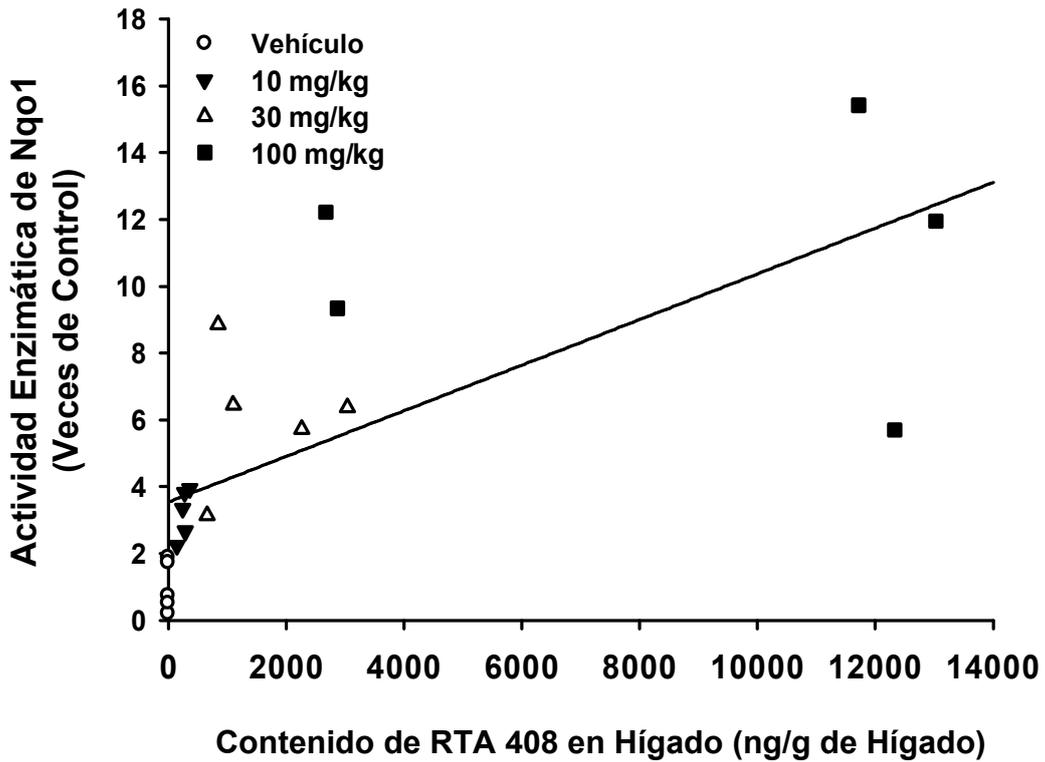


(b)

FIGS. 31a y b

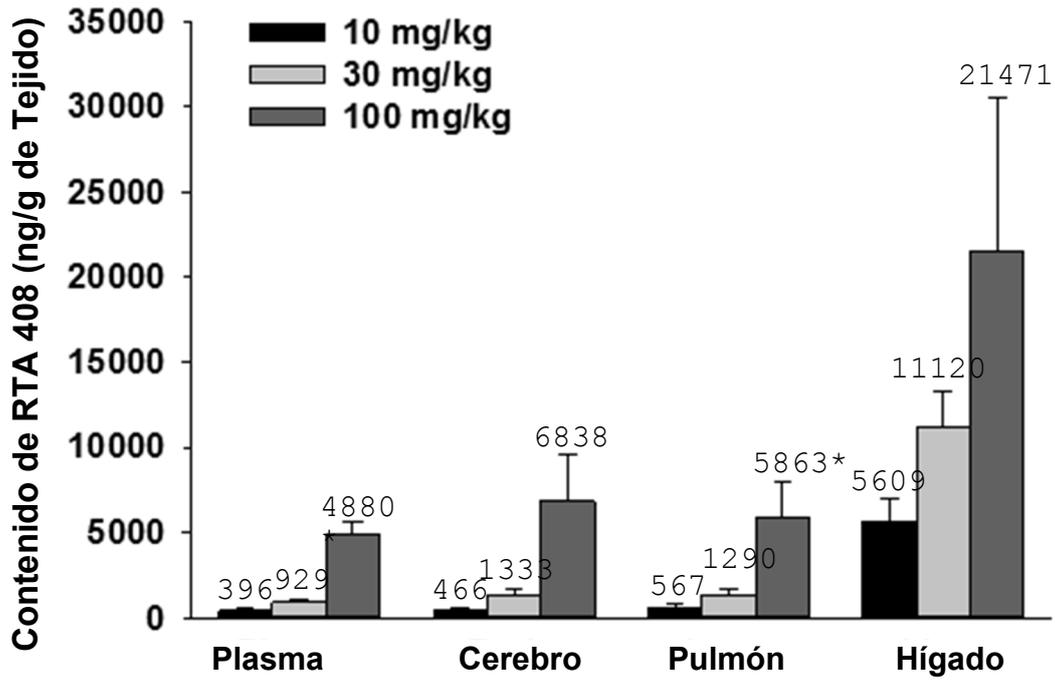


(a)

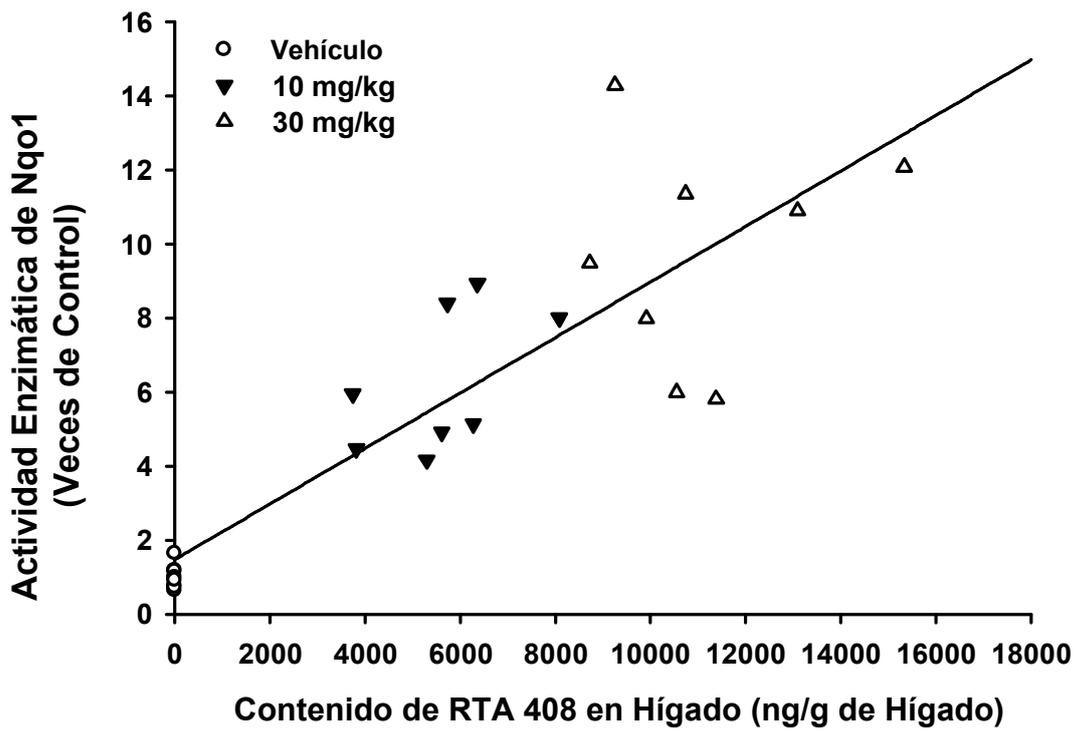


(b)

FIGS. 32a y b

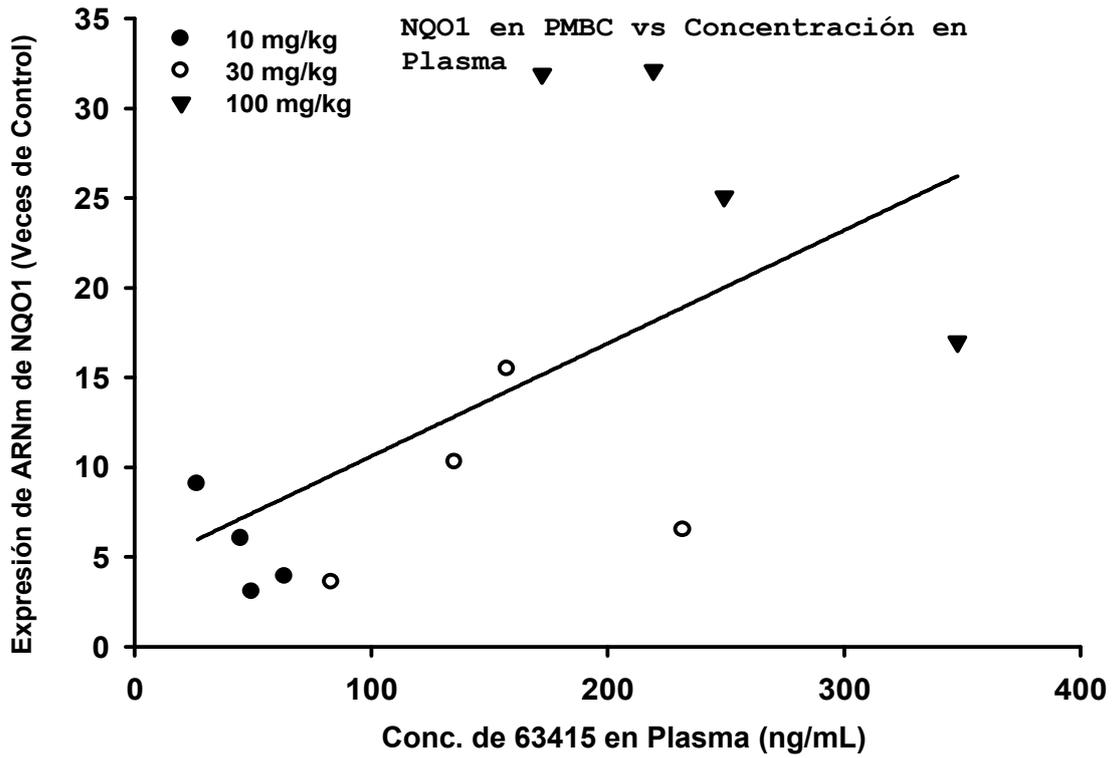


(a)

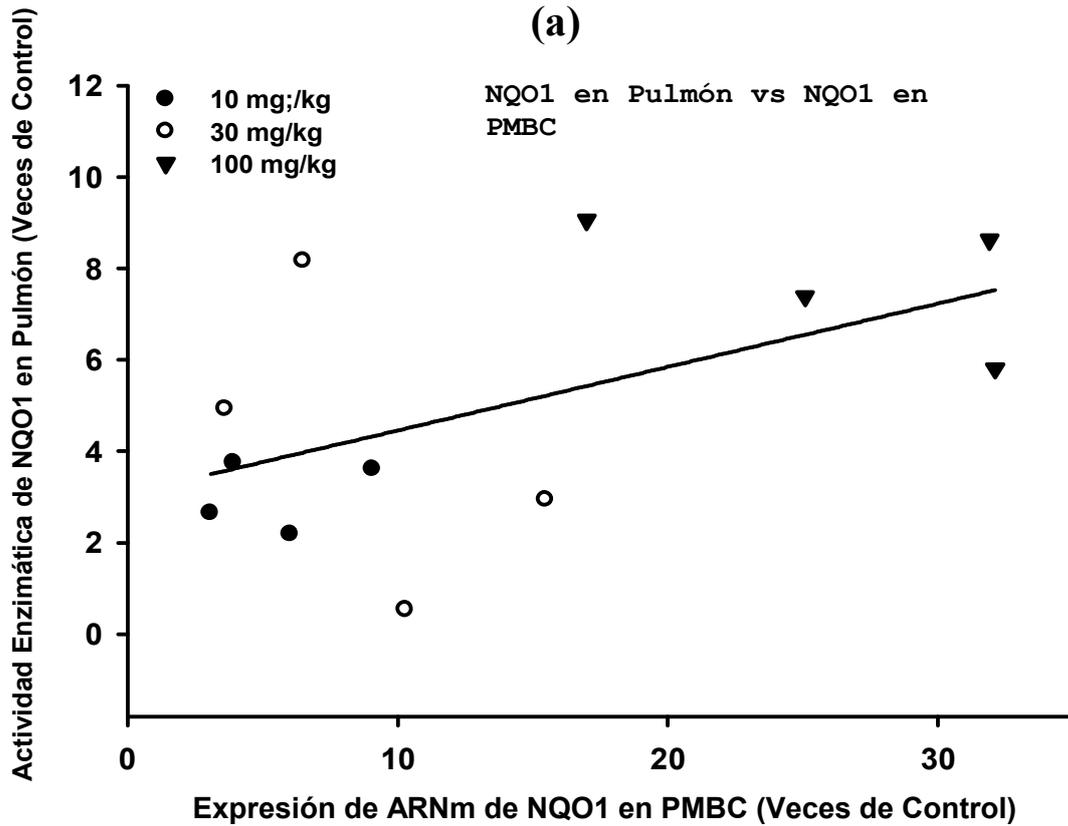


(b)

FIGS. 33a y b



(a)



(b)

FIGS. 34a y b

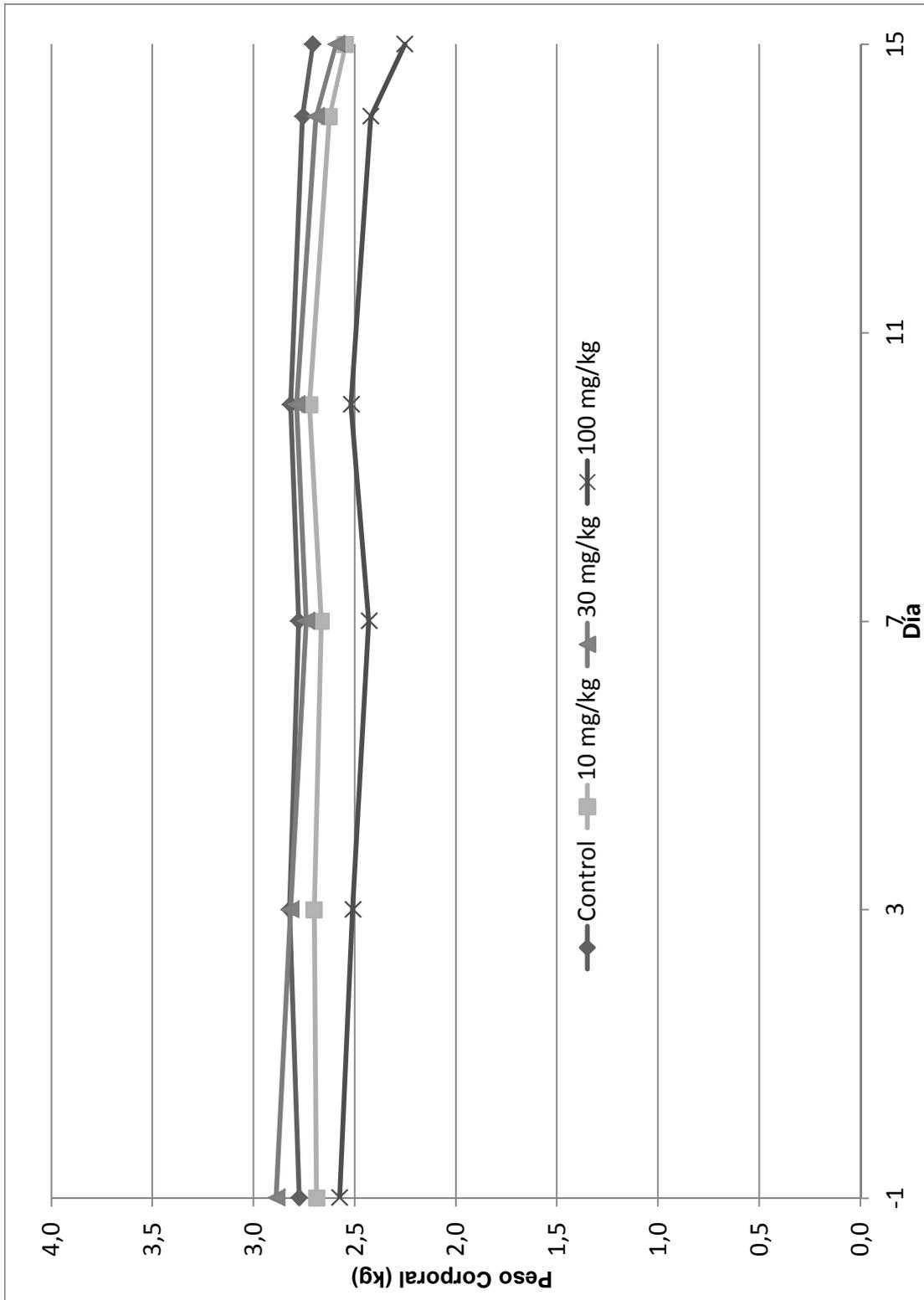


FIG. 35

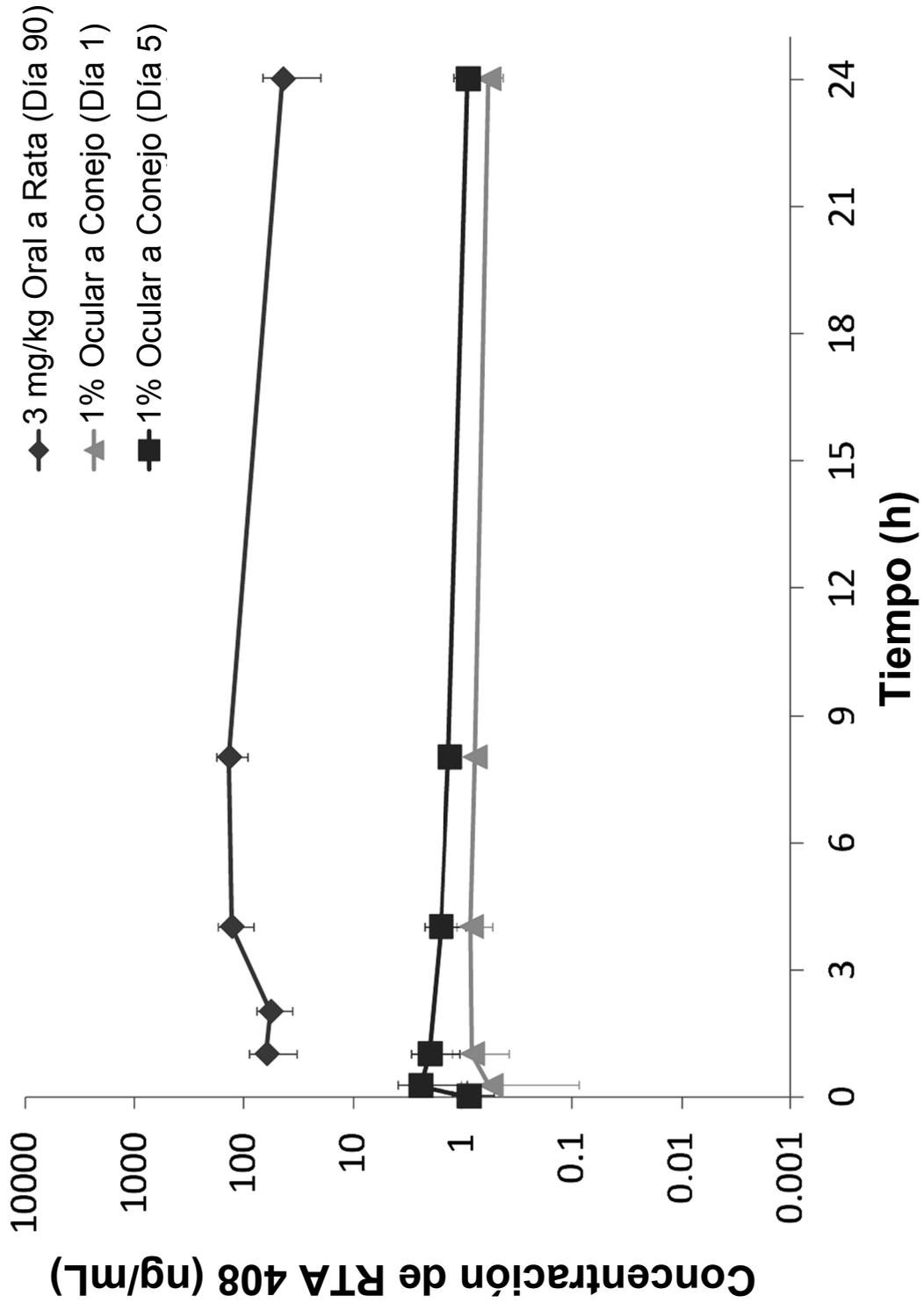
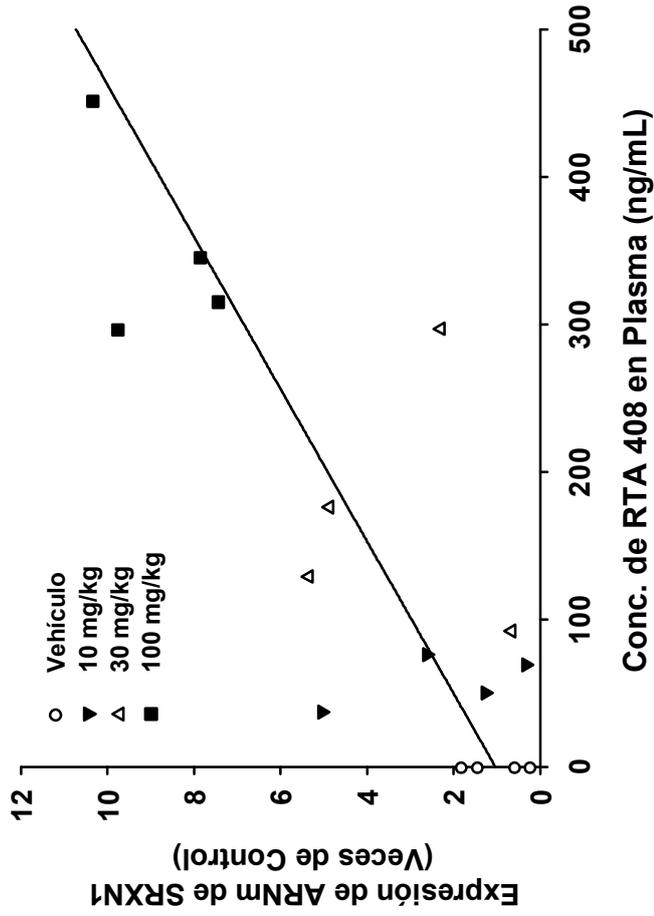


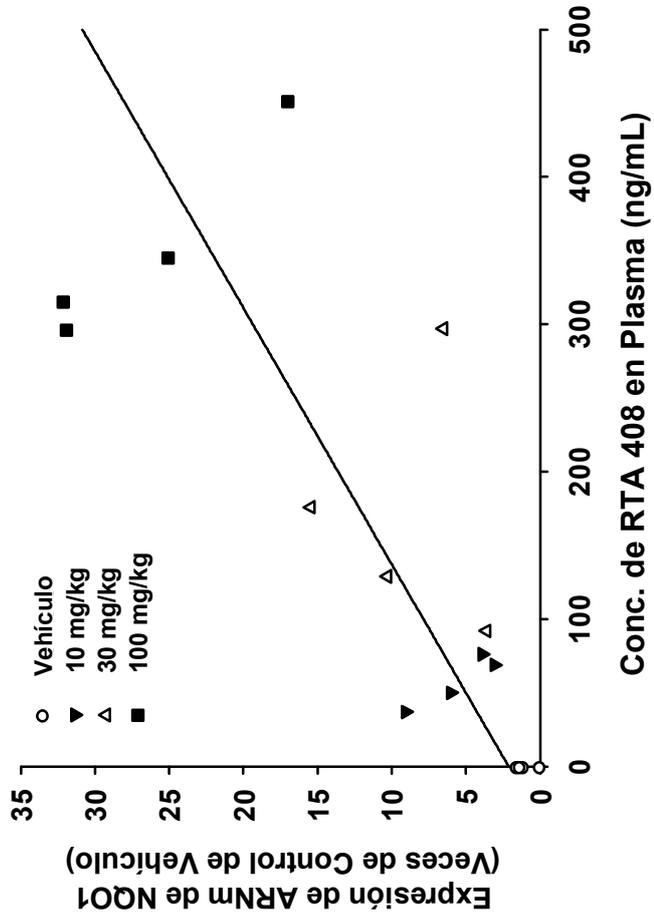
FIG. 36

SRXN1



(b)

NQO1



(a)

