

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 626**

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: **24.04.2014 PCT/US2014/035279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14176415**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014 E 14727306 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2989114**

54 Título: **Derivados de 2,2-difluoropropionamida de bardoxolone metilo, formas polimórficas y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

24.04.2013 US 201361815502 P

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

27.09.2018

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**SHEIKH, AHMAD Y.;
MATTEI, ALESSANDRA y
WANG, XIU C.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 683 626 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 bardoxolone metilo, formas polimórficas y métodos de uso de los mismos

Descripción**ANTECEDENTES DE LA INVENCION****5 I. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a formas polimórficas del 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,

10 También se denomina en el presente documento como RTA 408, 63415 o PP415. La presente invención también se refiere a métodos para la preparación y uso del mismo, a composiciones farmacéuticas del mismo, y a kits y artículos de fabricación del mismo.

II. Descripción de la técnica relacionada

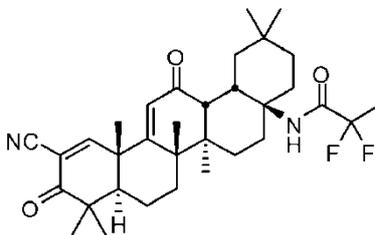
15 La actividad antiinflamatoria y antiproliferativa del triterpenoide que existe de forma natural, el ácido oleanólico, se ha mejorado por modificaciones químicas. Por ejemplo, se han desarrollado ácido 2-ciano-3,12-diooxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) y compuestos relacionados. Véanse Honda *et 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 las patentes de EE.UU. 8.129.429, 7.915.402, 8.124.799 y 7.943.778. El éster metílico, bardoxolone metilo (CDDO-Me), se ha evaluado en ensayos clínicos de fase II y III para el tratamiento y la prevención de nefropatía diabética y enfermedad renal crónica. Véase Pergola *et al.*, 2011.

20 También se ha mostrado que los análogos sintéticos de triterpenoide de ácido oleanólico son inhibidores de procesos inflamatorios celulares, tales como la inducción por IFN- γ y de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de COX-2 en macrófagos de ratón. Véanse Honda *et al.*, (2000a), Honda *et al.* (2000b), Honda *et al.* (2002) y las patentes de EE.UU. 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 de proteína y así modulan la actividad de varias vías de señalización celular importantes relacionadas con el estrés oxidativo, control del ciclo celular e inflamación (por ejemplo, Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2008; Liby *et al.*, 2007, y las patentes de EE.UU. 8.129.429, 7.915.402, 8.124.799 y 7.943.778).

30 Dado que varían los perfiles de actividad biológica de los derivados de triterpenoide conocidos, y en vista de la amplia variedad de enfermedades que se pueden tratar o prevenir con los compuestos que tienen potentes efectos antioxidantes y antiinflamatorios, y el alto grado de necesidades médicas no cumplidas representadas dentro de esta variedad de enfermedades, se desea sintetizar nuevos compuestos con diferentes perfiles de actividad biológica para el tratamiento o la prevención de una o más indicaciones.

SUMARIO DE LA INVENCION

35 Según la presente invención, se proporcionan formas polimórficas de un compuesto de la fórmula (también denominado RTA 408, 63415 o PP415):



40 En una de dos realizaciones reivindicadas, la forma polimórfica es cristalina, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo (CuK α) que comprende picos en aproximadamente 10,601, 11,638, 12,121, 13,021, 13,435, 15,418, 15,760, 17,830, 18,753 y 19,671° 2 θ . En algunas realizaciones, el patrón de difracción de rayos X de polvo (CuK α) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 53.

En la otra de las dos realizaciones reivindicadas, la forma polimórfica es cristalina, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo (CuK α) que comprende picos en aproximadamente 7,552, 10,339, 11,159, 12,107, 14,729, 15,329, 15,857, 16,824, 17,994, 18,344, 19,444, 19,764, 20,801 y 22,414° 2 θ . En algunas realizaciones, el patrón de difracción de rayos X (CuK α) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 56.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un principio activo que consiste en las formas polimórficas anteriormente mencionadas, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración: por vía oral, intradiposa, intrarterial, intrarticular, intracraneal, intradérmica, intralesional, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrarrectal, intratecal, intratraqueal, intratumoral, intraumbilical, intravaginal, intravenosa, intravesicular, intravítrea, liposomal, local, mucosa, parenteral, rectal, subconjuntiva, subcutánea, sublingual, tópica, transbucal, transdérmica, vaginal, en cremas, en composiciones de lípido, mediante un catéter, mediante un lavado, mediante infusión continua, mediante infusión, mediante inhalación, mediante inyección, mediante administración local, o mediante perfusión localizada.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración oral, intrarterial, intravenosa o tópica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración por vía oral.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula como una cápsula dura o blanda, un comprimido, un jarabe, una suspensión, una dispersión sólida, una oblea o un elixir. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica según la invención comprende además un agente que potencia la solubilidad y dispersabilidad. 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, una pomada, un bálsamo, 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 principio activo es desde aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % en peso, aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 3 % en peso, o 0,01 %, 0,1 %, 1 %, o 3 % en peso.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan métodos de prevención o tratamiento de una afección asociada con inflamación o estrés oxidativo en un paciente en necesidad de los mismos, que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente o más adelante. La invención se refiere asimismo a los polimorfos anteriormente mencionados del 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, 63415 o PP415), o a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades anteriormente mencionadas y un vehículo farmacéuticamente aceptable (incluyendo, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas como se ha descrito anteriormente), para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección asociada con inflamación o estrés oxidativo. La invención también se refiere al uso de las formas polimórficas anteriormente mencionadas o la composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección asociada con inflamación o estrés oxidativo. En algunas realizaciones, la afección está asociada con inflamación. En otras realizaciones, la afección está asociada con estrés oxidativo. En algunas realizaciones, la afección es una enfermedad o trastorno de la piel, septicemia, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria del intestino, una complicación de exposición localizada o de cuerpo entero a radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad del hígado, pancreatitis, un trastorno ocular, una enfermedad pulmonar o diabetes.

La presente invención se refiere además a los polimorfos anteriormente mencionados del 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 composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades anteriormente mencionadas y un vehículo farmacéuticamente aceptable (incluyendo, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas como se ha descrito anteriormente), para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada de una enfermedad o trastorno de la piel, septicemia, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria del intestino, una complicación de exposición localizada o de cuerpo entero a radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad del hígado, pancreatitis, un trastorno ocular, una enfermedad pulmonar, o diabetes. Por consiguiente, la invención se refiere al uso de la forma polimórfica anteriormente mencionada o composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada de una enfermedad o trastorno de la piel, septicemia, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria del intestino, una complicación de exposición localizada o de cuerpo entero a radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad del hígado, pancreatitis, un trastorno ocular, una enfermedad pulmonar, o diabetes. La divulgación también se refiere a un método de tratamiento o prevención de una afección seleccionada de una enfermedad o trastorno de la piel, septicemia, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria del intestino, una complicación de exposición localizada o de cuerpo entero a radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad del hígado, 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 eficaz de la forma polimórfica o composición farmacéutica anteriormente mencionada.

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,

quemadura solar, complicaciones de la quemadura solar, trastornos de la pigmentación de la piel, una afección de la piel relacionada con el envejecimiento; una herida posquirúrgica, una cicatriz de una lesión de la piel o quemadura, psoriasis, una manifestación dermatológica de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad injerto contra huésped, cáncer de piel; o un trastorno que implica hiperproliferación de las 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 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 úlcera de 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 hiperproliferación de las células de la piel. En algunas realizaciones, el trastorno que implica hiperproliferación de las células de la piel es hiperqueratosis.

En otras realizaciones, la afección es una enfermedad autoinmunitaria, tal como artritis reumatoide, lupus, enfermedad de Crohn o psoriasis. En otras realizaciones, la afección es enfermedad del hígado, tal como enfermedad del 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 de la córnea, inflamación posquirúrgica, 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 de la córnea es distrofia corneal endotelial de Fuchs.

En otras realizaciones, la afección es una enfermedad pulmonar, tal como inflamación pulmonar, fibrosis pulmonar, EPOC, asma, fibrosis quística, o fibrosis pulmonar idiopática. En algunas realizaciones, la EPOC se induce por el humo de los cigarros.

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

En otras realizaciones, la afección es cáncer. En algunas realizaciones no limitantes, el cáncer es leucemia, linfoma, mieloma múltiple, o cáncer de mama, piel, pulmón, páncreas, hígado, estómago, intestino delgado, intestino grueso o colon, vesícula biliar, esófago, ovario, endometrio, cuello uterino, mucosa oral o nasal, cerebro, próstata, vejiga, aparato genitourinario, testículo, riñón, genitales, tiroides, o tejido muscular. En algunas realizaciones, el cáncer es un carcinoma o sarcoma.

En algunas realizaciones, el compuesto o composición de la invención se administra antes o inmediatamente después de que un sujeto se trate con radioterapia, quimioterapia, o ambos. En algunas realizaciones, el compuesto o composición de la invención se administra tanto antes como después de que el sujeto se trate con radioterapia, quimioterapia o ambos. En algunas realizaciones, el efecto de la composición de la invención es para reducir los efectos secundarios de la radioterapia, quimioterapia, o radio- y quimioterapia combinada, que incluye mucositis y dermatitis. En algunas realizaciones, el efecto de la composición de la invención es para potenciar la eficacia de la radioterapia, quimioterapia, o radio- y quimioterapia combinada. En algunas realizaciones, el efecto de la composición de la invención es para reducir los efectos secundarios de, y potenciar la eficacia de, la radioterapia, quimioterapia, o radio- y quimioterapia combinada.

También se contempla por la presente divulgación la terapia de tratamiento de combinación. Por ejemplo, con respecto a los métodos de tratamiento de cáncer en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación, el método puede comprender además un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un segundo fármaco, radioterapia, terapia génica y cirugía. Tales métodos pueden comprender además (1) poner en contacto una célula tumoral con el compuesto antes de poner en contacto la célula tumoral con el segundo fármaco, (2) poner en contacto una célula tumoral con el segundo fármaco antes de poner en contacto la célula tumoral con el compuesto, o (3) poner en contacto una célula tumoral con el compuesto y el segundo fármaco al mismo tiempo. El segundo fármaco puede ser, en ciertas realizaciones, un antibiótico, antiinflamatorio, antineoplásico, antiproliferativo, antiviral, inmunomodulador o inmunosupresor. El segundo fármaco puede ser un agente alquilante, modulador de receptores androgénicos, disruptor citoesquelético, modulador de receptores estrogénicos, inhibidor de histona-desacetilasa, inhibidor de HMG-CoA reductasa, inhibidor de la transferencia de prenil-proteinasa, modulador de receptores retinoides, inhibidor de la topoisomerasa, o inhibidor de tirosina cinasas. En ciertas realizaciones, el segundo fármaco es 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, ácido 9-cis-retinoico, actinomicina D, alitretinoína, ácido all-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, 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, estreptozotocina, ácido hidroxámico-suberoilánilida, sunitinib, tamoxifeno, tenipósido, tiopeta, tioguanina, topotecán, TRAIL, trastuzumab, tretinoína, tricostatina A, ácido valproico, valrubicina, vandetanib, vinblastina, vincristina, vindesina o vinorelbina.

También se contemplan métodos de prevención o tratamiento de una enfermedad con un componente inflamatorio en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación. La enfermedad puede ser, por ejemplo, lupus o artritis reumatoide. La enfermedad puede ser una enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. La enfermedad con un componente inflamatorio puede ser una enfermedad cardiovascular. La enfermedad con un componente inflamatorio puede ser diabetes, tal como diabetes de tipo 1 o de tipo 2. También se puede usar RTA 408 para tratar complicaciones asociadas a la diabetes. Se conocen bien en la técnica tales complicaciones e incluyen, por ejemplo, obesidad, hipertensión, aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, hipertensión, nefropatía, neuropatía, mionecrosis, retinopatía y síndrome metabólico (síndrome X). 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 en los métodos de tratamiento de dichas enfermedades de la piel puede ser, por ejemplo, tópica u oral.

La enfermedad con un componente inflamatorio puede ser síndrome metabólico (síndrome X). Un paciente que tiene este síndrome se caracteriza por que tiene tres o más síntomas seleccionados del siguiente grupo de cinco síntomas: (1) obesidad abdominal; (2) hipertrigliceridemia; (3) colesterol bajo por lipoproteínas de alta densidad (HDL); (4) hipertensión arterial; y (5) glucosa elevada en ayunas, que puede estar en el intervalo característico de la diabetes de tipo 2 si el paciente también es diabético. Cada uno de estos síntomas se define en 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 de NIH N° 01-3670. Los pacientes con síndrome metabólico, tanto si tienen o desarrollan como si no diabetes mellitus abierta, tienen un riesgo elevado de desarrollar las complicaciones macrovasculares y microvasculares que se enumeran anteriormente que se producen con la diabetes de tipo 2, tales como aterosclerosis y enfermedad cardíaca coronaria.

Otro método general de la presente divulgación implica un método de tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación. La enfermedad cardiovascular puede ser, por ejemplo, aterosclerosis, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, enfermedad cardíaca reumática, enfermedad de las válvulas, enfermedad de las arterias coronarias, endocarditis o infarto de miocardio. También se contempla para dichos métodos terapia de combinación. Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender además administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un segundo fármaco. El segundo fármaco puede ser, por ejemplo, un fármaco hipocolesterolemiante, un antihiperlipidémico, un bloqueante de los canales de calcio, un antihipertensor, o un inhibidor de HMG-CoA reductasa. Ejemplos no limitantes de segundos fármacos incluyen amlodipina, aspirina, ezetimiba, felodipina, lacidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina o nitrendipina. Otros ejemplos no limitantes de los segundos fármacos incluyen atenolol, bucindolol, carvedilol, clonidina, doxazosina, indoramina, labetalol, metildopa, metoprolol, nadolol, oxprenolol, fenoxibenzamina, fentolamina, pindolol, prazosina, propranolol, terazosina, timolol o tolazolina. El segundo fármaco puede ser, por ejemplo, una estatina, tal como atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina o simvastatina.

También se contemplan métodos de prevención o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación. 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 enfermedad de Alzheimer. En realizaciones particulares, la enfermedad neurodegenerativa es EM, tal como EM primaria progresiva, secundaria progresiva recidivante-remitente o recidivante progresiva. El sujeto puede ser, por ejemplo, un primate. El sujeto puede ser un humano.

En realizaciones particulares de métodos de prevención o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación, el tratamiento suprime la desmielinización de neuronas en el cerebro o la médula espinal del sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento suprime la desmielinización inflamatoria. En ciertas realizaciones, el tratamiento suprime el corte transversal de axones neuronales en el cerebro o la médula espinal del sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento suprime el corte transversal de neuritas en el cerebro o la médula espinal del sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento suprime la apoptosis neuronal en el cerebro o la médula espinal del sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento estimula la remielinización de axones neuronales en el cerebro o la 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 incapacidad resultante de un ataque de EM.

5 Un aspecto general de la presente divulgación contempla un método de tratamiento o prevención de un trastorno caracterizado por la expresión en exceso de genes iNOS en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación.

Otro aspecto general de la presente divulgación 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 eficaz de un compuesto de la presente divulgación.

10 Otro método general más de la presente divulgación contempla un método de tratamiento o prevención de un trastorno caracterizado por la expresión en exceso de genes COX-2 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto de la presente divulgación.

15 También se contemplan métodos de tratamiento de enfermedad renal/del riñón (RKD) en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación. Véase la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 12/352.473. La RKD puede resultar de, por ejemplo, una agresión tóxica. La agresión tóxica puede resultar de, por ejemplo, un agente de obtención de imágenes o un fármaco. El fármaco puede ser un quimioterapéutico, por ejemplo. La RKD puede resultar de lesión por isquemia/reperfusión, en ciertas realizaciones. En ciertas realizaciones, la RKD resulta de diabetes o hipertensión. La RKD puede resultar de una enfermedad autoinmunitaria. La RKD se puede definir además como RKD crónica, o RKD aguda.

20 En ciertos métodos de tratamiento de enfermedad renal/de riñón (RKD) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación, el sujeto ha recibido o está recibiendo diálisis. En ciertas realizaciones, el sujeto ha recibido o es candidato a recibir un trasplante de riñón. El sujeto puede ser un primate. El primate puede ser un humano. El sujeto en este o cualquier otro método puede ser, por ejemplo, una vaca, caballo, perro, gato, cerdo, ratón, rata o cobaya.

25 También se contempla por la presente divulgación un método de mejora de la velocidad de filtración glomerular o depuración de la creatinina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación.

30 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una dosis única por día. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra en más de una dosis por día. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz.

En algunas realizaciones, el principio activo se administra en una dosis desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 2000 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis es desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis es aproximadamente 3, 10, 30 o 100 mg/kg.

35 En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía tópica. En algunas realizaciones, la administración tópica se administra a la piel. En otras realizaciones, la administración tópica se administra al ojo.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente divulgación. La invención se puede entender mejor como referencia a uno de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

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

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

FIGS. 3a-d - Efecto de RTA 408 sobre la expresión del gen diana Nrf2 en fibroblastos de pulmón HFL1: (a) NQO1; (b) HMOX1; (c) GCLM; (d) TXNRD1.

50 **FIGS. 4a-d** - Efecto de RTA 408 sobre la expresión del gen diana Nrf2 en células epiteliales bronquiales BEAS-2B: (a) NQO1; (b) HMOX1; (c) GCLM; (d) TXNRD1.

FIGS. 5a y b - Efecto de RTA 408 sobre los niveles de proteína diana Nrf2: (a) células SH-SY5Y; (b) células BV2.

FIG. 6 - Efecto de RTA 408 sobre la actividad enzimática de NQO1 en células RAW264.7.

FIG. 7 - Efecto de RTA 408 sobre los niveles totales de glutatión en la línea celular de hepatocitos AML-12.

FIG. 8 - Efecto de RTA 408 sobre la absorbancia de WST-1 como marcador de NADPH.

5 **FIGS. 9a-d** - Efecto de RTA 408 sobre la expresión de genes implicada en la síntesis NADPH: (a) H6PD; (b) PGD; (c) TKT; (d) ME1.

FIG. 10 - Efecto de RTA 408 sobre la activación inducida por TNF α de una construcción indicadora de luciferasa NF- κ B.

FIG. 11 - Efecto de RTA 408 sobre la fosforilación inducida por TNF α de I κ B α .

10 **FIGS. 12a-d** - Efecto de RTA 408 sobre la expresión génica de transaminasas: (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).

FIG. 13 - Efecto de RTA 408 sobre los niveles de piruvato en células cultivadas de músculo (* P < 0,05).

15 **FIG. 14** - Actividad de RTA 408 en un modelo de inflamación pulmonar mediada por LPS (% de cambio en citocinas pro-inflamatorias con respecto a tratamiento con LPS). Se administró RTA 408 QD \times 3 a tiempo 0, 24 y 48 horas seguido por LPS una hora después de la última dosis de RTA 408 en ratones BALB/c hembra. Los animales se sacrificaron 20 horas después de la administración de LPS. Se examinó BALF para la expresión de citocinas pro-inflamatorias. RTA 408 redujo las citocinas pro-inflamatorias: se observaron reducciones dependientes de la dosis, con reducciones del pico que variaban desde 50 %-80 % en TNF, IL-6 e IL-12.

20 **FIGS. 15a y b** - Efecto de RTA 408 sobre la inflamación pulmonar inducida por LPS en ratones: (a) citocinas inflamatorias; (b) dianas de Nrf2. Métodos: Se administró RTA 408 a ratones BALB/c hembra (n = 10) QD \times 6 a tiempo 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas seguido por LPS a las 121 horas sacrificándose los animales a las 141 horas. Se ensayó la expresión de proteínas citocinas pro-inflamatorias en BALF; se ensayaron biomarcadores de Nrf2 en pulmón. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control de solución salina (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001).

25 **FIGS. 16a y b** - RTA 408 reduce los infiltrados de BALF en inflamación pulmonar inducida por bleomicina: (a) cifra de células en líquido de BAL; (b) peso corporal. Se administró RTA 408 QD \times 39 en los Días -10 a 28 a ratones C57BL/6. Se administró bleomicina en el Día 0. Se midieron diariamente los pesos. Se obtuvieron las cifras de células en líquido de BAL en el momento del sacrificio. Se observó una notable reducción en el infiltrado inflamatorio. No se observó mejora significativa en la puntuación de inflamación crónica, fibrosis intersticial o número de focos fibróticos.

30 **FIGS. 17a y b** - Efecto de RTA 408 sobre 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. 18** - Efecto de RTA 408 sobre enzimas diana Nrf2 en pulmones de ratas con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control de solución salina (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001).

40 **FIGS. 19a-e** - Efecto de RTA 408 sobre EPOC inducida por el humo de cigarro en ratones: (a) KC; (b) IL-6; (c) TNF- α ; (d) IFN- γ ; (e) RANTES. Se probó RTA 408 (63415) a niveles de dosis de 3 mg/kg (baja), 10 mg/kg (media) y 30 mg/kg (alta). Se probó un análogo de AIM (63355) en el mismo estudio para comparación. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control de CS.

FIG. 20 - Efecto de RTA 408 sobre enzimas diana Nrf2 en pulmones de ratones con EPOC inducida por el humo de cigarro. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control de solución salina (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001). Las dagas representan una diferencia estadísticamente significativa de ratones expuestos al humo de cigarro y administrados con vehículo ($\dagger P$ < 0,05).

45 **FIGS. 21a-d** - muestran el peso corporal en función del tiempo de ratones BALB/c tratados con 63415 que sirve de modelo de septicemia. Se administró LPS a todos los animales en el Día 0. (a) Peso corporal: 63415, (b) Peso corporal: RTA 405, (c) LPS sistémico: % de supervivencia: 63415, (d) LPS sistémico: % de supervivencia: RTA 405. Se administraron tanto RTA 408 como 63415 QD \times 5 en los Días -2 a 2. 63415 mejoró la supervivencia.

50 **FIG. 22** - Actividad de RTA 408 en un modelo de mucositis oral inducida por la radiación. Se administraron BID \times 20 RTA 405 o RTA 408 (63415) en los Días -5 a -1 y los Días 1 a 15 a hámsteres dorados sirios macho. La radiación ocurrió en el Día 0. Las puntuación de mucositis varían desde 0 hasta 5 basándose en manifestaciones clínicas (0: completamente sanos; 1-2: eritema de ligero a grave; 3-5: grados variables de

ulceración). RTA 408 (63415) mejoró significativamente la mucositis a 30 mg/kg y 100 mg/kg con hasta una reducción del 36 % en la ulceración.

FIG. 23 - La inducción de genes diana Nrf2 fue coherente del estudio de toxicidad en ratones de 14 días con RTA 408 (63415) en ratones C57BL/6. Se evaluó el ARNm de genes diana Nrf2 en hígados de ratones tratados PO QDx14. Se observaron aumentos sustanciales en la expresión de ARNm para múltiples genes diana Nrf2 y estuvieron de acuerdo con la exposición a tejido.

FIGS. 24a y b - Inducción de genes diana Nrf2 en la distribución tisular por RTA 408 (63415): (a) Genes diana; (b) Reguladores negativos. Se evaluó el ARNm de genes diana Nrf2 en hígados de ratas tratados PO QDx14.

FIGS. 25a y b - RTA 408 (63415) induce genes diana Nrf2 en tejidos de mono: (a) Hígado; (b) Pulmón. Se evaluaron ARNm

de genes diana Nrf2 en monos tratados PO QDx14 usando tecnología Panomics QuantiGene® 2.0 Plex.

FIGS. 26a y b - RTA 408 (63415) induce la actividad enzimática diana de Nrf2 en el hígado de ratón: (a) Actividad de NQO1; (b) Actividad de GST. Se evaluó la actividad enzimática diana de Nrf2 en hígados de ratones tratados PO QDx14. Se indujeron actividades enzimáticas de NQO1 y GST de un modo dependiente de la dosis.

FIGS. 27a y b - Inducción de la actividad enzimática diana en el hígado de rata por RTA 408 (63415): (a) NQO1; (b) GST. Se evaluó la actividad enzimática diana de Nrf2 en hígados de ratas tratados PO QDx14. Se indujeron actividades enzimáticas de NQO1 y GST de un modo dependiente de la dosis.

FIGS. 28a y b - RTA 408 (63415) induce la actividad enzimática diana de Nrf2 en diversos tejidos de monos cinomolgos: (a) Actividad de NQO1; (b) Actividad de GSR.

FIGS. 29a y b - Concentración de RTA 408 en hígado de ratón, pulmón y cerebro, y actividad de NQO1 en el hígado de ratón después de 14 días de administración diaria por vía oral. (a) Distribución tisular de RTA 408 en ratones después de 14 días de administración diaria por vía oral. Los datos representan medio \pm DE de concentraciones de RTA 408 en tejido recogido 4 horas después de la dosis final del estudio. Los números encima de las barras de error son representativos de la media. (b) Correlación del contenido de RTA 408 en hígado de ratón con la actividad enzimática de NQO1. Se representó el contenido en hígado de RTA 408 de hígado de ratón individual contra la actividad enzimática individual de este informe.

FIGS. 30a 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 diaria por vía oral. (a) Distribución tisular de RTA 408 en ratas después de 14 días de administración diaria por vía oral. Los datos representan media \pm DE de concentraciones de RTA 408 en tejido recogido 4 horas después de la dosis final del estudio. Los números encima de las barras de error son representativos de la media. * Se excluyeron dos valores del cálculo de la media debido a ser valores atípicos, definidos como valores que causan que el conjunto de datos no pase la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. (b) Correlación del contenido de RTA 408 en hígado de rata con la actividad enzimática de NQO1. Se representó el contenido en hígado de RTA 408 de hígado de rata individual contra la actividad enzimática individual de este informe. Se recogieron los tejidos del grupo de dosis de 100 mg/kg de RTA 408 en el Día 6, y las toxicidades observadas en este grupo descartaron evaluaciones de la actividad enzimática de NQO1 del hígado.

FIGS. 31a y b - El tratamiento con RTA 408 (63415) de monos activó Nrf2 en células CMSP: (a) NQO1 en CMSP frente a la concentración plasmática; (b) NQO1 en pulmón frente a NQO1 en CMSP.

FIG. 32 - Resumen del estudio de toxicidad en mono de 14 días de RTA 408 (63415). Todas las dosis fueron bien toleradas sin signos clínicos adversos. Los datos de química clínica no sugirieron toxicidad obvia.

FIG. 33 - Concentración plasmática de RTA 408 después de las administraciones oculares tópicas y por vía oral en diferentes tiempos después de la dosificación. La concentración plasmática de RTA 408 también se midió después de 5 días de administración ocular tópica diaria de RTA 408 y se determinó que seguía siendo relativamente coherente de las mediciones tomadas después del primer día.

FIGS. 34a y b - Correlación de la exposición a RTA 408 en plasma de mono con la expresión de ARNm de NQO1 y SRXN1 en CMSP: (a) NQO1; (b) SRXN1.

FIG. 35 - Concentración de RTA 408 en diversos tejidos o líquidos diferentes dentro del ojo en función del tiempo después de 5 días de la dosificación ocular tópica. También se midió la concentración en plasma de RTA 408 después de la administración ocular tópica.

FIG. 36 - Efecto de RTA 408 sobre la incidencia de dermatitis de grado 3 causada por exposición a radiación aguda para diferentes concentraciones de RTA administrado por vía tópica.

FIG. 37 - Efecto de RTA 408 sobre la incidencia de dermatitis de grado 2 durante el transcurso de 30 días causada por exposición a radiación aguda para diferentes concentraciones de RTA administrado por vía tópica.

FIG. 38 - Efecto de RTA 408 sobre la incidencia de dermatitis de grado 3 durante el transcurso de 28 días causada por exposición a radiación aguda para diferentes concentraciones de RTA administrado por vía oral.

5 **FIG. 39a y b** - a) Un análisis del área bajo la curva de la puntuación clínica de la dermatitis en función del tiempo para cada uno de los diferentes grupos de control que incluyen todos los animales usados en el ensayo. b) Un análisis del área bajo la curva de la puntuación clínica de la dermatitis en función de la duración de esa puntuación para cada uno de los diferentes grupos de control que incluyen solo animales que completaron los 30 días completos en el ensayo.

10 **FIG. 40** - 1ª Puntuación ciega promedio de la dermatitis por radiación aguda en función del tiempo para no tratados, no tratados sin exposición a radiación, vehículo solo y tres cantidades orales de RTA 408 a 3, 10 y 30 mg/kg. La puntuación de dermatitis se basa en la escala que 0 es completamente sano, 1-2 presenta eritema de leve a moderado con descamación de mínima a ligera, 3-4 presenta eritema de moderado a grave y descamación, y 5 presenta una úlcera franca.

15 **FIG. 41** - Puntuación media de la dermatitis por radiación aguda en función del tiempo para no tratados, no tratados sin exposición a radiación, vehículo solo y tres cantidades orales de RTA 408 a 3, 10 y 30 mg/kg medidas cada dos días desde el Día 4 hasta el Día 30. La puntuación de dermatitis se basa en la escala que 0 es completamente sano, 1-2 presenta eritema de leve a moderado con descamación de mínima a ligera, 3-4 presenta eritema de moderado a grave y descamación, y 5 presenta una úlcera franca.

20 **FIG. 42** - Puntuación media de la dermatitis por radiación aguda en función del tiempo para no tratados, no tratados sin exposición a radiación, vehículo solo y tres cantidades tópicas de RTA 408 al 0,01, 0,1 y 1 % medida cada dos días desde el Día 4 hasta el Día 30. La puntuación de dermatitis se basa en la escala que 0 es completamente sano, 1-2 presenta eritema de leve a moderado con descamación de mínima a ligera, 3-4 presenta eritema de moderado a grave y descamación, y 5 presenta una úlcera franca.

25 **FIG. 43** - Puntuaciones clínicas de dermatitis por radiación fraccionaria representada frente al tiempo y muestra el cambio en la puntuación de dermatitis para cada grupo del ensayo. La escala incluye una puntuación de dermatitis desde 0 hasta 5 donde 0 es completamente sano, 1-2 indica eritema de leve a moderado con descamación de mínima a ligera, 3-4 indica eritema de moderado a grave y descamación, y 5 es una úlcera franca.

30 **FIG. 44** - Gráfico del análisis del ABC que muestra la puntuación de dermatitis (gravedad * días) para cada uno de los grupos de ensayo con respecto al periodo de observación completo. Las puntuaciones de dermatitis se evaluaron cada dos días desde el Día 4 hasta el Día 30 del estudio.

35 **FIG. 45**- Reducción de las concentraciones de proteína del humor acuoso para diferentes formulaciones de RTA 408 (barras oscuras) en comparación con valores bibliográficos para MaxiDex® (0,1 % de dexametasona) y mapracorat (barras claras) después de la inducción de paracentesis.

FIG. 46 - RTA 408 (63415) dependiente de la dosis suprime NO *in vivo*. Se administraron ratones CD-1 (n = 6) con sulfóxido de dimetilo o AIM por sonda nasogástrica oral. Se administró LPS (5 mg/kg) 24 h después. Veinticuatro horas después de la administración de LPS, se recogió sangre completa para el ensayo de NO. Se determinó la inhibición de NO por la reacción de Griess a partir de plasma desproteinado reducido.

40 **FIG. 47** - RTA 408 (63415) se distribuye ampliamente en los tejidos de ratón. Se administraron los ratones con 25 mg/kg PO QDx3 de cualquiera de RTA 408 (63415) o RTA 405. Se recogieron 6 horas después de la última dosis sangre (plasma y sangre completa) y tejidos (cerebro, hígado, pulmón y riñón). Se realizó análisis semi-cuantitativo del contenido de fármaco. Se observaron niveles notables en el SNC.

45 **FIG. 48** - RTA 408 (63415) induce actividad de NQO1 en hígado de ratón, pulmón y riñón. Se administraron los ratones con 25 mg/kg PO QDx3, se recogieron 6 horas después de la última dosis los tejidos y se realizó análisis de actividad de NQO1. Se observó activación significativa de NQO1 en múltiples tejidos.

50 **FIG. 49** - Resumen del estudio de toxicidad de ratón de 14 días con RTA 408 (63415). Se administraron ratones C57BL/6 PO QDx14. Los criterios de valoración incluyeron supervivencia, peso y químicas clínicas. Todos los animales sobrevivieron hasta el Día 14. No ocurrieron cambios de peso significativos en comparación con el grupo de vehículo, y no hubo evidencia de toxicidad a ninguna dosis basándose en las químicas clínicas.

FIG. 50 - Distribución tisular del estudio de toxicidad de ratón de 14 días con RTA 408 (63415) en ratones C57BL/6. Cerebro, pulmón y hígado: Se recogieron 4 horas después de la dosis final, se cuantificaron para contenido de RTA 408 (63415) usando un método sensible de CL/EM/EM. Exposiciones a 10 y 100 mg/kg: en

pulmón superó *in vitro* la Cl_{50} para la inducción de NO 55 y 1138 veces, respectivamente, y en cerebro superó *in vitro* la Cl_{50} para la inducción de NO 29 y 541 veces, respectivamente.

FIG. 51 - Distribución tisular de RTA 408 (63415) en ratas Sprague Dawley. RTA 408 (63415) se distribuyó bien en tejidos diana. Los tejidos se recogieron cuatro horas después de la dosis final en el Día 14 o Día 6 (100 mg/kg), se extrajeron, se cuantificaron para contenido de RTA 408 (63415) usando un método sensible de CL/EM/EM. Las exposiciones a 10 mg/kg en pulmón y cerebro superaron *in vitro* la Cl_{50} para la inducción de NO 294 y 240 veces, respectivamente.

FIG. 52 - Distribución tisular de RTA 408 (63415) diana en monos cinomolgos. Se recogieron tejidos cuatro horas después de la dosis final en el Día 14. Se extrajo el contenido de RTA 408 (63415) y se cuantificó usando un método sensible de CL/EM/EM.

FIG. 53 - Patrones de PXRD (2-30° 2 θ) de la forma A de RTA 408.

FIG. 54 - Termograma de DSC (25-280 °C) de la forma A de RTA 408.

FIG. 55 - Termograma de TGA-EM (25-200 °C) de la forma A de RTA 408.

FIG. 56 - Patrones de PXRD (2-30 °2 θ) de la forma B de RTA 408.

FIG. 57 - Termograma de DSC (25-280 °C) de la forma B de RTA 408.

FIG. 58 - Termograma de TGA-EM (25-200 °C) de la forma B de RTA 408.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

La presente invención proporciona en un aspecto los polimorfos anteriormente mencionados del 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 se denomina en el presente documento RTA 408. También se desvelan en el presente documento métodos para la preparación, composiciones farmacéuticas, y kits y artículos de fabricación de estos compuestos y sus formas polimórficas.

I. Definiciones

Cuando se usa 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); "halógeno" significa independientemente -F, -Cl, -Br o -I; "amino" significa -NH₂; "hidroxiamino" significa -NHOH; "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; "tio" significa =S; y "sulfonilo" significa -S(O)₂-. Cualquier valencia no definida sobre un átomo de una estructura mostrada en la presente solicitud representa implícitamente un átomo de hidrógeno unido al átomo.

El uso de la palabra "un" o "una", cuando se usa conjuntamente con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva, puede significar "uno", pero también está de acuerdo con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

En toda la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa 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 del estudio. Cuando se usa en el contexto de difracción de rayos X de polvo, el término "aproximadamente" se usa para indicar un valor de $\pm 0,2^\circ$ 2 θ del valor informado, preferentemente un valor de $\pm 0,1^\circ$ 2 θ del valor informado. Cuando se usa en el contexto de calorimetría diferencial de barrido o temperaturas de transición vítrea, el término "aproximadamente" se usa para indicar un valor de $\pm 10^\circ$ C con respecto al máximo del pico, preferentemente un valor de $\pm 2^\circ$ C con respecto al máximo del pico. Cuando se usa en otro contexto, el término "aproximadamente" se usa para indicar un valor de $\pm 10\%$ del valor informado, preferentemente un valor de $\pm 5\%$ del valor informado. Se debe entender que, siempre que se use el término "aproximadamente", también se incluye una referencia específica al valor numérico exacto indicado.

Los términos "comprenden", "tiene" e "incluyen" son verbos de enlace de extremos abiertos. Cualquier forma o tiempo de uno o más de estos verbos, tales como "comprende", "que comprende", "tiene", "que tiene", "incluye" y "que incluye", también es de extremos abiertos. Por ejemplo, cualquier método que "comprenda", "tenga" o "incluya" una o más etapas no se limita a los poseen solo una o más etapas y también cubre otras etapas sin enumerar.

El término "eficaz", ya que ese término se usa en la memoria descriptiva y/o reivindicaciones, significa adecuado para realizar un resultado deseado, esperado o previsto. "Cantidad eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz", cuando se usan en el contexto de tratar un paciente o sujeto con un

compuesto, significa que la cantidad del compuesto, cuando se administra a un sujeto o paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad.

5 El término "hidrato", cuando se usa como un adjetivo de un compuesto, significa que el compuesto tiene menos de una (por ejemplo, hemihidrato), una (por ejemplo, monohidrato), o más de una (por ejemplo, dihidrato) molécula de agua asociada a cada molécula de compuesto, tal como en formas sólidas del compuesto.

Como se usa en el presente documento, el término "CI₅₀" se refiere a una dosis inhibitoria que es el 50 % de la máxima respuesta obtenida. Esta medida cuantitativa indica cuánto se necesita de un fármaco particular u otra sustancia (inhibidor) para inhibir un proceso biológico, bioquímico o químico dado (o componente de un proceso, es decir, una enzima, célula, receptor de célula o microorganismo) a la mitad.

10 Un "isómero" de un primer compuesto es un compuesto separado en el que cada molécula contiene los mismos átomos constituyentes que el primer compuesto, pero donde se diferencia la configuración de los átomos en las tres dimensiones.

15 Como se usa en el presente documento, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a un organismo mamífero vivo, tal como un humano, mono, vaca, oveja, cabra, perro, gato, ratón, rata, cobaya, o sus especies transgénicas. En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto es un mamífero no humano. En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto es un primate. En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto es un humano. Ejemplos no limitantes de sujetos humanos son adultos, jóvenes, lactantes y fetos.

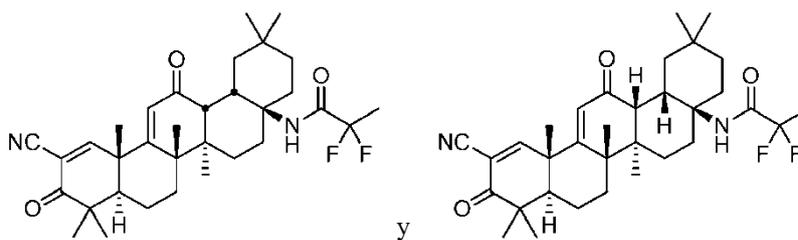
20 Como se usa generalmente en el presente documento, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del criterio médico sensato, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos, órganos y/o líquidos corporales de los seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otros problemas o complicaciones proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable.

25 "Sales farmacéuticamente aceptables" significa las sales de los compuestos de la presente invención que son farmacéuticamente aceptables, como se ha definido anteriormente, y que poseen la actividad farmacológica deseada. Dichas sales incluyen las 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-naftalenosulfónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido 4,4'-metilénbis(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido acético, ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos sulfúricos alifáticos, ácidos sulfúricos aromáticos, ácido benzenosulfónico, 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 oxálico, ácido *p*-clorobencenosulfónico, ácidos alcanicos sustituidos con fenilo, ácido propiónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido terc-butilacético, ácido trimetilacético, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición de base que se puede formar cuando los protones ácidos presentes pueden reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido sódico, carbonato sódico, hidróxido potásico, hidróxido de aluminio e hidróxido de calcio. Las bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, *N*-metilglucamina y similares. Se debe reconocer que el anión o catión particular que forma una parte de cualquier sal de la presente invención no es crítico, mientras que la sal, en conjunto, sea farmacológicamente aceptable. 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).

45 "Prevención" o "prevenir" incluye: (1) inhibir la aparición de una enfermedad en un sujeto o paciente que puede estar en riesgo y/o tener predisposición a la enfermedad, pero que todavía no experimenta o presenta ninguna o toda la patología o sintomatología de la enfermedad, y/o (2) ralentizar la aparición de la patología o sintomatología de una enfermedad en un sujeto o paciente que puede estar en riesgo y/o tener predisposición a la enfermedad, pero que todavía no experimenta o presenta ninguna o toda la patología o sintomatología de la enfermedad.

50 "Tratamiento" o "tratar" incluye (1) inhibir una enfermedad en un sujeto o paciente que experimenta o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, detener el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología), (2) mejorar una enfermedad en un sujeto o paciente que experimenta o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, invertir la patología y/o sintomatología), y/o (3) efectuar cualquier disminución medible en una enfermedad en un sujeto o paciente que experimenta o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad.

En el contexto de la presente divulgación, las fórmulas:



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

- 5 El hecho de que se definan ciertos términos, sin embargo, no se debe considerar indicativo de que cualquier término que no se defina sea indefinido. Más bien, se cree que todos los términos usados describen la invención en términos tales que un experto en la técnica pueda apreciar el alcance y práctica la presente invención.

II. RTA 408 y métodos sintéticos

- Se puede preparar RTA 408 según los métodos descritos en la sección a continuación. Estos métodos se pueden modificar y optimizar adicionalmente usando los principios y técnicas de química orgánica como se aplican por un experto en la materia. Dichos principios y técnicas se enseñan, por ejemplo, en *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure* (2007). Se debe reconocer que el anión o catión particular que forma una parte de cualquier sal de la presente invención no es crítico, mientras que la sal, en conjunto, sea farmacológicamente aceptable. Ejemplos adicionales de sales farmacológicamente aceptables y sus métodos de preparación y uso se presentan en *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use* (2002). Además, los átomos que constituyen RTA 408 de la presente invención pretenden incluir todas las formas isotópicas de dichos átomos. Los isótopos, como se usan en el presente documento, incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. 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 . Similarmente, se contempla que uno o más átomo(s) de carbono de un compuesto de la presente invención se puede(n) sustituir por un átomo(s) de silicio. Además, se contempla que uno o más átomo(s) de oxígeno de RTA 408 se puede(n) sustituir con un átomo(s) de azufre o selenio.

- RTA 408 y su forma polimórfica también pueden tener la ventaja de que pueden ser más eficaces que, ser menos tóxicos que, ser de acción más larga 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 oral biodisponibilidad y/o menor eliminación) que, y/o tener otras ventajas farmacológicas, físicas o químicas útiles con respecto a compuestos conocidos en el estado de la técnica para su uso en las indicaciones establecidas en el presente documento.

III. Formas polimórficas de RTA 408

- Se realizó un estudio de polimorfismos, y se encontró RTA 408 en dos formas cristalinas (forma A y forma B), esencialmente libres de disolvente. Para una descripción de las clases, véase la Tabla 1 a continuación. La forma cristalina A es metaestable y tiene un punto de fusión de 181,98 °C y ΔH fusión = 42,01 J/g. Esta forma puede tener utilidad para obtener formas amorfas de RTA 408 o en formulaciones de extrusión. La forma cristalina A puede ser ligeramente higroscópica (pérdida de masa de ~0,5 % en peso en TGA-EM, FIG. 55). La forma cristalina B tiene mayor estabilidad termodinámica que la forma A como se indica por un punto de fusión más alto (250,10 °C) y mayor entalpía de fusión (ΔH fusión = 47,85 J/g). Se espera mayor estabilidad química y física para la forma B en comparación con la forma A tanto a temperaturas ambiente como elevadas. Puede existir una cantidad mínima de agua superficial en la forma B como se indica por TGA-EM (FIG. 58).

Las nuevas formas se caracterizaron por PXRD (Tabla 8 y tabla 9).

Tabla 1. Resumen de formas sólidas

Forma	Punto de fusión	Entalpía de fusión
A	181,98 °C	42,01 J/g
B	250,10 °C	47,85 J/g

40 IV. Enfermedades asociados con inflamación y/o estrés oxidativo

La inflamación es un proceso biológico que proporciona resistencia a organismos infecciosos o parasíticos y la reparación de tejido dañado. La inflamación se caracteriza comúnmente por vasodilatación localizada, rojez, hinchazón y dolor, el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección o lesión, producción de citocinas inflamatorias,

- tales como TNF- α e IL-1, y producción de especies reactivas del oxígeno o nitrógeno, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido y peroxinitrito. En etapas posteriores de la inflamación, puede ocurrir remodelación tisular, angiogénesis y formación de cicatrices (fibrosis) como parte del proceso de cicatrización. En circunstancias normales, la respuesta inflamatoria se regula, temporalmente, y se resuelve de un modo orquestado una vez se ha tratado adecuado la infección o lesión. Sin embargo, la inflamación aguda puede llegar a ser excesiva y potencialmente mortal si fallan los mecanismos reguladores. Alternativamente, la inflamación se puede convertir en crónica y causar daño acumulado al tejido o complicaciones sistémicas. Basándose al menos en la evidencia presentada en el presente documento, se puede usar RTA 408 en el tratamiento o la prevención de inflamación o enfermedades asociadas con inflamación.
- 5
- 10 Muchas enfermedades humanas graves y resistentes al tratamiento implican la desregulación de procesos inflamatorios, que incluyen enfermedades tales como cáncer, aterosclerosis y diabetes, que no fueron tradicionalmente consideradas afecciones inflamatorias. En el caso del cáncer, los procesos inflamatorios se asocian con formación de tumor, progresión, metástasis, y resistencia a la terapia. Se entiende ahora que la aterosclerosis, considerada desde hace tiempo un trastorno del metabolismo de los lípidos, es principalmente una afección inflamatoria, desempeñando los macrófagos activados una función importante en la formación y eventual rotura de placas ateroscleróticas. También se ha mostrado que la activación de las vías de señalización inflamatoria desempeña una función en el desarrollo de resistencia a la insulina, así como en el daño a tejido periférico asociado con hiperglucemia diabética. La excesiva producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, tales como superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito, es un distintivo de las afecciones inflamatorias. Se ha informado de evidencia en una amplia variedad de enfermedades de producción desregulada de peroxinitrito (Szabo *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2008; Forstermann, 2006; Pall, 2007).
- 15
- 20
- Las enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, lupus, psoriasis y esclerosis múltiple implican la activación inapropiada y crónica de procesos inflamatorios en tejidos afectados, que surgen de la disfunción de mecanismos de auto- frente a no auto-reconocimiento y respuesta en el sistema inmunitario. En enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, el daño neural se correlaciona con la activación de la microglía y niveles elevados de proteínas pro-inflamatorias, tales como óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). El fallo multiorgánico crónico, tal como insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca, insuficiencia hepática y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, se asocia estrechamente a la presencia de estrés oxidativo crónico e inflamación, que conducen al desarrollo de fibrosis y eventual pérdida de la función orgánica. El estrés oxidativo en las células endoteliales vasculares, que revisten los vasos sanguíneos mayores y menores, puede conducir a disfunción endotelial y se cree que es un factor contribuyente importante en el desarrollo de enfermedad cardiovascular sistémica, complicaciones de la diabetes, enfermedad renal crónica y otras formas de fallo orgánico, y varias otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento, que incluyen enfermedades degenerativas del sistema nervioso central y la retina.
- 25
- 30
- Muchos otros trastornos implican estrés oxidativo e inflamación en tejidos afectados, que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedades inflamatorias de la piel; mucositis y dermatitis relacionadas con radioterapia y quimioterapia; enfermedades oculares, tales como uveítis, glaucoma, degeneración macular, y diversas formas de retinopatía; fallo y rechazo de trasplante; lesión por isquemia-reperfusión; dolor crónico; afecciones degenerativas de los huesos y articulaciones, que incluyen osteoartritis y osteoporosis; asma y fibrosis quística; trastornos convulsivos; y afecciones neuropsiquiátricas, que incluyen esquizofrenia, depresión, trastorno bipolar, trastorno de estrés posttraumático, trastornos de déficit de atención, trastornos del espectro autista y trastornos de la alimentación, tales como anorexia nerviosa. Se cree que la desregulación de las vías de señalización inflamatoria es un factor importante en la patología de enfermedades de atrofia muscular, que incluye distrofia muscular y diversas formas de caquexia.
- 35
- 40
- Una variedad de trastornos agudos potencialmente mortales también implican señalización inflamatoria desregulada, que incluyen fallo orgánico agudo que implica al páncreas, riñones, hígado, o pulmones, infarto de miocardio o síndrome coronario agudo, accidente cerebrovascular, choque séptico, traumatismo, quemaduras graves y anafilaxia.
- 45
- Muchas complicaciones de enfermedades infecciosas también implican la desregulación de respuestas inflamatorias. Aunque una respuesta inflamatoria puede destruir los patógenos invasores, una excesiva respuesta inflamatoria también puede ser bastante destructiva y en algunos casos pueden ser una fuente principal de daño en tejidos infectados. Además, una excesiva respuesta inflamatoria también puede conducir a complicaciones sistémicas debido a producción en exceso de citocinas inflamatorias, tales como TNF- α e IL-1. Se cree que esto es un factor en la mortalidad que surge de gripe grave, síndrome respiratorio agudo grave y septicemia.
- 50
- La aberrante o excesiva expresión de ya sea iNOS o ciclooxigenasa-2 (COX-2) participa en la patogénesis de muchos procesos de enfermedad. Por ejemplo, es evidente que NO es un potente mutágeno (Tamir y Tannebaum, 1996), y que el óxido nítrico también puede activar COX-2 (Salvemini *et al.*, 1994). Además, existe un marcado aumento en iNOS en 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 poderosos inhibidores de los procesos inflamatorios celulares, tales como la inducción por IFN- γ y de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de COX-2 en macrófagos de ratón. Véanse Honda *et al.* (2000a), Honda *et al.* (2000b) y Honda *et al.* (2002). En un
- 55
- 60

aspecto, RTA 408 en el presente documento se desvela en parte caracterizado 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. RTA 408 se caracteriza además por la capacidad de inducir la expresión de proteínas antioxidantes, tales 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 matriz de enfermedades y trastornos que implican estrés oxidativo y desregulación de procesos inflamatorios, que incluyen cáncer, complicaciones de la exposición localizada o de cuerpo entero a radiación ionizante, mucositis y dermatitis resultantes de radioterapia o quimioterapia, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares, que incluyen aterosclerosis, lesión por isquemia-reperfusión, fallo orgánico agudo y crónico, que incluye insuficiencia renal e insuficiencia cardíaca, enfermedades respiratorias, diabetes y complicaciones de diabetes, alergias graves, rechazo de trasplante, enfermedad injerto contra huésped, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del ojo y de la retina, dolor agudo y crónico, enfermedades degenerativas de los huesos, que incluyen osteoartritis y osteoporosis, enfermedades inflamatorias del intestino, dermatitis y otras enfermedades de la piel, septicemia, quemaduras, trastornos convulsivos y trastornos neuropsiquiátricos.

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

En otro aspecto, se puede usar RTA 408 para tratar un sujeto que tiene una afección tal como enfermedades o trastornos de la piel. Por ejemplo, dermatitis, que incluye dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis debida a exposición química y dermatitis inducida por radiación; quemaduras térmicas o químicas; heridas crónicas que incluyen úlceras diabéticas, úlceras de presión y úlceras venosas; acné; alopecia que incluye calvicie y alopecia inducida por fármacos; otros trastornos del folículo piloso; epidermólisis bullosa; quemadura solar y sus complicaciones; trastornos de la pigmentación de la piel que incluyen vitiligo; afecciones de la piel relacionadas con el envejecimiento; cicatrización posquirúrgica; prevención o reducción de la cicatrización de lesión de la piel, cirugía o quemaduras; psoriasis; manifestaciones dermatológicas de enfermedades autoinmunitarias o enfermedad injerto contra huésped; prevención o tratamiento de cáncer de piel; trastornos que implican hiperproliferación de las células de la piel tales como hiperqueratosis es un ejemplo no limitante de enfermedades de la piel que se podrían tratar con RTA 408.

Sin desear quedar ligado a teoría, se cree que la activación de la vía antioxidante/antiinflamatoria Keap1/Nrf2/ARE está implicada en tanto las propiedades antiinflamatorias como anticarcinogénicas del compuesto desvelado en el presente documento.

En otro aspecto, se puede usar RTA 408 para tratar un sujeto que tiene una afección causada por niveles elevados de estrés oxidativo en uno o más tejidos. El estrés oxidativo resulta de niveles anormalmente altos o prolongados de especies reactivas de oxígeno, tales como superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito (formadas mediante la reacción de óxido nítrico y superóxido). El estrés oxidativo se pueden acompañar por ya sea inflamación aguda o crónica. El estrés oxidativo se puede causar por disfunción mitocondrial, por activación de células inmunitarias, tales como macrófagos y neutrófilos, por exposición aguda a un agente externo, tal como radiación ionizante o un agente citotóxico de quimioterapia (por ejemplo, doxorubicina), por traumatismo u otra lesión aguda de tejido, 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 dichas afecciones, se ha mostrado que la expresión estimulante de la hemo oxigenasa (HO-1) inducible, un gen diana de la vía Nrf2, tiene un significativo efecto terapéutico que incluye en modelos de infarto de miocardio, insuficiencia renal, fallo y rechazo de trasplante, accidente cerebrovascular, enfermedad cardiovascular y enfermedad autoinmunitaria (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 el hemo en hierro, monóxido de carbono (CO) y biliverdina (que se convierte posteriormente en la potente molécula antioxidante, bilirrubina).