FIGS. 37a y b

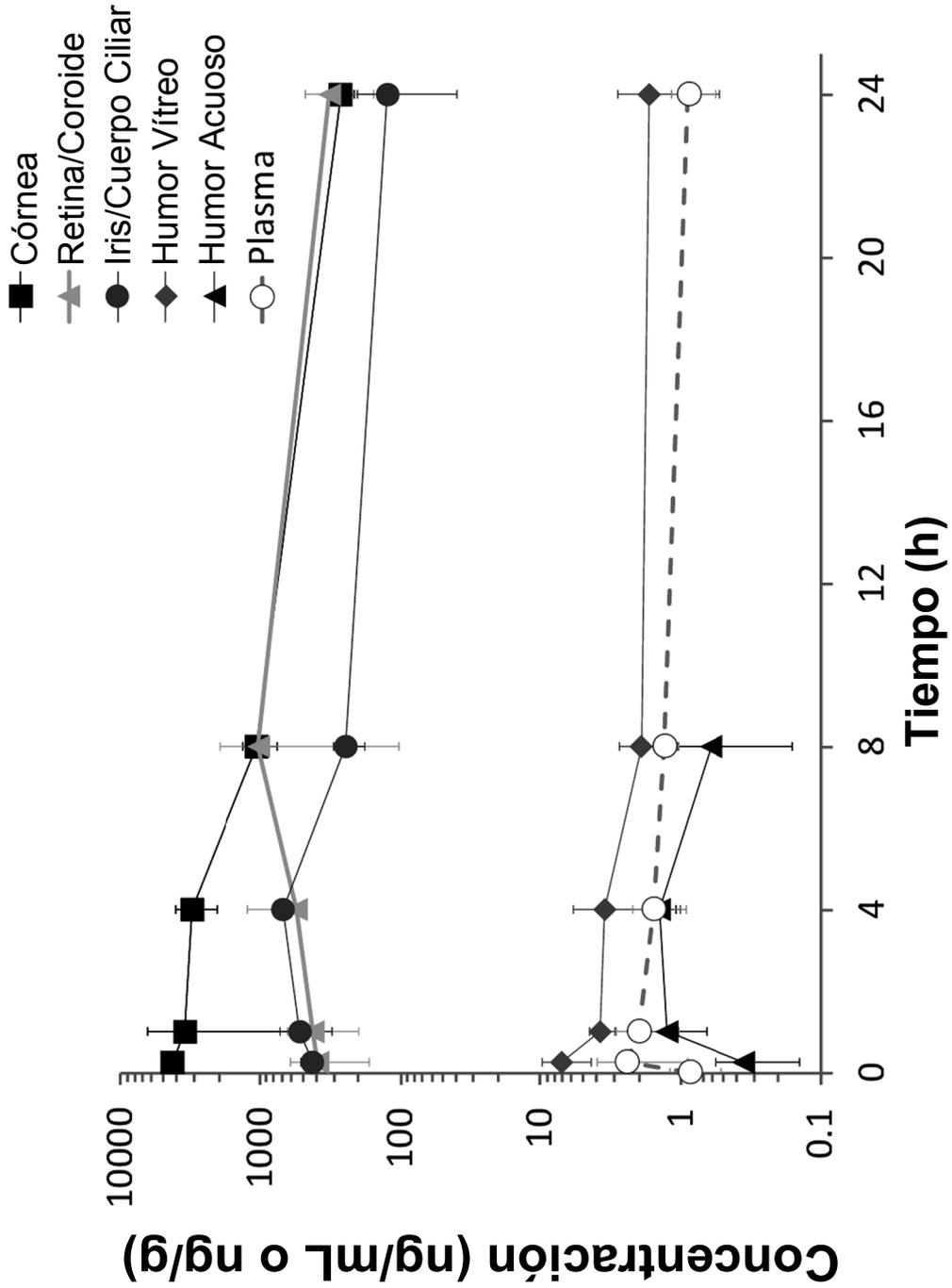


FIG. 38

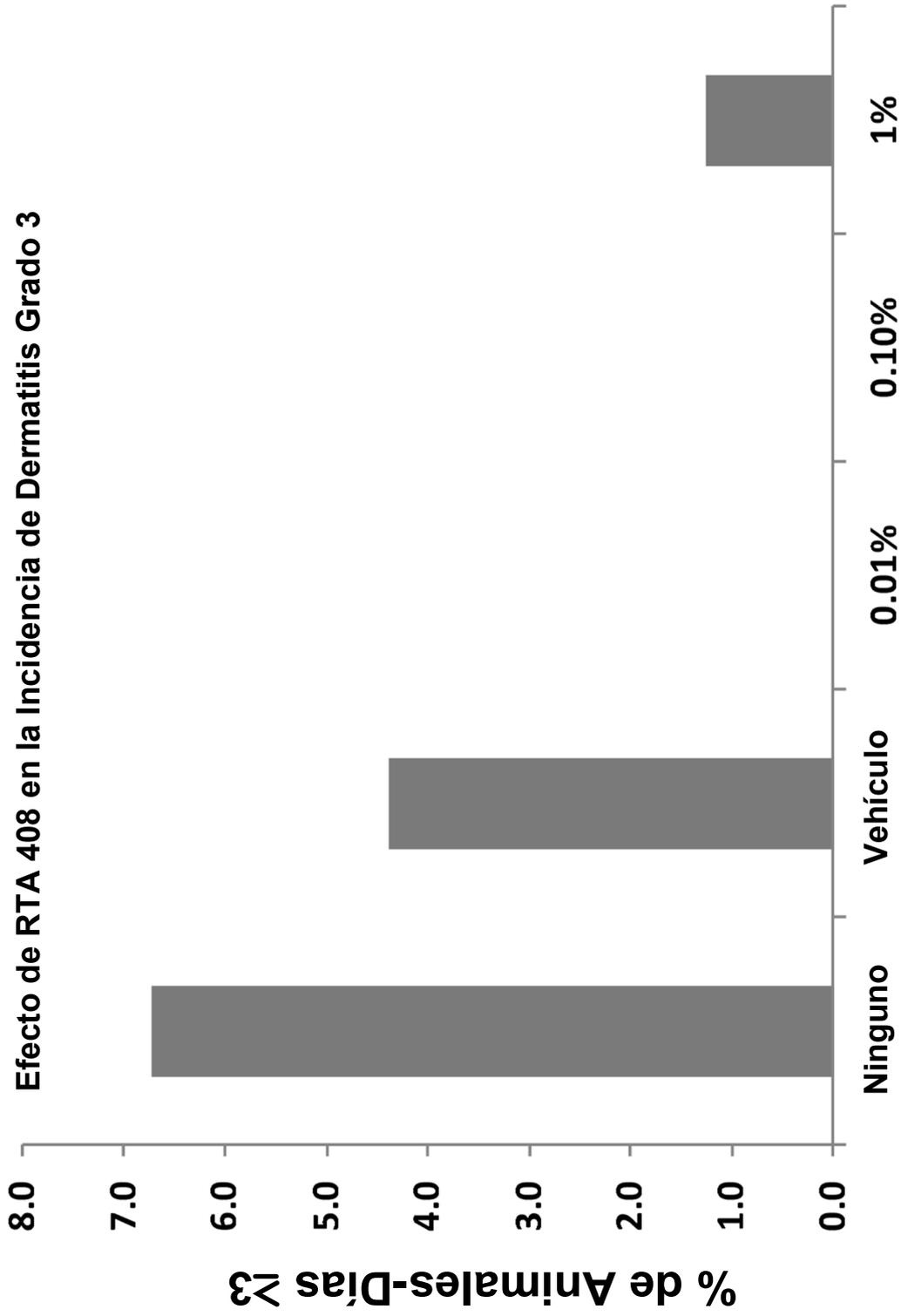


FIG. 39

Efecto de RTA 408 en la Incidencia de Dermatitis Grado 2 hasta el Día 30

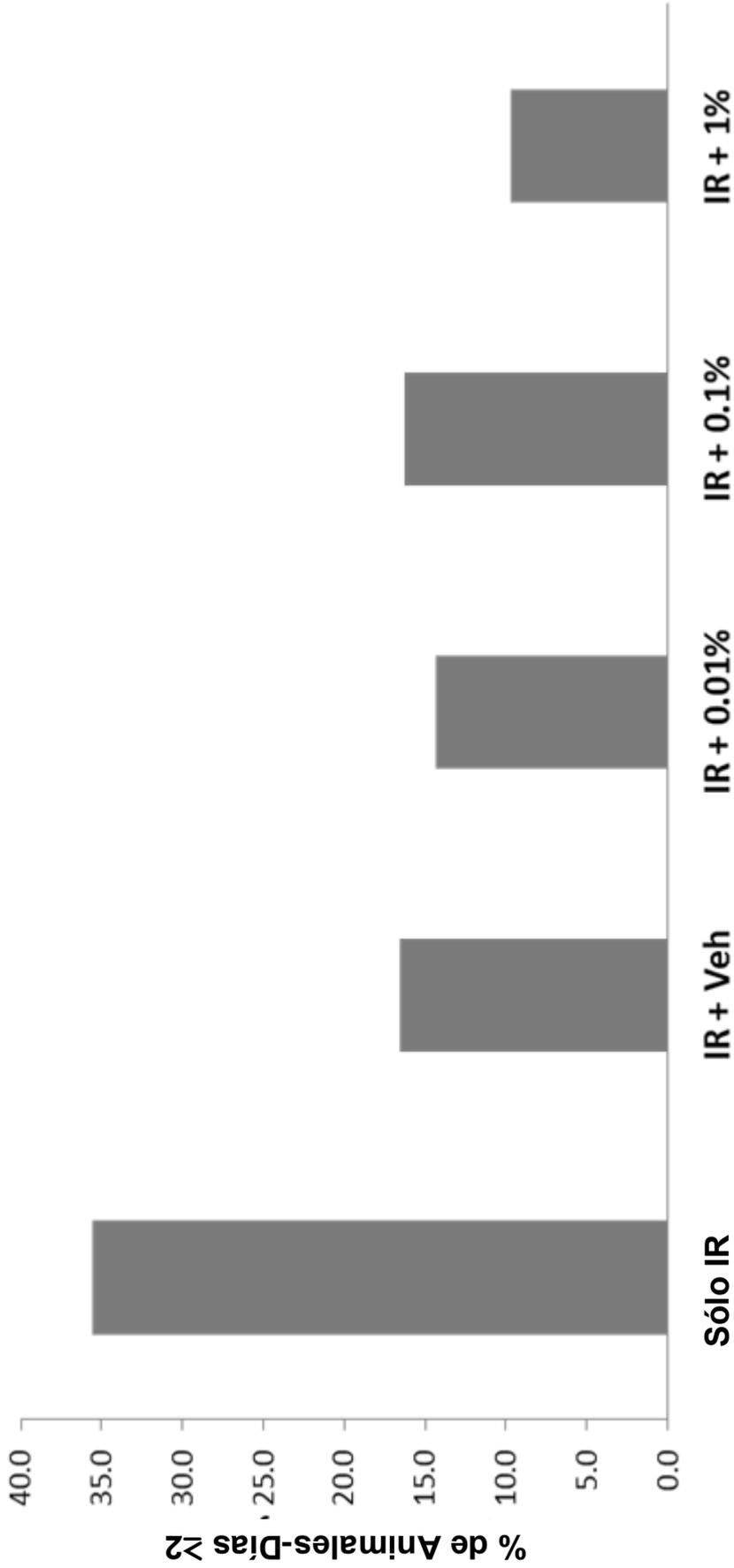


FIG. 40

Efecto de RTA 408 en la Incidencia de Dermatitis Grado 3 Hasta el Día 28

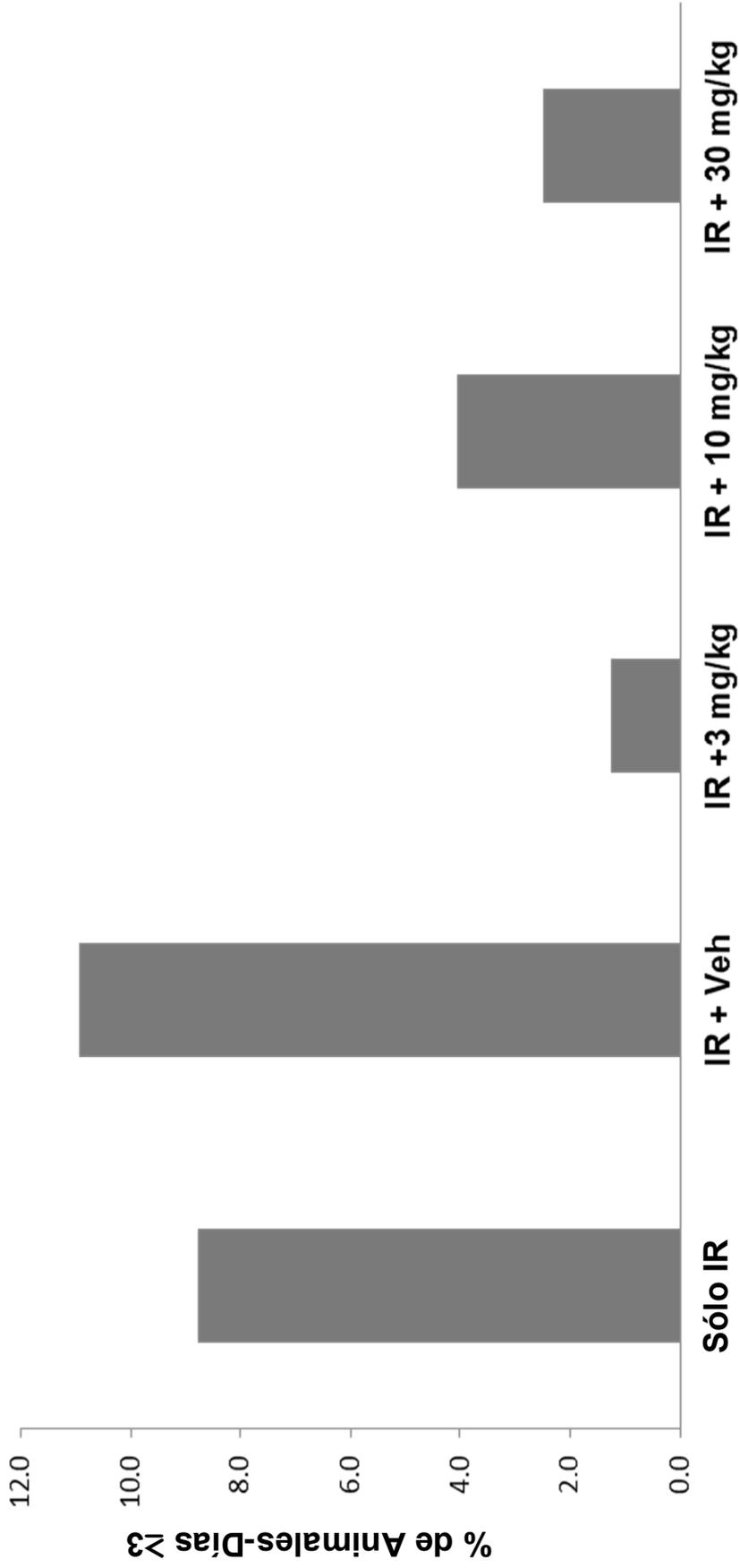


FIG. 41

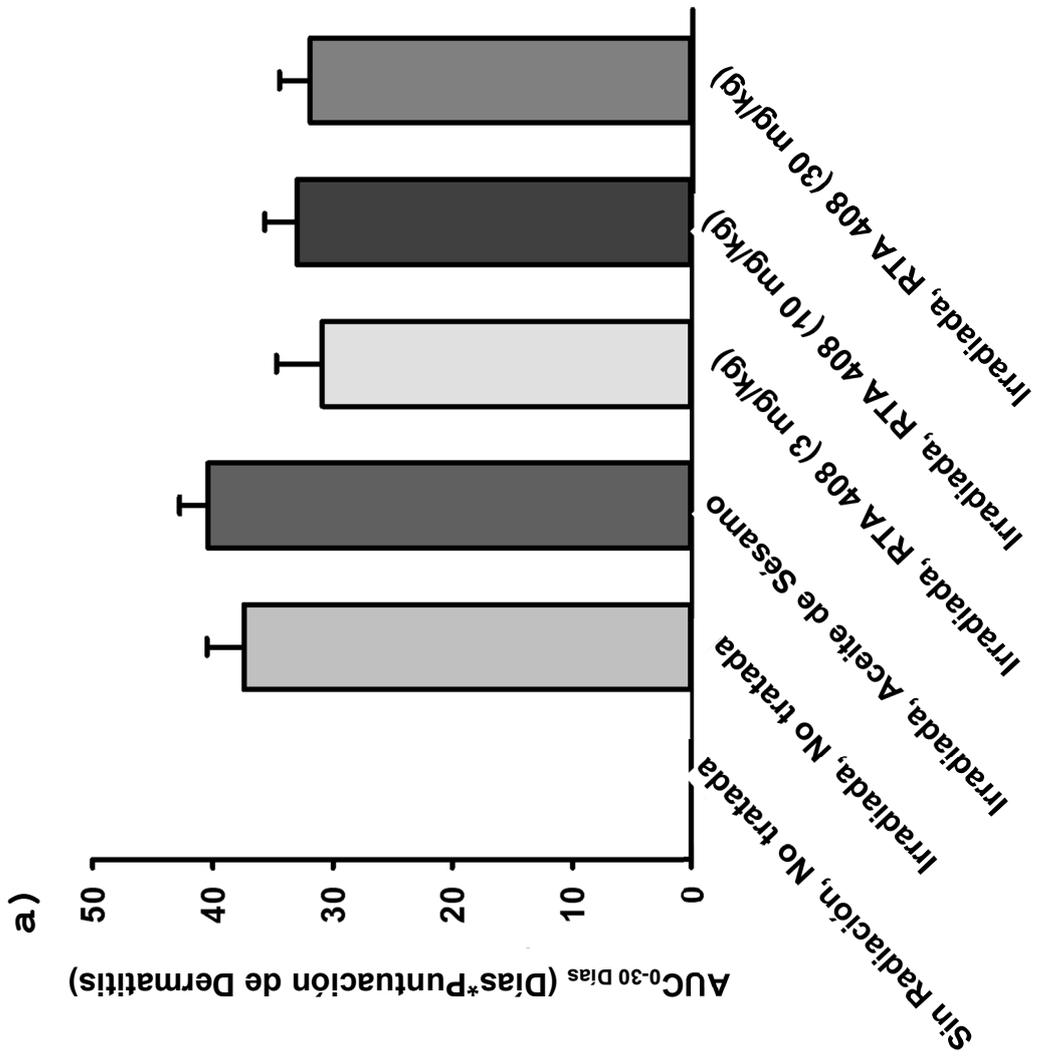


FIG 42a

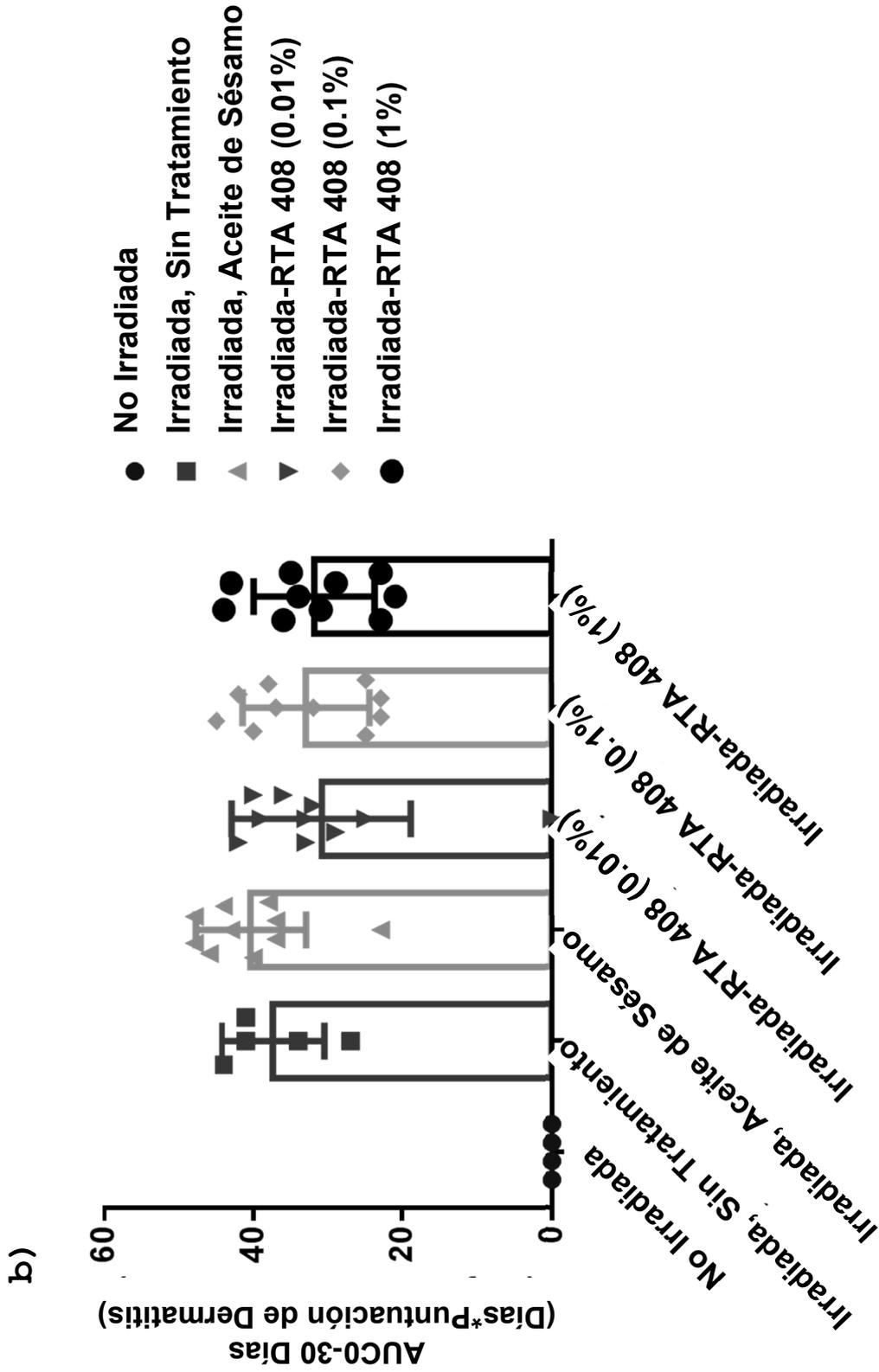


FIG 42b

Puntuaciones de Severidad de la Dermatitis – 1 puntuación ciega

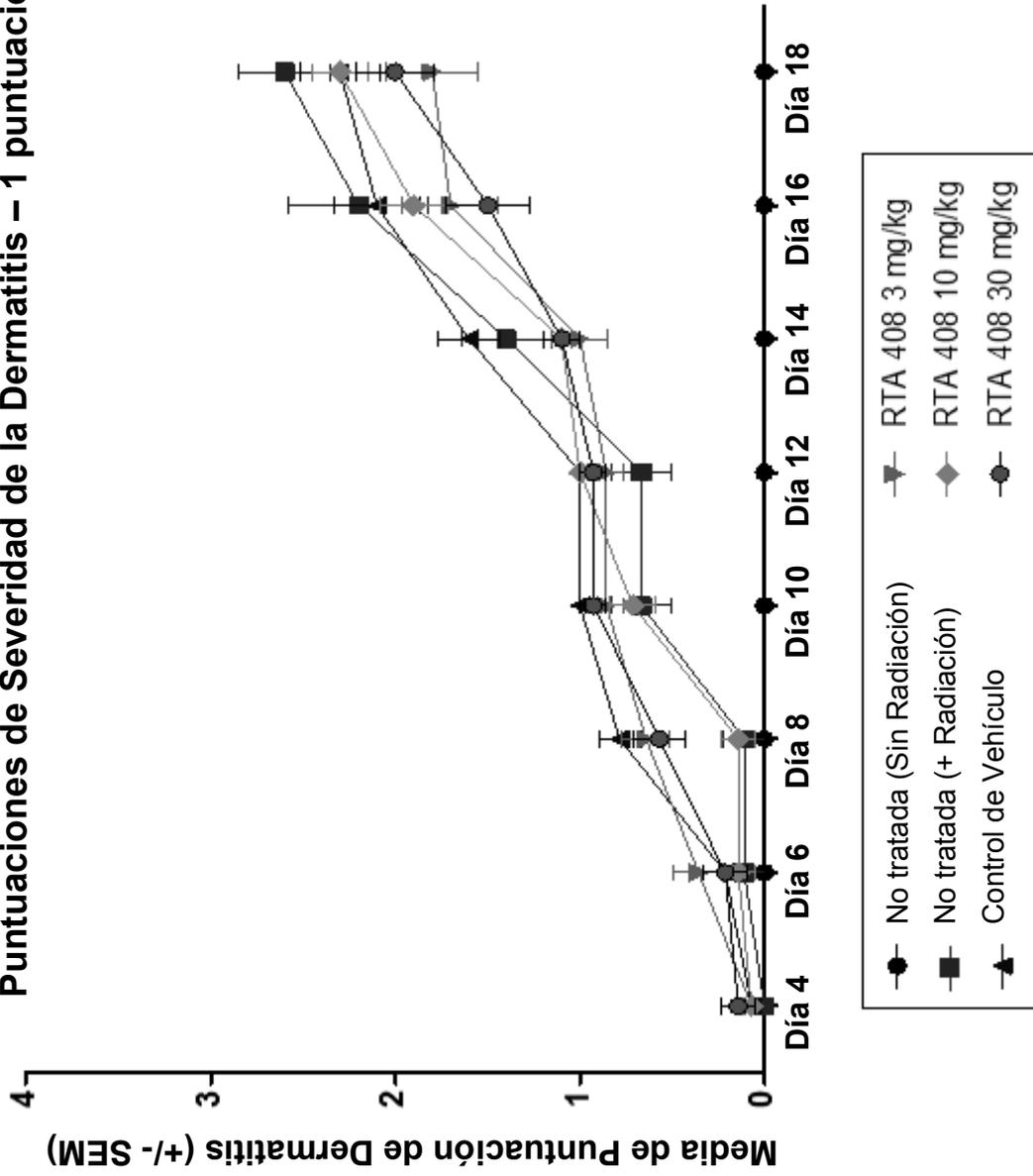


FIG. 43

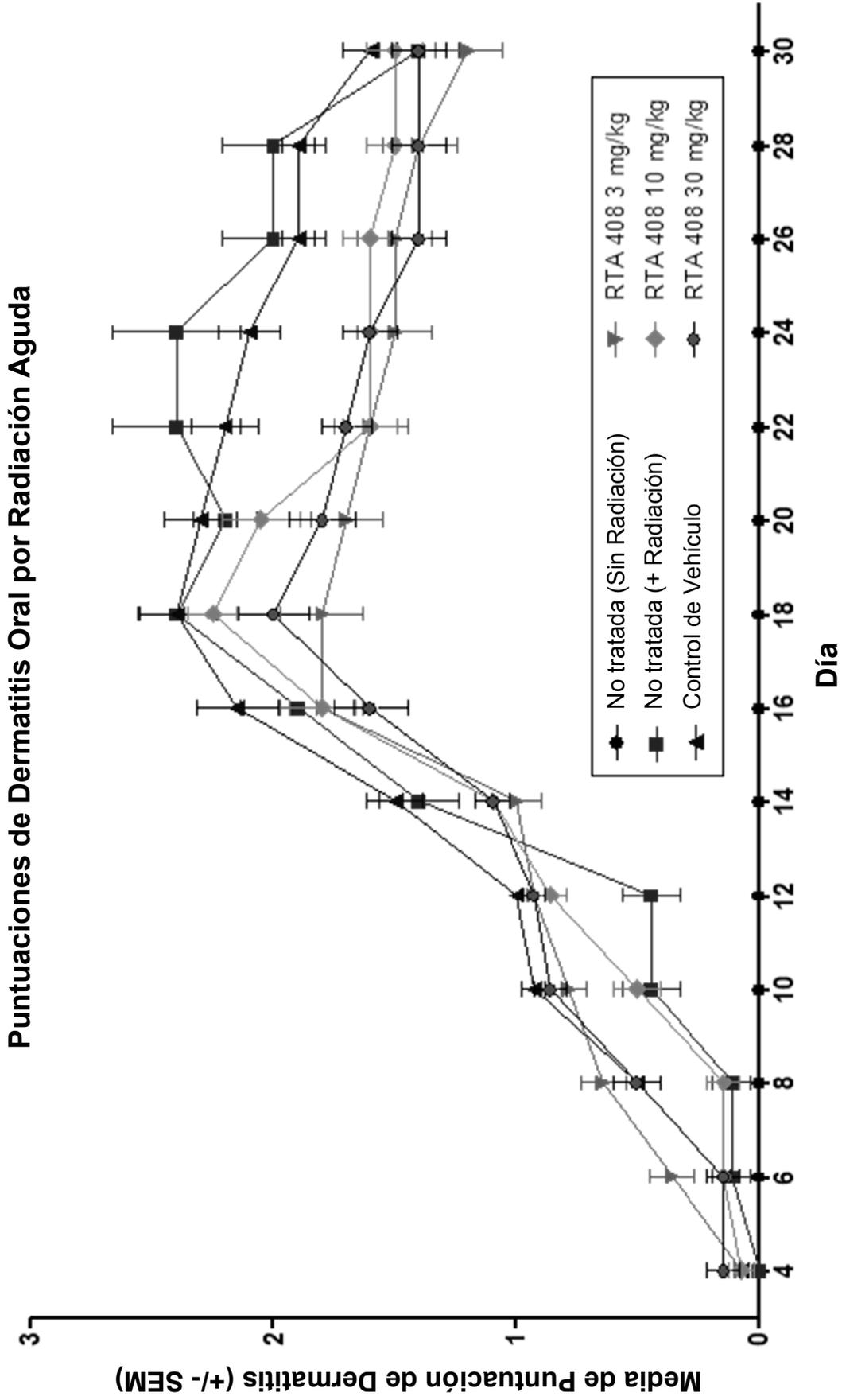


FIG 44

Puntuaciones de Dermatitis Tópica por Radiación Aguda

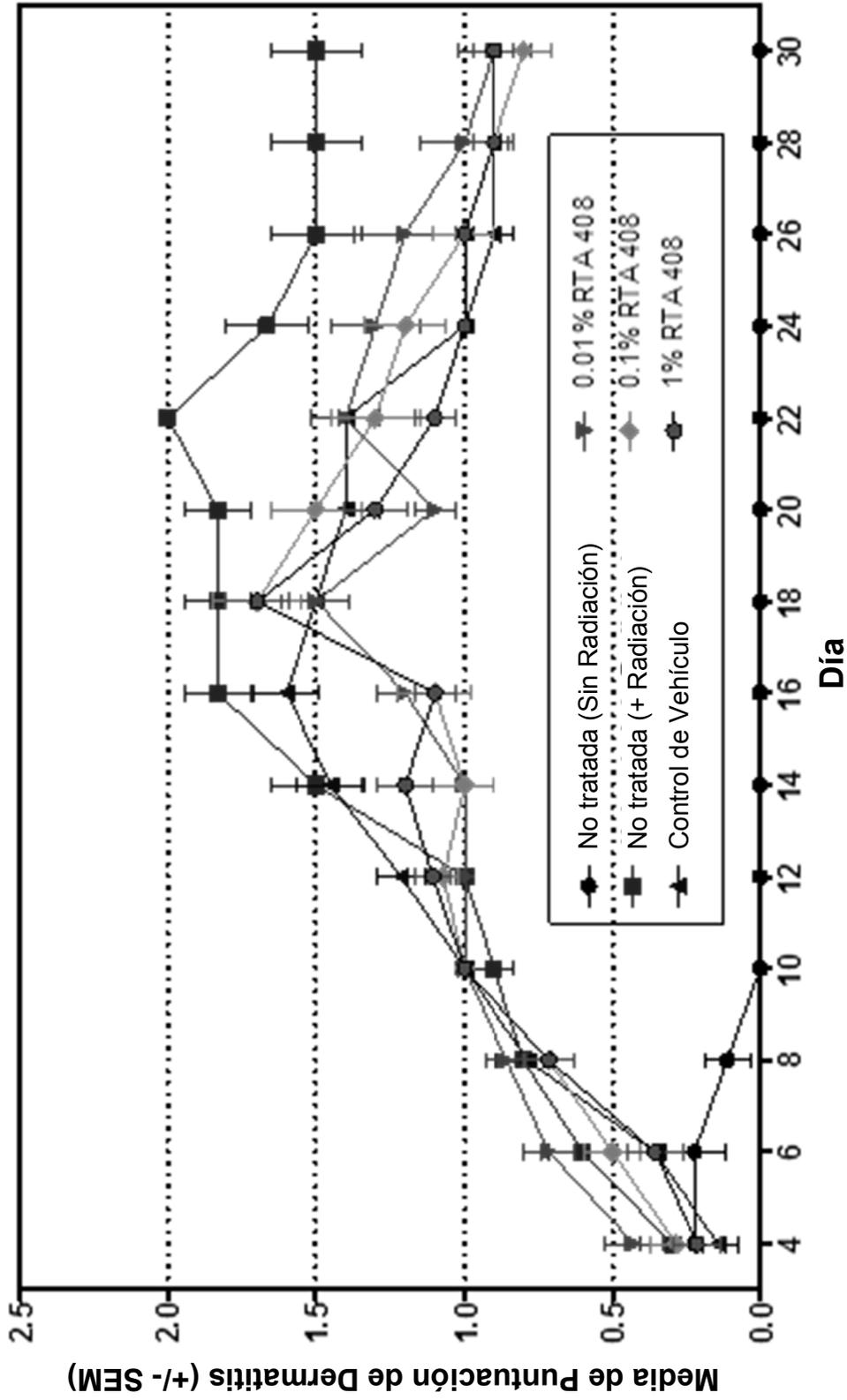


FIG. 45

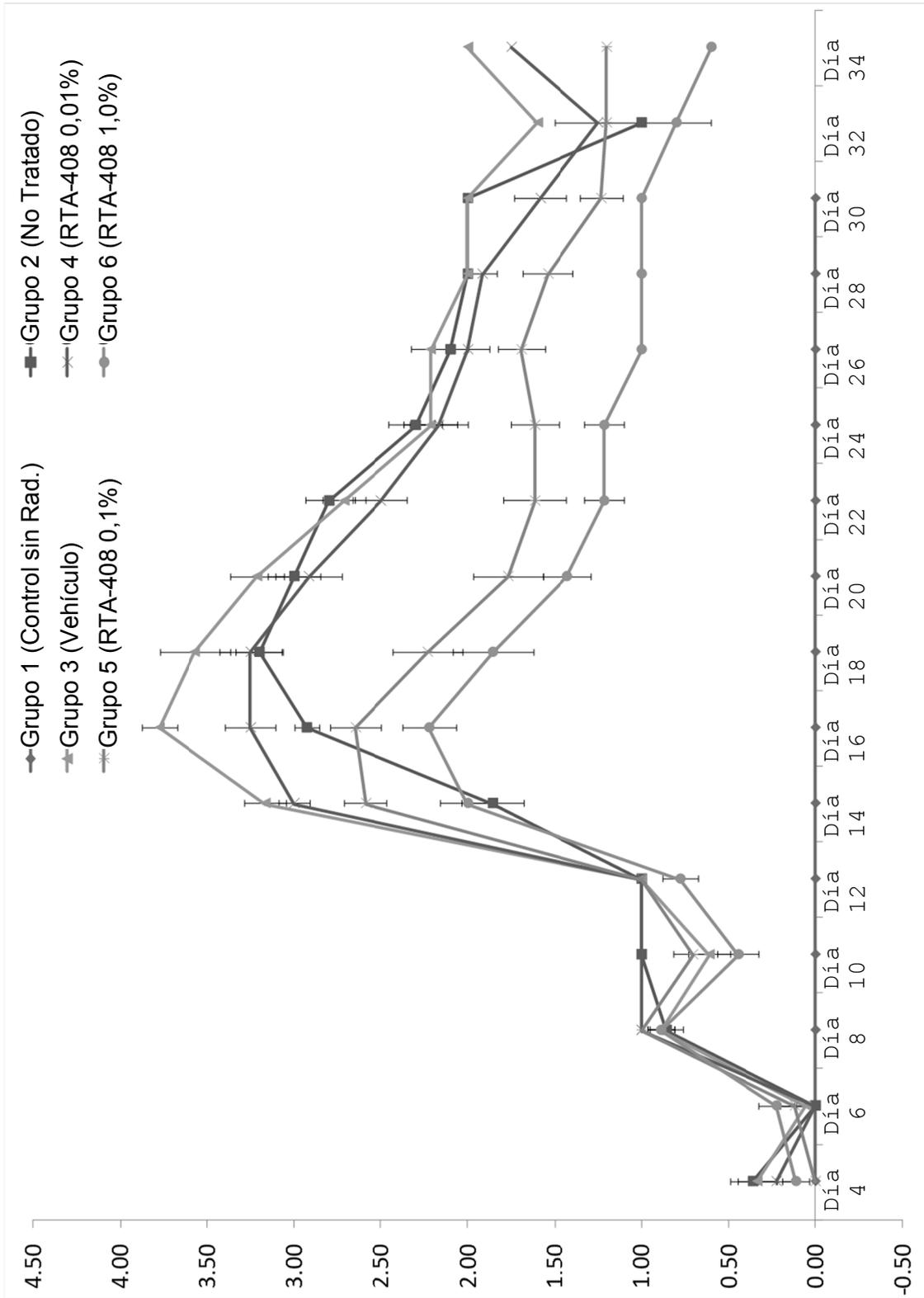


FIG. 46

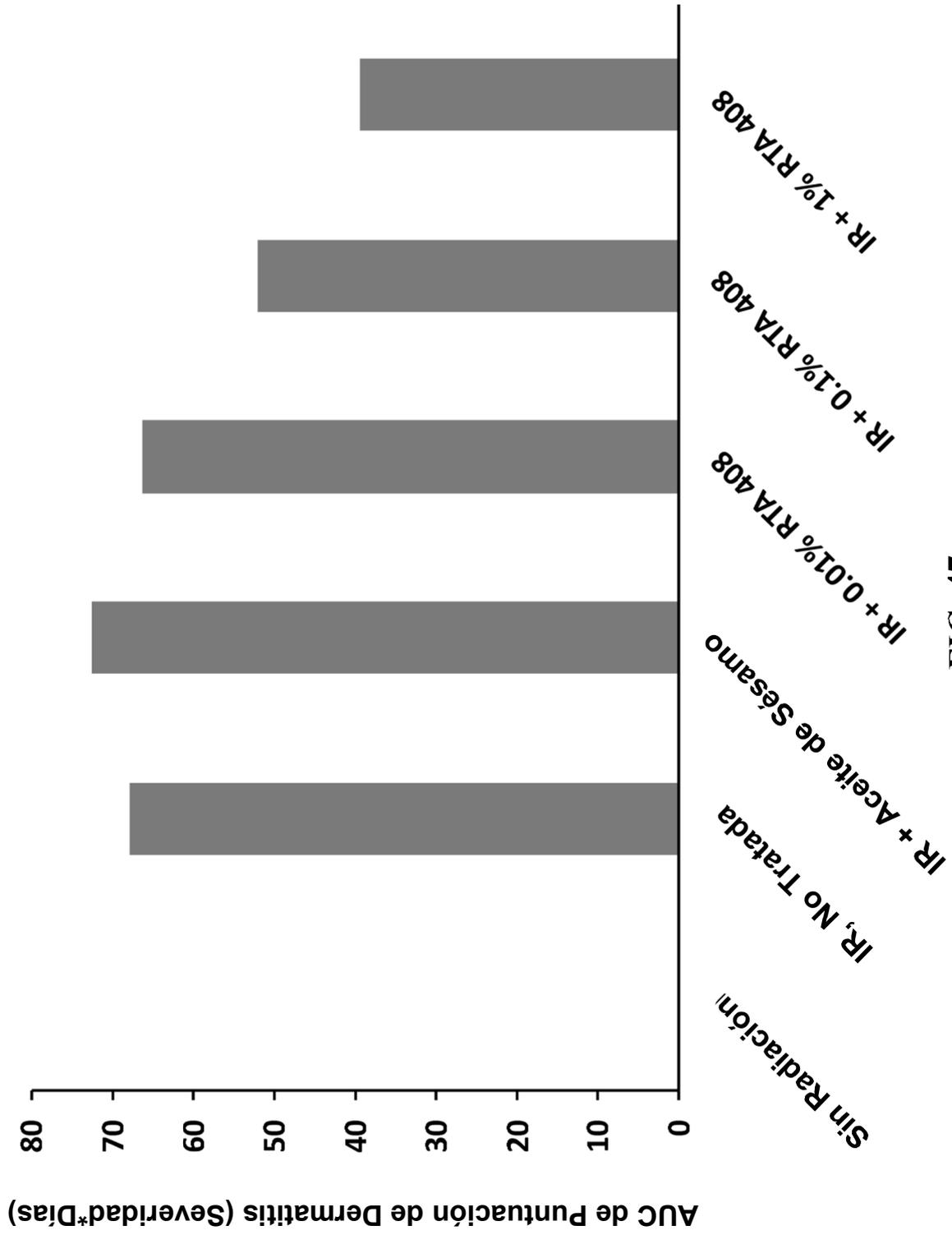


FIG. 47

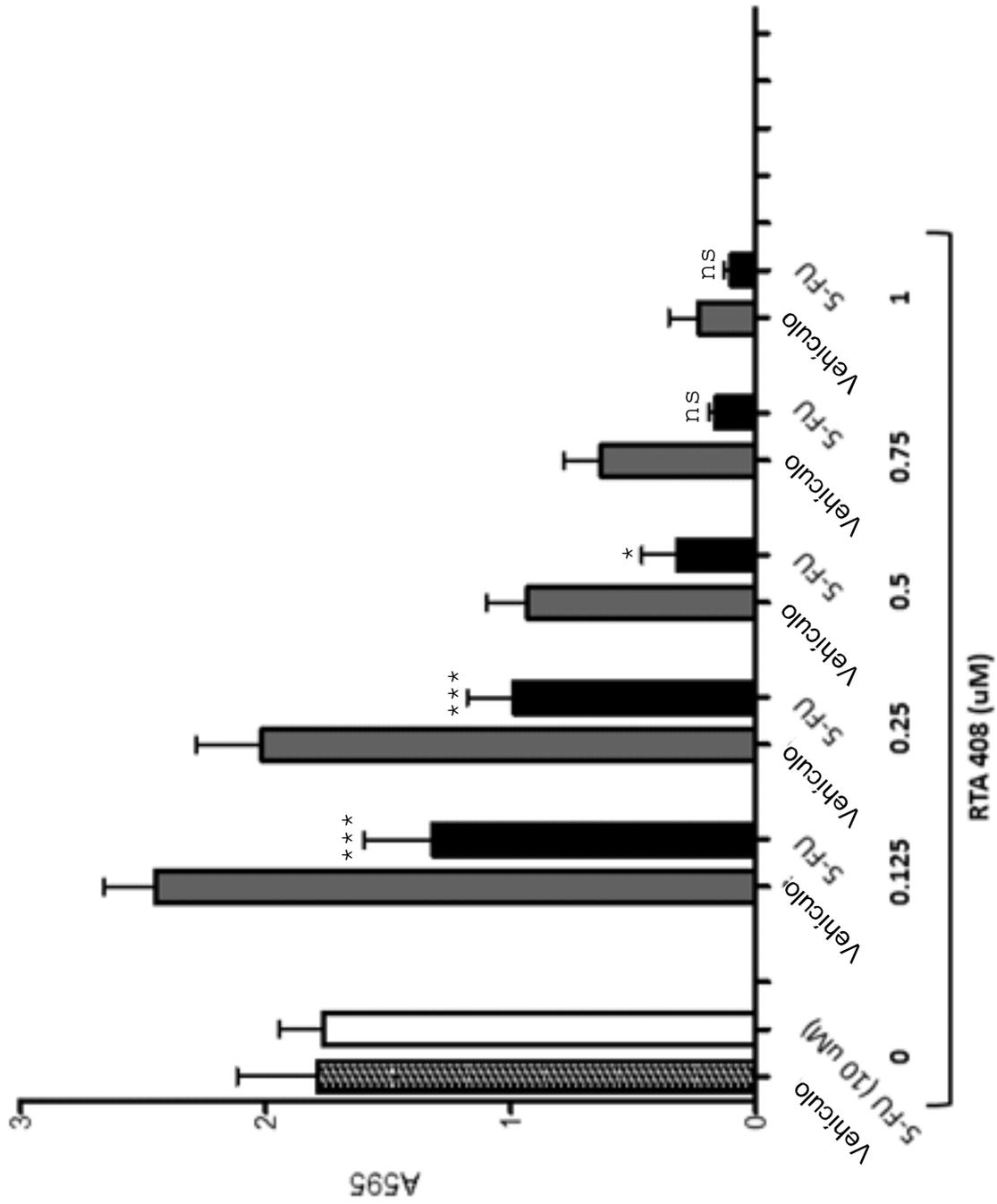


FIG. 48a

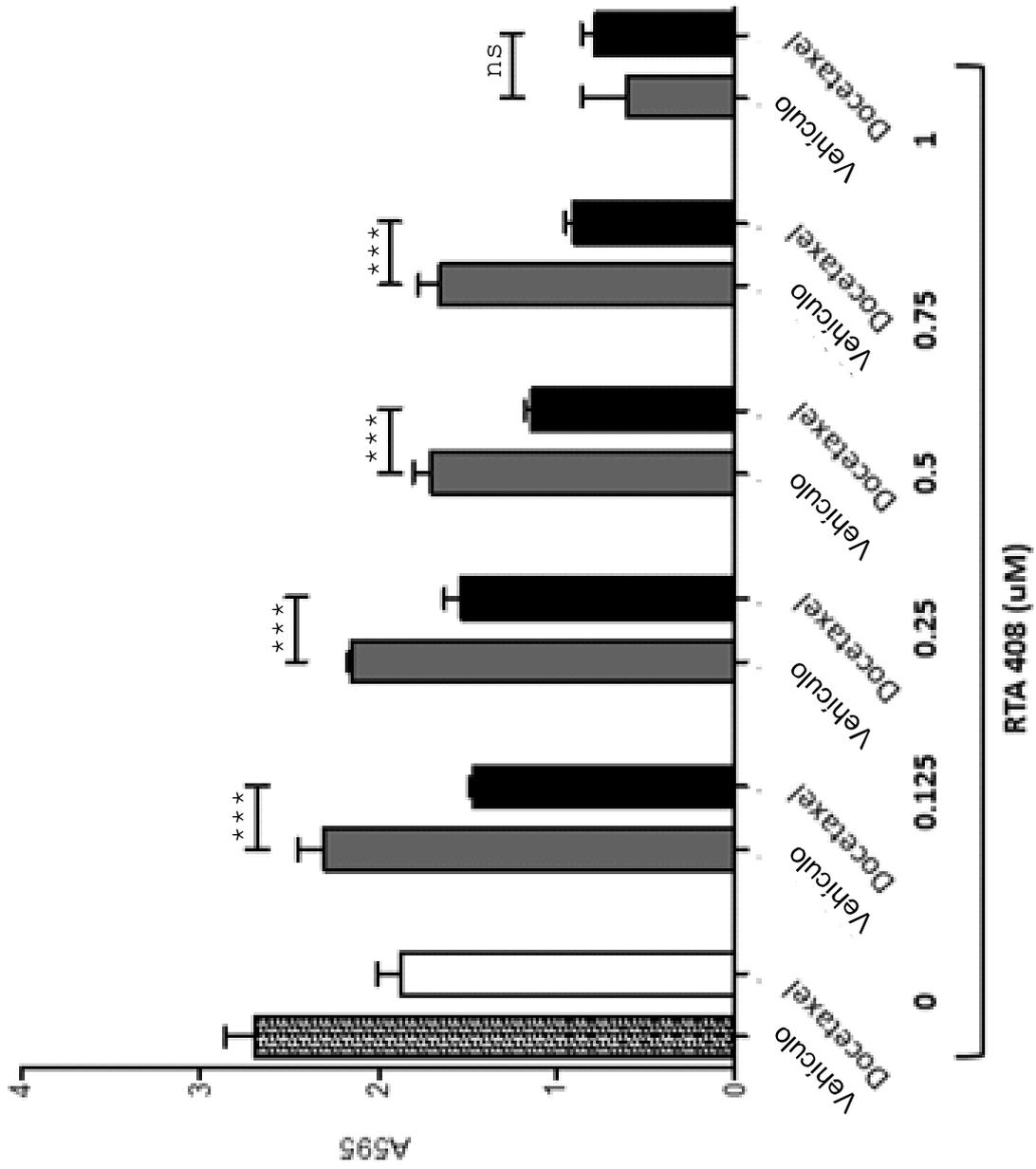
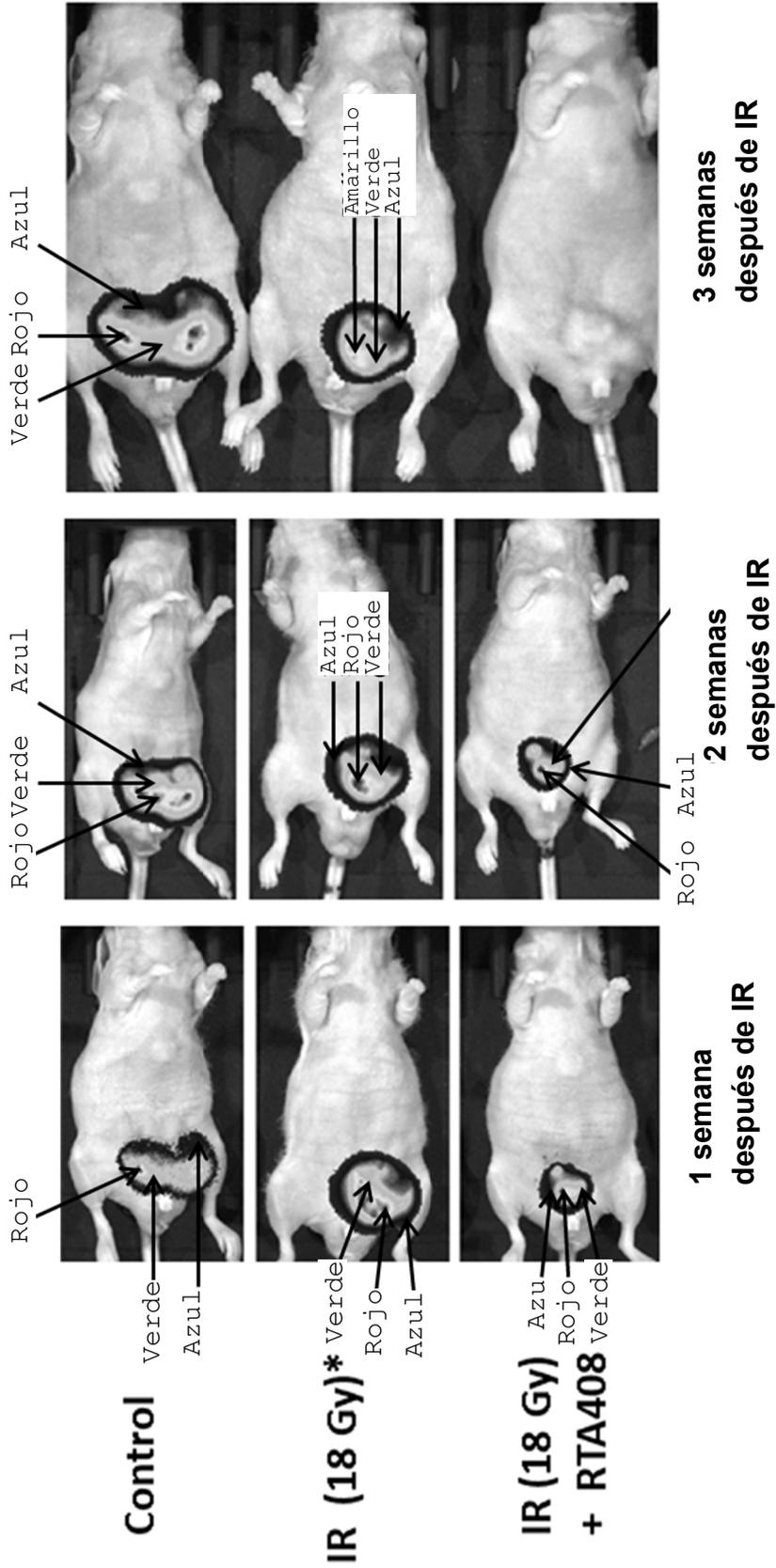


FIG. 48b



* Dosis única de IR administrada al área pélvica de animales que portan tumor

FIG. 49

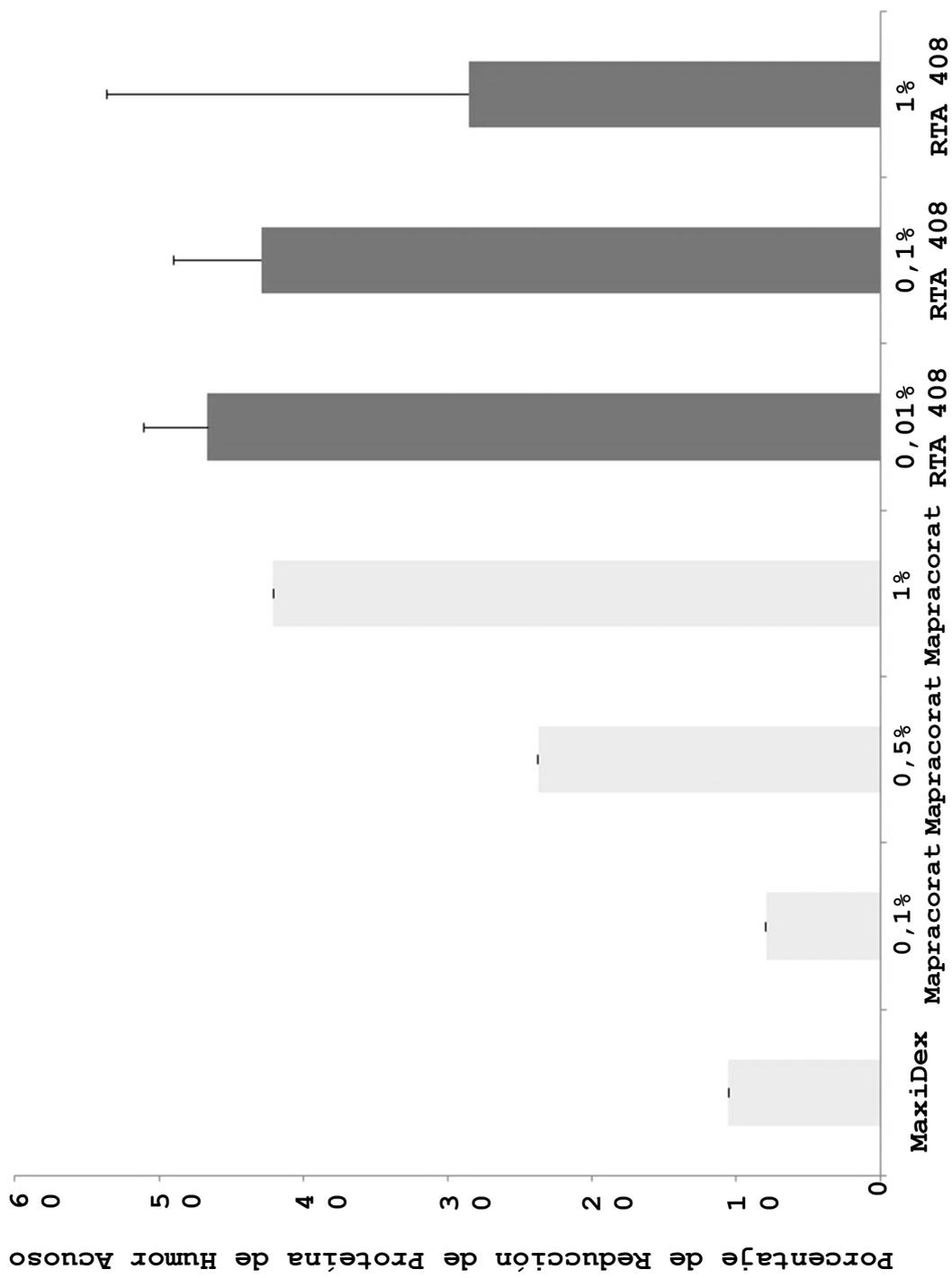


FIG. 50

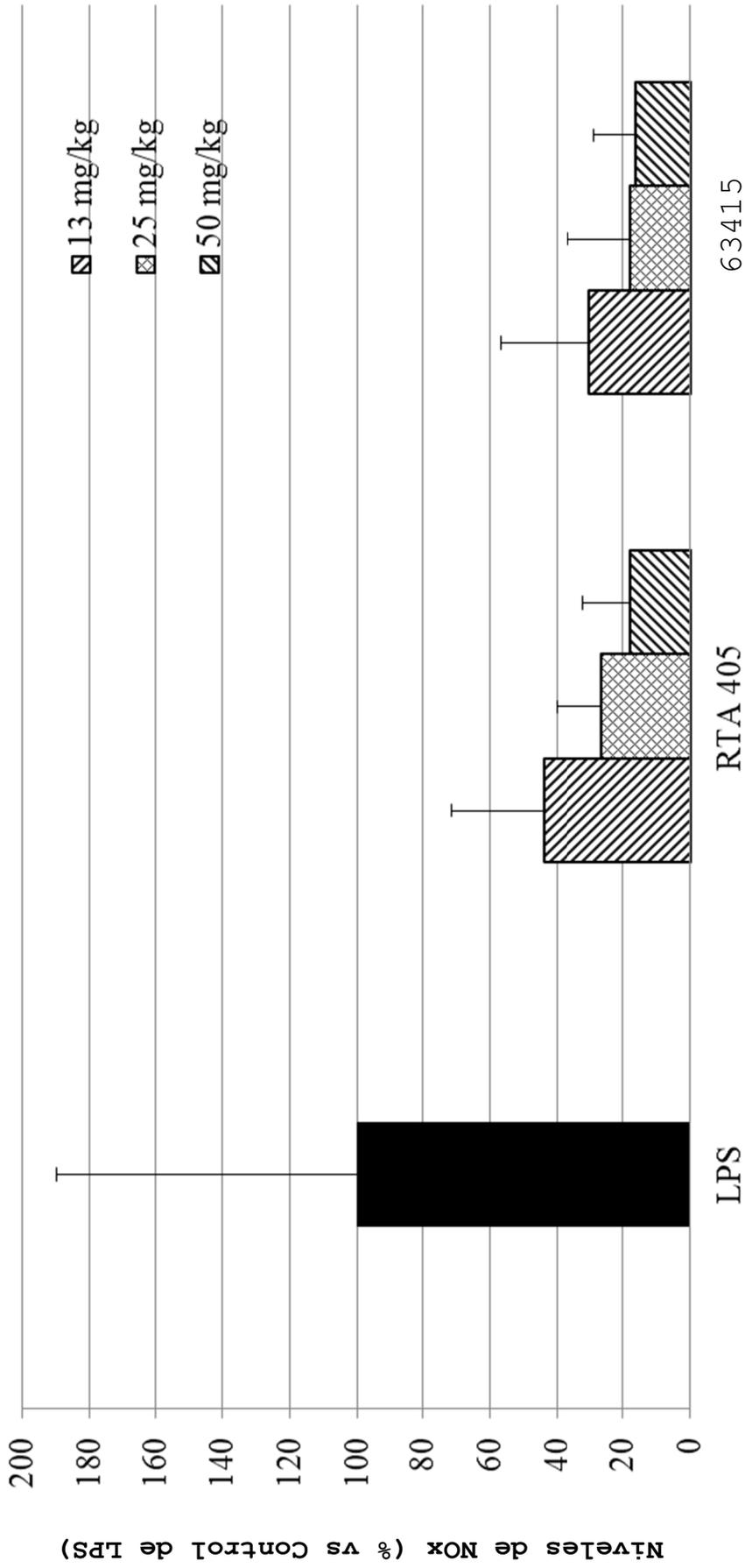


FIG. 51

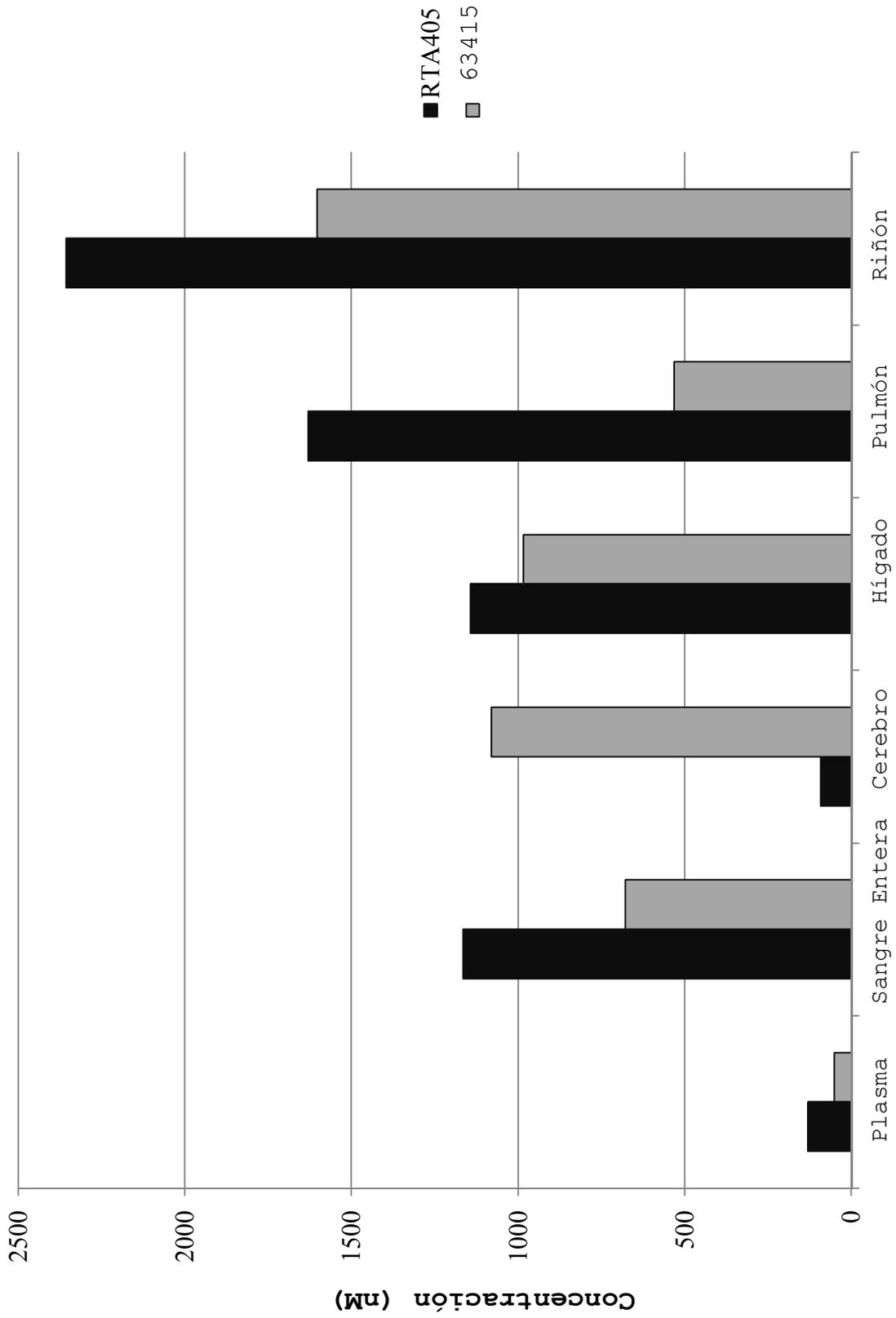


FIG. 52

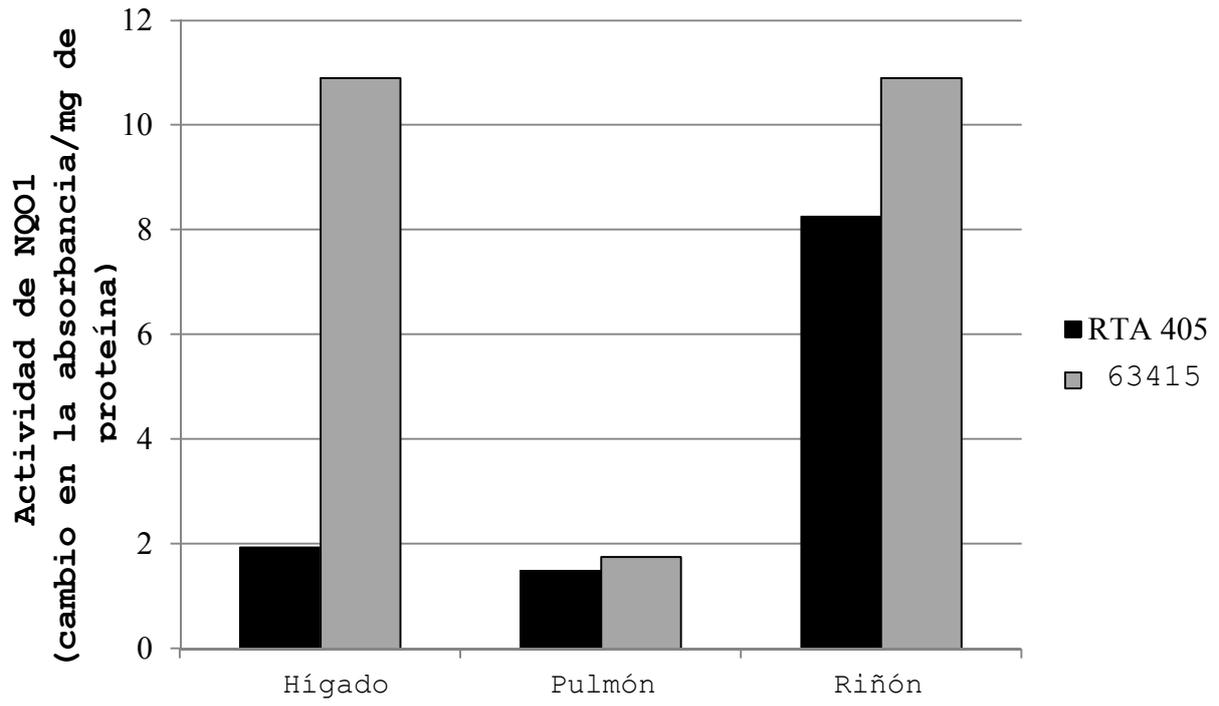


FIG. 53

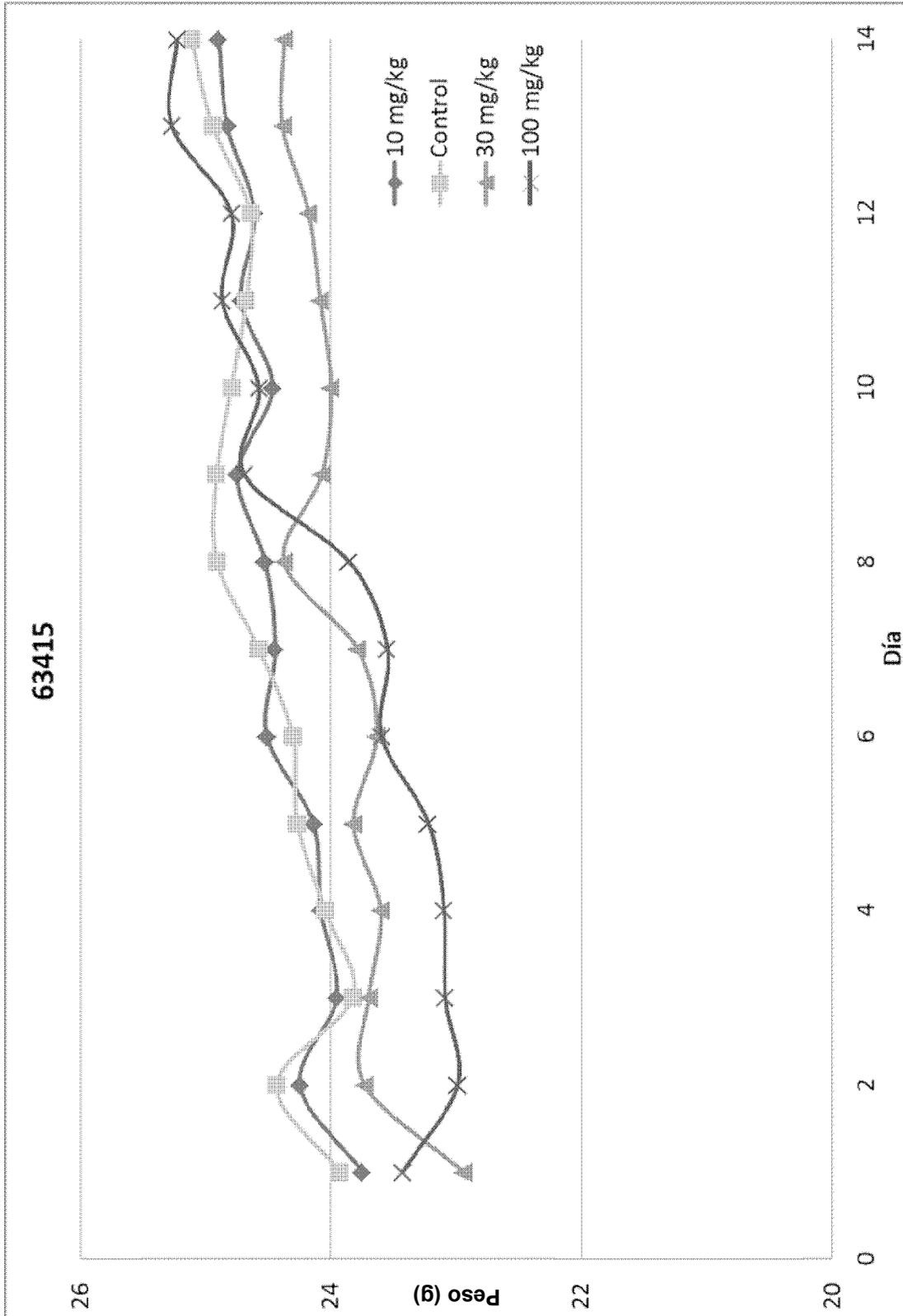


FIG. 54

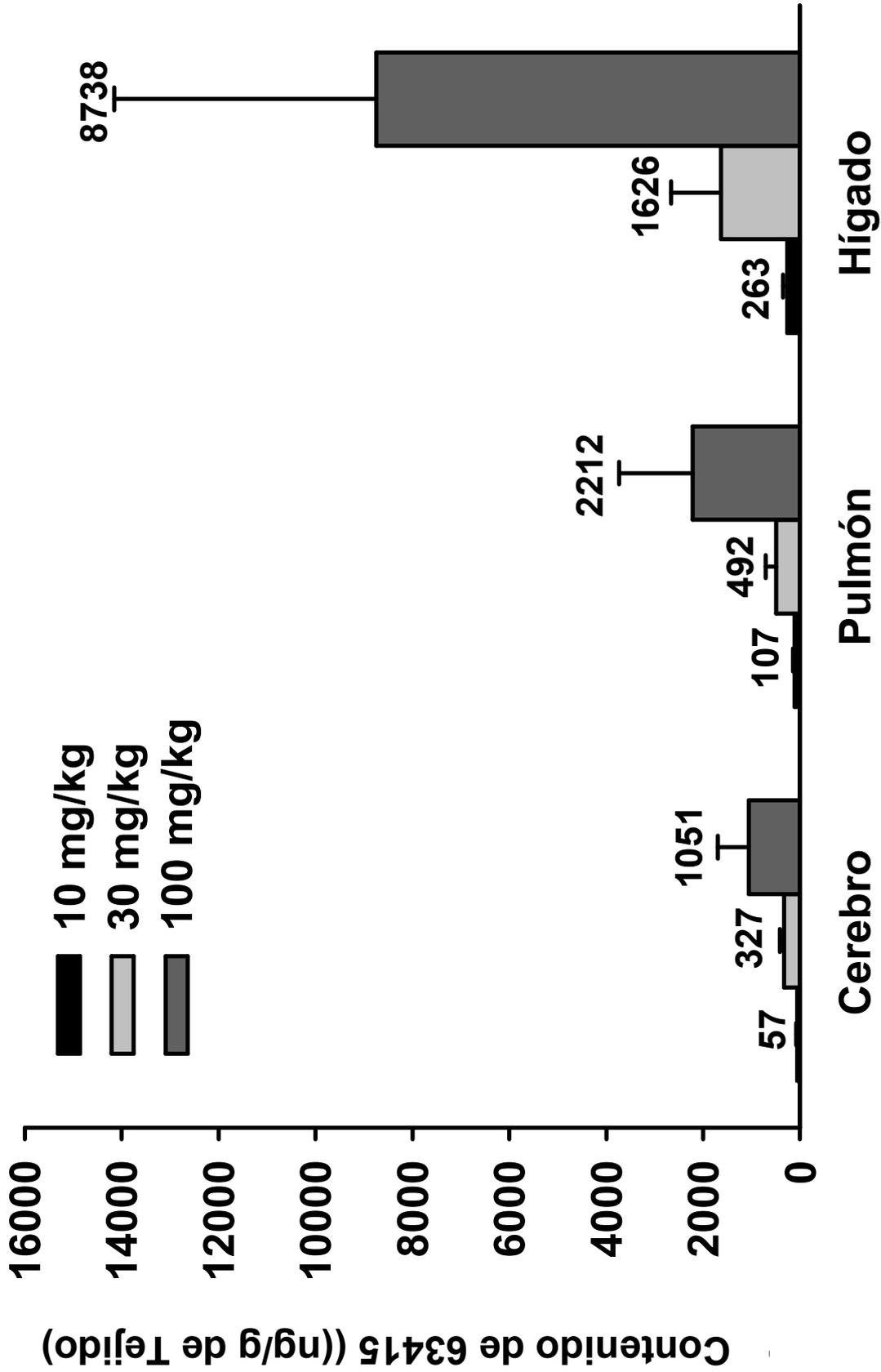


FIG. 55

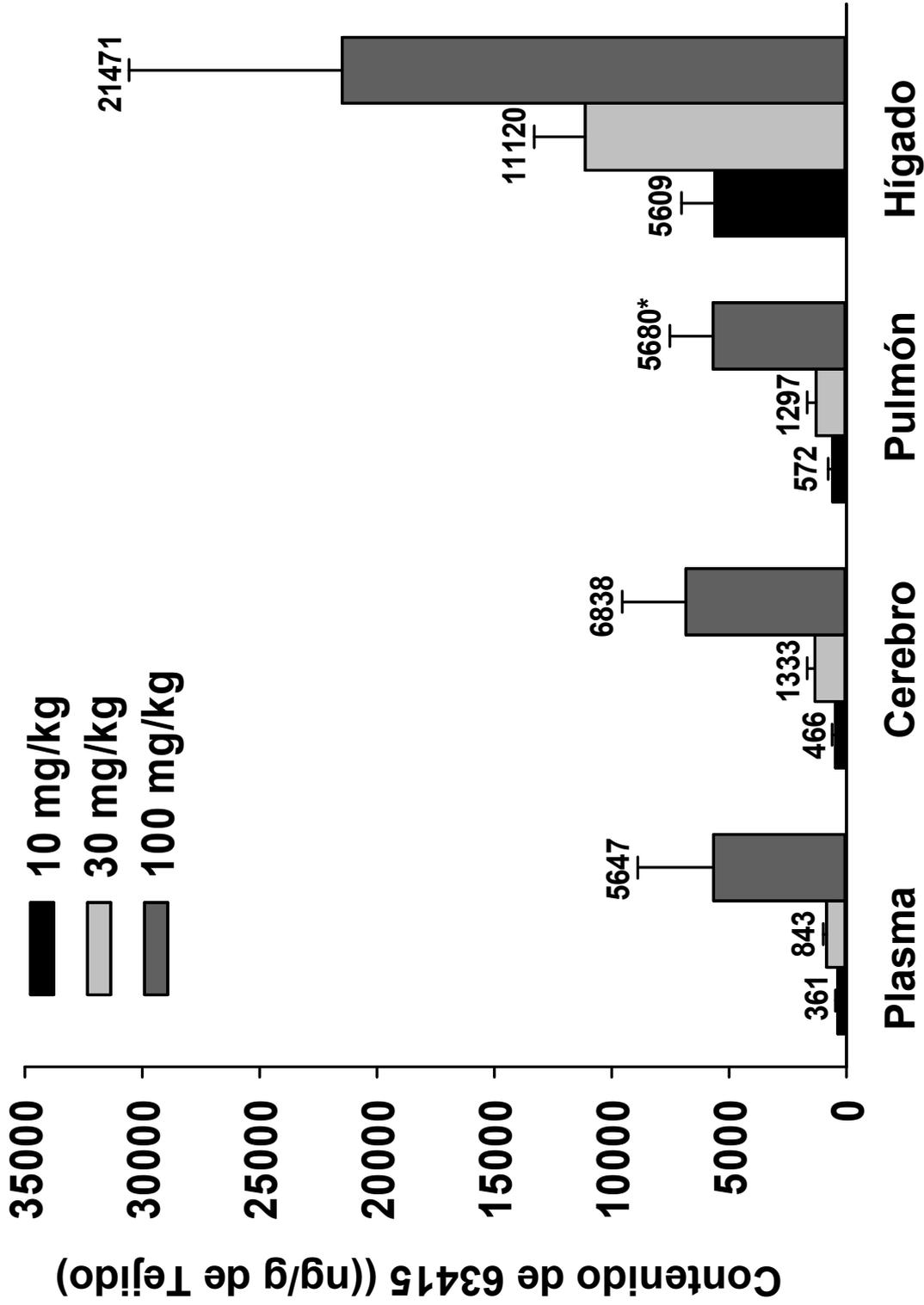


FIG. 56

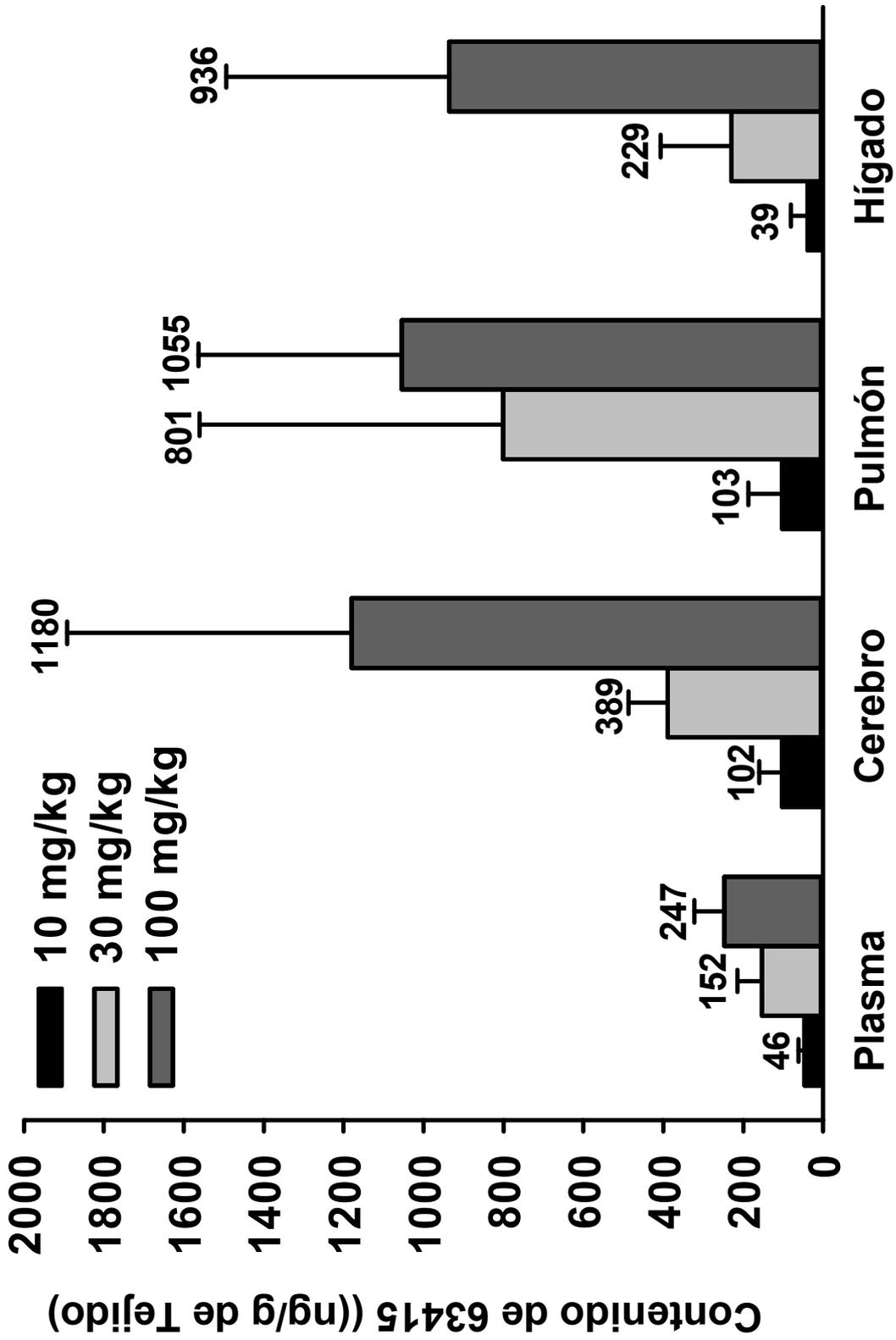


FIG. 57

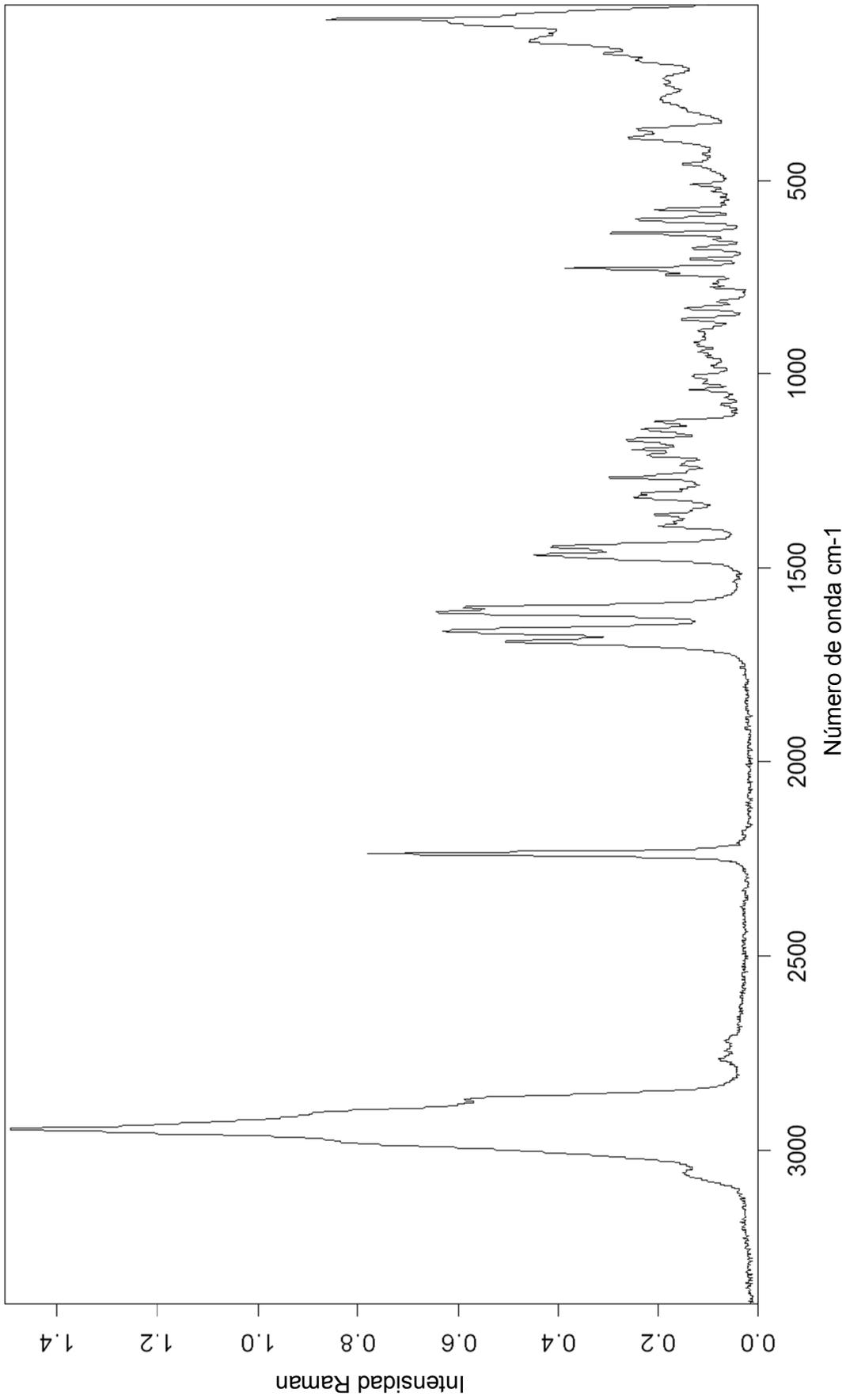


FIG. 58

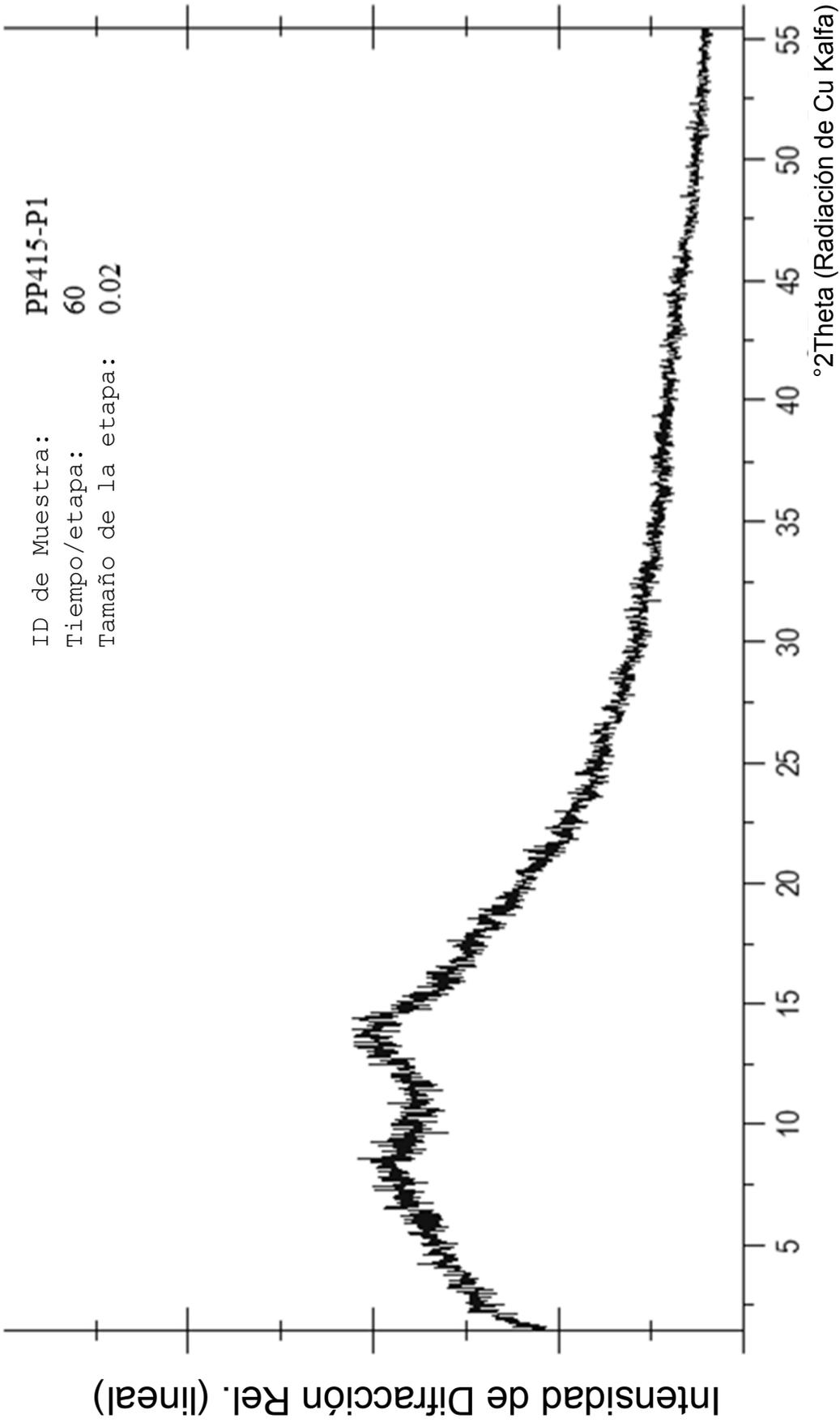


FIG. 59

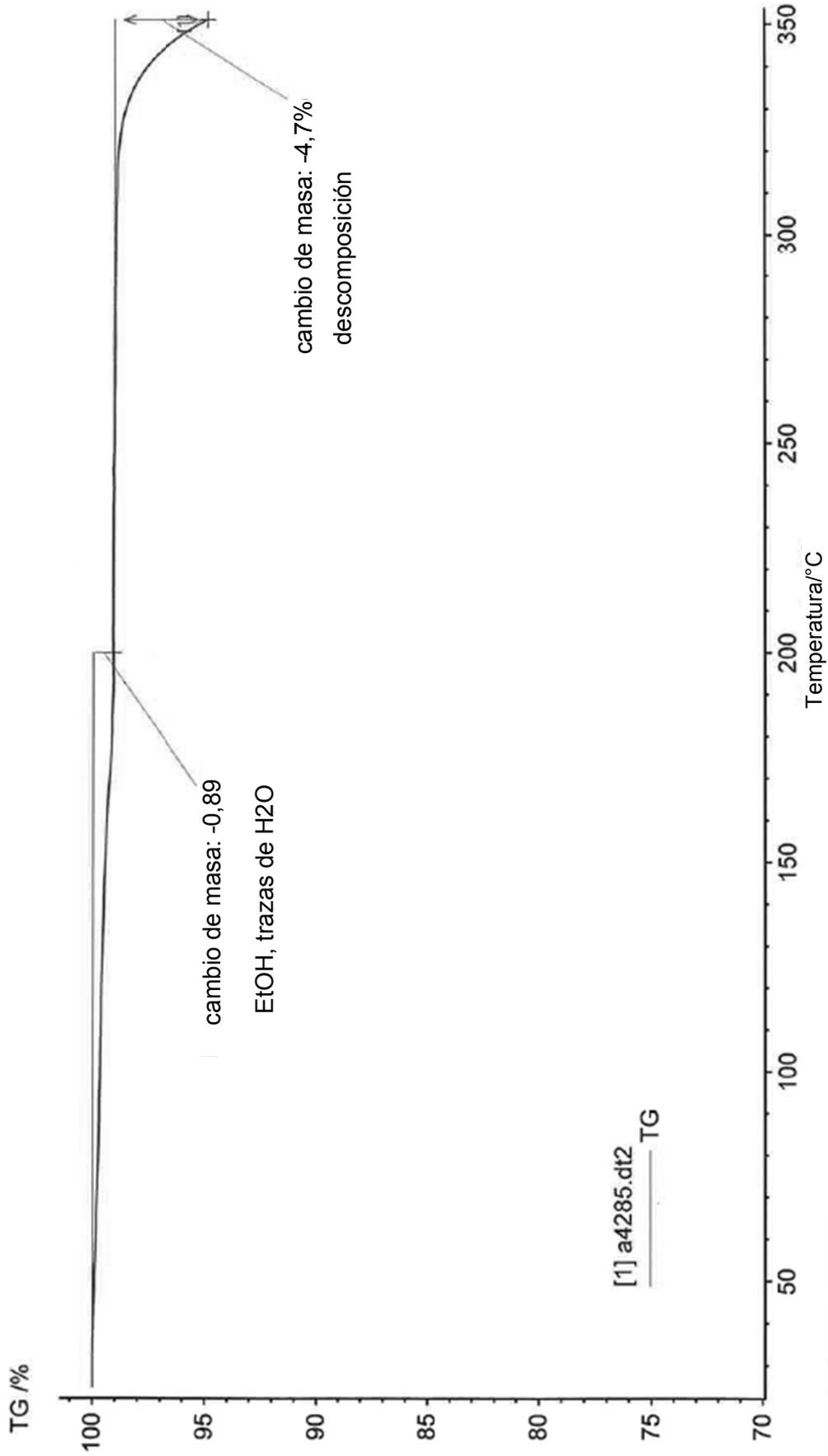


FIG. 60

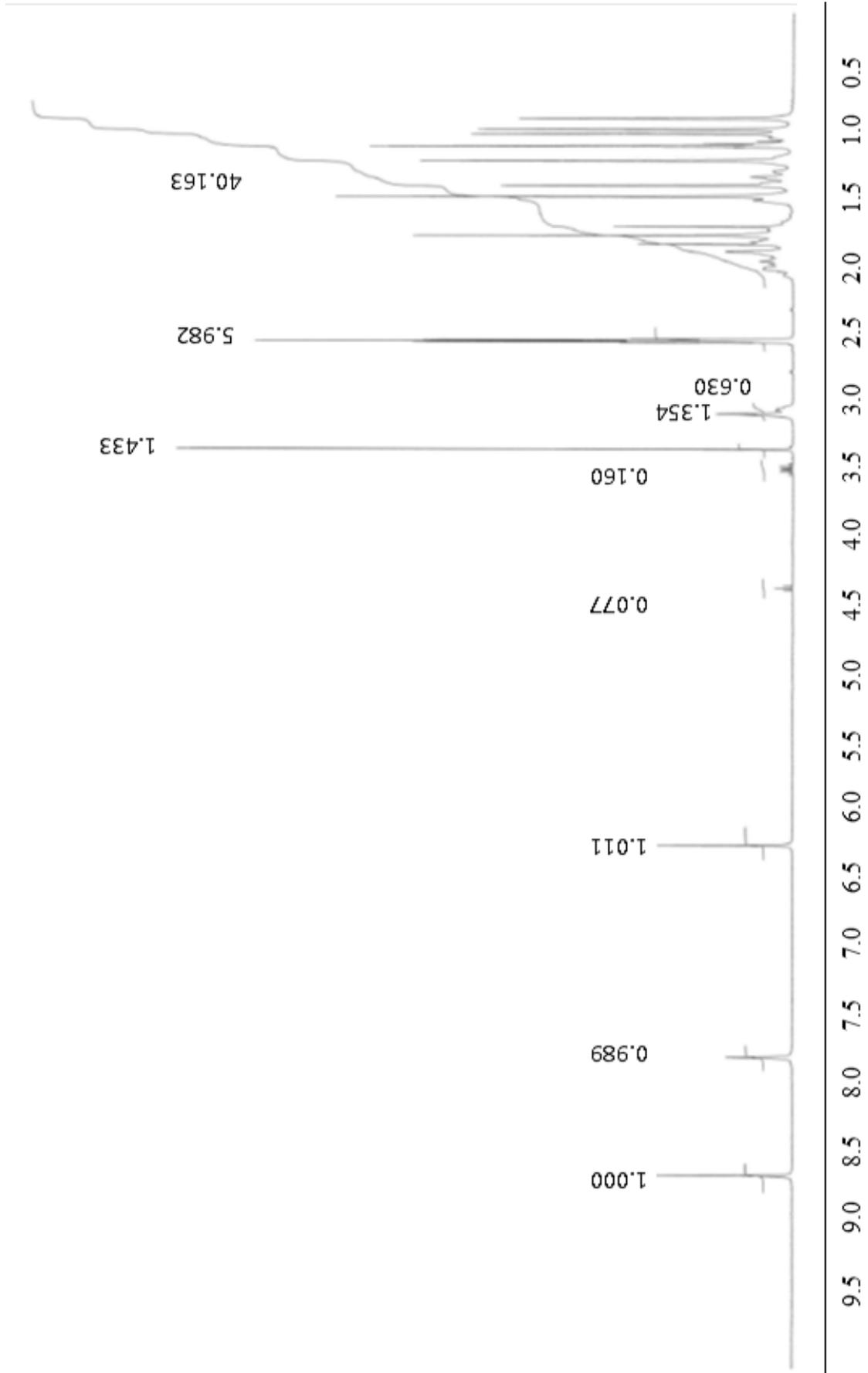


FIG. 61

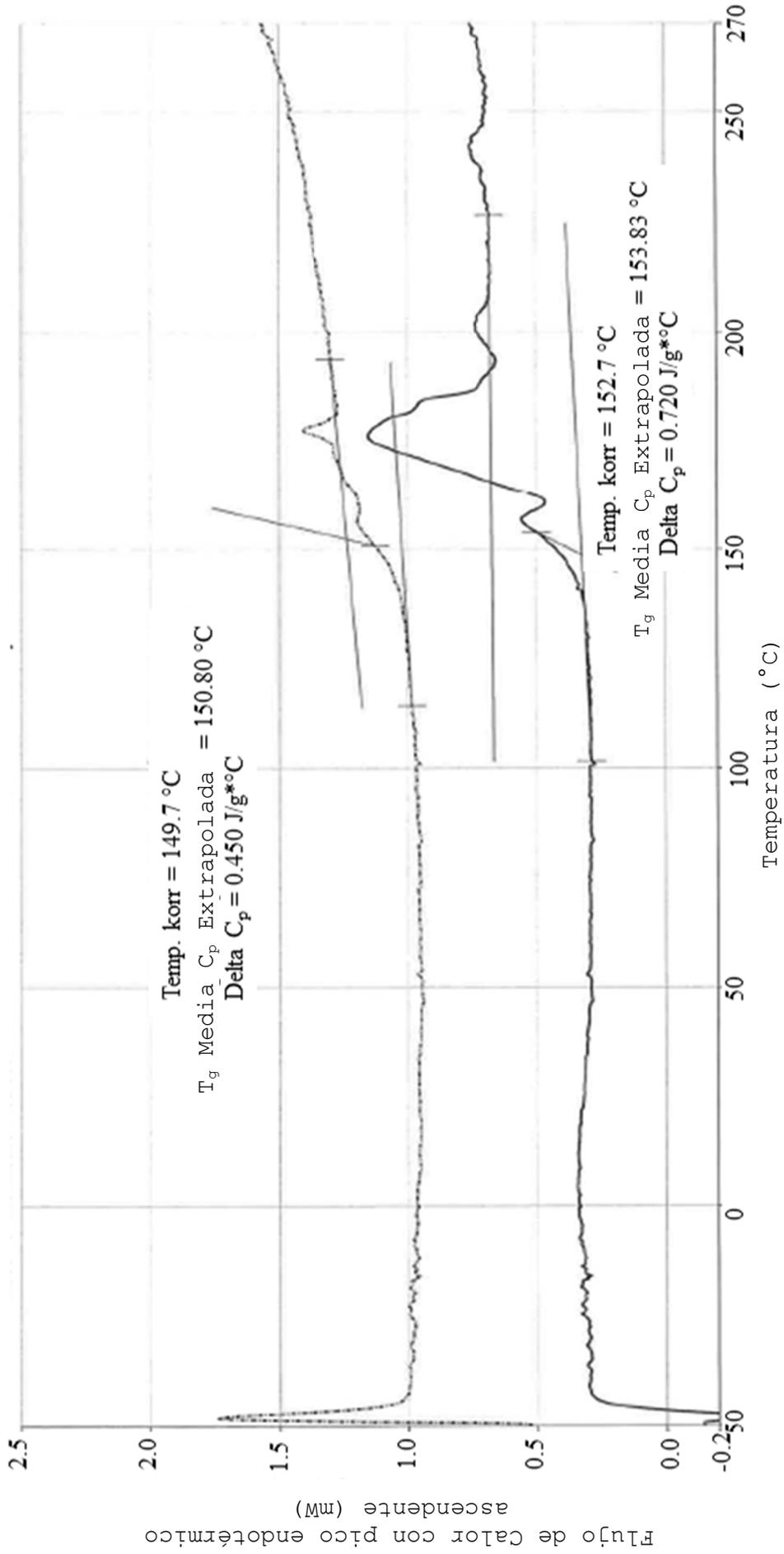