En otro aspecto, se puede usar RTA 408 en prevenir o tratar daño de tejido o fallo orgánico, agudo y crónico, resultante de estrés oxidativo agravado por la inflamación. Ejemplos de enfermedades que se encuentran en esta categoría incluyen insuficiencia cardíaca, insuficiencia hepática, fallo y rechazo de trasplante, insuficiencia renal, pancreatitis, enfermedades pulmonares fibróticas (fibrosis quística, EPOC y fibrosis pulmonar idiopática, entre otras), diabetes (incluyendo complicaciones), aterosclerosis, lesión por isquemia-reperfusión, glaucoma, accidente cerebrovascular, enfermedad autoinmunitaria, autismo, degeneración macular y muscular distrofia. Por ejemplo, en el caso de autismo, los estudios sugieren que el elevado estrés oxidativo en el sistema nervioso central puede contribuir al desarrollo de la enfermedad (Chauhan y Chauhan, 2006).

La evidencia también liga el estrés oxidativo y la inflamación al desarrollo y la patología de muchos otros trastornos del sistema nervioso central, que incluyen trastornos psiquiátricos, tales como psicosis, depresión mayor y trastorno

bipolar; trastornos convulsivos, tales como epilepsia; dolor y síndromes sensoriales, tales como migraña, dolor neuropático o acúfenos; y síndromes conductuales, tales como los trastornos de déficit de atención. Véanse, 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, niveles elevados de citocinas inflamatorias, que incluyen TNF, interferón- γ e IL-6, se asocian con enfermedad mental mayor (Dickerson *et al.*, 2007). También se ha ligado la activación de la microglía a enfermedad mental mayor. Por tanto, la regulación por disminución de citocinas inflamatorias y la inhibición de la excesiva activación de la microglía podrían ser beneficiosas en pacientes con esquizofrenia, depresión mayor, trastorno bipolar, trastornos del espectro autista, y otros trastornos neuropsiquiátricos.

Por consiguiente, en patologías que implican estrés oxidativo solo o estrés oxidativo agravado por inflamación, el tratamiento puede comprender administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, tal como los descritos anteriormente o en toda esta memoria descriptiva. El tratamiento se puede administrar preventivamente, con anticipación de un estado predecible de estrés oxidativo (por ejemplo, trasplante de órganos o la administración de radioterapia a un paciente con cáncer), o se puede administrar terapéuticamente en situaciones que implican estrés oxidativo establecido e inflamación. En algunos casos, tales como un paciente con cáncer que recibe radioterapia o quimioterapia (o ambas), el compuesto de la invención se puede administrar tanto antes como después de la radiación o quimioterapia, o se puede administrar en combinación con las otras terapias. Dependiendo de la naturaleza de la radioterapia o quimioterapia, se pueden usar diversas combinaciones de pre-tratamiento, pos-tratamiento, o administración simultánea del compuesto de la invención. El compuesto de la invención puede prevenir o reducir la gravedad de los efectos secundarios asociados con la radioterapia o quimioterapia. Debido a que dichos efectos secundarios pueden ser limitantes de la dosis, su reducción o prevención puede permitir dosificación más alta o más frecuente de la radioterapia o quimioterapia, dando como resultado mayor eficacia. Alternativamente, como se muestra en el presente documento, el uso del compuesto de la invención en combinación con la radioterapia o quimioterapia puede potenciar la eficacia de una dosis dada de radiación o quimioterapia. En parte, 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. NF- κ B se activa frecuentemente crónicamente en células cancerosas, y dicha activación se asocia con resistencia a la terapia y promoción de la progresión tumoral (por ejemplo, Karin M, *Nature*. 2006 May 25;441(7092):431-6; Aghajani *et al.*, *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Mar;27 Suppl 2:10-4). También se pueden inhibir por el compuesto de la invención otros factores de transcripción que promueven la inflamación y cáncer, tales como STAT3 (por ejemplo, He G y Karin M, *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):159-68; Grivennikov SI y Karin M, *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Feb;21(1):11-9).

Se puede usar RTA 408 para tratar o prevenir afecciones inflamatorias, tales como septicemia, dermatitis, enfermedad autoinmunitaria y osteoartritis. RTA 408 también se puede usar para tratar o prevenir dolor inflamatorio y/o dolor neuropático, por ejemplo, induciendo Nrf2 y/o inhibiendo NF- κ B.

RTA 408 también se puede usar para tratar o prevenir enfermedades, tales como cáncer, inflamación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, autismo, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, lupus, enfermedad de Crohn y psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, todas las otras enfermedades cuya patogénesis se cree que implica excesiva producción de ya sea óxido nítrico o prostaglandinas, y patologías que implican estrés oxidativo solo o estrés oxidativo agravado por inflamación.

Otro aspecto de la inflamación es la producción de prostaglandinas inflamatorias, tales como la prostaglandina E. Se puede usar RTA 408 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 se encuentran altos niveles de COX-2 en tejidos inflamados. Por consiguiente, la inhibición de COX-2 puede aliviar muchos síntomas de la inflamación y varios fármacos antiinflamatorios importantes (por ejemplo, ibuprofeno y celecoxib) actúan inhibiendo la actividad de COX-2. Se ha demostrado que una clase de prostaglandinas de ciclopentenona (cyPGs) (por ejemplo, 15-desoxi-prostaglandin J2, también conocida como PGJ2) desempeña una función en estimular la resolución orquestada de la inflamación (por ejemplo, Rajakariar *et al.*, 2007). La COX-2 también se asocia con la producción de prostaglandinas de ciclopentenona. Por consiguiente, la inhibición de COX-2 puede interferir con la completa resolución de la inflamación, promoviendo posiblemente la persistencia de células inmunitarias activadas en tejidos y que conducen a inflamación crónica "latente". Este efecto puede ser responsable de la elevada incidencia de enfermedad cardiovascular en pacientes usando inhibidores selectivos de COX-2 durante largos periodos de tiempo.

En un aspecto, se puede usar RTA 408 para controlar la producción de citocinas pro-inflamatorias dentro de la célula activando selectivamente restos reguladores de cisteína (RCRs) en proteínas que regulan la actividad de factores de transcripción sensible a oxidorreducción. Se ha mostrado que la activación de RCRs por cyPGs inicia un programa de pro-resolución en el que se induce potentemente la actividad del factor de transcripción antioxidante y citoprotector Nrf2 y se suprimen las actividades de los factores de transcripción pro-oxidantes y pro-inflamatorios NF- κ B y STAT. En algunas realizaciones, se puede usar RTA 408 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, se puede usar RTA 408 para

causar que las células que hospedan el evento inflamatorio reviertan a un estado no inflamatorio que promueve la resolución de la inflamación y que limita el excesivo daño de tejido al hospedador.

A. Cáncer

5 Además, se puede usar RTA 408 para inducir la apoptosis en células tumorales, para inducir la diferenciación celular, para inhibir la proliferación celular de cáncer, para inhibir una respuesta inflamatoria y/o para funcionar en una capacidad quimiopreventiva. Por ejemplo, RTA 408 tiene una o más de las siguientes propiedades: (1) una capacidad para inducir apoptosis y diferenciar tanto células malignas como no malignas, (2) una actividad a niveles sub-micromolares o nanomolares como inhibidor de la proliferación de muchas células malignas o pre-malignas, (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).

15 Los niveles de iNOS y COX-2 se elevan en ciertos cánceres y participan en la carcinogénesis y se ha mostrado que los inhibidores de COX-2 reducen la incidencia de adenomas colónicos primarios en seres humanos (Rostom *et al.*, 2007; Brown y DuBois, 2005; Crowel *et al.*, 2003). iNOS se expresa en células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) (Angulo *et al.*, 2000) y se ha mostrado que la actividad de COX-2 en células cancerosas da como resultado la producción de prostaglandina E2 (PGE2), que se ha mostrado que induce la expresión de arginasa en MDSCs (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. Se ha mostrado que la reducción de arginina del microentorno tumoral por MDSCs, combinado con la producción de NO y peroxinitrito, inhibe la proliferación e induce la apoptosis de linfocitos T (Bronte *et al.*, 2003). Se ha mostrado que la inhibición de COX-2 e iNOS reduce la acumulación de MDSCs, restaura la actividad citotóxica de linfocitos T asociados con tumor y retrasa el crecimiento tumoral (Sinha *et al.*, 2007; Mazzone *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007).

20 La inhibición de las vías de señalización NF-κB y JAK/STAT participa como una estrategia para inhibir la proliferación de células epiteliales de cáncer e inducir su apoptosis. Se ha mostrado que la activación de STAT3 y NF-κB da como resultado la supresión de la apoptosis en células cancerosas, y la promoción de proliferación, invasión y metástasis. Se ha mostrado que muchos de los genes diana implicados en estos procesos se regulan transcripcionalmente por tanto NF-κB como STAT3 (Yu *et al.*, 2007).

25 Además de sus funciones directas en células epiteliales de cáncer, NF-κB y STAT3 también tienen funciones importantes en otras células encontradas dentro del microentorno tumoral. Experimentos en modelos animales han demostrado que NF-κB se requiere en tanto células cancerosas como en células hematopoyéticas para propagar los efectos de la inflamación en el inicio y la progresión del cáncer (Greten *et al.*, 2004). La inhibición de NF-κB en cáncer y células mieloides reduce el número y tamaño, respectivamente, de los tumores resultantes. La activación de STAT3 en células cancerosas da como resultado la producción de varias citocinas (IL-6, IL-10) que suprimen la maduración de células dendríticas (DC) asociadas con tumor. Además, STAT3 se activa por estas citocinas 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 (Kortilewski *et al.*, 2005).

B. Tratamiento de esclerosis múltiple y otras afecciones neurodegenerativas

30 Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes para esclerosis múltiple (EM). Se conoce que la EM es una afección inflamatoria del sistema nervioso central (Williams *et al.*, 1994; Merrill y Benvenist, 1996; Genain y Nauser, 1997). Basándose en varias investigaciones, existe evidencia que sugiere que los mecanismos inflamatorios, oxidativos y/o inmunitarios participan en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y EM (Bagasra *et al.*, 1995; McGeer y McGeer, 1995; Simonian y Coyle, 1996; Kaltschmidt *et al.*, 1997). Tanto los astrocitos reactivos como la microglía activada participan en la etiología de la enfermedad neurodegenerativa (END) y enfermedad neuroinflamatoria (ENI); ha existido una énfasis particular en la microglía como células que sintetizan tanto NO como prostaglandinas como productos de las enzimas respectivas, iNOS y COX-2. La formación *de novo* de estas enzimas se pueden accionar por citocinas inflamatorias tales como interferón-γ o interleucina-1. A su vez, la excesiva producción de NO puede conducir a cascadas inflamatorias y/o daño oxidativo en células y tejidos de muchos órganos, que incluyen neuronas y oligodendrocitos del sistema nervioso, con manifestaciones consecuentes en EA y EM, y posibles EP y ELA (Coyle y Puttfarcken, 1993; Beal, 1996; Merrill y Benvenist, 1996; Simonian y Coyle, 1996; Vodovotz *et al.*, 1996). Los datos epidemiológicos indican que el uso crónico de AINE que bloquean la síntesis de prostaglandinas de araquidonato, notablemente reducen el riesgo de desarrollo de EA (McGeer *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 1997). Así, se puede usar agentes que bloquean la formación de NO y prostaglandinas, en enfoques para la prevención y tratamiento de END. Candidatos terapéuticos satisfactorios para tratar dicha enfermedad normalmente requieren una capacidad para penetrar en la barrera hematoencefálica. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. 2009/0060873.

C. Neuroinflamación

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con neuroinflamación. La neuroinflamación resume la idea de que las respuestas y acciones de la microglía y astrocíticas en el sistema nervioso central tienen un carácter

fundamentalmente de tipo inflamación, y que estas respuestas son primordiales para la patogénesis y progresión de una amplia variedad de trastornos neurológicos. Esta idea se originó en el campo de la enfermedad de Alzheimer (Griffin *et al.*, 1989; Rogers *et al.*, 1988), donde ha revolucionado el entendimiento de los presentes inventores de esta enfermedad (Akiyama *et al.*, 2000). Estas ideas han sido extendidas a otras enfermedades neurodegenerativas (Eikelenboom *et al.*, 2002; Ishizawa y Dickson, 2001), a enfermedades isquémicas/tóxicas (Gehrmann *et al.*, 1995; Touzani *et al.*, 1999), a la biología tumoral (Graeber *et al.*, 2002) e incluso al desarrollo normal del cerebro.

La neuroinflamación incorpora un amplio espectro de respuestas celulares complejas que incluyen activación de la microglía y los astrocitos e inducción de citocinas, quimiocinas, proteínas del complemento, proteínas de fase aguda, lesión oxidativa y procesos moleculares relacionados. Estos eventos pueden tener efectos perjudiciales sobre la función neuronal, que conducen a lesión neuronal, activación adicional de la glía y por último lugar neurodegeneración.

D. Tratamiento de insuficiencia renal

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con insuficiencia renal. Véase la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 12/352.473. Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a nuevos métodos y compuestos para el tratamiento y la prevención de enfermedad renal. La insuficiencia renal, que da como resultado eliminación inadecuada de productos residuales metabólicos de la sangre y concentraciones anormales de electrolitos 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 (ERC), pero también está asociada con otras afecciones tales como lupus. La insuficiencia renal aguda puede surgir de la exposición a ciertos fármacos (por ejemplo, acetaminofeno) o productos químicos tóxicos, o de lesión por isquemia-reperusión asociada con choque o procedimientos quirúrgicos tales como trasplante, y puede dar como resultado insuficiencia renal crónica. En muchos pacientes, la insuficiencia renal avanza a una fase en la que el paciente requiere diálisis regular o trasplante de riñón para seguir viviendo. Ambos de estos procedimientos son altamente invasivos y asociados con significativos efectos secundarios y aspectos de la calidad de vida. Aunque son tratamientos eficaces para algunas complicaciones de insuficiencia renal, tales como hiperparatiroidismo e hiperfosfatemia, ningún tratamiento disponible ha mostrado que detenga o revierta la progresión subyacente de la insuficiencia renal. Así, agentes que pueden mejorar la función renal comprometida representarían un avance significativo en el tratamiento de la insuficiencia renal.

La inflamación contribuye significativamente a la patología de la ERC. También hay un fuerte enlace mecanístico entre el estrés oxidativo y la disfunción renal. La vía de señalización NF-κB desempeña una función importante en la progresión de ERC ya que NF-κB regula la transcripción de MCP-1, una quimiocina que es responsable del reclutamiento de monocitos/macrófagos dando como resultado una respuesta inflamatoria que daña por último lugar el riñón (Wardle, 2001). La vía Keap1/Nrf2/ARE controla la transcripción de varios genes que codifican enzimas antioxidantes, que incluyen hemo oxigenasa-1 (HO-1). La ablación del gen Nrf2 en ratones hembra da como resultado el desarrollo de glomerular nefritis de tipo lupus (Yoh *et al.*, 2001). Además, varios estudios han demostrado que la expresión de HO-1 se induce en respuesta a daño e inflamación renal y que esta enzima y sus productos -bilirrubina y monóxido de carbono- desempeñan una función protectora en el riñón (Nath *et al.*, 2006).

El glomérulo y la capsula de Bowman circundante constituyen la unidad funcional básica del riñón. La velocidad de filtración glomerular (GFR) es la medida estándar de la función renal. Se usa comúnmente la depuración de la creatinina para medir la GFR. Sin embargo, se usa comúnmente el nivel de creatinina en suero como una medida indirecta de la depuración de la creatinina. Por ejemplo, se aceptan generalmente excesivos niveles de creatinina en suero para indicar función renal inadecuada y se aceptan reducciones en la creatinina en suero con el tiempo como una indicación de función renal mejorada. Los niveles normales de creatinina en la sangre son aproximadamente 0,6 a 1,2 miligramos (mg) por decilitro (dl) en varones adultos y 0,5 a 1,1 miligramos por decilitro en mujeres adultas.

Puede ocurrir lesión renal aguda (LRA) tras isquemia-reperusión, tratamiento con ciertos agentes farmacológicos tales como cisplatino y rapamicina, e inyección intravenosa de medios de radiocontraste usados en la obtención médica de imágenes. Al igual que en ERC, la inflamación y el estrés oxidativo contribuyen a la patología de LRA. No se entienden bien los mecanismos moleculares subyacentes a la nefropatía inducida por radiocontraste (NRC); sin embargo, es probable que una combinación de acontecimientos que incluyen vasoconstricción prolongada, alteración de la autorregulación renal y toxicidad directa de los medios de contraste contribuyan todos a la insuficiencia renal (Tumlin *et al.*, 2006). La vasoconstricción da como resultado reducida circulación sanguínea renal y causa isquemia-reperusión y la producción de especies reactivas de oxígeno. HO-1 se induce fuertemente en estas condiciones y se ha demostrado que previene la lesión por isquemia-reperusión en varios órganos diferentes, que incluyen al riñón (Nath *et al.*, 2006). Específicamente, se ha mostrado que la inducción de HO-1 es protectora en un modelo de rata de NRC (Goodman *et al.*, 2007). La reperusión también induce una respuesta inflamatoria, en parte mediante la activación de la señalización NF-κB (Nichols, 2004). Se ha propuesto elegir como diana NF-κB como una estrategia terapéutica para prevenir el daño al órgano (Zingarelli *et al.*, 2003).

E. Enfermedad cardiovascular

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con enfermedad cardiovascular. Véase la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 12/352.473. La enfermedad cardiovascular (CV) está entre las causas más importantes de mortalidad en todo el mundo, y es la principal causa de muerte en muchas naciones desarrolladas. La etiología de la enfermedad CV es compleja, pero la mayoría de las causas se relacionan con suministro inadecuado o completamente interrumpido de sangre a un órgano o tejido crítico. Frecuentemente, una afección tal surge de la rotura de una o más placas ateroscleróticas, que conduce a la formación de un trombo que bloquea la circulación sanguínea en un vaso crítico. Tal trombosis es la principal causa de los infartos de miocardio, en los que se bloquea una o más de las arterias coronarias y se interrumpe la propia circulación sanguínea al corazón. La isquemia resultante es altamente dañina para el tejido cardíaco, tanto por carecer de oxígeno durante el evento isquémico como por la excesiva formación de radicales libres después de que se restaure la circulación sanguínea (un fenómeno conocido como lesión por isquemia-reperusión). Ocurre daño similar en el cerebro durante un accidente cerebrovascular trombótico, cuando una arteria cerebral u otros vaso importante se bloquea por trombosis. Los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos, a diferencia, implican la rotura de un vaso sanguíneo y hemorragia en el tejido cerebral circundante. Esto crea estrés oxidativo en el área inmediata de la hemorragia, debido a la presencia de grandes cantidades de hemo libre y otras especies reactivas, e isquemia en otras partes del cerebro debido a la circulación sanguínea comprometida. La hemorragia subaracnoidea, que es acompañada frecuentemente por vasoespasma cerebral, también causa lesión por isquemia/reperusión en el cerebro.

Alternativamente, la aterosclerosis pueden ser tan extensa en vasos sanguíneos críticos que se desarrolla estenosis (estrechamiento de las arterias) y la circulación sanguínea a órganos críticos (incluyendo el corazón) es crónicamente insuficiente. Dicha isquemia crónica puede conducir a lesión orgánica específica de muchos tipos, que incluye la hipertrofia cardíaca asociada con insuficiencia cardíaca congestiva.

La aterosclerosis, el defecto subyacente que conduce a muchas formas de enfermedad cardiovascular, se produce cuando un defecto o lesión físico al revestimiento (endotelio) de una arteria desencadena una respuesta inflamatoria que implica la proliferación de células vasculares de músculo liso y la infiltración de leucocitos en el área afectada. Por último lugar, se puede formar una lesión complicada conocida como una placa aterosclerótica, compuesta de las células anteriormente mencionadas combinadas con depósitos de lipoproteínas portadoras de colesterol y otros materiales (por ejemplo, Hansson *et al.*, 2006).

Los tratamientos farmacéuticos para la enfermedad cardiovascular incluyen tratamientos preventivos, tales como el uso de fármacos previstos para reducir la tensión arterial o niveles circulantes de colesterol y lipoproteínas, así como tratamientos diseñados para reducir las tendencias adherentes de plaquetas y otros glóbulos sanguíneos (reduciendo así la velocidad de progresión de placas y el riesgo de formación de trombos). Más recientemente, se han introducido fármacos tales como estreptocinasa y activador tisular del plasminógeno y se usan para disolver el trombo y restaurar la circulación sanguínea. Los tratamientos quirúrgicos incluyen el injerto de derivación de las arterias coronarias para crear un riego sanguíneo alternativo, angioplastia con globo para comprimir el tejido de placa y aumentar el diámetro de la luz de la arteria, y endarterectomía de carótida para eliminar tejido de placa en la arteria carótida. Dichos tratamientos, especialmente la angioplastia con globo, se puede acompañar usando prótesis endovasculares, tubos de malla expansibles diseñados para soportar las paredes arteriales del área afectada y mantener abierto el vaso. Recientemente, se ha vuelto común el uso de prótesis endovasculares eluyentes de fármaco con el fin de prevenir la reestenosis posquirúrgica (estrechamiento de la arteria) en el área afectada. Estos dispositivos son prótesis endovasculares de alambre recubierto con una matriz biocompatible de polímero que contiene un fármaco que inhibe la proliferación celular (por ejemplo, paclitaxel o rapamicina). El polímero permite una liberación localizada lenta del fármaco en el área afectada con exposición mínima de tejidos inespecíficos. A pesar de los significativos beneficios ofrecidos por tales tratamientos, sigue siendo alta la mortalidad de la enfermedad cardiovascular y sigue habiendo significativas necesidades sin cumplir en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

Como se observa anteriormente, se ha mostrado que la inducción de HO-1 es beneficiosa en una variedad de modelos de enfermedad cardiovascular, y se han correlacionado clínicamente bajos niveles de expresión de HO-1 con elevado riesgo de enfermedad CV. Los compuestos de la invención, por tanto, se puede usar en el tratamiento o la prevención de una variedad de trastornos cardiovasculares que incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, hipertensión, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica, accidente cerebrovascular, hemorragia subaracnoidea y reestenosis.

F. Diabetes

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con diabetes. Véase la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 12/352.473. La diabetes es una enfermedad compleja caracterizada por el fallo del cuerpo para regular los niveles circulantes de glucosa. Este fallo puede resultar de ausencia de insulina, una hormona peptídica que regula tanto la producción como la absorción de glucosa en diversos tejidos. La deficiencia de insulina compromete la capacidad del músculo, grasa, y otros tejidos para absorber adecuadamente la glucosa, que conduce a hiperglucemia (niveles anormalmente altos de glucosa en sangre). Más comúnmente, dicha deficiencia de insulina resulta de la inadecuada producción en las células de los islotes del páncreas. En la mayoría de los casos, esto surge de la destrucción

autoinmunitaria de estas células, una afección conocida como diabetes de tipo 1 o de aparición juvenil, pero también puede ser debida a traumatismo físico o alguna otra causa.

5 La diabetes también puede surgir cuando las células musculares y de grasa se vuelven menos sensibles a la insulina y no absorben adecuadamente la glucosa, dando como resultado hiperglucemia. Este fenómeno se conoce como resistencia a la insulina, y la afección resultante se conoce como diabetes de tipo 2. La diabetes de tipo 2, el tipo más común, se asocia altamente con obesidad e hipertensión. La obesidad se asocia con un estado inflamatorio de tejido adiposo que se cree que desempeña una función importante en el desarrollo de resistencia a la insulina (por ejemplo, Hotamisligil, 2006; Guilherme *et al.*, 2008).

10 La diabetes se asocia con daño a muchos tejidos, debido en gran medida a que la hiperglucemia (e hipoglucemia, que puede resultar de dosis excesiva o poco cronometradas de insulina) es una fuente significativa de estrés oxidativo. La insuficiencia renal crónica, retinopatía, neuropatía periférica, vasculitis periférica y el desarrollo de úlceras dérmicas que curan lentamente o en absoluto están entre las complicaciones comunes de la diabetes. Debido a su capacidad para proteger contra el estrés oxidativo, particularmente por la inducción de expresión de HO-1, los compuestos de la invención se pueden usar en tratamientos para muchas complicaciones de la diabetes. Como se observa anteriormente (Cai *et al.*, 2005), se sospecha que la inflamación crónica y el estrés oxidativo en el hígado son factores contribuyente primarios en el desarrollo de la diabetes de tipo 2. Además, agonistas de PPAPy tales como tiazolidindionas pueden reducir la resistencia a la insulina y se conoce que son tratamientos eficaces para la diabetes de tipo 2.

20 Se puede evaluar el efecto del tratamiento de la diabetes del siguiente modo. Se evalúan, si es posible, tanto la eficacia biológica de la modalidad de tratamiento, así como la eficacia clínica. Por ejemplo, debido a que la enfermedad se manifiesta por sí misma por elevada azúcar en sangre, por tanto, se puede evaluar la eficacia biológica del tratamiento, por ejemplo, por observación del retorno de la glucosa en sangre evaluada a la normalidad. La medición de hemoglobina glucosilada, también denominada A1c o HbA1c, es otro parámetro comúnmente usado del control de la glucosa en sangre. La medición de un criterio de valoración clínico que puede dar una indicación de la regeneración de células b después de, por ejemplo, un periodo de tiempo de seis meses, puede dar una indicación de la eficacia clínica de la pauta de tratamiento.

G. Artritis reumatoide

30 Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con AR. Normalmente, los primeros signos de la artritis reumatoide (AR) aparecen en la capa de revestimiento sinovial, con proliferación de fibroblastos sinoviales y su unión a la superficie articular en el borde de la articulación (Lipsky, 1998). Posteriormente, se reclutan en la articulación macrófagos, linfocitos T y otras células inflamatorias, donde producen varios mediadores, que incluye las citocinas interleucina-1 (IL-1), que contribuye a las secuelas crónicas que conducen a la destrucción de hueso y cartílago, y factor de necrosis tumoral (TNF- α), que desempeña una función en la inflamación (Dinarello, 1998; Arend y Dayer, 1995; van den Berg, 2001). La concentración de IL-1 en plasma es significativamente más alta en pacientes con AR que en individuos sanos y, en particular, los niveles de IL-1 en plasma se correlacionan con la actividad de la enfermedad de AR (Eastgate *et al.*, 1988). Además, los niveles en fluido sinovial de IL-1 se correlacionan con diversas características radiográficas e histológicas de AR (Kahle *et al.*, 1992; Rooney *et al.*, 1990).

40 En las articulaciones normales, los efectos de estas y otras citocinas proinflamatorias se equilibran por una variedad de citocinas antiinflamatorias y factores reguladores (Burger y Dayer, 1995). La significancia de este equilibrio de citocinas se ilustra en pacientes con AR juvenil, que tienen aumentos clínicos en la fiebre a lo largo del día (Priour *et al.*, 1987). Después de cada pico de fiebre, se encuentra en suero y orina un factor que bloquea los efectos de IL-1. Se ha aislado este factor, clonado e identificado como el antagonista de receptor de IL-1 (IL-1ra), un miembro de la familia de genes de IL-1 (Hannum *et al.*, 1990). IL-1ra, como su nombre indica, es un antagonista natural de receptor que compite con IL-1 para unirse a receptores de tipo I IL-1 y, como resultado, bloquea los efectos de IL-1 (Arend *et al.*, 1998). Se puede necesitar un exceso de 10 a 100 de IL-1ra para bloquear IL-1 eficazmente; sin embargo, no parece que las células sinoviales aisladas de pacientes con AR produzcan IL-1ra suficiente para contrarrestar los efectos de IL-1 (Firestein *et al.*, 1994; Fujikawa *et al.*, 1995).

H. Artritis psoriásica

50 Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con artritis psoriásica. La psoriasis es un trastorno de la piel inflamatorio y proliferativo con una prevalencia del 1,5-3 %. Aproximadamente el 20 % de pacientes con psoriasis desarrollan una forma característica de artritis que tiene varios patrones (Gladman, 1992; Jones *et al.*, 1994; Gladman *et al.*, 1995). Algunos individuos presentan síntomas de las articulaciones primero, pero la mayoría presentan primero psoriasis de la piel. Aproximadamente un tercio de los pacientes tienen exacerbaciones simultáneas de su enfermedad de la piel y articulaciones (Gladman *et al.*, 1987) y existe una relación topográfica entre las enfermedades de las uñas y las articulaciones interfalángicas distales (Jones *et al.*, 1994; Wright, 1956). Aunque siguen siendo imprecisos los procesos inflamatorios que conectan la enfermedad de la piel, uñas y articulaciones, participa una patología inmunomediada.

La artritis psoriásica (APs) es una artropatía inflamatoria crónica caracterizada por la asociación de artritis y psoriasis y se reconoció como una entidad clínica distinta de la artritis reumatoide (AR) en 1964 (Blumberg *et al.*, 1964). Estudios posteriores han revelado que la APs comparte varias características genéticas, patogénicas y clínicas con otras espondiloartropatías (EPA), un grupo de enfermedades que comprenden espondilitis anquilosante, artritis reactiva y artritis enteropática (Wright, 1979). La noción de que la APs pertenece al grupo de las EPA ha ganado recientemente apoyo adicional de los estudios de formación de imágenes que demuestran entesitis dispersada en la, incluyendo EPA pero no AR (McGonagle *et al.*, 1999; McGonagle *et al.*, 1998). Más específicamente, se ha postulado que la entesitis es uno de los eventos más tempranos que ocurren en las EPA, que conducen a remodelación ósea y anquilosis en la columna vertebral, así como a sinovitis articular cuando las entesitis inflamadas se aproximan a las articulaciones periféricas. Sin embargo, sigue sin estar clara en gran parte la conexión entre la entesitis y las manifestaciones clínicas en EPA, ya que la EPA puede presentar patrones bastante heterogéneos de implicación articular con grados variables de gravedad (Marsal *et al.*, 1999; Salvarani *et al.*, (1998). Así, se deben plantear otros factores a tener en cuenta para las múltiples características de la EPA, solo algunas de las cuales se han identificado (tales como la expresión de la molécula HLA-B27, que se asocia en gran medida con la enfermedad axial). Como consecuencia, sigue siendo difícil mapear las manifestaciones de la enfermedad a los mecanismos patogénicos específicos, que significa que el tratamiento de esta afección sigue siendo en gran medida empírico.

Los estudios familiares han sugerido una contribución genética al desarrollo de la EPA (Moll y Wright, 1973). Se cree que otras formas inflamatorias crónicas de artritis, tales como espondilitis anquilosante y artritis reumatoide, tienen una base genética compleja. Sin embargo, ha sido difícil de evaluar por varios motivos el componente genético de la EPA. Existe una fuerte evidencia de una predisposición genética para la psoriasis sola que puede enmascarar los factores genéticos que son importantes para el desarrollo de la EPA. Aunque la mayoría aceptaría la EPA como una entidad de enfermedad distinta, a veces existe un solapamiento fenotípico con la artritis reumatoide y la espondilitis anquilosante. Por tanto, la EPA por sí misma no es una afección homogénea y se han propuesto varios subgrupos.

Se ha informado de cantidades elevadas de TNF- α en tanto piel psoriásica (Ettehad *et al.*, 1994) como fluido sinovial (Partsch *et al.*, 1997). Los ensayos recientes han mostrado un beneficio positivo del tratamiento con anti-TNF en tanto EPA (Mease *et al.*, 2000) como espondilitis anquilosante (Brandt *et al.*, 2000).

I. Artritis reactiva

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con artritis reactiva. En la artritis reactiva (ARe), el mecanismo del daño articular no es claro, pero es probable que las citocinas desempeñen funciones críticas. Se ha informado de altos niveles de perfil de Th1 más predominantes de interferón gamma (IFN- γ) y bajos niveles de interleucina 4 (IL-4) (Lahesmaa *et al.*, 1992; Schlaak *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1993; Schlaak *et al.*, 1996; Kotake *et al.*, 1999; Ribbens *et al.*, 2000), pero varios estudios han mostrado un predominio relativo de IL-4 e IL-10 y ausencia relativa de IFN- γ y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en la membrana sinovial (Simon *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1999) y fluido (SF) (Yin *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 1997) de pacientes con artritis reactiva en comparación con pacientes con artritis reumatoide (AR). También se ha informado de un nivel más bajo de secreción de TNF- α en pacientes con artritis reactiva que con AR después de la estimulación *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (Braun *et al.*, 1999).

Se ha argumentado que la eliminación de bacterias asociadas con artritis reactiva requiere la producción de niveles apropiados de IFN- γ y TNF- α , mientras que IL-10 actúa suprimiendo estas respuestas (Autenrieth *et al.*, 1994; Sieper y Braun, 1995). IL-10 es una citocina reguladora que inhibe la síntesis de IL-12 y IFN- γ por macrófagos activados (de Waal *et al.*, 1991; Hart *et al.*, 1995; Chomarat *et al.*, 1995) y de IFN- γ por linfocitos T (Macatonia *et al.*, 1993).

J. Artritis enteropática

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con artritis enteropática. Normalmente, la artritis enteropática (AE) ocurre en combinación con enfermedades inflamatorias del intestino (EII) tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. También puede afectar la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas. La artritis enteropática implica las articulaciones periféricas, normalmente en las extremidades inferiores tales como las rodillas o los tobillos. Implica comúnmente solo algunas o un número limitado de articulaciones y puede seguir estrechamente a afección intestinal. Esto ocurre en aproximadamente el 11 % de pacientes con colitis ulcerosa y el 21 % de estos con enfermedad de Crohn. La sinovitis es generalmente auto-limitada y no deformante.

Las artropatías enteropáticas comprenden una colección de afecciones reumatológicas que comparten una conexión a la patología GI. Estas afecciones incluyen artritis reactiva (es decir, relacionada con infección) debido a bacterias (por ejemplo, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, especies de *Yersinia*, *Clostridium difficile*), parásitos (por ejemplo, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia saginata*, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, especies *Cryptosporidium*), y espondiloartropatías asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Otras afecciones y trastornos incluyen derivación intestinal (yeyuno-ileal), artritis, celiacía, enfermedad de Whipple y colitis colagenosa.

K. Artritis reumatoide juvenil

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con ARJ. La artritis reumatoide juvenil (ARJ), un término para la forma más predominante de artritis en niños, se aplica a una familia de enfermedades caracterizadas por la inflamación crónica e hipertrofia de las membranas sinoviales. El término solapa, pero no es completamente sinónimo, con la familia de enfermedades denominadas artritis crónica juvenil y/o artritis idiopática juvenil en Europa.

Tanto los sistemas inmunitarios innatos como adaptativos usan múltiples tipos de células, una amplia matriz de proteínas de la superficie celular y secretadas, y redes interconectadas de retroalimentación positiva y negativa (Lo *et al.*, 1999). Además, aunque es separable en el pensamiento, las alas innatas y adaptativas del sistema inmunitario se cruzan funcionalmente (Fearon y Locksley, 1996), y es probable que los eventos patológicos que ocurren en estos puntos de intersección sean altamente relevantes para el entendimiento de los presentes inventores de la patogénesis de las formas adultas e infantiles de la artritis crónica (Warrington, *et al.*, 2001).

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

L. Artritis inflamatoria temprana

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con artritis inflamatoria temprana. La presentación clínica de diferentes artropatías inflamatorias es similar pronto en el curso de la enfermedad. Como resultado, es frecuentemente difícil distinguir pacientes que están en riesgo de desarrollar la sinovitis grave y persistente que conduce al daño erosivo de la articulación de aquellos cuya artritis es más auto-limitada. Dicha distinción es crítica con el fin de dirigir la terapia apropiadamente, tratando agresivamente aquellos con enfermedad erosiva y evitando la toxicidad innecesaria en pacientes con enfermedad más auto-limitada. Los actuales criterios clínicos para diagnosticar las artropatías erosivas tales como la artritis reumatoide (AR) son menos eficaces en la enfermedad temprana y los marcadores tradicionales de la actividad de la enfermedad tales como las cifras de articulaciones y la respuesta de fase aguda no identifican adecuadamente pacientes que probablemente tengan malos desenlaces (Harrison *et al.*, 1998). Es más probable que los parámetros que reflejan los eventos patológicos que ocurren en la membrana sinovial sean de valor pronóstico significativo.

Esfuerzos recientes para identificar factores pronósticos de mal desenlace en la artritis inflamatoria temprana han identificado la presencia de autoanticuerpos específicos de AR, en particular anticuerpos hacia péptidos citrulinados, que se asocian con enfermedad erosiva y persistente en cohortes de artritis inflamatoria temprana. Basándose en esto, se ha desarrollado un péptido citrulinado cíclico (CCP) para ayudar en la identificación de anticuerpos anti-CCP en sueros de pacientes. Usando este enfoque, se ha mostrado que la presencia de anticuerpos anti-CCP es específica y sensible para la AR, puede distinguir AR de otras artropatías, y puede predecir posiblemente la sinovitis erosiva persistente antes de que estos desenlaces se manifiesten clínicamente. Y, lo que es más importante, los anticuerpos anti-CCP son frecuentemente detectables en sueros muchos años antes de los síntomas clínicos, sugiriendo que pueden ser el reflejo de los eventos inmunitarios subclínicos (Nielen *et al.*, 2004; Rantapaa-Dahlqvist *et al.*, 2003).

M. Espondilitis anquilosante

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con espondilitis anquilosante. La EA es un subconjunto de enfermedad dentro de una clasificación de enfermedad más amplia de espondiloartropatía. Los pacientes afectados con los diversos subconjuntos de espondiloartropatía tienen etiologías de enfermedad que son frecuentemente muy diferentes, variando de infecciones bacterianas a herencia. Todavía, en todos los subgrupos, el resultado final del proceso de enfermedad es la artritis axial. A pesar de las diferencias clínicamente tempranas observadas en las diversas poblaciones de pacientes, muchos de ellos terminan casi idénticos después de una evolución de la enfermedad de diez a veinte años. Estudios recientes sugieren que el tiempo medio hasta el diagnóstico clínico de la espondilitis anquilosante desde el inicio de la enfermedad de la enfermedad es de 7,5 años (Khan, 1998). Estos mismos estudios sugieren que las espondiloartropatías puede tener prevalencia próxima a la de la artritis reumatoide (Feldtkeller *et al.*, 2003; Doran *et al.*, 2003).

La EA es un trastorno reumático inflamatorio sistémico crónico del esqueleto axial con o sin manifestaciones extraesqueléticas. Se afectan principalmente las articulaciones sacroilíacas y la columna vertebral, pero también se pueden implicar las articulaciones de la cadera y hombros, y menos comúnmente las articulaciones periféricas o ciertas estructuras extrarticulares tales el ojo, vasculatura, sistema nervioso y sistema gastrointestinal. Su etiología todavía no es completamente entendida (Wordsworth, 1995; Calin y Taurog, 1998). Se asocia en gran medida con el alelo HLA-B27 de la clase I de histocompatibilidad mayor (MHC I) (Calin y Taurog, 1998). La EA afecta a individuos en la plenitud de su vida y es temida debido a su potencial para causar dolor crónico y daño irreversible de tendones,

ligamentos, articulaciones y huesos (Brewerton *et al.*, 1973a; Brewerton *et al.*, 1973b; Schlosstein *et al.*, 1973). La EA puede ocurrir sola o en asociación con otra forma de espondiloartropatía tal como artritis reactiva, psoriasis, artritis psoriásica, entesitis, colitis ulcerosa, enfermedad del intestino irritable o enfermedad de Crohn, en cuyo caso se clasifica como EA secundaria.

5 Normalmente, los sitios afectados incluyen las articulaciones discovertebrales, apofisarias, costovertebrales y costotransversales de la columna vertebral, y las estructuras ligamentosas paravertebrales. También es notoria en esta enfermedad la inflamación de las entesis, que son sitios de la unión musculotendinosa y ligamentosa a los huesos (Calin y Taurog, 1998). Se conoce que el sitio de entesitis se infiltra por las células plasmáticas, linfocitos y células polimorfonucleares. El proceso inflamatorio da como resultado frecuentemente anquilosis fibrosa y ósea
10 gradual (Ball, 1971; Khan, 1990).

El diagnóstico tardío es común debido a que los síntomas se atribuyen frecuentemente a problemas de espalda más comunes. Una pérdida notable de flexibilidad en la columna vertebral lumbar es un signo temprano de EA. Otros síntomas comunes incluyen dolor crónico y rigidez en la región lumbar que normalmente comienza donde la parte
15 baja de la columna vertebral se une a la pelvis o cadera. Aunque la mayoría de los síntomas comienzan en las áreas lumbares y sacroilíacas, también pueden implicar el cuello y la parte superior de la espalda. La artritis también puede ocurrir en los hombros, caderas y pies. Algunos pacientes tienen inflamación de ojos, y se deben observar casos más graves para la implicación de la válvula cardíaca.

La presentación más frecuente es dolor de espalda, pero la enfermedad puede comenzar anormalmente en las articulaciones periféricas, especialmente en niños y mujeres, y rara vez con iritis aguda (uveítis anterior). Los
20 síntomas y signos tempranos adicionales son expansión de pecho disminuida de la implicación costovertebral difusa, febrícula, fatiga, anorexia, pérdida de peso y anemia. El dolor de espalda recurrente -frecuentemente nocturno y de intensidad variable- es una dolencia eventual, ya que la rigidez matutina se alivia normalmente por la actividad. Una postura flexionada o inclinada facilita el dolor de espalda y el espasmo muscular paraespinal; así, algún grado de cifosis es común en pacientes no tratados.

25 Las manifestaciones sistémicas ocurren en 1/3 de los pacientes. La iritis aguda, normalmente auto-limitada, recurrente (uveítis anterior) se prolonga raramente y es suficientemente grave para deteriorar la visión. Los signos neurológicos pueden resultar ocasionalmente de radiculitis por compresión o ciática, fractura vertebral o subluxación, y síndrome de cola de caballo (que consiste en impotencia, incontinencia urinaria nocturna, sensación disminuida de la vejiga y rectal, y ausencia de reflejos aquileos). Las manifestaciones cardiovasculares pueden incluir insuficiencia
30 aórtica, angina, pericarditis, y anomalías de conducción ECG. Una observación pulmonar rara es la fibrosis del lóbulo superior, ocasionalmente con cavitación que puede confundir con TB y se puede complicar por infección con *Aspergillus*.

La EA se caracteriza por sarpullidos leves o moderados de la espondilitis activa que se alterna con periodos de inflamación casi o totalmente inactiva. El tratamiento apropiado en la mayoría de pacientes da como resultado una
35 discapacidad mínima o ninguna discapacidad y en su totalidad vidas productivas a pesar de la rigidez de espalda. Ocasionalmente, la evolución es grave y progresiva, dando como resultado deformidades incapacitantes pronunciadas. El pronóstico es sombrío para pacientes con iritis refractaria y para los pacientes raros con amiloidosis secundaria.

N. Colitis ulcerosa

40 Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con colitis ulcerosa. La colitis ulcerosa es una enfermedad que provoca 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 el colon completo. La colitis ulcerosa afecta raramente el intestino delgado, excepto la sección terminal, llamada el íleon terminal. La colitis ulcerosa también se
45 puede denominar colitis o proctitis. La inflamación hace que el colon se vacíe frecuentemente, causando diarrea. Las úlceras se forman en lugares donde la inflamación ha exterminado las células que revisten el colon; las úlceras sangran y producen pus.

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria del intestino (EII), el nombre general para las enfermedades que causan inflamación en el intestino delgado y colon. La colitis ulcerosa puede ser difícil de diagnosticar debido a que sus síntomas son similares a otros trastornos intestinales y a otro tipo de EII, la enfermedad de Crohn. La
50 enfermedad de Crohn se diferencia de la colitis ulcerosa debido a que causa inflamación más profunda dentro de la pared intestinal. Por tanto, la enfermedad de Crohn ocurre normalmente en el intestino delgado, aunque también puede ocurrir en la boca, esófago, estómago, duodeno, intestino grueso, apéndice y ano.

La colitis ulcerosa puede ocurrir en personas de cualquier edad, pero casi siempre comienza entre las edades de 15 y 30, o menos frecuentemente entre las edades de 50 y 70. Los niños y adolescentes desarrollan algunas veces la
55 enfermedad. La colitis ulcerosa afecta a hombres y mujeres igualmente y parece que se presenta en algunas familias. Abundan las teorías sobre qué causa la colitis ulcerosa, pero ninguna ha sido probada. La teoría más popular es que el sistema inmunitario del cuerpo reacciona a un virus o una bacteria causando la inflamación en curso en la pared intestinal. Las personas con colitis ulcerosa tienen anomalías del sistema inmunitario, pero los

médicos no saben si estas anomalías son una causa o un resultado de la enfermedad. La colitis ulcerosa no se causa por estrés emocional o sensibilidad a ciertos alimentos o productos alimenticios, pero estos factores pueden desencadenar síntoma en algunas personas.

5 Los síntomas más comunes de la colitis ulcerosa son dolor abdominal y diarrea con sangre. Los pacientes también pueden experimentar fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, hemorragia rectal y pérdida de líquidos corporales y nutrientes. Aproximadamente la mitad de los pacientes tienen síntomas leves. Otros sufren fiebre frecuente, diarrea con sangre, náuseas y cólicos graves. La colitis ulcerosa también puede causar problemas tales como artritis, inflamación del ojo, enfermedad del hígado (hepatitis, cirrosis y colangitis esclerosante primaria), osteoporosis, erupciones cutáneas y anemia. Nadie sabe con seguridad por qué los problemas ocurren fuera del
10 colón. Los científicos piensan que estas complicaciones pueden ocurrir cuando el sistema inmunitario desencadena inflamación en otra parte del cuerpo. Algunos de estos problemas desaparecen cuando se trata la colitis.

Se pueden requerir un examen físico completo y una serie de pruebas para diagnosticar la colitis ulcerosa. Las Se pueden hacer análisis de sangre para verificar la anemia, que podría indicar hemorragia en el colon o recto. Los análisis de sangre también pueden descubrir un alto número de glóbulos blancos, que es un signo de inflamación en
15 algún lugar en el cuerpo. Al analizar una muestra de heces, el médico puede detectar la hemorragia o la infección en el colon o recto. El médico puede hacer una colonoscopia o sigmoidoscopia. Para cualquier prueba, el médico inserta un endoscopio - un tubo iluminado, flexible, largo conectado a un ordenador y monitor de TV - en el ano para observar el interior del colon y el recto. El médico podrá observar cualquier inflamación, hemorragia o úlceras en la pared del colon. Durante el examen, el médico puede hacer una biopsia, que implica tomar una muestra de tejido del
20 revestimiento del colon para revisión con un microscopio. También se puede requerir un enema de bario con rayos X del colon. Este procedimiento implica llenar el colon con bario, una disolución blanca blanquecina. El bario se muestra en blanco en la película de rayos X, permitiendo al doctor una vista clara del colon, incluyendo cualquier úlcera u otras anomalías que podrían estar ahí.

El tratamiento para la colitis ulcerosa depende de la gravedad de la enfermedad. La mayoría de las personas se
25 tratan con medicamentos. En casos graves, un paciente puede necesitar cirugía para extirpar el colon enfermo. La cirugía es la única cura para la colitis ulcerosa. Algunas personas cuyos síntomas son desencadenados por ciertos alimentos pueden controlar los síntomas evitando los alimentos que causan malestar a sus intestinos, como alimentos altamente sazonados, frutas y verduras crudas, o azúcar de la leche (lactosa). Cada persona puede experimentar colitis ulcerosa de manera diferente, de modo que el tratamiento se ajusta para cada individuo. Es
30 importante el apoyo emocional y psicológico. Algunas personas tienen remisiones -períodos cuando los síntomas desaparecen- que duran meses o incluso años. Sin embargo, la mayoría de los síntomas del paciente reaparecen con el tiempo. Este patrón cambiante de la enfermedad significa que no siempre se puede decir cuándo ha ayudado un tratamiento. Algunas personas con colitis ulcerosa pueden necesitar asistencia médica durante algún tiempo, con visitas regulares al médico para monitorizar la afección.

35 **O. Enfermedad de Crohn**

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con enfermedad de Crohn. Otro trastorno para el que se ha probado la inmunosupresión es la enfermedad de Crohn. Los síntomas de la enfermedad de Crohn incluyen inflamación intestinal y el desarrollo de estenosis intestinal y fistulas; la neuropatía va frecuentemente acompañada de estos
40 síntomas. Se recetan normalmente fármacos antiinflamatorios, tales como 5-aminosalicilatos (por ejemplo, mesalamina) o corticosteroides, pero no siempre son eficaces (revisado en Botoman *et al.*, 1998). La inmunosupresión con ciclosporina es algunas veces beneficiosa para pacientes resistentes o intolerantes a los corticosteroides (Brynskov *et al.*, 1989).

Los esfuerzos para desarrollar herramientas de diagnóstico y tratamiento contra la enfermedad de Crohn se han centrado en la función central de las citocinas (Schreiber, 1998; van Hogezaand y Verspaget, 1998). Las citocinas son
45 proteínas secretadas pequeñas o factores (5 a 20 kD) que tienen efectos específicos sobre las interacciones célula a célula, comunicación intercelular, o el comportamiento de otras células. Las citocinas se producen por linfocitos, especialmente linfocitos TH1 y TH2, monocitos, macrófagos intestinales, granulocitos, células epiteliales y fibroblastos (revisado en Rogler y Andus, 1998; Galley y Webster, 1996). Algunas citocinas son pro-inflamatorias (por ejemplo, TNF- α , IL-1(α y β), IL-6, IL-8, IL-12, o el factor inhibidor de leucemia [LIF]); otras son antiinflamatorias
50 (por ejemplo, antagonista del receptor de IL-1, IL-4, IL-10, IL-11, y TGF- β). Sin embargo, puede haber un solapamiento y redundancia funcional en sus efectos en ciertas afecciones inflamatorias.

En casos activos de la enfermedad de Crohn, se secretan concentraciones elevadas de TNF- α e IL-6 en la circulación sanguínea, y TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 se producen en exceso localmente por las células de la mucosa (id.; Funakoshi *et al.*, 1998). Estas citocinas pueden tener efectos de largo alcance sobre los sistemas fisiológicos que
55 incluyen desarrollo de huesos, hematopoyesis, y función del hígado, tiroides y neuropsiquiátrica. Por tanto, se ha observado un desequilibrio de la relación de IL-1 β /IL-1ra, en favor de IL-1 β pro-inflamatoria, en pacientes con enfermedad de Crohn (Rogler y Andus, 1998; Saiki *et al.*, 1998; Dionne *et al.*, 1998; pero véase Kuboyama, 1998). Un estudio sugirió que los perfiles de citocinas en muestras de heces podrían ser una herramienta de diagnóstico útil para la enfermedad de Crohn (Saiki *et al.*, 1998).

Los tratamientos que se han propuesto para la enfermedad de Crohn incluyen el uso de diversos antagonistas de citocinas (por ejemplo, IL-1ra), inhibidores (por ejemplo, de la enzima convertidora de IL-1 β y antioxidantes) y anticuerpos anti- citocinas (Rogler y Andus, 1998; van Hogezaand y Verspaget, 1998; Reimund *et al.*, 1998; Lugerling *et al.*, 1998; McAlindon *et al.*, 1998). En particular, se han probado anticuerpos monoclonales contra TNF- α con algún 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 usar en terapia de combinación con compuestos de la presente divulgación.

Otro enfoque para el tratamiento de la enfermedad de Crohn se ha centrado en erradicar al menos parcialmente la comunidad bacteriana que puede desencadenar la respuesta inflamatoria y reemplazarla con una comunidad no patógena. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.599.795 desvela un método para la prevención y el tratamiento de enfermedad de Crohn en pacientes humanos. Su método se dirigió a esterilizar el tubo digestivo con al menos un antibiótico y al menos un agente antifúngico para exterminar la flora existente y reemplazarla con diferentes bacterias bien caracterizadas seleccionadas tomadas de seres humanos normales. Borody enseñó un método de tratamiento de la enfermedad de Crohn por la eliminación al menos parcial de la microflora intestinal existente por lavado y sustitución con una nueva comunidad bacteriana introducida por inóculo fecal de un donante humano con enfermedad clasificada o por una composición que comprende Bacteroides y especies de *Escherichia coli* (patente de EE.UU. N° 5.443.826).

P. Lupus eritematoso sistémico

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con SLE. También ha habido causa no conocida para enfermedades autoinmunitarias tal como el lupus eritematoso sistémico. El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad reumática autoinmunitaria caracterizada por la deposición en los tejidos de autoanticuerpos y complejos autoinmunitarios que conducen a la lesión del tejido (Kotzin, 1996). A diferencia de enfermedades autoinmunitarias tales como EM y diabetes mellitus tipo 1, el LES implica posiblemente múltiples sistemas orgánicos directamente, y sus manifestaciones clínicas son diversas y variables (revisado por Kotzin y O'Dell, 1995). Por ejemplo, algunos pacientes pueden mostrar principalmente erupción cutánea y dolor articular, mostrar remisiones espontáneas, y requerir poco medicamento. En el otro extremo del espectro están los pacientes que muestran participación renal grave y progresiva que requiere terapia con altas dosis de esteroides y fármacos citotóxicos tales como ciclofosfamida (Kotzin, 1996).

El distintivo serológico del LES, y la prueba de diagnóstico primaria disponible, son niveles elevados en suero de los anticuerpos IgG a constituyentes del núcleo celular, tales como ADN bicatenario (ADNbc), ADN monocatenario (ARNmc) y cromatina. Entre estos autoanticuerpos, los anticuerpos anti-ADNbc IgG desempeñan una función importante en el desarrollo de glomerulonefritis lúpica (GN) (Hahn y Tsao, 1993; Ohnishi *et al.*, 1994). La glomerulonefritis es una afección grave en la que las paredes de los capilares de la sangre del riñón que purifica los glomérulos se engruesan por acumulaciones en el lado epitelial de las membranas basales glomerulares. La enfermedad es frecuentemente crónica y progresiva y puede conducir a insuficiencia renal eventual.

Q. Síndrome del intestino irritable

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con síndrome del intestino irritable (SII). El SII es un trastorno funcional caracterizado por dolor abdominal y hábitos intestinales alterados. Este síndrome puede comenzar en la juventud y se puede asociar con discapacidad significativa. Este síndrome no es un trastorno homogéneo. Más bien, se han descrito subtipos de SII basándose en el síntoma predominante - diarrea, estreñimiento o dolor. En ausencia de síntomas de "alarma", tales como fiebre, pérdida de peso y hemorragia gastrointestinal, se necesita un estudio de diagnóstico limitado. Una vez se hace un diagnóstico de SII, un procedimiento de tratamiento integrado puede reducir eficazmente la gravedad de los síntomas. El SII es un trastorno común, aunque han variado sus tasas de prevalencia. En general, el SII afecta a aproximadamente el 15 % de los adultos de los Estados Unidos y ocurre aproximadamente tres veces más frecuentemente en mujeres que en hombres (Jailwala *et al.*, 2000).

El SII representa entre 2,4 millones y 3,5 millones de visitas a los médicos cada año. No solo es la afección más común observada por los gastroenterólogos, sino que también es una de las afecciones gastrointestinales más comunes observada por médicos de atención primaria (Everhart *et al.*, 1991; Sandler, 1990).

El SII también es un trastorno costoso. Comparado con personas que no tienen síntomas intestinales, las personas con SII pierden tres veces más días de trabajo y es más probable que informen que están demasiado enfermos para trabajar (Drossman *et al.*, 1993; Drossman *et al.*, 1997). Por otra parte, aquellos con SII incurren en cientos de dólares más en tarifas médicas que las personas sin trastornos intestinales (Talley *et al.*, 1995).

Ninguna anomalía específica explica las exacerbaciones y remisiones del dolor abdominal y los hábitos intestinales alterados experimentados por los pacientes con SII. La teoría en desarrollo del SII sugiere desregulación en múltiples niveles del eje cerebro-intestino. Se han implicado todos de la dismotilidad, hipersensibilidad visceral, modulación anormal del sistema nervioso central (SNC) e infección. Además, los factores psicosociales desempeñan una función modificadora importante. La motilidad intestinal anormal se ha considerado desde hace mucho tiempo un factor en la patogénesis del SII. Se ha mostrado que el tiempo de tránsito a través del intestino delgado después

de una comida es más corto en pacientes con SII con diarrea predominante que en pacientes que tienen el subtipo con estreñimiento predominante o dolor predominante (Cann *et al.*, 1983).

5 En estudios del intestino delgado durante el ayuno, se ha informado en pacientes con SII de la presencia de tanto contracciones acumuladas discretas como contracciones propagadas prolongadas (Kellow y Phillips, 1987). También experimentan dolor con contracciones irregulares más frecuentemente que las personas sanas (Kellow y Phillips, 1987; Horwitz y Fisher, 2001)

10 Estos descubrimientos de motilidad no representan el complejo de síntomas completo en pacientes con SII; en realidad, la mayoría de estos pacientes no tienen anomalías demostrables (Rothstein, 2000). Los pacientes con SII tienen elevada sensibilidad al dolor visceral. Los estudios que implican la distensión con globo del colon rectosigmoideo han mostrado que los pacientes con SII experimentan dolor e hinchazón a presiones y volúmenes mucho más bajos que los sujetos de control (Whitehead *et al.*, 1990). Estos pacientes mantienen la percepción normal de los estímulos somáticos.

15 Se han propuesto múltiples teorías para explicar este fenómeno. Por ejemplo, los receptores en las vísceras pueden tener elevada sensibilidad en respuesta a la distensión o contenidos intraluminales. Las neuronas en el asta dorsal de la médula espinal pueden tener elevada excitabilidad. Además, se puede implicar la alteración en el procesamiento por el SNC de sensaciones (Drossman *et al.*, 1997). Los estudios de formación de imágenes de resonancia magnética funcional han mostrado recientemente que, en comparación con sujetos de control, los pacientes con SII tienen elevada activación de la corteza cingulada anterior, un importante centro de dolor, en respuesta a un estímulo rectal doloroso (Mertz *et al.*, 2000).

20 Cada vez más, la evidencia sugiere una relación entre la enteritis infecciosa y el posterior desarrollo de SII. Las citocinas inflamatorias pueden desempeñar una función. En una encuesta de paciente con antecedentes de gastroenteritis bacteriana confirmada (Neal *et al.*, 1997), el 25 % informaron alteración persistente de los hábitos intestinales. La persistencia de los síntomas puede ser debida a estrés fisiológico en el momento de la infección aguda (Gwee *et al.*, 1999).

25 Datos recientes sugieren que el crecimiento en exceso bacteriano en el intestino delgado puede tener una función en los síntomas de SII. En un estudio (Pimentel *et al.*, 2000), el 157 (78 %) de 202 pacientes con SII referidos para prueba del aliento con hidrógeno tuvieron resultado de la prueba que fueron positivos para el crecimiento en exceso bacteriano. De los 47 sujetos que se sometieron a la prueba de seguimiento, 25 (53 %) informaron una mejora en los síntomas (es decir, dolor abdominal y diarrea) con tratamiento con antibiótico.

30 El SII puede presentar una variedad de síntomas. Sin embargo, el dolor abdominal y los hábitos intestinales alterados siguen siendo las características primarias. La molestia abdominal se describe frecuentemente como de naturaleza de tipo cólico y se sitúa en el cuadrante inferior izquierdo, aunque la gravedad y la localización pueden diferir en gran medida. Los pacientes pueden informar diarrea, estreñimiento o episodios alternos de diarrea y estreñimiento. Los síntomas diarreicos se describen normalmente como heces sueltas de volumen pequeño y algunas veces acompañadas por descarga mucosa. Los pacientes también pueden informar hinchazón, necesidad imperiosa de defecar, evacuación incompleta y distensión abdominal. También pueden estar presentes síntomas gastrointestinales superiores, tales como reflujo gastroesofágico, dispepsia o náuseas (Lynn y Friedman, 1993).

35 La persistencia de los síntomas no es una indicación para pruebas adicionales; es una característica del SII y es por sí mismo un síntoma esperado del síndrome. La evaluación de diagnóstico más extensa se indica en pacientes cuyos síntomas están empeorando o cambiando. Las indicaciones para pruebas adicionales también incluyen la presencia de síntomas de alarma, aparición de síntomas después de la edad de 50, y antecedentes familiares de cáncer de colon. Las pruebas pueden incluir colonoscopia, tomografía computarizada del abdomen y la pelvis, y estudios con bario del intestino delgado o grueso.

R. Síndrome de Sjögren

45 Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con síndrome de Sjögren. El síndrome de Sjögren (SS) primario es una enfermedad autoinmunitaria sistémica, lentamente progresiva, crónica, que afecta predominantemente a mujeres de edad media (relación de mujeres a hombres 9:1), aunque se puede observar en todas las edades incluyendo la niñez (Jonsson *et al.*, 2002). Se caracteriza por infiltración linfocítica y destrucción de las glándulas exocrinas, que se infiltran por células mononucleares incluyendo linfocitos CD4+, CD8+ y linfocitos B (Jonsson *et al.*, 2002). Además, se observan manifestaciones extraglandulares (sistémicas) en un tercio de los pacientes (Jonsson *et al.*, 2001).

55 La infiltración linfocítica glandular es una característica progresiva (Jonsson *et al.*, 1993) que, cuando es amplia, puede reemplazar grandes porciones de los órganos. De manera interesante, los infiltrados glandulares en algunos pacientes se asemejan estrechamente a las microestructuras linfoides ectópicas en las glándulas salivales (indicados como centros germinales ectópicos) (Salomonsson *et al.*, 2002; Xanthou *et al.*, 2001). En el SS, los GCs ectópicos se definen como agregados de linfocitos T y B de células proliferantes con una red de células dendríticas foliculares y células endoteliales activadas. Estas estructuras similares a GC formadas dentro del tejido diana

también representan propiedades funcionales con producción de autoanticuerpos (anti-Ro/SSA y anti-La/SSB) (Salomonsson y Jonsson, 2003).

En otras enfermedades autoinmunitarias sistémicas, tales como AR, se han identificado los factores críticos para los GCs ectópicos. Se mostró que los tejidos sinoviales reumatoides con GCs producían quimiocinas CXCL13, CCL21 y linfotóxina (LT)- β (detectadas en el centro folicular y los linfocitos B de la zona del manto). El análisis de regresión multivariante de estos análisis identificaron CXCL13 y LT- β como las citocinas solitarias que predicen los GCs en la sinovitis reumatoide (Weyand y Goronzy, 2003). Recientemente, se ha mostrado que CXCL13 y CXCR5 en las glándulas salivales desempeñan una función esencial en el proceso inflamatorio reclutando linfocitos B y T, que contribuyen, por lo tanto, a la neogénesis linfoide y la formación de GC ectópicos en el SS (Salomonsson *et al.*, 2002).

S. Psoriasis

Se puede usar RTA 408 para tratar pacientes con psoriasis. La psoriasis es una enfermedad de la piel crónica de desescamación e inflamación que afecta del 2 al 2,6 por ciento de la población en los Estados Unidos, o entre 5,8 y 7,5 millones de personas. Aunque la enfermedad ocurre en todos los grupos de edad, afecta principalmente a los adultos. Aparece aproximadamente igual en mujeres y hombres. La psoriasis ocurre cuando las células de la piel se elevan rápidamente desde su origen por debajo de la superficie de la piel y se apilan sobre la superficie antes de que tengan la oportunidad de madurar. Normalmente, este movimiento (también llamado renovación) dura aproximadamente un mes, pero en la psoriasis puede ocurrir en solo algunos días. En su forma típica, la psoriasis da como resultado parches de piel roja (inflamada) gruesa cubierta con escamas plateadas. Estos parches, que algunas veces se denominan placas, normalmente pican o duelen. Casi siempre ocurren en los codos, rodillas, otras partes de las piernas, cuero cabelludo, región lumbar, cara, palmas de las manos y plantas de los pies, pero pueden ocurrir en la piel en cualquier lugar en el 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. Aunque es usual que se agriete la piel alrededor de las articulaciones afectadas, aproximadamente 1 millón de personas con psoriasis experimentan inflamación articular que produce síntomas de artritis. Esta afección se denomina artritis psoriásica.

La psoriasis es un trastorno de la piel conducido por el sistema inmunitario, que implica especialmente un tipo de glóbulo blanco llamado un linfocito T. Normalmente, los linfocitos T ayudan a proteger el cuerpo contra la infección y enfermedad. En el caso de la psoriasis, los linfocitos T entran en acción por error y se vuelven tan activos que desencadenan otras respuestas inmunitarias, que conducen a inflamación y a la rápida renovación de las células de la piel. En aproximadamente un tercio de los casos, existen antecedentes familiares de psoriasis. Los investigadores han estudiado un gran número de familias afectadas por la psoriasis y han identificado genes asociados con la enfermedad. Las personas con psoriasis pueden notar que hay veces que su piel empeora, después mejora. Las condiciones que pueden provocar sarpullidos incluyen infecciones, estrés y cambios en el clima que secan la piel. Por tanto, ciertas medicinas, incluyendo litio y beta bloqueantes, que se recetan para hipertensión arterial, pueden desencadenar un brote o empeorar la enfermedad.

T. Enfermedades infecciosas

RTA 408 puede ser útil en el tratamiento de enfermedades infecciosas, que incluyen infecciones virales y bacterianas. Como se observa anteriormente, tales infecciones se pueden asociar con respuestas inflamatorias graves localizadas o sistémicas. Por ejemplo, la gripe puede causar inflamación grave del pulmón y la infección bacteriana puede causar respuesta hiperinflamatoria sistémica, que incluye la excesiva producción de citocinas inflamatorias múltiples, que es la característica de la septicemia. Además, los compuestos de la invención pueden ser útiles en inhibir directamente la replicación de patógenos virales. Estudios previos han demostrado que compuestos relacionados tales como CDDO pueden inhibir la replicación del VIH en macrófagos (Vázquez *et al.*, 2005). Otros estudios han indicado que la inhibición de la señalización NF-kappa B puede inhibir la replicación del virus de la gripe, 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 la prevención de cada una de las enfermedades/trastornos/afecciones referidas anteriormente en la sección IV usando el compuesto RTA 408 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una forma polimórfica de ese compuesto (tal como, por ejemplo, cualquiera de las formas polimórficas descritas en el presente documento anteriormente o posteriormente), o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades anteriormente mencionadas y un vehículo farmacéuticamente aceptable (incluyendo, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento anteriormente o posteriormente).

V. Formulaciones farmacéuticas y vías de administración

Se puede administrar RTA 408 por una variedad de métodos, por ejemplo, por vía oral o por inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, etc.). Dependiendo de la vía de administración, los compuestos activos se pueden recubrir en un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales

que puedan inactivar el compuesto. También se pueden administrar por perfusión/infusión continua de una enfermedad o sitio de la herida.

5 Para administrar RTA 408 por administración distinta de parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir 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 solución salina y disoluciones acuosas de tampón. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan *et al.*, 1984).

10 También se puede administrar RTA 408 por vía parenteral, por vía intraperitoneal, por vía intraespinal, o por vía intracerebral. Se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

15 Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles incorporando RTA 408 en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por 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 componentes 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 a vacío y liofilización, que da un polvo del principio activo (es decir, el compuesto terapéutico) más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

20 RTA 408 se puede convertir en completamente amorfo usando un procedimiento de secado por pulverización directo. Se puede administrar RTA 408 por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto terapéutico y otros componentes también se pueden encerrar en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimir en comprimidos o incorporar directamente en la dieta del paciente. Para administración terapéutica oral, el compuesto terapéutico se puede incorporar con excipientes y usar en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Por supuesto, se puede variar el porcentaje del compuesto terapéutico en las composiciones y preparaciones. La cantidad del compuesto terapéutico en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

30 Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes que se van 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. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención se dictan por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto terapéutico y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos tal como un compuesto terapéutico para el tratamiento de una afección seleccionada en un paciente.

40 También se puede administrar RTA 408 por vía tópica a la piel, ojos, o mucosa. Alternativamente, si se desea la administración local a los pulmones, el compuesto terapéutico se puede administrar por inhalación en una formulación en polvo seco o en aerosol.

Normalmente se administrará RTA 408 a una dosificación terapéuticamente eficaz suficiente para tratar una afección asociada con un paciente dado. Por ejemplo, la eficacia de un compuesto se puede evaluar en un sistema de modelo animal que puede ser predictivo de la eficacia en el tratamiento de la enfermedad en seres humanos, tales como los sistemas modelo mostrados en los ejemplos y dibujos.

45 La cantidad de dosificación actual de RTA 408 o composición que comprende RTA 408 administrado a un paciente se puede determinar por factores físicos y fisiológicos, tales como edad, sexo, peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se trata, intervenciones terapéuticas previas y concurrentes, idiopatía del paciente, y la vía de administración. Estos factores se pueden determinar por un experto. El médico responsable de la administración determinará normalmente la concentración de principio(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis apropiada(s) para el paciente individual. La dosificación se puede ajustar por el médico individual en el caso de cualquier complicación.

55 Una cantidad eficaz variará normalmente desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 1000 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 750 mg/kg, desde aproximadamente 100 mg/kg hasta aproximadamente 500 mg/kg, desde aproximadamente 1,0 mg/kg hasta aproximadamente 250 mg/kg, desde aproximadamente 10,0 mg/kg hasta 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 tratados anteriormente). Otros intervalos de dosis adecuados incluyen 1 mg a 10000 mg al día, 100 mg a 10000 mg

al día, 500 mg a 10000 mg al día y 500 mg a 1000 mg al día. En algunas realizaciones particulares, la cantidad es inferior a 10.000 mg al día con un intervalo de 750 mg a 9000 mg al día.

5 La cantidad eficaz puede ser inferior a 1 mg/kg/día, inferior a 500 mg/kg/día, inferior a 250 mg/kg/día, inferior a 100 mg/kg/día, inferior a 50 mg/kg/día, inferior a 25 mg/kg/día, o inferior a 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 o 150 mg/kg formulada como una suspensión en aceite de sésamo. En algunas realizaciones, la cantidad podría ser 3, 10, 30 o 100 mg/kg administrada diariamente a través de sonda nasogástrica oral. En algunas realizaciones, la cantidad podría ser 10, 30 o 100 mg/kg administrada por vía oral. Por ejemplo, con respecto al tratamiento de pacientes diabéticos, la dosificación unitaria puede ser una cantidad que reduzca la glucosa en sangre al menos el 40 % en comparación con un paciente no tratado. En otra realización, la dosificación unitaria es una cantidad que reduce la glucosa en la sangre a un nivel que es ± 10 % del nivel de glucosa en la sangre de un paciente no diabético.

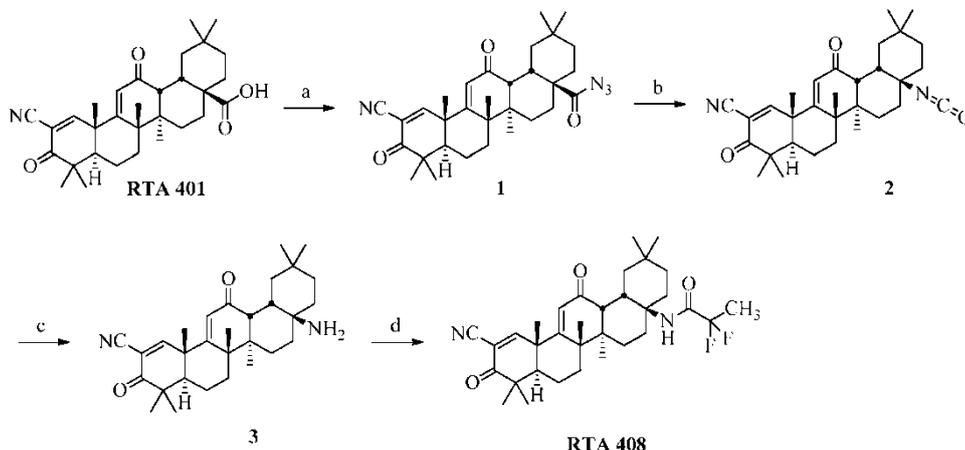
15 En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 20 100 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable en su interior. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, etc., basado en los números descritos anteriormente.

30 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente descripción puede comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,01 % de RTA 408. En otras realizaciones, RTA 408 puede comprender entre aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 5 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en su interior. En algunas realizaciones, se puede usar RTA 408 en una formulación tal como una suspensión en aceite de sésamo del 0,01, 0,1 o 1 %.

35 Se contemplan dosis únicas o múltiples del agente que comprende RTA 408. Los intervalos de tiempo deseados para la administración de dosis múltiples se pueden determinar por un experto habitual en la materia empleando no más de experimentación de rutina. Como un ejemplo, los pacientes se pueden administrar con dos dosis diarias a aproximadamente intervalos de 12 horas. En algunas realizaciones, el agente se administra una vez al día. El (Los) agente(s) se pueden administrar en un programa de rutina. Como se usa en el presente documento, un programa de rutina se refiere a un periodo de tiempo designado predeterminado. El programa de rutina puede englobar periodos de tiempo que son idénticos o que se diferencian en la duración, en tanto que el programa se predetermine. 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 número establecido de días o semanas entre los mismos. Alternativamente, el programa de rutina predeterminado puede implicar la administración basada en dos veces al día durante la primera semana, seguido por una base diaria durante siete meses, etc. En otras realizaciones, la invención proporciona que el (los) agente(s) se puedan tomar por vía oral y cuyo momento exacto sea o no sea dependiente del consumo de alimentos. Así, por ejemplo, el agente se puede tomar cada mañana y/o cada noche, independientemente de cuando el paciente ha comido o comerá.

VI. Ejemplos

A. Síntesis de RTA 408 (63415)



Reactivos y condiciones: (a) $(\text{PhO})_2\text{PON}_3$ (DPPA), trietilamina, tolueno, 0°C durante 5 minutos, luego temperatura ambiente durante la noche, ~94 %; (b) benceno, 80°C durante 2 horas; (c) HCl, CH_3CN , temperatura ambiente durante 1 hora; (d) $\text{CH}_3\text{CF}_2\text{CO}_2\text{H}$, dicitohexilcarbodiimida, 4-(dimetilamino)piridina, CH_2Cl_2 , temperatura ambiente durante la noche, 73 % de RTA 401 (4 etapas).

Compuesto 1: Se añadieron a un reactor RTA 401 (20,0 g, 40,6 mmoles), trietilamina (17,0 ml, 122,0 mmoles) y tolueno (400 ml) y se enfriaron hasta 0°C con agitación. Se añadió con agitación a 0°C durante 5 minutos difenilfosforilazida (DPPA) (13,2 ml, 61,0 mmoles), y la mezcla se agitó continuamente a temperatura ambiente durante la noche (la comprobación por HPLC-EM muestra que no queda RTA 401). La mezcla de reacción se cargó directamente sobre una columna de gel de sílice y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 0 % al 5 % de acetato de etilo en CH_2Cl_2) dando el compuesto **1** (19,7 g, ~94 %, se convirtió parcialmente en el compuesto **2**) como una espuma blanca.

Compuesto 2: Se añadieron en un reactor el compuesto **1** (19,7 g, ~38,1 mmoles) y benceno (250 ml) y se calentaron hasta 80°C con agitación durante 2 horas (la comprobación por HPLC-EM muestra que no queda compuesto **1**). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida proporcionando el compuesto en bruto **2** como un residuo sólido, que se usó para la siguiente etapa sin purificación.

Compuesto 3: Se añadieron en un reactor el compuesto en bruto **2** ($\leq 38,1$ mmoles) y CH_3CN (200 ml) y se enfriaron hasta 0°C con agitación. Se añadió HCl (12 N, 90 ml) a 0°C durante 1 minuto, y la mezcla se agitó continuamente a temperatura ambiente durante 1 hora (la comprobación por HPLC-EM muestra que no queda compuesto **2**). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se añadió 10 % de NaOH (~500 ml) con agitación. Entonces, se añadió NaHCO_3 saturado (1 l) con agitación. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2×500 ml). La fase orgánica combinada se lavó con H_2O (200 ml), NaCl saturado (200 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró proporcionando el compuesto en bruto **3** (16,62 g) como una espuma amarilla clara, que se usó para la siguiente etapa sin purificación.

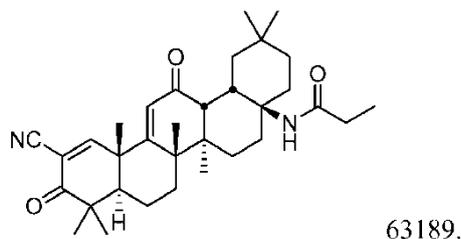
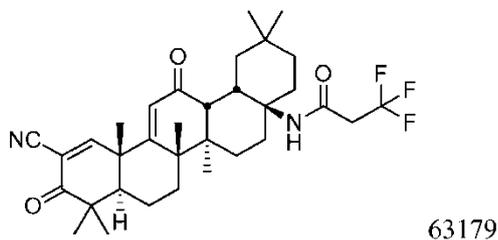
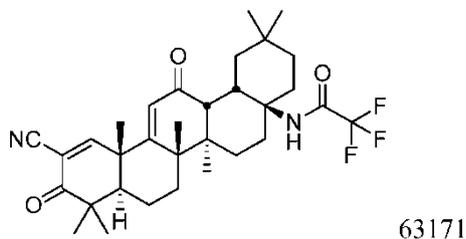
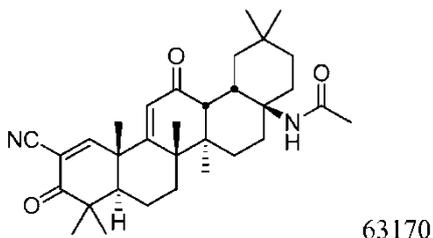
RTA 408: Se añadieron la amina en bruto **3** (16,62 g, 35,9 mmoles), $\text{CH}_3\text{CF}_2\text{CO}_2\text{H}$ (4,7388 g, 43,1 mmoles) y CH_2Cl_2 (360 ml) en un reactor con agitación a temperatura ambiente. Entonces, se añadieron dicitohexilcarbodiimida (DCC) (11,129 g, 53,9 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (1,65 g, 13,64 mmoles) y la mezcla se agitó continuamente a temperatura ambiente durante la noche (la comprobación por HPLC-EM muestra que no queda compuesto **3**). La mezcla de reacción se filtró para retirar los subproductos sólidos, y el filtrado se cargó directamente sobre una columna de gel de sílice y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 0 % al 20 % de acetato de etilo en hexanos) dos veces dando el compuesto **RTA 408** (16,347 g, 73 % a partir de **RTA 401** durante 4 etapas) como una espuma blanca: RMN ^1H (400 MHz, CD_3Cl) δ ppm 8,04 (s, 1H), 6,00 (s, 1H), 5,94 (s, a, 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

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

1. Efectos de RTA 408 sobre Keap1-Nrf2 y NF- κ B *in vitro*

La inhibición de la producción de NO inducida por IFN γ por AIM es dependiente de Nrf2 (Dinkova-Kostova, 2005). Se pretrataron macrófagos de ratón RAW264.7 con sulfóxido de dimetilo (vehículo) o RTA 408 durante 2 horas, seguido por el tratamiento con 20 ng/ml de IFN γ de ratón durante 24 horas. Se midieron los niveles de nitrito (NO $_2^-$) en el medio como un sustituto para el óxido nítrico usando el ensayo de reactivo de Griess. Se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo WST- 1. El tratamiento con RTA 408 dio como resultado una supresión dependiente de dosis de la producción de NO inducida por IFN γ , con un valor promedio de CI $_{50}$ de $3,8 \pm 1,2$ nM. Se muestran los resultados de un experimento representativo en la FIG. 1. Se encontró que el valor CI $_{50}$ para RTA 408 era el 45 %-65 % más bajo que los valores de CI $_{50}$ para los compuestos 63170 (8 ± 3 nM), 63171 ($6,9 \pm 0,6$ nM), 63179 (11 ± 2 nm) y 63189 (7 ± 2 nM). 63170, 63171, 63179, y 63189 son los compuestos de las fórmulas:



2. Efecto de RTA 408 sobre genes diana Nrf2

Se probó RTA 408 en dos ensayos indicadores diferentes para evaluar la activación del elemento de respuesta antioxidante (ARE). El primer indicador probado se controló por un ARE derivado del gen NQO1 humano. Se transfeció transitoriamente la línea celular de hepatoma humano HuH-7 con un plásmido indicador de luciferasa NQO1-ARE, y las células se trataron con RTA 408 durante 18 horas. La 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 veinte por ciento menos de RTA 408 (12 nM) que de 63189 (14,9 nM) para aumentar 2 veces la transcripción de NQO1-ARE en células HuH-7. Asimismo, 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 2 veces la transcripción de NQO1-ARE en células HuH-7. También se evaluó el efecto de RTA 408 sobre la activación indicadora de luciferasa en la línea celular indicadora AREc32. Esta línea celular deriva de células MCF-7 de carcinoma de mama humano y se transfecta establemente con un gen indicador de luciferasa bajo el control de la transcripción de ocho copias de la secuencia de GSTA2 ARE de rata. Tras el tratamiento con RTA 408 durante 18 horas, se observó una respuesta dependiente de la dosis similar en la línea celular indicadora AREc32 (FIG. 2b). Fue evidente una inducción de la actividad de luciferasa de ~2 veces tras el tratamiento con RTA 408 15,6 nM en ambos ensayos indicadores.

También se mostró que RTA 408 aumentaba los niveles de transcrito de genes diana Nrf2 conocidos en las líneas celulares de fibroblasto de pulmón humano HFL1 y epiteliales bronquiales humanas BEAS-2B. El tratamiento de fibroblastos de pulmón HFL1 con RTA 408 durante 18 horas produjo un aumento de la expresión de varios genes diana Nrf2, que incluyen NQO1, HMOX1, GCLM y TXNRD1, como se mide por PCR cuantitativa (FIGS. 3a-d). Para todos los genes probados, la inducción por RTA 408 fue dependiente de la dosis y evidente a concentraciones de tan solo 15,6 nM. El tratamiento de células epiteliales bronquiales BEAS-2B con RTA 408 durante 18 horas produjo un aumento dependiente de la dosis similar de todos los genes diana Nrf2 evaluados (FIGS. 4a-d). RTA 408 también aumentó la expresión de genes diana Nrf2 en células mesangiales humanas normales (nHMC), la línea de células de microglía BV2 de ratón y la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y a concentraciones similares.

El tratamiento con RTA 408 también aumentó los niveles de proteína NQO1 en células SH-SY5Y de un modo dependiente de la dosis (FIG. 5a). No se detectó proteína HMOX1 en células SH-SY5Y no tratadas o tratadas con RTA 408. En células BV2, el tratamiento con RTA 408 aumentó los niveles de proteína NQO1 y HMOX1 a concentraciones de hasta 125 nM (FIG. 5b). El valor de CE_{50} para la inducción de expresión de proteínas Nrf2 en células SK-N-SH por RTA 408 (56,4 nM) fue el 45 %-65 % más bajo 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).

Se midió CE_{50} usando un ensayo Western de NQO1 en la célula donde las células se incubaron con el compuesto en evaluación durante 3 días. Después de la incubación con el compuesto de interés, las células se hicieron reaccionar con anticuerpo de ratón contra NQO1 y entonces al día siguiente las células se hicieron reaccionar con anticuerpo anti-IgG de ratón IRDye-800CW. Se visualizaron las señales diana y luego se evaluaron.

De acuerdo con la inducción de genes diana Nrf2 y productos de proteína correspondientes, el tratamiento de células de macrófago de ratón RAW264.7 durante 24 horas aumentó la actividad enzimática de NQO1 de un modo dependiente de la dosis, con aumentos evidentes a 7,8 nM (FIG. 6).

Tomados conjuntamente, 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 genes diana Nrf2 y aumenta la actividad de NQO1, un producto del gen diana Nrf2.

3. Efecto de RTA 408 sobre marcadores de capacidad celular de oxidorreducción

El glutatión y NADPH son factores críticos requeridos para el mantenimiento de la capacidad celular de oxidorreducción. Se ha demostrado que varios genes implicados en la síntesis de glutatión (por ejemplo, GCLC y GCLM) y NADPH [por ejemplo, hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (H6PD) y la enzima málica 1 (ME1)] se regulan por Nrf2 (Wu, 2011). Se evaluó el efecto del tratamiento con RTA 408 sobre los niveles totales de glutatión en la línea celular de hepatocitos AML-12 de ratón. El tratamiento de células AML-12 durante 24 horas con RTA 408 aumentó los niveles totales de glutatión celular de un modo dependiente de la dosis (FIG. 7). Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes. Se observó un aumento de >2 veces en glutatión total a concentraciones de RTA 408 de tan solo 15,6 nM. El valor de CE_{50} usando un modelo de ratón RAW264.7 para la inducción de niveles de glutatión por RTA 408 (9,9 nM) fue el 22 %-57 % más bajo que los valores de CE_{50} para 63170 (12,1 nM), 63171 (23,2 nM) y 63189 (16 nM).

Se evaluó el efecto del tratamiento con RTA 408 en células HCT-116 sobre los niveles de NADPH, como se mide por la absorbancia de un colorante sensible a la oxidorreducción, WST-1. El tratamiento con RTA 408 durante 24 horas aumentó la absorbancia de WST-1 de un modo dependiente de la dosis (FIG. 8), sugiriendo que aumentaron los niveles de NADPH.

También se evaluó en este estudio el efecto de RTA 408 sobre la expresión de genes implicados en las vías de síntesis de NADPH. Se trataron con RTA 408 células HCT-116 durante 24 horas, y se midieron los niveles de ARNm de H6PD, fosfogluconato deshidrogenasa (PGD), transcetolasa (TKT) y ME1 usando PCR cuantitativa. El tratamiento con RTA 408 produjo un aumento dependiente de la dosis en la expresión de genes implicados en la síntesis de NADPH (FIGS. 9a-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 producción de NADPH, en células HCT-116. Esta observación se correlacionó con un aumento en la expresión de varios genes clave que codifican enzimas implicadas en la síntesis de NADPH.

4. Efecto de RTA 408 sobre la señalización de NF- κ B inducida por TNF α

NF- κ B es un factor de transcripción que desempeña una función central en la regulación de muchas respuestas inmunitarias e inflamatorias. Se ha mostrado que RTA 402 y otros AIMs inhiben la señalización pro-inflamatoria de NF- κ B en una variedad de líneas celulares (Shishodia, 2006; Ahmad, 2006; Yore, 2006). Se evaluó el efecto de RTA 408 sobre la señalización de NF- κ B inducida por TNF α en células HeLa/NF- κ B-Luc, una línea celular de adenocarcinoma cervical humano transfectada establemente con una construcción indicadora de luciferasa bajo el control de múltiples elementos de respuesta transcripcional de NF- κ B. Se pretrataron células HeLa/NF- κ B-Luc

durante 1 hora con RTA 408, seguido por tratamiento con TNF α (10 ng/ml) durante 5 horas adicionales. Después del tratamiento, se midió la luminiscencia, y se determinó el efecto del pretratamiento con RTA 408 sobre la actividad de luciferasa inducida por TNF α . Los resultados y desviaciones estándar promedio de tres experimentos independientes se muestran en la FIG. 10. RTA 408 inhibió de manera dependiente de la dosis la activación de NF- κ B inducida por TNF α con un valor de CI₅₀ de 517 \pm 83nM. Se observaron resultados similares en otra línea celular indicadora de NF- κ B (A549/NF- κ B-Luc) donde RTA 408 inhibió la activación de NF- κ B inducida por TNF α con un valor de CI₅₀ de 627 nM (intervalo 614-649 nM). RTA 408 fue 1,6-1,8 veces más eficiente en reducir la expresión del indicador del promotor de NF- κ B en células HeLa/NF- κ B-Luc que 63189 (854 nM) y 63170 (953 nM), respectivamente.

También se evaluó en células HeLa el efecto de RTA 408 sobre la fosforilación inducida por TNF α de I κ B α , una etapa clave en la activación de la vía NF- κ B. Se pretrataron células HeLa con RTA 408 durante 6 horas, seguido por tratamiento con TNF α (20 ng/ml) durante 5 min. Se evaluaron los niveles totales y fosforilados de I κ B α por transferencia Western. De acuerdo con los resultados del ensayo indicador de luciferasa, RTA 408 inhibió la fosforilación inducida por TNF α de I κ B α de un modo dependiente de la dosis (FIG. 11).

También se ha demostrado que RTA 408 inhibe otras vías de señalización pro-inflamatorias, tales como el transductor de señales inducido por IL-6 y la fosforilación del activador de la transcripción 3 (STAT3) y la osteoclastogénesis inducida por el activador de receptor del ligando NF- κ B (RANKL). En células HeLa, el pretratamiento con RTA 408 1 μ M durante 6 horas inhibió la fosforilación de STAT3 inducida por IL-6. La osteoclastogénesis es un proceso de diferenciación multi-etapa que resulta de la unión de RANKL a su receptor, RANK, sobre células de origen hematopoyético. Esto da como resultado la activación de NF- κ B y MAPK, que a su vez aumenta la transcripción de genes diana específicos de osteoclastos, que incluyen fosfatasa resistente a tartrato (TRAP). Se evaluó el efecto de RTA 408 sobre la osteoclastogénesis inducida por RANKL en la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7. Se pretrataron células RAW264.7 durante 2 horas con RTA 408 y luego se trataron con 50 ng/ml de RANKL de ratón recombinante. RTA 408 inhibió de manera dependiente de la dosis la actividad de TRAP inducida por RANKL y la formación de osteoclastos, con un CI₅₀ de \sim 5-10 nM.

5. Efecto de RTA 408 sobre la expresión de genes que codifican enzimas transaminasas

Se observaron elevaciones de transaminasas en los estudios de toxicidad de 28 días con RTA 408 en ratas y, a un grado mucho más bajos en monos. Se han observado resultados similares tras la administración por vía oral de un AIM relacionado (bardoxolone metilo) en seres humanos (Pergola, 2011). Una hipótesis de este efecto es que AIM aumentan directamente o indirectamente la expresión génica de transaminasas en ausencia de toxicidad celular. Para evaluar si el tratamiento con RTA 408 afecta o no los niveles de ARNm de transaminasa, se trataron con RTA 408 hepatocitos AML-12 de ratón durante 18 horas, y se midieron los niveles de ARNm de genes que codifican transaminasas usando PCR cuantitativa. 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. 12a, c). RTA 408 no tuvo efecto sobre 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. 12b,d). Estos resultados demuestran que RTA 408, a las concentraciones probadas (250 nM o 500 nM), afecta la expresión génica de transaminasa *in vitro* de un modo de acuerdo con los efectos de otros compuestos en la clase de AIM. Sin embargo, no queda claro cómo los resultados de este sistema *in vitro* a las concentraciones de RTA 408 probadas se relacionan con los posibles efectos sobre transaminasas a niveles de dosis clínicamente relevantes en seres humanos.

6. Efecto de RTA 408 sobre los niveles de productos intermedios glucolíticos

Estudios en ratones diabéticos han demostrado que bardoxolone metilo aumenta la captación de glucosa estimulada por insulina específica de músculo (Saha, 2010). En seres humanos, un mayor porcentaje de pacientes que recibieron bardoxolone metilo informaron que experimentaban calambres musculares en comparación con los pacientes que recibieron placebo (Pergola, 2011). También se ha informado de espasmos musculares en pacientes diabéticos tras la administración de insulina, sugiriendo una posible asociación con el metabolismo de la glucosa muscular. Se evaluó el efecto de RTA 408 sobre el metabolismo glucolítico mediante la evaluación de los niveles de lactato y piruvato en células musculares cultivadas C2C12 de roedor. Similar al tratamiento con insulina, el tratamiento de miotubos C2C12 diferenciados con RTA 408 1 μ M o 2 μ M durante 3 horas aumentó significativamente los niveles de lactato intracelular y extracelular de un modo dependiente de la dosis.

El tratamiento de miotubos diferenciados C2C12 con RTA 408 250 nM o 500 nM durante 18 horas también aumentó significativamente ($P < 0,0001$, indicado por asteriscos) los niveles de piruvato intracelular de un modo dependiente de la dosis (FIG. 13). Juntos, estos resultados demuestran que RTA 408, a las concentraciones probadas, puede afectar los productos intermedios glucolíticos musculares *in vitro*; sin embargo, no queda claro cómo los resultados de este sistema *in vitro* a las concentraciones de RTA 408 se relacionan con los posibles efectos sobre el metabolismo de la glucosa a niveles de dosis clínicamente relevantes en seres humanos.

7. Evaluación *in vitro* de la salida de RTA 408 por MRP-1

Se determinó experimentalmente que la relación de salida de MRP-1 para RTA 408 (1,3) era aproximadamente diez veces más baja que 63170 (10) y 63171 (11,2) y más de 40 veces más baja que 63189 (57,1). El valor determinado para RTA 408 indica que no es un sustrato de MRP-1, mientras que sí lo son los otros compuestos.

5 C. Efectos protectores de RTA 408 en modelos animales de enfermedad pulmonar

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

10 1. Inflamación pulmonar inducida por LPS en ratones

Se probó RTA 408 en dos estudios de inflamación pulmonar inducida por LPS en ratones. En el primer estudio, que se propuso que fuera un buscador de intervalo de dosis preliminar, se administró RTA 408 (30, 100 o 150 mg/kg) una vez al día durante 3 días, seguido por la administración de LPS 1 hora después de la dosis final. Se recogió líquido de lavado broncoalveolar (BALF) 20 horas después de la administración de LPS (21 horas después de la dosis final de RTA 408) y se evaluó para niveles de marcadores pro-inflamatorios (es decir, IL-6, IL-12p40, TNF- α y RANTES). El tratamiento con RTA 408 produjo una reducción significativa en IL-12p40 a todas las dosis y en TNF α a las dosis de 100 y 150 mg/kg (FIG. 14). En el segundo estudio, se administró RTA 408 (10, 30 o 100 mg/kg) diariamente durante 6 días, seguido por la administración de LPS 1 hora después de la dosis final. En este estudio, se observaron disminuciones significativas en el peso corporal al nivel de dosis de 100 mg/kg empezando en el Día 3. Se observaron reducciones significativas en TNF α a la dosis de 10 mg/kg, y se observaron reducciones significativas en IL-12p40, TNF α , y RANTES a la dosis de 30 mg/kg (FIGS. 15a). La evaluación adicional de los pulmones de ratones en este estudio reveló el significativo acoplamiento de genes diana Nrf2 relevantes, que incluye la significativa inducción de la actividad enzimática de NQO1 y aumentos en GSH total a 10 y 30 mg/kg (FIG. 15b).

8. Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

También se evaluó el efecto de RTA 408 en modelos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones y ratas. En el primer estudio preliminar, se administró RTA 408 (10, 30 o 100 mg/kg) a ratones diariamente por sonda nasogástrica oral durante 39 días, con exposición a bleomicina (intranasal) en el Día 10. En el último día de dosificación, se recogió tejido de pulmón y se realizó la histología para evaluar el grado de inflamación y la fibrosis intersticial. En este modelo, no se observaron efectos estadísticamente significativos a las dosis de RTA 408 probadas (FIGS. 16a y b). Se realizó evaluación adicional usando un modelo de rata de fibrosis pulmonar que ha sido ampliamente caracterizado en el Lovelace Respiratory Research Institute. En este estudio, se expusieron ratas a bleomicina o solución salina por administración intratraqueal en el Día 0. Tras la exposición, los animales recibieron RTA 408 (3, 10 o 30 mg/kg) diariamente por sonda nasogástrica oral durante 28 días. La administración de la dosis de 30 mg/kg se detuvo en el Día 14 debido a la excesiva deshidratación y diarrea en los animales. Para los restantes animales, se recogió líquido de lavado broncoalveolar en el Día 28 para la evaluación de infiltrados pro-inflamatorios, y se analizó el tejido de pulmón para niveles de hidroxiprolina e histopatología. La exposición a sulfato de bleomicina indujo una liberación sustancial de neutrófilos y un aumento en el colágeno soluble en BALF, así como un aumento en hidroxiprolina en el pulmón. Los tratamientos con 3 y 10 mg/kg de RTA 408 suprimieron significativamente la infiltración de células polimorfonucleares (PMN) en los pulmones y también produjo una reducción significativa (~10 %-20 %) en la deposición de hidroxiprolina (FIGS. 17a y b).

Y, lo que es más importante, la evaluación histopatológica reveló una disminución significativa en la deposición de colágeno, como se evaluó por la tinción por tricromo, en ratas tratadas con RTA 408. Aunque los animales de control de bleomicina presentaron principalmente tinción moderada, los animales tratados con 10 mg/kg de RTA 408 tuvieron tinción predominantemente de mínima a leve (Tabla 2).

45 **Tabla 2: Efecto de RTA 408 sobre la deposición de colágeno en pulmón de rata como se evalúa por la intensidad de la tinción de tricromo**

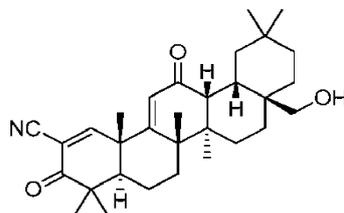
Intensidad de la tinción ^a	Control de bleomicina	RTA 408 (3 mg/kg)	RTA 408 (10 mg/kg)
Mínima	0	0	3
Leve	1	0	4
Moderada	7	7	1

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

La evaluación adicional de pulmones de ratas en este estudio también reveló el significativo acoplamiento de genes diana Nrf2 relevantes (FIG. 18). RTA 408 aumentó significativamente y de manera dependiente de la dosis la actividad enzimática de NQO1, Txnrd, Gsr y Gst en los pulmones de ratas expuestas a bleomicina, demostrando la activación de Nrf2 por RTA 408 en este entorno de enfermedad.

5 9. EPOC inducida por el humo de cigarro en ratones

También se probó RTA 408 en un modelo de ratón de EPOC inducida por el humo de cigarro. Los ratones recibieron RTA 408 (3, 10 o 30 mg/kg) diariamente por sonda nasogástrica oral durante dos semanas y se expusieron al humo de cigarro cinco días por semana durante el periodo de dosificación de RTA 408. Al final del estudio, se recogieron tejido de pulmón y BALF para el análisis de infiltrados inflamatorios y citocinas. En este experimento, la administración de dosis múltiples de RTA 408 a dosis de tan solo 3 mg/kg de RTA 408 produjo supresión significativa de citocinas pro-inflamatorias, que incluyen KC (homólogo de ratón funcional de IL-8 humana) y TNF α . Un resumen de resultados de este estudio se presenta en las FIGS. 19a-e. Se probó un análogo de AIM (63355) en el mismo estudio para comparación. 63355 es un compuesto de la fórmula:



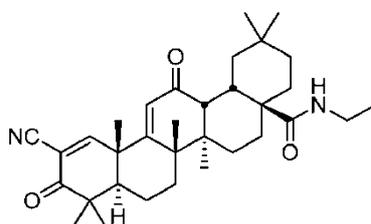
La evaluación adicional de pulmones de ratones en este estudio también reveló un acoplamiento significativo de genes diana Nrf2 relevantes (FIG. 20). La actividad enzimática de NQO1 en el pulmón disminuyó significativamente por exposición a humo de cigarro; la administración de RTA 408 rescató esta pérdida. También se indujo la actividad enzimática de Txnrd por la dosis de 30 mg/kg de RTA 408. En general, no se alteró la actividad enzimática de Gsr, y la actividad enzimática de Gst disminuyó con el tratamiento - ambos de los cuales fueron probablemente la consecuencia de una respuesta temporal para estas enzimas.

10. Asma inducido por ovoalbúmina en ratones

También se evaluó la posible actividad de RTA 408 en un estudio piloto en un modelo de ratón de asma inducido por ovoalbúmina. Se sensibilizaron ratones con una inyección IP de ovoalbúmina e hidróxido de aluminio en el Día 0 y Día 14 y se expusieron por vía intranasal a ovoalbúmina en solución salina en los Días 14, 25, 26 y 27. Los ratones recibieron RTA 408 (3, 10 o 30 mg/kg) diariamente por sonda nasogástrica oral en los Días 1-13 y 15-27. Tras la sensibilización y exposición a 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). También se observó un aumento en el número de linfocitos T y linfocitos B en los ratones tratados con vehículo. El tratamiento con RTA 408 a 30 mg/kg redujo significativamente el número y porcentaje de linfocitos B dentro de las vías respiratorias. 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 sugerentes de la posible eficacia en este modelo.

11. Efectos de RTA 408 sobre la septicemia inducida por LPS en ratones

Se indujo septicemia en el Día 0 con una inyección IP de LPS (21 mg/kg), y se siguió la supervivencia hasta el Día 4. Se administró diariamente RTA 408 (10, 30 o 100 mg/kg) por sonda nasogástrica oral desde el Día -2 hasta el Día 2. En el grupo de control de vehículo, el 60 % de los animales sobrevivió hasta el Día 4 (superior a ~40 % de tasa de supervivencia esperada en este modelo). En el grupo de tratamiento con 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 sobrevivió hasta el Día 4 (FIGS. 21c y d). Para el grupo de dosis de 100 mg/kg, el 90 % de los animales sobrevivió hasta el Día 4, con solo una única muerte que se produjo en el Día 4. Aunque estos efectos inducidos por RTA 408 son indicativos de la profunda eficacia en este modelo, la tasa de supervivencia relativamente alta en el grupo de control de vehículo excluyó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de control y tratados con RTA 408. También se presentan los resultados obtenidos usando el compuesto RTA 405 (FIGS. 21a y b). RTA 405 es un compuesto de la fórmula:



12. Efectos de RTA 408 contra la mucositis oral inducida por radiación

La exposición a radiación aguda dirigida a los abazones bucales de hámsteres produce efectos similares a los observados en la mucositis ulcerosa oral en seres humanos. Estos efectos incluyen mucositis de moderada a grave caracterizada por eritema grave y vasodilatación, erosión de la superficial mucosa y formación de úlceras. Se realizó un único estudio para evaluar los efectos de RTA 408 en este modelo. En el Día 0, cada hámster se administró con una dosis de radiación aguda de 40 Gy dirigida al abazón bucal izquierdo. Se administró por vía oral RTA 408 (10, 30 o 100 mg/kg) dos veces al Día desde el Día -5 hasta el Día -1, y Día 1 hasta el Día 15. Empezando en el Día 6 y continuando hasta el Día 28 en días alternos, se evaluó la mucositis oral usando una escala de puntuación estándar de puntos. Tanto las dosis de 30 como de 100 mg/kg de RTA 408 causaron una reducción significativa en la duración de la mucositis ulcerosa (FIG. 22). 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 o 100 mg/kg causó reducciones significativas dependientes de la dosis en el aumento de peso en hámsteres irradiados. Debido a una pérdida de peso superior al 20 %, dos de los ocho hámsteres en el grupo de dosis de 100 mg/kg se sacrificaron en el Día 2.

13. Efecto de RTA 408 sobre la inducción de biomarcadores Nrf2 *in vivo*

Como se ha descrito anteriormente, una diana molecular clave de RTA 408 es Nrf2, un regulador transcripcional fundamental de la protección celular antioxidativa. La activación de Nrf2 induce la regulación por incremento de una batería de genes citoprotectores, que incluyen NQO1, enzimas implicadas en la síntesis de GSH [es decir, subunidades catalíticas y modificadoras de glutamato-cisteína ligasa (Gclc y Gclm)], enzimas implicadas en la desintoxicación (es decir, glutatión S-transferasas [Gsts]) y transportadores de salida [es decir, proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos (MRPs)]. La inducción de estos genes da como resultado un esfuerzo celular coordinado para proteger contra la agresión oxidativa, subrayada por la elevada capacidad antioxidativa, inducción de la síntesis de glutatión y conjugación y exportación de moléculas posiblemente peligrosas de la célula. Además de los criterios de valoración de eficacia y la expresión de genes diana Nrf2 evaluada en los diversos modelos animales descritos anteriormente, también se evaluó la capacidad de RTA 408 para inducir la expresión de genes diana Nrf2 usando tejidos recogidos de ratones, ratas y monos sanos tratados con RTA 408.

Como parte de los estudios de toxicidad de 14 días no de GLP de RTA 408 en ratones, ratas y monos, se recogieron tejidos para los fines de medición de los niveles de ARNm y de actividad enzimática de genes diana Nrf2 seleccionados. Para ratones y ratas, se recogieron muestras de hígado 4 horas después de la dosis final en el Día 14. Para monos, se recogieron sangre (para el aislamiento de CMSP), hígado, pulmón y tejido cerebral 24 horas después de la dosis final en el Día 14. Se midieron la actividad enzimática para NQO1, Gst y glutatión reductasa (Gsr) en homogeneizados de tejido. Se determinaron los niveles de ARNm usando tecnología QuantiGene Plex 2.0, que implica un ensayo basado en hibridación usando perlas magnéticas xMAP® Luminex® para la cuantificación directa de dianas de ARNm. Además, se midieron concentraciones de RTA 408 en plasma y tejidos por métodos de CL/EM/EM.

RTA 408 aumentó generalmente la expresión de diversos genes diana Nrf2 de un modo dependiente de la dosis a dosis de 10, 30 y 100 mg/kg (FIG. 23, FIG. 24a, FIGS. 25a y b). La regulación transcripcional por incremento de los genes diana Nrf2 por RTA 408 también produjo aumentos funcionales en la respuesta antioxidante, como se manifiesta por aumentos dependientes de la dosis en la actividad enzimática de NQO1, Gst y Gsr en hígado de roedor, así como hígado y pulmón de mono (FIGS. 26a y b, FIGS. 27a y b, FIGS. 28a 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 prototípico para Nrf2 (FIG. 29b, FIG. 30b). En monos, el nivel de expresión de ARNm en CMSP de tanto NQO1 como sulfirredoxina 1 (SRXN1) se correlacionó con la exposición del plasma a RTA 408 (FIGS. 34a y b). En general, RTA 408 aumentó los niveles de ARNm y actividad de dianas Nrf2, y dichos aumentos se correlacionaron generalmente con exposiciones de tejido y plasma, sugiriendo que las dianas Nrf2 pueden servir de biomarcadores factibles para la activación de Nrf2 (FIGS. 31a y b) y pueden ser útiles para evaluar la actividad farmacológica de RTA 408 en sujetos humanos sanos.