FIG. 62

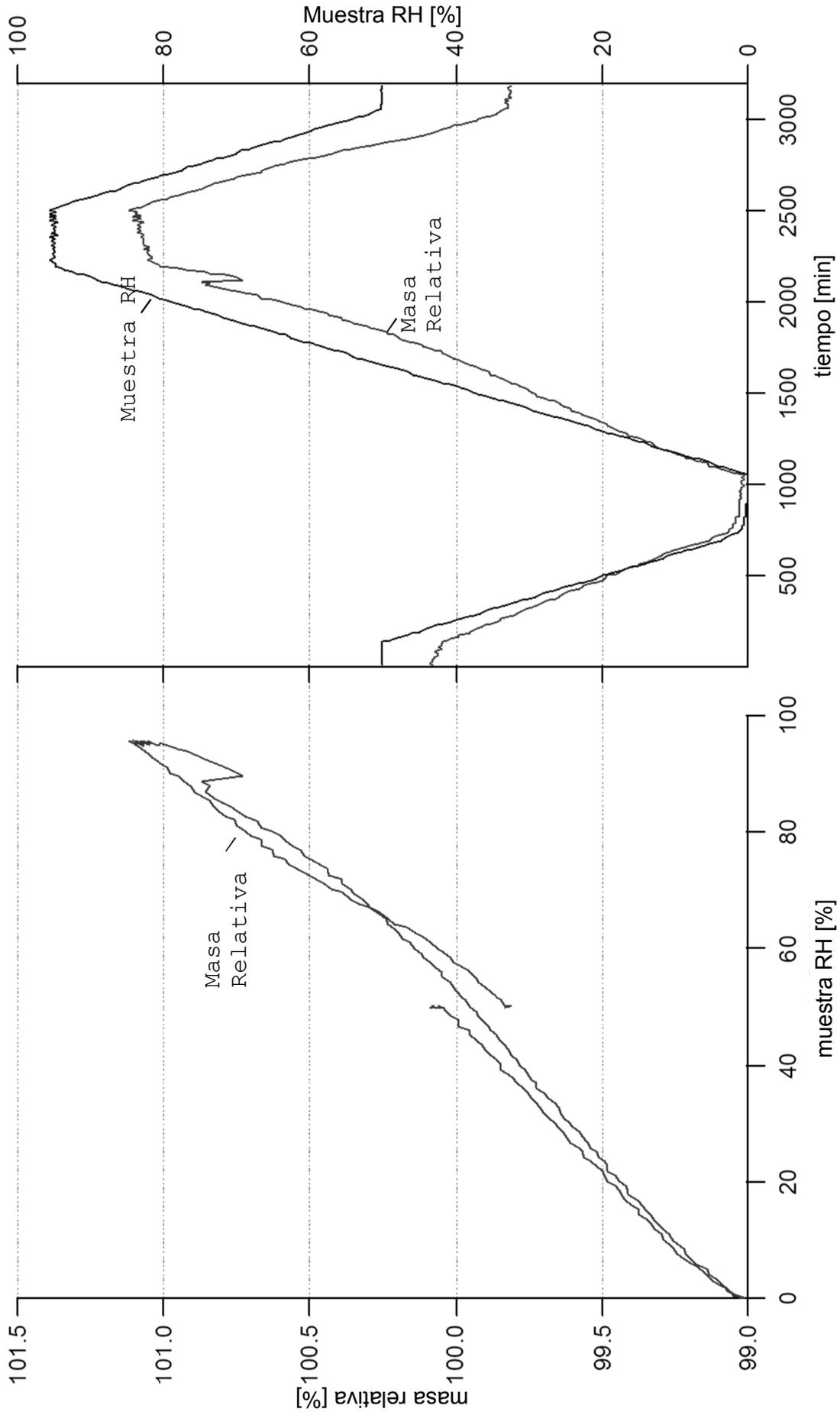


FIG. 63

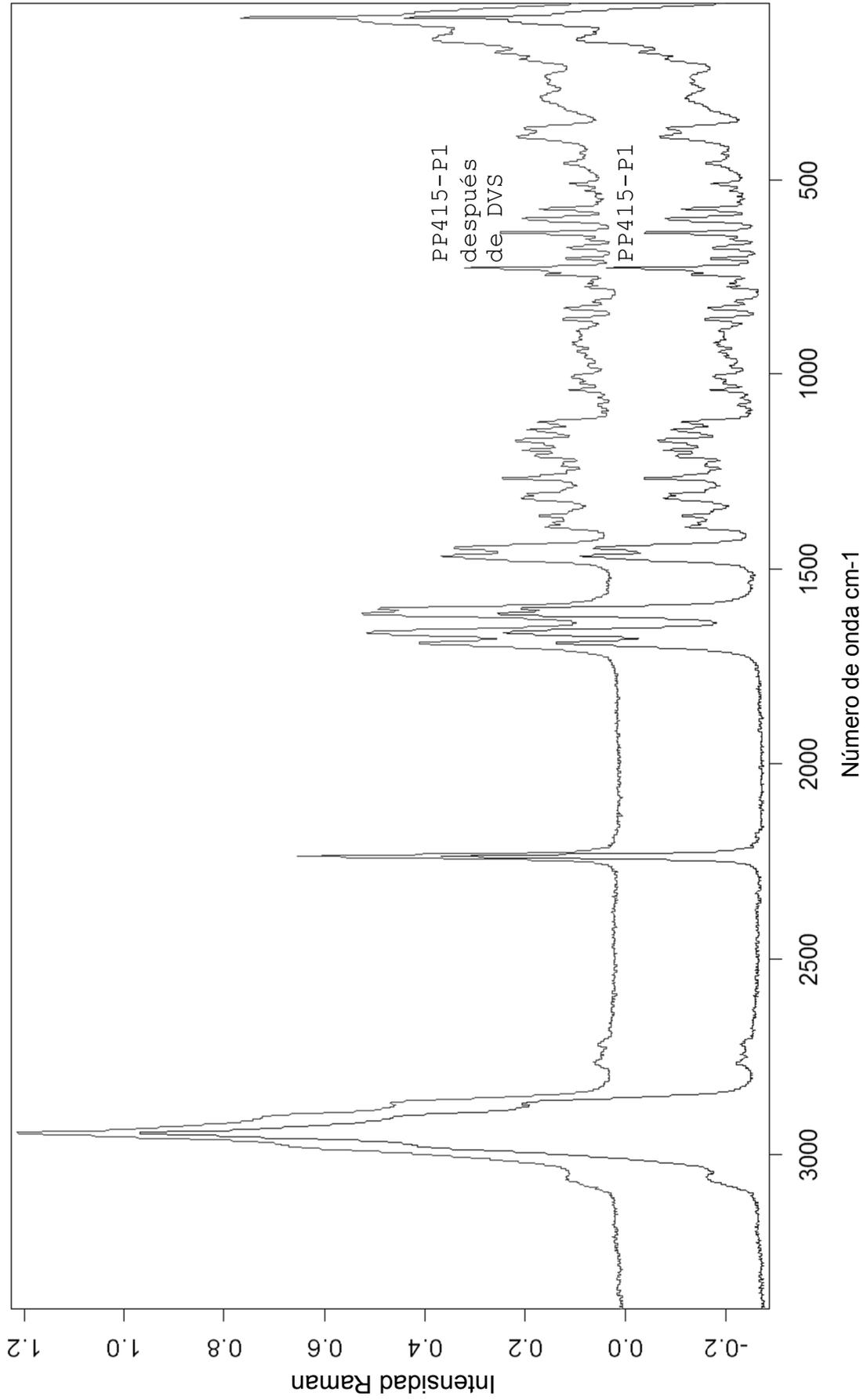


FIG. 64

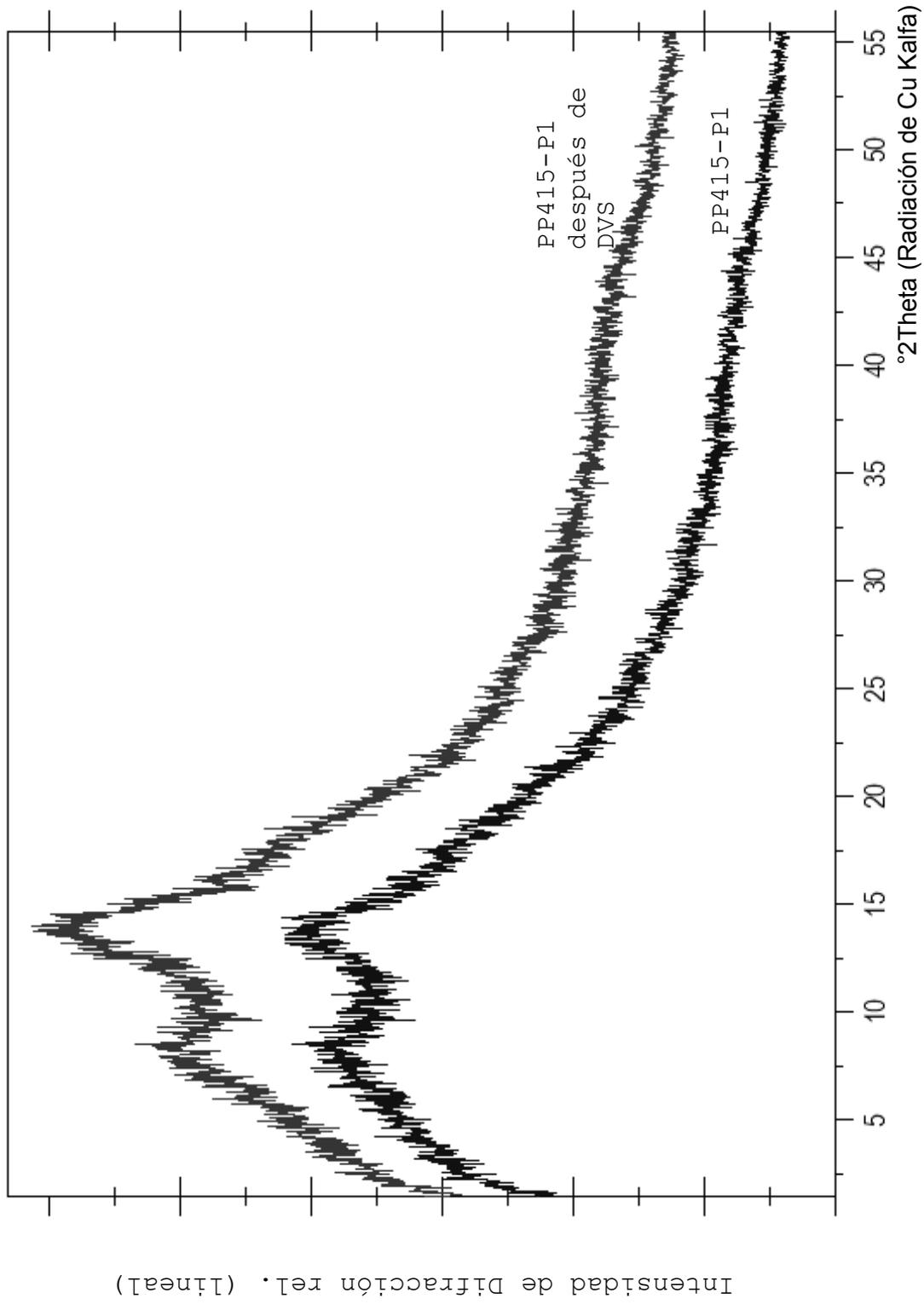


FIG. 65

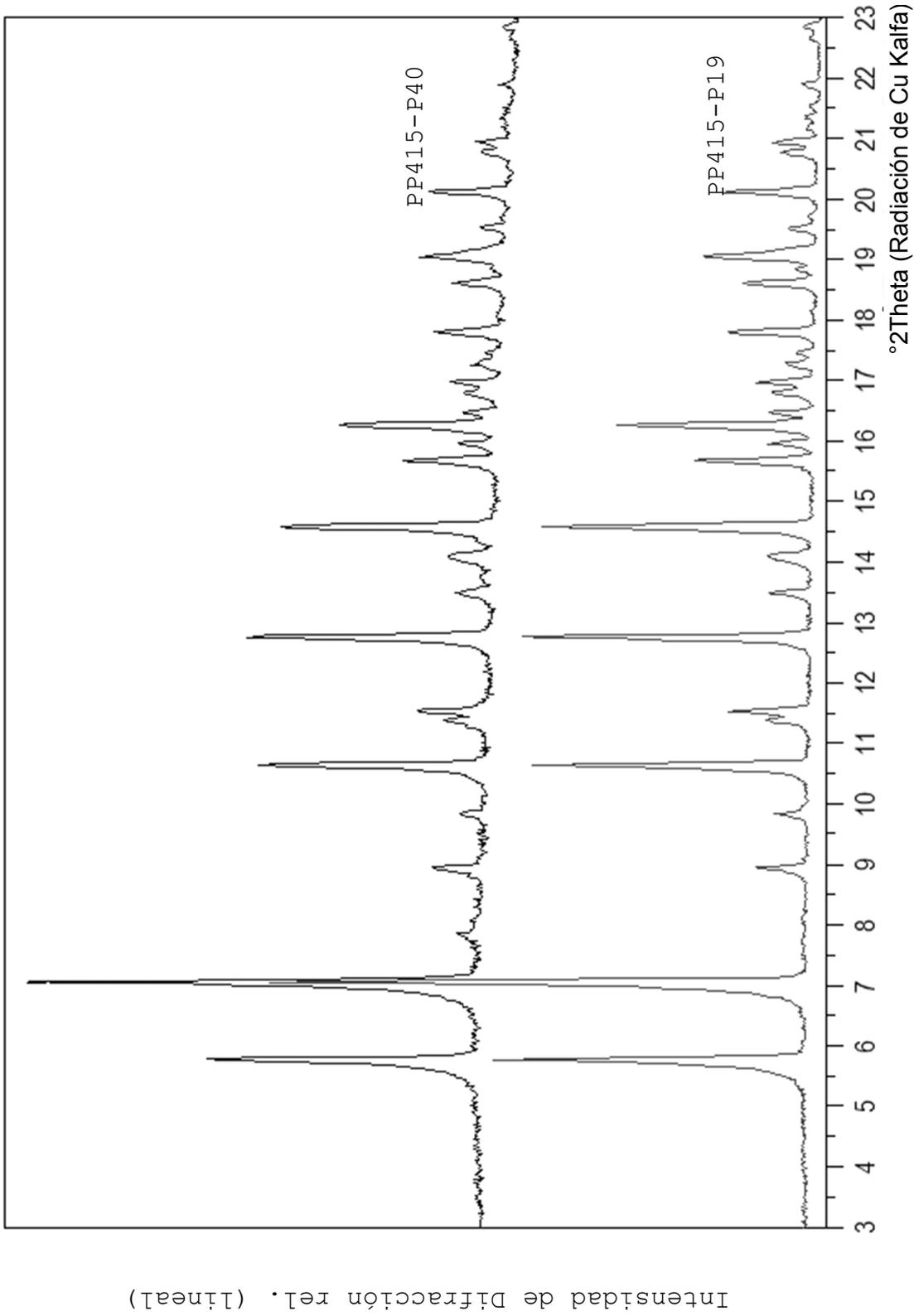


FIG. 66

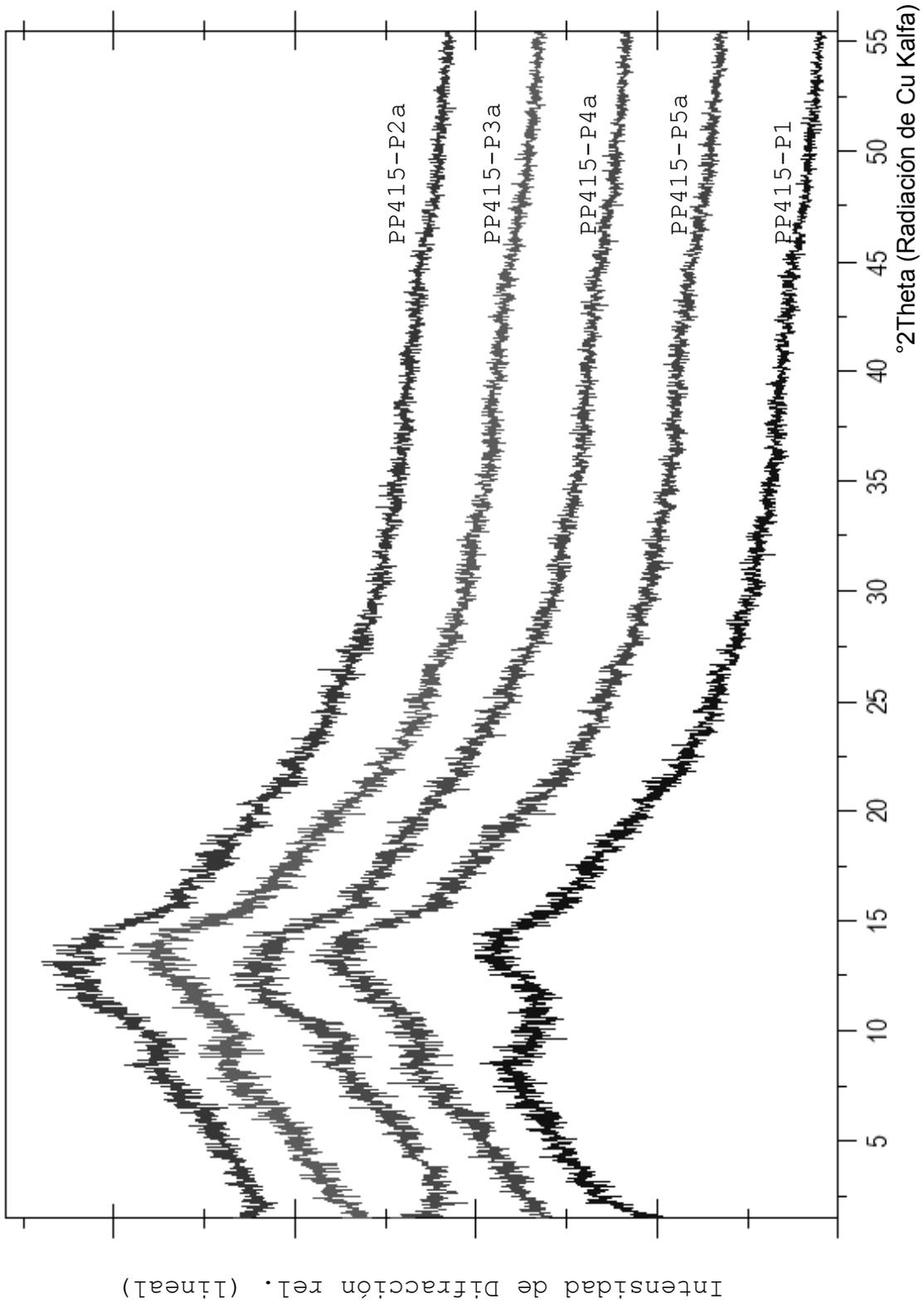


FIG. 67

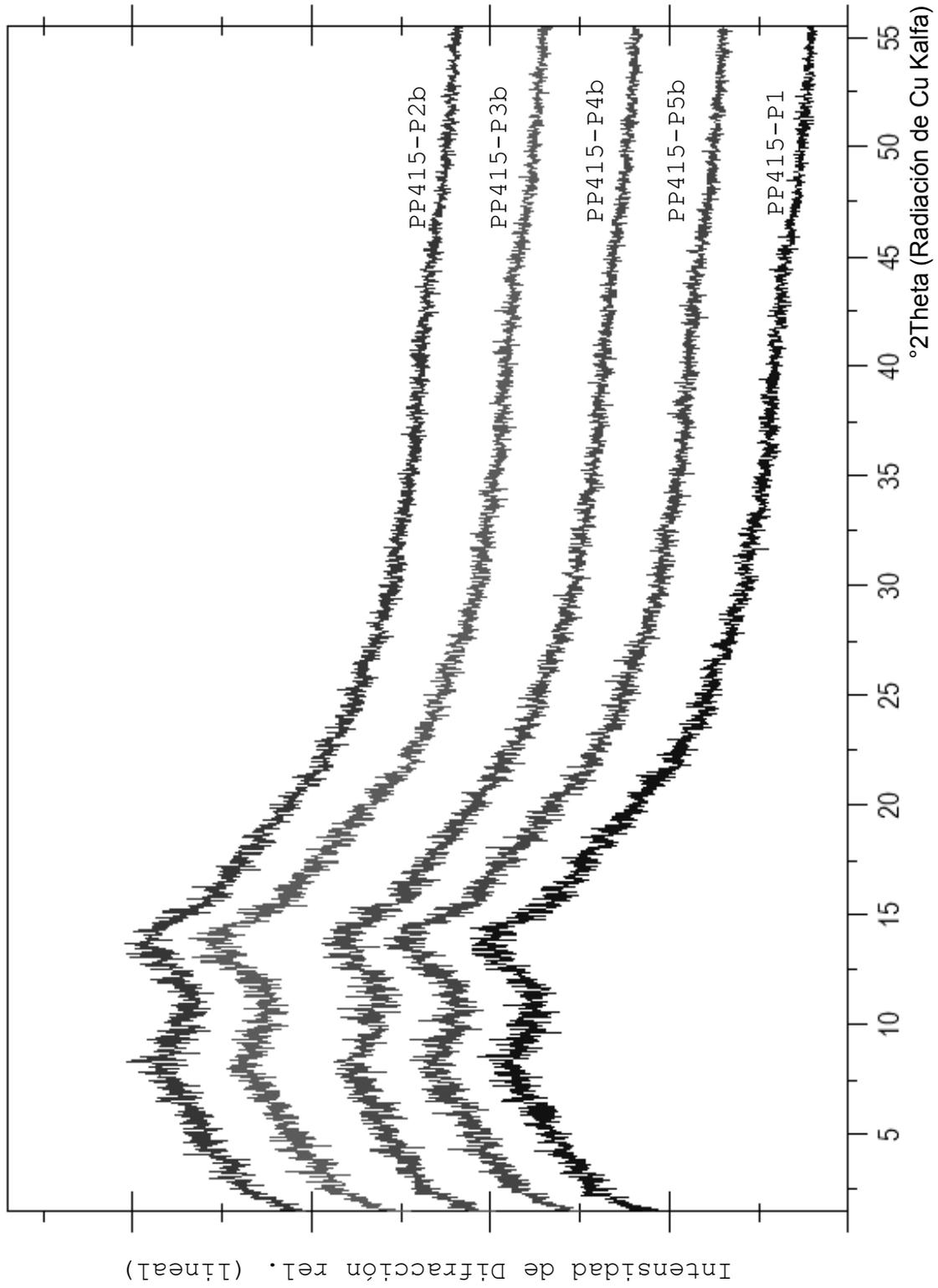


FIG. 68

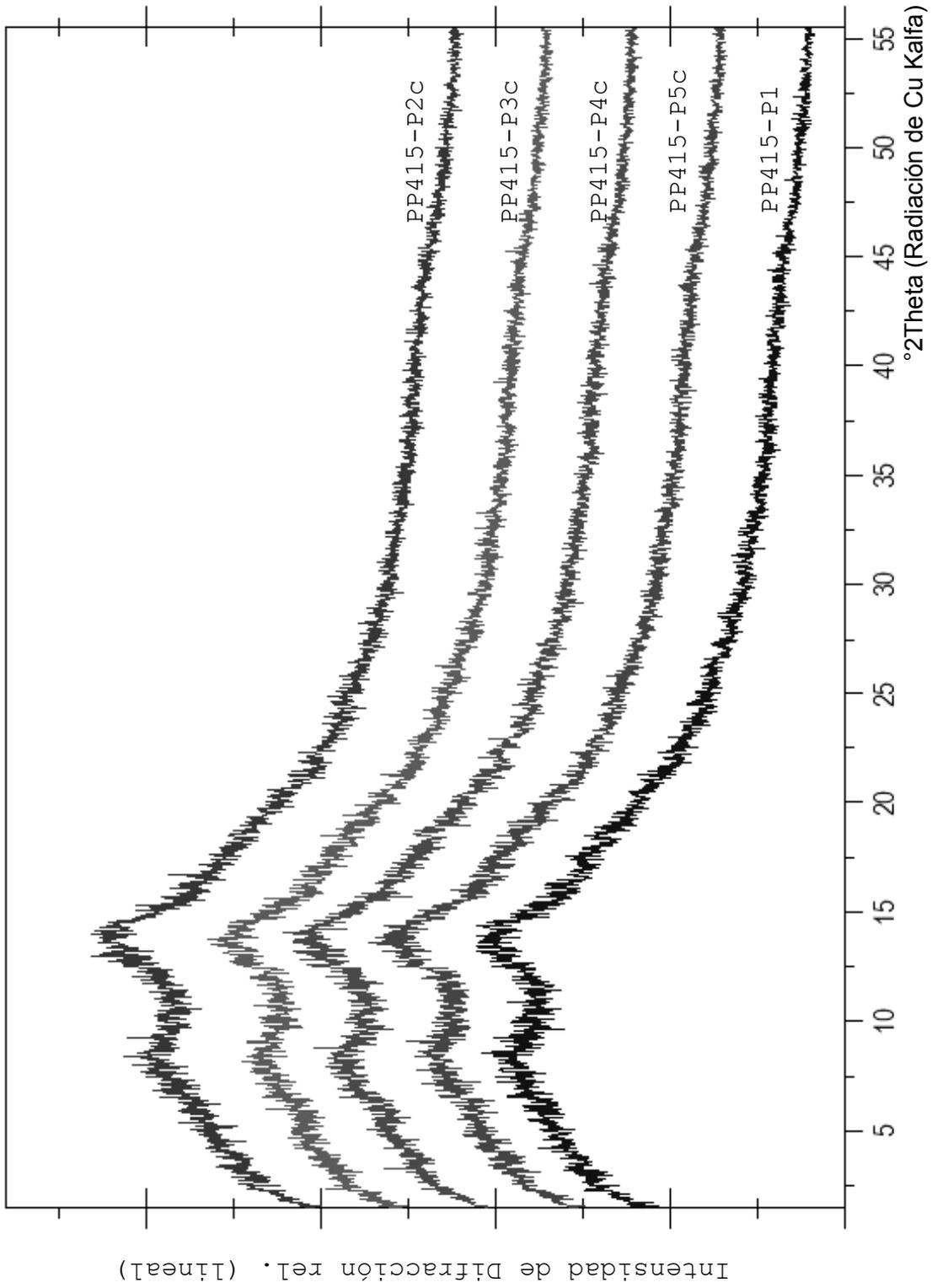


FIG. 69

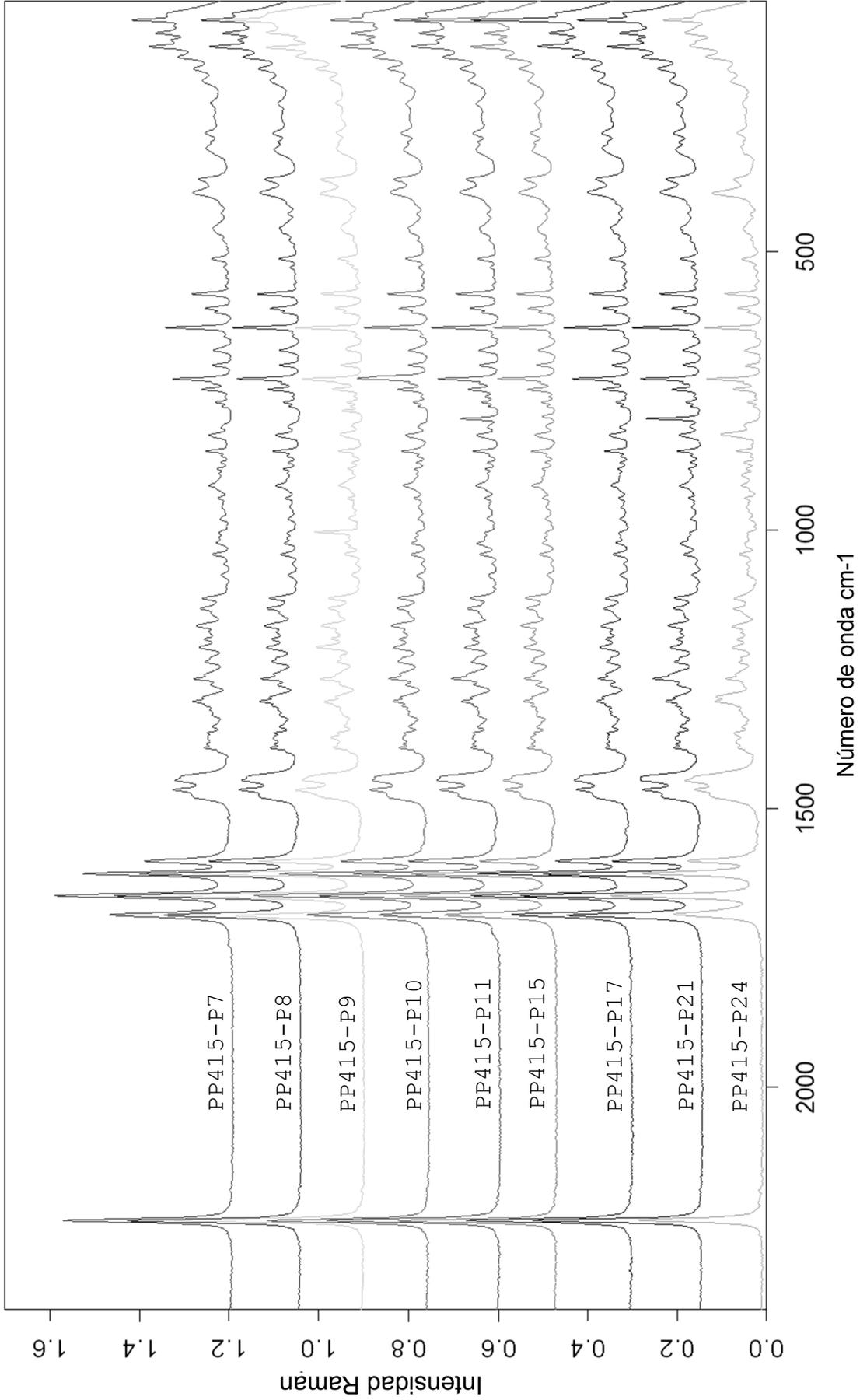


FIG. 70

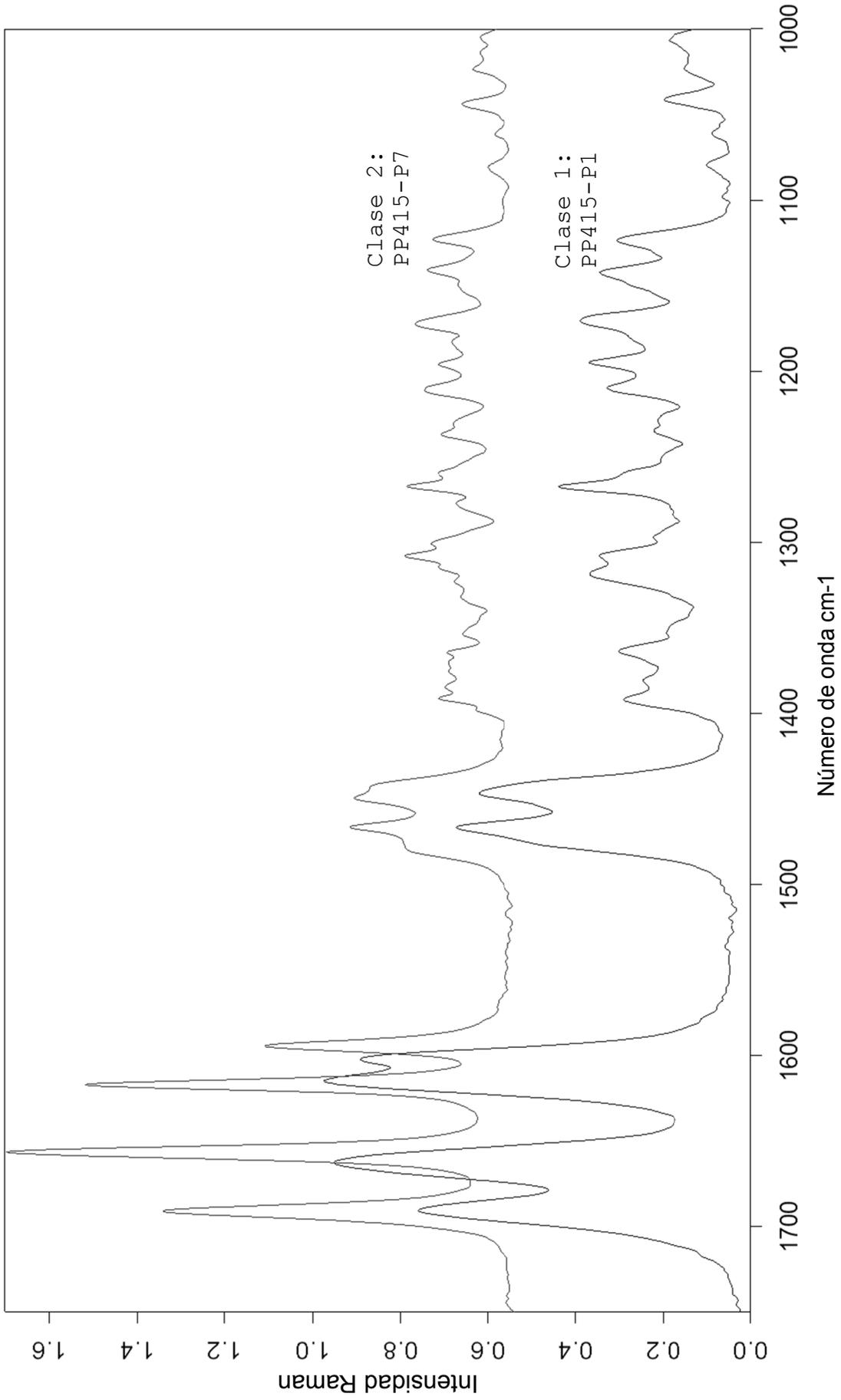


FIG. 71

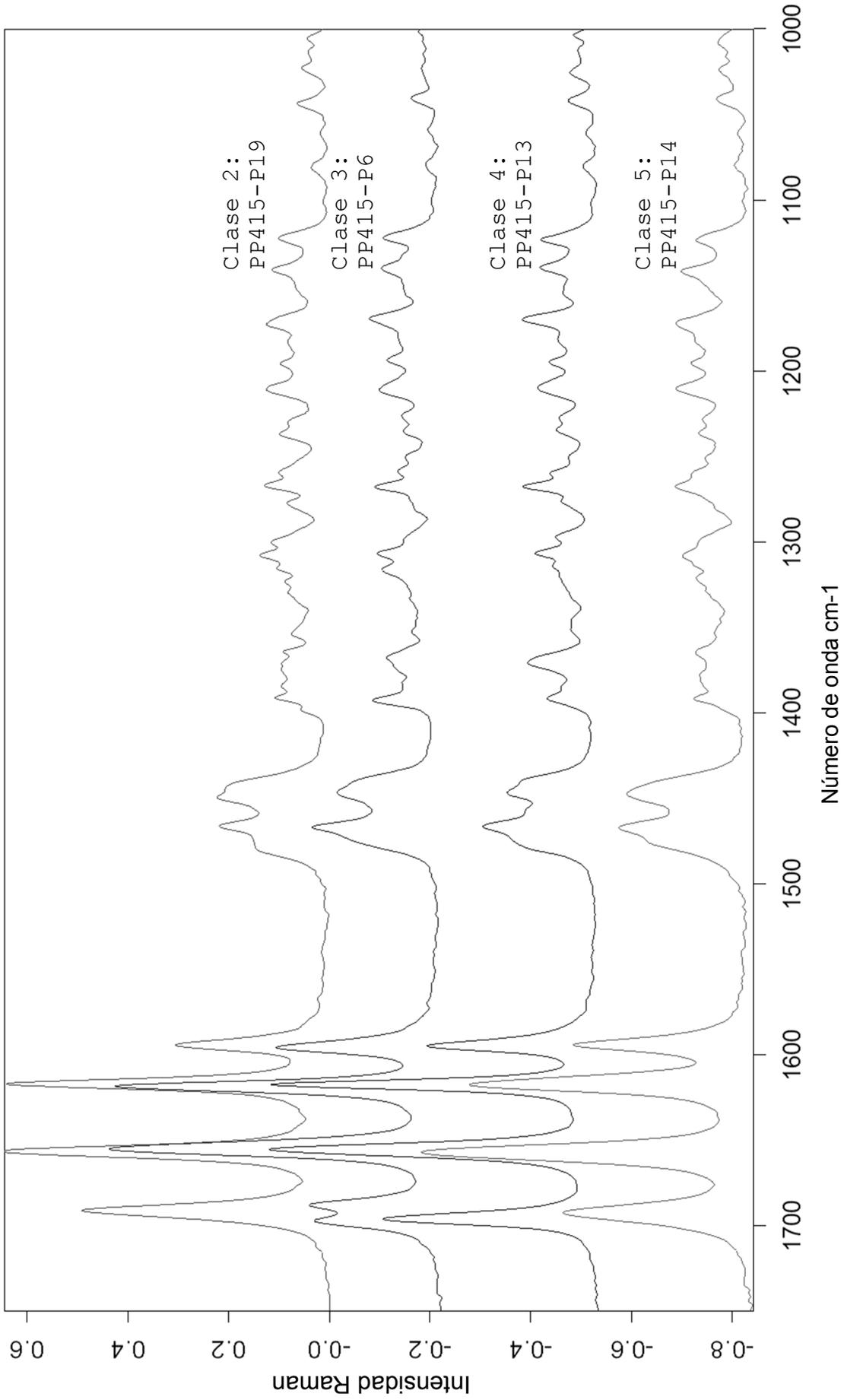


FIG. 72

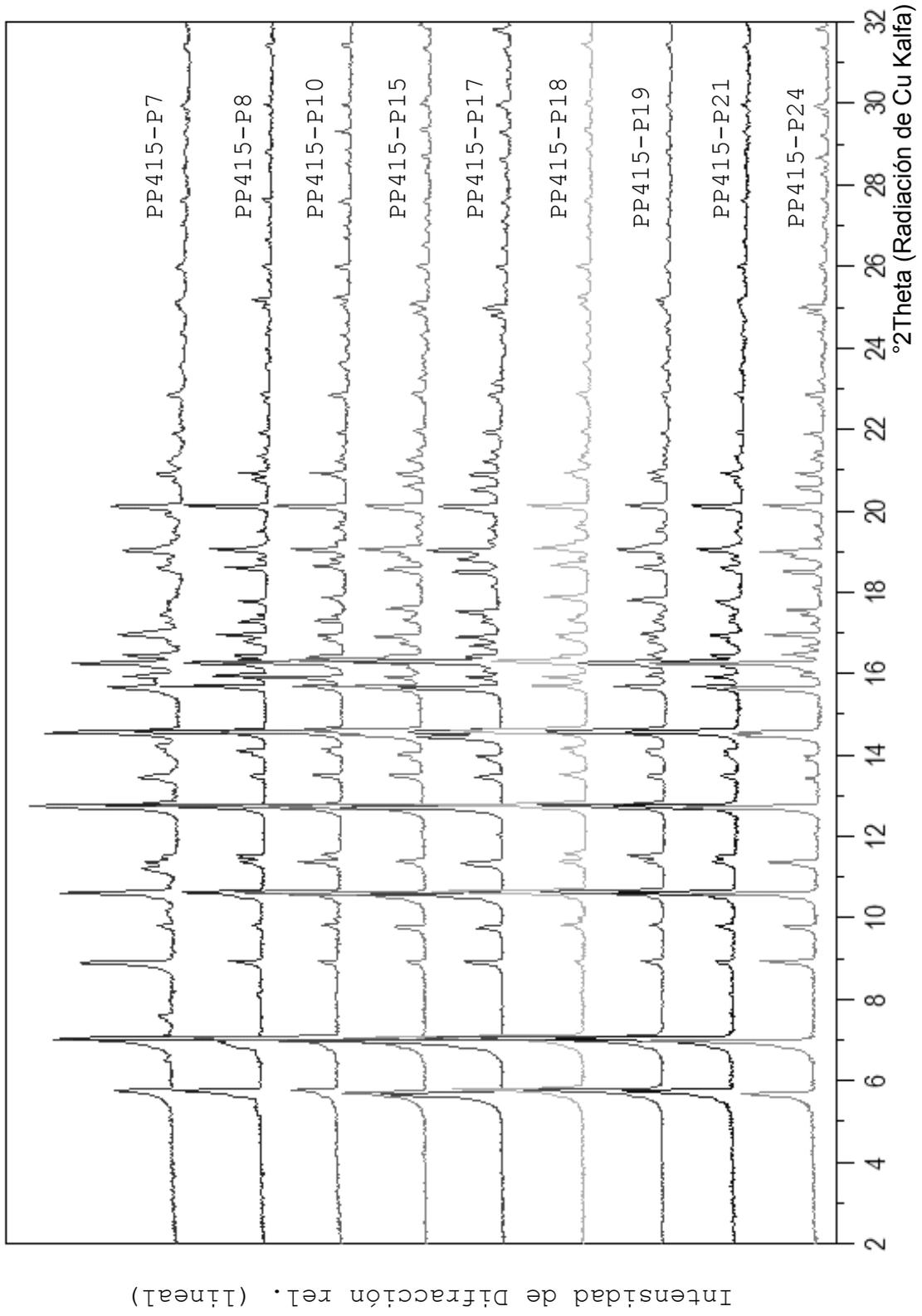


FIG. 73

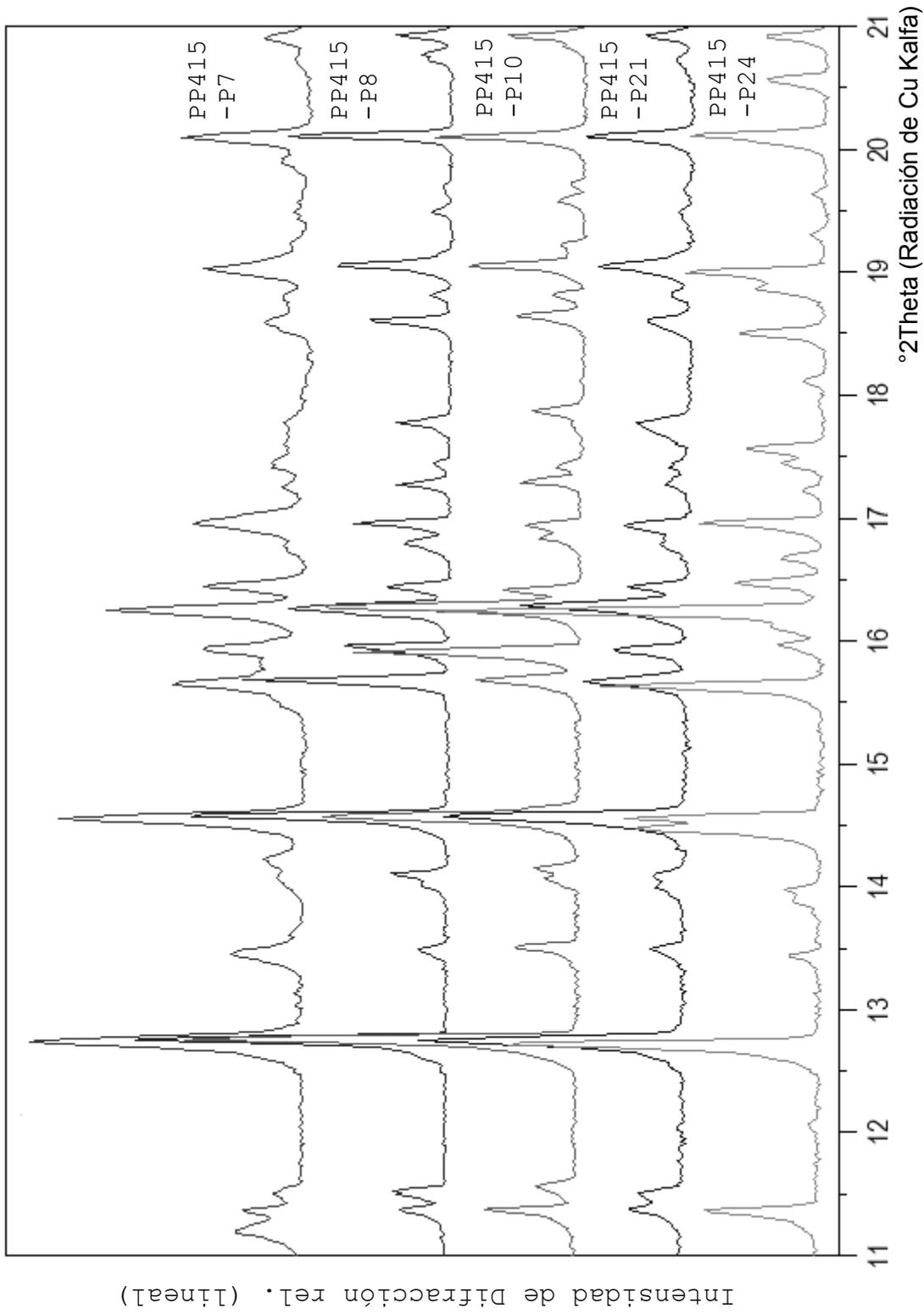


FIG. 74

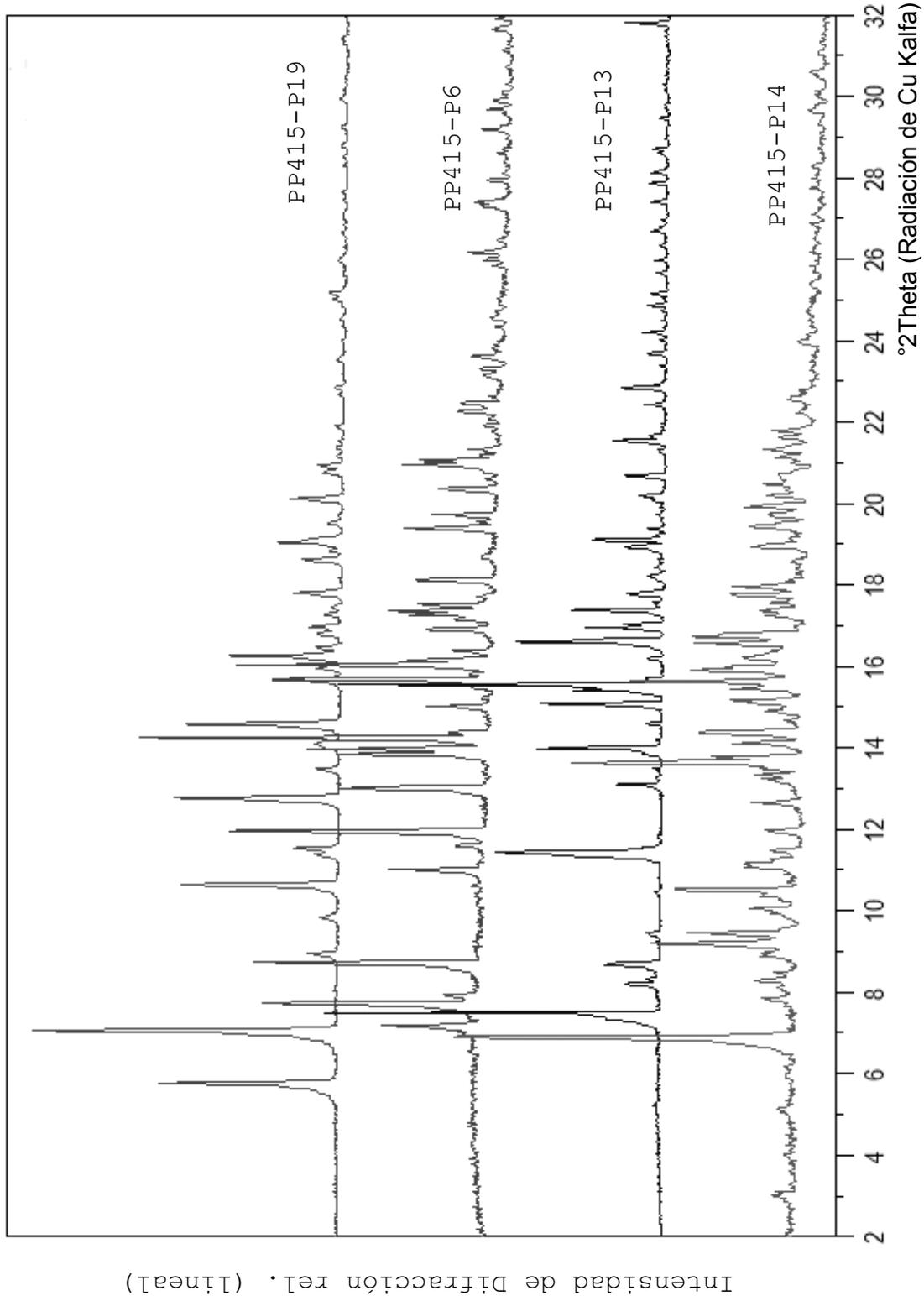


FIG. 75

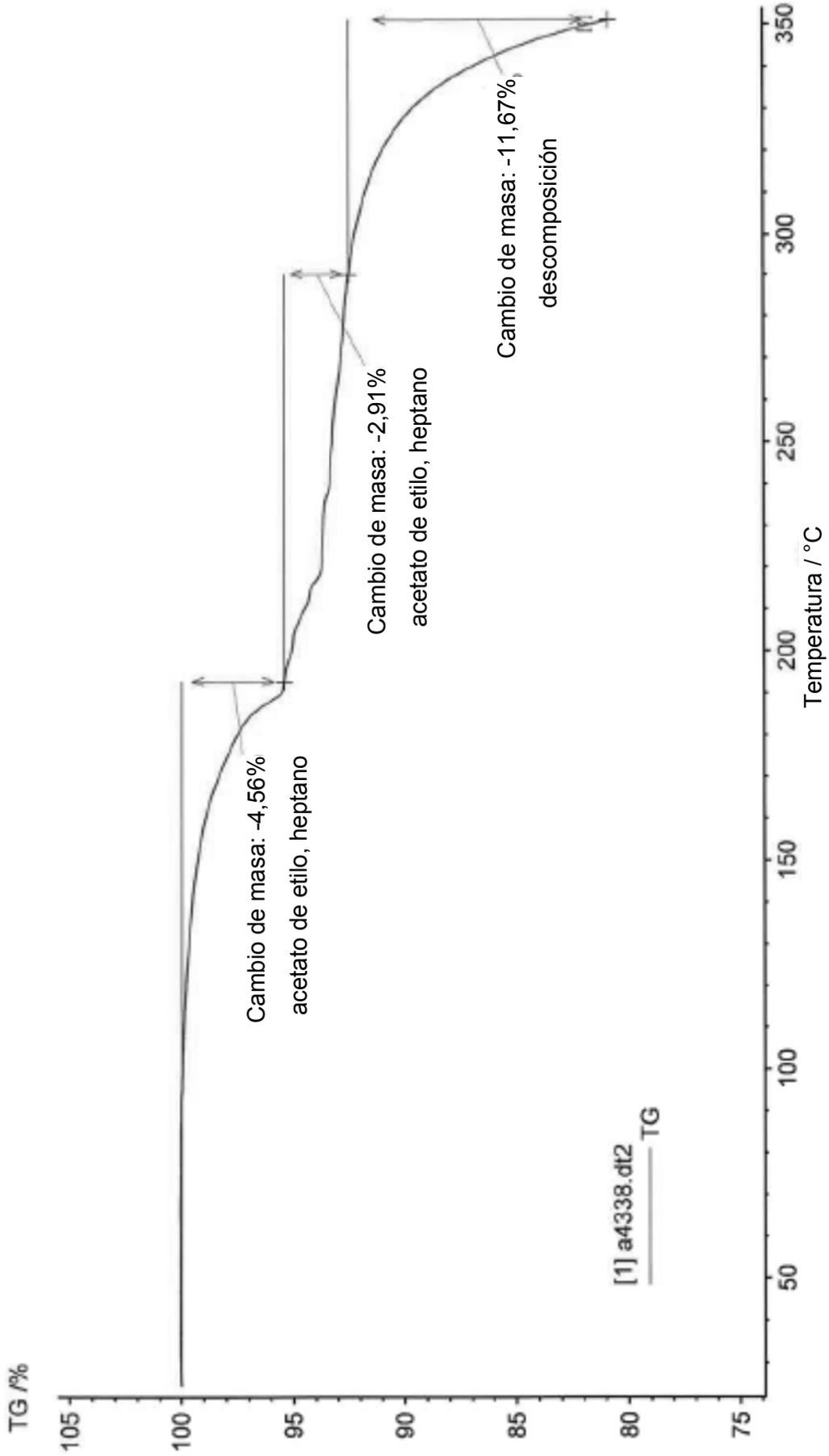


FIG. 76

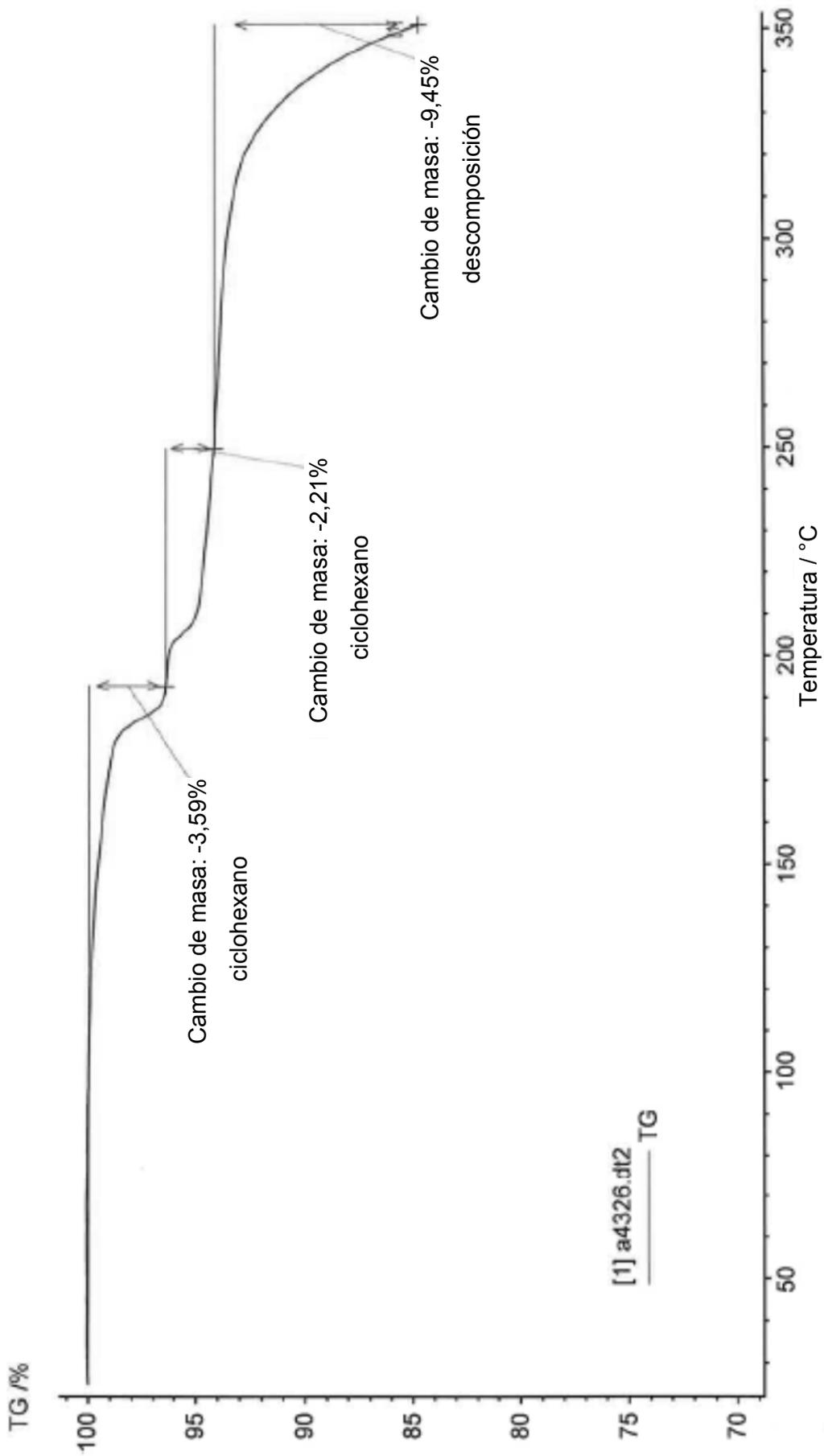