D. Farmacología de seguridad

Se completó un programa de farmacología de seguridad conforme a GLP usando RTA 408. Éste incluyó estudios *in vitro* e *in vivo* (mono) en el sistema cardiovascular, así como estudios en el aparato respiratorio y sistema nervioso central en ratas.

2. Evaluación de los efectos de RTA 408 sobre canales de hERG clonados expresados en células HEK293

Se realizó este estudio para evaluar los efectos de RTA 408 sobre la corriente de potasio rectificadora hacia adentro rápidamente activante (I_{Kr}) conducida por canales hERG (gen relacionado con ether-ago-go humano) establemente expresados en la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293). Se evaluaron los efectos de RTA 408 sobre la corriente de potasio relacionada con hERG usando métodos de electrofisiología de pinzamiento zonal de células completas. Se determinó que RTA 408 tenía el valor de Cl_{50} de 12,4 μ M en un ensayo hERG QPatch Kv11.1. Este

valor fue 2,5-3 veces superior a los valores para 63170 (4,9 μM) y 63189 (3,8 μM), respectivamente. El valor de Cl_{50} de RTA 408 fue similar al valor de 63171 (15,7 μM).

3. Evaluación cardiovascular de RTA 408 en el mono cinomolgo

5 Se realizó un único estudio para evaluar los posibles efectos cardiovasculares de RTA 408 en monos cinomolgos conscientes que se mueven libremente. Los mismos cuatro monos cinomolgos macho y cuatro hembra se administraron con el vehículo (aceite de sésamo) y RTA 408 a niveles de dosis de 10, 30 y 100 mg/kg según un diseño de cuadrados latinos, con un animal/sexo/tratamiento administrado cada semana seguido por un periodo de reposo farmacológico de 14 días entre administraciones, hasta que cada animal recibió todos los tratamientos. Se administraron vehículo y RTA 408 a todos los animales por sonda nasogástrica oral a un volumen de dosis de 10 5 ml/kg.

Los animales se equiparon con transmisores de telemetría para la medición de la evaluación de la temperatura corporal, tensión arterial, frecuencia cardíaca y electrocardiograma (ECG). Se monitorizaron continuamente los parámetros de temperatura corporal, tensión arterial sistólica, diastólica y media, frecuencia cardíaca y ECG (duración de QRS e intervalos RR, PR y QT) desde al menos 2 horas pre-dosis hasta al menos 24 horas post-dosis. 15 Se imprimieron los registros ECG en momentos de tiempo designados de los datos de monitorización cardiovascular y se evaluaron cualitativamente por un cardiólogo veterinario con certificado de especialidad. Antes de la primera administración en el estudio, los animales sin tratar se monitorizaron continuamente para criterios de valoración cardiovascular durante al menos 24 horas, y estos datos se usaron en el cálculo del intervalo QT corregido en todo el estudio.

20 Se realizaron observaciones para morbilidad, mortalidad, lesión y disponibilidad de alimentos y agua al menos dos veces al día para todos los animales. Se realizaron observaciones clínicas pre-dosis, aproximadamente 4 horas post-dosis y tras la finalización del periodo de monitorización cardiovascular. Se midieron y registraron los pesos corporales el día antes de cada administración de tratamiento.

RTA 408 a niveles de dosis de 10, 30 y 100 mg/kg no produjo mortalidad, signos clínicos adversos, ni dio como resultado cambios significativos en el peso corporal (FIG. 32), temperatura corporal, tensión arterial o parámetros cualitativos o cuantitativos de ECG (intervalos PR, RR, QRS, QT). En el grupo de dosis de 100 mg/kg, se observó un pequeño aumento (1,6 % en promedio) pero estadísticamente significativo en el intervalo QT corregido; sin embargo, 25 datos en animales individuales no mostraron aumentos coherentes en QTc que indicaran un efecto relacionado con el artículo de prueba. Por consiguiente, debido a la pequeña magnitud del cambio y la ausencia de una respuesta coherente en animales individuales, no se consideró que estos ligeros aumentos en QTc se relacionaran con el tratamiento con RTA 408. Por tanto, la administración por vía oral de RTA 408 no produjo efectos sobre la función cardiovascular en monos cinomolgos a dosis hasta y que incluyen 100 mg/kg. 30

4. Evaluación neuroconductual de RTA 408 en ratas

35 Se evaluó la posible toxicidad neuroconductual aguda de RTA 408 en ratas. Tres grupos de tratamiento de 10 ratas macho y 10 hembra CD° [Cr1:CD° (SD)] recibieron RTA 408 a niveles de dosis de 3, 10 o 30 mg/kg. Un grupo adicional de 10 animales/sexo sirvió de control y recibió vehículo (aceite de sésamo). Se administró vehículo o RTA 408 a todos los grupos por sonda nasogástrica oral una vez en el Día 1 a un volumen de dosis de 10 ml/kg.

Se realizaron observaciones para morbilidad, mortalidad, lesión y disponibilidad de comida y agua dos veces al día para todos los animales. Se realizaron observaciones para signos clínicos antes de la dosificación en el Día 1 y siguiendo cada evaluación de la batería observacional funcional (FOB). Las evaluaciones de FOB se realizaron pre-dosis (Día -1) y aproximadamente 4 y 24 horas post-dosis. Se midieron y registraron los pesos corporales pre-dosis en el Día 1. 40

RTA 408 a dosis de 3, 10 y 30 mg/kg no produjo mortalidad, observaciones clínicas adversas ni efectos sobre ninguna de las medidas neuroconductuales probadas. Se observaron ligeras disminuciones en el aumento de peso corporal aproximadamente 24 horas después de la dosificación en el grupo de 30 mg/kg que pueden estar posiblemente relacionadas con el artículo de prueba. Con respecto a los criterios de valoración neuroconductuales básicos evaluados en este estudio, RTA 408 no produjo ningún efecto adverso en ratas a dosis hasta y que incluyen 30 mg/kg. 45

5. Evaluación pulmonar de RTA 408 en ratas

50 Se evaluó en ratas el posible efecto de RTA 408 sobre la función pulmonar. Tres grupos de tratamiento de ocho ratas macho y ocho hembra CD° [Cr1:CD° (SD)] recibieron RTA 408 a niveles de dosis de 3, 10 o 30 mg/kg. Un grupo adicional de ocho animales/sexo sirvió de control y recibió vehículo (aceite de sésamo). Se administró vehículo o RTA 408 a todos los grupos por sonda nasogástrica oral una vez en el Día 1 a un volumen de dosis de 10 ml/kg.

55 Se realizaron observaciones para morbilidad, mortalidad, lesión y disponibilidad de comida y agua dos veces al día para todos los animales. Se realizaron observaciones clínicas antes de la dosificación, aproximadamente 4 horas

post-dosis y tras la finalización del periodo de monitorización pulmonar de 8 horas. Se midieron y registraron los pesos corporales el día de la administración de RTA 408. Se monitorizó la función pulmonar (frecuencia respiratoria, volumen corriente y volumen respiratorio por minuto) durante al menos 1 hora antes de la dosificación para establecer un nivel inicial y durante al menos 8 horas post-dosis.

- 5 RTA 408 a dosis de 3, 10 y 30 mg/kg no produjeron mortalidad, observaciones clínicas adversas ni efectos sobre cualesquiera de los parámetros pulmonares evaluados. Por tanto, con respecto a los criterios de valoración pulmonar básica evaluada en este estudio, RTA 408 no produjo ningún efecto adverso en ratas a dosis hasta y que incluyen 30 mg/kg.

E. Visión general no clínica

10 1. Farmacocinética

Se ha investigado RTA 408 tanto *in vitro* como *in vivo* para evaluar sus propiedades FC y de metabolismo. Se han realizado estudios *in vitro* para determinar la unión a proteína plasmática RTA 408 y el reparto sangre/plasma, inhibición e inducción de citocromo P450 (CYP450), y para identificar metabolitos formados por los microsomas del hígado de ratones, ratas, monos y seres humanos. Se han obtenido principalmente datos referentes a la absorción y distribución *in vivo* tras la administración repetida de RTA 408 mediante la monitorización de niveles de fármaco en plasma y tejidos seleccionados de estudios de toxicología. Se han usado métodos bioanalíticos sensibles y selectivos basados en cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL/EM/EM) para medir concentraciones de RTA 408 en plasma, sangre y tejidos con exactitud y precisión apropiadas.

a. Absorción

20 Se estudió la absorción y el comportamiento farmacocinético sistémico de RTA 408 en ratones, ratas y monos tras la administración única y repetida (diaria) por vía oral. Tras la administración por vía oral de una formulación en suspensión a dosis de 10 a 100 mg/kg, se observaron concentraciones máximas en el plazo de 1 a 2 horas en ratones, y en el plazo de 1 a 24 horas en ratas y monos. La exposición sistémica a RTA 408 tendió a ser la más alta en ratas, con niveles más bajos observados en ratones y monos. Las estimaciones de la semivida terminal aparente de RTA 408 observada después de la administración por vía oral estuvieron generalmente en el intervalo de 6 a 26 horas, aunque la fase de absorción prolongada aparente en algunos casos excluyó el cálculo de una estimación de semivida definitiva.

La exposición sistémica a RTA 408 fue generalmente similar en machos y hembras. La exposición a RTA 408 tras la administración diaria repetida por vía oral tendió a ser ligeramente más alta (≤ 2 veces) que la exposición observada después de una dosis única. La administración de RTA 408 durante un intervalo de dosis de 3 a 100 mg/kg en una formulación en suspensión produjo generalmente aumentos proporcionales a la dosis en la exposición sistémica. Sin embargo, la administración de dosis más altas (100 a 800 mg/kg en monos; 500 a 2000 mg/kg en ratas) no dio como resultado aumentos similares en la exposición, que sugiere saturación de la absorción a dosis por encima de 100 mg/kg. Tras la administración por vía oral de una formulación en cápsula no optimizada (llenada suelta) de RTA 408 (3 mg/kg) a monos, la exposición sistémica normalizada a la dosis tendió a ser algo más baja que la observada con una formulación en suspensión.

Se estudió la absorción y el comportamiento farmacocinético sistémico de RTA 408 en ratas usando administración tópica única y repetida. La administración de RTA 408 durante un intervalo del 0,01 al 3 % mostró concentraciones plasmáticas más bajas con respecto a la dosificación oral similar. La exposición sistémica a RTA 408 aumentó generalmente de un modo dependiente de la dosis. La administración tópica se formuló como una suspensión en aceite de sésamo.

Usando conejos, se evaluó la absorción ocular y el comportamiento farmacocinético sistémico de RTA 408. Se administró RTA 408 por vía tópica al ojo una vez por día durante 5 días. La administración ocular mostró concentración plasmática más baja de RTA 408 con respecto a cuando se administra RTA 408 por vía oral (FIG 33). La cantidad de RTA 408 en el plasma incluso después de cinco días consecutivos mostró solo un pequeño cambio en comparación con la concentración después de la primera dosis con respecto a cuando RTA 408 se administró por vía oral, cuando las concentraciones plasmáticas fueron casi 100 veces más altas (FIG. 33).

b. Distribución

Se evaluó la unión a proteína plasmática de RTA 408 en ratón, rata, conejo, perro, minicerdo, mono y plasma humano a concentraciones de RTA 408 de 10-2000 ng/ml usando metodología de ultracentrifugación. RTA 408 se unió ampliamente a proteínas plasmáticas. La unión a proteína plasmática en las especies no clínicas varió desde el 93 % (ratón) hasta >99 % (minicerdo), con unión del 95 % en las especies de toxicología (rata y mono) y del 97 % en ser humano. No hubo evidencia de unión a proteína dependiente de la concentración en ninguna especie probada. Los resultados de los experimentos de reparto en sangre con respecto a plasma indican que RTA 408 tendió a contribuir principalmente a la fracción plasmática de la sangre de una manera lineal, con relaciones sangre:plasma <1,0 para todas las especies y todas las concentraciones probadas.

Se ha investigado la distribución de RTA 408 en tejidos después de la administración por vía oral a ratones, ratas y monos. En los estudios de toxicidad no GLP de 14 días, se recogieron tejidos seleccionados (hígado, pulmón y cerebro) en un único momento de tiempo (4 horas para rata y ratón; 24 horas para mono) después de que se administrara la dosis final del estudio y se analizaron para contenido de RTA 408 usando CL/EM/EM. RTA 408 se distribuye fácilmente en pulmón, hígado y cerebro. En pulmón, las concentraciones de RTA 408 a las 4 horas en ratones y ratas fueron similares o ligeramente más altas (<2 veces) que las concentraciones en plasma, mientras que a las 24 horas en monos, las concentraciones de RTA 408 en pulmón fueron 6 a 16 veces superiores a las concentraciones plasmáticas. Se observó un patrón similar para cerebro. A diferencia, las concentraciones de RTA 408 en el hígado fueron 5 a 17 veces superiores a en plasma para ratones y ratas a las 4 horas, y 2 a 5 veces superiores a en plasma a las 24 horas en monos.

Se evaluaron los efectos farmacodinámicos de RTA 408 en tejidos en ratones, ratas y monos, monitorizando la inducción de genes diana Nrf2 en los mismos tejidos recogidos para la exposición a fármaco a partir de los estudios de toxicidad de 14 días. La inducción de genes diana Nrf2 por RTA 408 produjo aumentos en la respuesta antioxidante como se manifestó por aumentos dependientes de la dosis en la actividad enzimática de NQO1, glutatión S-transferasa (Gst) y glutatión reductasa (Gsr) en los tejidos examinados. Además, en roedores, el contenido en hígado de RTA 408 se correlacionó con el nivel de actividad enzimática para NQO1, el gen diana prototípico para Nrf2. En monos, el nivel de expresión de ARNm en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) para tanto NQO1 como sulfirredoxina 1 (SRXN1) se correlacionó con la exposición a plasma de RTA 408 (FIGS. 34a y b). En general, RTA 408 indujo biomarcadores de Nrf2 en roedores y monos, y tales inducciones generalmente se correlacionaron bien con la exposición de tejido y plasma a RTA 408.

Cuando RTA 408 se administró a conejos mediante 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 más bajas de RTA 408 (FIG. 35).

c. Metabolismo

Se ha investigado el metabolismo de RTA 408 después de la incubación *in vitro* de RTA 408 durante 60 minutos con microsomas de hígado de ratones, ratas, monos y seres humanos en presencia de un sistema regenerador de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y una mezcla de reacción de uridina difosfato glucuronosiltransferasa (UGT). Se observó una amplia renovación de RTA 408 con microsomas de primate, quedando <10 % de la molécula original al final de la incubación de 60 minutos en tanto microsomas de mono como humanos. A diferencia, el grado de metabolismo fue más bajo en microsoma de roedor, quedando >65 % de la molécula original al final de la incubación. La ausencia de patrones auténticos disponibles para los diversos posibles metabolitos de RTA 408 excluyó 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, e incluyó picos con masas de acuerdo 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, siendo también observados todos los picos en las incubaciones de microsomas humanos en una o más de las especies preclínicas. En particular, basándose en los datos de microsomas *in vitro*, todos los metabolitos humanos estuvieron presentes en rata o mono, las especies seleccionadas de toxicidad de roedor y no roedor.

d. Interacciones farmacocinéticas de fármacos

Se evaluaron las posibilidades de RTA 408 para inhibir el metabolismo mediado por citocromo P450 (CYP450) usando microsomas de hígado humano reunidos y sustratos estándares para enzimas CYP450 específicas. RTA 408 inhibió directamente CYP2C8 y CYP3A4/5 con valores de K_i de aproximadamente 0,5 μM para cada enzima. No se observó inhibición significativa para las otras enzimas probadas (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 o CYP2D6), con inhibición <50 % a la concentración más alta probada (3 μM). Además, hubo poca o ninguna evidencia de inhibición dependiente del metabolismo de cualquiera de las enzimas probadas. Se pueden garantizar, basándose en estos datos, estudios futuros que investigarán las posibilidades de interacciones fármaco-fármaco mediadas por CYP3A4/5, y las concentraciones posiblemente altas que se pueden lograr localmente en el tubo gastrointestinal (GI) después de la administración por vía oral.

Se evaluaron las posibilidades de que RTA 408 indujera la expresión de la enzima CYP450 usando hepatocitos humanos cultivados. En condiciones donde inductores prototípicos causaron los aumentos esperados en la actividad de CYP, RTA 408 (hasta 3 μM) no fue un inductor de la actividad enzimática de CYP1A2, CYP2B6 o CYP3A4 en hepatocitos humanos cultivados.

F. Efectos de RTA 408 sobre la dermatitis por radiación aguda

Se han examinado los efectos de RTA 408 como preventivo tópico u oral para dermatitis por radiación aguda. Usando ratones BALB/c macho, se administró una dosis de radiación de 30 Gy en el Día 0 (Tabla 3). Se administró vehículo de aceite de sésamo o RTA 408 a las ratas en el Día -5 a -1 y los Días 1 a 30. RTA 408 se administró tanto por vía oral a 3, 10 y 30 mg/kg en aceite de sésamo como por vía tópica en porcentaje de composición del 0,01, 0,1 y 1 % en aceite de sésamo. La dermatitis se evaluó de forma cegada cada dos días desde el Día 4 hasta el 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 restantes ratones se sacrificaron en el Día 30 4 horas post-dosis. Se recogió el plasma en los Días 12 y 30, así como se irradiaron muestras de piel para examen de ARNm e histológico.

Tabla 3: Diseño del estudio para el modelo de dermatitis por radiación aguda

Grupo	Número de animales	Radiación (Día 0)	Tratamiento	Programa de tratamiento
1	9 machos	---	No tratados	---
2	10 machos	30 Gy	No tratados	---
3	14 machos	30 Gy	Control de vehículo (aceite de sésamo)	Día -5 a -1 y Día 1 a 30
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 prueba donde los ratones se trataron con RTA 408, la incidencia de dermatitis pareció ser de gravedad ligeramente reducida cuando RTA 408 se administró en tanto una administración por vía oral como una tópica (FIGS. 36-39). Además, las curvas que representan la puntuación clínica promedio de dermatitis para los grupos de prueba en función del tiempo muestran algún cambio con la administración de RTA 408 ya sea en forma oral o tópica de los grupos de prueba no tratados (FIGS. 40-42), particularmente en el caso en el que RTA 408 se administró mediante una administración por vía oral. Además, como puede apreciarse en las Tablas 4 y 5 a continuación, el porcentaje de ratones que padece dermatitis con una puntuación clínica por encima de 3 fue significativamente más bajo para ratones tratados con RTA 408 mediante una administración por vía oral, mientras que el porcentaje de ratones que padecen dermatitis con una puntuación clínica por encima de 2 fue ligeramente más bajo para los grupos de prueba que se administraron con una administración tópica de RTA 408.

10

15

Tabla 4 - Porcentaje de ratones por grupo de prueba que puntuaron por encima de 2 en su examen clínico de dermatitis 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	% de animal-días ≥ 2	% de animal-días ≥ 3
1	sin radiación, no tratados	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	irradiados, no tratados	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	irradiados, 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	irradiados, 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	irradiados, 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	irradiados, 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 puntuaron por encima de 3 en su examen clínico de dermatitis y administrados con un tratamiento oral que contiene RTA 408

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

G. Efectos de RTA 408 sobre la dermatitis por radiación fraccionada

- 5 Utilizando RTA 408 mediante administración tópica, se midieron los efectos de RTA 408 hacia la mejora de los efectos de la dermatitis por radiación fraccionada. Usando ratones Balb/c, se administró RTA 408 en una preparación tópica a los ratones diariamente desde el Día -5 hasta el Día 30 en tres dosis que variaron desde el 0,01 hasta el 1 %. Los ratones se irradiaron en los Días 0-2 y 5-7 con seis dosis de 10 Gy por día. Se evaluaron de forma cegada las puntuaciones clínicas de dermatitis para los ratones cada dos días desde el Día 4 hasta el final del estudio. En la FIG. 43, se representó en función del tiempo el gráfico que muestra el cambio en la puntuación clínica promedio para cada grupo. El gráfico muestra una mejora estadísticamente significativa en las puntuaciones para ratones tratados con del 0,1 al 1 % de formulaciones tópicas de RTA 408. Se pueden encontrar los parámetros del estudio y tratamiento en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones del estudio para la dermatitis inducida por radiación fraccionada

Grupo	Número de animales	Radiación (Días 0-2, 5-7)	Tratamiento	Programa de tratamiento
1	9 machos	---	No tratados	---
2	14 machos	6x 10 Gy	No tratados	---
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

- 15 Analizando las puntuaciones clínicas promedio que se mostraron en la FIG. 43, se realizó un análisis del área bajo la curva (ABC), que dio la gravedad de la dermatitis con respecto a cuánto tiempo persistió la dermatitis. Este análisis de ABC permitió la comparación directa entre los diferentes grupos de ratones y el efecto de los diferentes porcentajes de composición de RTA 408 (FIG 44 y Tabla 7). La administración de formulaciones tópicas de RTA 408 redujo las lesiones de grado 2 y grado 3 desde el 60 % y el 33 % cuando los ratones solo se expusieron al vehículo al 21 % y 6 % con RTA 408 al 1 % de concentración, respectivamente. La otra composición de RTA mostró cierta actividad, pero no fue tan significativa como la mostrada por la formulación al 1 %.

Tabla 7 - Porcentaje de puntuación de dermatitis para cada grupo de tratamiento

Grupo	% de días ≥ 2	% de días ≥ 3
Sin rad, sin tratamiento	0 %	0 %
Rad, sin tratamiento	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 de RTA 408 sobre un modelo de inflamación ocular

Se llevó a cabo un estudio de los efectos de RTA 408 sobre la inflamación ocular usando conejos de la cepa albina New Zealand. Los conejos se dividieron en 5 grupos de 12 conejos que se administraron con tres concentraciones diferentes de RTA 408 (0,01, 0,1 y 1 %), colirio Voltarene® al 0,1 % y vehículo (aceite de sésamo). Cada conejo se administró con tres instilaciones en el plazo de 60 minutos antes de la inducción de paracentesis y dos instilaciones en el plazo de 30 minutos después de la inducción de paracentesis. Cada instilación fue 50 μ l y se administró en ambos ojos. Se recogió el humor acuoso para 6 animales por momento de tiempo 30 minutos y otra vez 2 horas después de la inducción de paracentesis. La cantidad de inflamación se determinó por concentración de proteína en el humor acuoso. Como se muestra en la FIG. 45, RTA 408 mostró una reducción en la proteína del humor acuoso similar a la de la concentración más alta de cualquiera de los otros compuestos de referencia (MaxiDex o mapracorat) a solo el 0,01 % de RTA 408 en la formulación. Los efectos de la concentración creciente de RTA 408 parecieron ser despreciables, ya que pareció que todas las concentraciones de RTA 408 mostraron efectos relativamente similares dentro del error en la reducción de la concentración de proteína en el humor acuoso.

I. Polimorfos de RTA 408**Forma polimórfica A de RTA 408**

Ejemplo 1: Se disolvieron 17 g de RTA 408 en 68 g de acetona. Se añadieron 620 g de agua desionizada a un reactor encamisado de 500 ml y se enfrió hasta 2 °C. Cuando el agua estaba por debajo de 7 °C, se añadió la disolución de RTA 408 al reactor mediante un embudo de adición. Se formó una suspensión de sólidos. La suspensión se agitó en el reactor con purga de nitrógeno. Los sólidos se aislaron usando filtración a vacío y se secaron a vacío a temperatura ambiente dando la forma A.

Ejemplo 2: Se disolvieron 300 mg de RTA 408 en 1 ml de acetato de etilo. A la disolución transparente se añadieron 2 ml de heptano. La cristalización ocurrió en el plazo de 30 minutos. La suspensión se agitó durante la noche y los sólidos se aislaron por filtración a vacío y se secaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces, los sólidos se secaron en una estufa de vacío a 50 °C durante la noche dando la forma A.

El patrón de difracción de rayos X de polvo (PXRD) y el listado de picos con intensidades relativas se muestran en la Figura 53 y la Tabla 8, respectivamente. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis termogravimétrico con espectroscopía de masas (TGA-EM) se muestran en las Figuras 54 y 55, respectivamente.

La DSC de la forma A indicó una forma esencialmente libre de disolvente con un punto de fusión de 181,98 °C y entalpía de fusión de 42,01 J/g. El TGA-EM de la forma A muestra la pérdida de ~0,5 % de peso con trazas de H₂O entre 25 y 200 °C, predominantemente por encima de 160 °C, que indica que la forma polimórfica A de RTA 408 puede ser ligeramente higroscópica.

Tabla 8: Listado de picos de la forma A de RTA 408

Posición de picos ($^{\circ} 2\theta$)	Intensidad relativa
10,601	11,0
11,638	7,1
12,121	4,6
13,021	10,9

Posición de picos ($^{\circ} 2\theta$)	Intensidad relativa
13,435	100,0
15,418	12,7
15,760	5,9
17,830	19,7
18,753	38,3
19,671	7,5

Forma polimórfica B de RTA 408

5 **Ejemplo 3:** Se disolvió 1,0 g de RTA 408 en 1,5 ml de acetona. En un vial de centelleo, se calentaron 10 ml de agua desionizada a 50 °C y la disolución de RTA 408 se añadió al vial gota a gota. Tras la agitación durante 2 horas, se formó una suspensión de sólidos. La suspensión se enfrió entonces hasta temperatura ambiente. Los sólidos resultantes se aislaron por filtración y se secaron en una estufa de vacío a 50 °C durante la noche dando la forma B.

10 **Ejemplo 4:** Se disolvieron 2,9 g de RTA 408 en 20 ml de alcohol isopropílico a reflujo. Se añadieron 20 ml de heptano a la disolución a reflujo. La disolución se enfrió hasta temperatura ambiente y se mezcló durante 1 hora. Se formó una suspensión de sólidos. Los sólidos se aislaron por filtración a vacío y se secaron a vacío a temperatura ambiente dando la forma B.

El patrón de difracción de rayos X de polvo (PXRD) y el listado de picos con intensidades relativas se muestran en la Figura 56 y Tabla 9, respectivamente. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis termogravimétrico con espectroscopía de masas (TGA-EM) se muestran en las Figuras 57 y 58, respectivamente.

15 La DSC de la forma B indicó una forma esencialmente libre de disolvente con un punto de fusión de 250,10 °C y entalpía de fusión de 42,01 J/g. El TGA-EM de la forma B muestra la ligera pérdida de ~0,2 % en peso con trazas de H₂O entre 25 y 200 °C, que indica que la forma polimórfica B de RTA 408 puede ser muy ligeramente higroscópica.

Tabla 9: Listado de picos de la forma B de RTA 408

Posición de picos ($^{\circ} 2\theta$)	Intensidad relativa
7,552	4,2
10,339	100,0
11,159	48,4
12,107	80,7
14,729	35,2
15,329	11,4
15,857	8,4
16,824	11,3
17,994	10,9
18,344	4,1
19,444	10,4
19,764	10,2
20,801	5,7
22,414	10,1

J. Instrumental - Condiciones típicas de medición**Difractometría de rayos X de polvo (PXRD)**

Se recogieron datos de PXRD usando un difractómetro G3000 (Inel Corp., Artenay, Francia) equipado con un detector curvado sensible a la posición y óptica de haz paralelo. El difractómetro funcionó con un tubo anódico de cobre (foco fino de 1,5 kW) a 40 kV y 30 mA. Un monocromador de germanio de haz incidente proporcionó radiación monocromática. El difractómetro se calibró usando el haz directo atenuado a intervalos de un grado. La calibración se comprobó usando un patrón de referencia de posición de la línea de polvo de silicio (NIST 640c). El instrumento se controló por el ordenador usando el software Symphonix (Inel Corp., Artenay, Francia) y los datos se analizaron usando el software Jade (versión 9.0.4, Materials Data, Inc., Livermore, CA). La muestra se cargó sobre un portamuestras de aluminio y se niveló con un portaobjetos de vidrio.

Análisis termogravimétrico/espectrometría de masas

Se realizó TGA con TA instruments, los datos se recogieron en una balanza térmica (Q-5000, TA Instruments, New Castle, DE) equipada con un analizador de datos (Universal Analysis 2000, versión 4.5A, TA Instruments, New Castle, DE). Durante los experimentos, el horno se purgó con nitrógeno a 60 ml/minuto, mientras que la cámara de equilibrio se purgó a 40 ml/minuto. La temperatura del horno de TGA se calibró usando puntos de Curie de aluminio y níquel. El tamaño de muestra varió desde 2 hasta 20 mg, y se usó una velocidad de calentamiento de 10 °C/minuto.

Para TGA-EM, la parte del análisis termogravimétrico fue la misma que antes. Se analizó la masa de gas desprendido con PFEIFFER GSD 301 T3 ThermoStar (PFEIFFER Vacuum, Asslar, Alemania). Se operó el instrumento y los datos se evaluaron con Software Quadstar 32-bit (V7.01, Inficon, LI-9496 Balzers, Liechtenstein).

Calorimetría diferencial de barrido

Se usó un DSC (Q-2000, TA Instruments, New Castle, DE) equipado con el software Universal Analysis 2000 (Versión 4.5A, TA Instruments, New Castle, DE) para determinar los trazados térmicos de DSC. Se calibró el eje de temperatura con patrones de bifenilo, indio y estaño. Se calibró la constante de la celda con indio. A menos que se establezca de otro modo, la muestra (2-5 mg) se encapsuló en un platillo de aluminio ventilado y se calentó a una velocidad de 10 °C/minuto bajo un flujo de gas nitrógeno de 50 ml/minuto durante el estudio.

Abreviaturas**Métodos:**

ABC	análisis del área bajo la curva
DSC	calorimetría diferencial de barrido
RMN ¹ H	espectroscopía protónica de resonancia magnética nuclear
HPLC-EM	cromatografía de líquidos de alto rendimiento acoplada a espectroscopía de masas
CL/EM/EM	cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem
PXRD	difracción de rayos X de polvo
TGA-EM	análisis termogravimétrico acoplado a espectroscopía de masas

Genes, proteínas y parámetros biológicos:

AIM	modulador de inflamación antioxidante
ARE	elemento de respuesta antioxidante
ALP	fosfatasa alcalina
ALT	alanina transaminasa
ARE	elemento de respuesta
AST	aspartato transaminasa
ABC	área bajo la curva
BAL	lavado broncoalveolar
BALF	líquido de lavado broncoalveolar

	EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
	COX-2	ciclooxigenasa-2
	Cr	creatina
	CYP450	citocromo P450
5	Gclc	glutamato-cisteína ligasa, subunidad catalítica
	Gclm	glutamato-cisteína ligasa, subunidad modificadora
	Glu	glucosa
	GOT	glutámico-oxaloacético transaminasa
	GPT1	glutámico-piruvato transaminasa
10	GSH	glutatión
	GSR	glutatión reductasa
	GST	glutatión S-transferasa
	Gy	Gray
	H6PD	hexosa-6-fosfato deshidrogenasa
15	hERG	gen relacionado con ether-a-go-go humano
	HMOX1	hemo oxigenasa (desciclación) 1
	HO-1	hemo oxigenasa
	IFN γ	interferón-gamma
	IL	interleucina
20	iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
	I κ B α	factor nuclear del potenciador del gen de polipéptidos ligeros kappa en inhibidor de linfocitos B, alfa
	KC	proteína relacionada con IL-8 de ratón
	Keap1	proteína-1 asociada a ECH de tipo Kelch
25	LPS	lipopolisacárido
	ME1	enzima málica 1
	MPCE	eritrocitos policromáticos micronucleados
	Mrps	proteínas relacionadas con fármacos de multirresistencia
	NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, reducida
30	NF- κ B	factor nuclear del potenciador de la cadena ligera kappa de linfocitos B activados
	NO	óxido nítrico
	NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1
	Nrf2	2 similar a factor nuclear (derivado de eritroide)
	p-I κ B α	I κ B α fosforilado
35	CMSP	célula mononuclear de sangre periférica
	PCE	eritrocitos policromáticos
	PGD	fosfogluconato deshidrogenasa

	PMN	polimorfonuclear
	RANTES	expresada y secretada por linfocitos T regulados y normales
	SOD1	superóxido dismutasa 1
	SRXN1	sulfirredoxina-1
5	TG	glicéridos totales
	TKT	transcetolasa
	TNF α	factor de necrosis tumoral alfa
	TXNRD1	tiorredoxina reductasa 1

Diversos:

10	min	minuto(s)
	p.f.	punto de fusión
	Ph	fenilo
	T	temperatura
	% en peso	porcentaje en peso

15 **K. Tablas adicionales**

Tabla 10. Parámetros de la FIG. 46

Compuesto	Niveles de NOx (% frente a controles de LPS)		
	13 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
RTA 405*	44 %	26 %	18 %
63415	30 %	18 %	16 %

Tabla 11. 63415: ADMET *in vivo* primario - Ensayos y criterios de valoración primarios clave de ADMET

Ensayo	Criterios de valoración clave
Toxicidad en ratón de 14 días	Tolerabilidad, peso corporal, química clínica Distribución tisular Expresión de ARNm del gen diana Nrf2 y activación enzimática en hígado
Toxicidad en rata de 14 días	Tolerabilidad, peso corporal, química clínica e histopatología limitada Distribución tisular y TK en plasma Expresión de ARNm del gen diana Nrf2 y activación enzimática en hígado
Toxicidad en mono de 14 días	Tolerabilidad, peso corporal, química clínica e histopatología limitada Distribución tisular y TK en plasma Expresión de ARNm del gen diana Nrf2 y activación enzimática en múltiples tejidos y CMSP

Tabla 12. Parámetros de la FIG. 49

	Vehículo	63415		
	0	10	30	100
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 total (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 13. 63415 es negativo para genotoxicidad en el estudio de micronúcleo *in vivo*

Tratamiento (n=5/grupo)	PCE/Eritrocitos totales (Media +/- DE)	Cambio desde el control (%)	Número de MPCE/1000 PCE (Media +/- DE)	Número de MPCE/PCE puntuado
Momento de tiempo de 24 h				
Aceite de sésamo	0,588 ± 0,04	-	0,2 ± 0,27	2/10000
125 mg/kg	0,543 ± 0,03	-8	0,3 ± 0,27	3/10000
250 mg/kg	0,520 ± 0,06	-12	0,3 ± 0,27	3/10000
500 mg/kg	0,426 ± 0,07	-28	0,0 ± 0,00	0/10000
1000 mg/kg	0,498 ± 0,05	-15	0,2 ± 0,27	2/10000
1500 mg/kg	0,499 ± 0,06	-15	0,4 ± 0,22	4/10000
2000 mg/kg	0,531 ± 0,05	-10	0,2 ± 0,27	2/10000
Momento de tiempo de 48 h				
Aceite de sésamo	0,526 ± 0,05	-	0,3 ± 0,27	3/10000
125 mg/kg	0,453 ± 0,03	-14	0,2 ± 0,27	2/10000
250 mg/kg	0,391 ± 0,02	-26	0,2 ± 0,27	2/10000
500 mg/kg	0,339 ± 0,05	-36	0,3 ± 0,45	3/10000
1000 mg/kg	0,344 ± 0,04	-35	0,1 ± 0,22	1/10000
1500 mg/kg	0,376 ± 0,05	-39	0,4 ± 0,42	4/10000
2000 mg/kg	0,360 ± 0,03	-32	0,1 ± 0,22	1/10000

ES 2 683 626 T3

Tabla 14. Parámetros de la FIG. 32

Tratamiento	Día	ALT (U/l)	AST (U/l)	ALP (U/L)	Bil total (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	Prot total (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Glucosa (mg/dl)	Col (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 15. 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 16. Parámetros de la FIG. 47

Compuesto	Plasma	Sangre completa	Cerebro	Hígado	Pulmón	Riñón
RTA 405 (nM)	130	1165	93	1143	1631	2357
63415 (nM)	51	679	1081	985	533	1604

5

Tabla 17. Parámetros de la FIG. 48

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

REFERENCIAS

Se hace referencia a las siguientes referencias en el presente documento:

- Abraham y Kappas, Free Radical Biol. Med., 39:1-25, 2005.
- 10 Ahmad, et. al., Cancer Res., 68:2920-2926, 2008.
- Ahmad, et. al., J. Biol. Chem., 281:35764-9, 2006.
- Akiyama et al., Alzheimer Dis. Assoc. Disord., 14(1): S47-53, 35 2000.
- Angulo et al., Eur. J. Immunol., 30:1263-1271, 2000.
- Araujo, et. al., J. Immunol., 171(3):1572-1580, 2003.
- 15 Arend y Dayer, Arthritis Rheum., 38:151-160, 1995.
- Arend et al., Annu. Rev. Immunol., 16:27-55, 1998.
- Autenrieth et al., Infect. Immun., 62:2590-2599, 1994.
- Bach, Hum. Immunol., 67(6):430-432, 2006.
- Bagasra et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:12041-12045, 1995.
- 20 Ball, Ann. Rheum. Dis., 30:213-223, 1971.
- Beal, Curr. Opin. Neurobiol., 6:661-666, 1996.
- Blumberg et al., Arthritis Rheum., 7:93-97, 1964.
- Botoman et al., Am. Fam. Physician, 57(1):57-68, 1998.
- Brandt et al., Arthritis Rheum., 43:1346-1352, 2000.
- 25 Braun et al., Arthritis Rheum., 42:2039-2044, 1999.
- Brewerton et al., Lancet., 1:904-907, 1973a.

- 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.
- 5 Burger y Dayer, *Neurology*, 45(6S-6):\$39-43, 1995.
- Cai et al., *Nat. Med.*, 11(2):183-190, 2005.
- Calin y Taurog, In: *The Spondylarthritides*, Calin et al. (Eds.), Oxford, UK. Oxford University Press, 179, 1998.
- Cann et al., *Gut.*, 24(12): 1135-1140, 1983.
- Chauhan y Chauhan, *Pathophysiology*, 13(3):171-181. 2006.
- 10 Chomarar et al., *ArthritisRheum.*, 38:1046-1054, 1995. 65.
- Coyle y Puttfarcken, *Science*, 262:689-695, 1993.
- Crowell et al., *Mol. Cancer. Ther.*, 2:815-823, 2003.
- Dickerson, et. al., *Prog NeuropsychopharmacolBiol. Psychiatry*, March 6, 2007.
- de Waal et al., *J. Exp. Med.*, 174:1209-1220, 1991.
- 15 Dinarello, *Int. Rev. Immunol.*, 16:457-499, 1998.
- 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.
- Doran et al., *J. Rheumatol.*, 30(2):316-320, 2003.
- Drossman et al., *Dig. Dis. Sci.*, 38(9):1569-1580, 1993.
- 20 Drossman et al., *Gastroenterol.*, 112(6):2120-2137, 1997.
- Dudhgaonkar, et al., *Eur. J. Pain*, 10(7):573-9, 2006.
- Eastgate, et al., *Lancet*, 2(8613): 706-9, 1988.
- Eikelenboom et al., *Glia*, 40(2):232-239, 2002.
- Ettehadi et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 96(1):146-151, 1994.
- 25 Everhart et al., *Gastroenterol.*, 100(4):998-1005, 1991.
- Fearon y Locksley, *Science*, 272(5258):50-53, 1996.
- Feldtkeller et al., *Rheumatol. Int.*, 23(2):61-66, 2003.
- Firestein et al., *Arthritis Rheum.*, 37:644-652, 1994.
- Forstermann, *Biol. Chem.*, 387:1521, 2006.
- 30 Fujikawa et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 54:318-320, 1995.
- Funakoshi et al., *Digestion*, 59(1):73-78, 1998.
- Galley y Webster, *Br. J. Anaesth.*, 77:11-16, 1996.
- Gehrmann et al., *Glia*, 15(2):141-151, 1995.
- Genain y Nauser, *J. Mol. Med.*, 75:187-197, 1997.
- 35 Gladman et al., *Br. J. Rheumatol.*, 22:675-679, 1995.
- Gladman et al., *J. Med.*, 62:127-141, 1987.
- Gladman, *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 18:247-256, 1992.

- Goodman et al., *Kidney Int.*, 72(8):945-953, 2007.
- Graeber et al., *Glia*, 40(2):252-259, 2002.
- Greten et al., *Cell*, 118:285-296, 2004.
- Griffin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(19):7611-7615, 1989.
- 5 Guilherme et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 9(5):367-77, 2008.
- Gwee et al., *Gut*, 44(3):400-406, 1999.
- Hahn y Tsao, en: *Dubois' Lupus Erythematosus*, 4^a Ed, Wallace and Hahn (Eds.), Lea and Febiger, Philadelphia, 195-201, 1993.
- 10 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use, Stahl and Wermuth Eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002.
- Hannum et al., *Nature*, 343:336-340, 1990.
- Hanson et al., *BMC Medical Genetics*, 6(7), 2005.
- Hansson et al., *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1:297-329, 2006.
- Harrison et al., *J. Rheumatol.*, 25(12):2324-2330, 1998.
- 15 Hart et al., *Immunology*, 84:536-542, 1995.
- Honda, et. al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12:1027-1030, 2002.
- Honda, et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7:1623-1628, 1997.
- Honda, et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8(19):2711-2714, 1998.
- Honda, et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9(24):3429-3434, 1999.
- 20 Honda, et. al., *J. Med. Chem.*, 43:4233-4246, 2000a.
- Honda, et. al., *J. Med. Chem.*, 43:1866-1877, 2000b.
- Horwitz y Fisher, *N. Engl. J. Med.*, 344(24):1846-1850, 2001.
- Hotamisligil, *Nature*, 444(7121):860-7, 2006.
- Ishikawa et al., *Circulation*, 104(15): 1831 - 1836, 2001.
- 25 Ishizawa y Dickson, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60(6): 647-657, 2001.
- Jacob et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1233-1237, 1990.
- Jailwala et al., *Ann. Intern. Med.*, 133(2):136-147, 2000.
- Jarvis, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 10(5):459-467, 1998.
- Jarvis, *Pediatr. Ann.*, 31(7):437-446, 2002.
- 30 Jones et al., *Br. J. Rheumatol.*, 33(9):834-839, 1994.
- Jonsson et al., *Br. J. Rheumatol.*, 32(7):578-581 1993.
- 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.
- 35 Kaltschmidt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2642-2647, 1997.
- Kawakami et al., *Brain Dev.*, 28(4):243-246, 2006.
- Kellow y Phillips, *Gastroenterol.*, 92(6): 1885-1893, 1987.

- Kendall-Tackett, *Trauma Violence Abuse*, 8(2):117-126, 2007.
- Khan et al., *J. Neurochem.*, 71:78-87, 1998.
- Khan et al., *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 103:482-490, 1990.
- Kortylewski et al., *Nat. Med.*, 11:1314-1321, 2005.
- 5 Kotake et al., *Infect. Immun.*, 67:2682-2686, 1999.
- Kotzin y O'Dell, en: *Sampler's Immunologic Diseases*, 5th 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.
- 10 Kuboyama, *Kurume Med. J.*, 45(1):33-37, 1998.
- Lahesmaa et al., *J. Immunol.*, 148:3079-3085, 1992.
- Lee, et. al., *Glia.*, 55(7):712-22, 2007.
- Lencz, et. al., *Mol. Psychiatry*, 12(6):572-80, 2007.
- Liby, et. al., *Cancer Res.*, 65(11):4789-4798, 2005.
- 15 Liby, et. al., *Nat. Rev. Cancer*, 7(5):357-356, 2007.
- Lipsky, en: *Harrison 's Principles of Internal Medicine*, Fauci et al. (Eds.), 14th Ed., NY, McGraw-Hill, 1880-1888, 1998.
- Liu, et. al., *FASEB J.*, 20(2):207-216, 2006.
- Lo et al., *Curr. Dir. Autoimmun.*, 1:226-246, 1999.
- 20 Lugerling et al., *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 30(3):338-344, 1998.
- Lynn y Friedman, *N. Engl. J. Med.*, 329(26):1940-1945, 1993.
- Macatonia et al., *J. Immunol.*, 150:3755-3765, 1993.
- March's *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 2007.
- Marsal et al., *Rheumatology*, 38:332-337, 1999.
- 25 Mazur et al., *Cell Microbiol.*, 9(7): 1683-94, 2007.
- Mazzoni et al., *J. Immunol.*, 168:689-695, 2002.
- 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.
- 30 McGonagle et al., *Arthritis Rheum.*, 41 : 694-700, 1998.
- McGonagle et al., *Curr. Opin. Rheumatol.*, 11:244-250, 1999.
- McIver 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.
- 35 Mertz et al., *Gastroenterol.*, 118(5):842-848, 2000.
- Moll y Wright, *Ann. Rheum. Dis.*, 32:181-201, 1973.
- Moll y Wright, *Semin. Arthritis Rheum.*, 3:55-78, 1973.

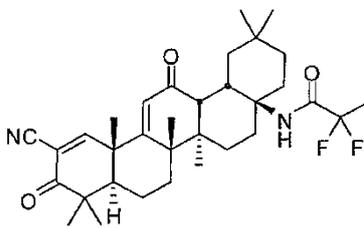
- Mclver, et. al., Pain, 120(1-2):161-9, 2005.
- Morris, et. al., J. Mol. Med., 80(2):96-104, 2002.
- Morse y Choi, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 172(6):660-670, 2005.
- Morse y Choi, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 27(1):8-16, 2002.
- 5 Nath et al., Neurology, 66(1):149-150, 2006.
- Neal et al., BMJ., 314(7083):779-782, 1997.
- Nichols, Drug News Perspect., 17(2):99-104, 2004.
- Nielen et al., Arthritis Rheum., 50(2):380-386, 2004.
- Ohnishi et al., Int. Immunol., 6:817-830, 1994.
- 10 Pall, Med. Hypoth., 69:821-825, 2007.
- Partsch et al., Br. J. Rheumatol., 24:518-523, 1997.
- Pica et al., AntimicrobAgents Chemother., 44(1):200-4, 2000.
- Pergola, et. al., N Engl J Med 365:327-336, 2011.
- Pimentel et al., Am. J. Gastroenterol., 95(12):3503-3506, 2000.
- 15 Prieur et al., Lancet., 2:1240-1242, 1987.
- Place, et. al., Clin. Cancer Res., 9(7):2798-806, 2003.
- Rajakariar, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(52):20979-84, 2007.
- Rantapaa-Dahlqvist et al., Arthritis Rheum., 48(10):2741-2749, 2003.
- Reimund et al., Eur. J. Clin. Invest., 28(2):145-150, 1998.
- 20 Ribbens et al., Eur. Cytokine Netw., 11:669-676, 2000.
- Rogers et al., Neurobiol Aging, 9(4):339-349, 1988.
- Rogler y Andus, WorldJ. Surg., 22(4):382-389, 1998.
- Rooney et al., RheumatolInt., 10:217-219, 1990.
- Ross, et. al., Am. J. Clin. Pathol., 120(Suppl):S53-71, 2003.
- 25 Ross, et. al., Expert Rev. Mol. Diagn., 3(5):573-585, 2003.
- Rostom et al., Ann. Intern. Med., 146, 376-389, 2007.
- Rothstein, Med. Clin. North Am., 84(5):1247-1257, 2000.
- Ruster, et. al., Scand. J. Rheumatol., 34(6):460-3, 2005.
- Sacerdoti, et. al., Curr Neurovasc Res. 2(2):103-111, 2005.
- 30 Saha, et. al., J Biol Chem 285:40581-92, 2010.
- Saiki et al., Scand. J. Gastroenterol., 33(6):616-622, 1998.
- Salomonsson y Jonsson, Arthritis Rheum., 48(11):3187-3201, 2003.
- Salomonsson et al., Scand. J. Immunol., 55(4):336-342, 2002.
- Salvarani et al., Curr. Opin. Rheumatol. 1998; 10:299-305, 25 1998.
- 35 Salvemini et al., J. Clin. Invest., 93:1940-1947, 1994.
- Sandler, Gastroenterol., 99(2):409-415, 1990.
- 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.
- Schlaak et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, 14:155-162, 1996.
- Schlaak et al., *Eur. J. Immunol.*, 22:2771-2776, 1992.
- 5 Schlosstein et al., *NE J. Medicine*, 288:704-706, 1973.
- Schreiber, *Neth. J. Med.*, 53(6):S24-31, 1998.
- Schulz et al., *Antioxid. Redox. Sig.*, 10:115, 2008.
- Shishodia, et. al., *Clin Cancer Res* 12:1828-38, 2006.
- Sieper y Braun, *Arthritis Rheum.*, 38:1547-1554, 1995.
- 10 Simon et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 94:122-126, 1993.
- Simon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:8562-8566, 40 1994.
- Simonian y Coyle, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36:83-106, 1996.
- Sinha et al., *CancerRes.*, 67:4507-4513, 2007.
- Stack et al., *Lancet*, 349(9051):521-524, 1997.
- 15 Stewart et al., *Neurology*, 48:626-632, 1997.
- Strejan, et. al., *J. Neuroimmunol.*, 7:27, 1984.
- Suh, et. al., *Cancer Res.*, 58:717-723, 1998.
- Suh, et. al., *Cancer Res.*, 59(2):336-341, 1999.
- Szabo, et. al., *Nature Rev. Drug Disc.*, 6:662-680, 2007.
- 20 Takahashi, et. al., *Cancer Res.*, 57:1233-1237, 1997.
- Talley et al., *Gastroenterol.*, 109(6):1736-1741, 1995.
- Tamir y Tannenbaum, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1288:F31-F36, 1996.
- Targan et al., *N. Engl. J. Med.*, 337(15):1029-1035, 1997.
- Touzani et al., *J. Neuroimmunol.*, 100(1-2):203-215, 1999.
- 25 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.
- Vazquez et al., *J. Virol.*, 79(7):4479-91, 2005.
- 30 Vodovotz et al., en; *Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV*, 1996.
- Wardle, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16(9):1764-8, 2001.
- Warrington et al., *Arthritis and Rheumatism*, 44:13-20, 2001.
- Weyand y Goronzy, *Ann. NY Acad. Sci.*, 987:140-149, 2003.
- Whitehead et al., *Gastroenterol.*, 98(5 Pt 1):1187-1192, 1990.
- 35 Williams et al., *Clin. Neurosci.*, 2(3-4):229-245, 1994.
- Wordsworth, en: *Genes and Arthritis, Brit. Medical Bulletin*, 51:249-266, 1995.
- Wright, *Ann. Rheum. Dis.*, 15:348-356, 1956.

- Wright, Clin. Orthop. Related Res., 143:8-14, 1979.
- Xanthou et al., Arthritis Rheum., 44(2):408-418, 2001.
- Yin et al., Arthritis Rheum., 40:1788-1797, 1997.
- Yin et al., Rheumatology, 38:1058-1067, 1999.
- 5 Yoh et al., Kidney Int., 60(4): 1343-1353,2001.
- Yore, et. al., Mol Cancer Ther 5:3232-9, 2006.
- Yu et al., Nat. Rev. Immunol., 7:41-51, 2007.
- Zhou et al., Am. J. Pathol., 166(1):27-37, 2005.
- Zhou et al., Cancer Sci., 98:882-889, 2007.
- 10 Zingarelli et al., J. Immunol., 171(12):6827-6837, 2003.

REIVINDICACIONES

1. Una forma polimórfica de un compuesto que tiene la fórmula:



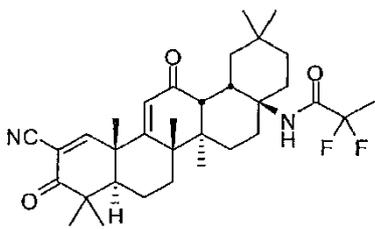
5 en la que la forma polimórfica es cristalina, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo (CuK α) que comprende picos en aproximadamente 10,601, 11,638, 12,121, 13,021, 13,435, 15,418, 15,760, 17,830, 18,753 y 19,671° 2 θ , en la que el término "aproximadamente" significa +/- 0,2° 2 θ .

2. La forma polimórfica de la reivindicación 1, en la que el patrón de difracción de rayos X de polvo (CuK α) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 53.

10 3. La forma polimórfica de la reivindicación 1, en la que el punto de fusión es aproximadamente 181,98 °C, en la que el término "aproximadamente" significa +/-10°C.

4. La forma polimórfica de la reivindicación 1, que tiene una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) sustancialmente como se muestra en la FIG. 54.

5. Una forma polimórfica de un compuesto que tiene la fórmula:



15 en la que la forma polimórfica es cristalina, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo (CuK α) que comprende picos en aproximadamente 7,552, 10,339, 11,159, 12,107, 14,729, 15,329, 15,857, 16,824, 17,994, 18,344, 19,444, 19,764, 20,801 y 22,414° 2 θ , en la que el término "aproximadamente" significa +/- 0,2° 2 θ .

6. La forma polimórfica de la reivindicación 5, en la que el patrón de difracción de rayos X de polvo (CuK α) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 56.

20 7. La forma polimórfica de la reivindicación 5, en la que el punto de fusión es aproximadamente 250,10 °C, en la que el término "aproximadamente" significa +/-10°C.

8. La forma polimórfica de la reivindicación 5, que tiene una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) sustancialmente como se muestra en la FIG. 57.

9. Una composición farmacéutica que comprende:

25 un principio activo que comprende una forma polimórfica de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y

un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la composición farmacéutica se formula para administración: por vía oral, intradiposa, intrarterial, intrarticular, intracraneal, intradérmica, intralesional, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleurales, intraprostática, intrarrectal, intratecal, intratraqueal, intratumoral, intraumbilical, intravaginal, intravenosa, intravesicular, intravítrea, liposomal, local, mucosa, parenteral, rectal, subconjuntiva, subcutánea, sublingual, tópica, transbucal, transdérmica, vaginal, en cremas, en composiciones de lípido, mediante un catéter, mediante un lavado, mediante infusión continua, mediante infusión, mediante inhalación, mediante inyección, mediante administración local, o mediante perfusión localizada.

35 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la composición farmacéutica se formula para administración oral, intrarterial, intravenosa o tópica.

12. La composición farmacéutica según cualquiera de la reivindicación 10 u 11, en la que la composición farmacéutica se formula para administración por vía oral.
13. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en la que la composición farmacéutica se formula como una cápsula dura o blanda, un comprimido, un jarabe, una suspensión, una dispersión sólida, una oblea, o un elixir.
14. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, que comprende además un agente que potencia la solubilidad y dispersabilidad.
15. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en la que el compuesto o forma polimórfica se suspende en aceite de sésamo.
16. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 o 13-15, en la que la composición farmacéutica se formula para administración tópica.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que la composición farmacéutica se formula como una loción, una crema, un gel, un aceite, una pomada, un bálsamo o una suspensión.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en la que la composición farmacéutica se formula como una loción.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en la que la composición farmacéutica se formula como una crema.
20. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en la que la composición farmacéutica se formula como un gel.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la cantidad del principio activo es desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 5 % en peso.
22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en la que la cantidad del principio activo es desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 3 % en peso.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, en la que la cantidad del principio activo es aproximadamente el 0,01 % en peso.
24. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, en la que la cantidad del principio activo es aproximadamente el 0,1 % en peso.
25. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, en la que la cantidad del principio activo es aproximadamente el 1 % en peso.
26. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, en la que la cantidad del principio activo es aproximadamente el 3 % en peso.
27. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 26 para su uso en un método de tratamiento o prevención de una afección asociada con inflamación o estrés oxidativo en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 26.
28. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 27, en la que la afección está asociada con inflamación.
29. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 27, en la que la afección está asociada con estrés oxidativo.
30. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27-29, en la que la afección es una enfermedad o trastorno de la piel, septicemia, dermatitis, osteoartritis, cáncer, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria del intestino, una complicación de exposición localizada o de cuerpo entero a radiación ionizante, mucositis, insuficiencia orgánica aguda o crónica, enfermedad del hígado, pancreatitis, un trastorno ocular, una enfermedad pulmonar, o diabetes.
31. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 30, en la que la afección es una enfermedad o trastorno de la piel.
32. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 31, en la que la enfermedad o trastorno de la piel es dermatitis, una quemadura térmica o química, una herida crónica, acné, alopecia, otros trastornos del folículo piloso, epidermolísis bullosa, quemadura solar, complicaciones de la quemadura solar, un trastorno de la pigmentación de la piel, una afección de la piel relacionada con el envejecimiento, una herida posquirúrgica, una

cicatriz de una lesión de la piel o quemadura, psoriasis, una manifestación dermatológica de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad injerto contra huésped, cáncer de piel, un trastorno que implica hiperproliferación de las células de la piel.

- 5 33. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 32, en la que la enfermedad o trastorno de la piel es dermatitis.
34. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 33, en la que la dermatitis es dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis debida a exposición química, o dermatitis inducida por radiación.
35. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 33, en la que la enfermedad o trastorno de la piel es una herida crónica.
- 10 36. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 35, en la que la herida crónica es una úlcera diabética, una úlcera de presión, o una úlcera venosa.
37. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 32, en la que la enfermedad o trastorno de la piel es alopecia.
- 15 38. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 37, en la que la alopecia se selecciona de calvicie y alopecia inducida por fármacos.
39. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 32, en la que la enfermedad o trastorno de la piel es un trastorno de la pigmentación de la piel.
40. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 39, en la que el trastorno de la pigmentación de la piel es vitiligo.
- 20 41. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 32, en la que la enfermedad o trastorno de la piel es un trastorno que implica hiperproliferación de las células de la piel.
42. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 41, en la que el trastorno que implica hiperproliferación de las células de la piel es hiperqueratosis.
- 25 43. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 30, en la que la afección es una enfermedad autoinmunitaria.
44. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 43, en la que la afección es artritis reumatoide, lupus, enfermedad de Crohn o psoriasis.
45. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 30, en la que la afección es enfermedad del hígado.
- 30 46. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 45, en la que el enfermedad del hígado es enfermedad del hígado graso o hepatitis.
47. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 30, en la que la afección es un trastorno ocular.
- 35 48. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 45, en la que el trastorno ocular es uveítis, degeneración macular, glaucoma, edema macular diabético, blefaritis, retinopatía diabética, una enfermedad o trastorno del endotelio de la córnea, inflamación posquirúrgica, ojo seco, conjuntivitis alérgica, o una forma de conjuntivitis.
49. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 48, en la que el trastorno ocular es degeneración macular.
50. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 49, en la que la degeneración macular es la forma seca.
- 40 51. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 49, en la que la degeneración macular es la forma húmeda.
52. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 48, en la que la enfermedad o trastorno del endotelio de la córnea es distrofia corneal endotelial de Fuchs.
- 45 53. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 30, en la que la afección es una enfermedad pulmonar.
54. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 53, en la que la enfermedad pulmonar es inflamación pulmonar, fibrosis pulmonar, EPOC, asma, fibrosis quística o fibrosis pulmonar idiopática.

55. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 54, en la que la enfermedad pulmonar es inflamación pulmonar.
56. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 54, en la que la enfermedad pulmonar es fibrosis pulmonar.
- 5 57. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 54, en la que la enfermedad pulmonar es EPOC.
58. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 57, en la que la EPOC se induce por humo de cigarro.
59. La composición farmacéutica para su uso método de la reivindicación 54, en la que la enfermedad pulmonar es asma.
- 10 60. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 30, en la que la afección es septicemia.
61. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 30, en la que la afección es mucositis resultante de radioterapia o quimioterapia.
62. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 61, en la que la mucositis se presenta por vía oral.
- 15 63. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 30, en la que la afección está asociada con exposición a radiación.
64. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 63, en la que la exposición a radiación conduce a dermatitis.
65. La composición farmacéutica para su uso método según una cualquiera de las reivindicaciones 63-64, en la que la exposición a radiación es aguda.
- 20 66. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 63-64, en la que la exposición a radiación es fraccionada.
67. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27-66, en la que la composición farmacéutica se administra en una dosis única por día.
- 25 68. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27-66, en la que la composición farmacéutica se administra en más de una dosis por día.
69. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27-68, en la que el principio activo se administra en una dosis desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 2000 mg/kg.
70. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 69, en la que la dosis es desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg.
- 30 71. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 70, en la que la dosis es aproximadamente 3 mg/kg.
72. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 70, en la que la dosis es aproximadamente 10 mg/kg.
- 35 73. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 70, en la que la dosis es aproximadamente 30 mg/kg.
74. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 70, en la que la dosis es aproximadamente 100 mg/kg.
75. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27-66, en la que la composición farmacéutica se administra por vía tópica.
- 40 76. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 75, en la que la administración tópica se administra a la piel.
77. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 75, en la que la administración tópica se administra al ojo.
- 45 78. La composición farmacéutica para su uso método según una cualquiera de las reivindicaciones 27-66, en la que la composición farmacéutica se administra por vía oral.

79. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27-66, en la que la composición farmacéutica se administra por vía intraocular.

80. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27-79, en la que el paciente es un ser humano.

5 81. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27-79, en la que el paciente es un animal no humano.

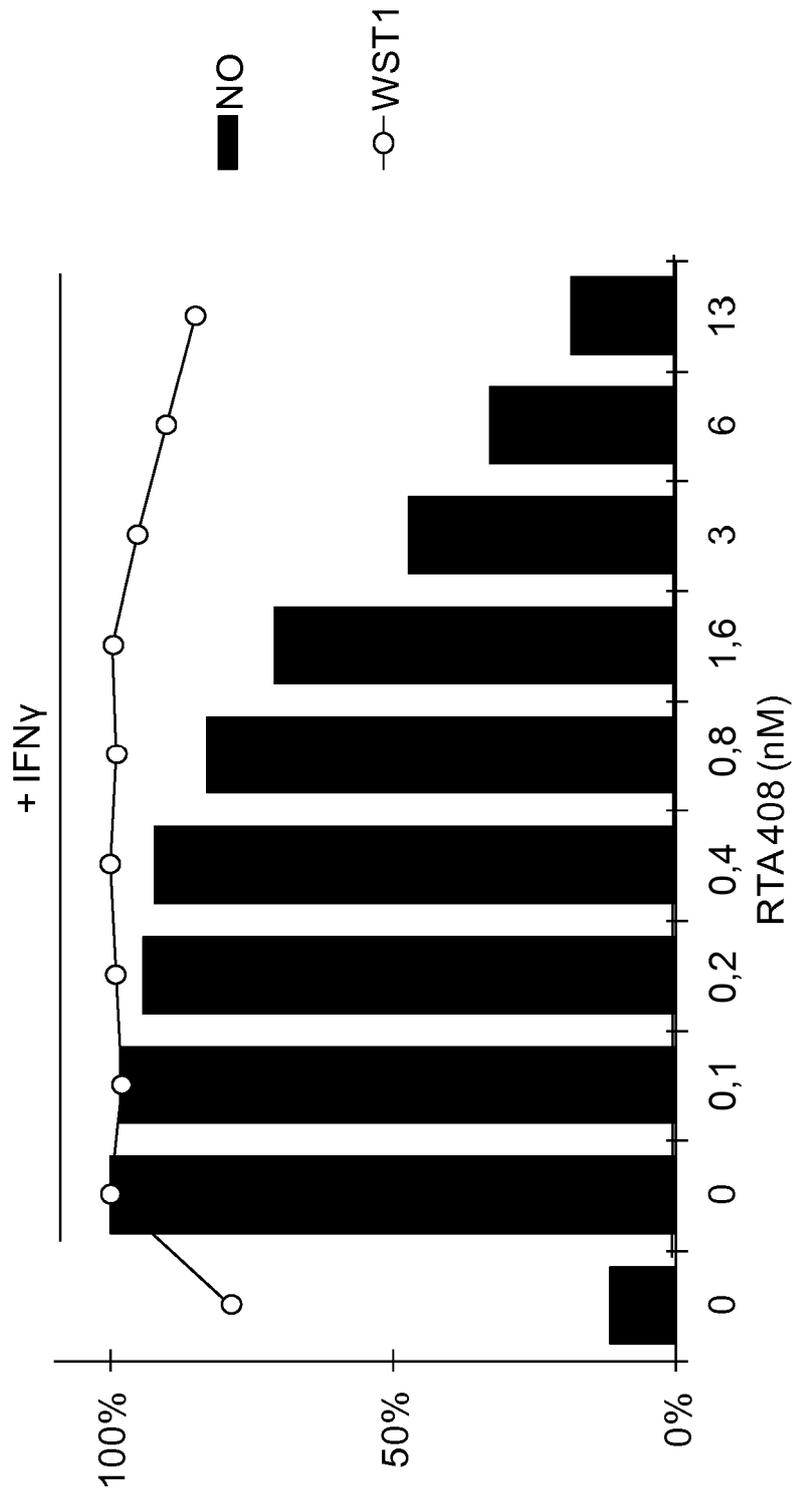
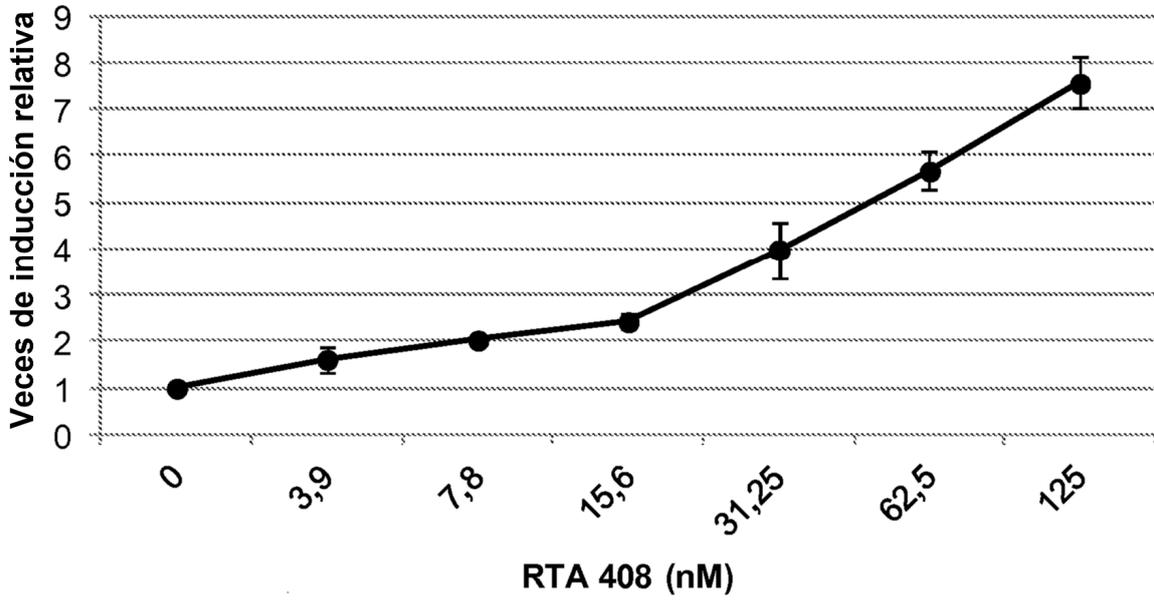


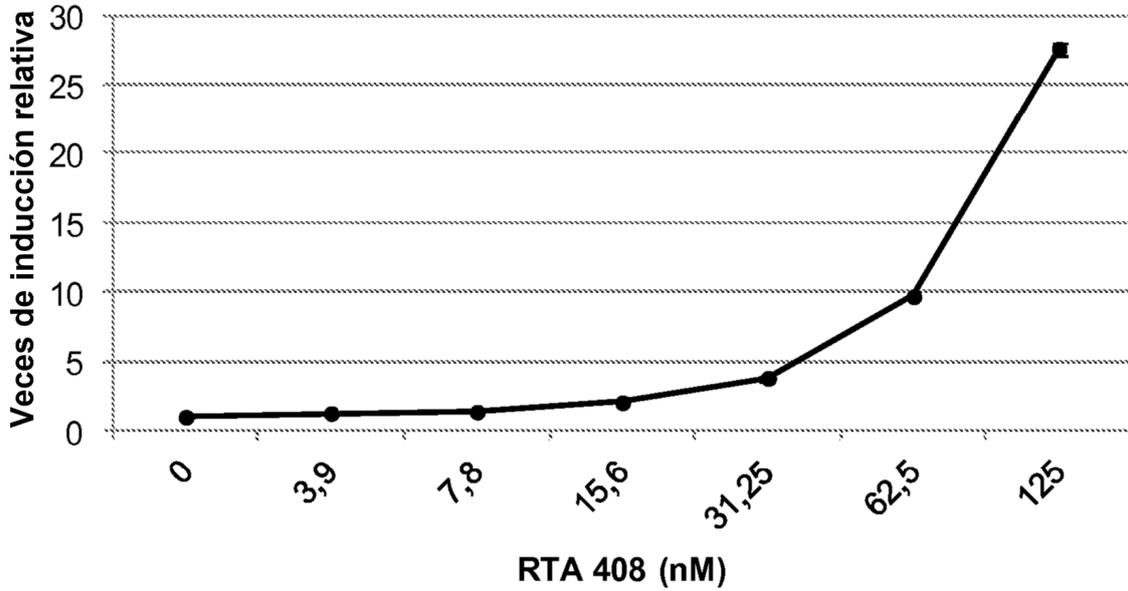
FIG. 1

Actividad de luciferasa NQO1-ARE



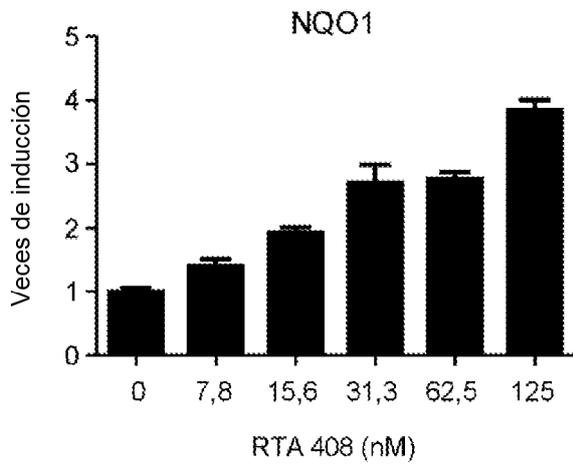
(a)

Actividad de luciferasa GSTA2-ARE

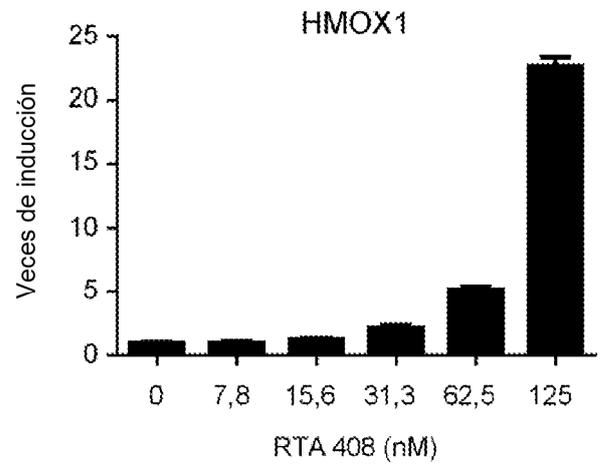


(b)

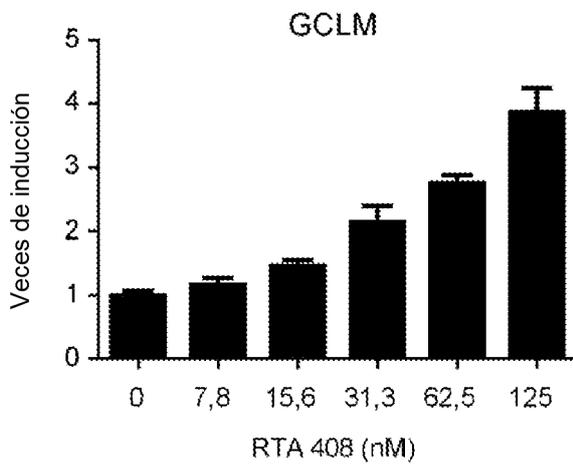
FIGS. 2a y b



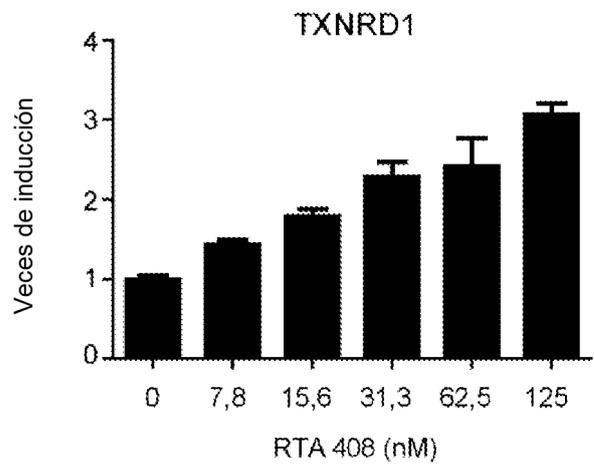
(a)



(b)

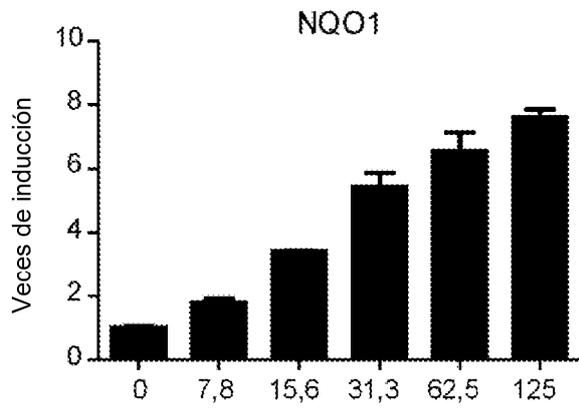


(c)

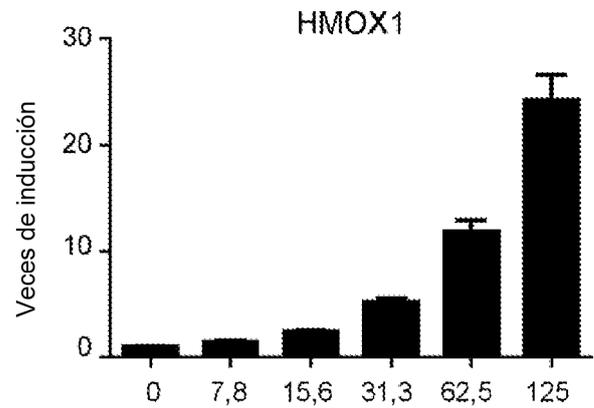


(d)

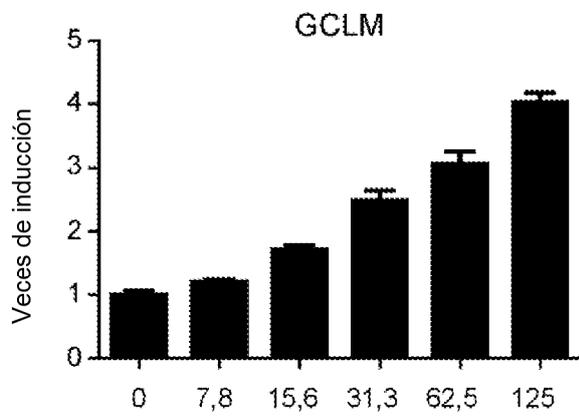
FIGS. 3a – d



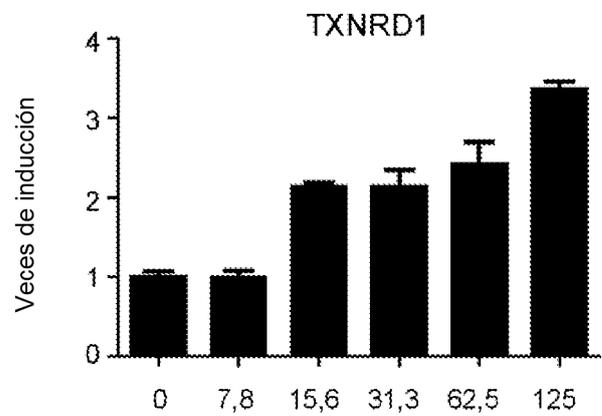
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGS. 4a – d

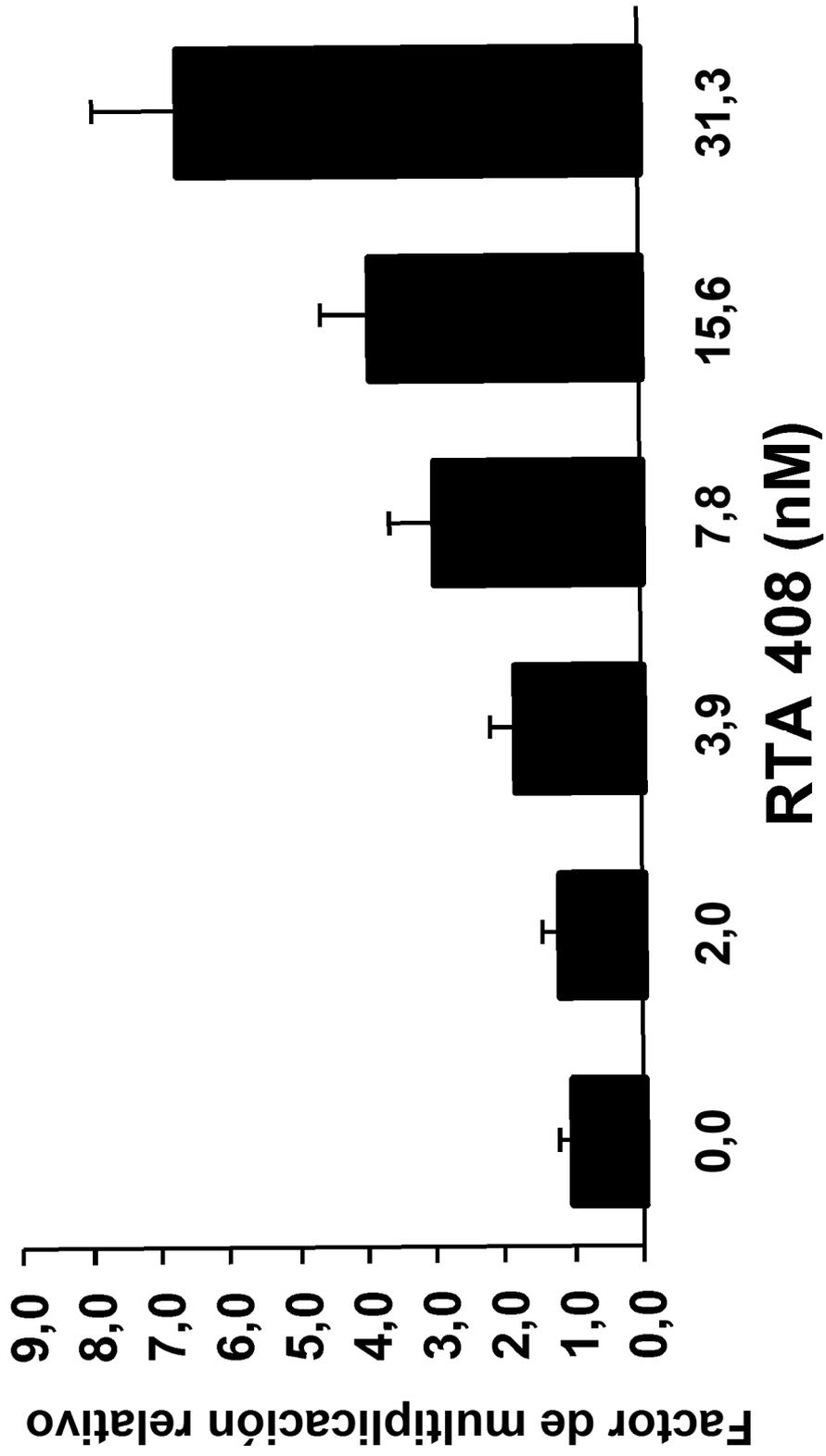


FIG. 6

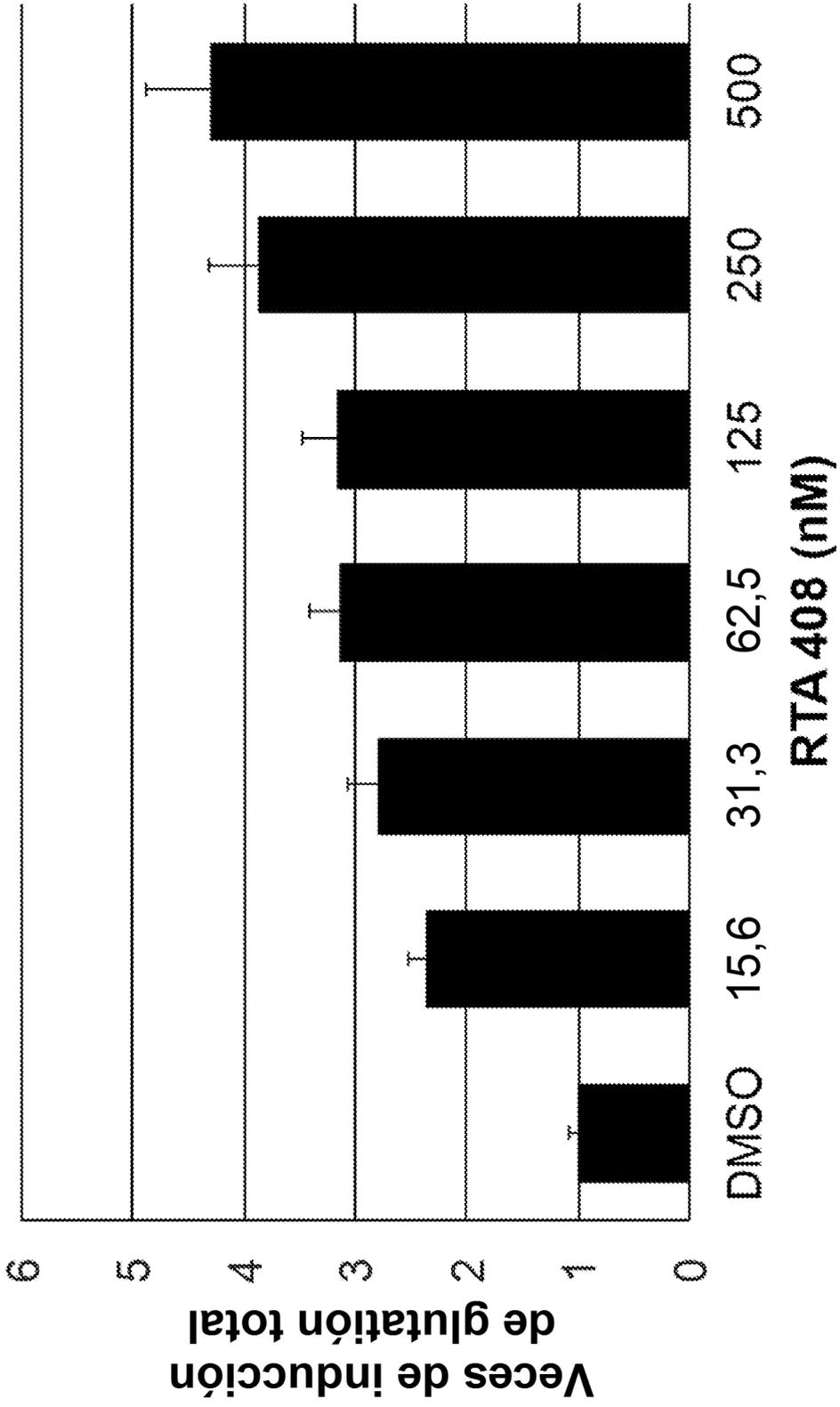


FIG. 7

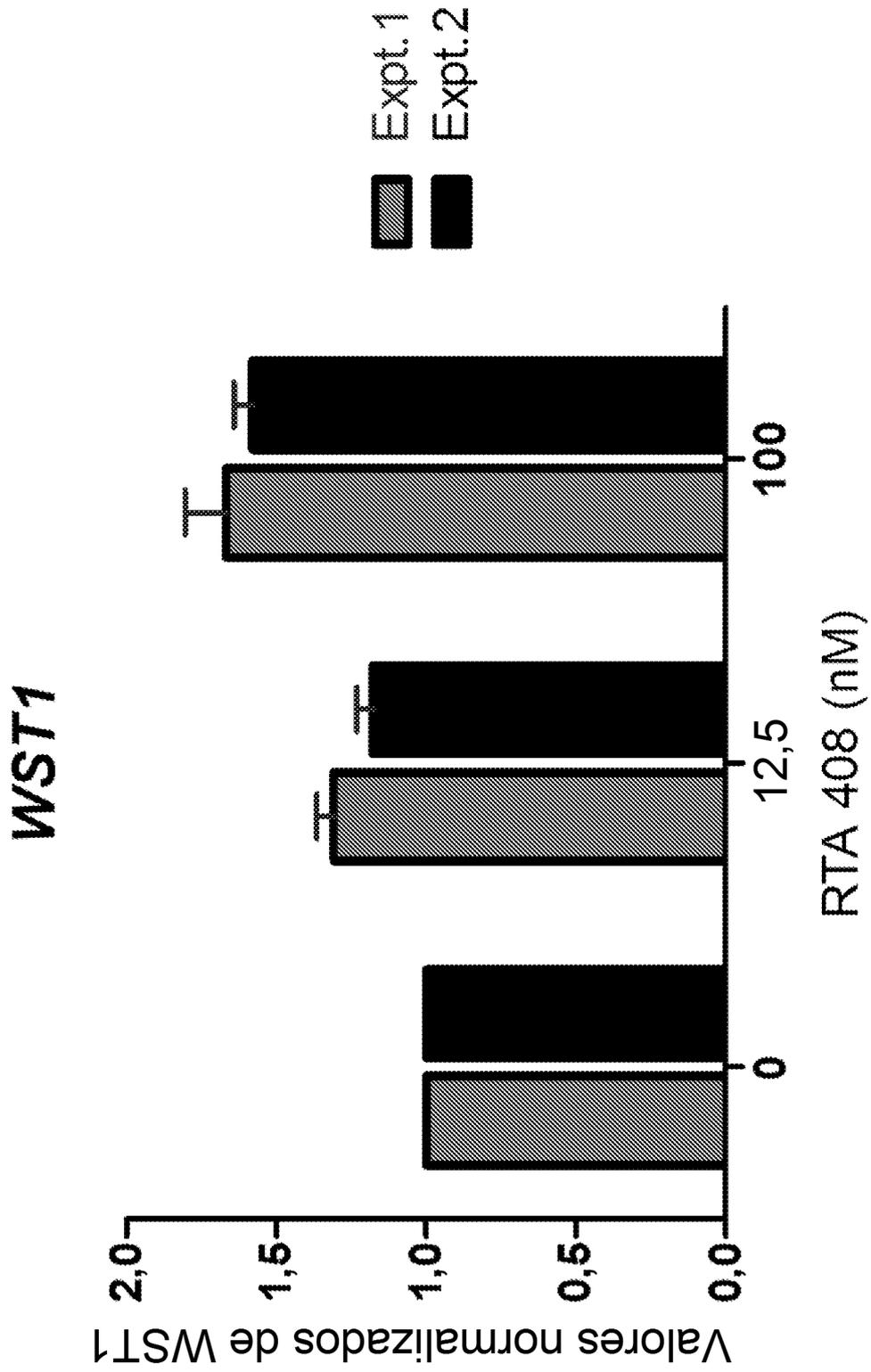
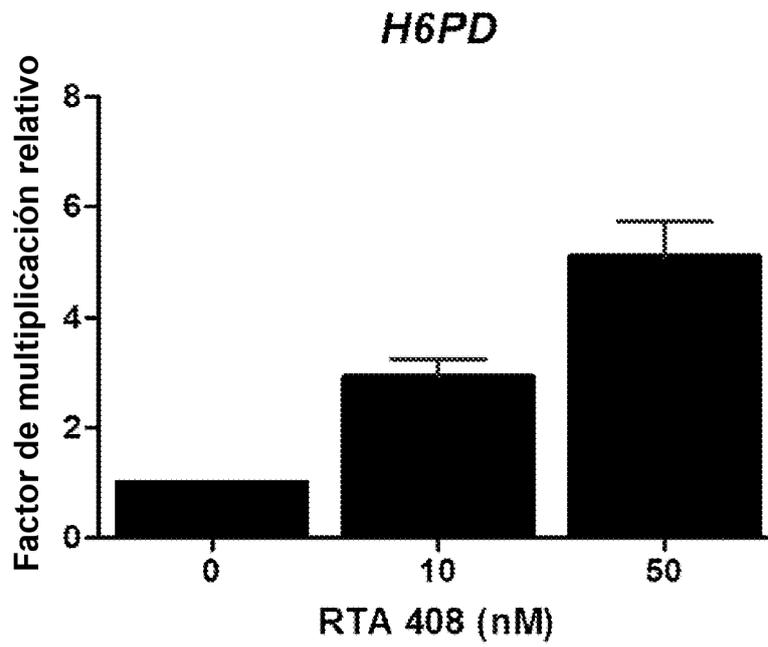
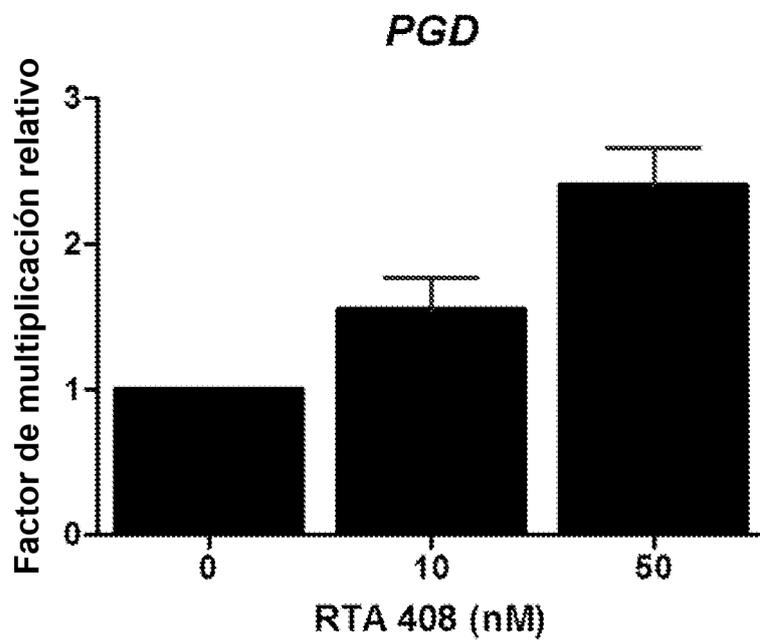


FIG. 8

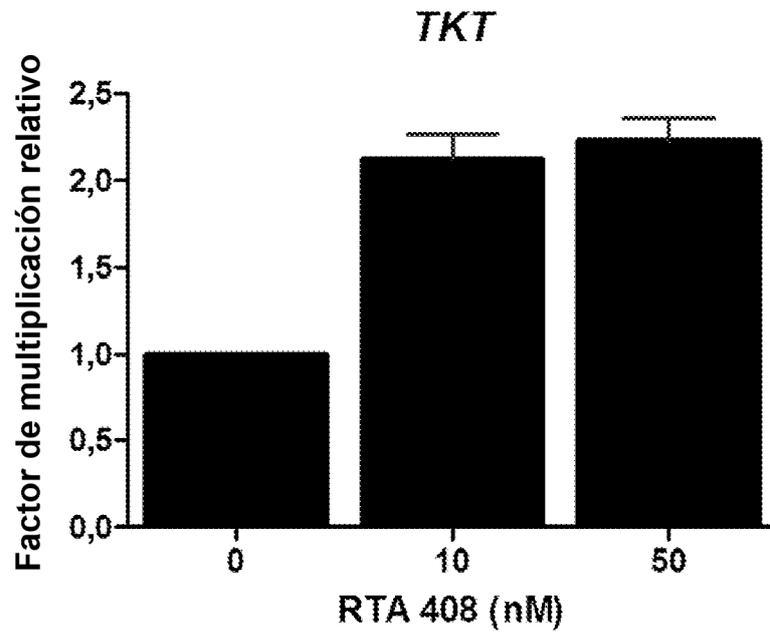


(a)

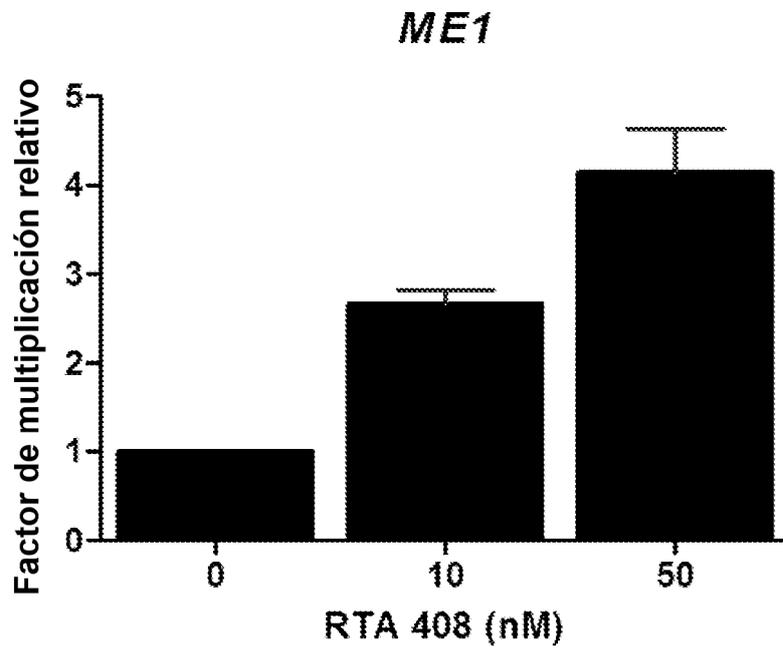


(b)

FIGS. 9a y b



(c)



(d)

FIGS. 9c y d

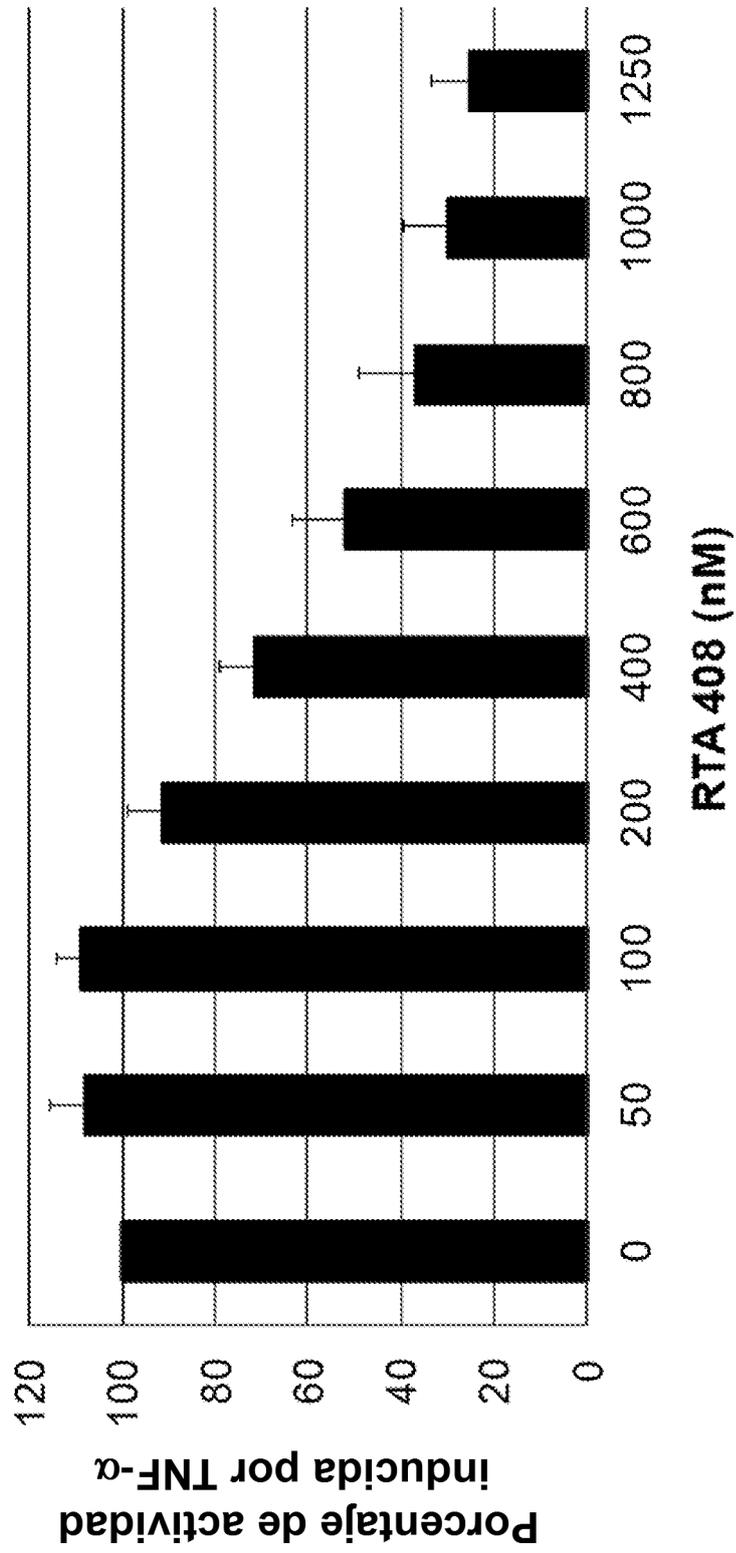


FIG. 10

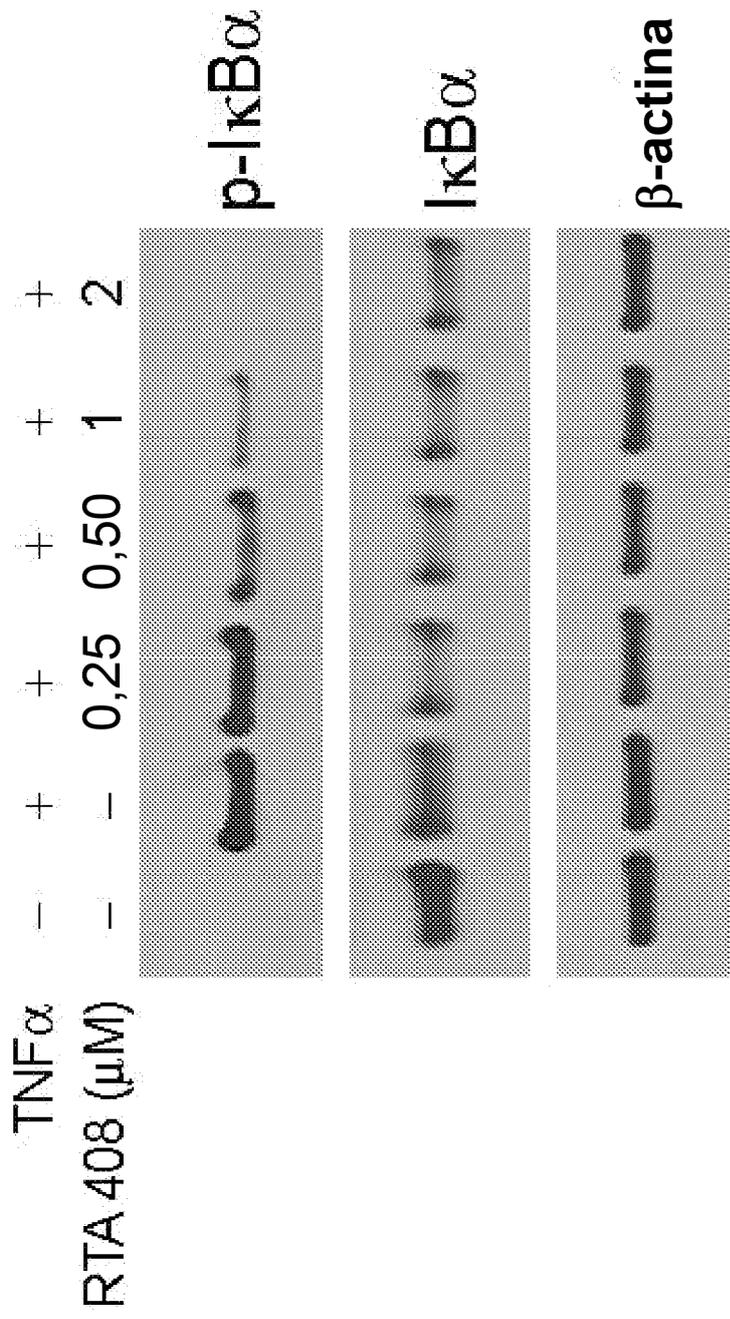
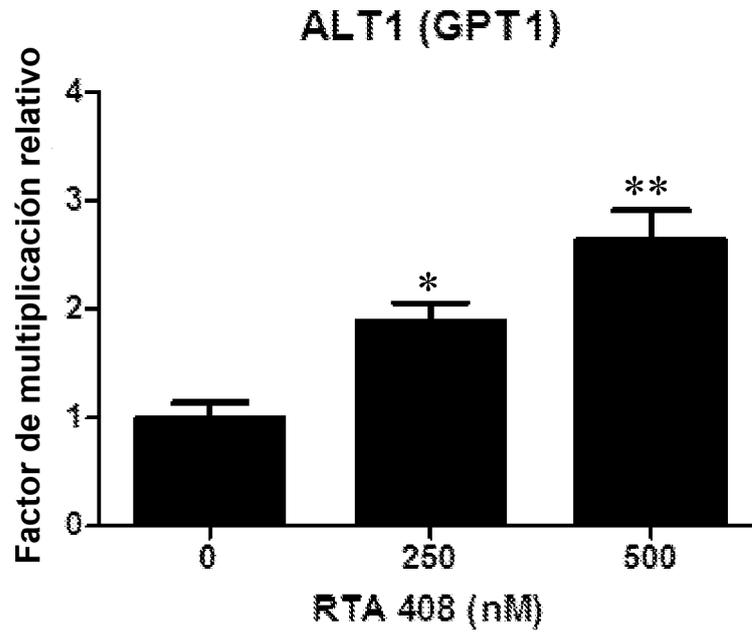
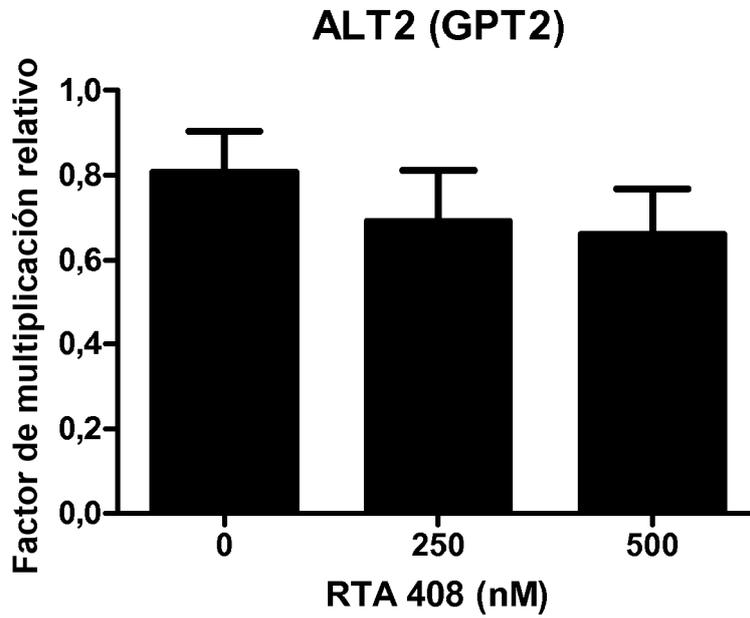


FIG. 11

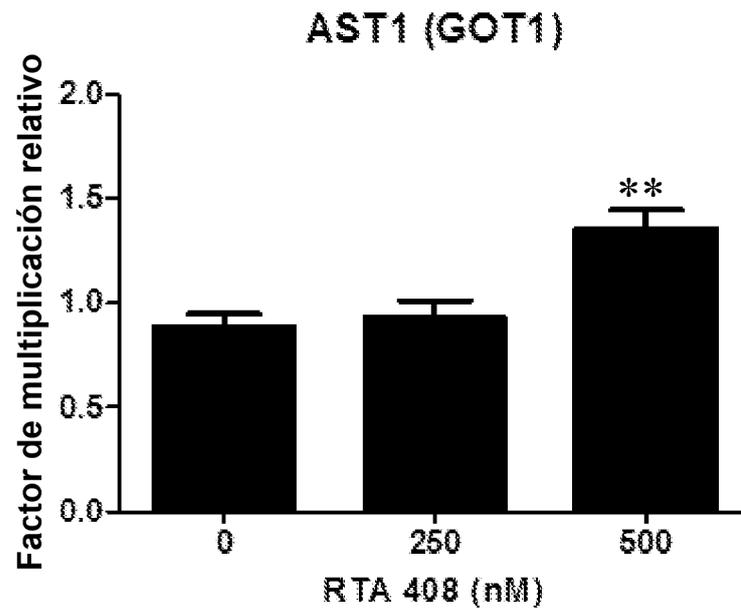


(a)

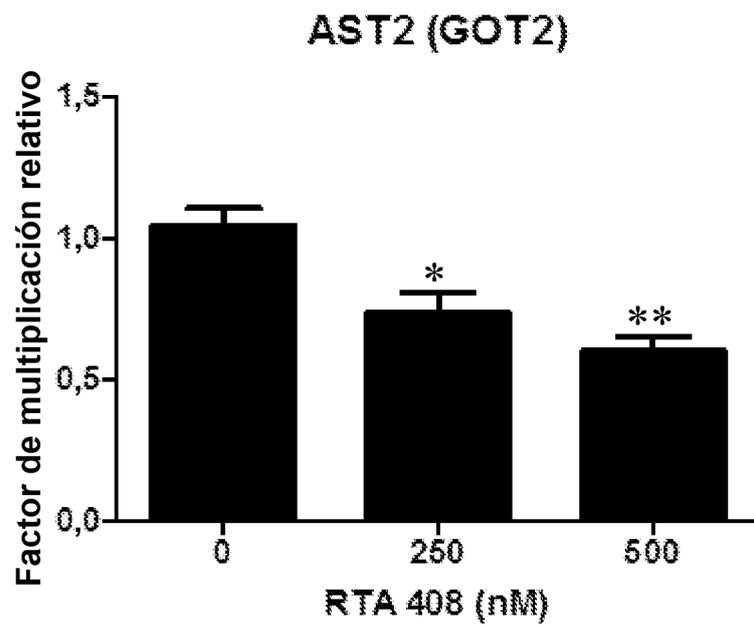


(b)