FIG. 77

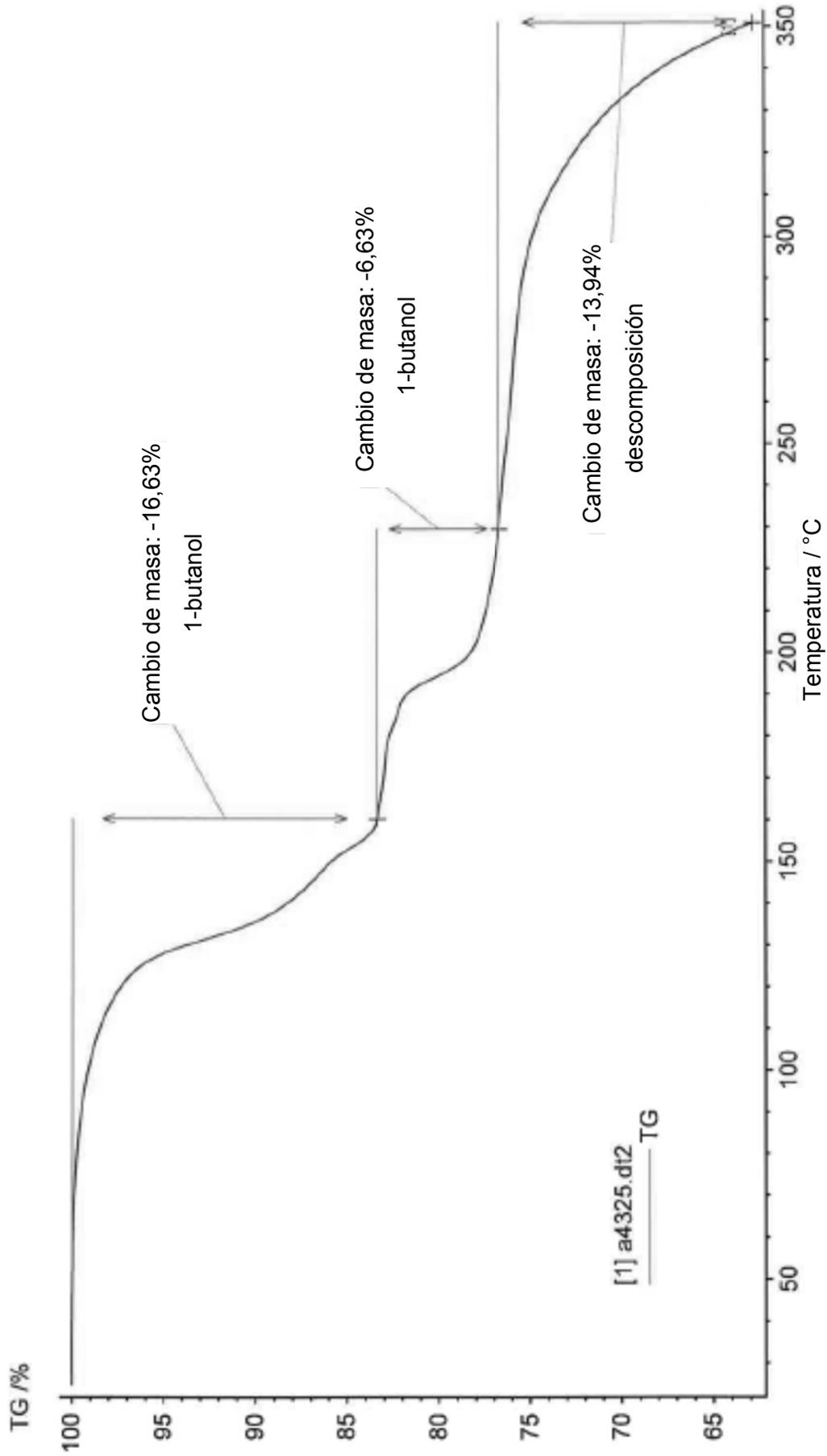


FIG. 78

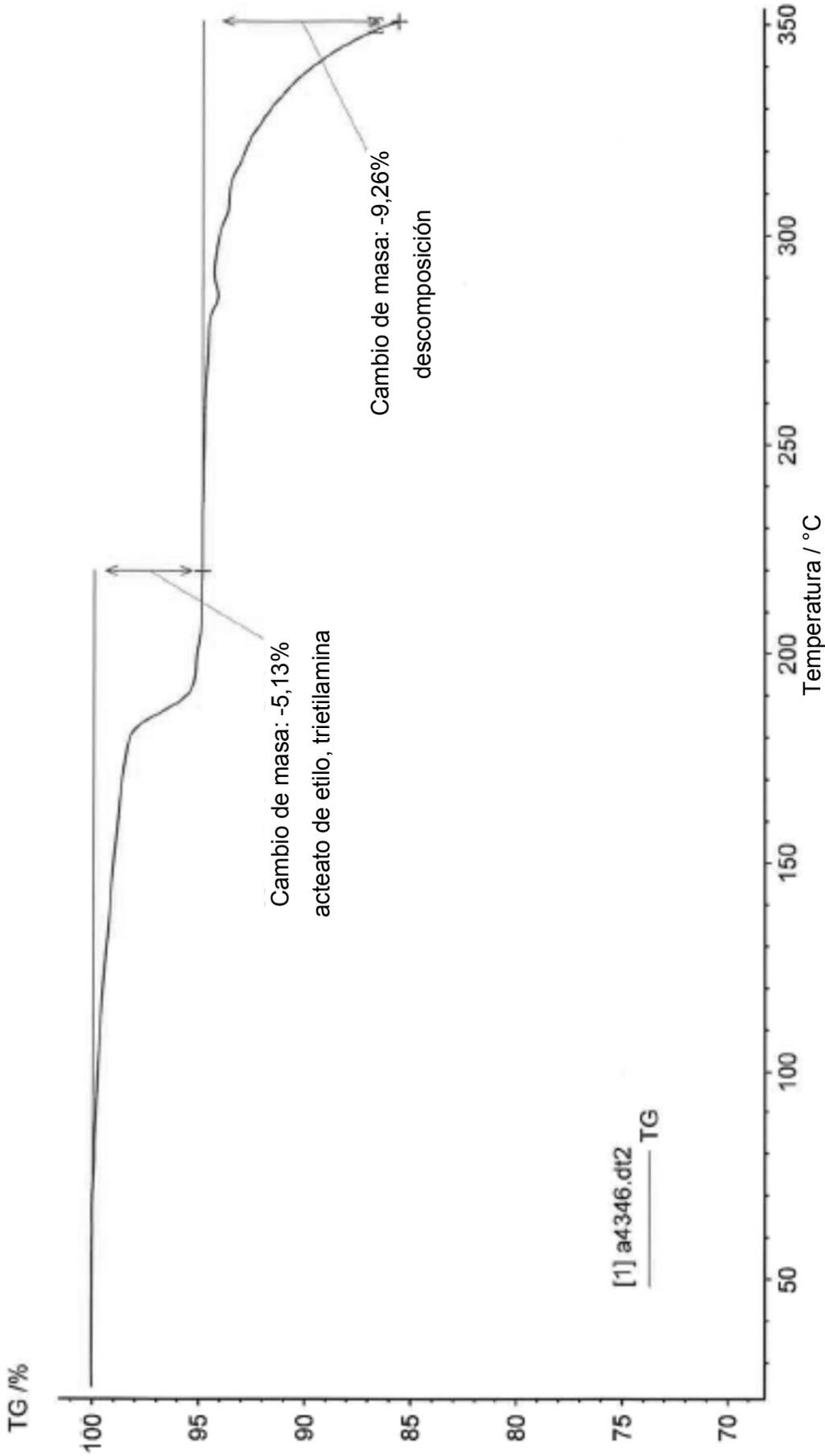


FIG. 79

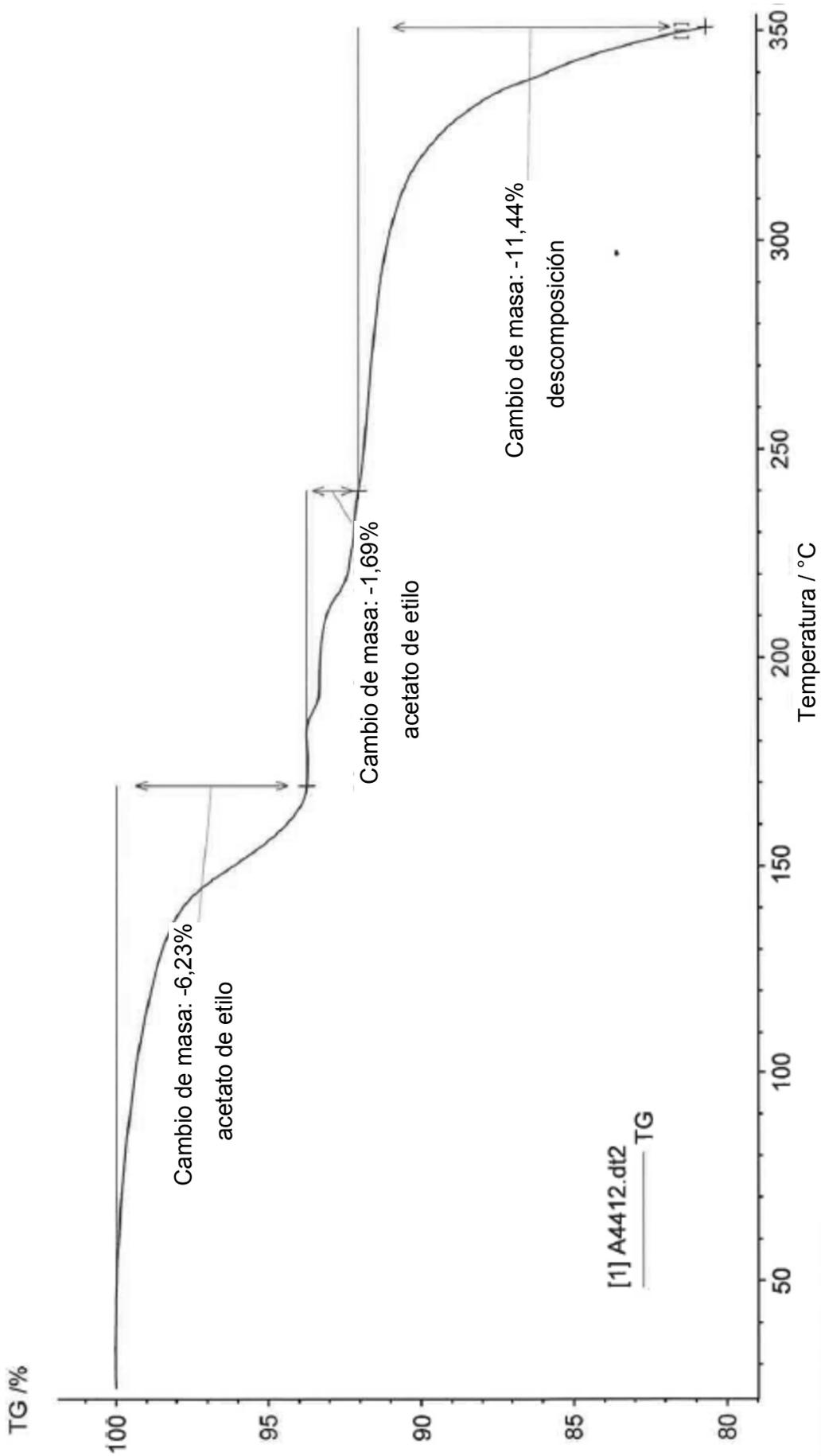


FIG. 80

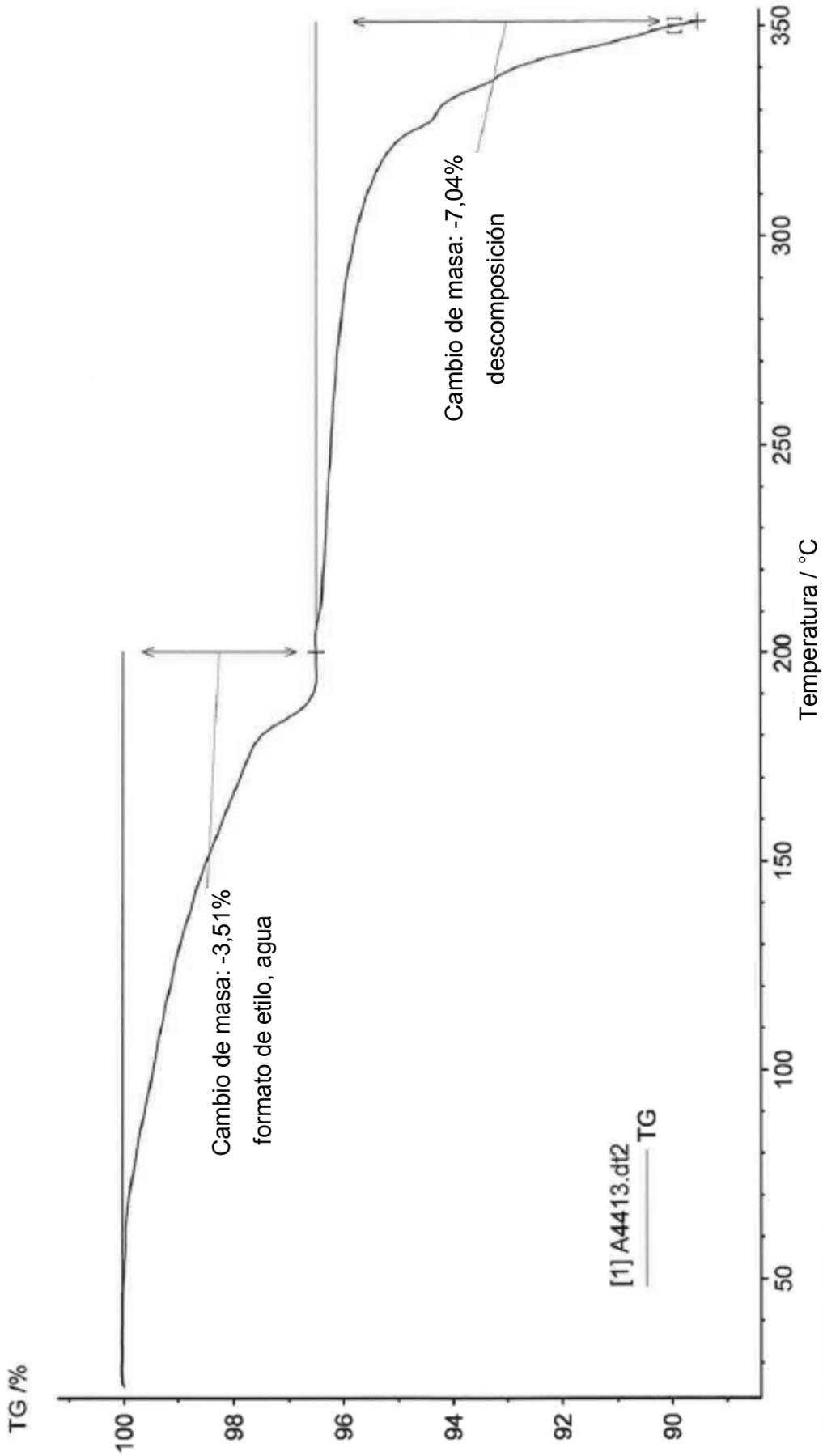


FIG. 81

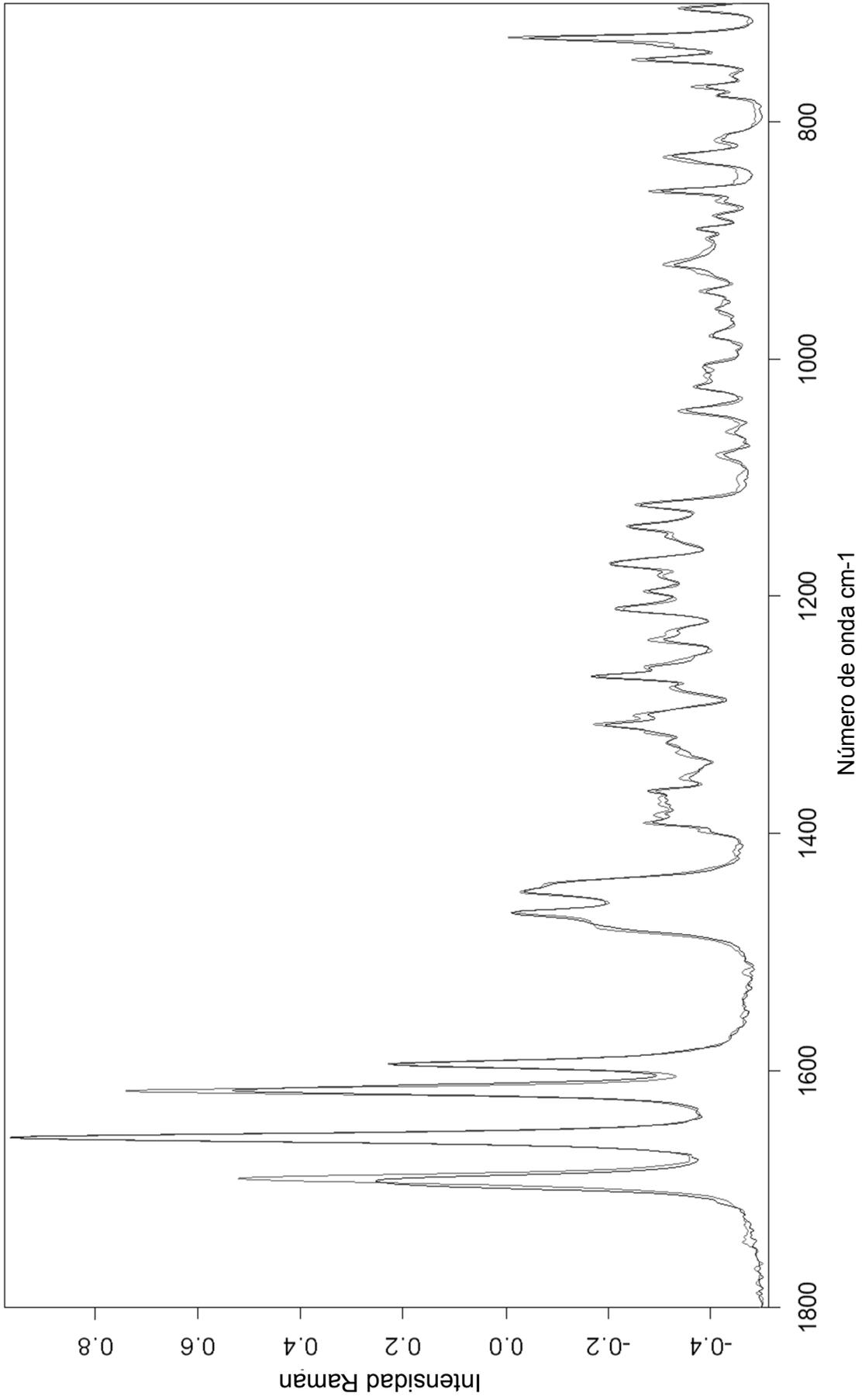


FIG. 82

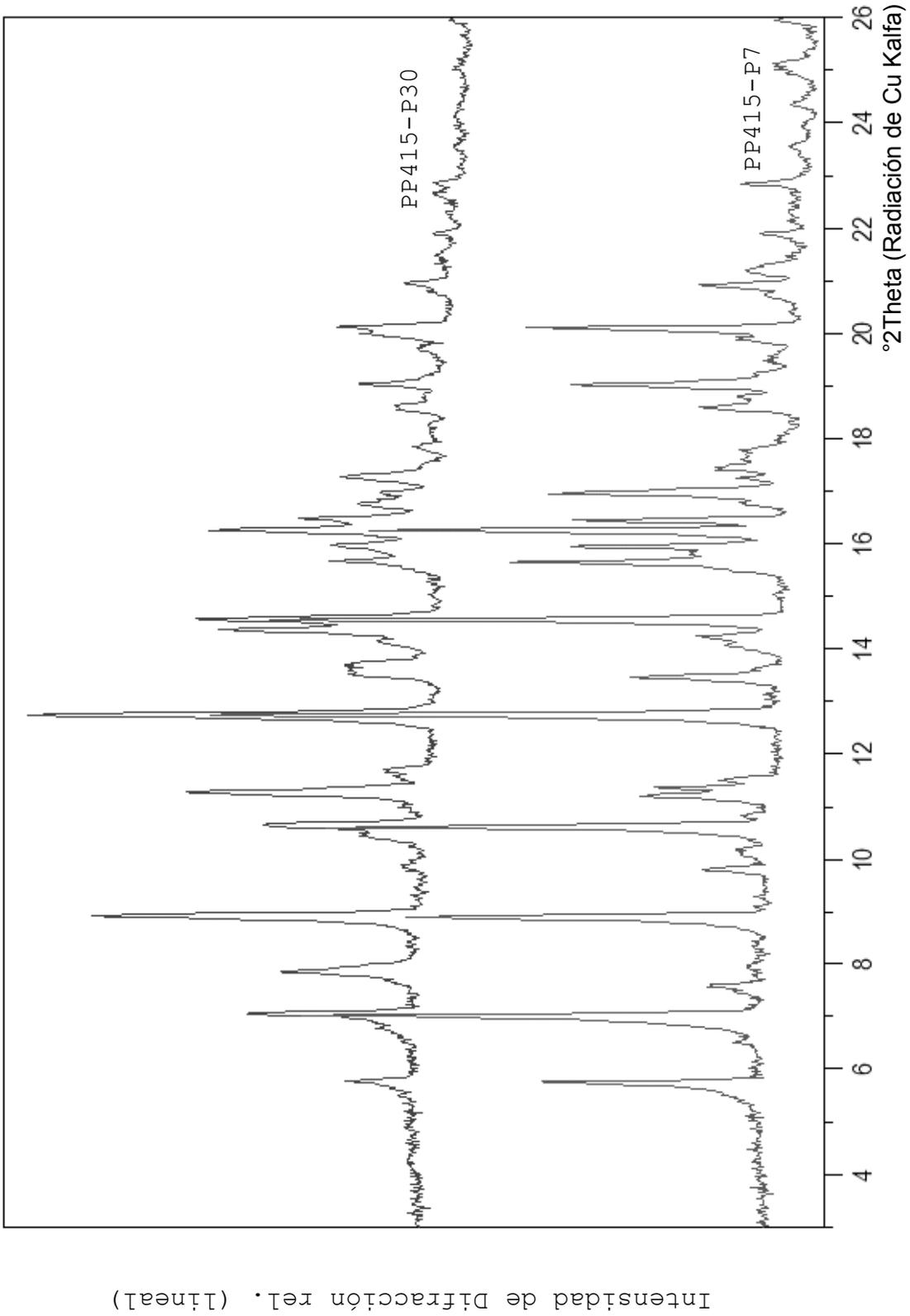


FIG. 83

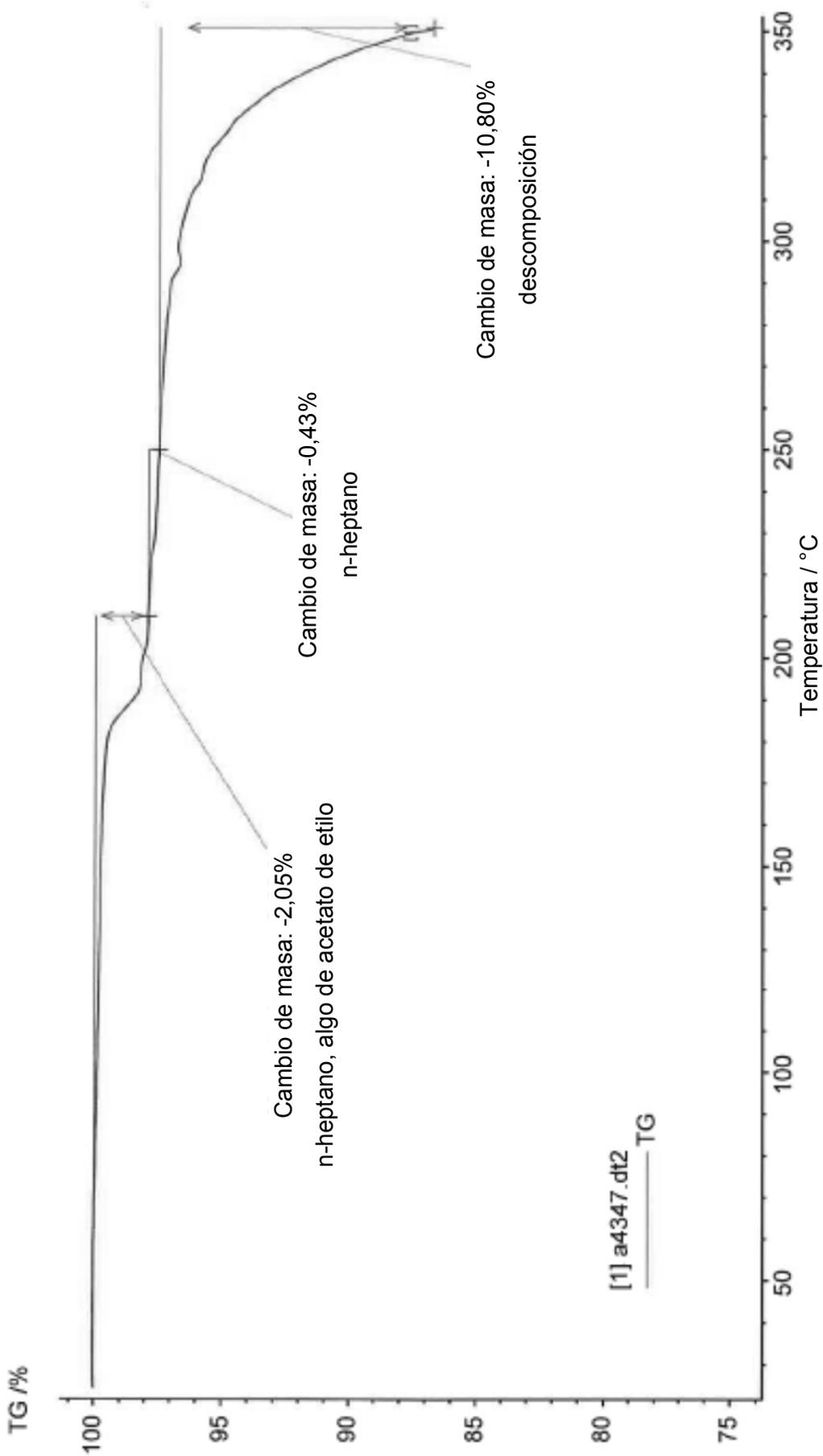


FIG. 84

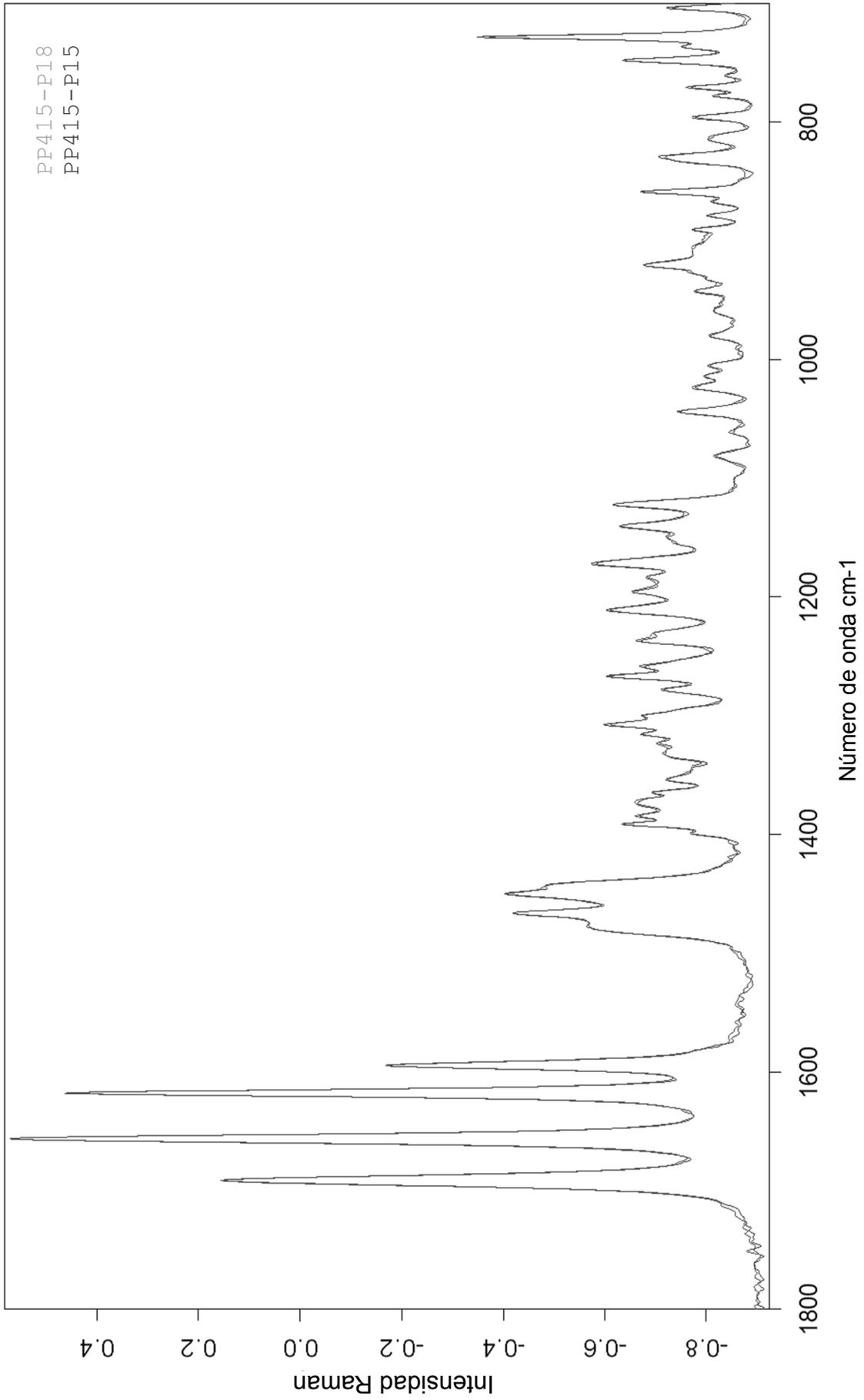


FIG. 85

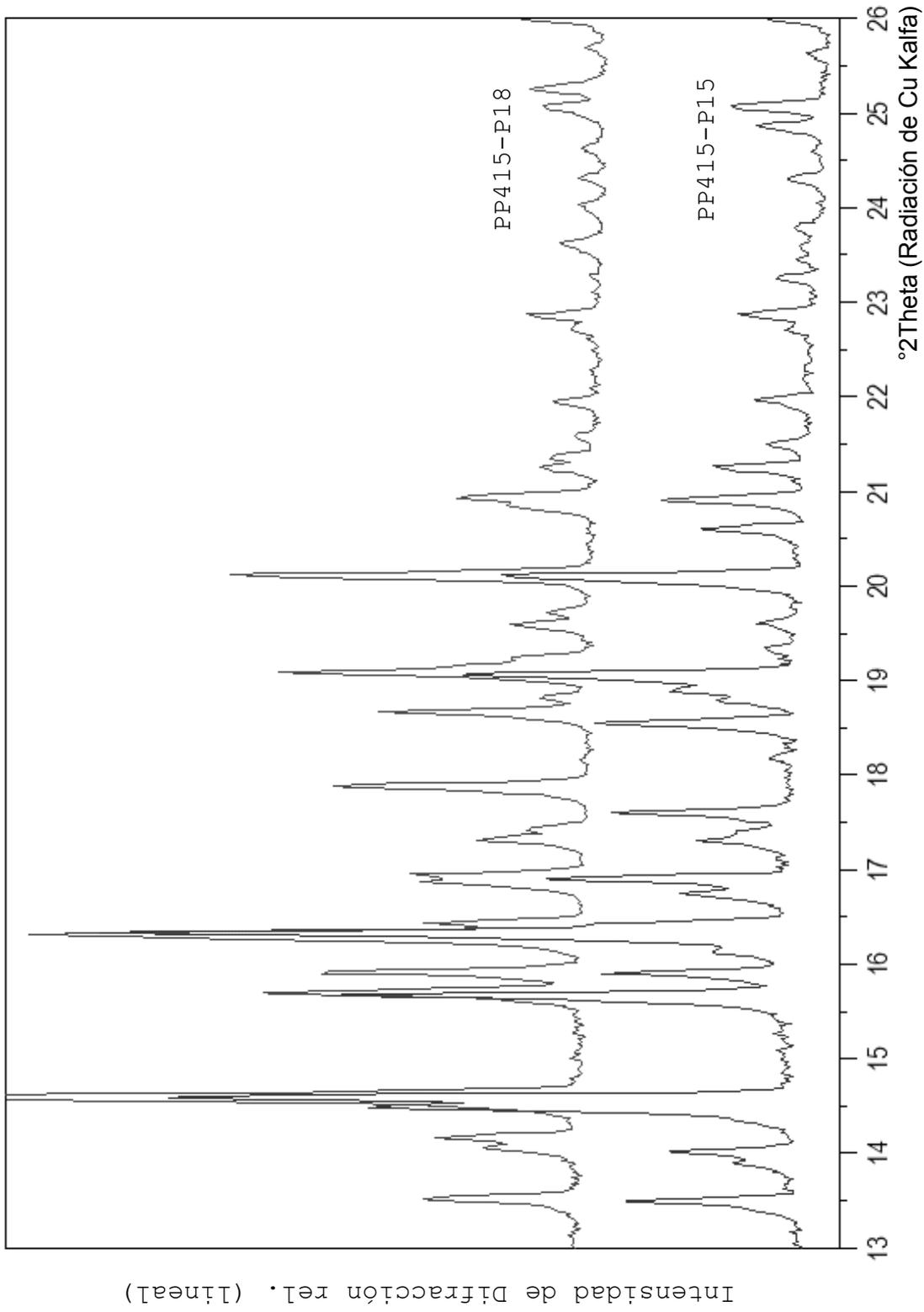


FIG. 86

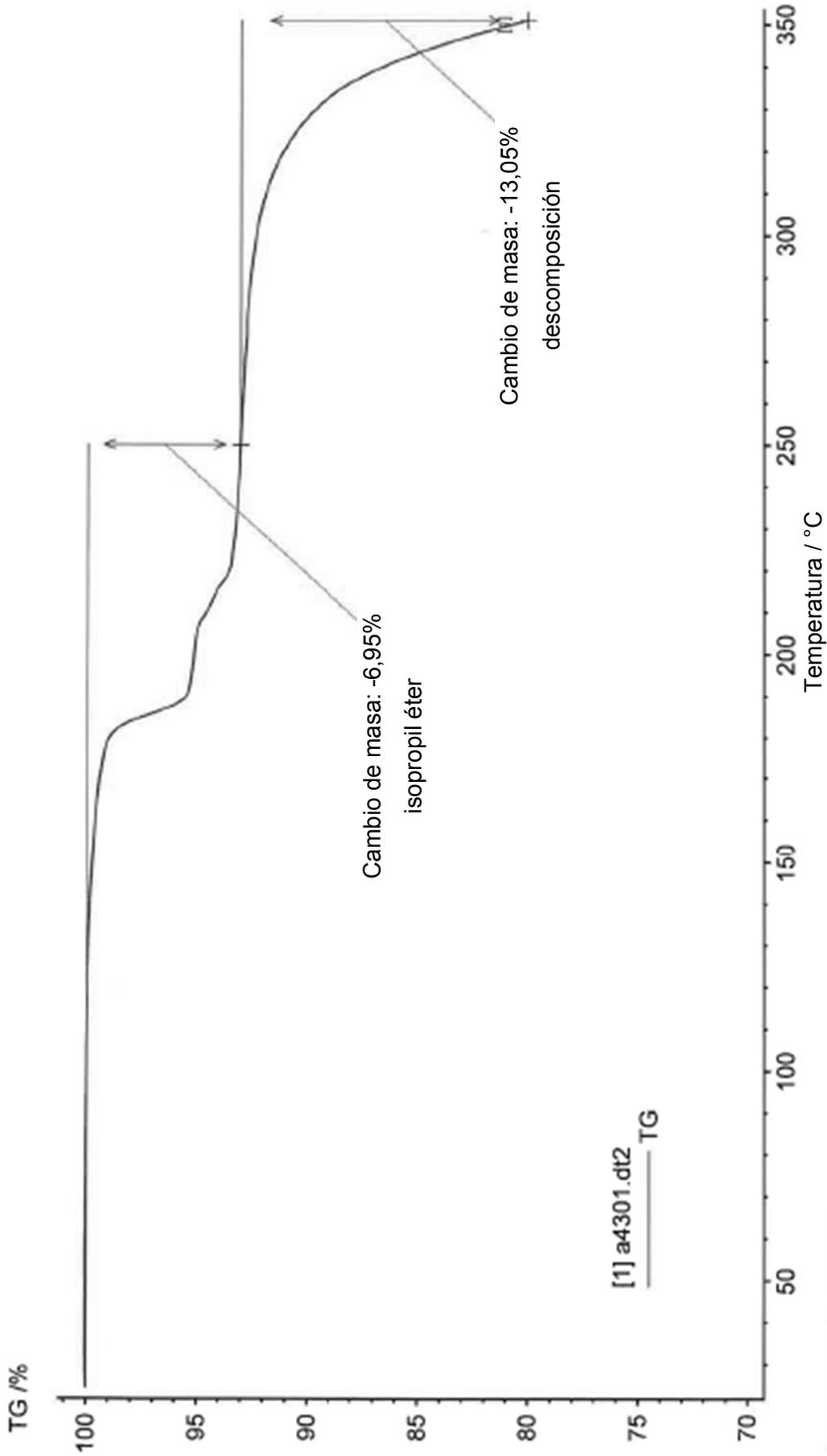


FIG. 87

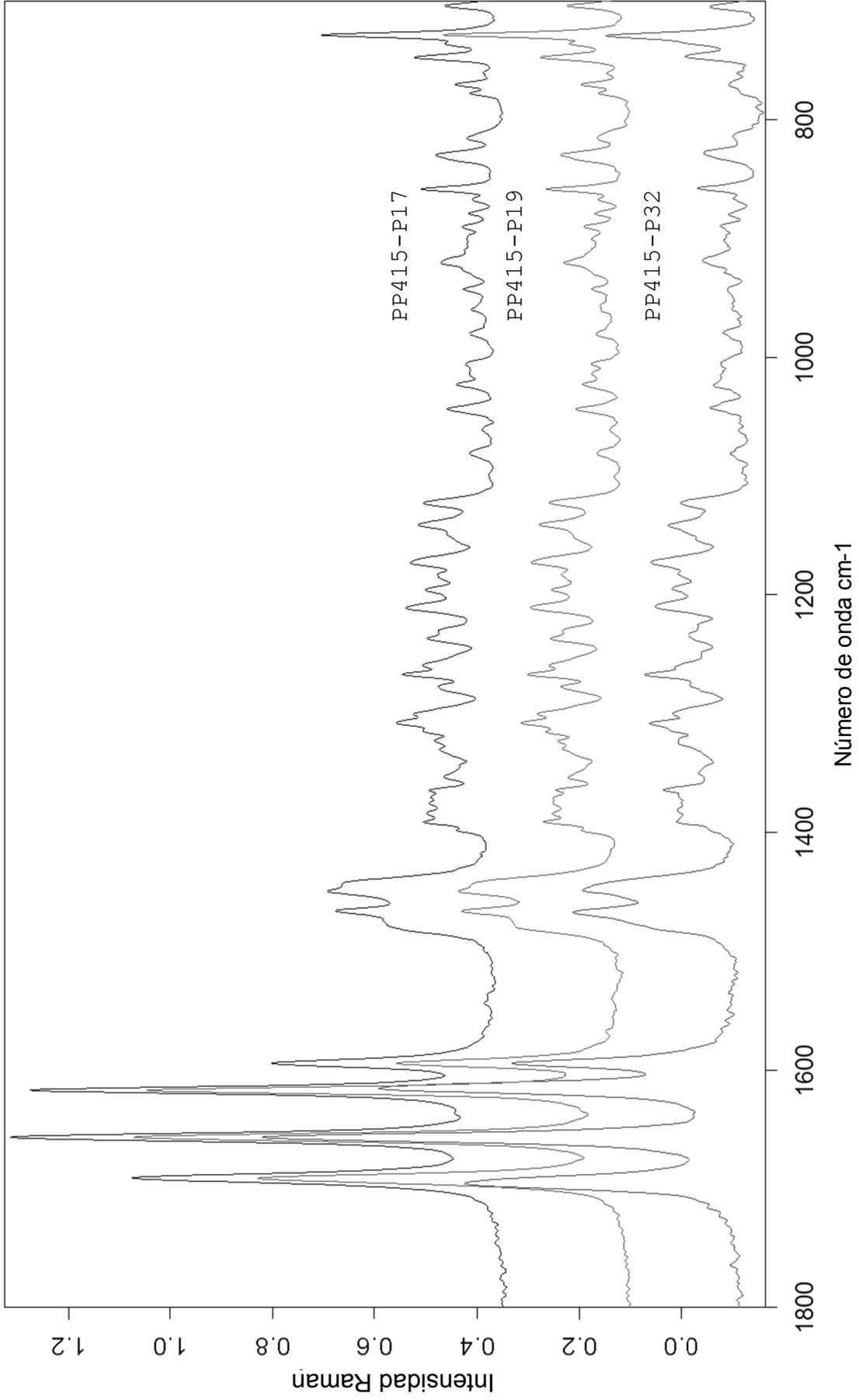


FIG. 88

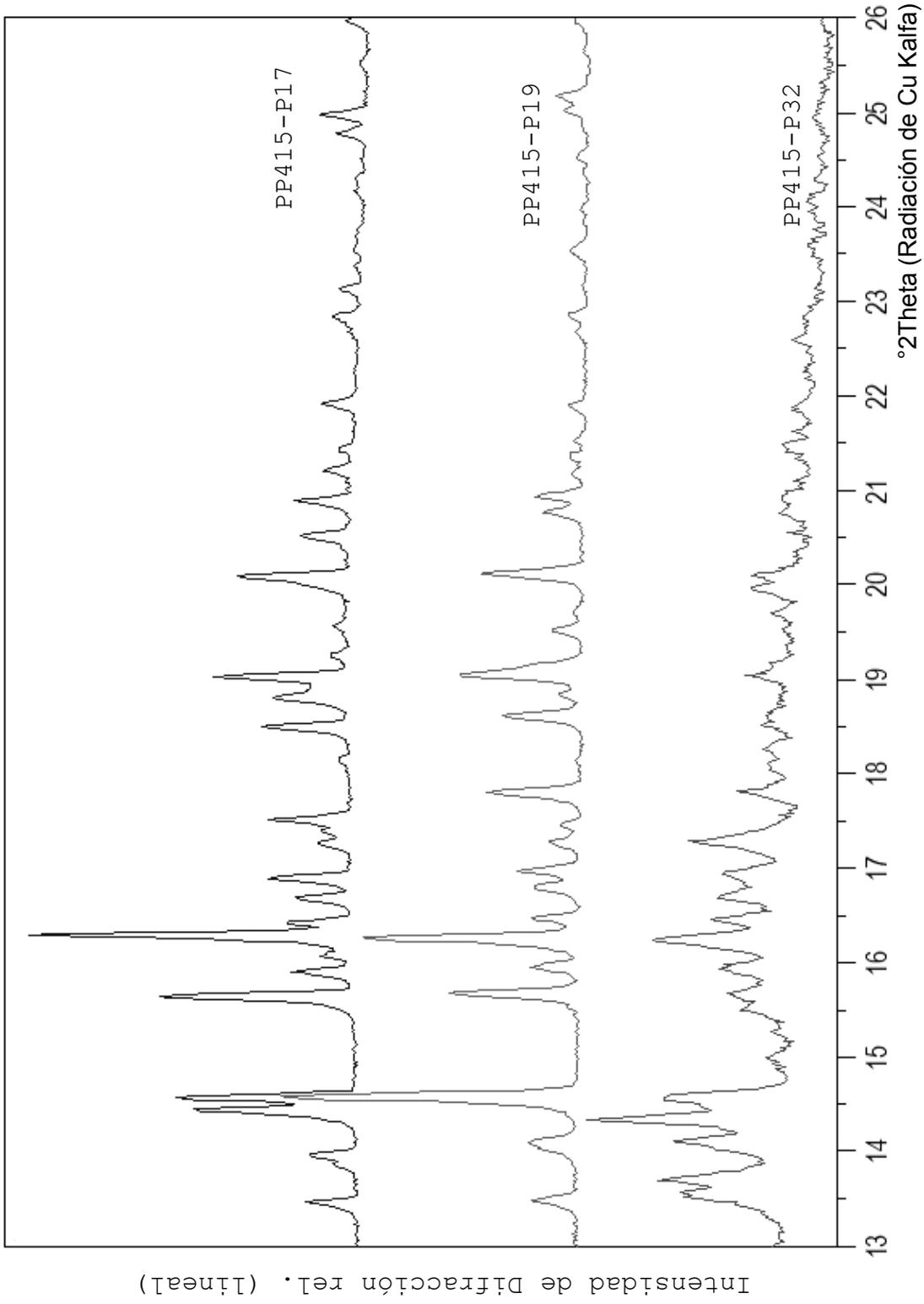


FIG. 89

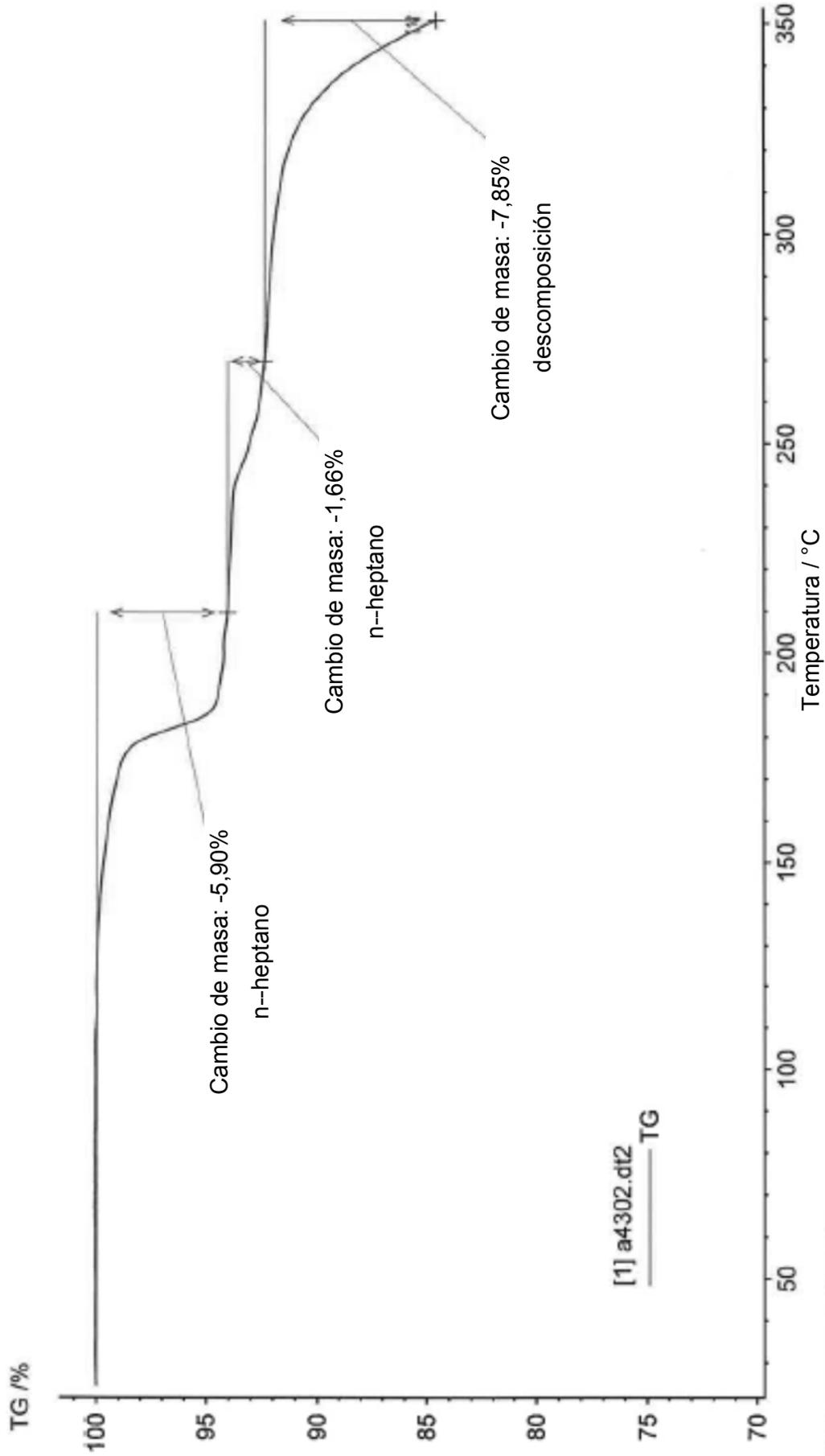


FIG. 90

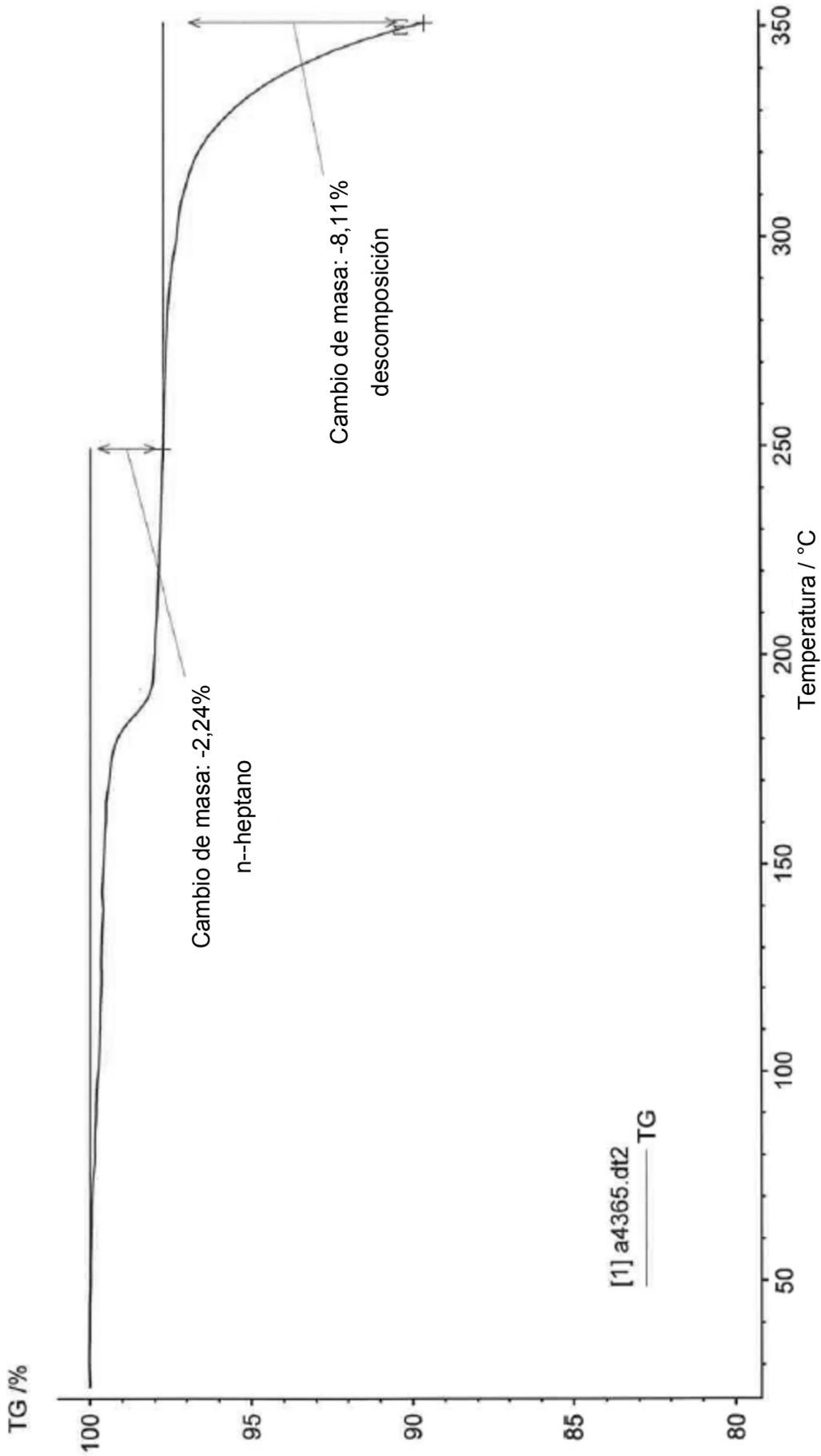


FIG. 91