FIG. 12a y b



(c)



(d)

FIGS. 12c & d

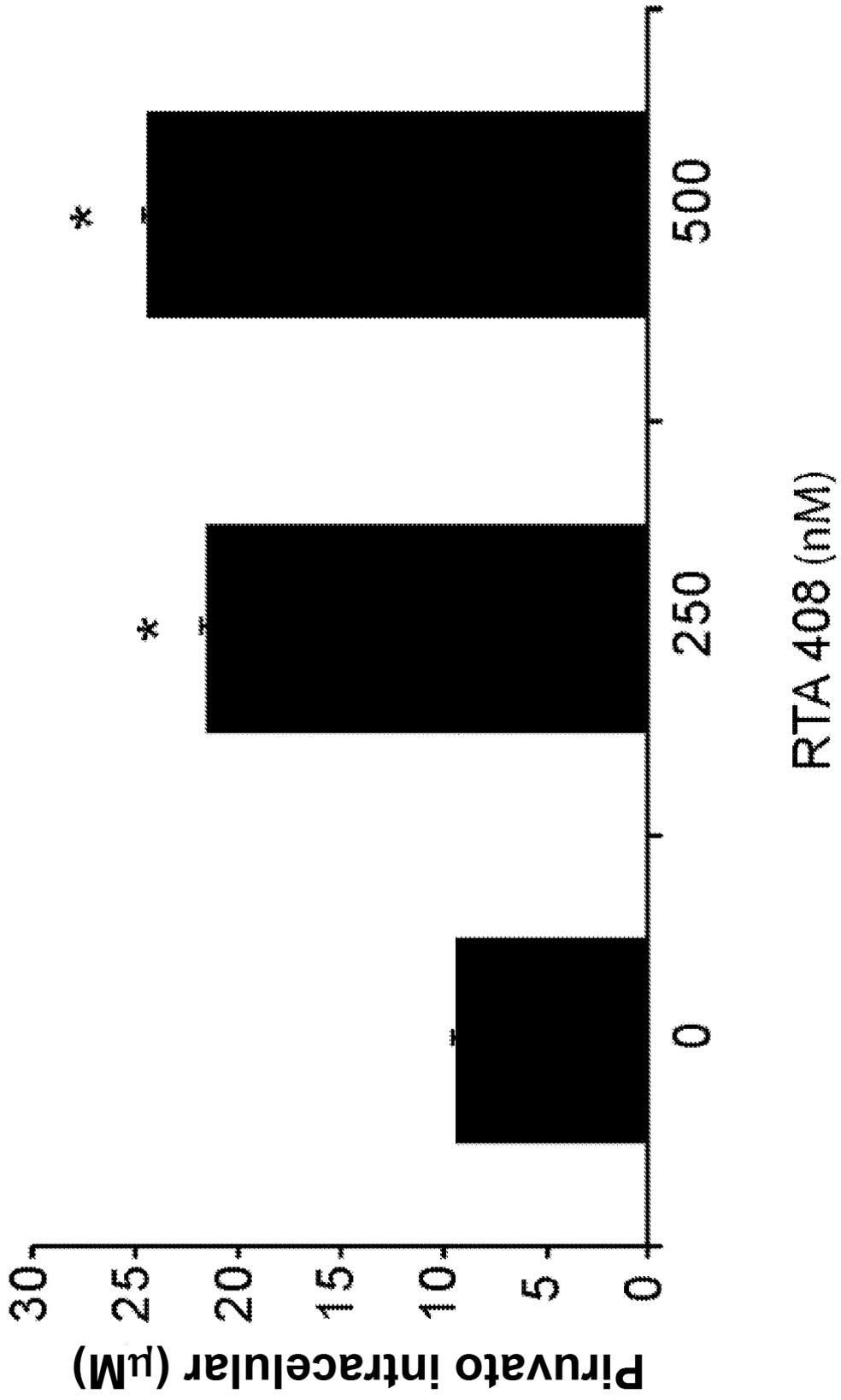


FIG. 13

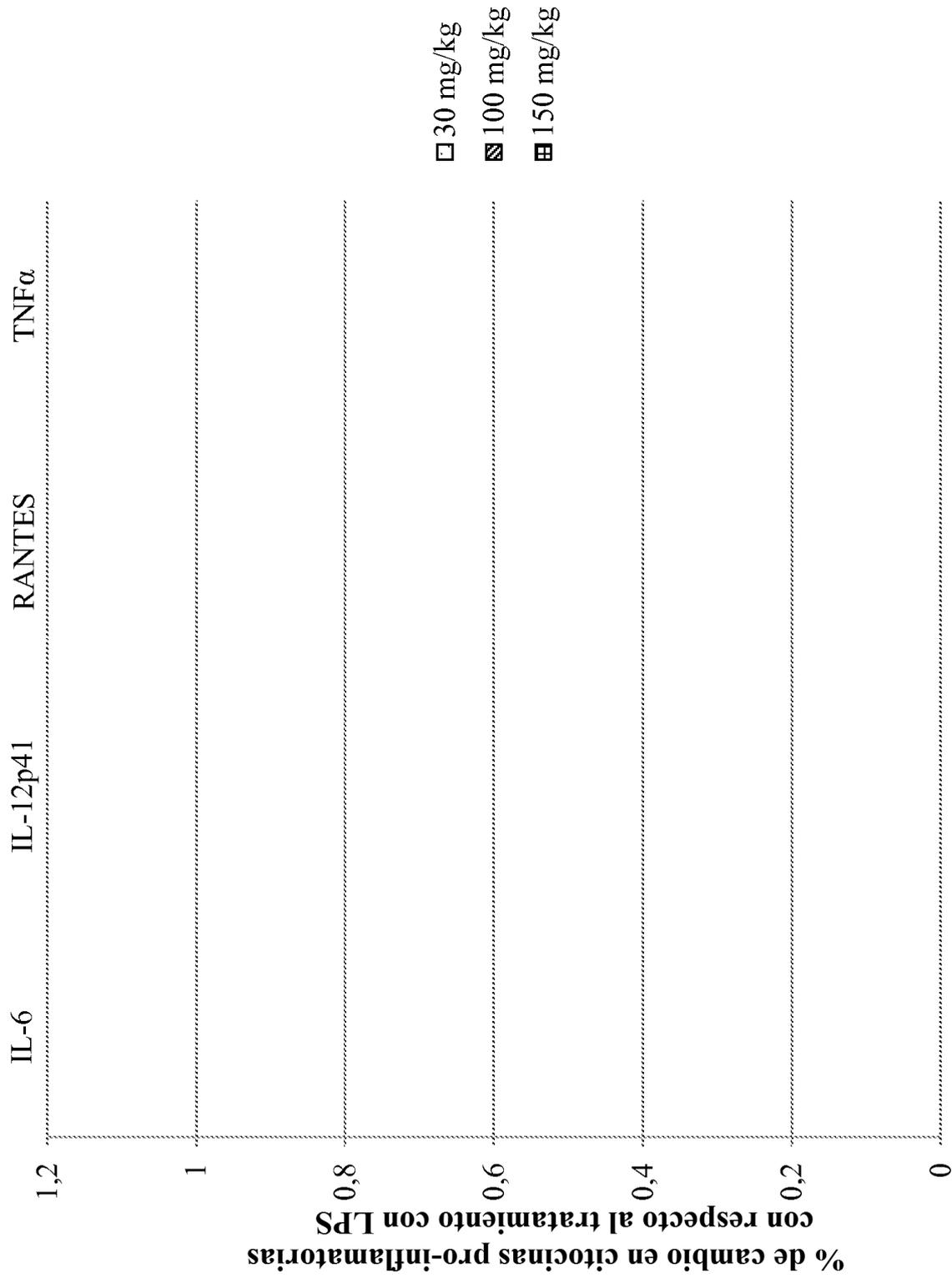
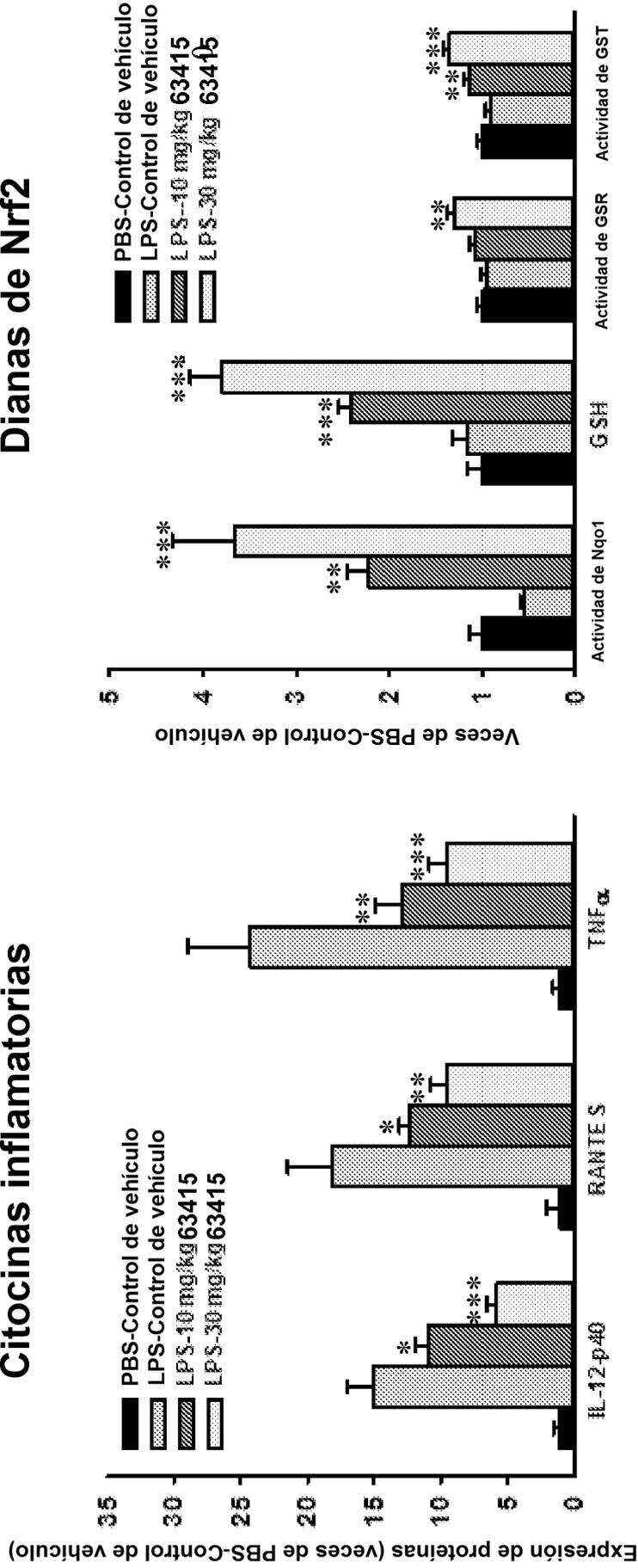


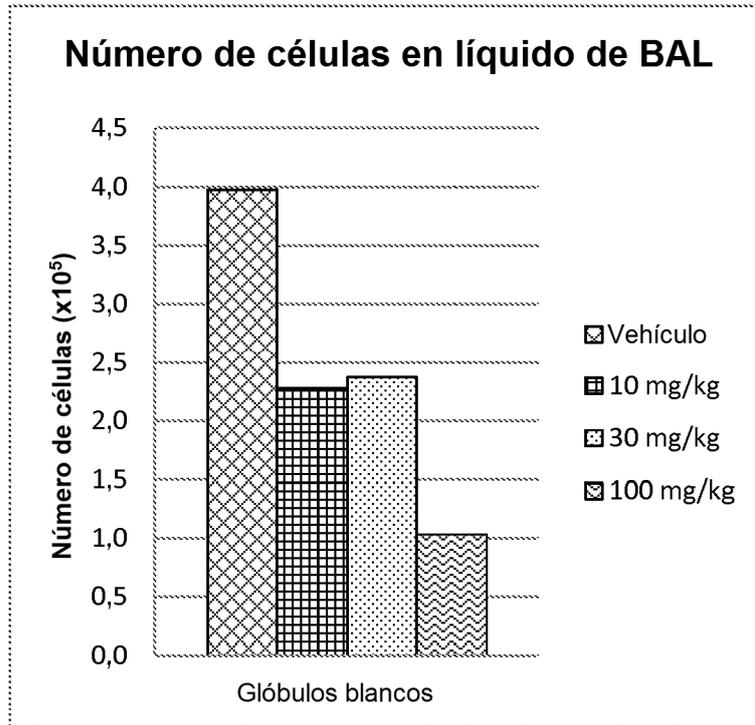
FIG. 14

Citocinas inflamatorias

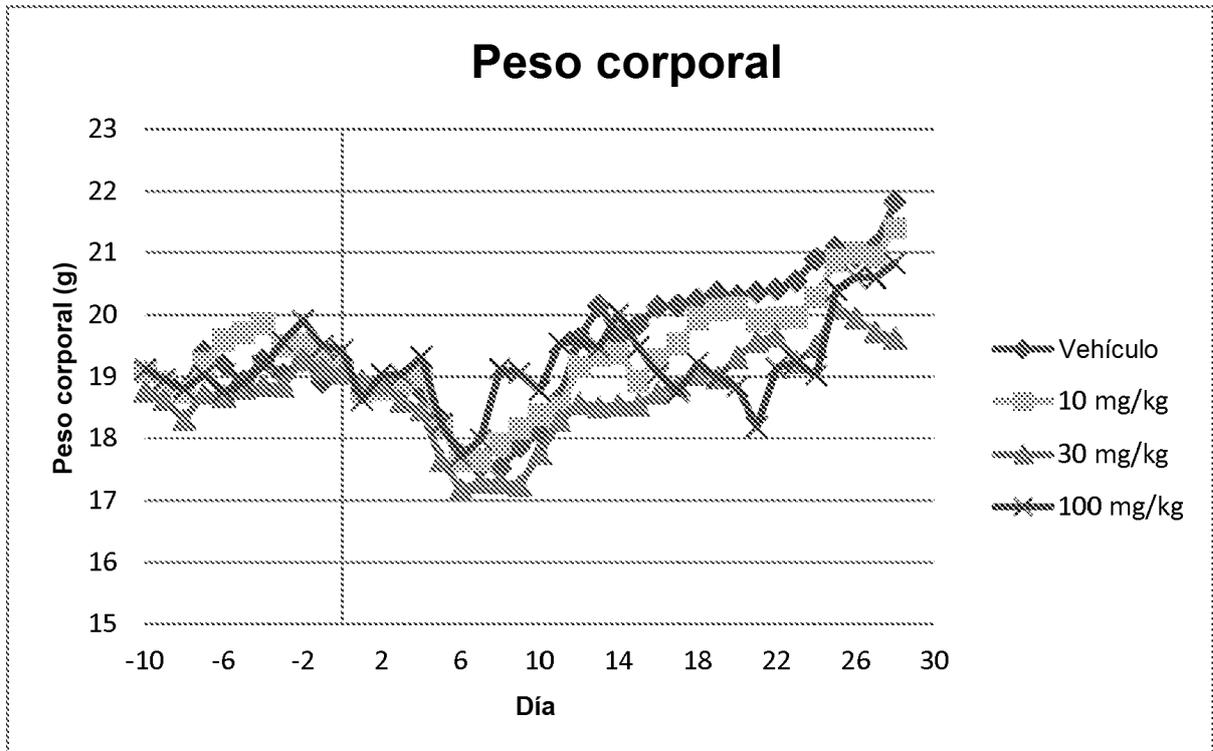
Dianas de Nrf2



FIGS. 15a y b

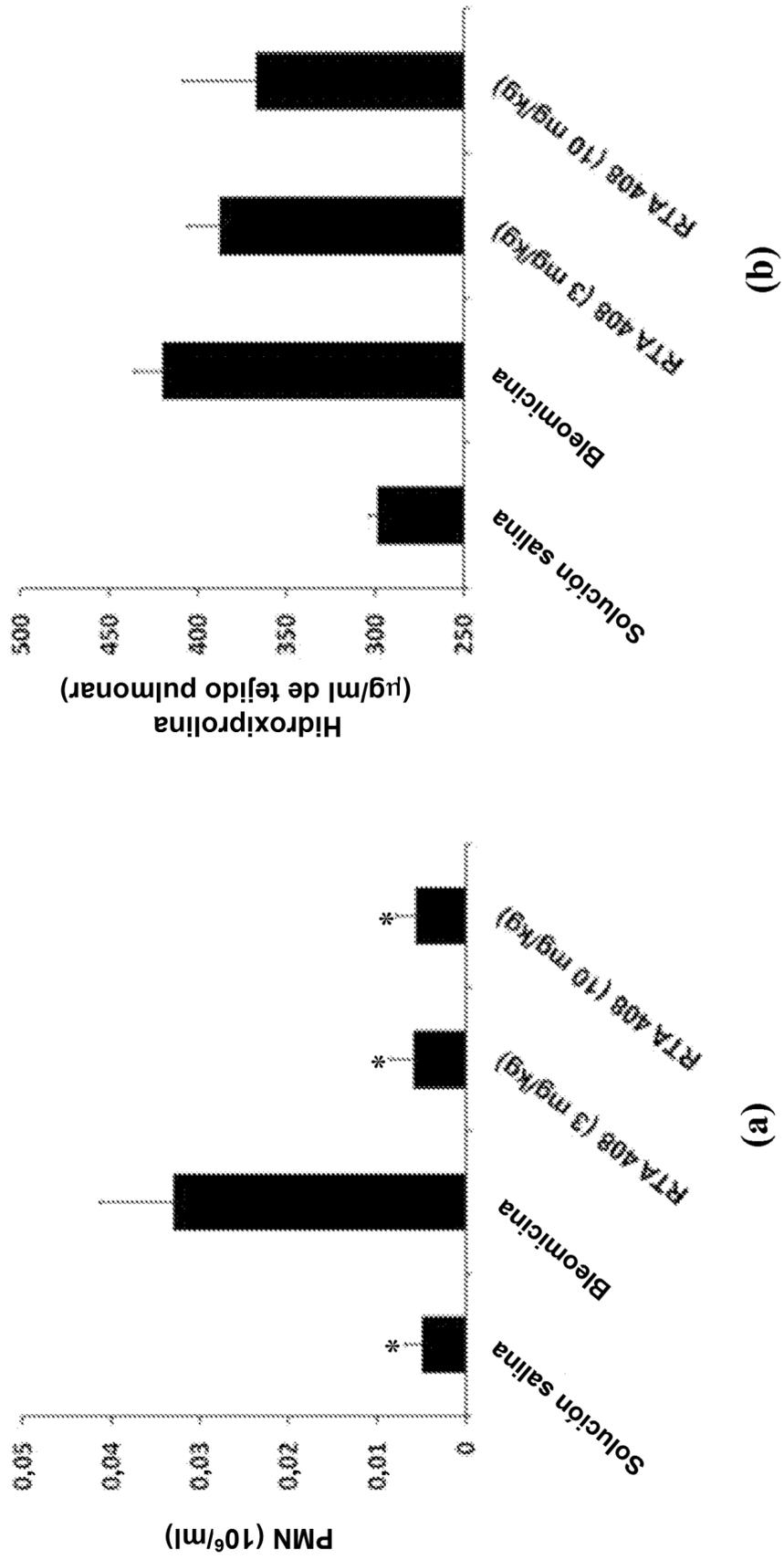


(a)



(b)

FIGS. 16a y b



FIGS. 17a y b

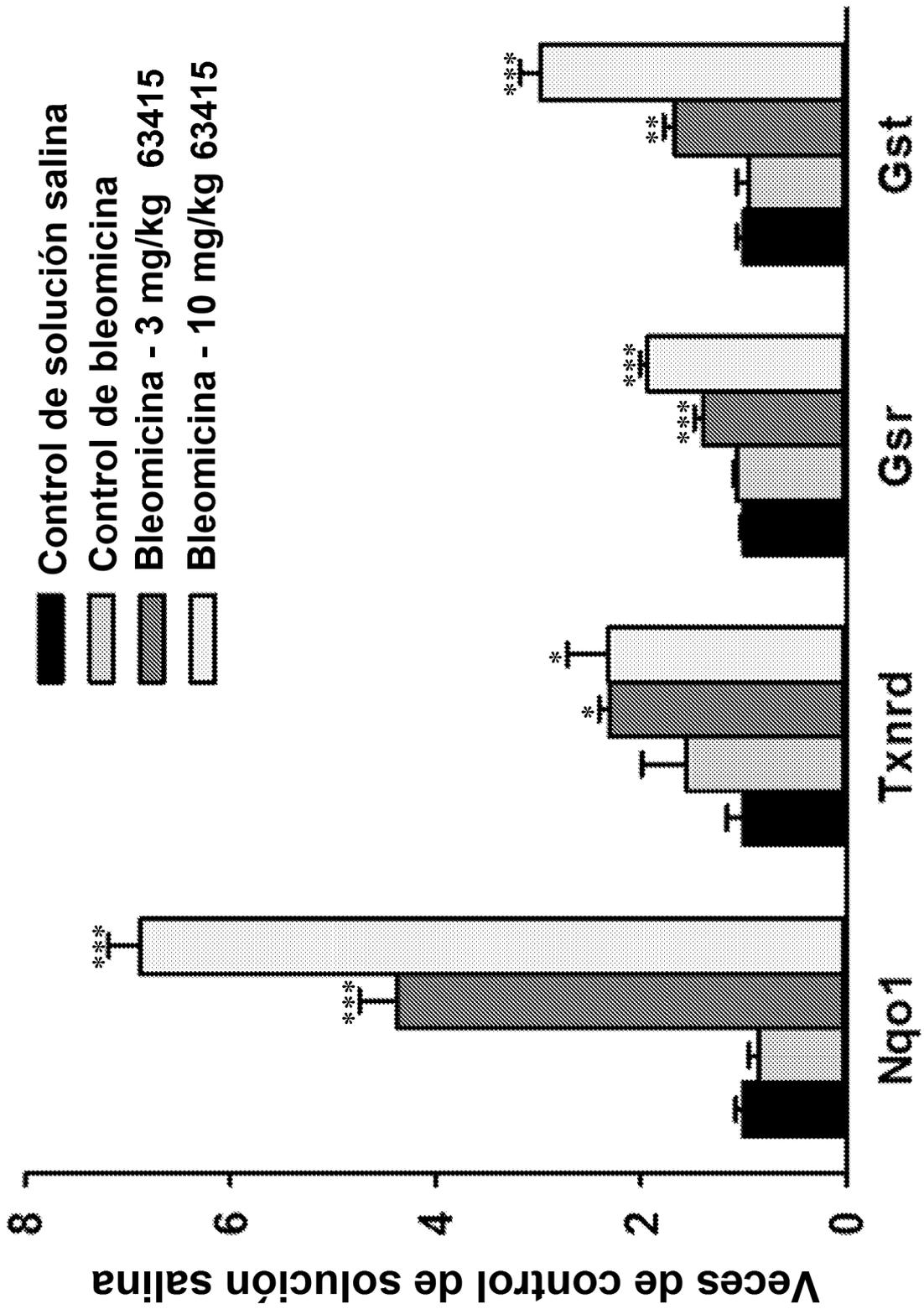
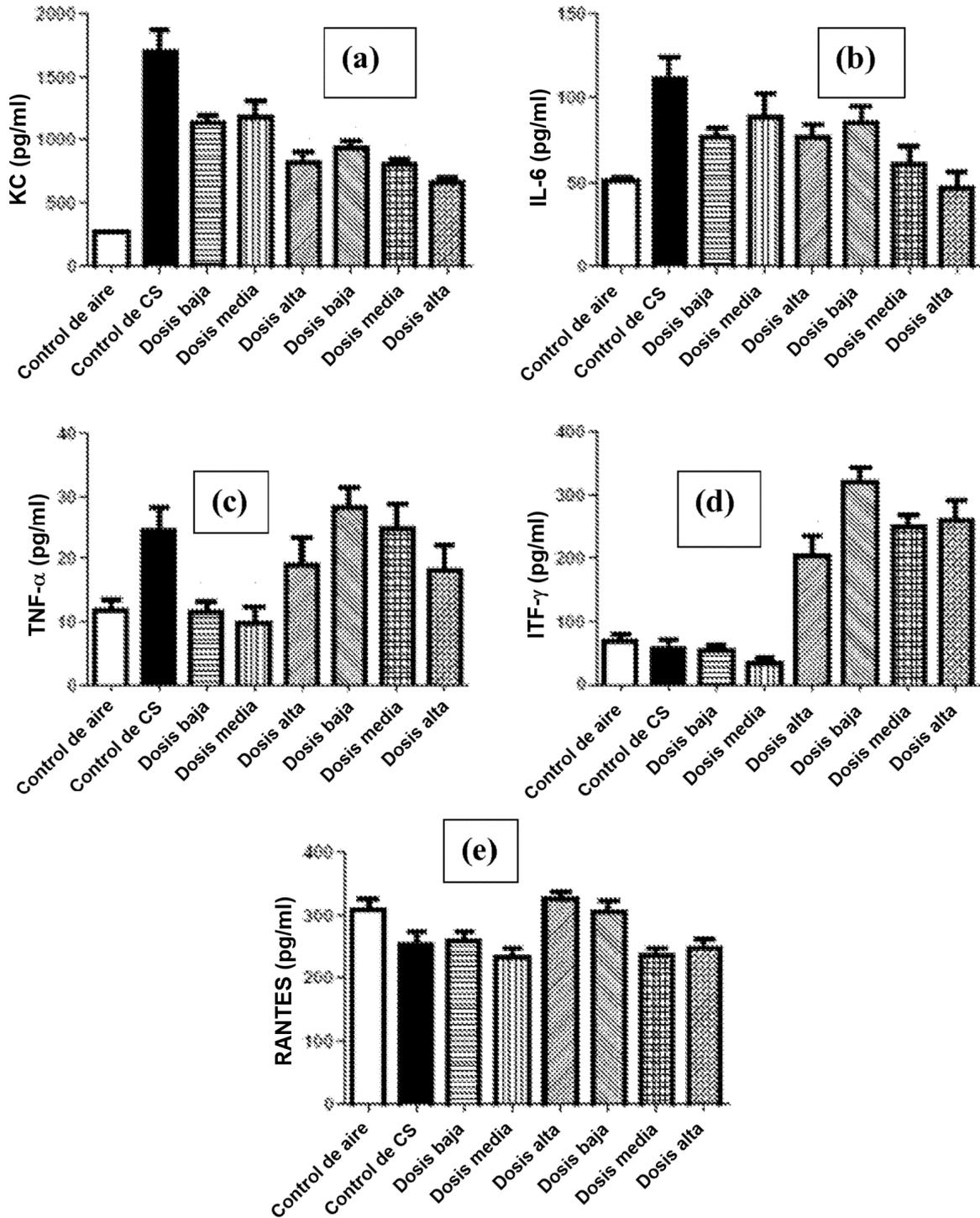


FIG. 18



FIGS. 19a – e

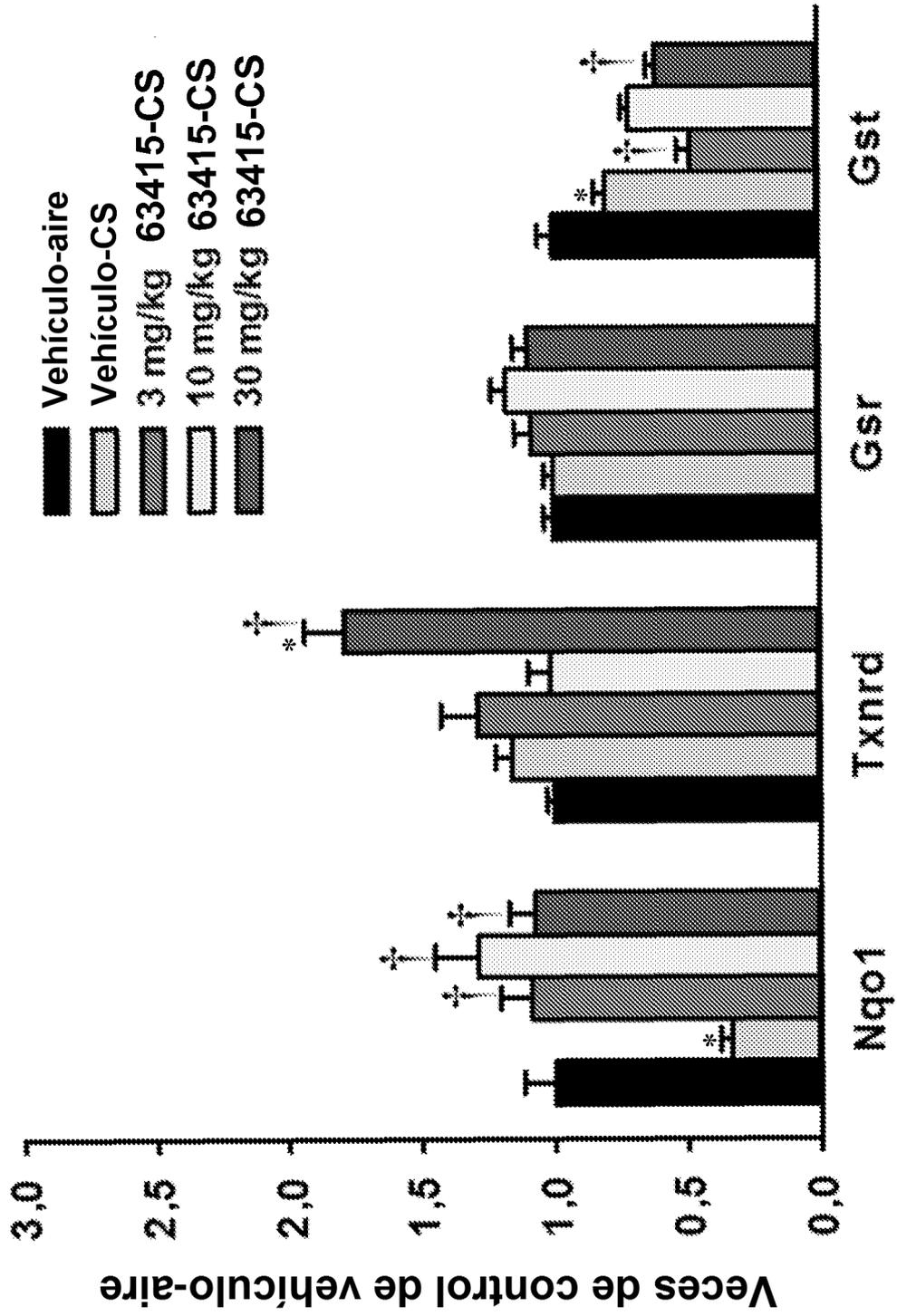
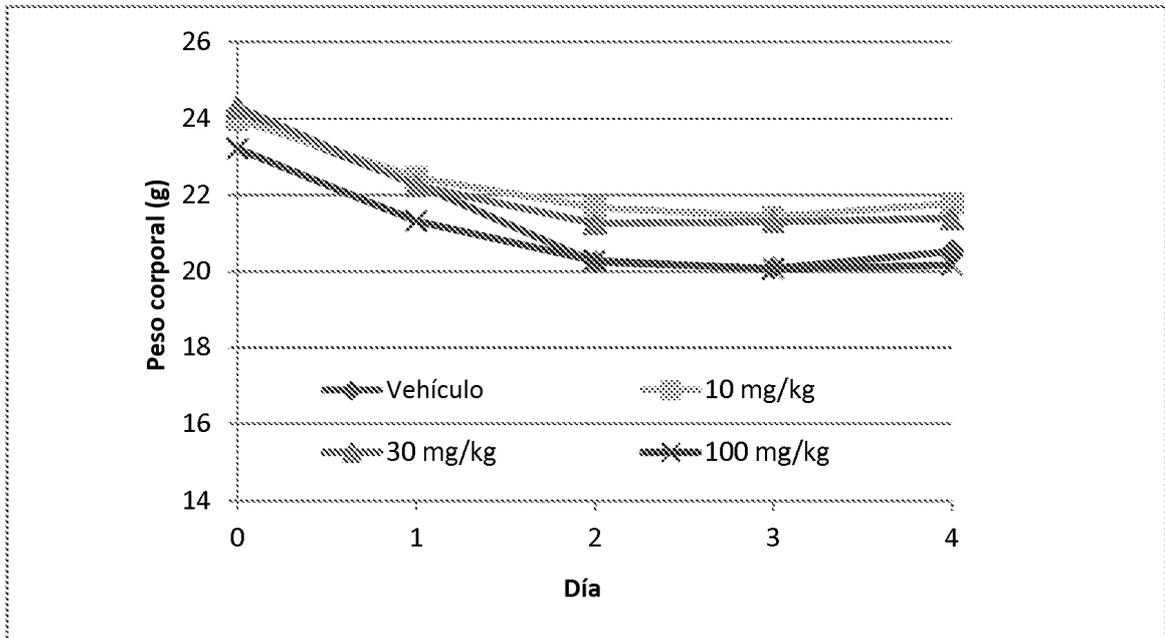


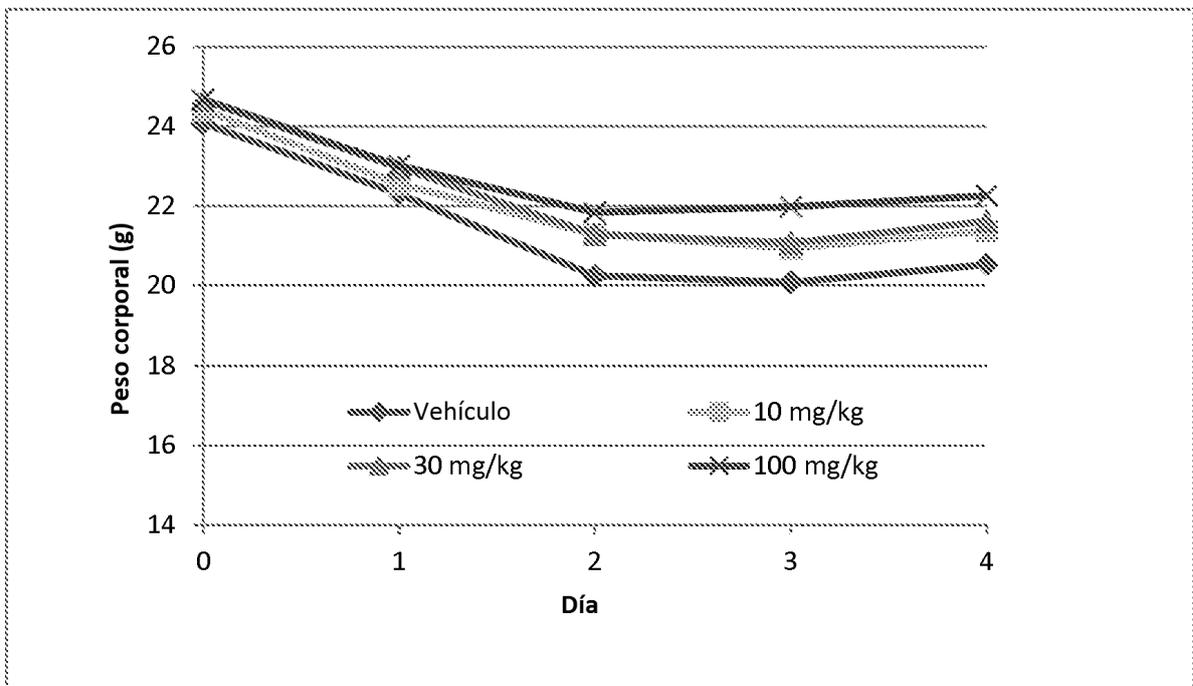
FIG. 20

LPS sistémico: Peso corporal: 63415



(a)

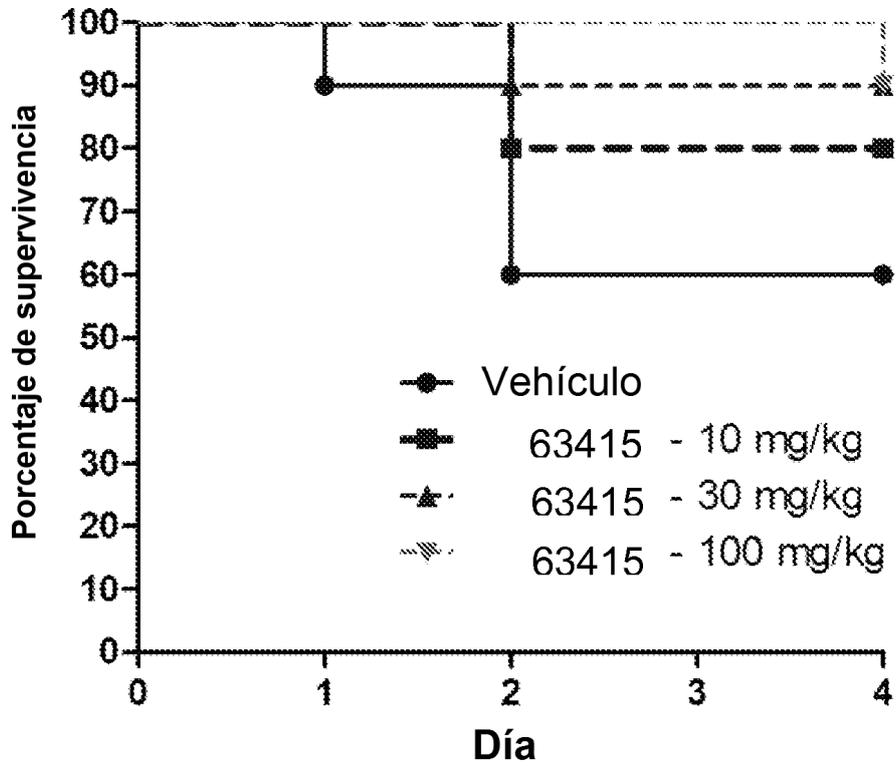
LPS sistémico: Peso corporal: RTA 405



(b)

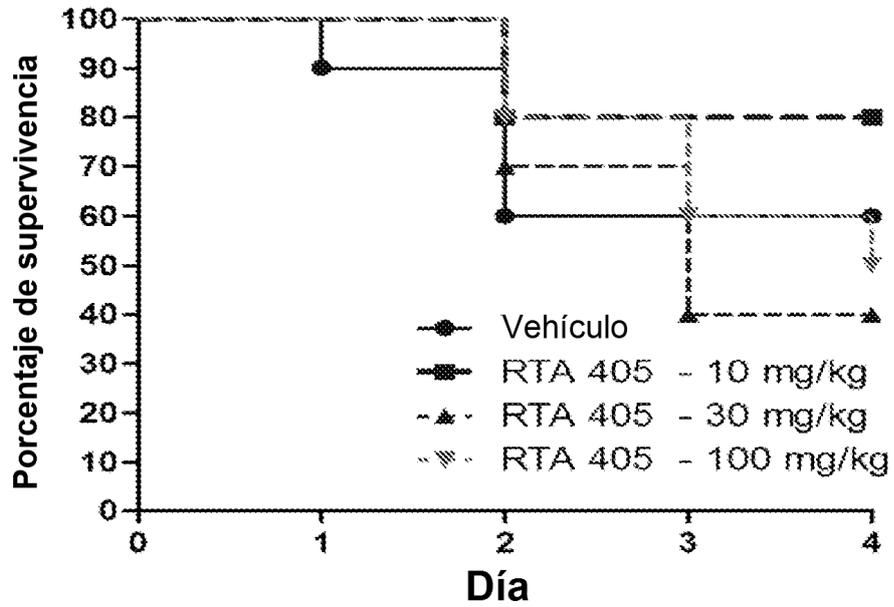
FIGS. 21a y b

LPS sistémico: % de supervivencia: 63415



(c)

LPS sistémico: % de supervivencia: RTA 405



(d)

FIGS. 21c y d

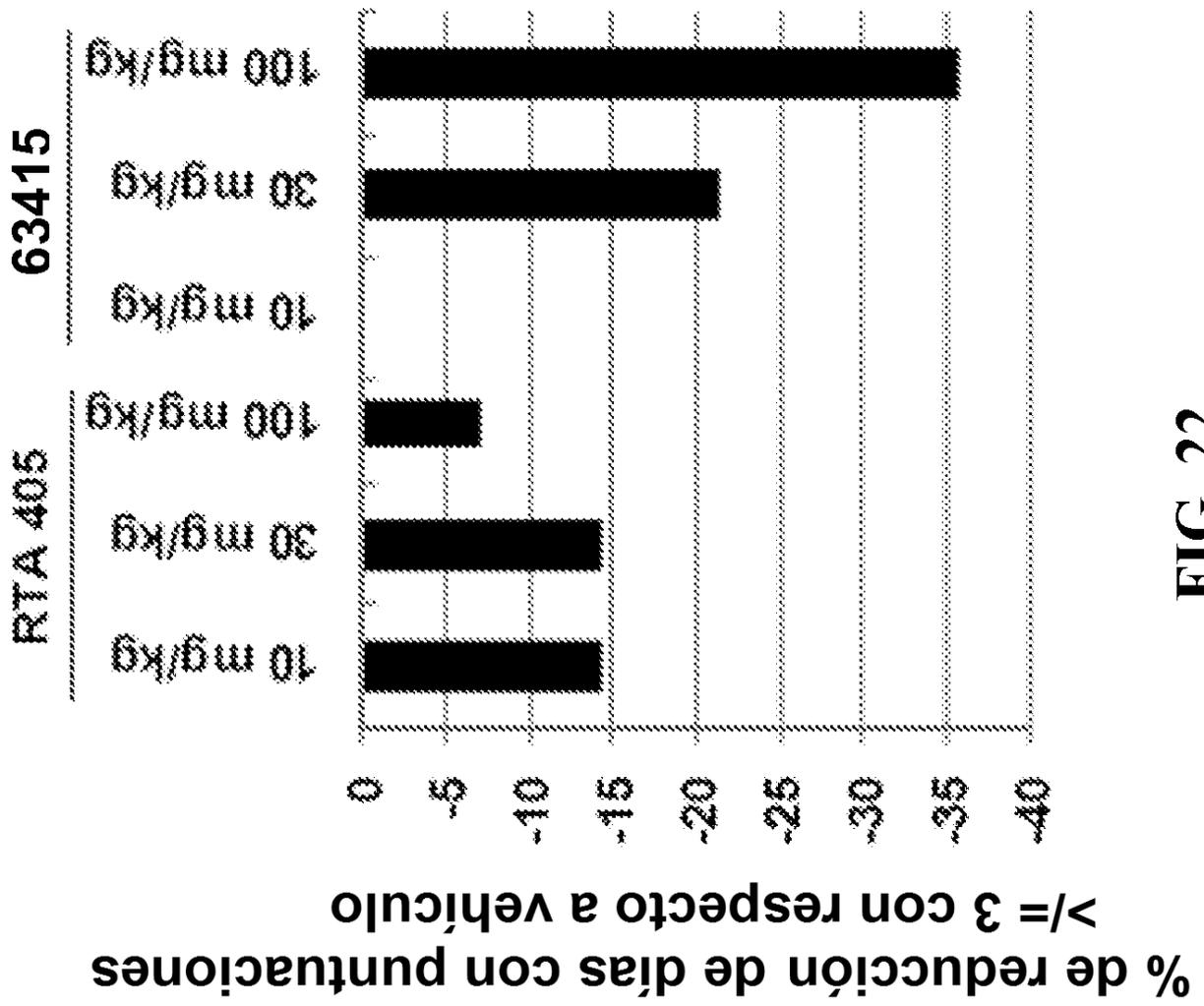


FIG. 22

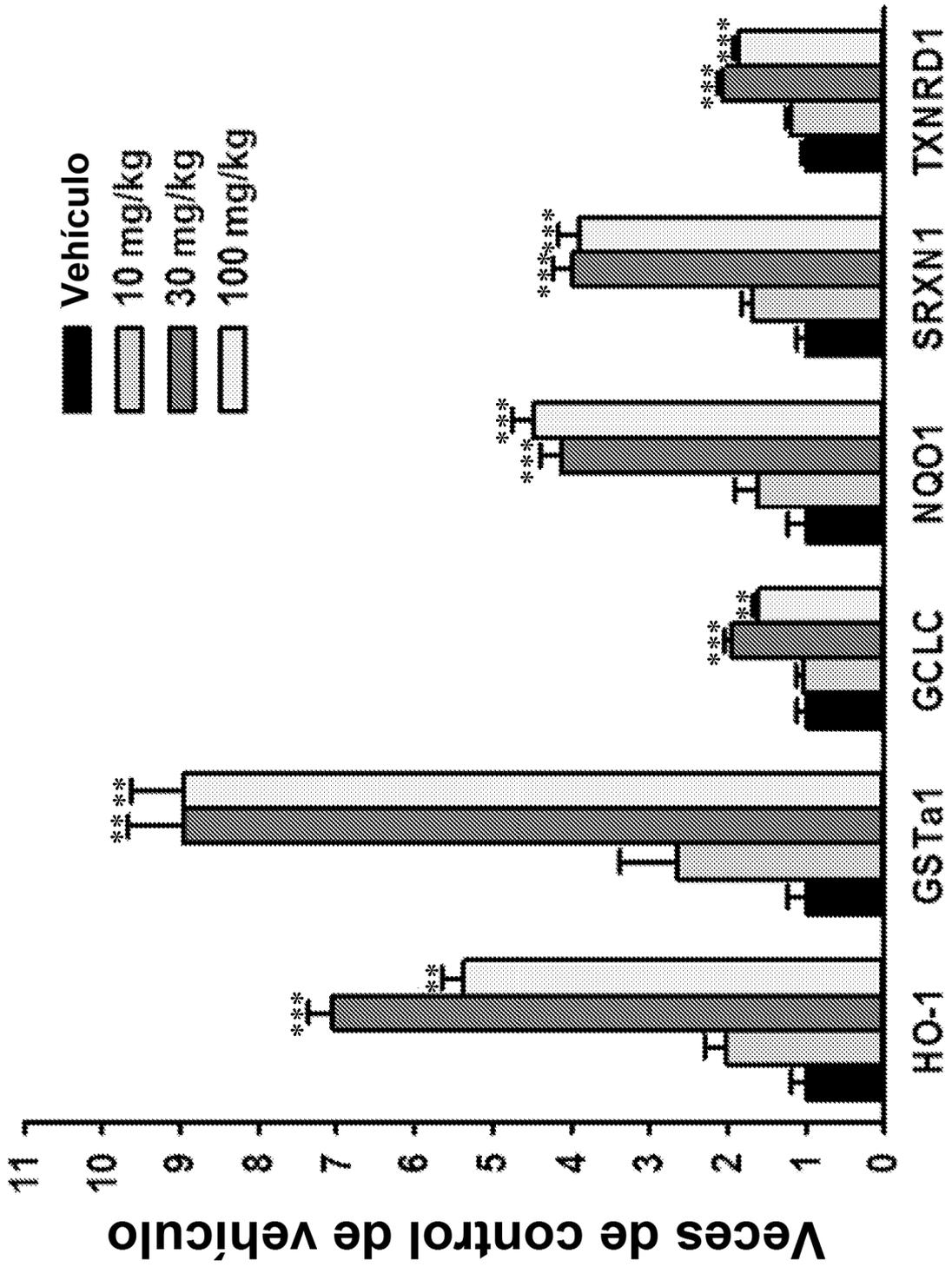
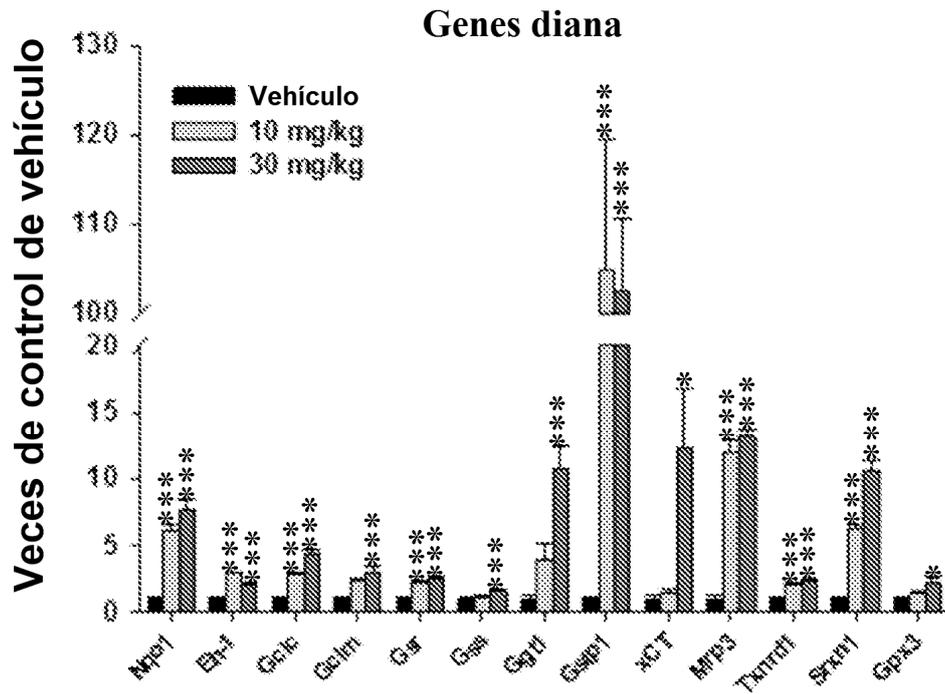
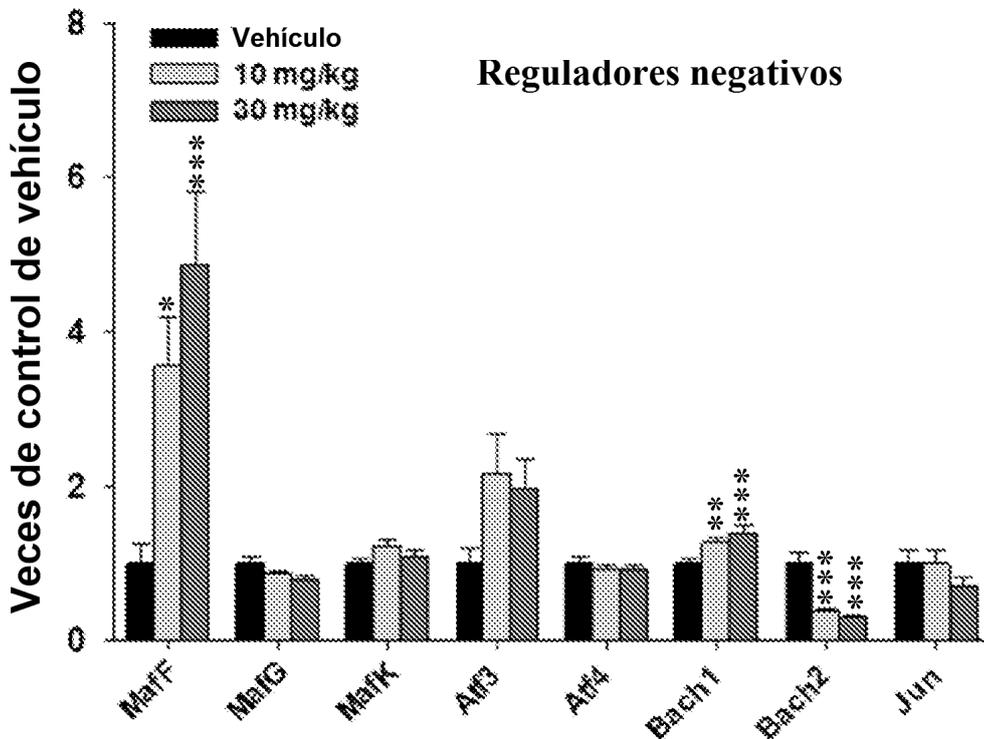


FIG. 23

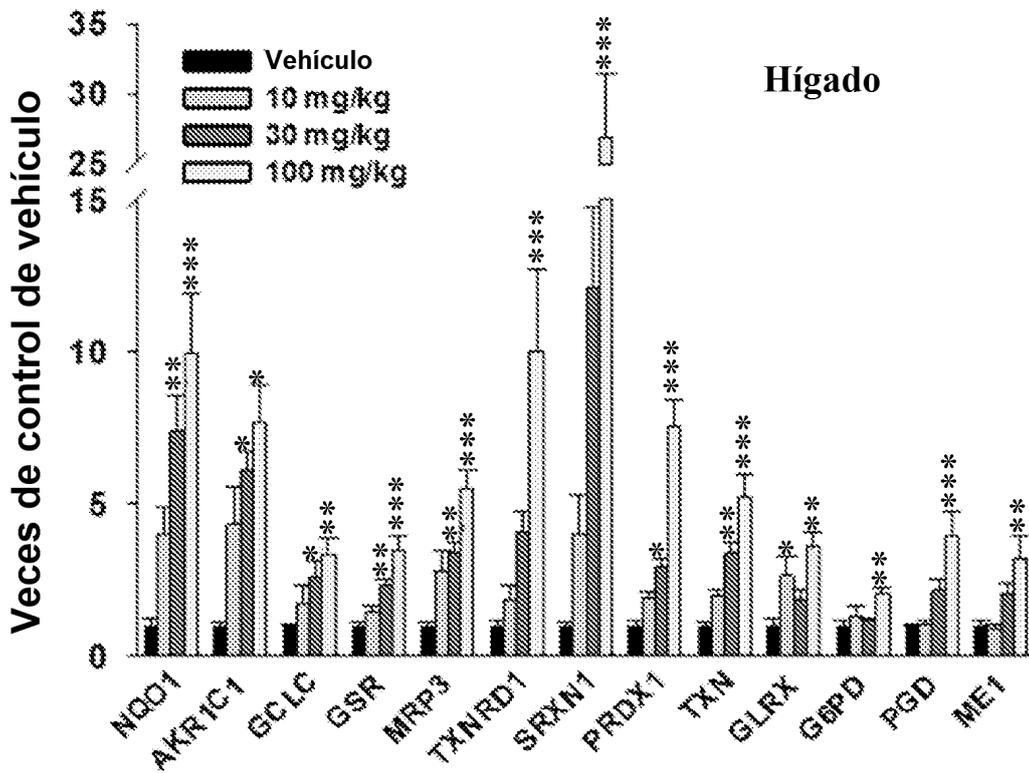


(a)

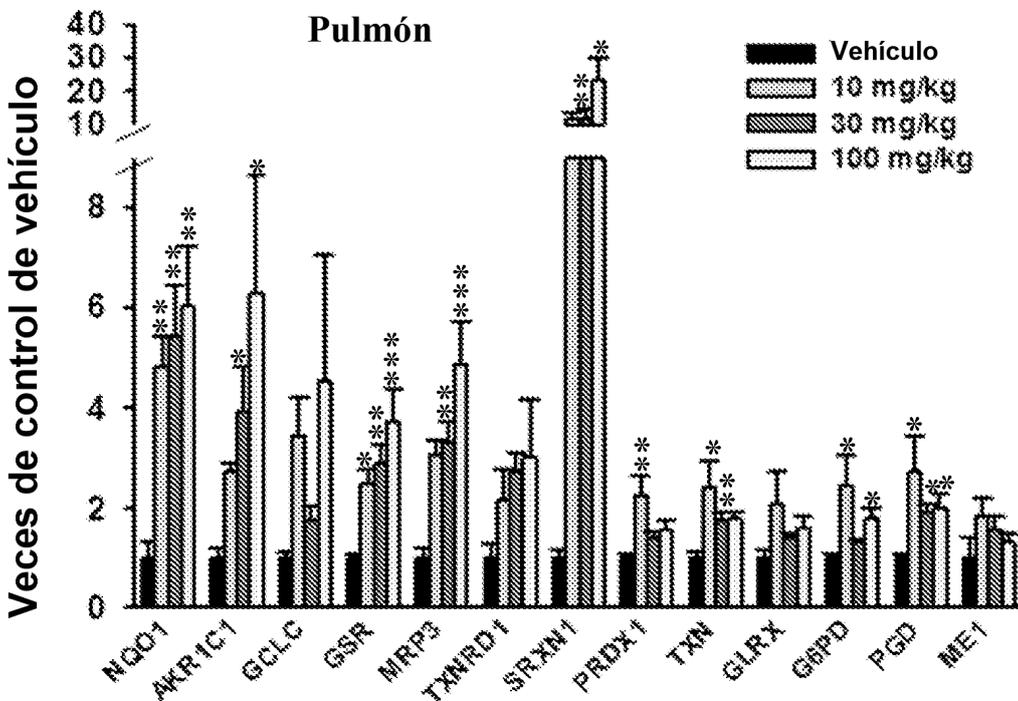


(b)

FIGS. 24a y b

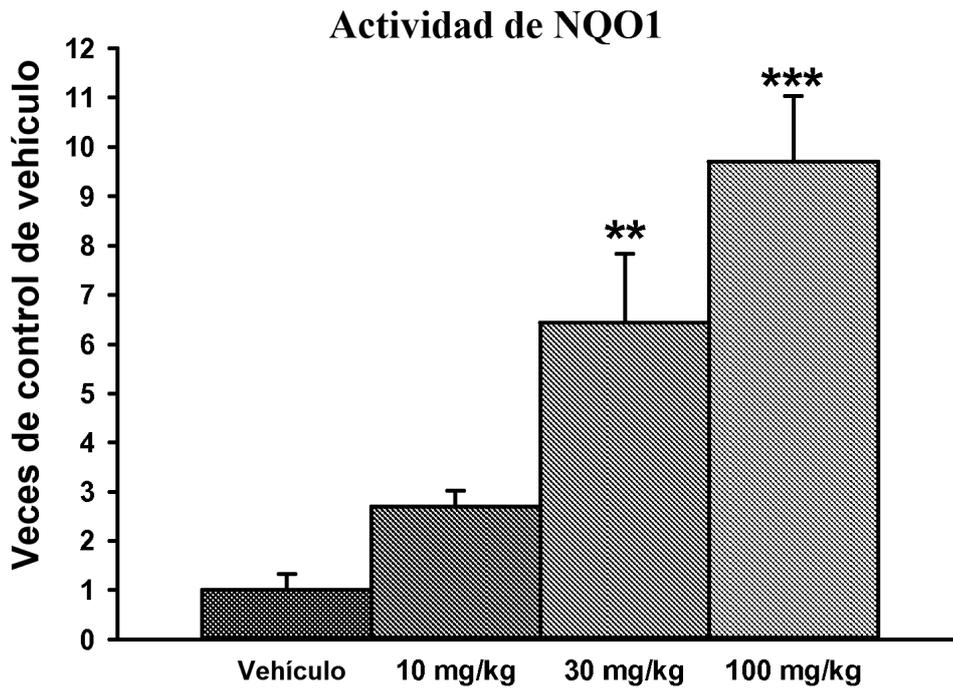


(a)

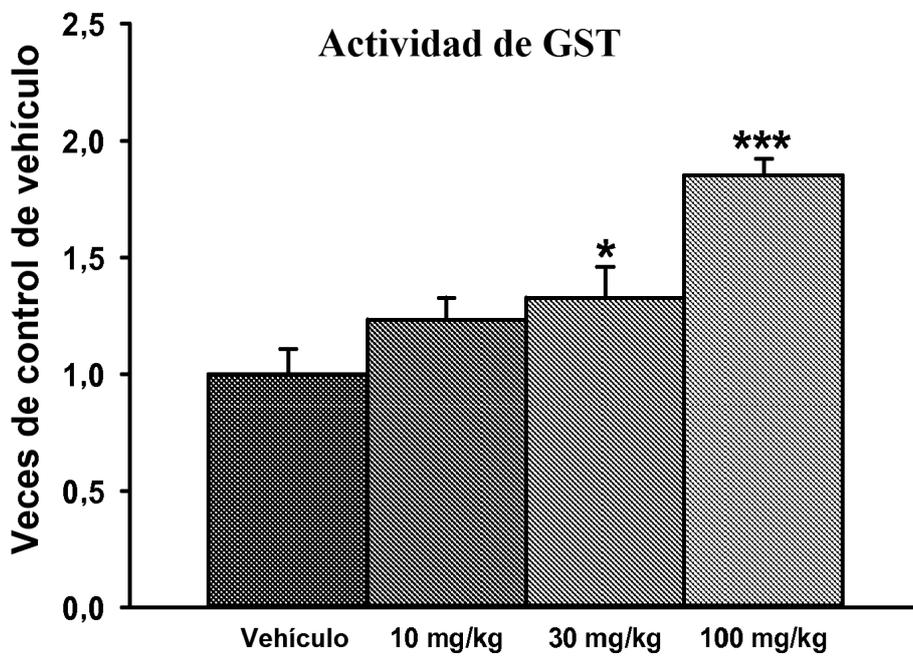


(b)

FIGS. 25a y b

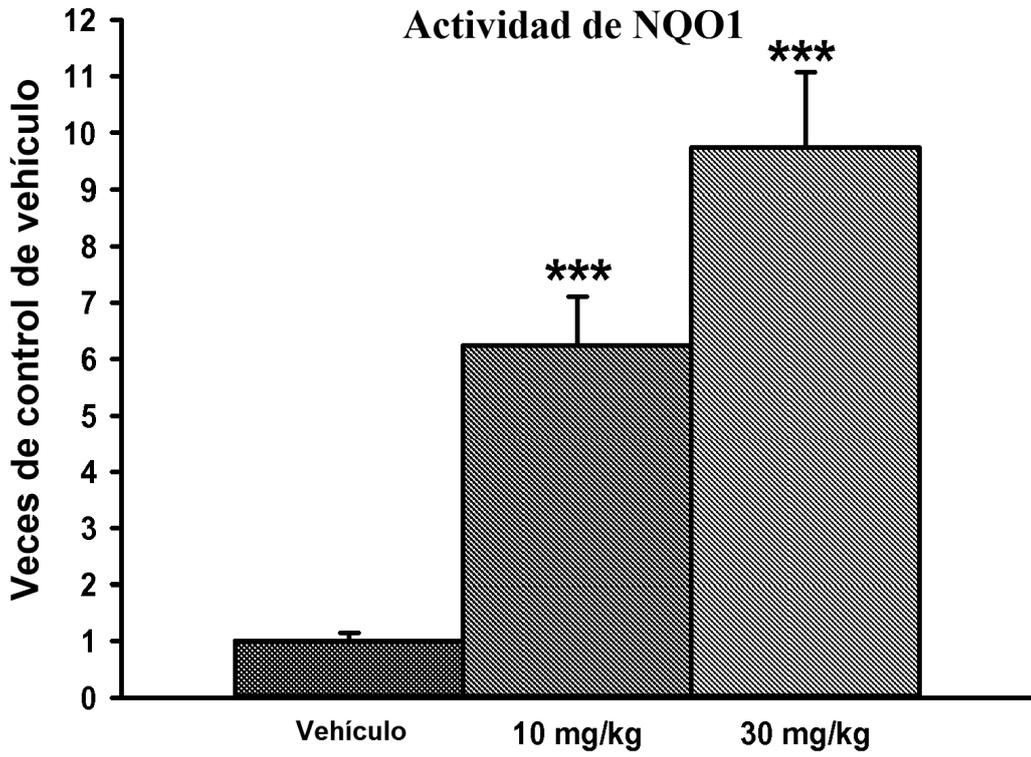


(a)

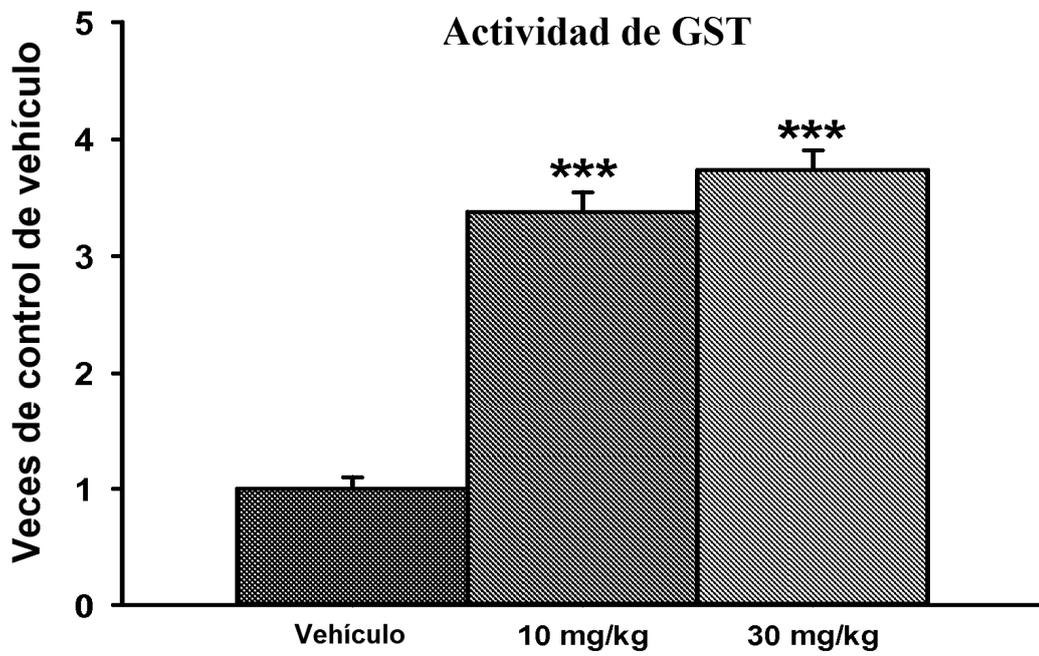


(b)

FIGS. 26a y b

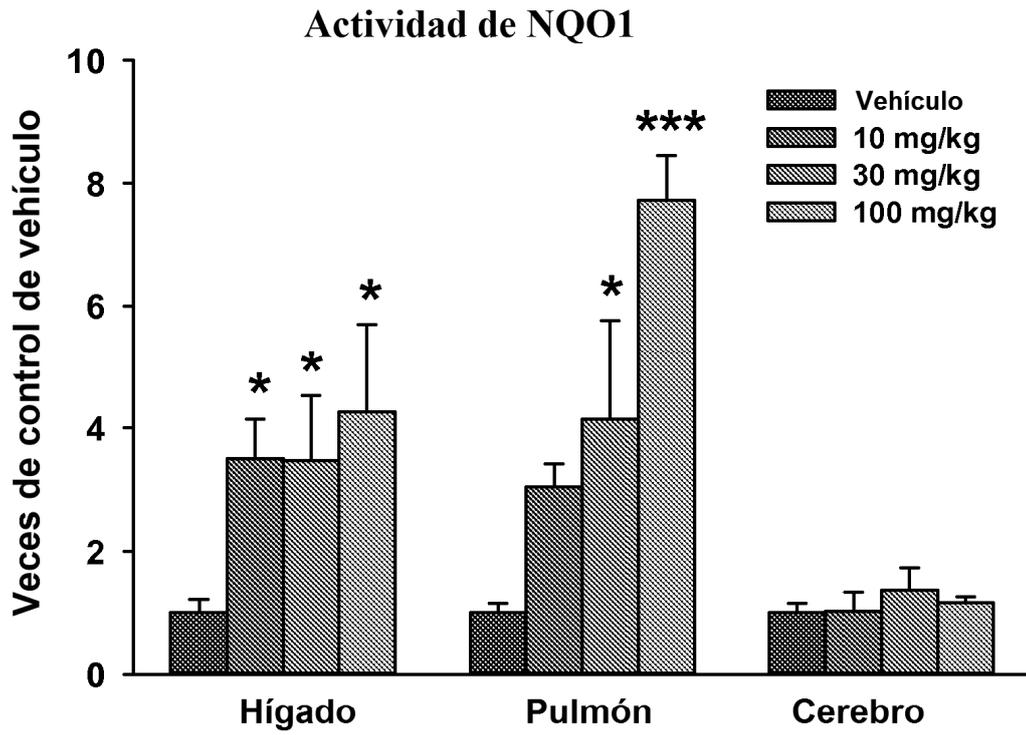


(a)

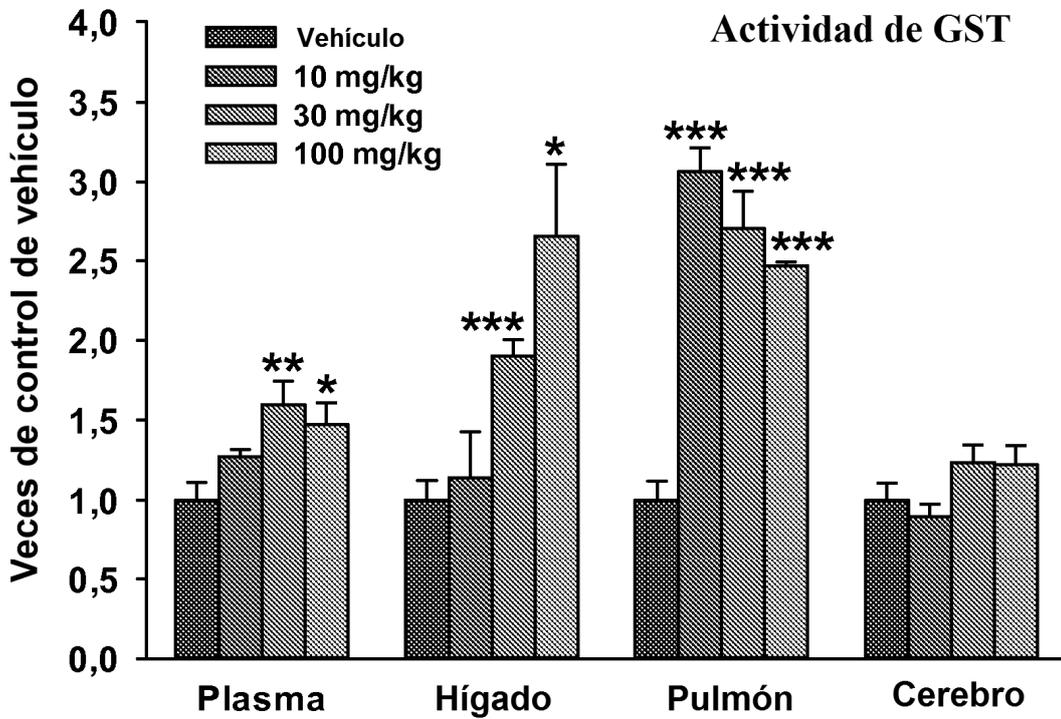


(b)

FIGS. 27a y b

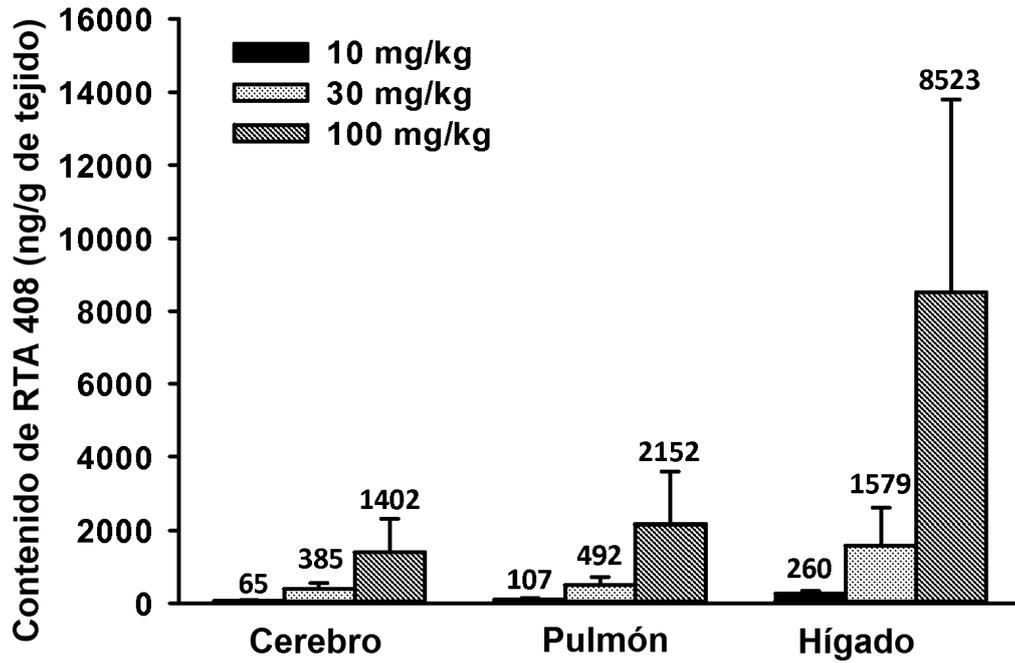


(a)

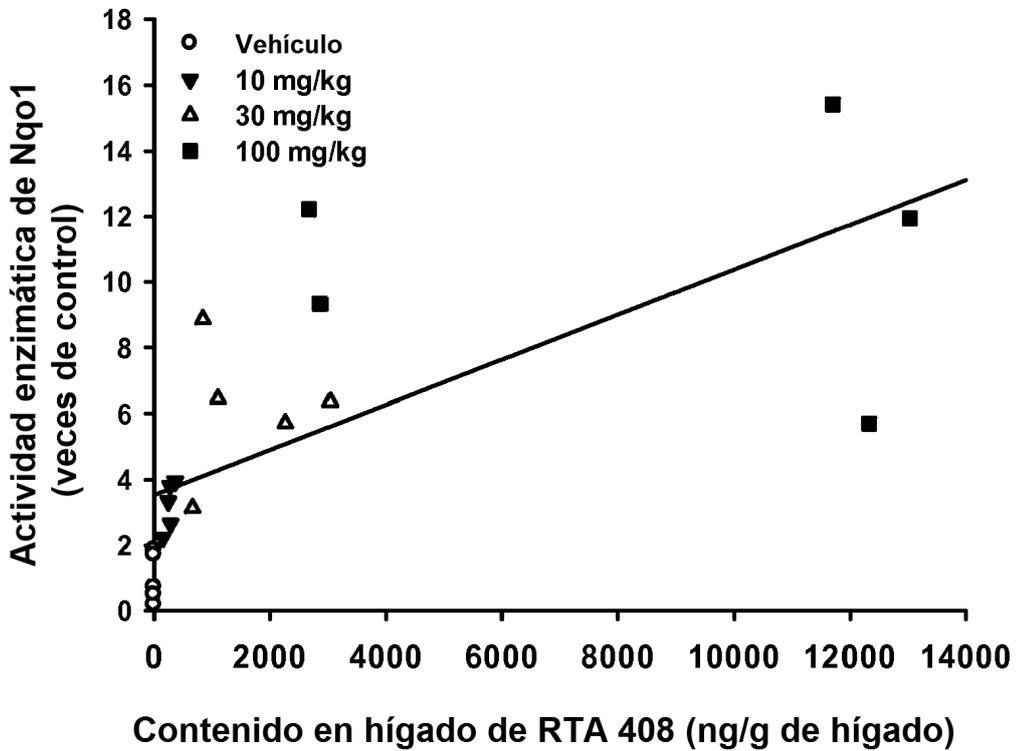


(b)

FIGS. 28a y b

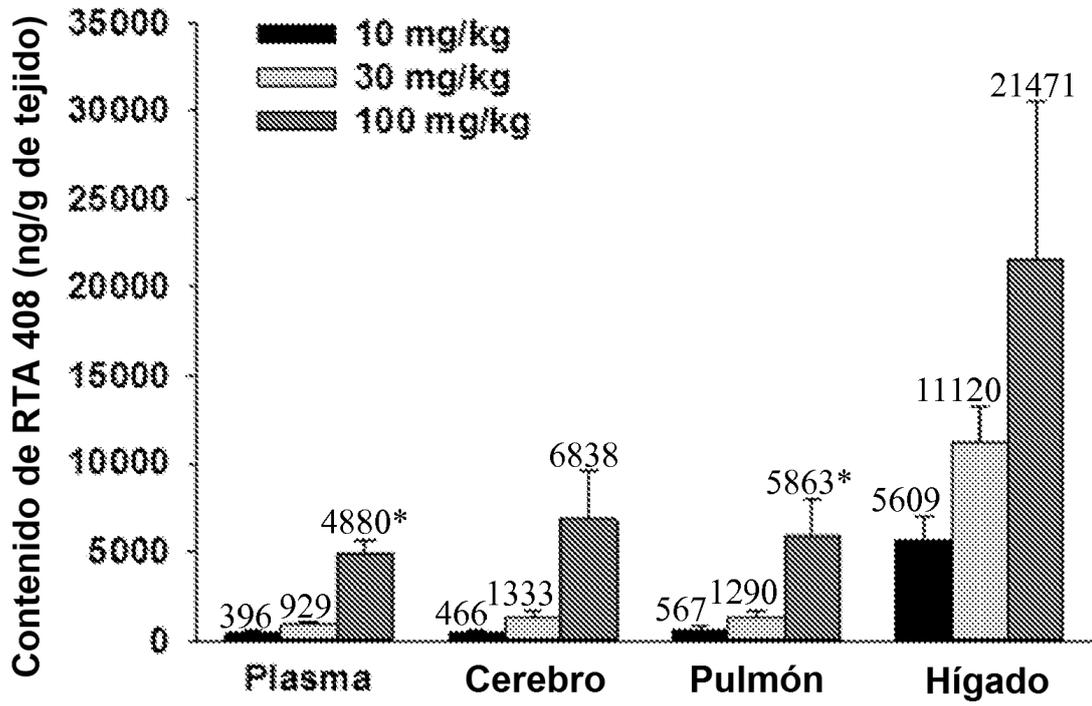


(a)

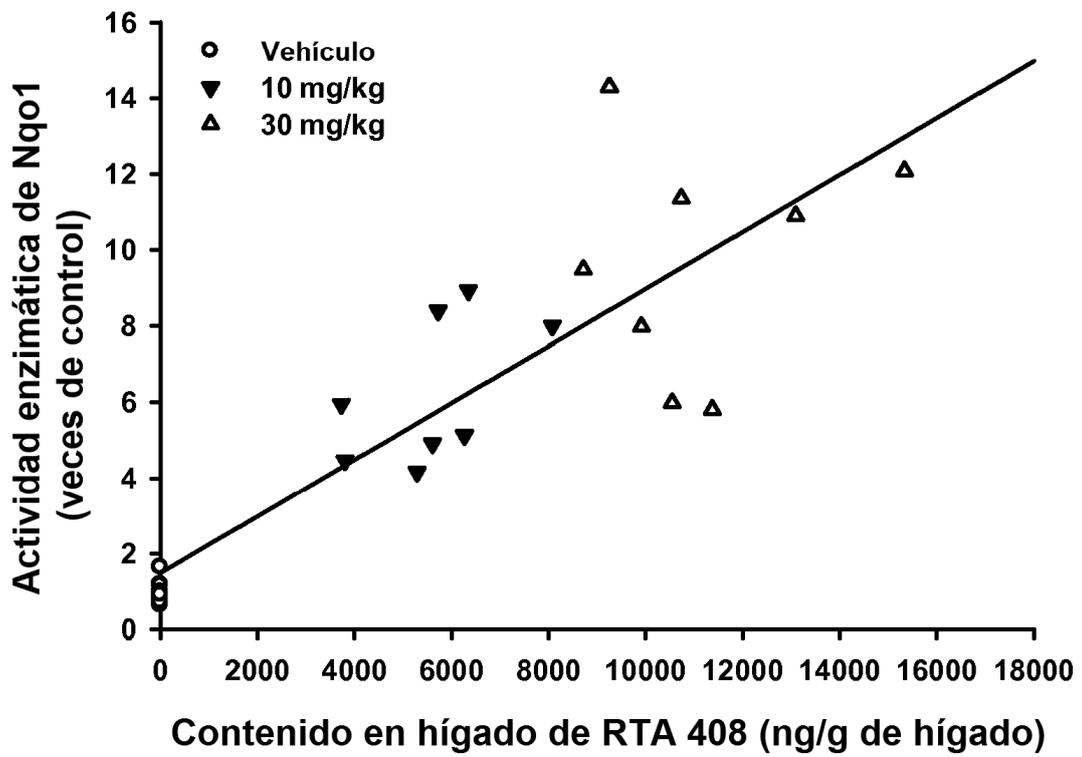


(b)

FIGS. 29a y b

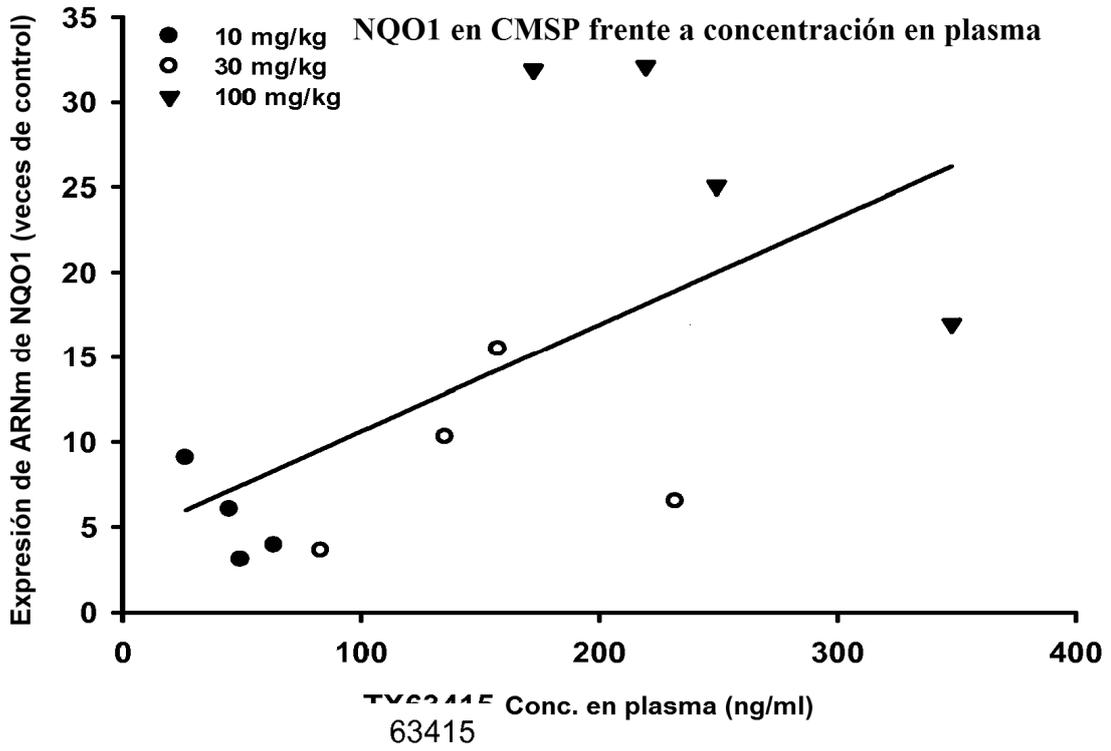


(a)

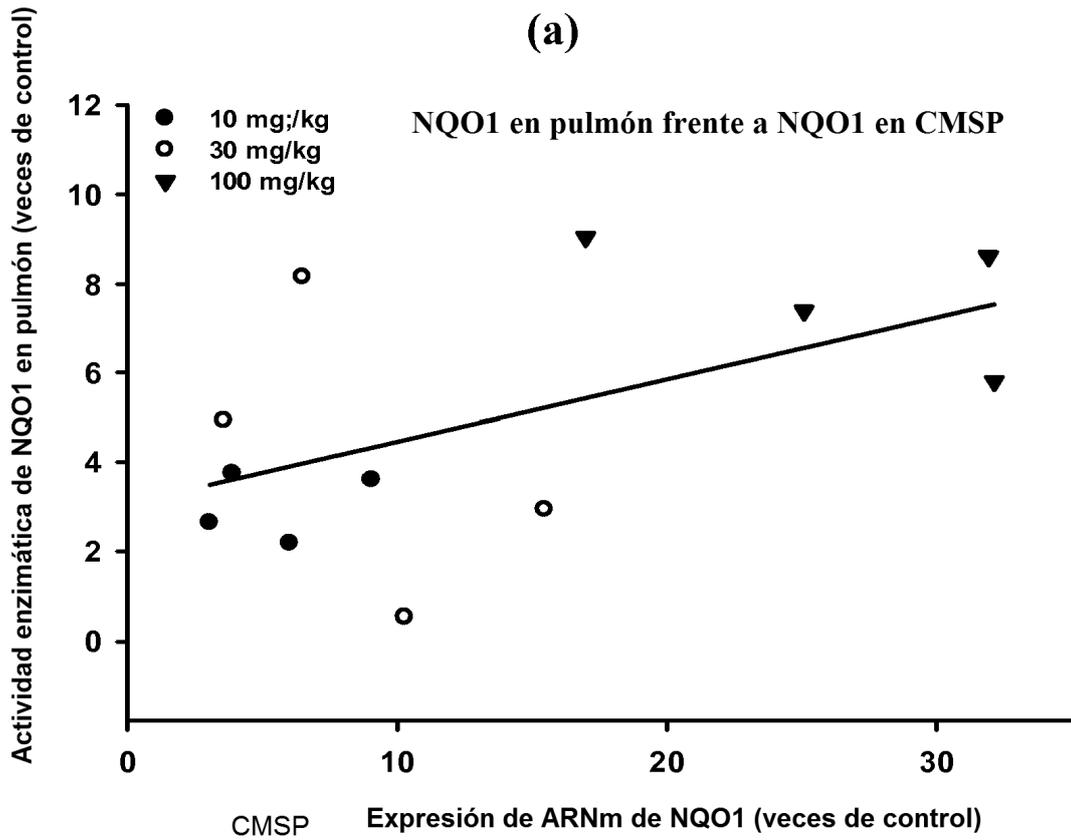


(b)

FIGS. 30a y b



(a)



(b)