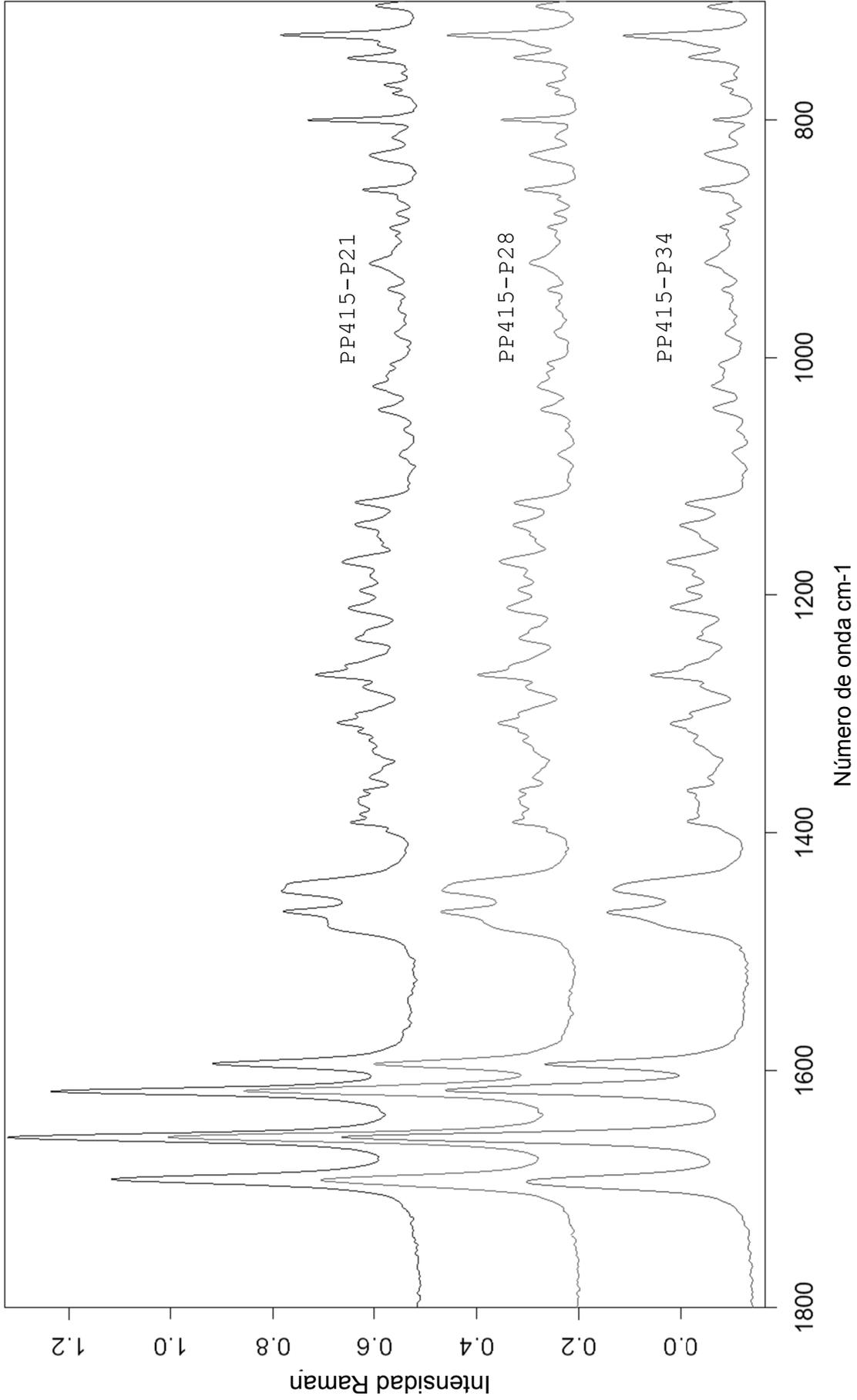


FIG. 92

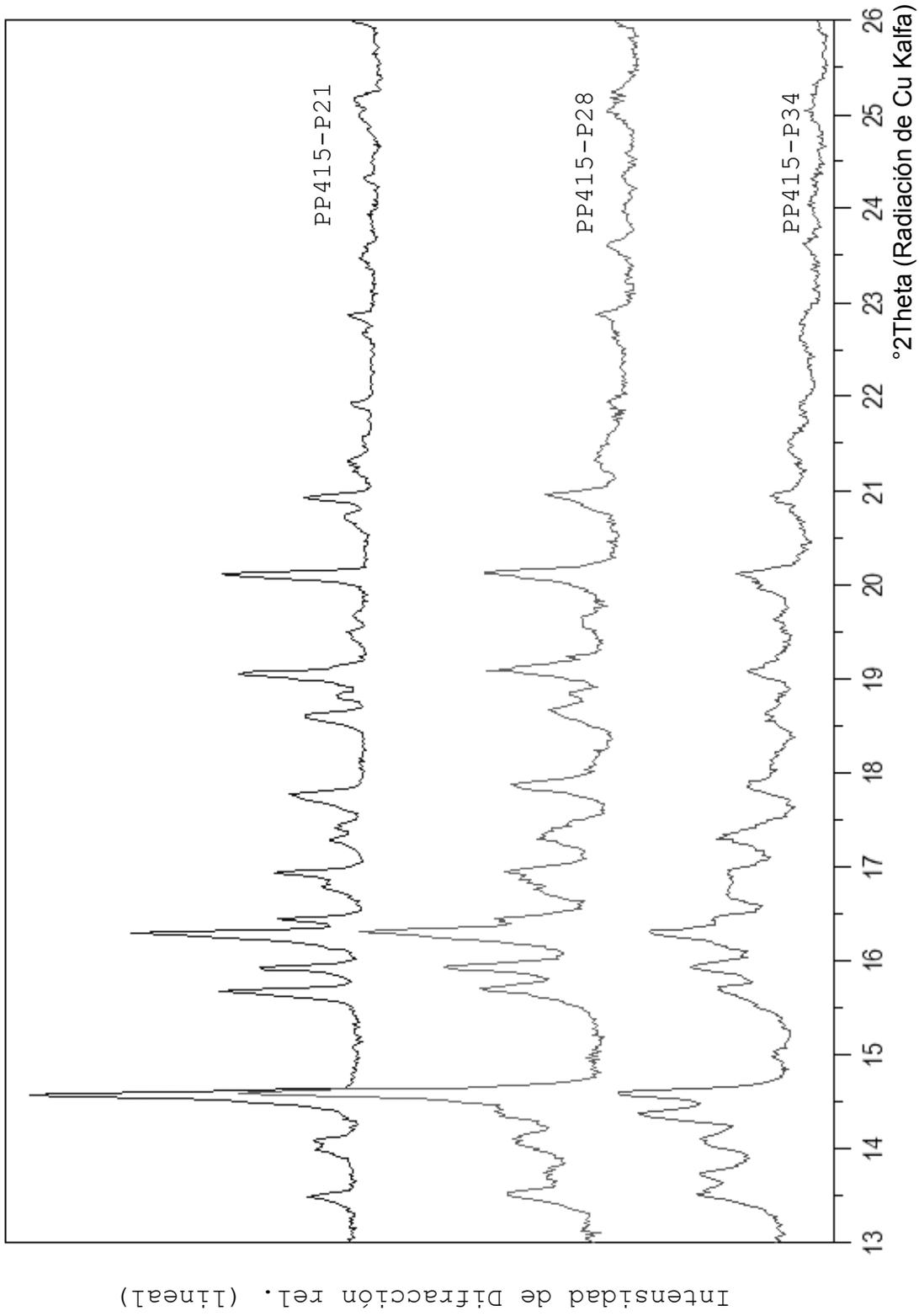


FIG. 93

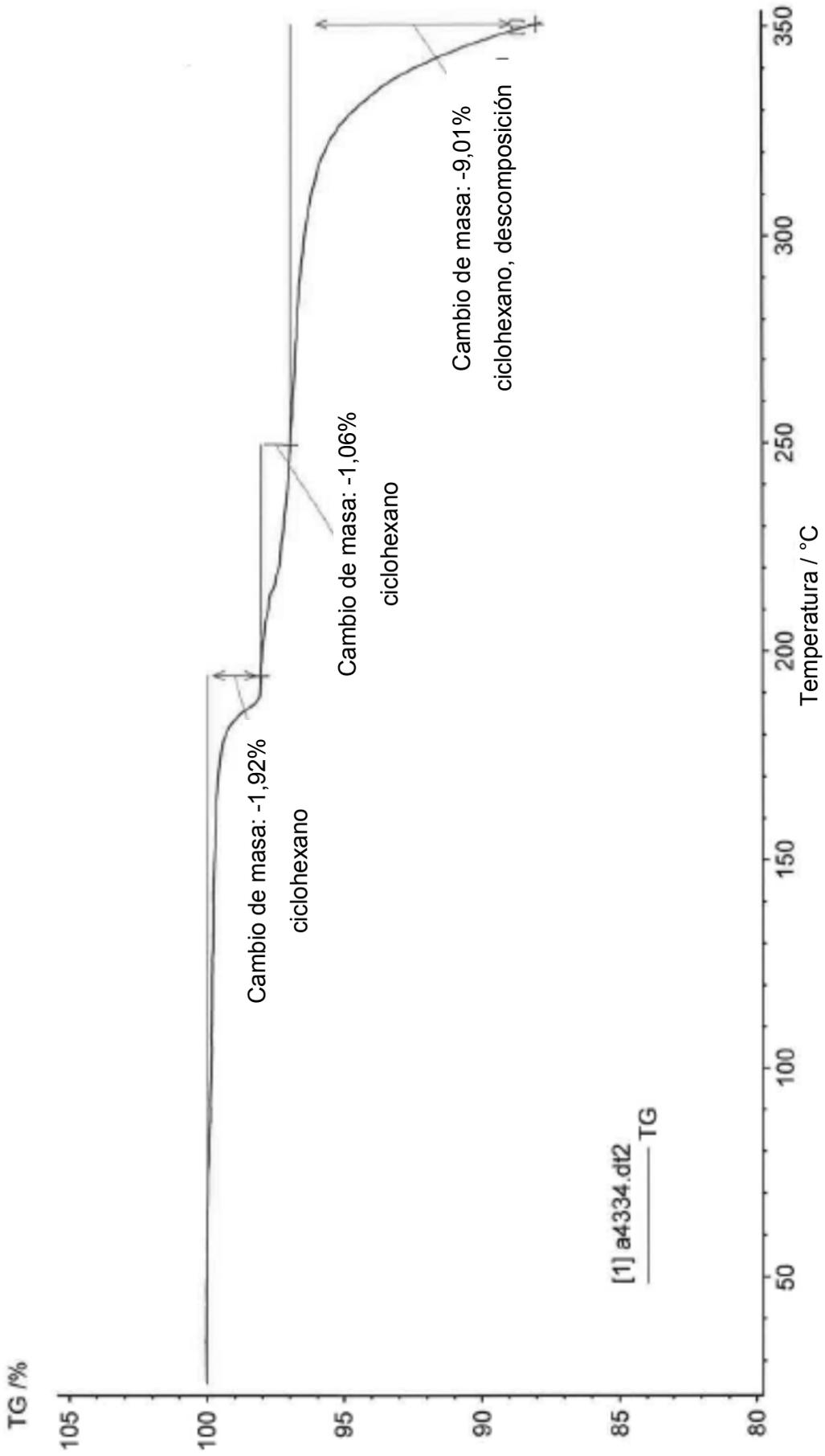


FIG. 94

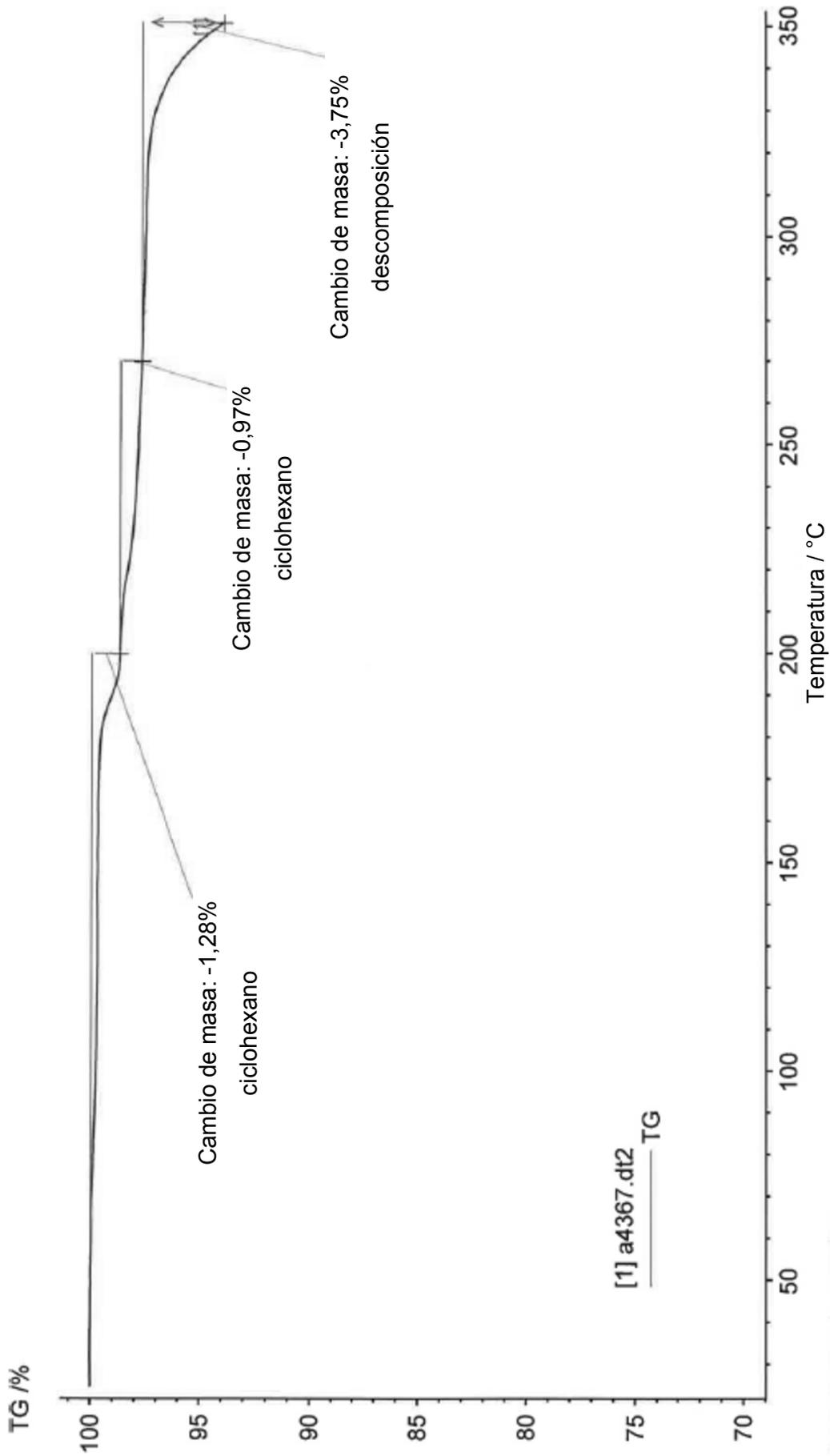


FIG. 95

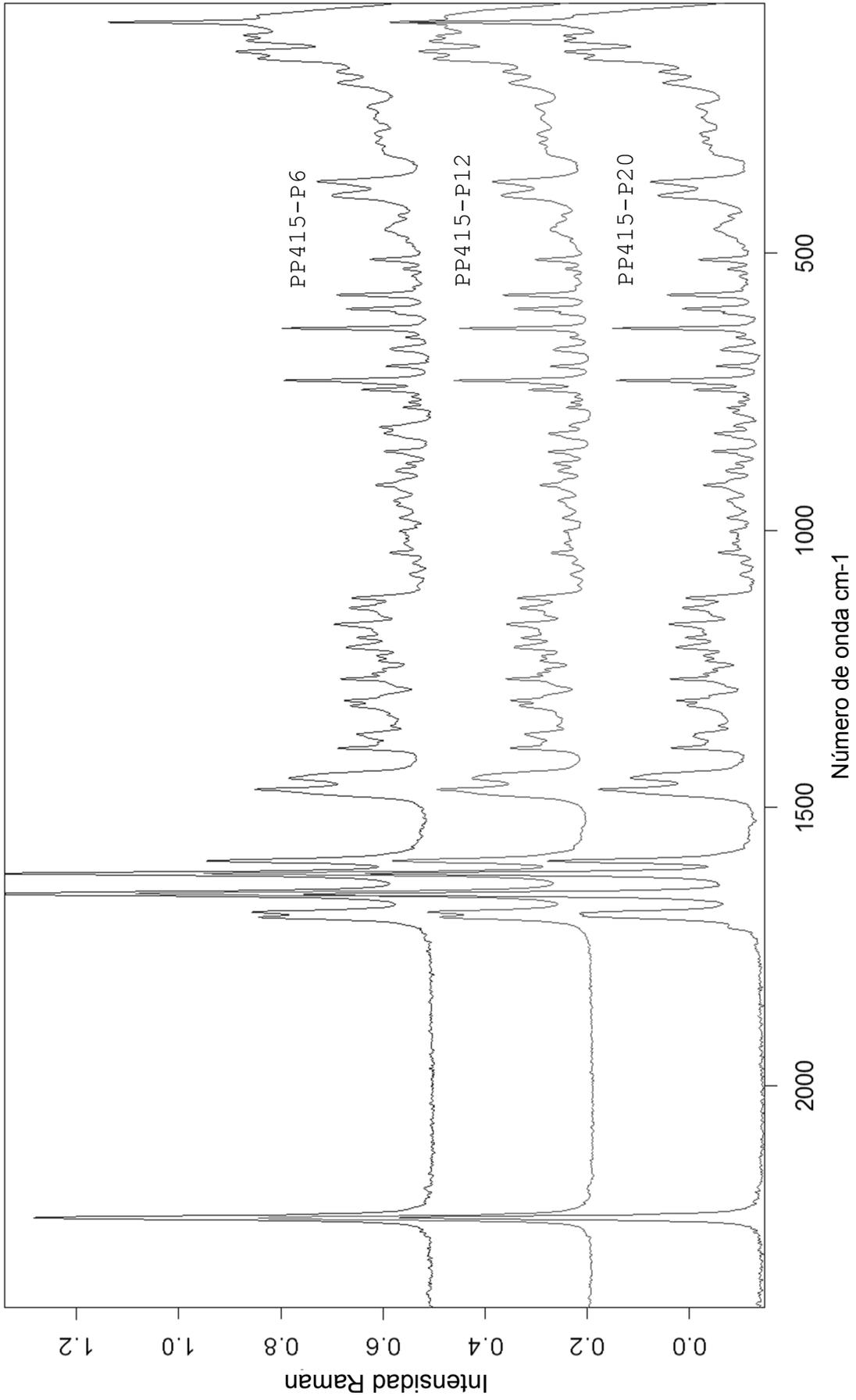


FIG. 96

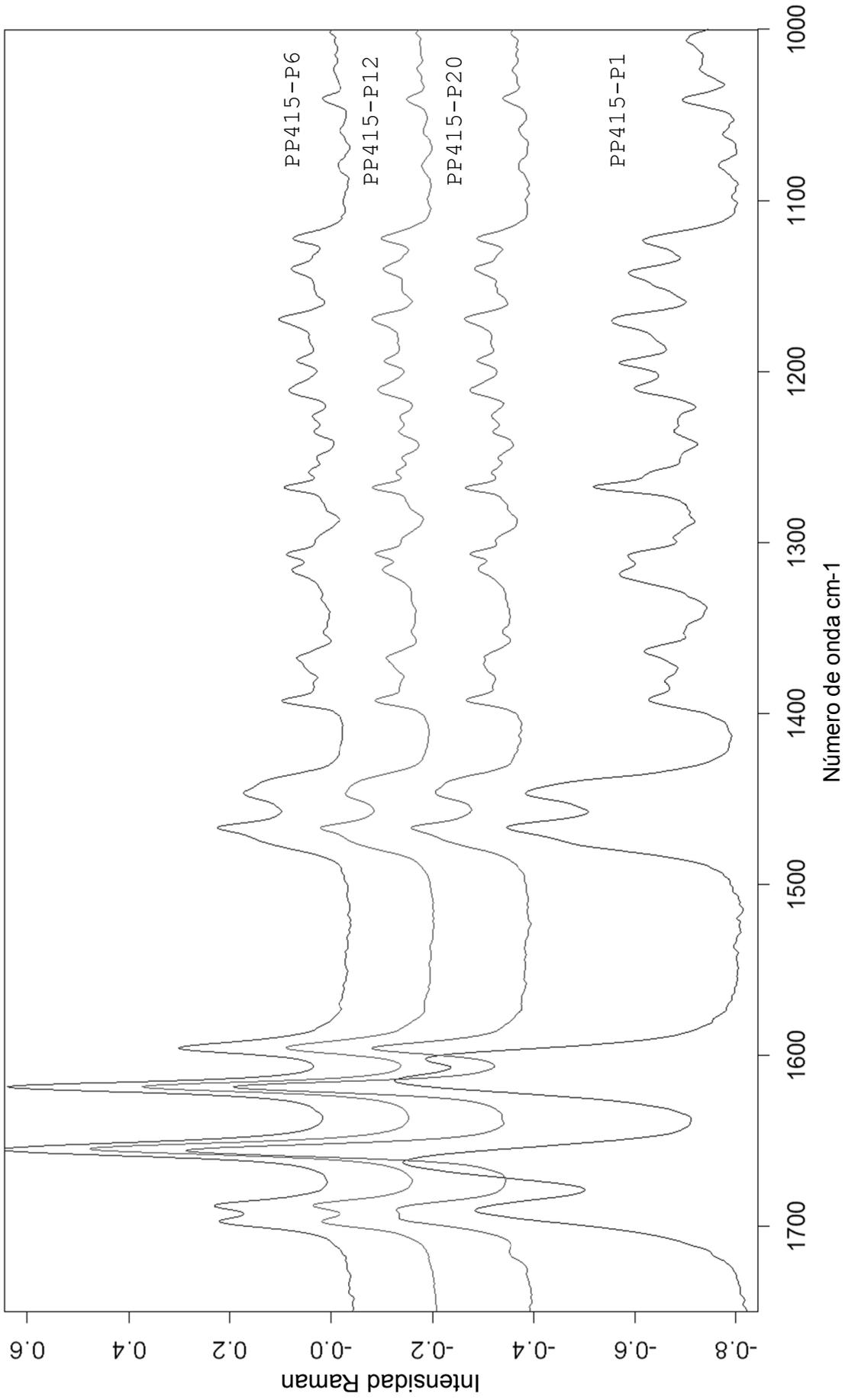


FIG. 97

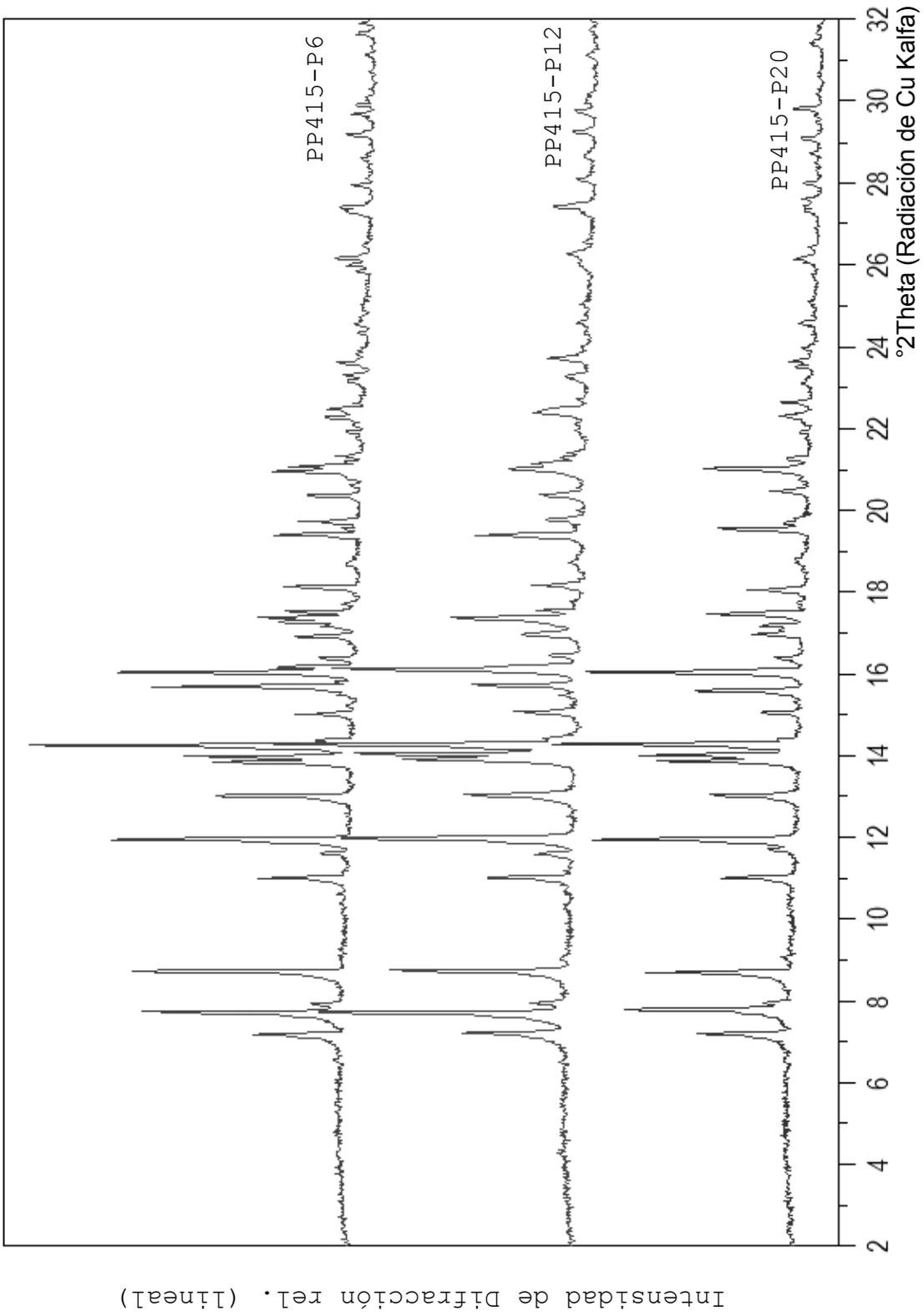


FIG. 98

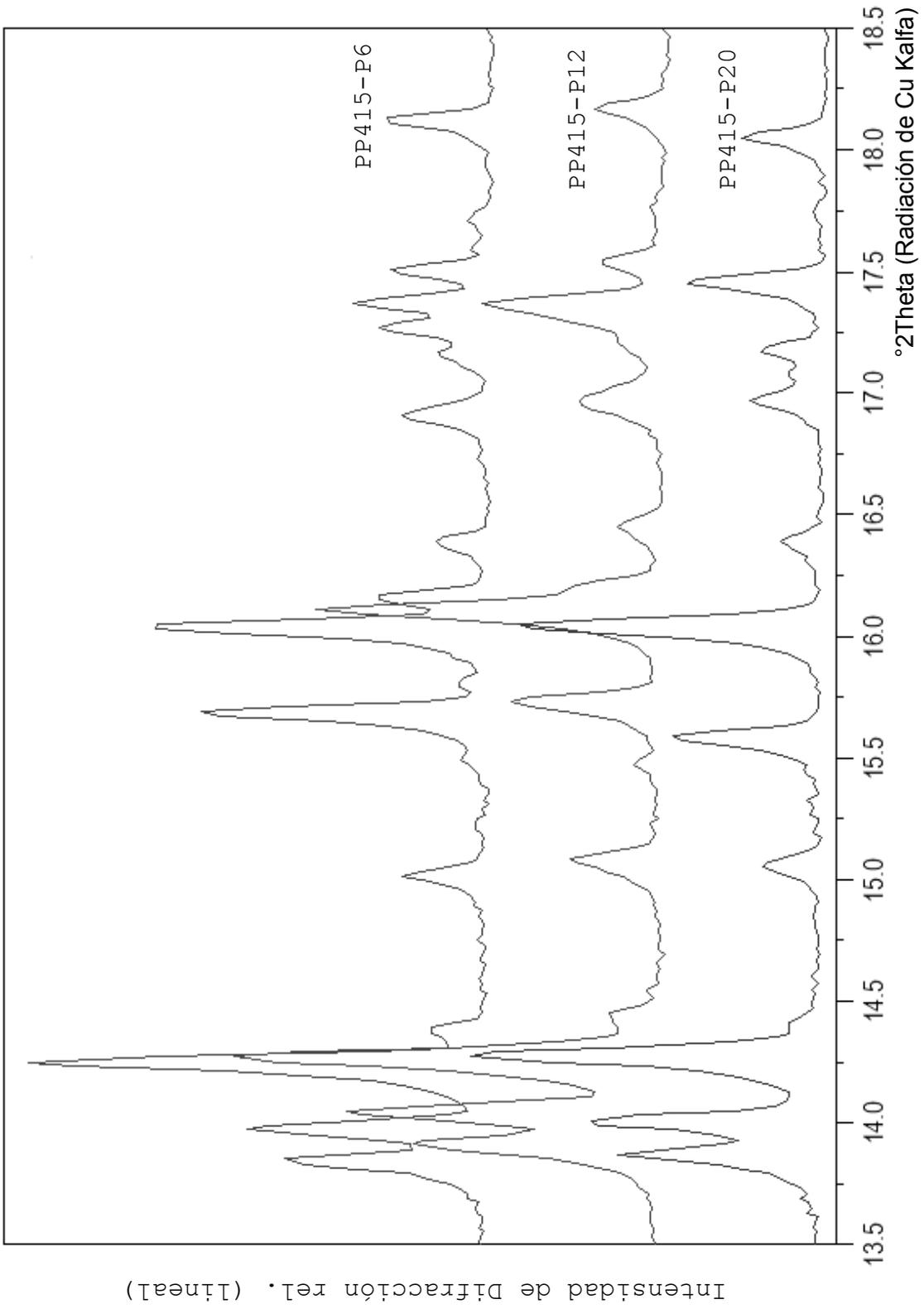


FIG. 99

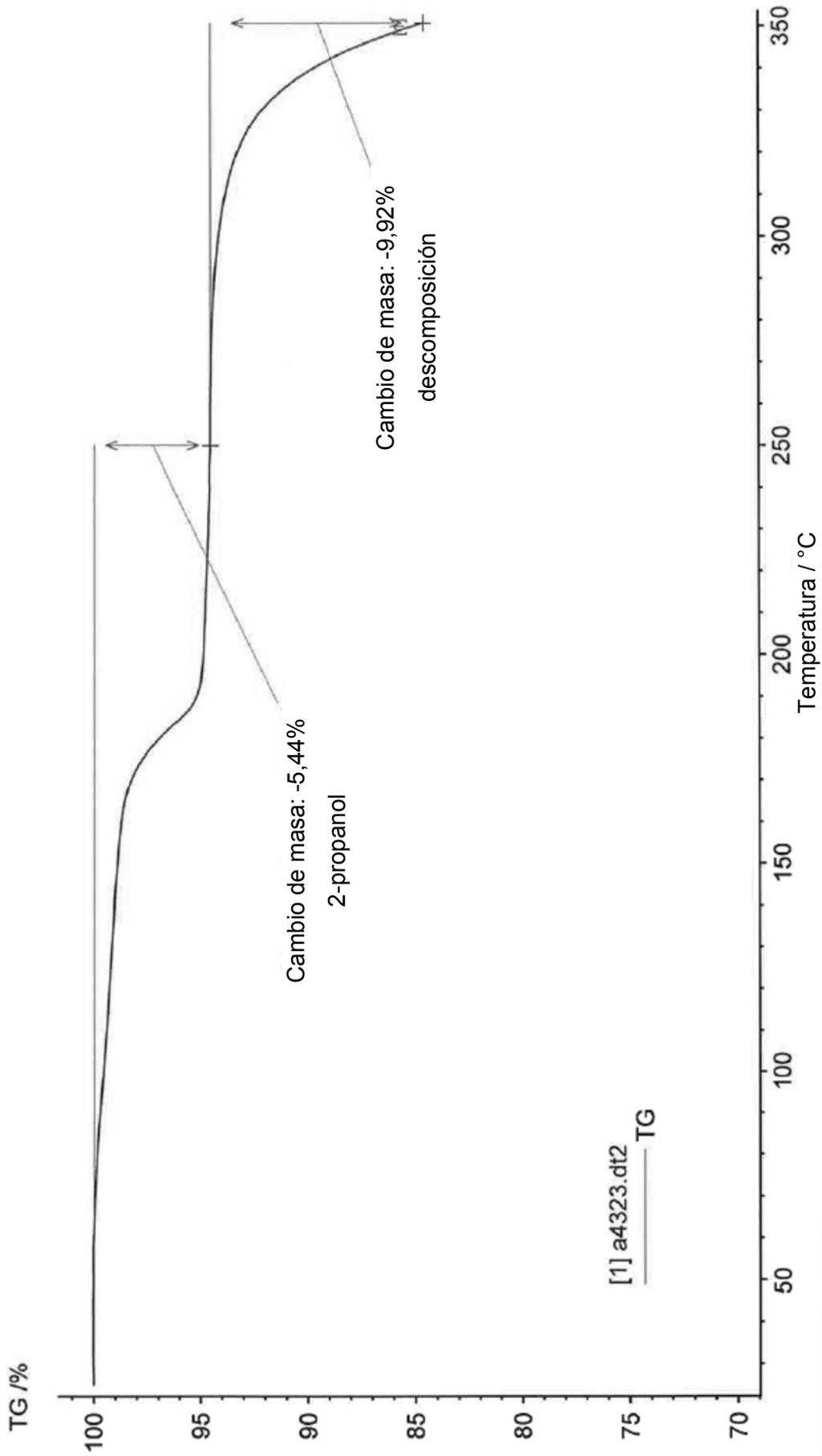


FIG. 100

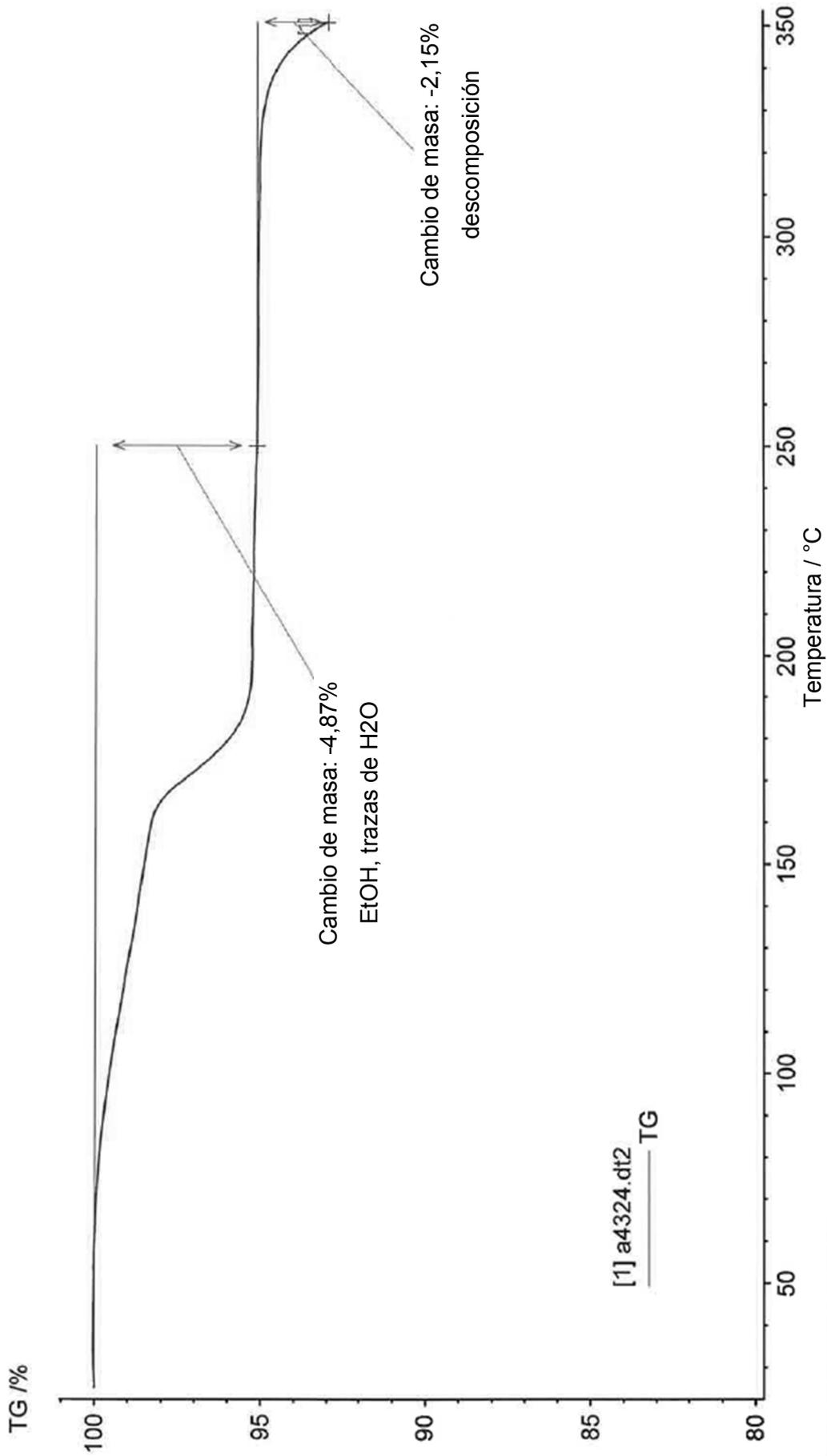


FIG. 101

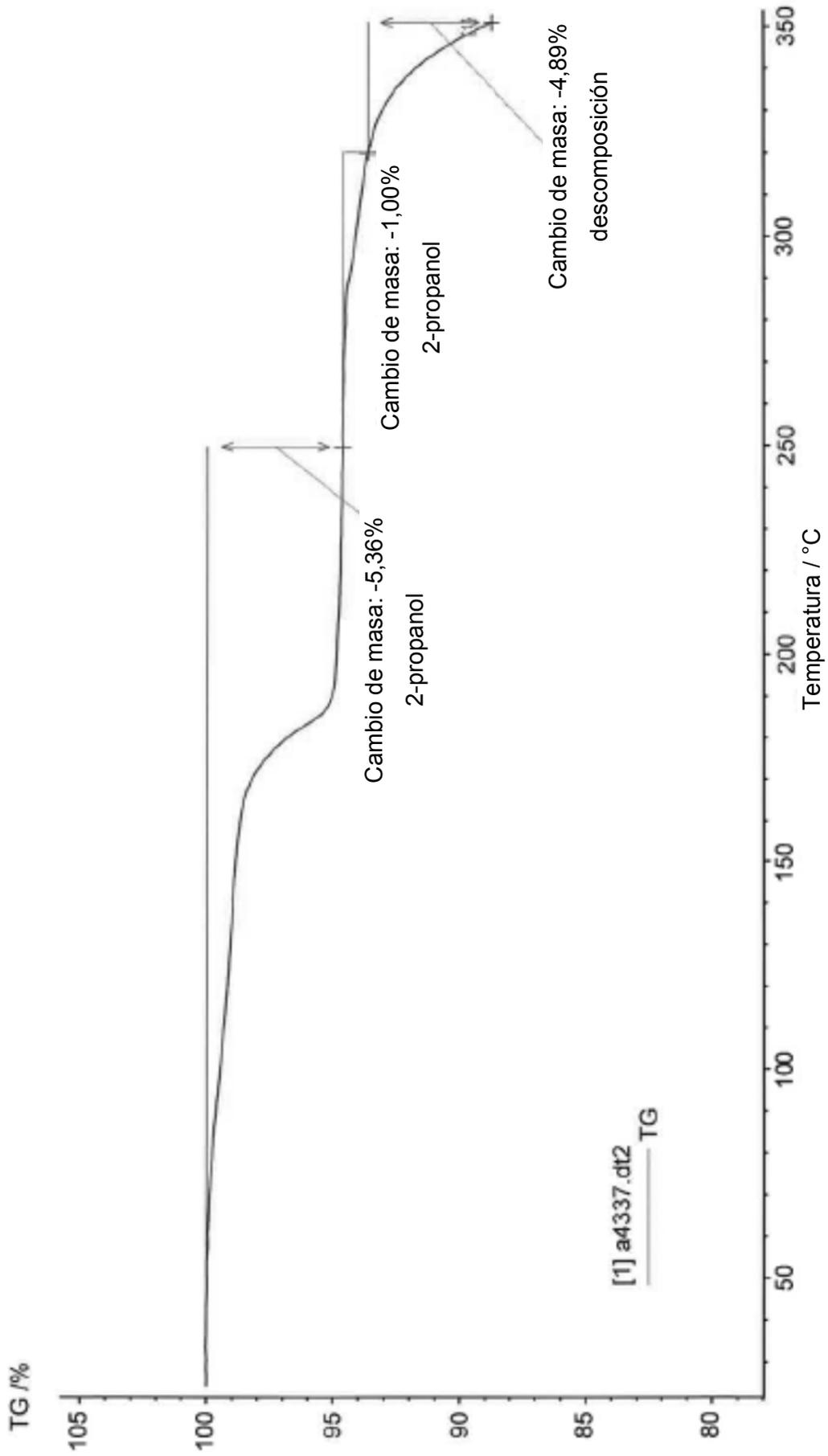


FIG. 102

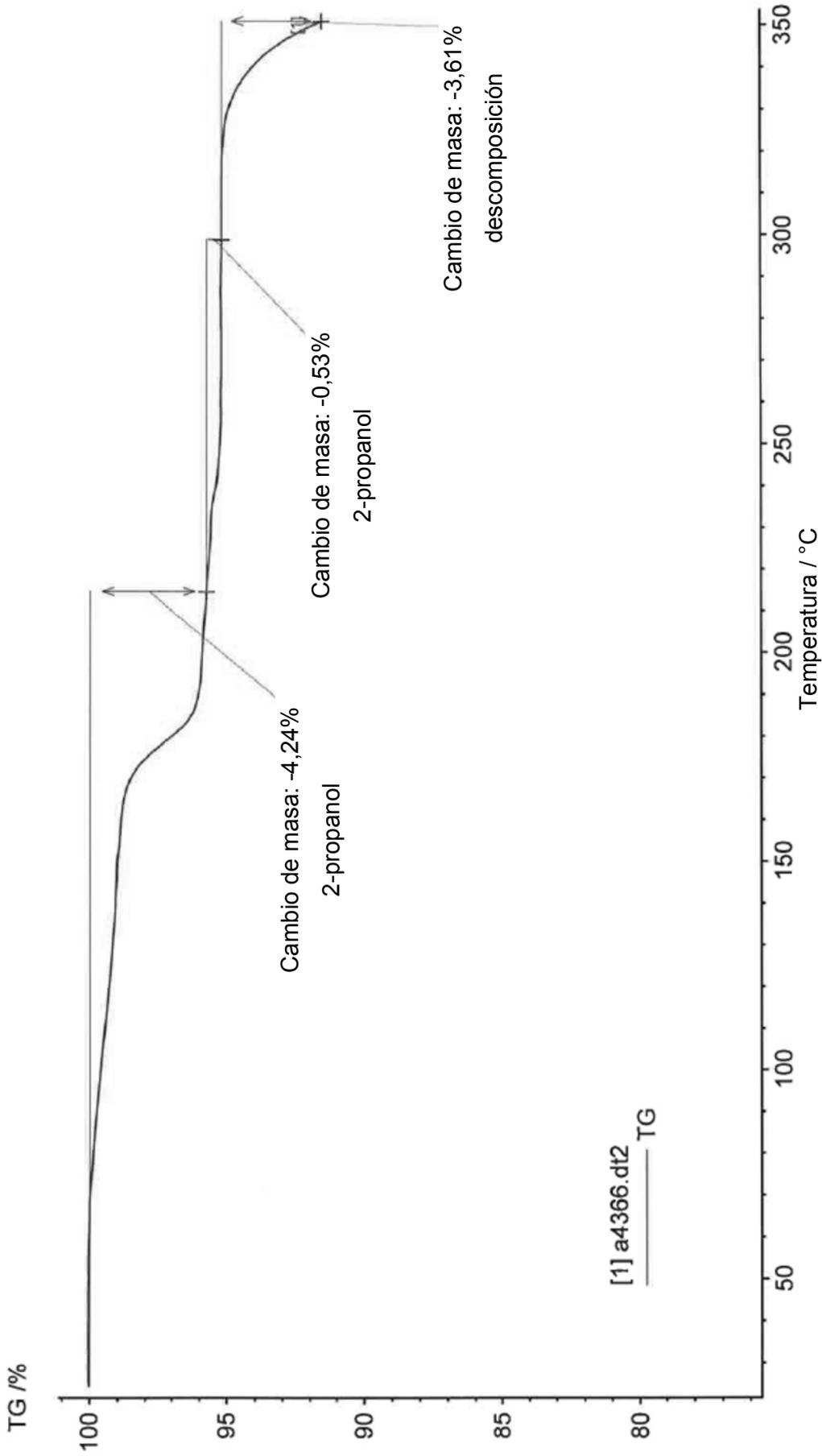


FIG. 103

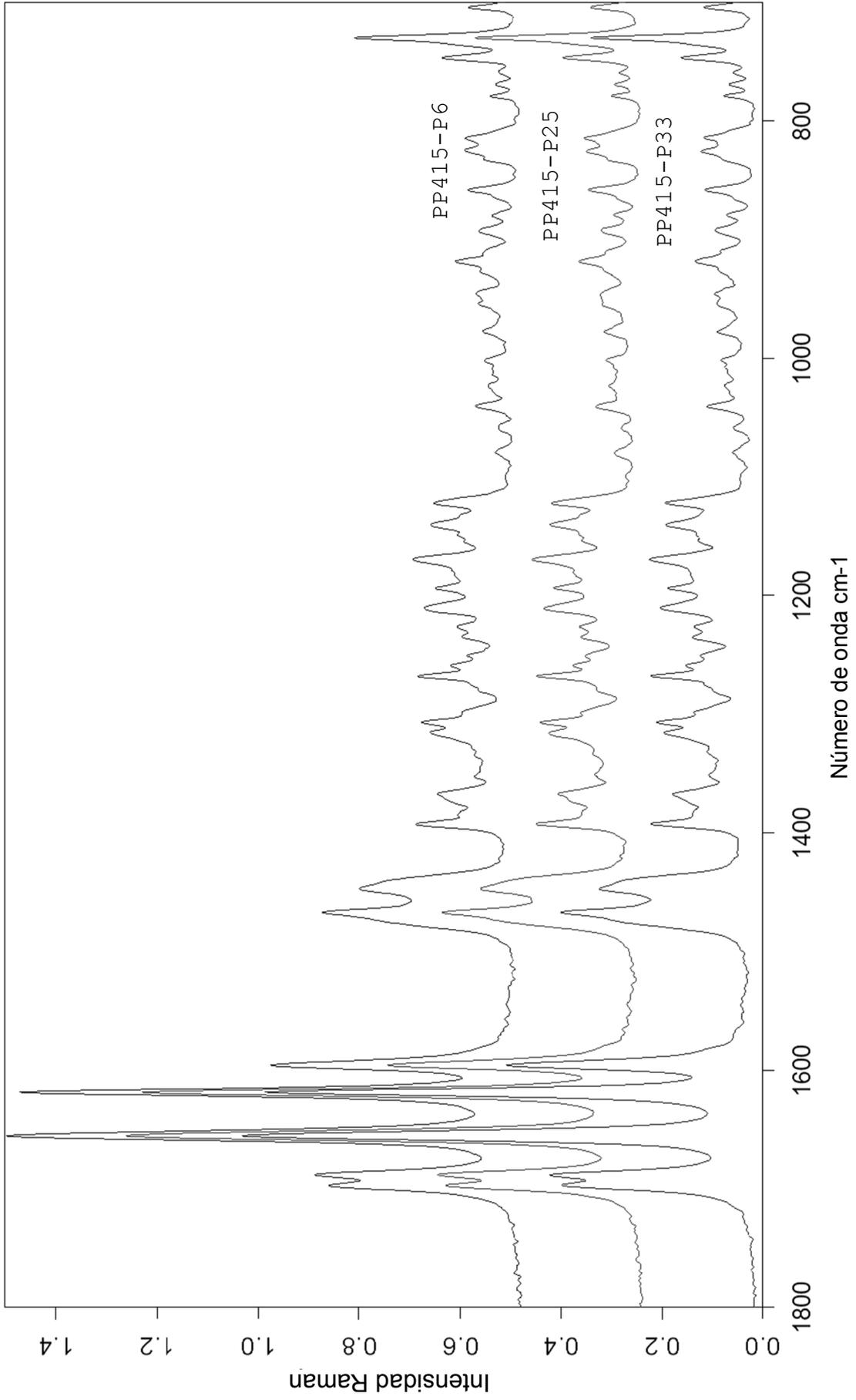


FIG. 104

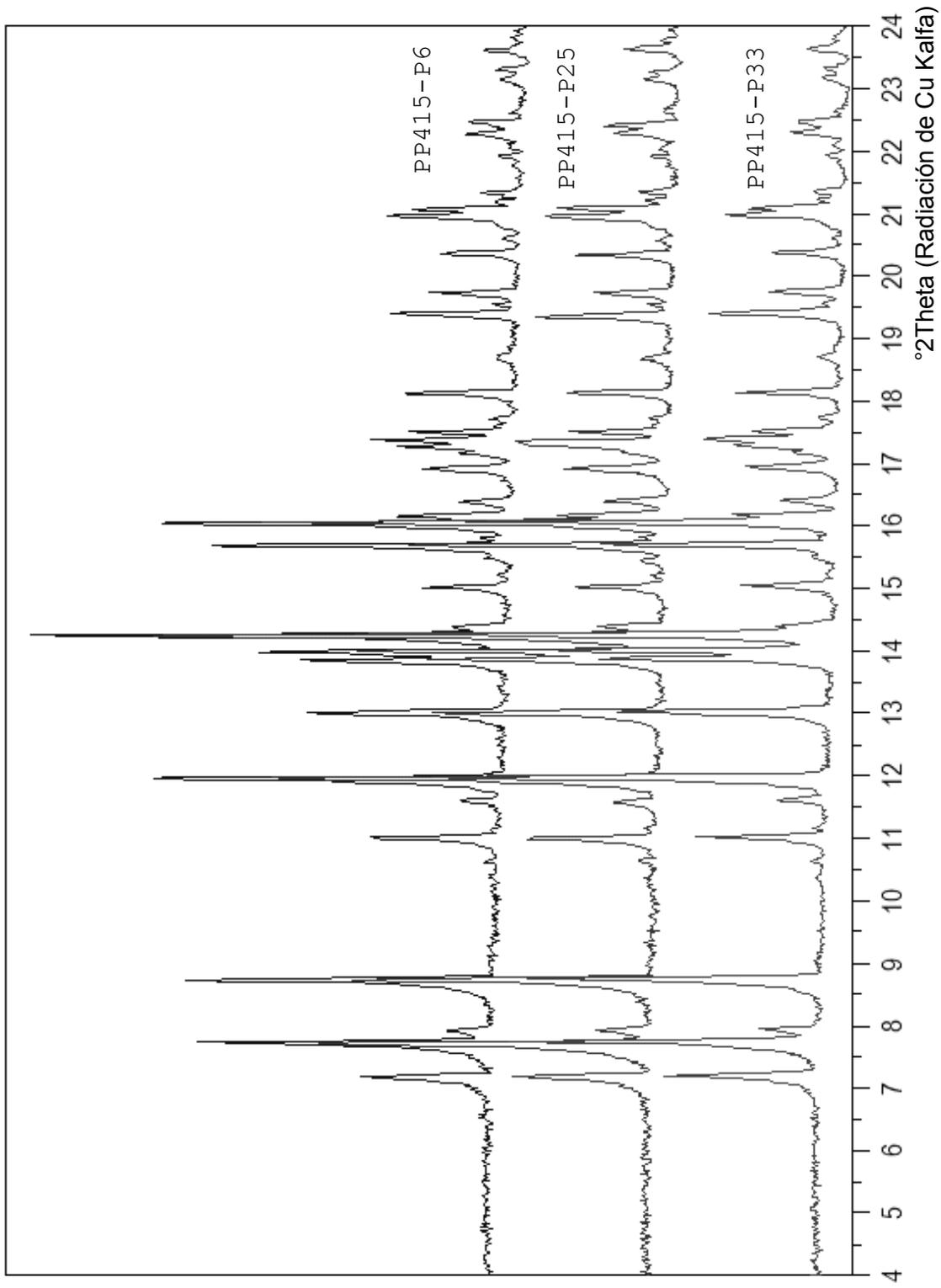


FIG. 105

Intensidad de Difracción rel. (lineal)

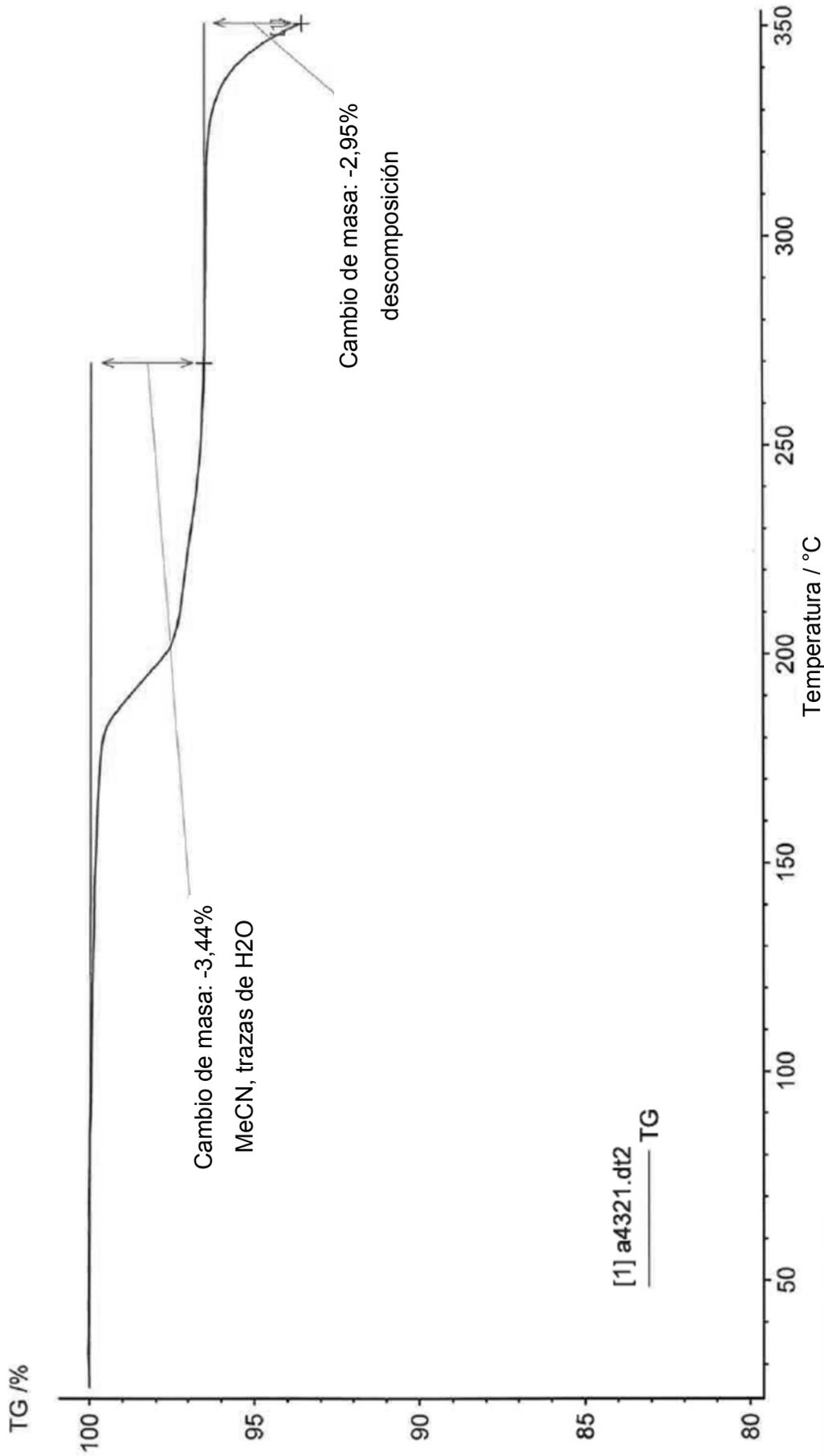


FIG. 106

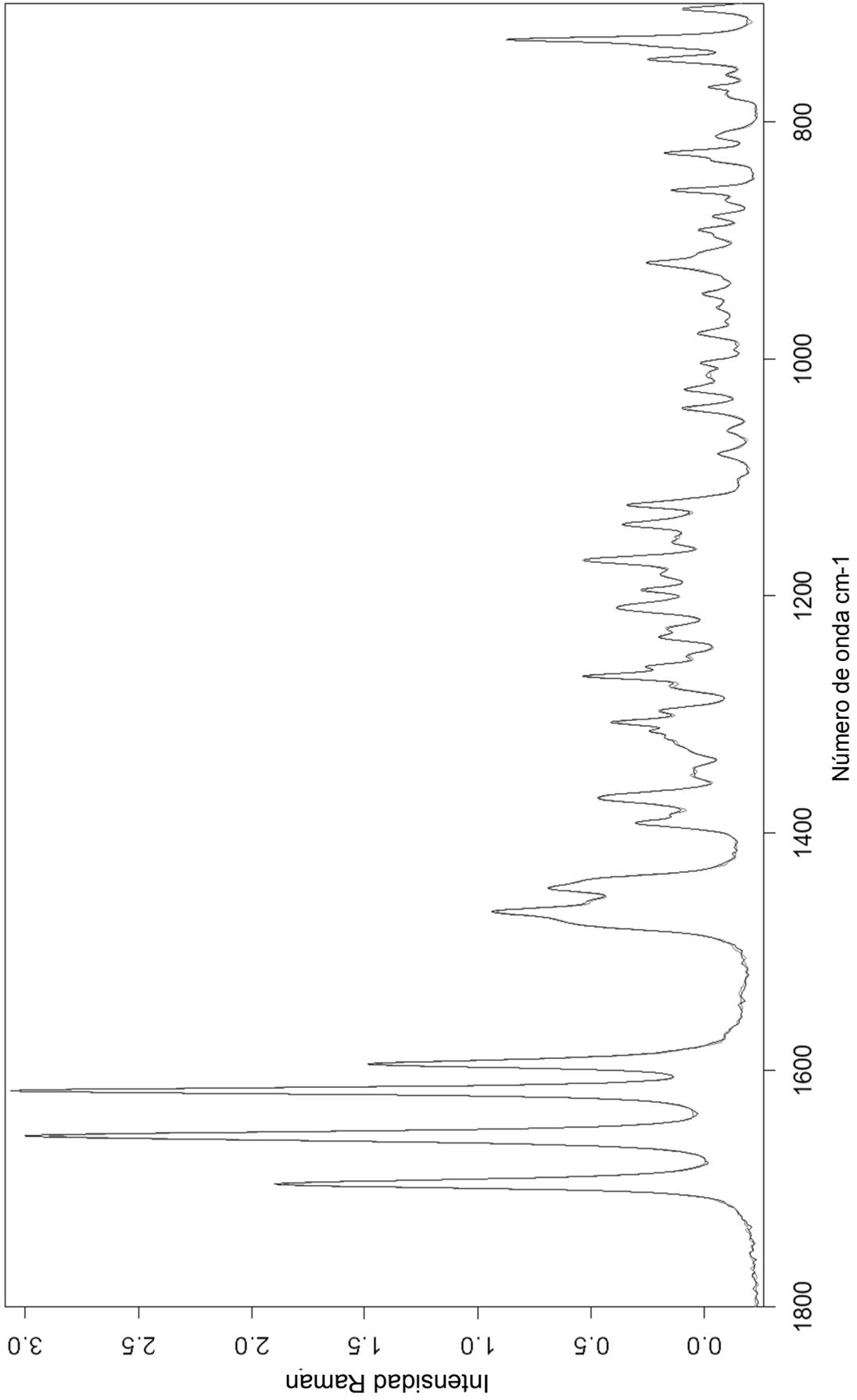


FIG. 107

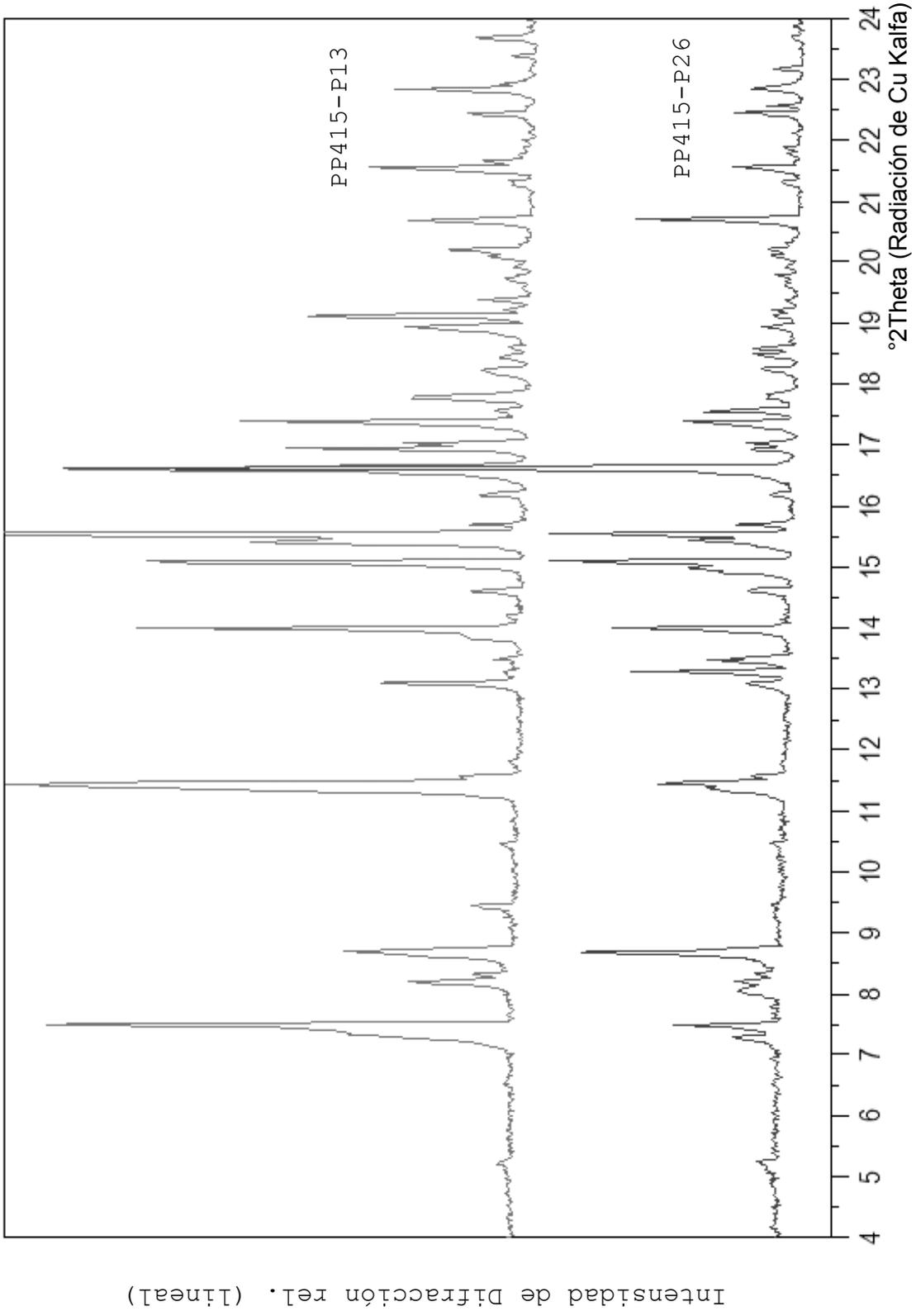


FIG. 108

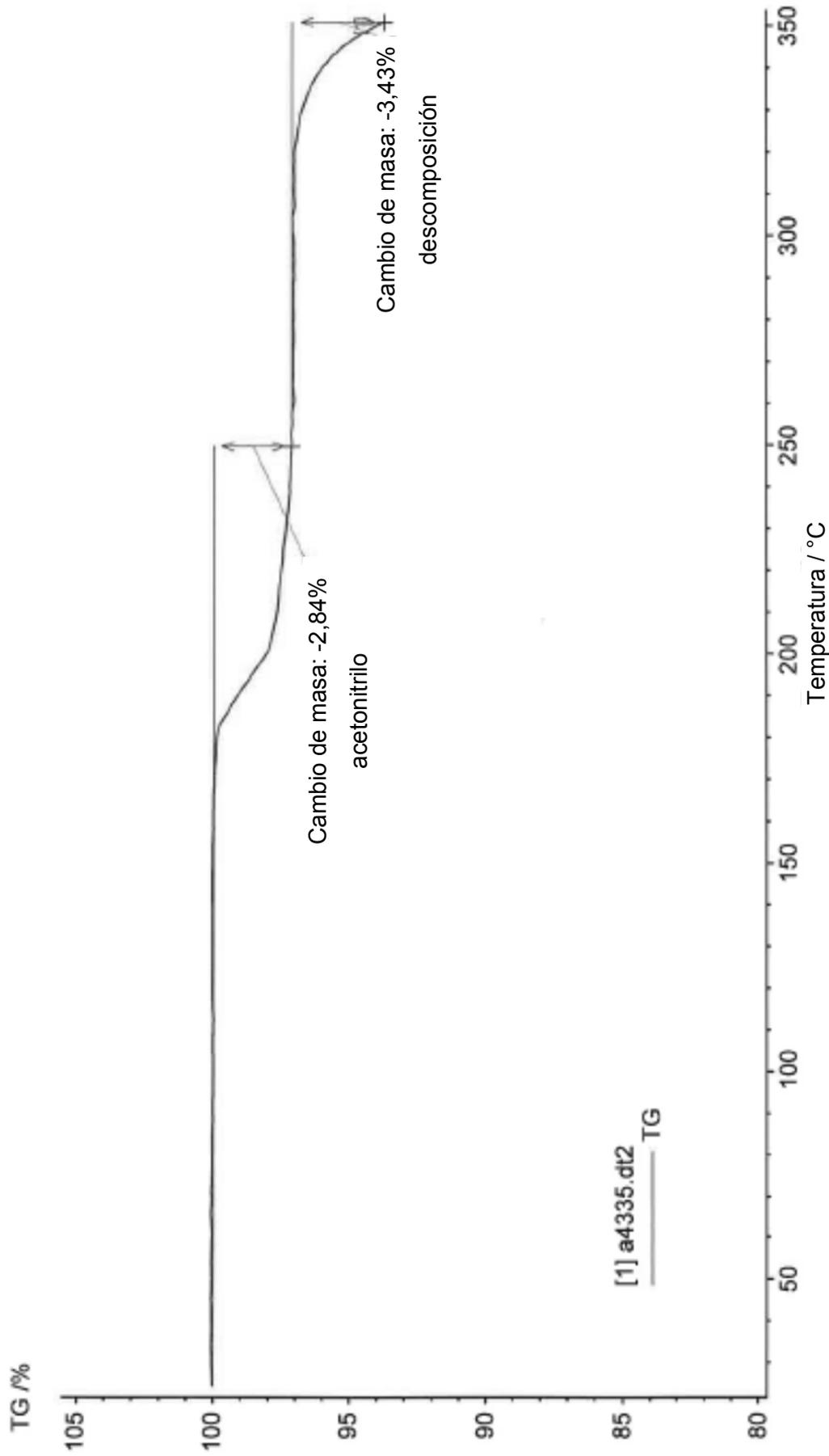


FIG. 109

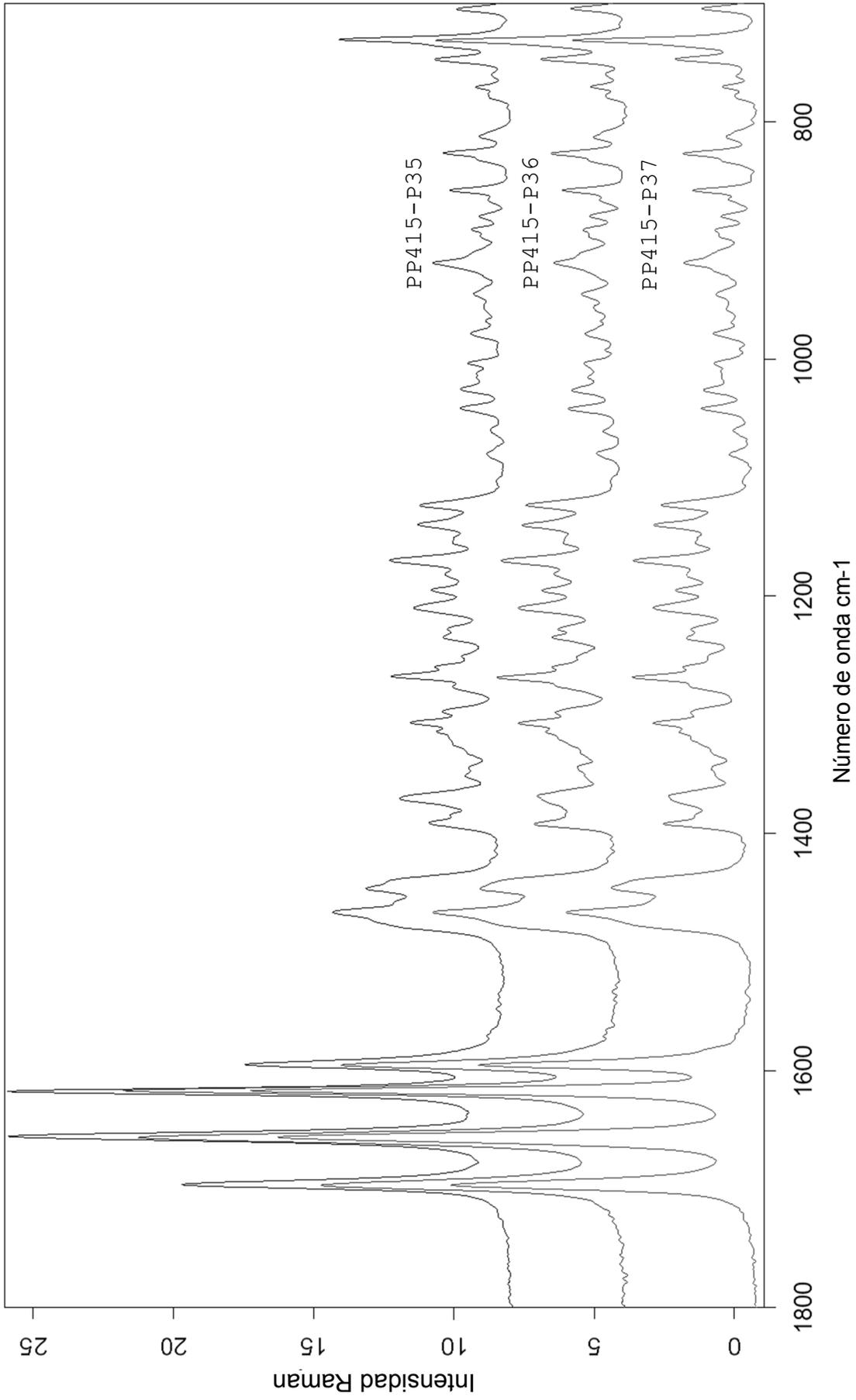


FIG. 110

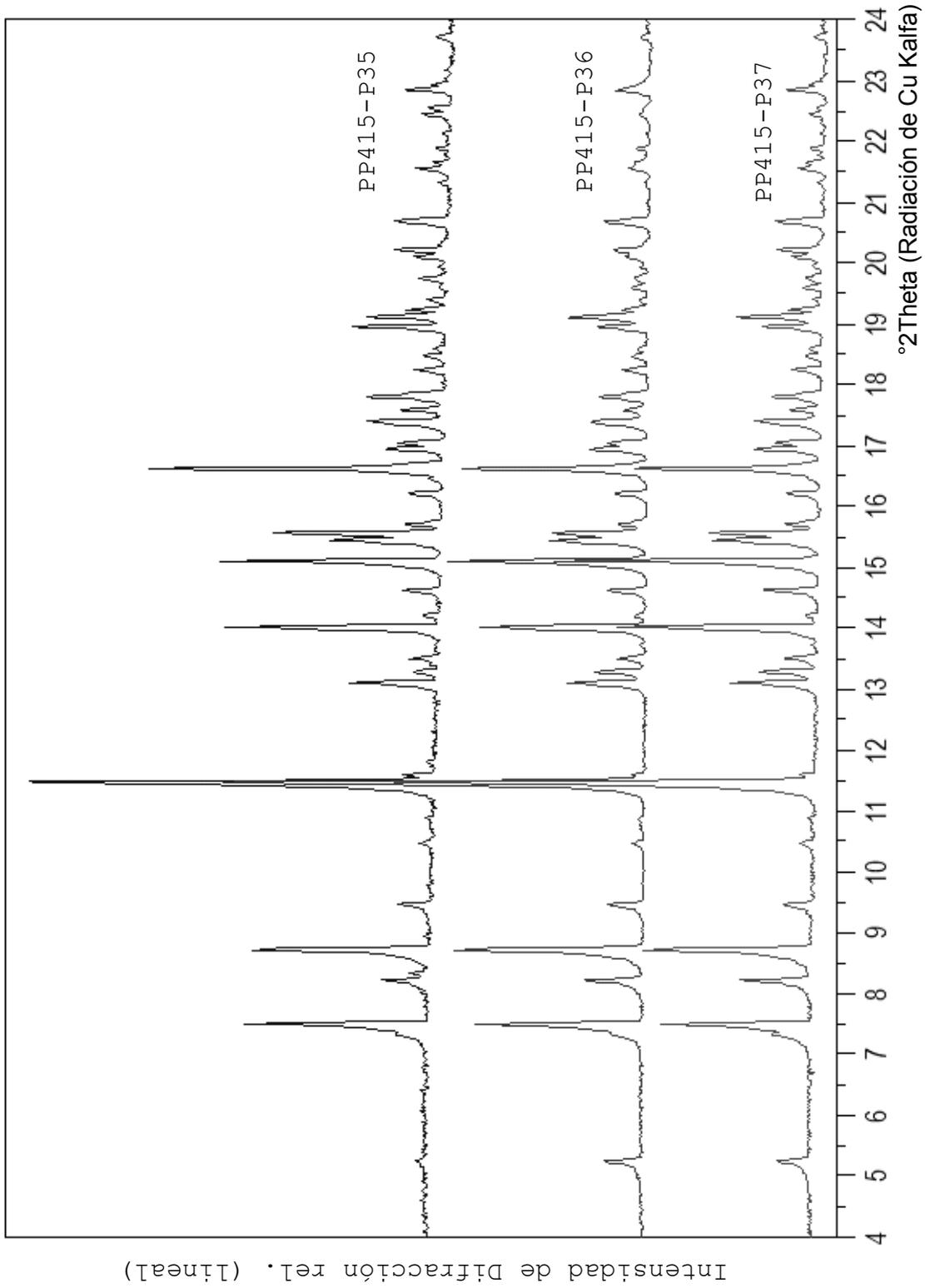


FIG. 111

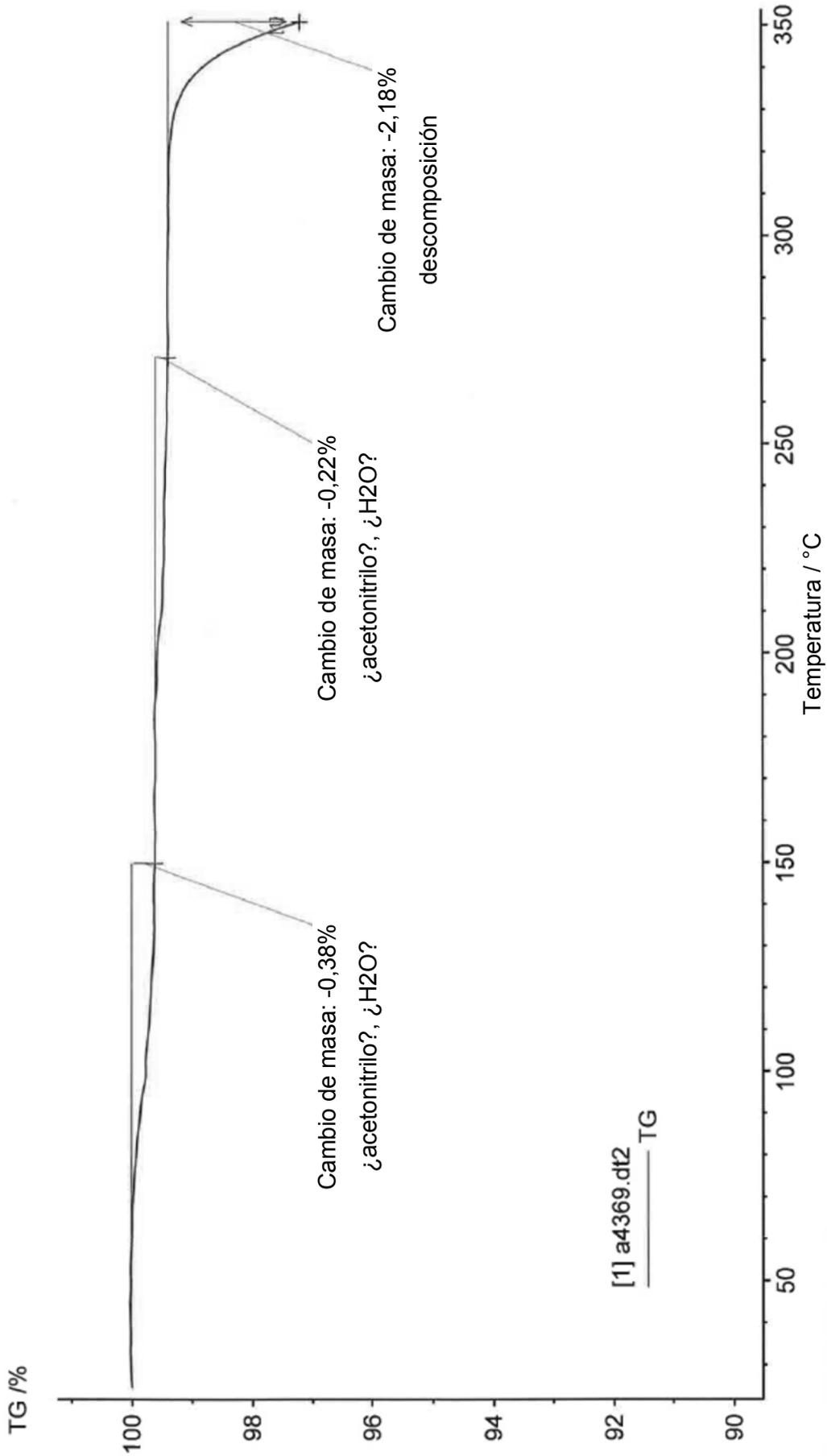


FIG. 112

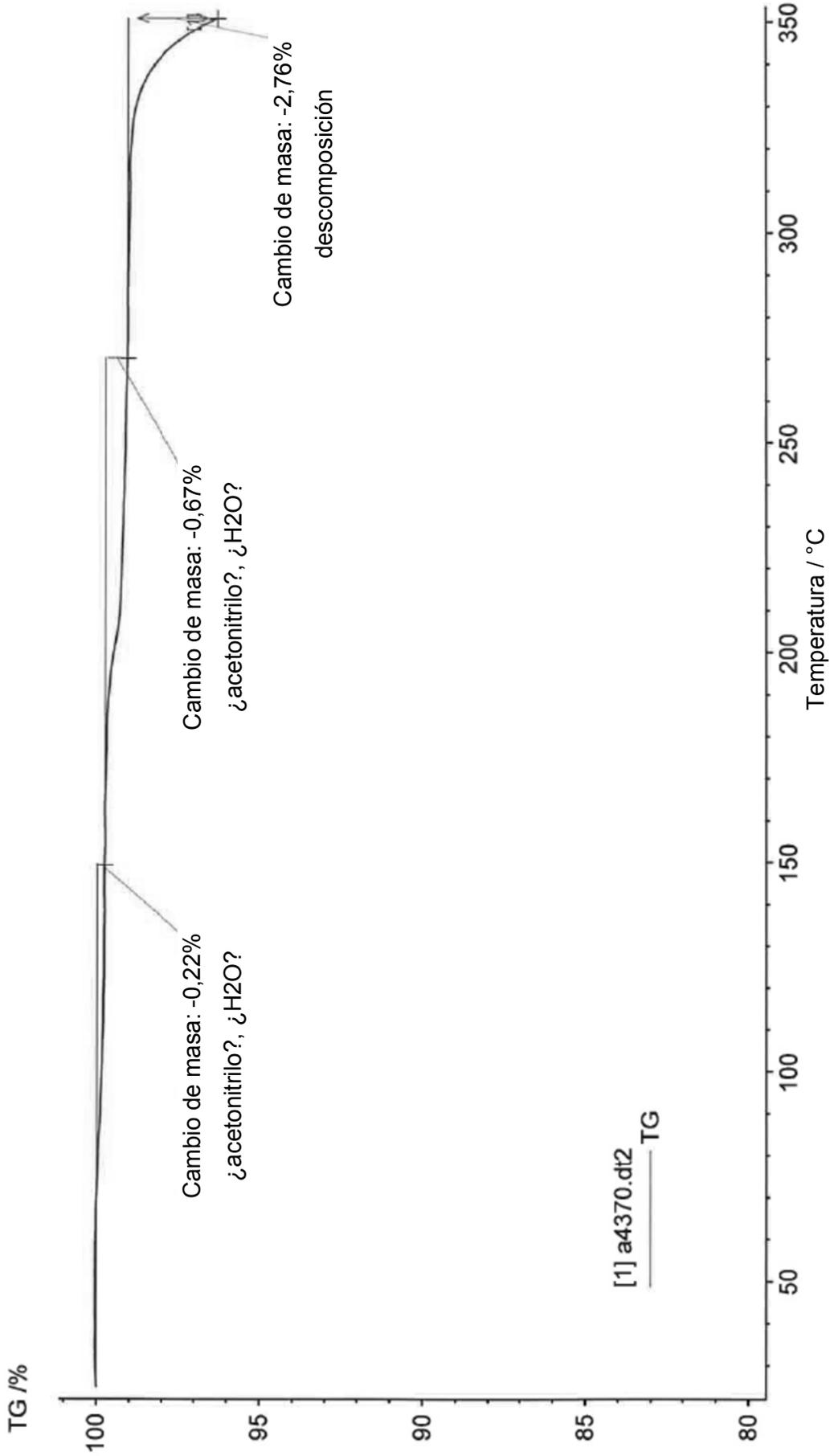


FIG. 113

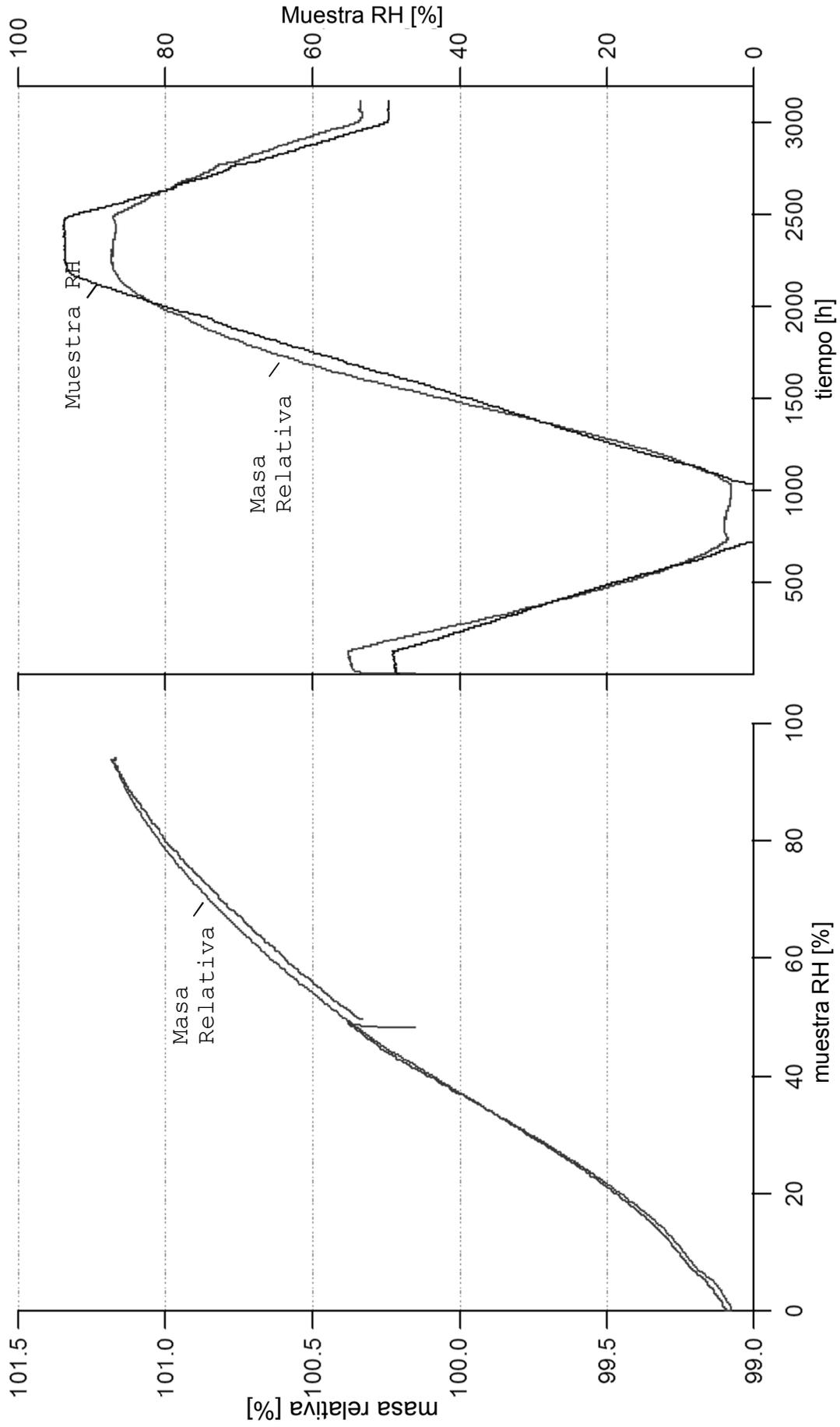


FIG. 114

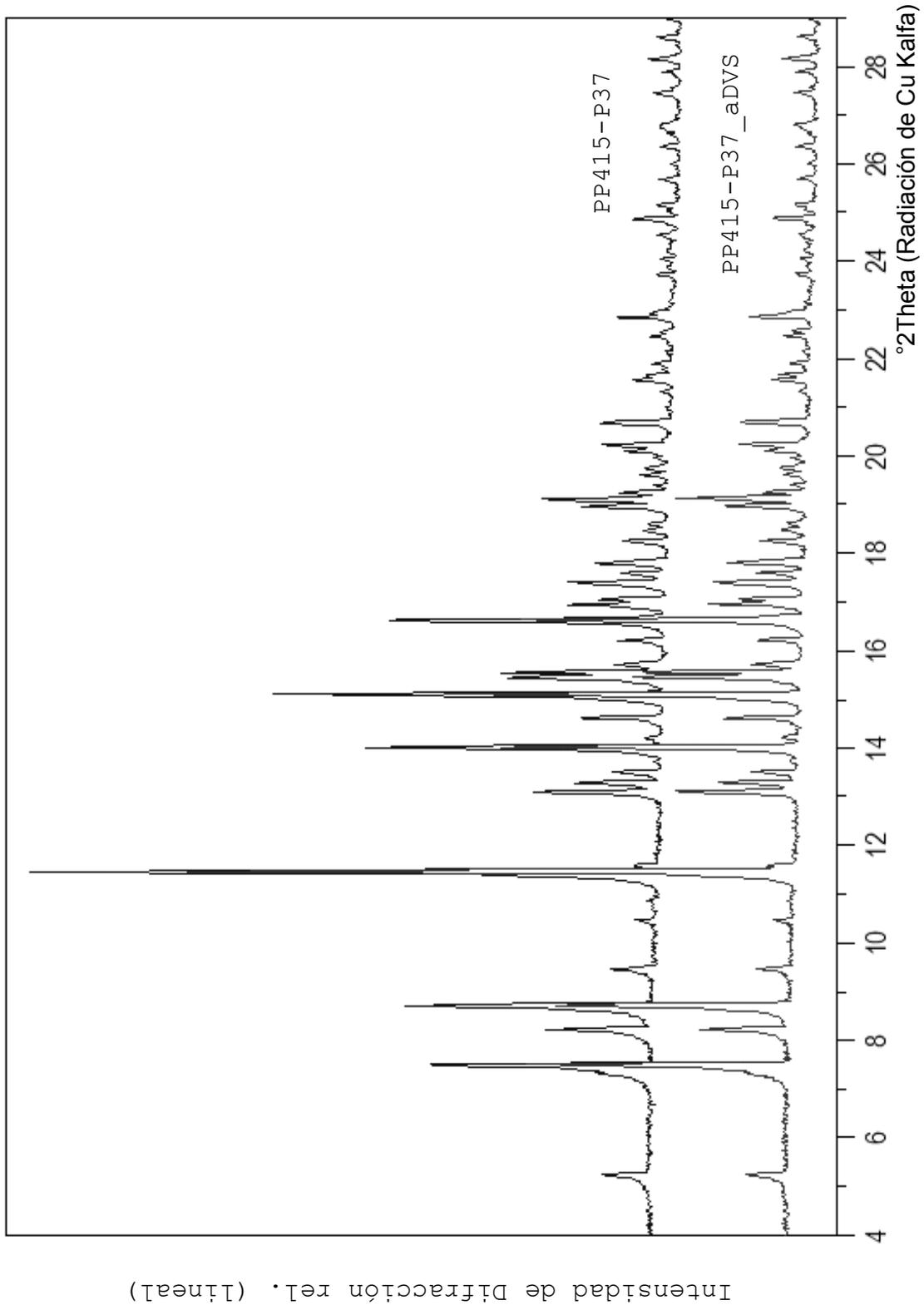
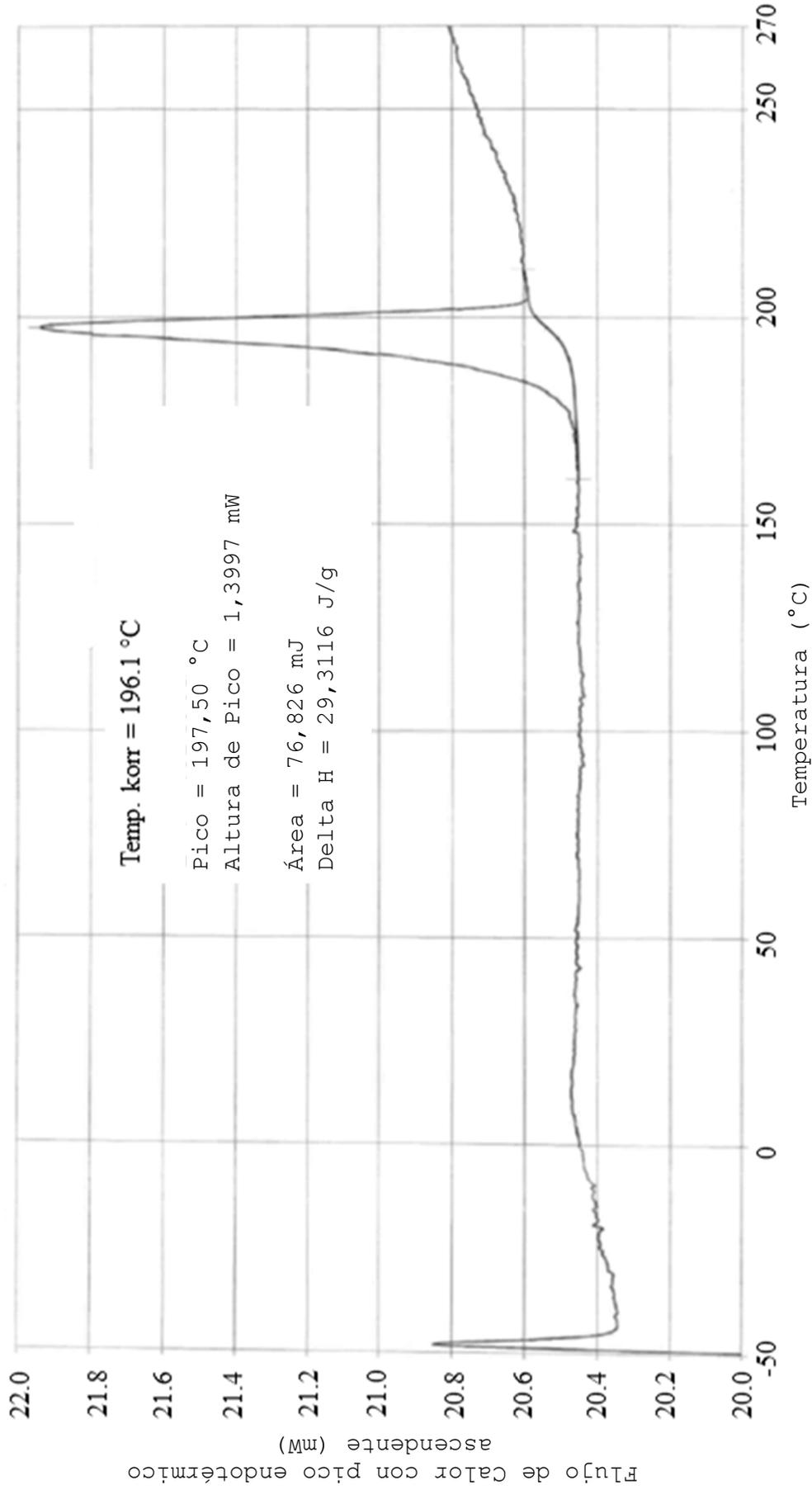


FIG. 115



Calor desde -50,00°C a 270,00°C a 10,00°C/min

FIG. 116

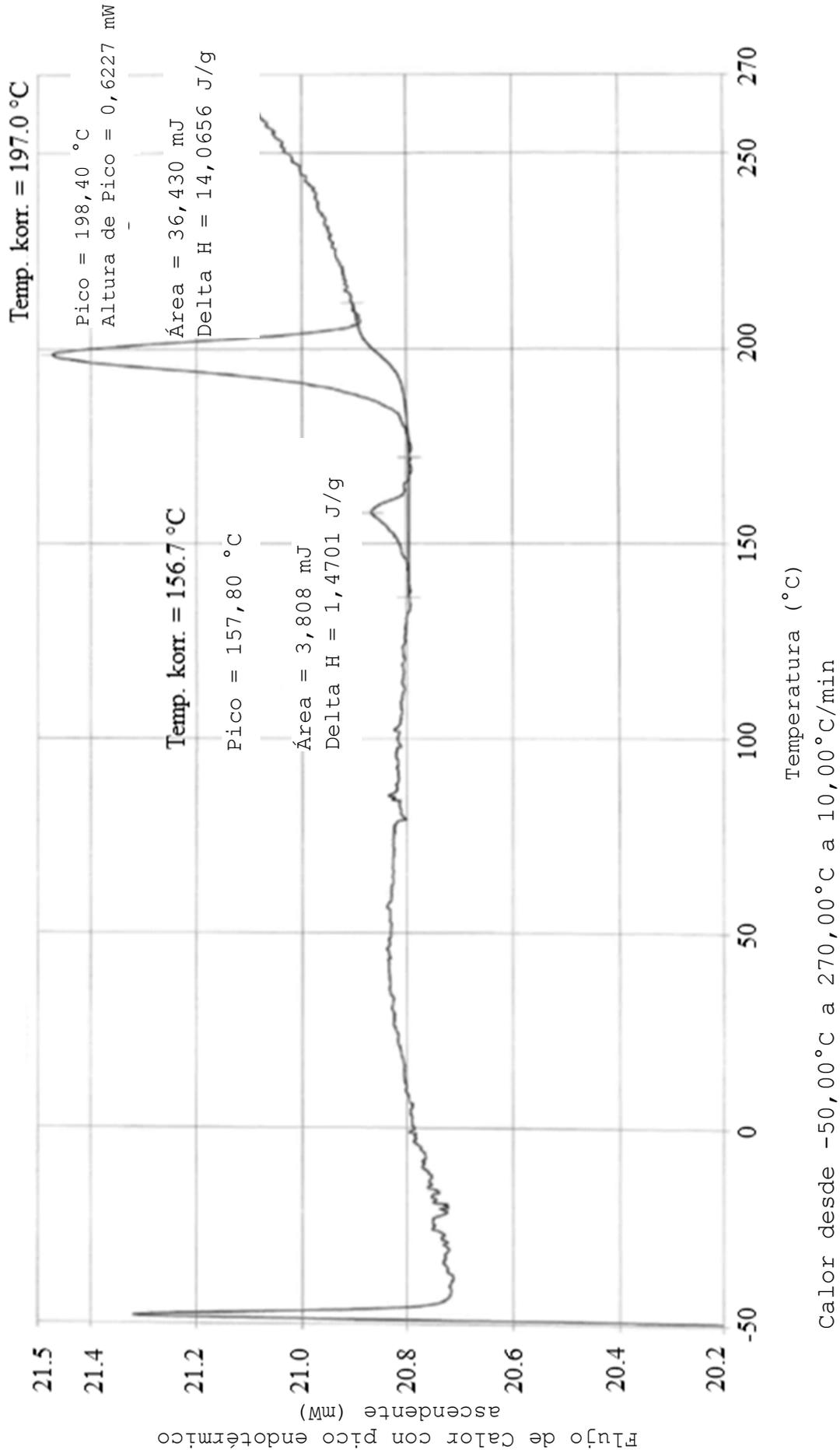
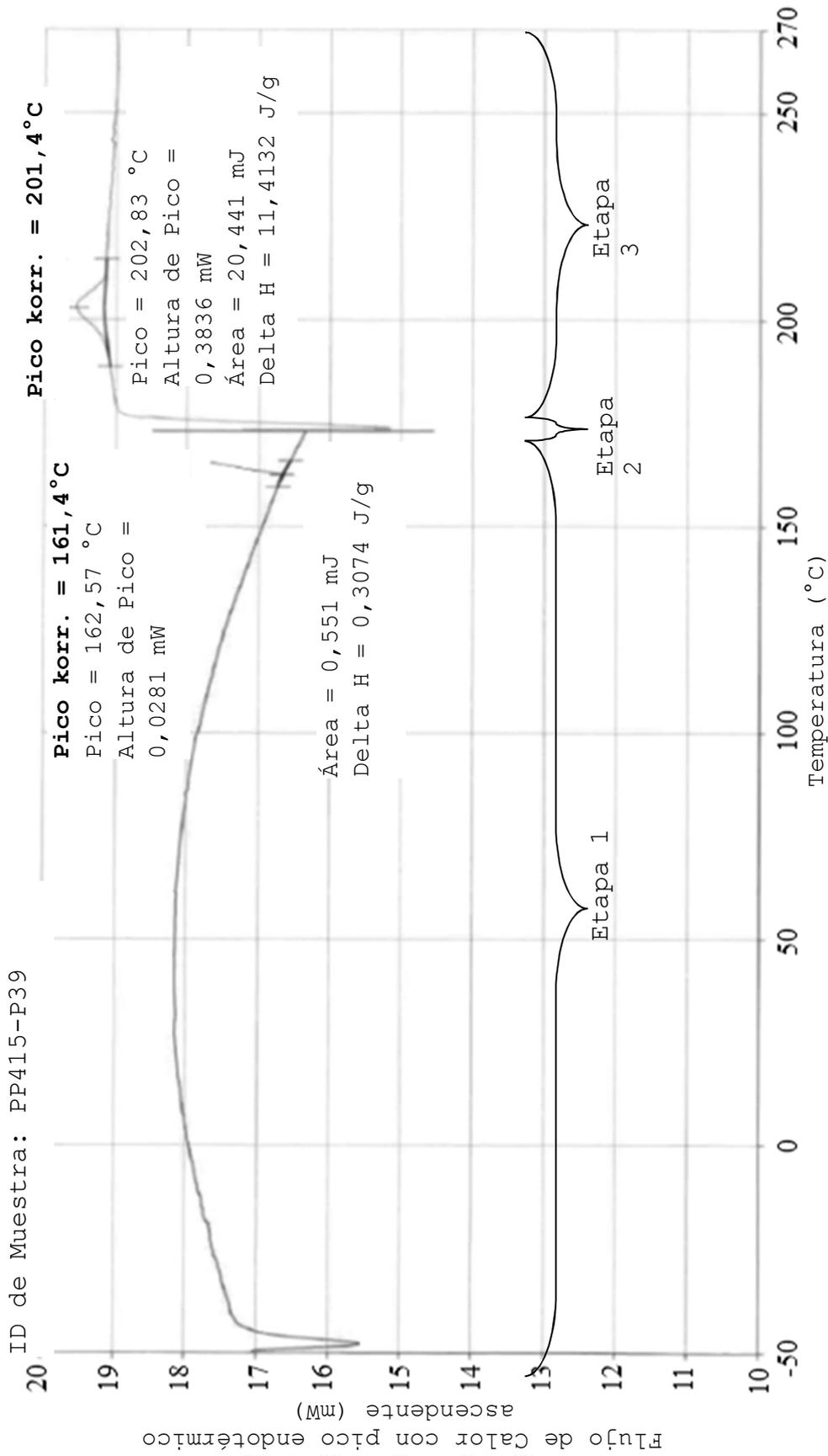


FIG. 117



- 1) Calor desde -50,00°C a 173,00°C a 10,00°C/min 3) Calor desde 173,00°C a 270,00°C a 10,00°C/min
- 2) Mantenido durante 30,0 min a 173,00°C

FIG. 118

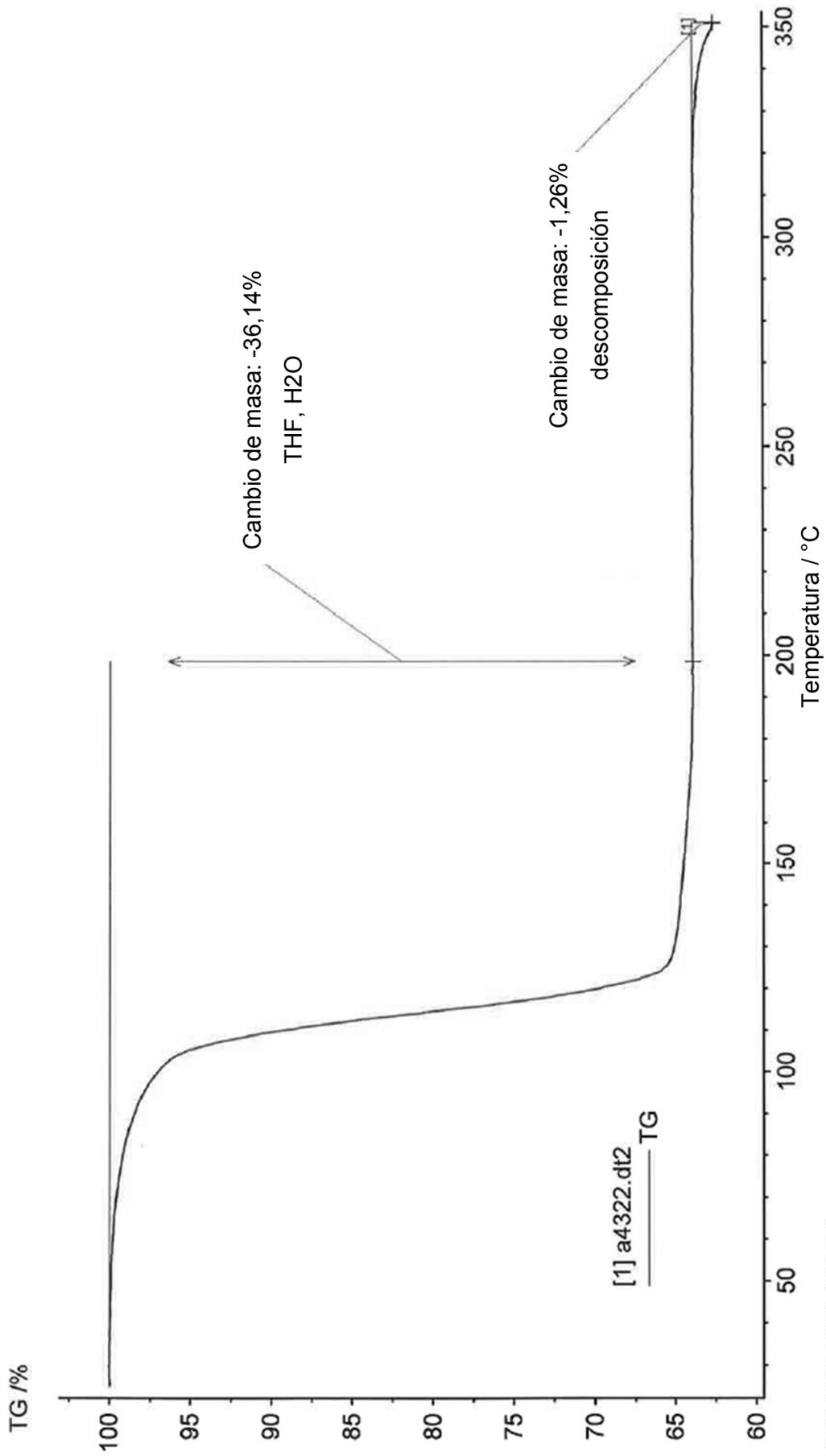


FIG. 119

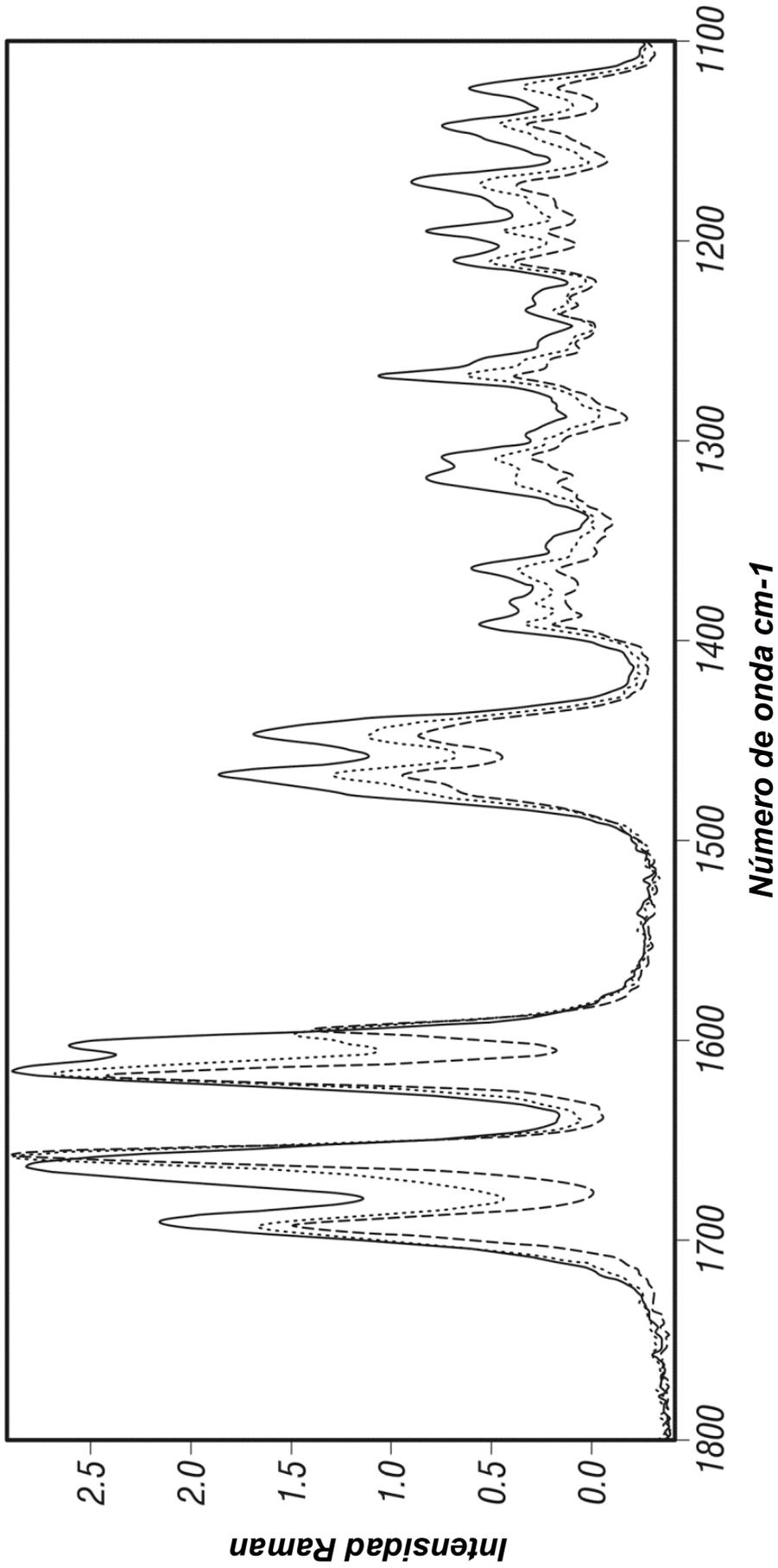


FIG. 120

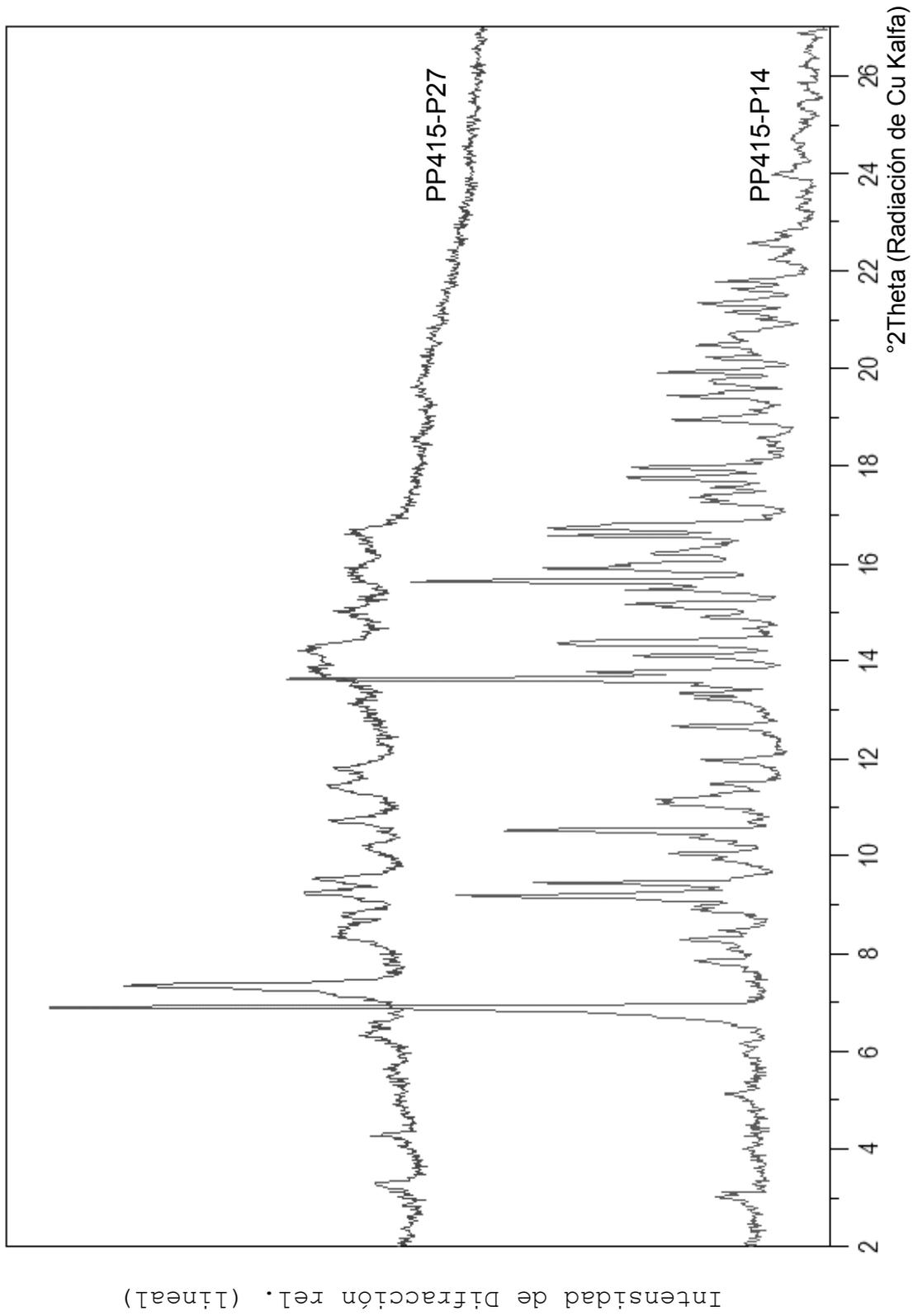


FIG. 121

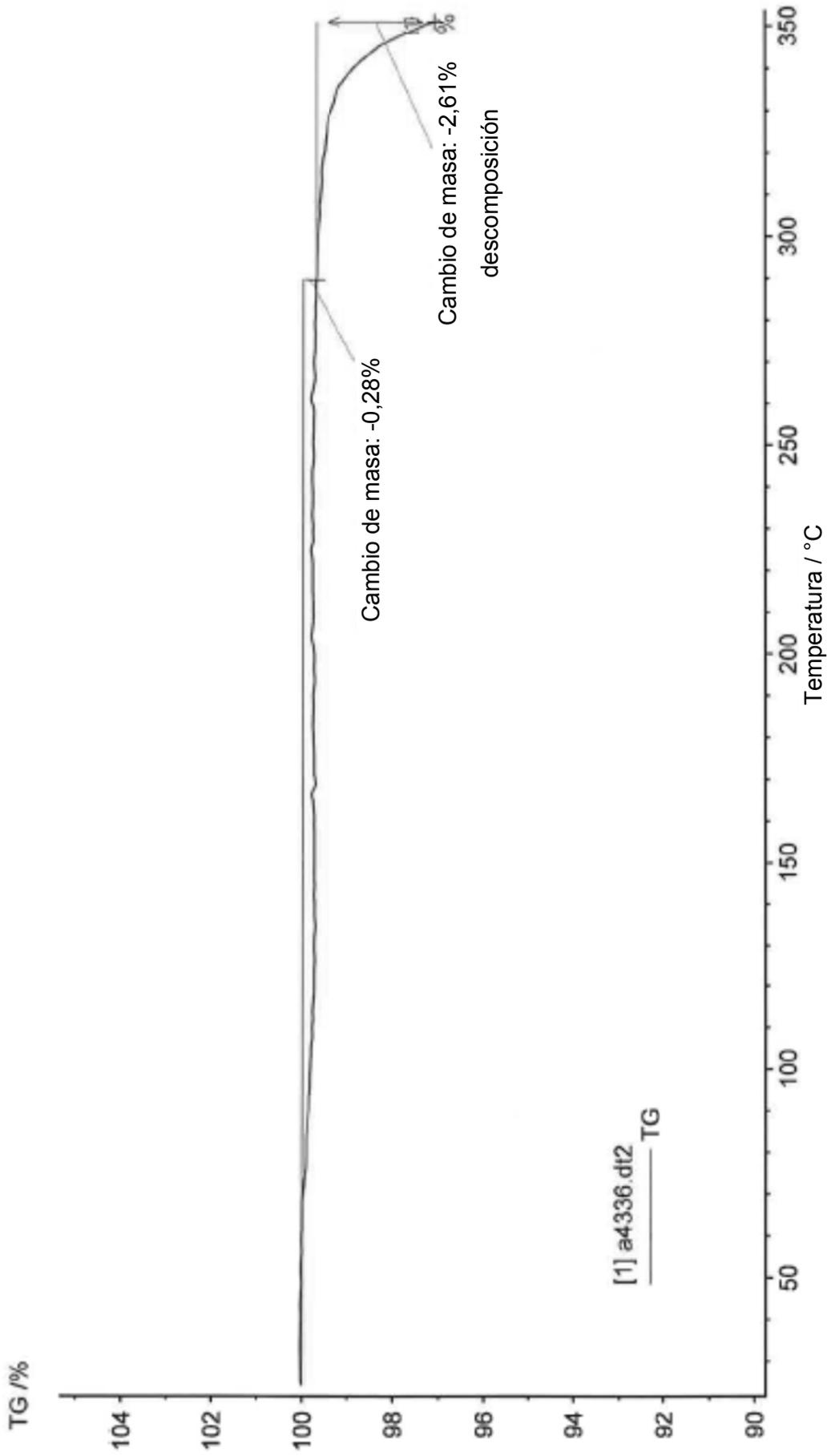


FIG. 122

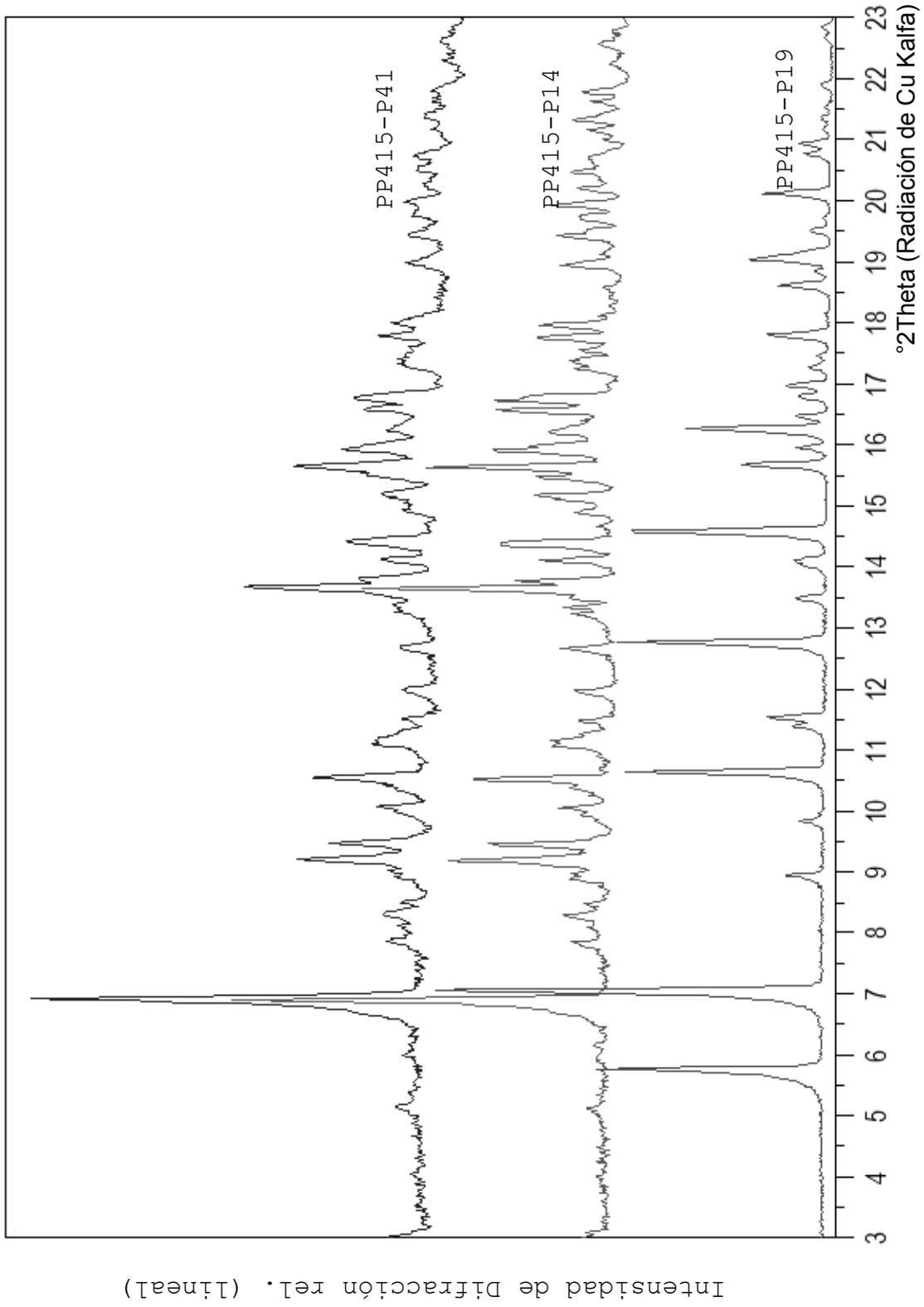


FIG. 123

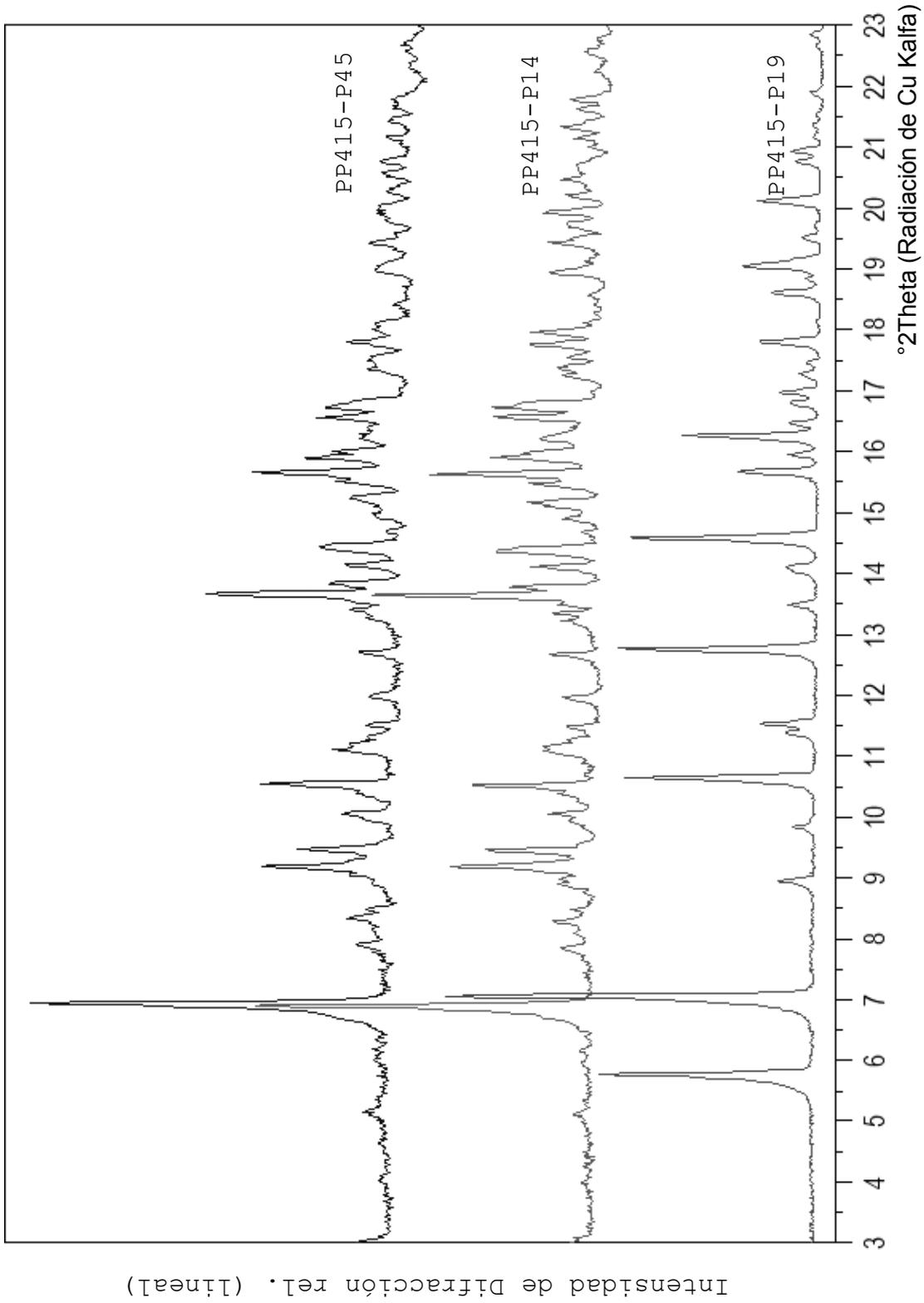


FIG. 124

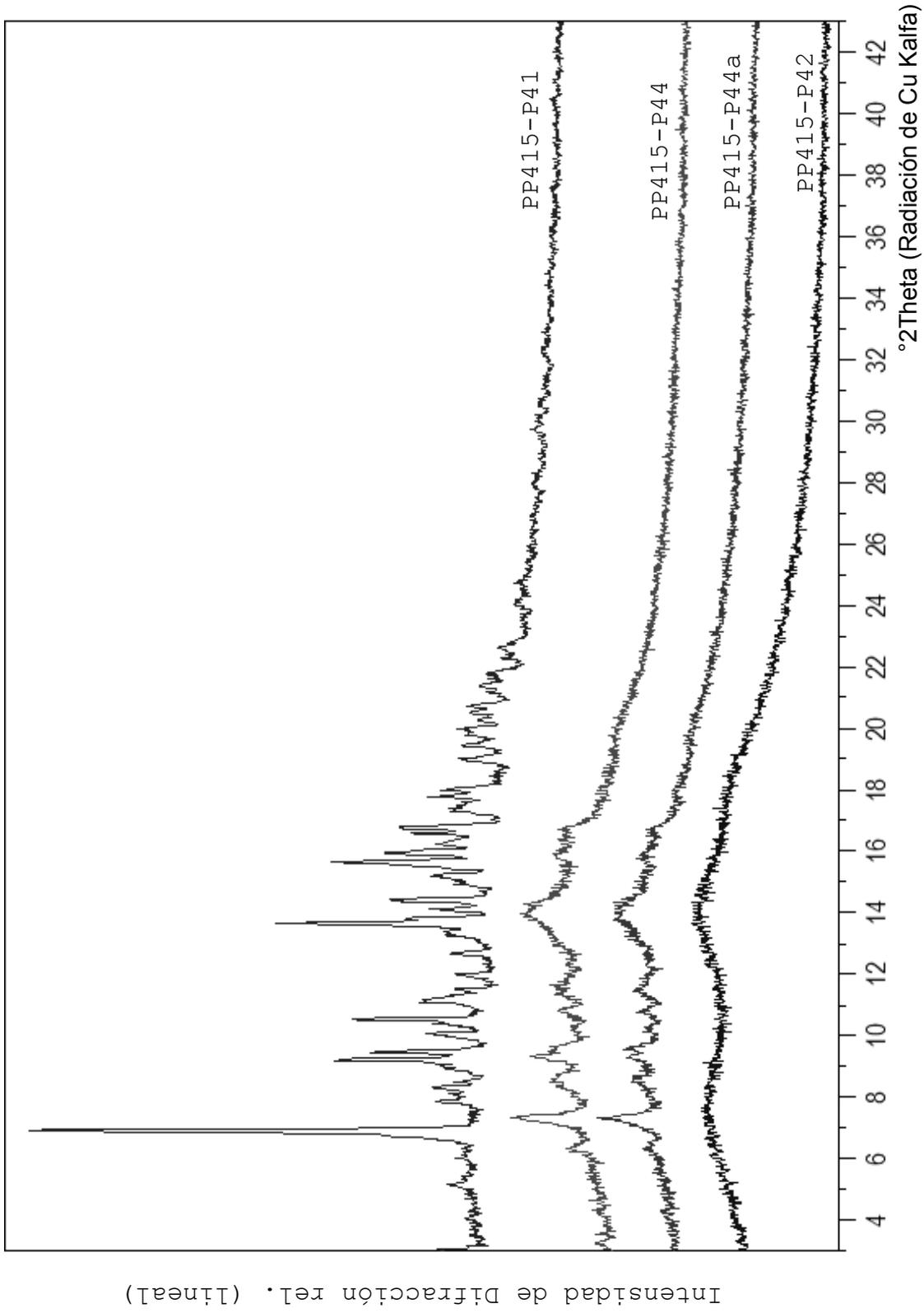


FIG. 125

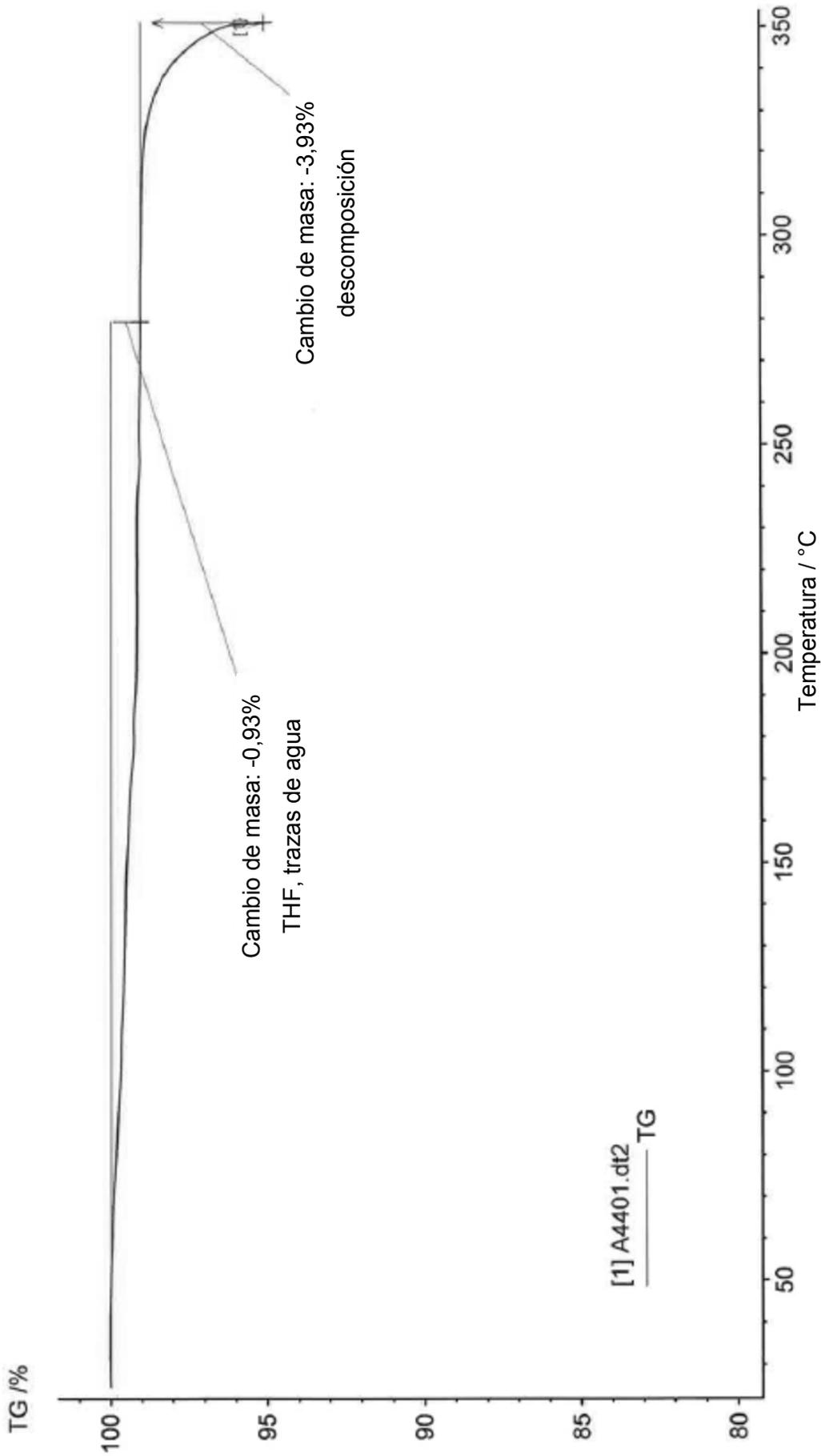


FIG. 126

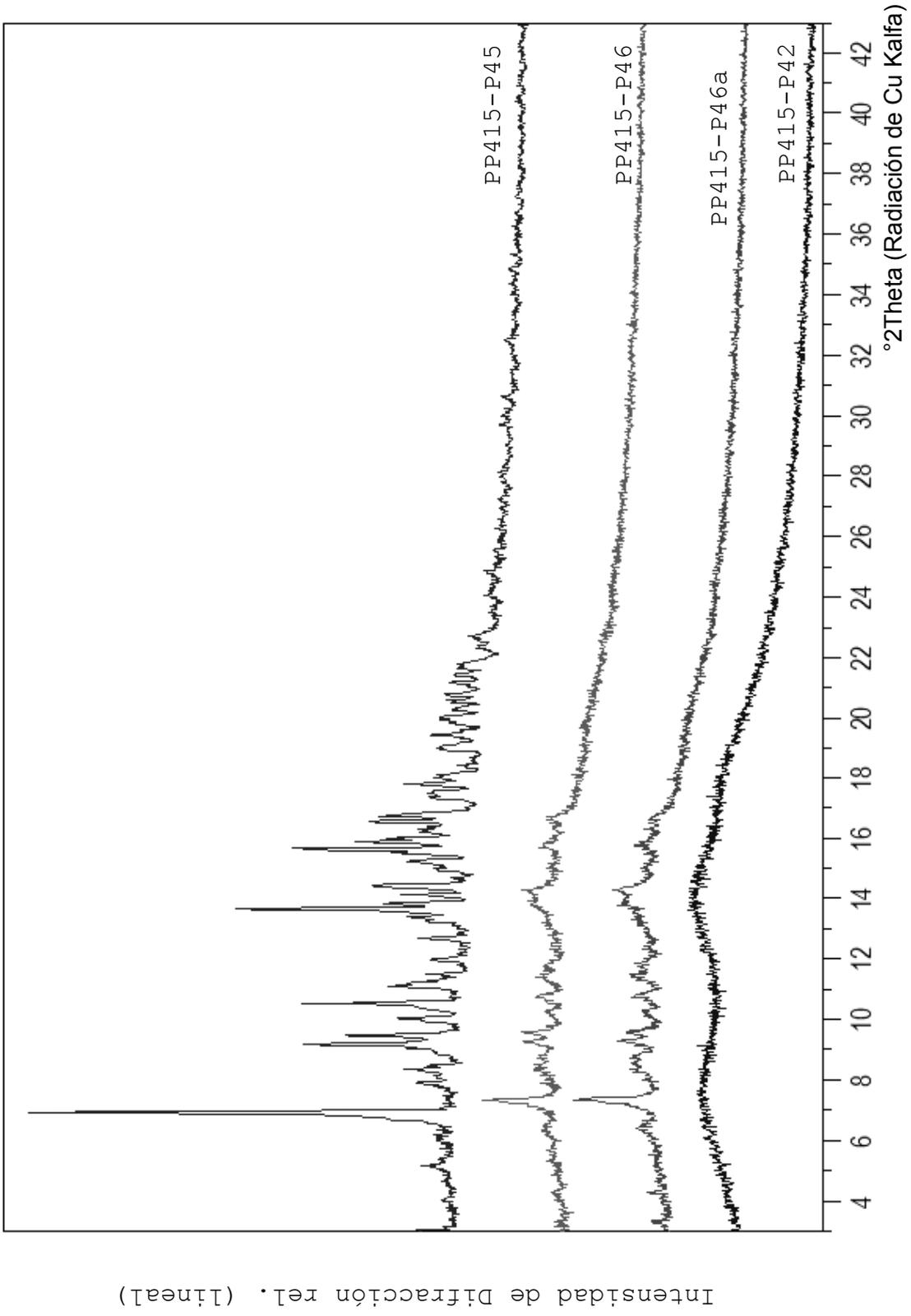


FIG. 127

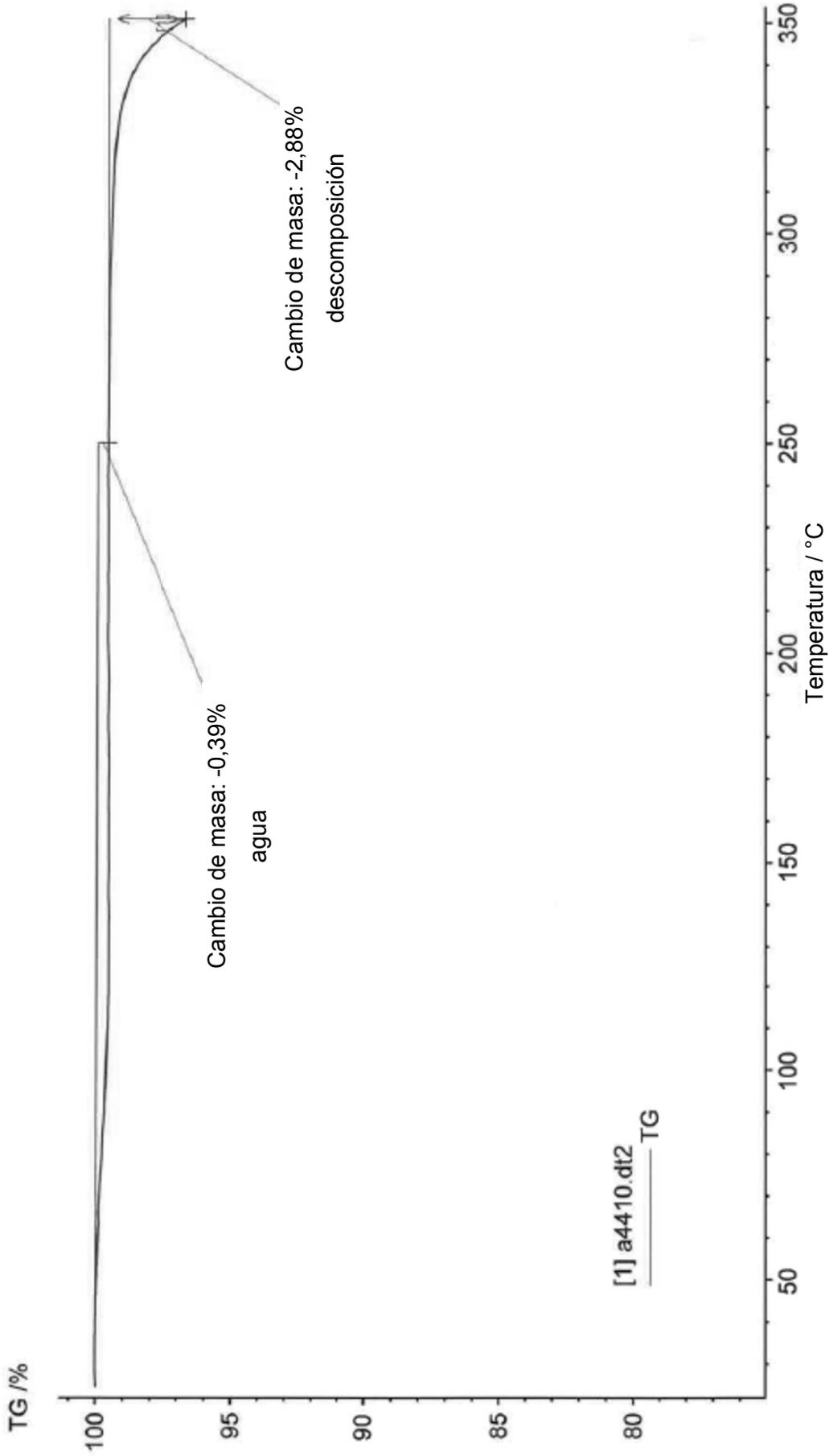


FIG. 128

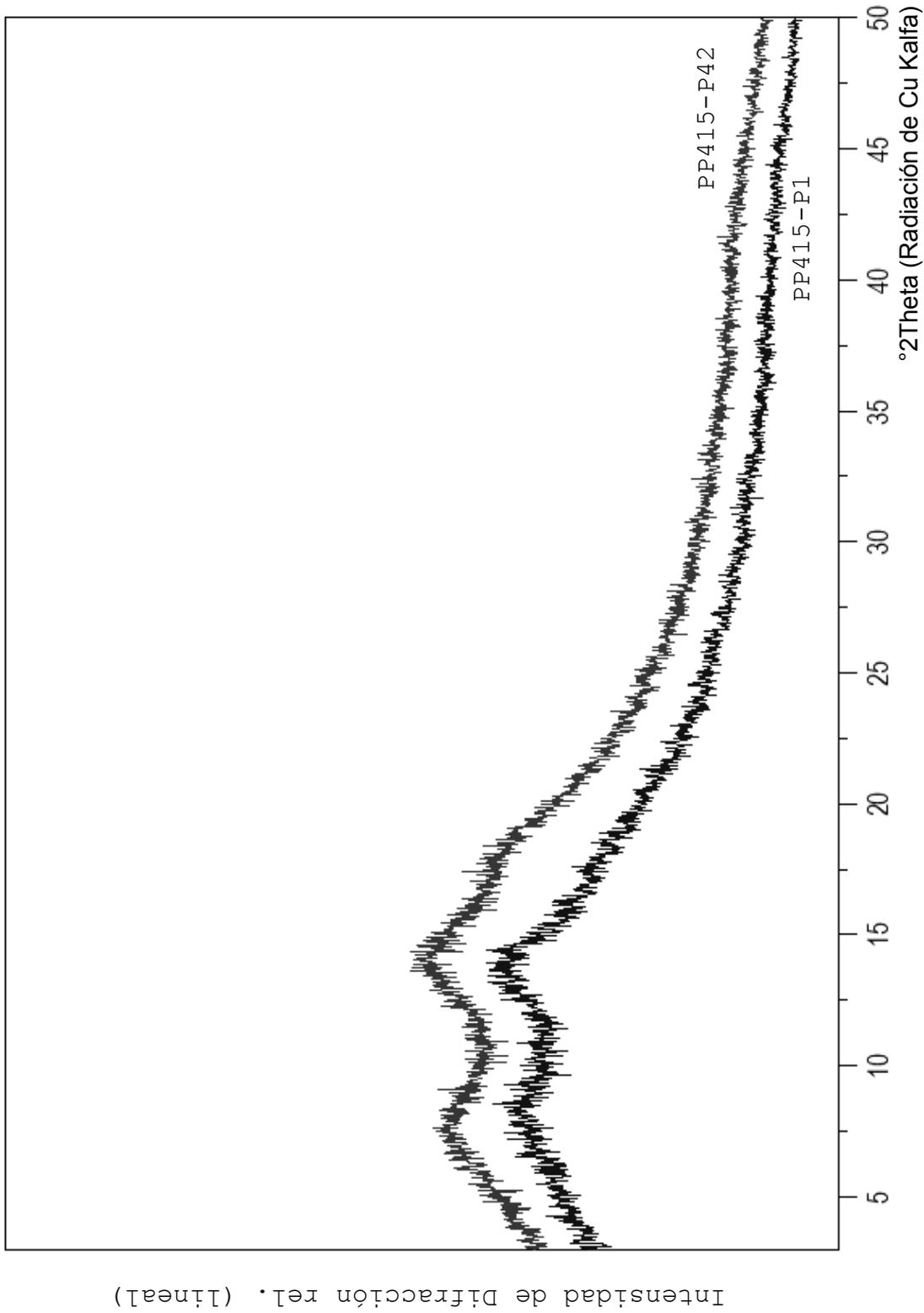


FIG. 129

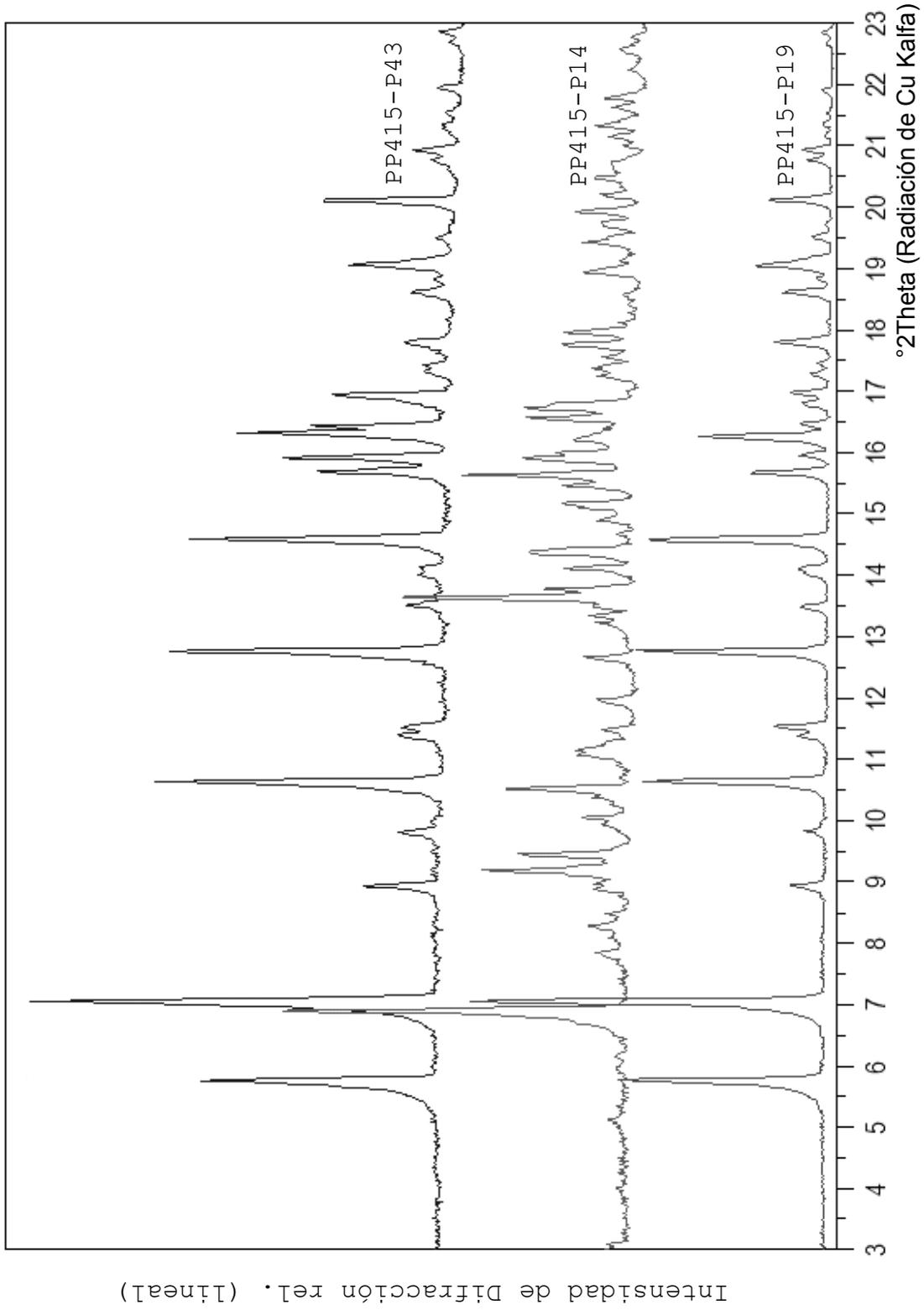


FIG. 130

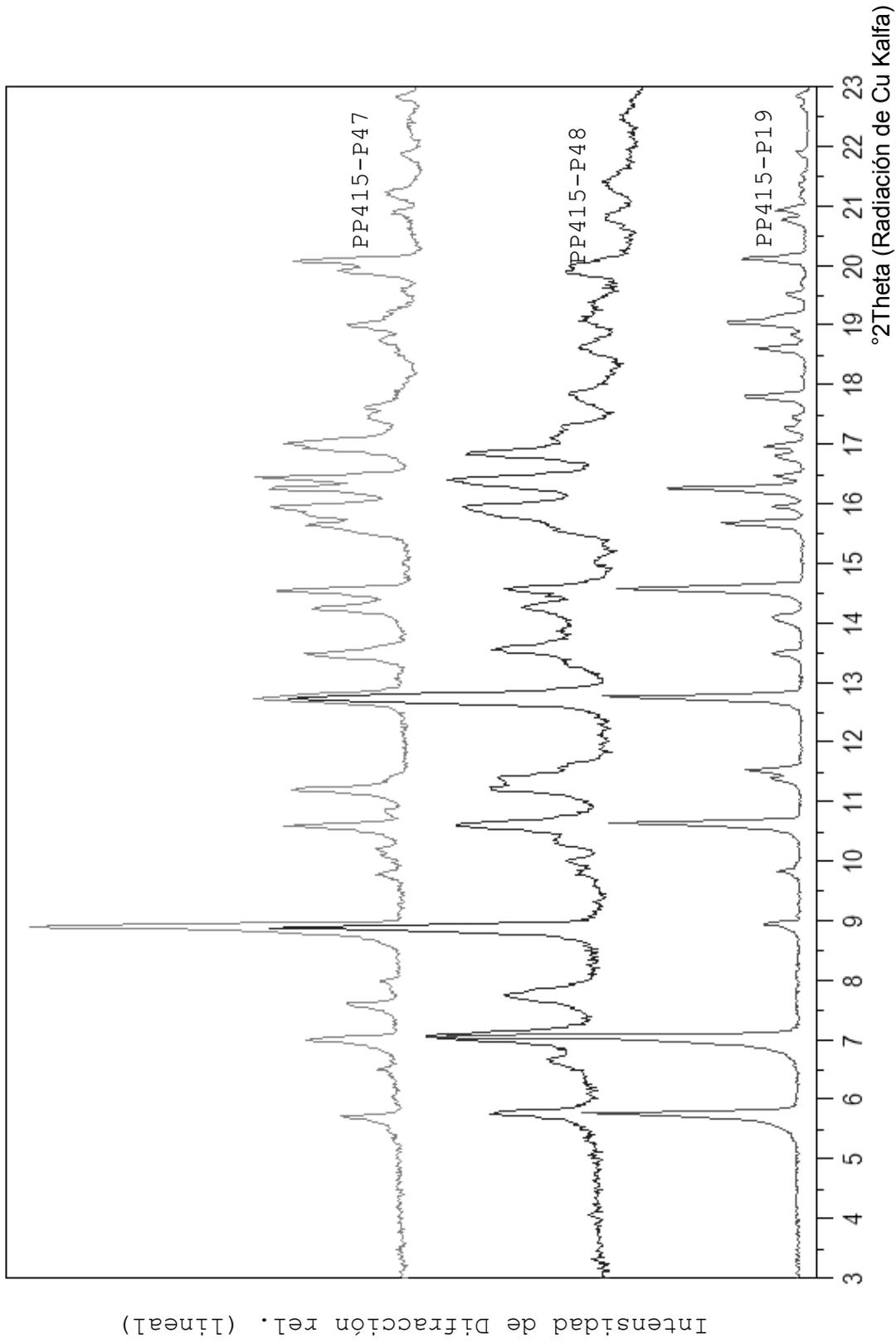


FIG. 131

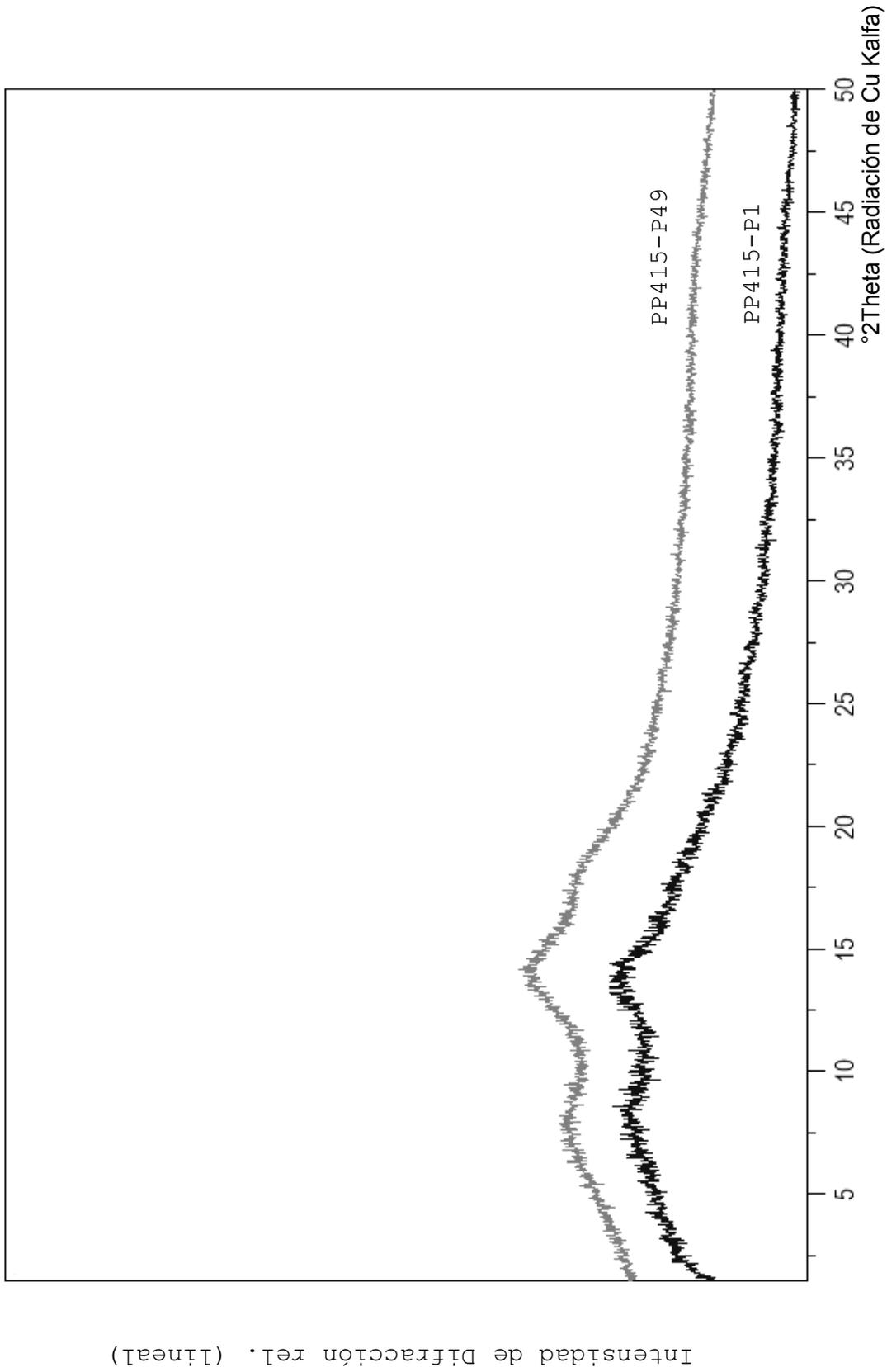


FIG. 132