FIGS. 31a y b

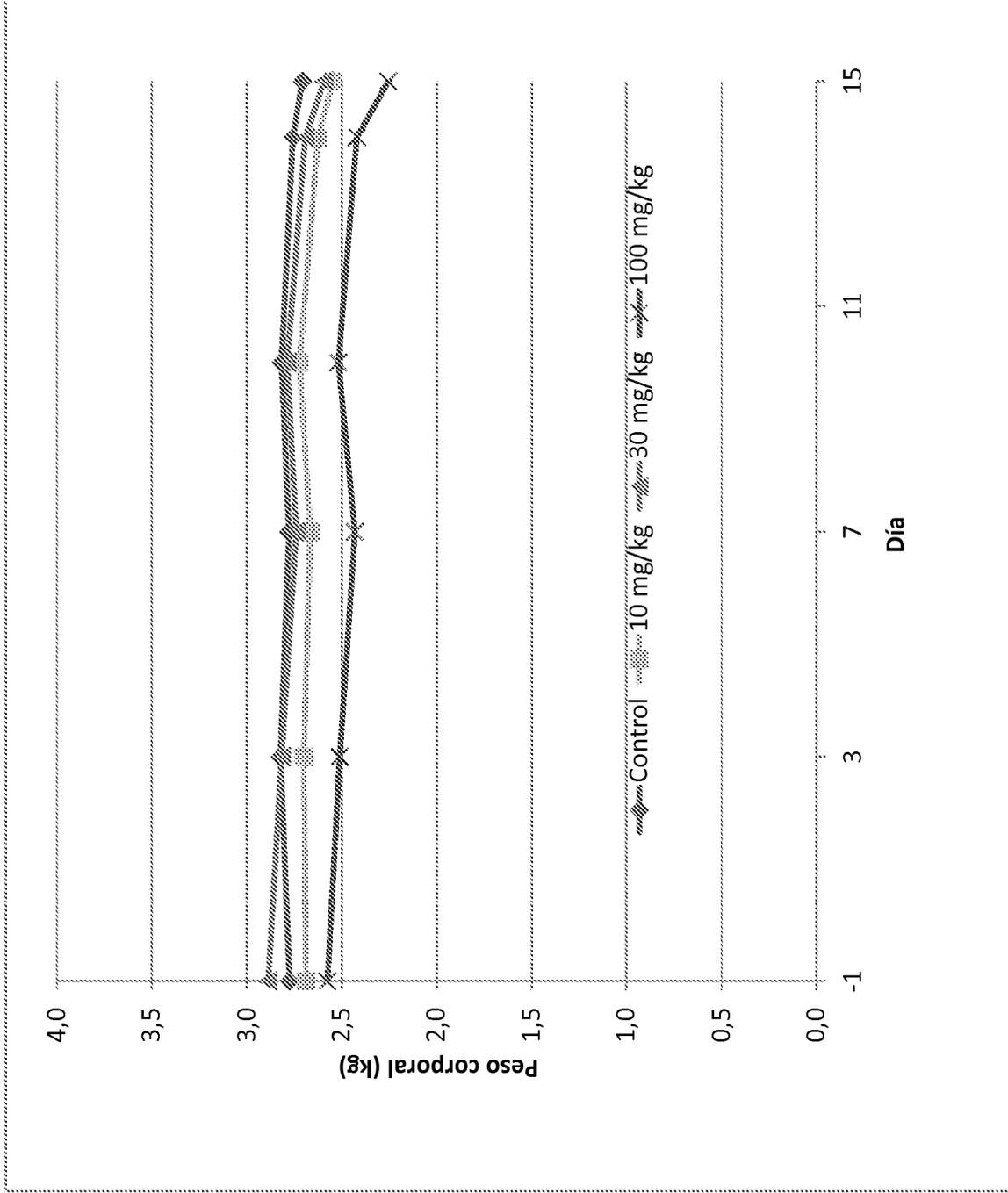


FIG. 32

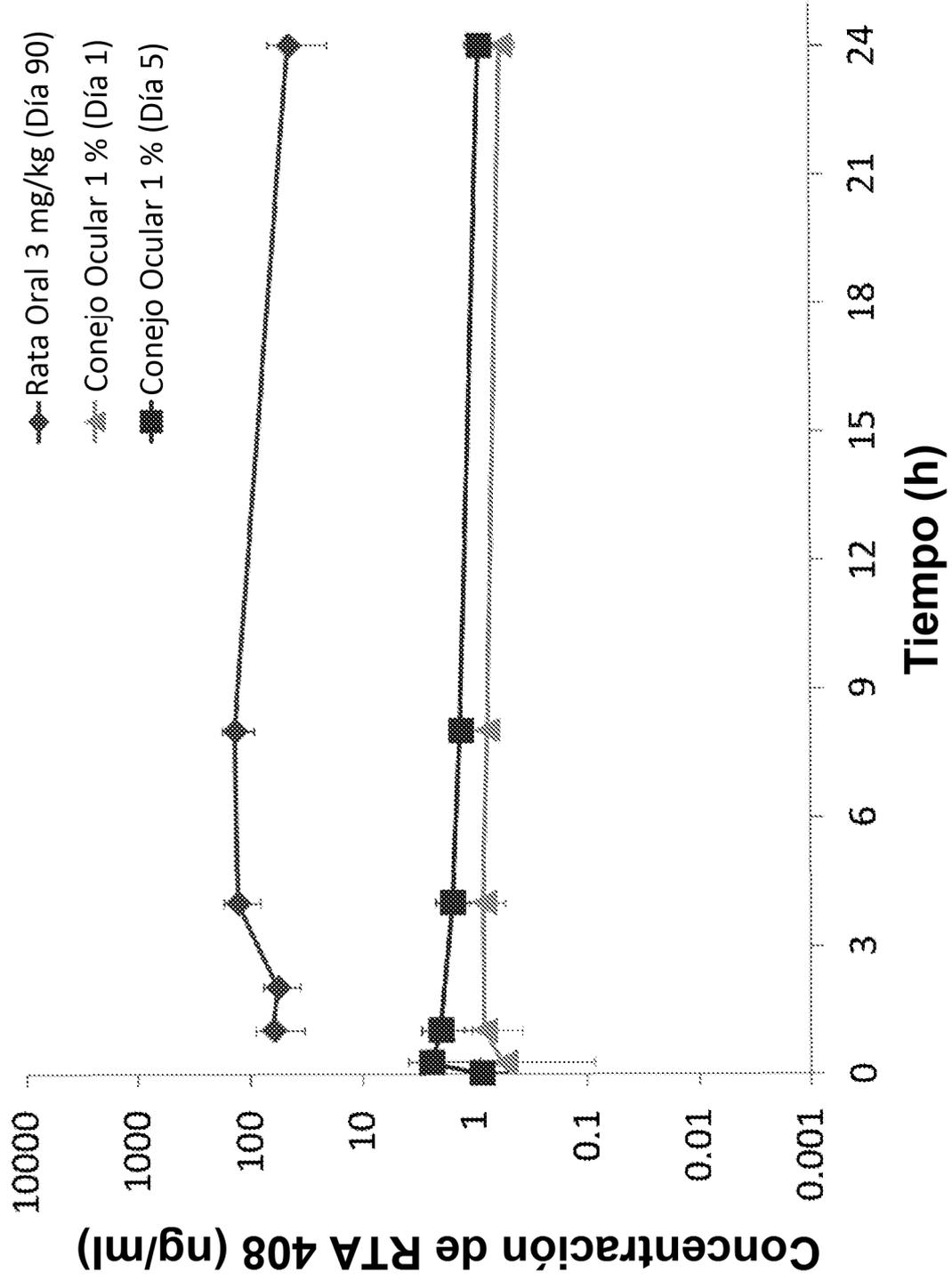


FIG. 33

Efecto de RTA 408 sobre la incidencia de dermatitis de grado 3

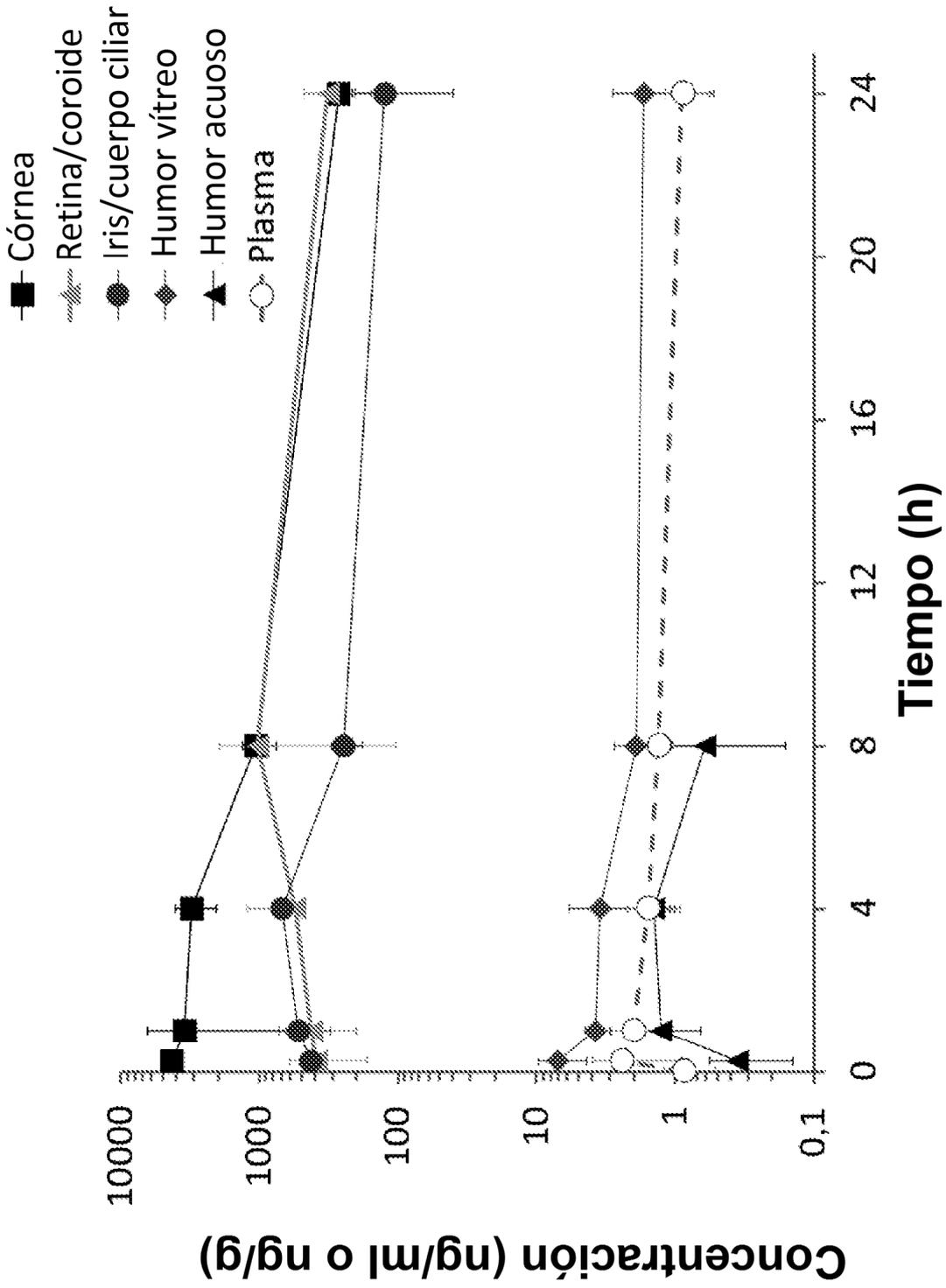


FIG. 35

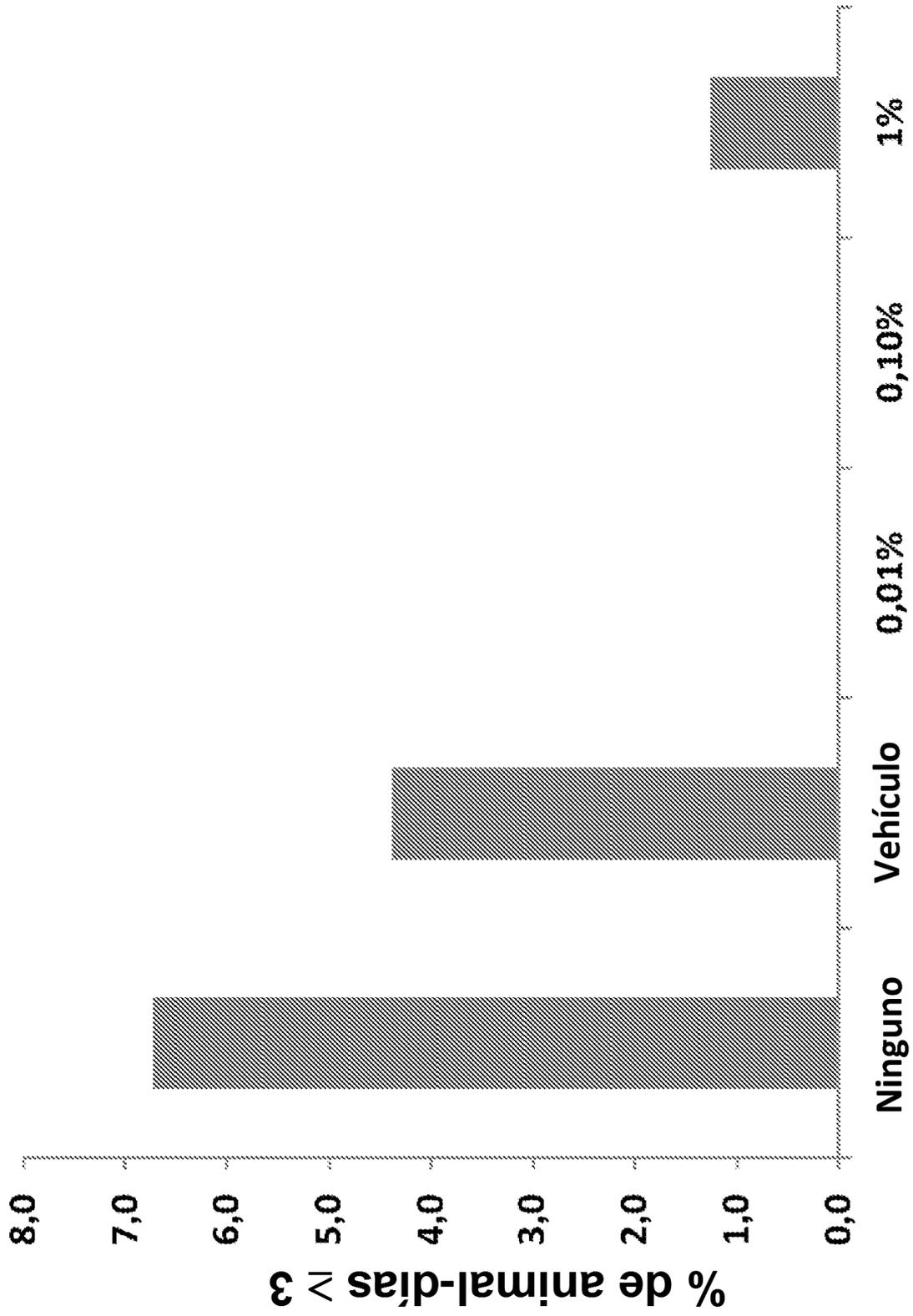


FIG. 36

Efecto de RTA 408 sobre la incidencia de dermatitis de grado 2 hasta el Día 30

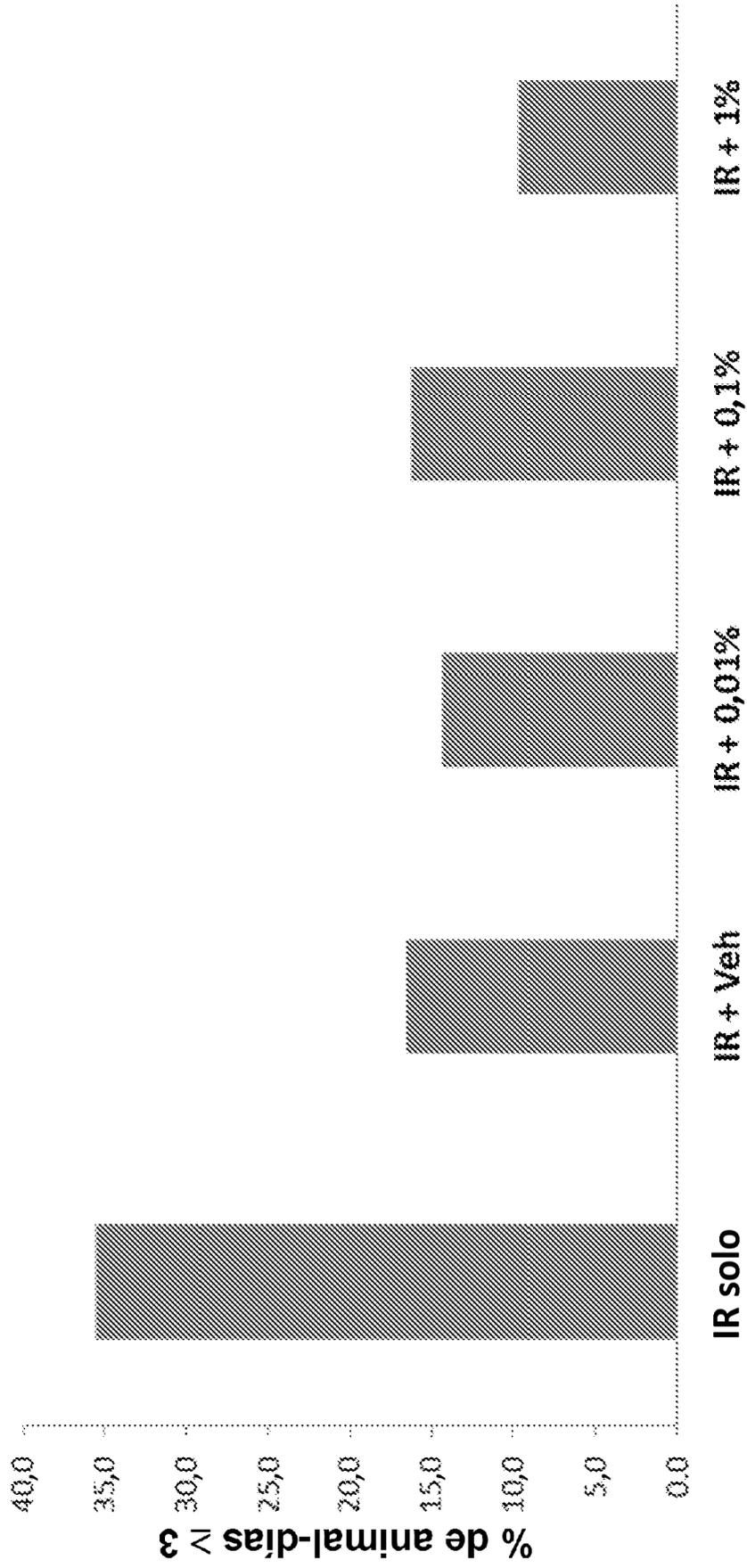


FIG. 37

Efecto de RTA 408 sobre la incidencia de dermatitis de grado 3 hasta el Día 28

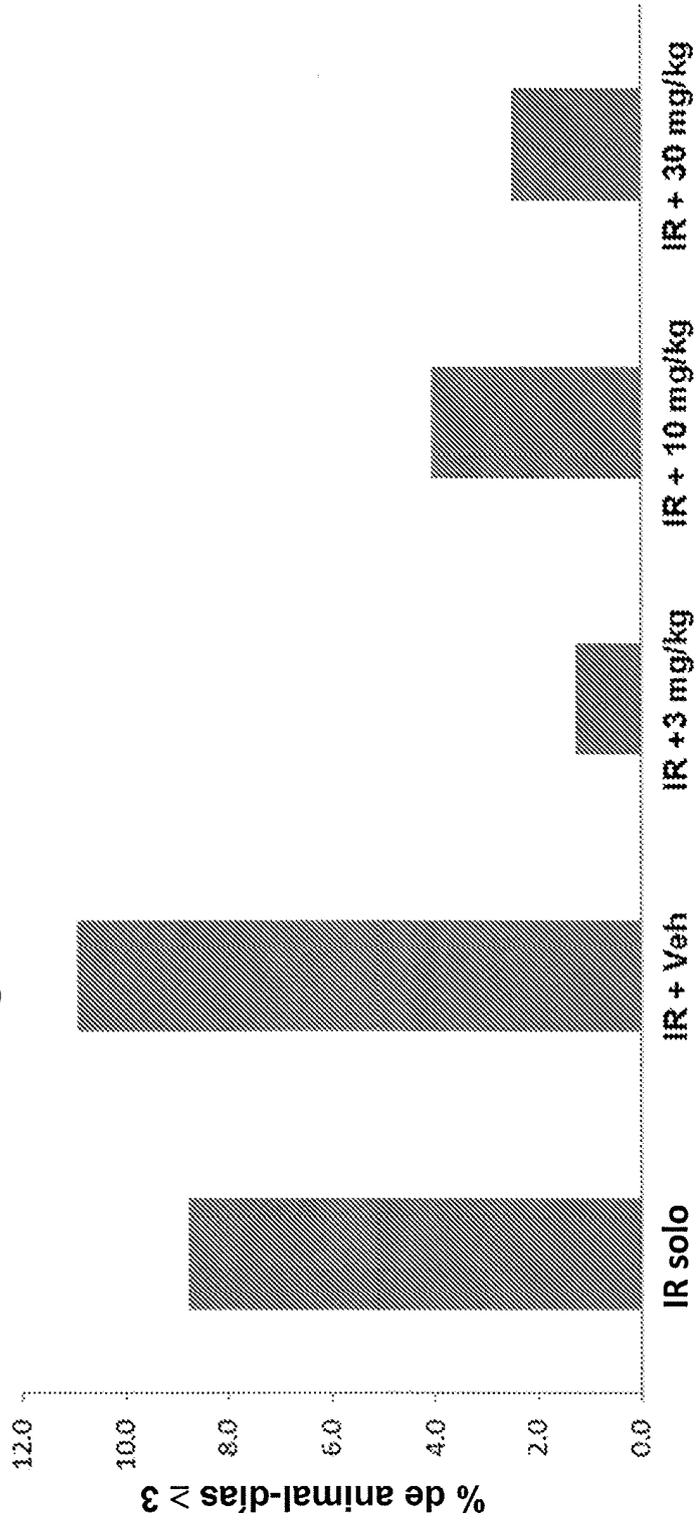


FIG. 38

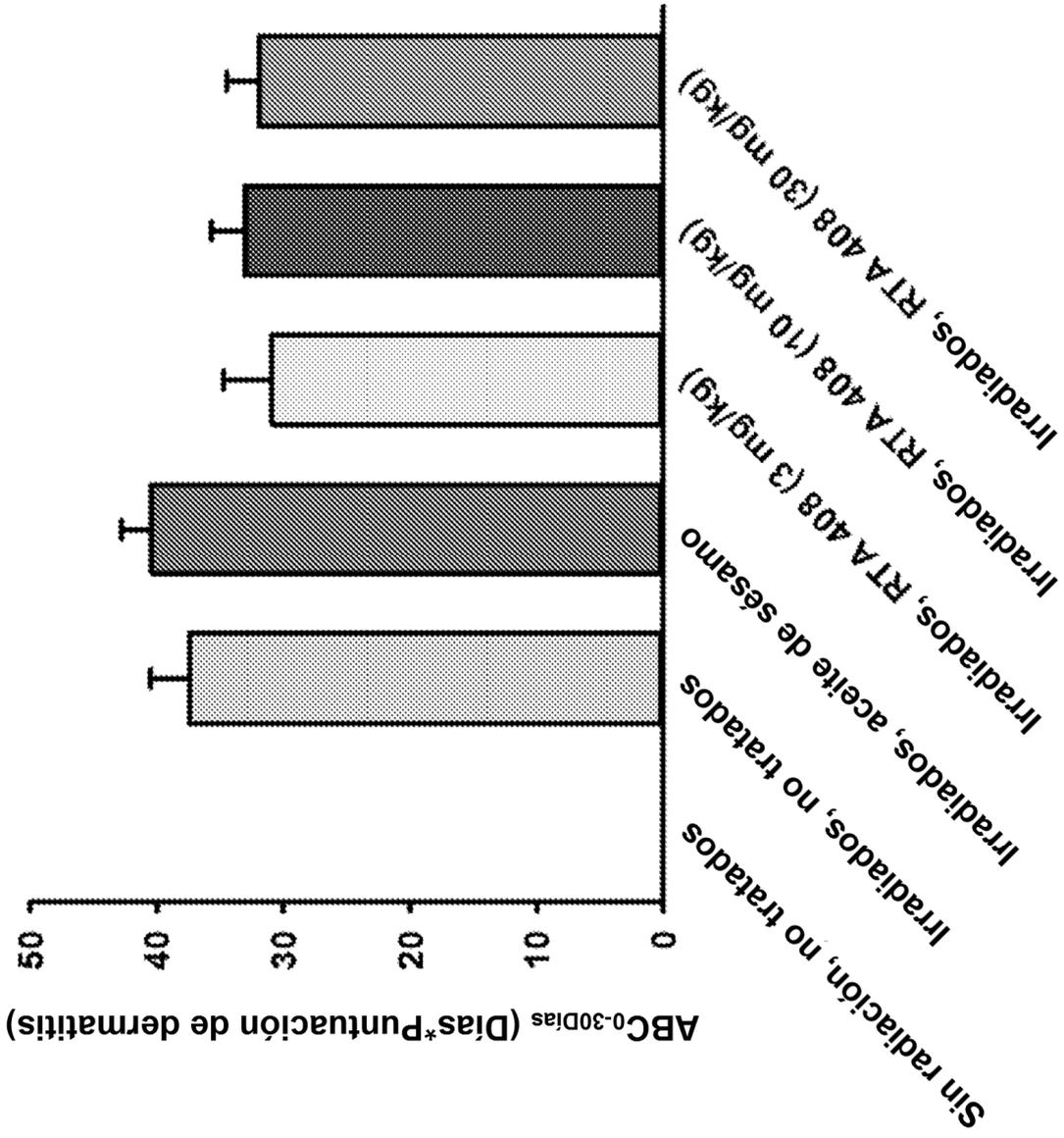


FIG 39a

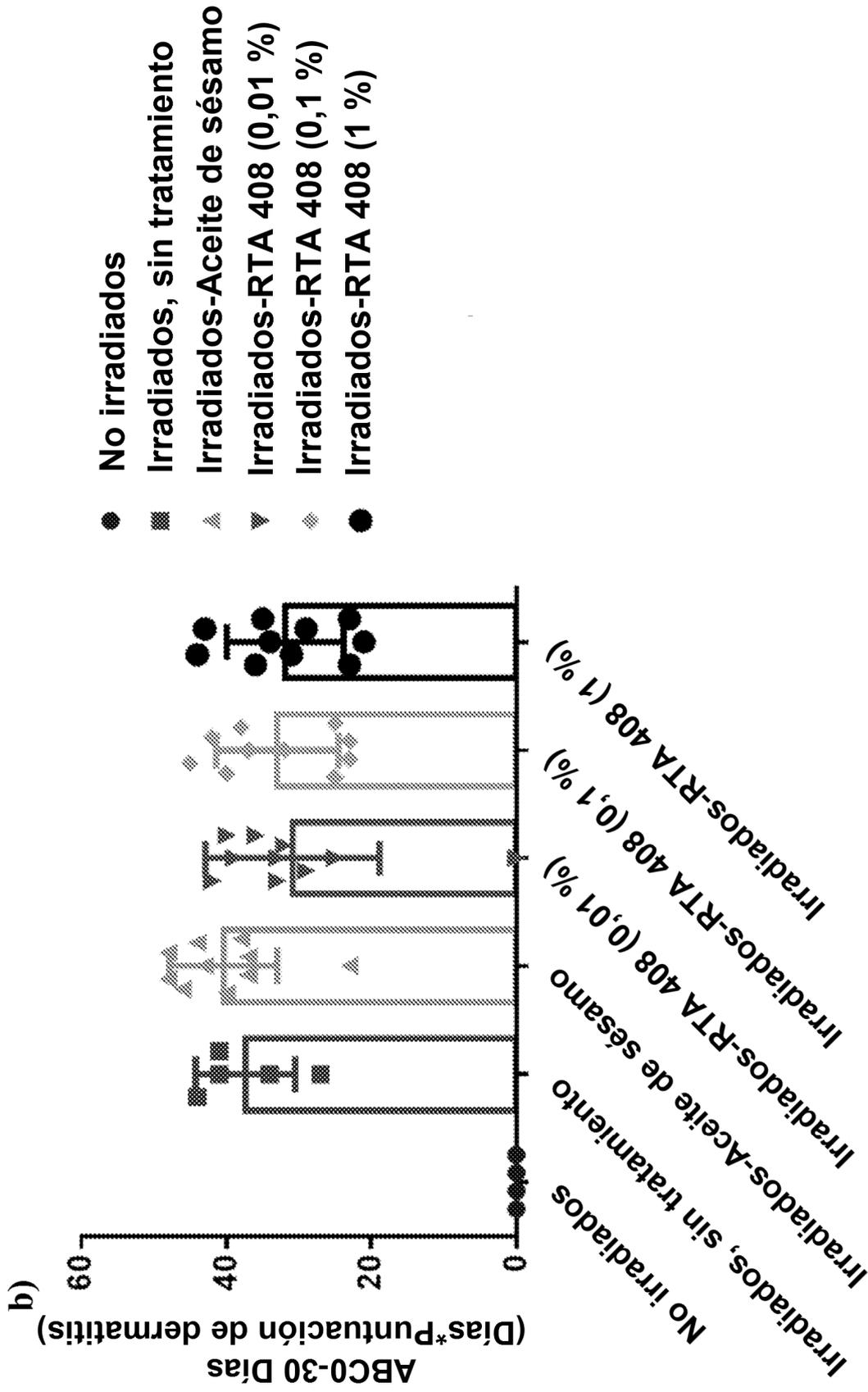


FIG 39b

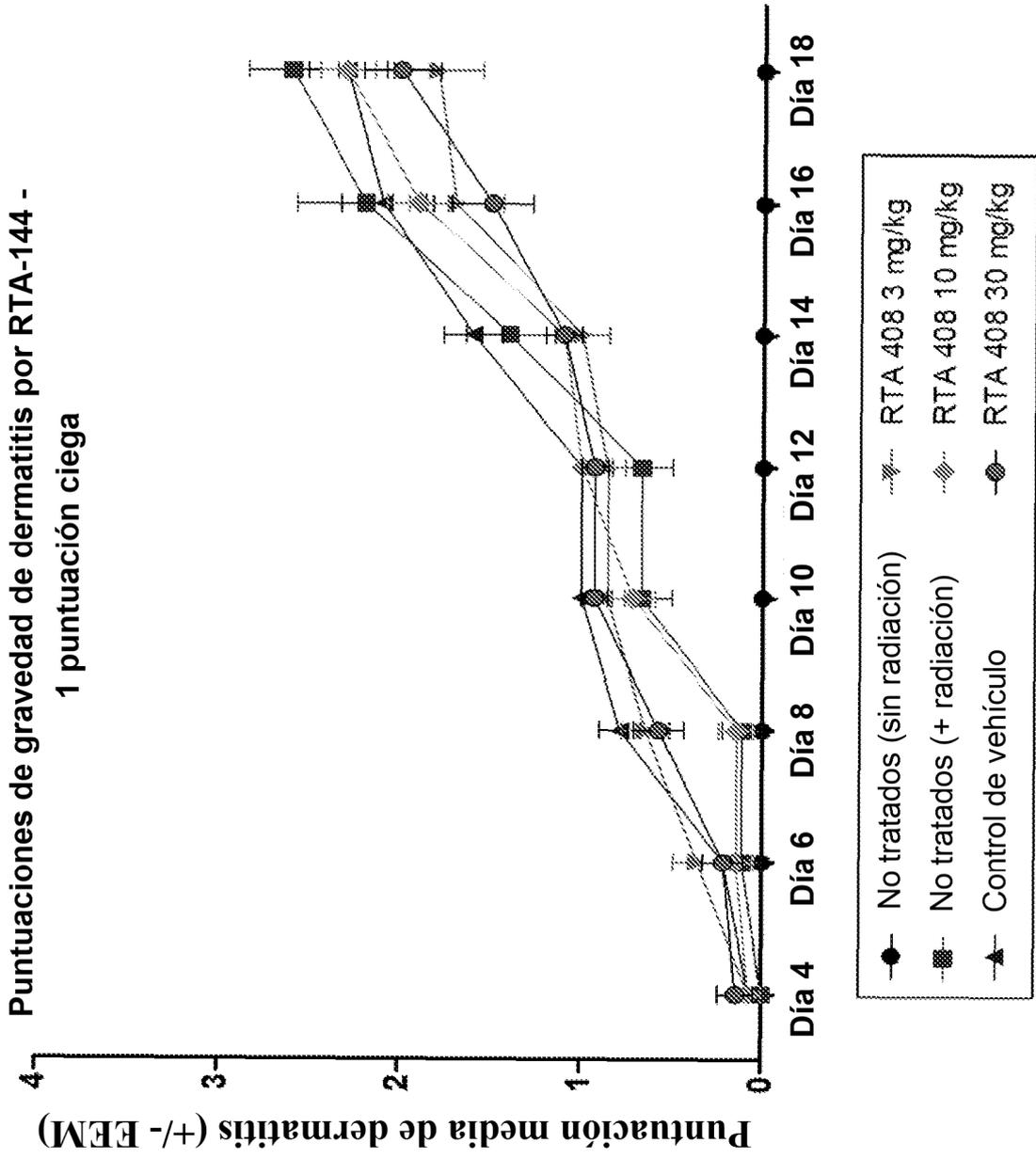


FIG. 40

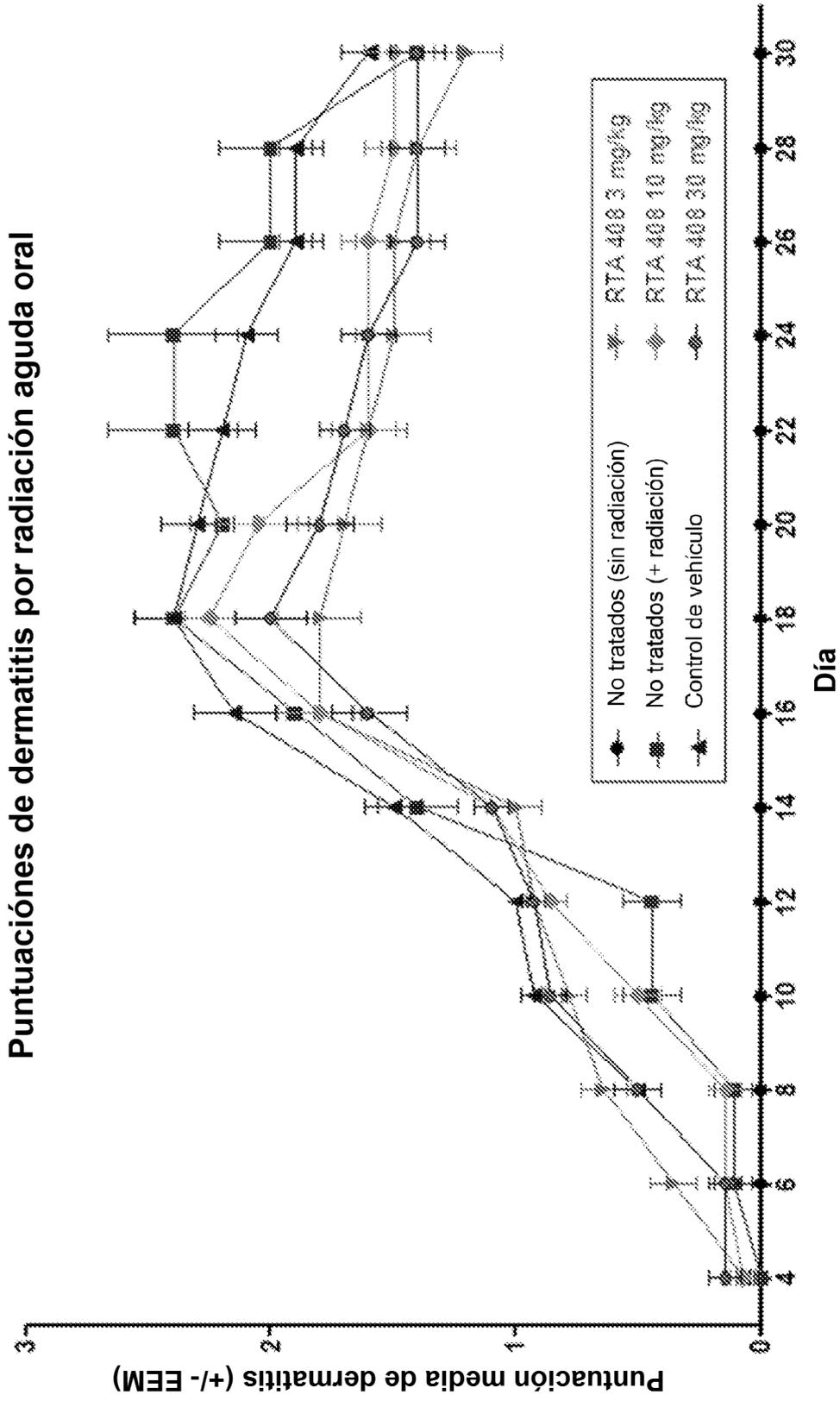


FIG 41

Puntuaciones de dermatitis por radiación aguda tóxica

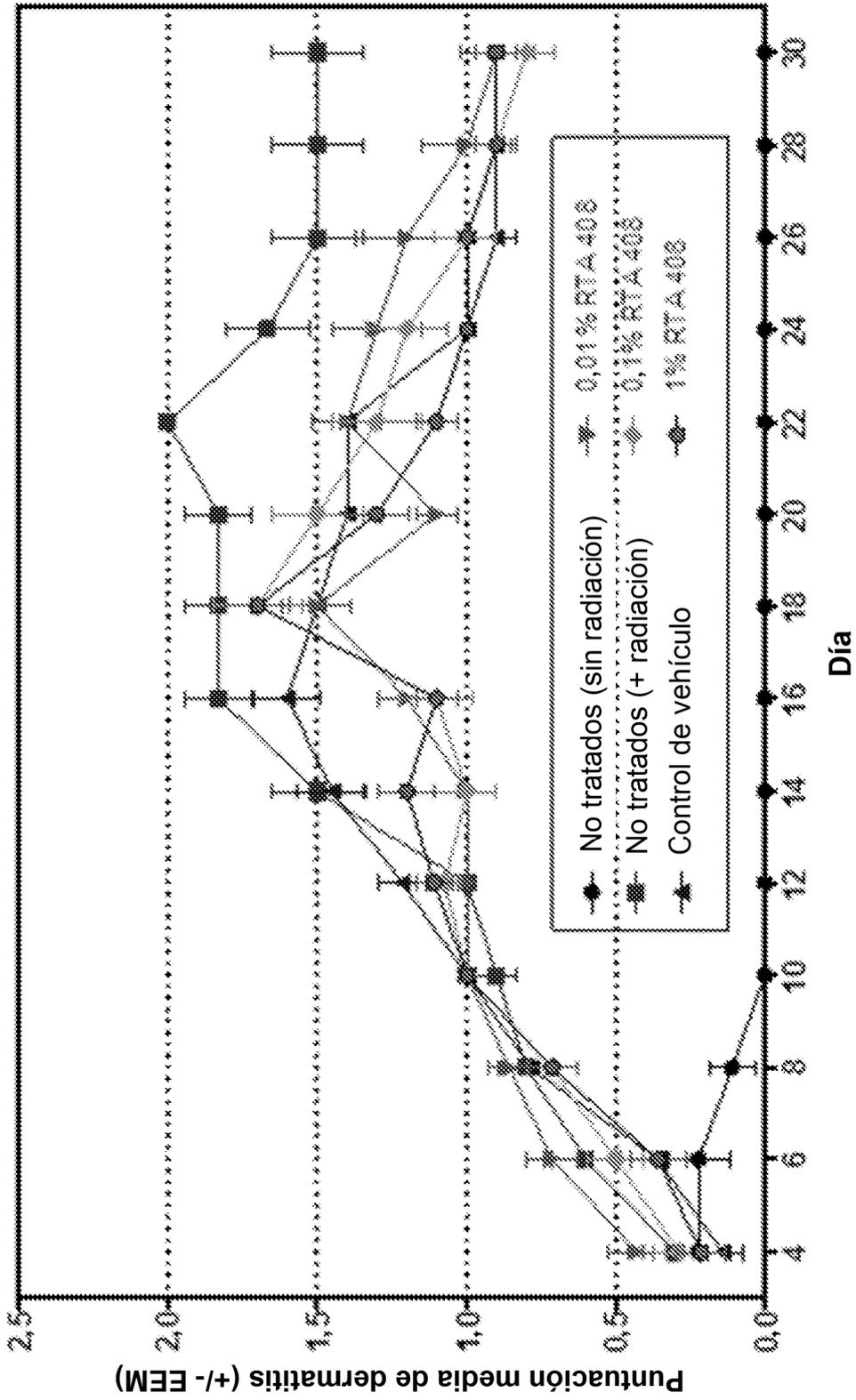


FIG. 42

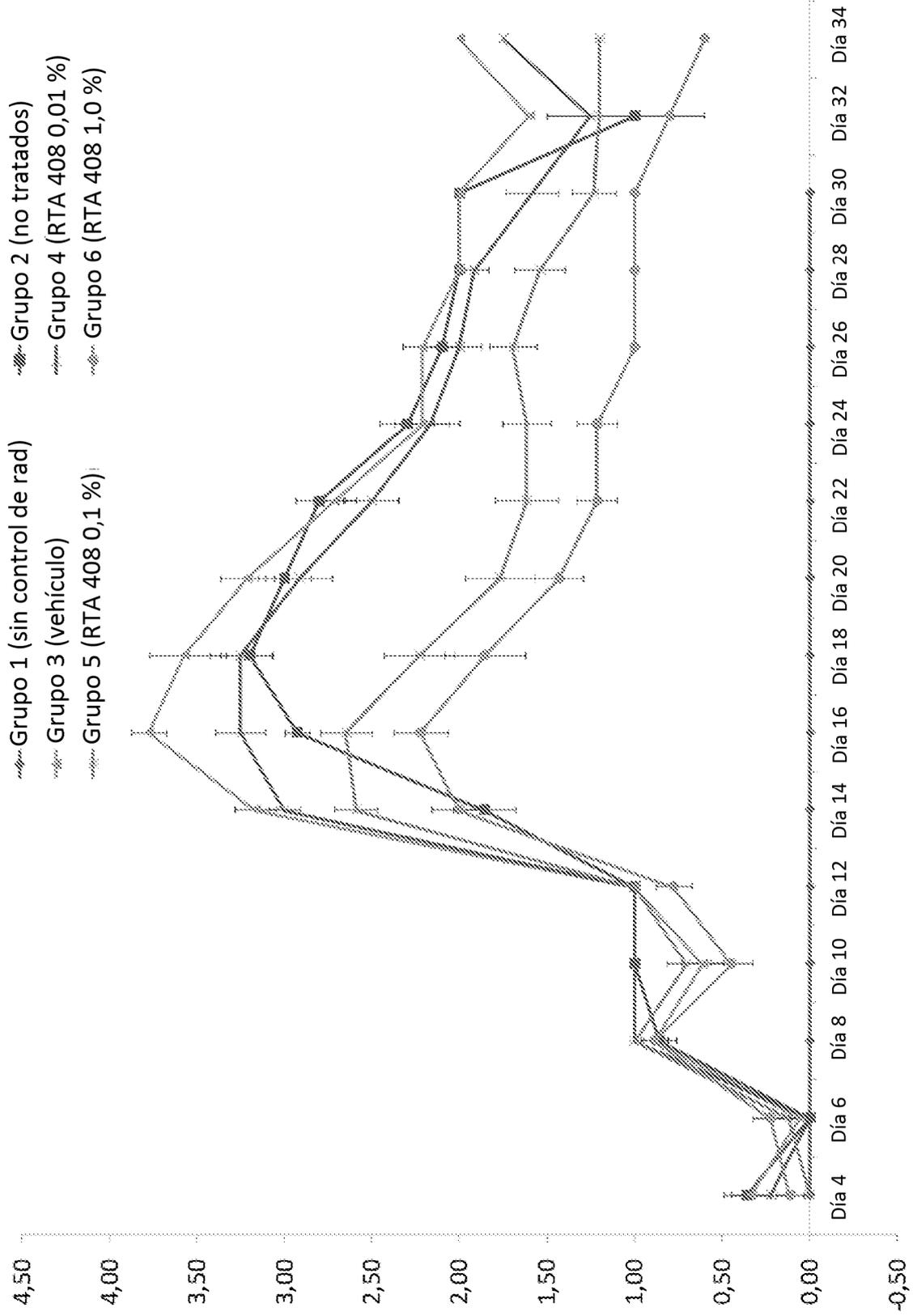


FIG. 43

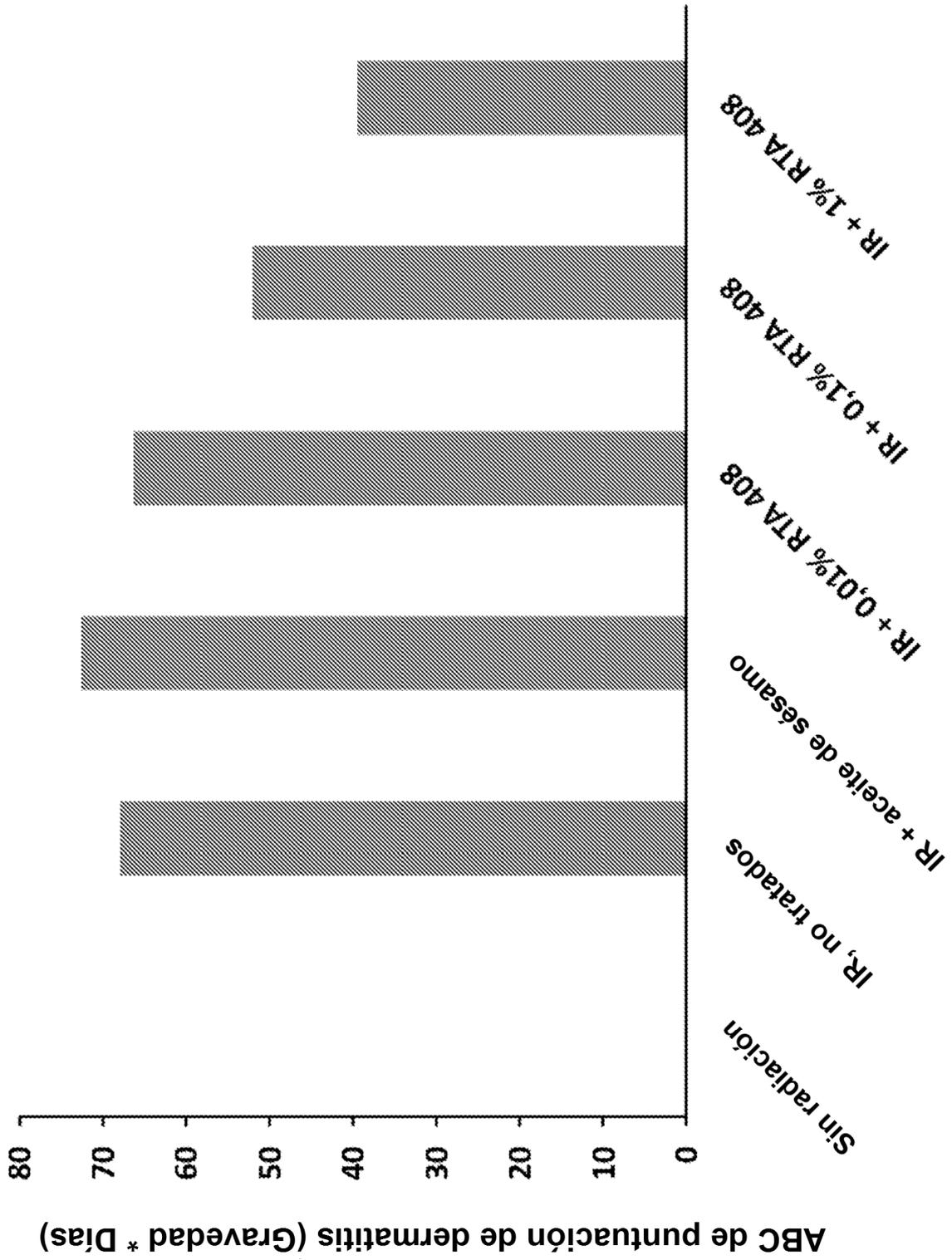


FIG. 44

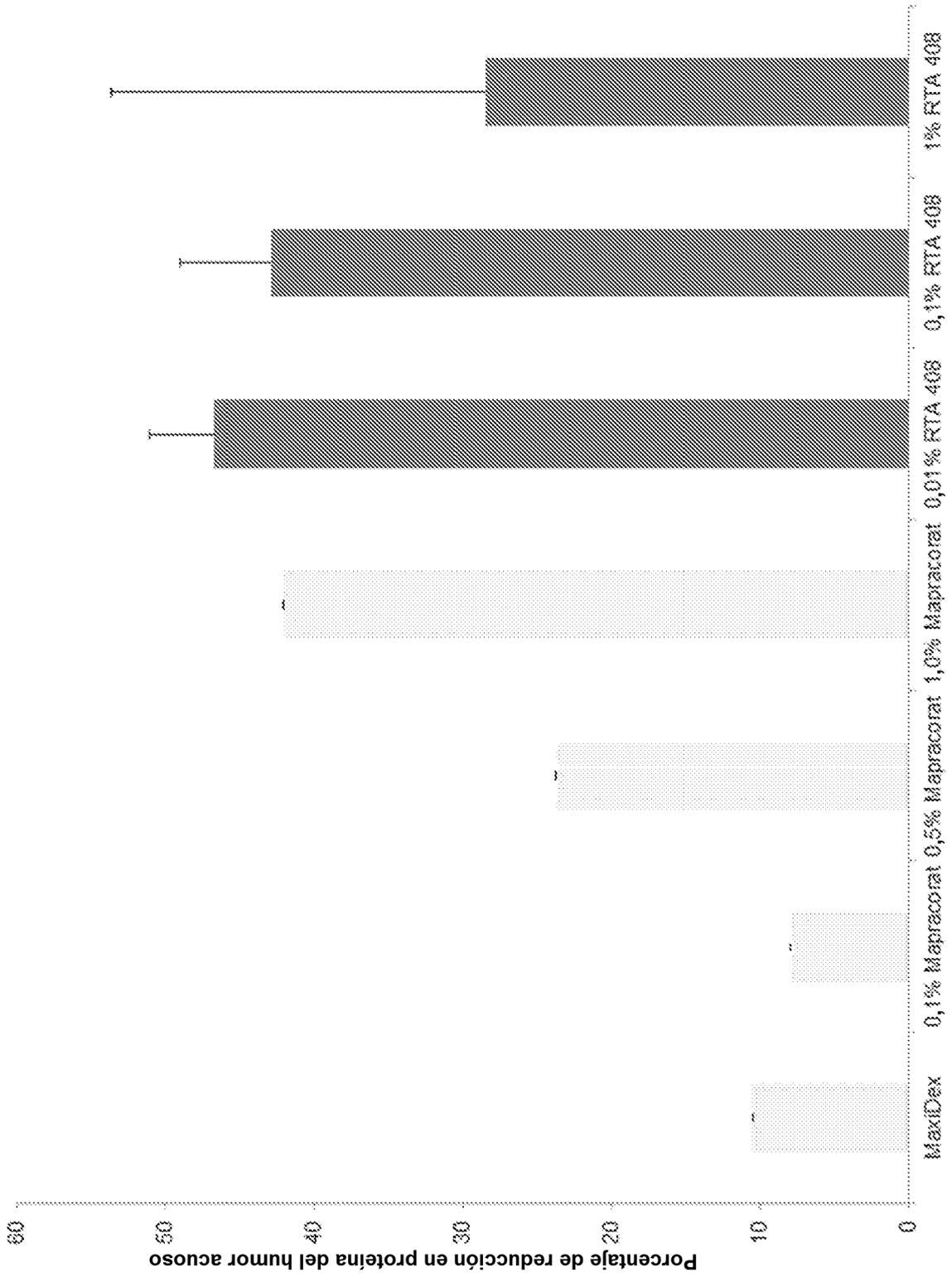


FIG. 45

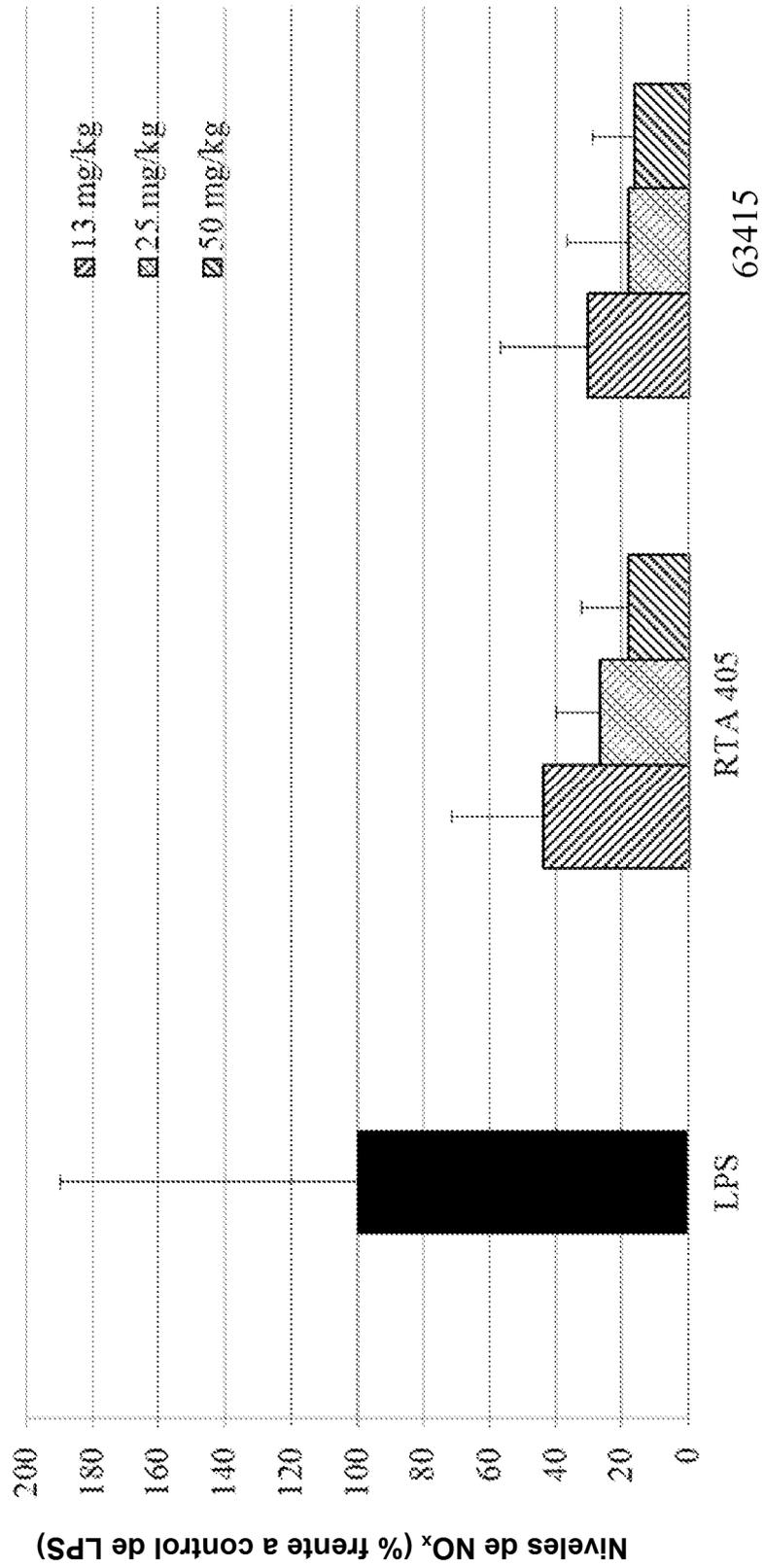


FIG. 46

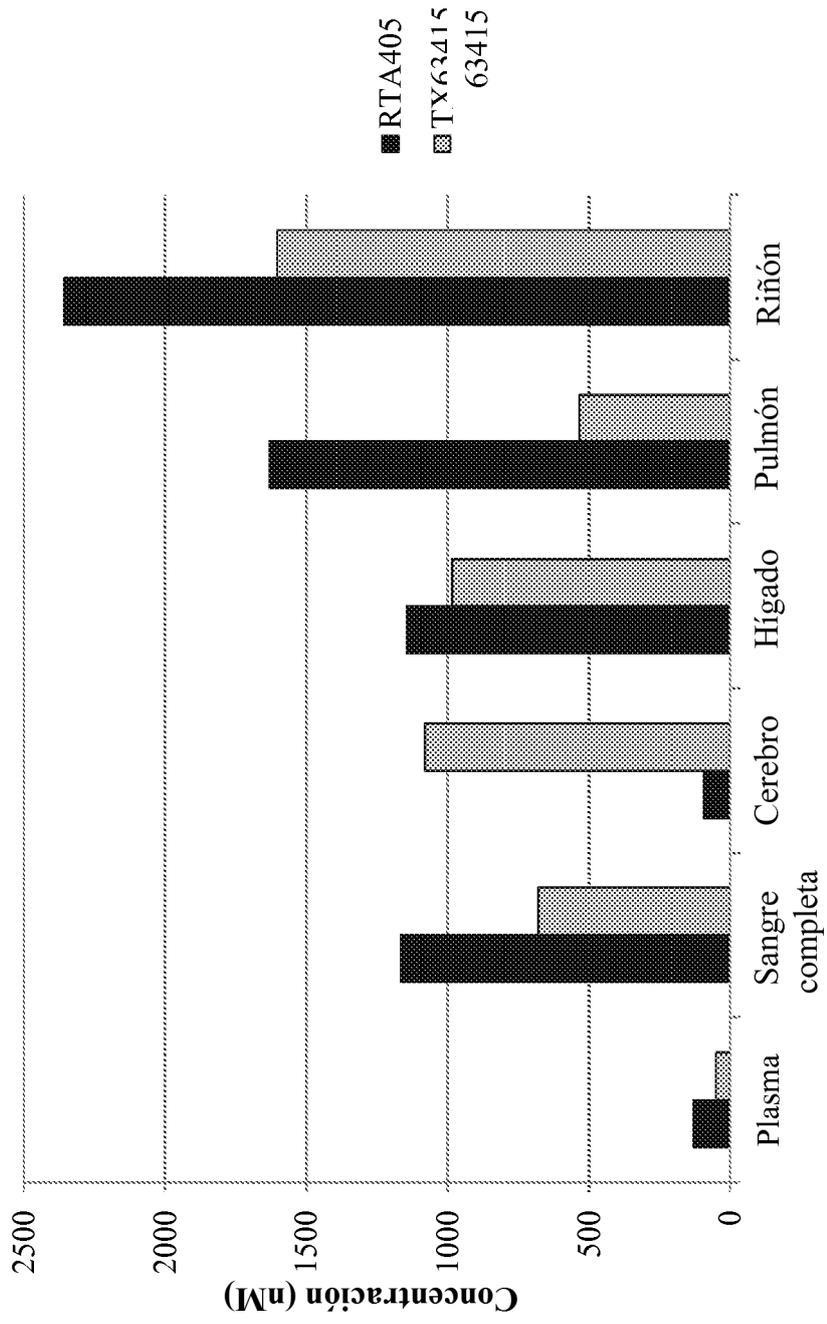


FIG. 47

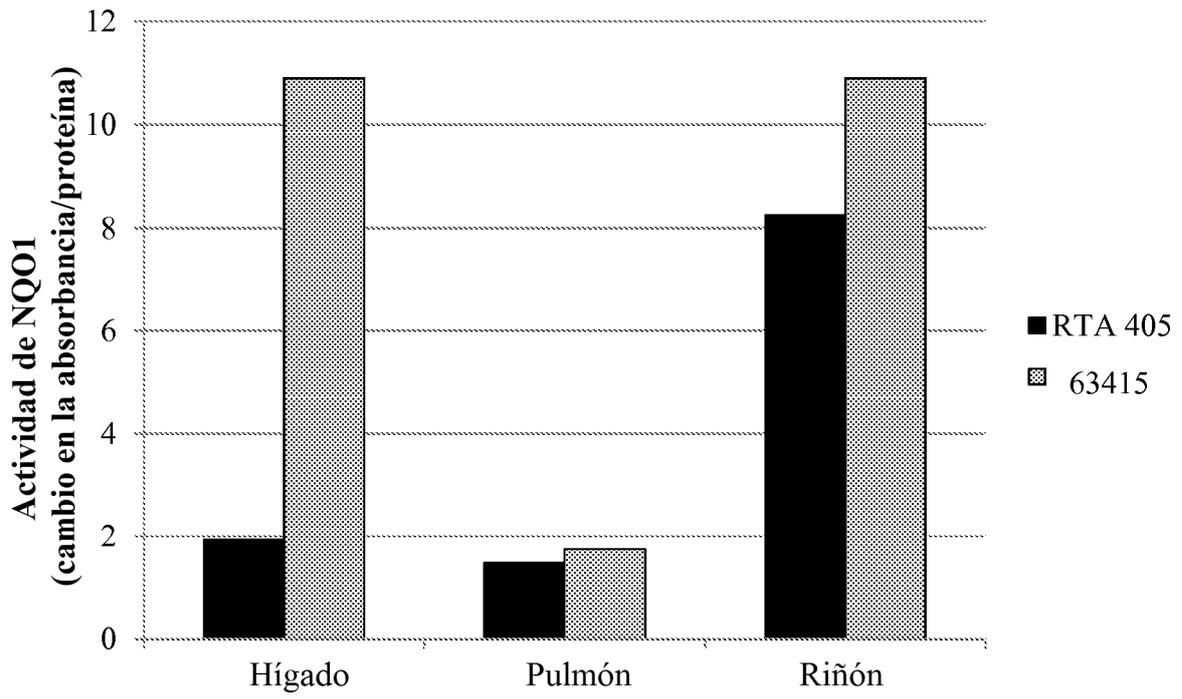


FIG. 48

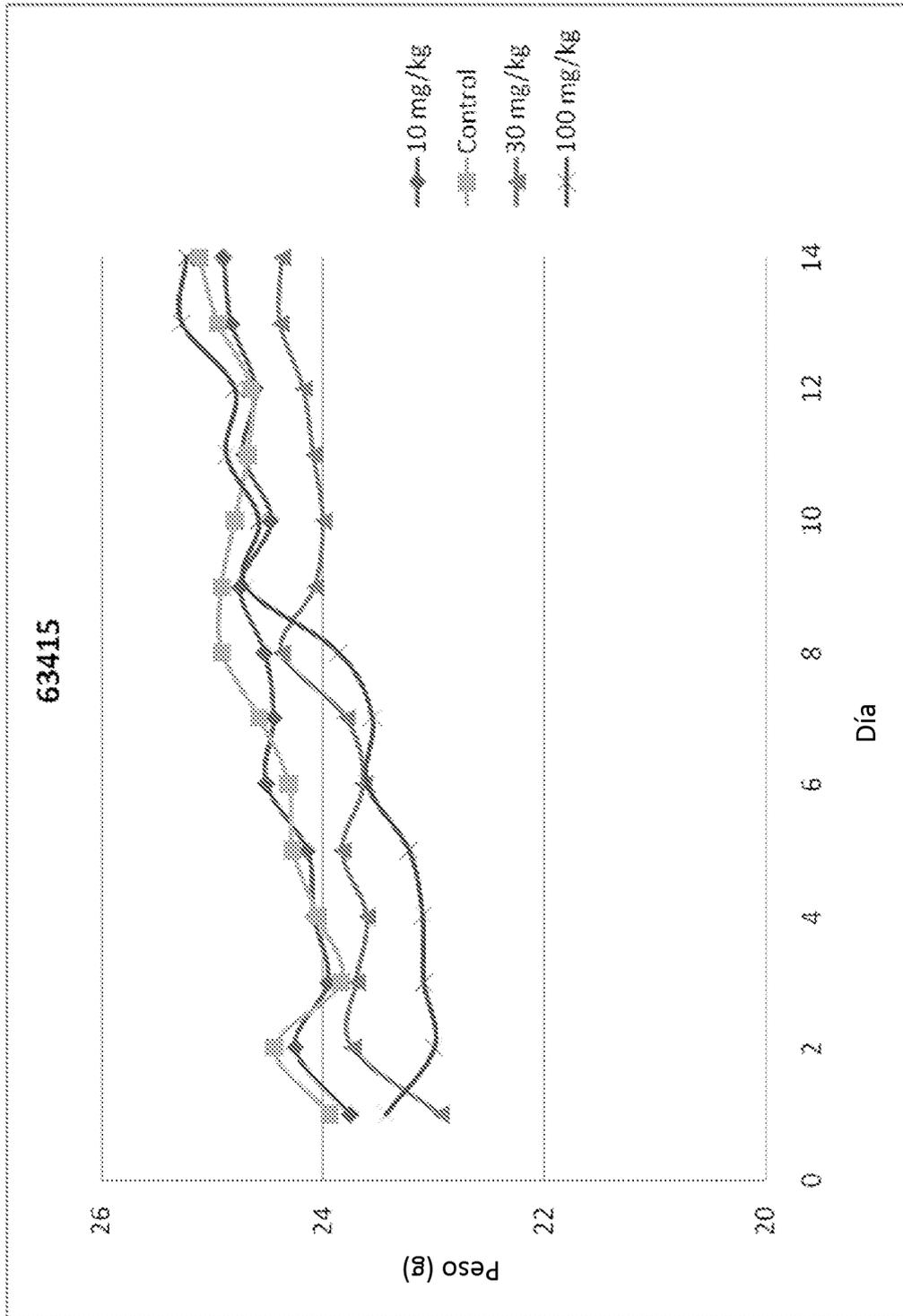


FIG. 49

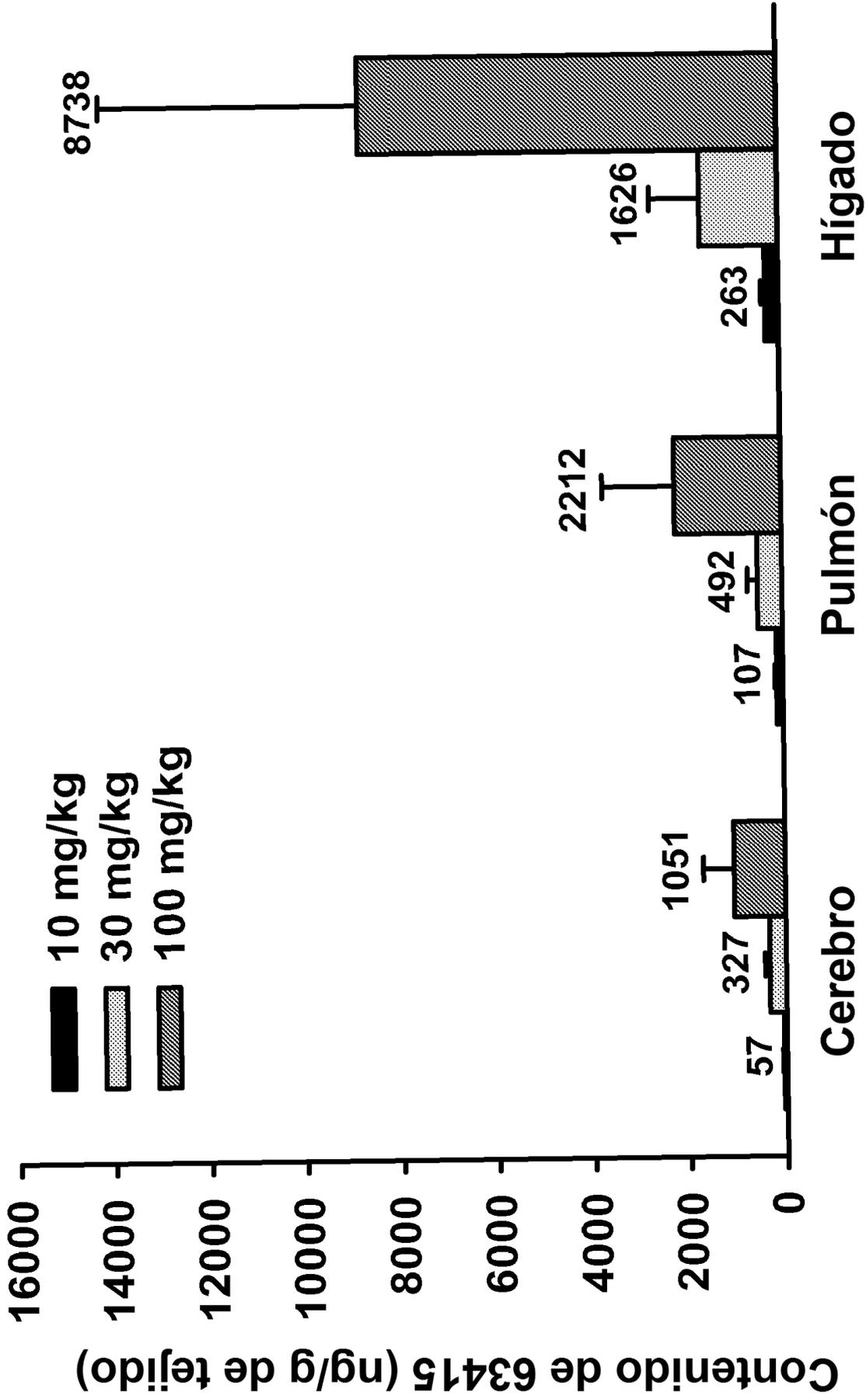


FIG. 50

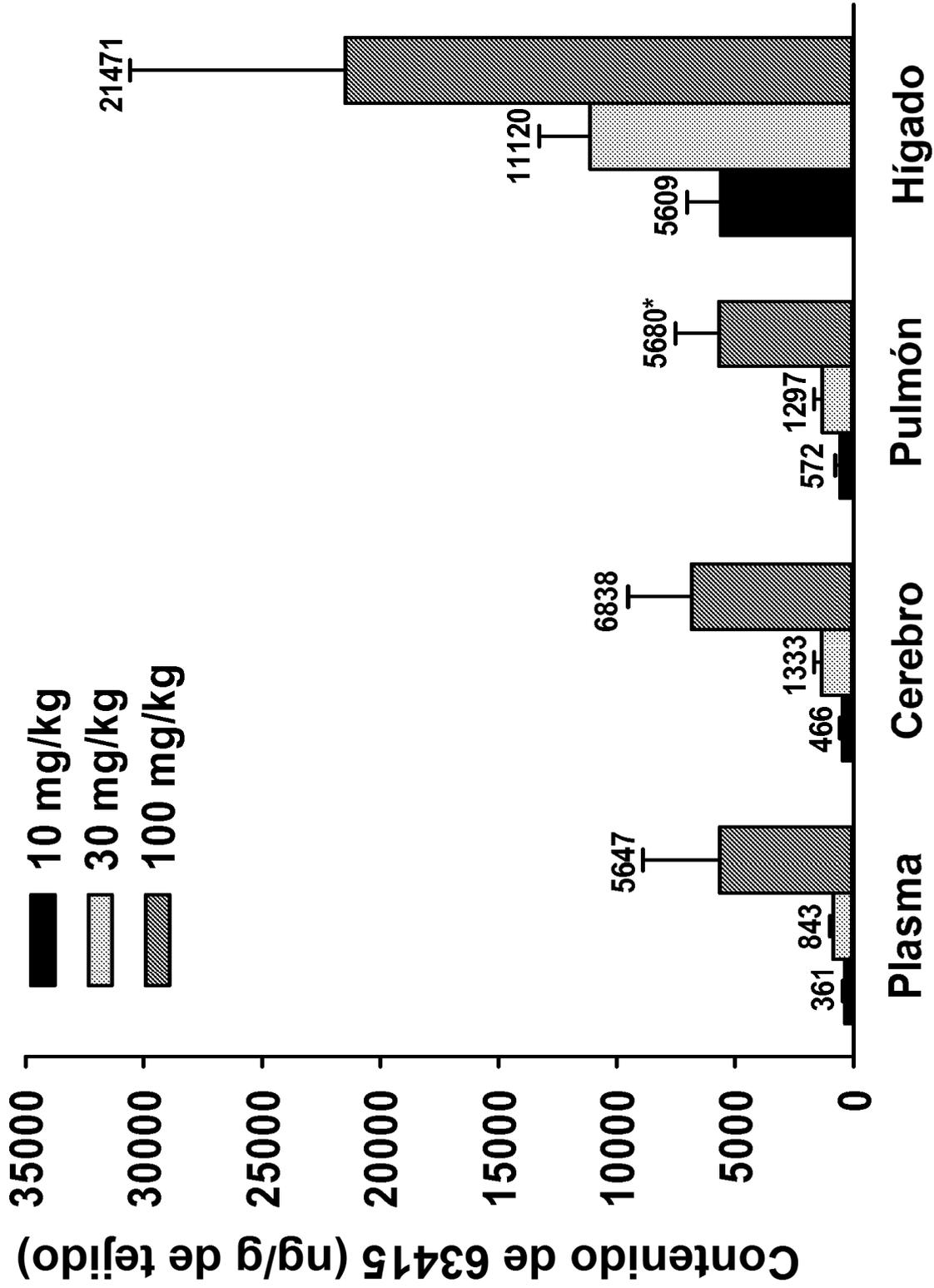


FIG. 51

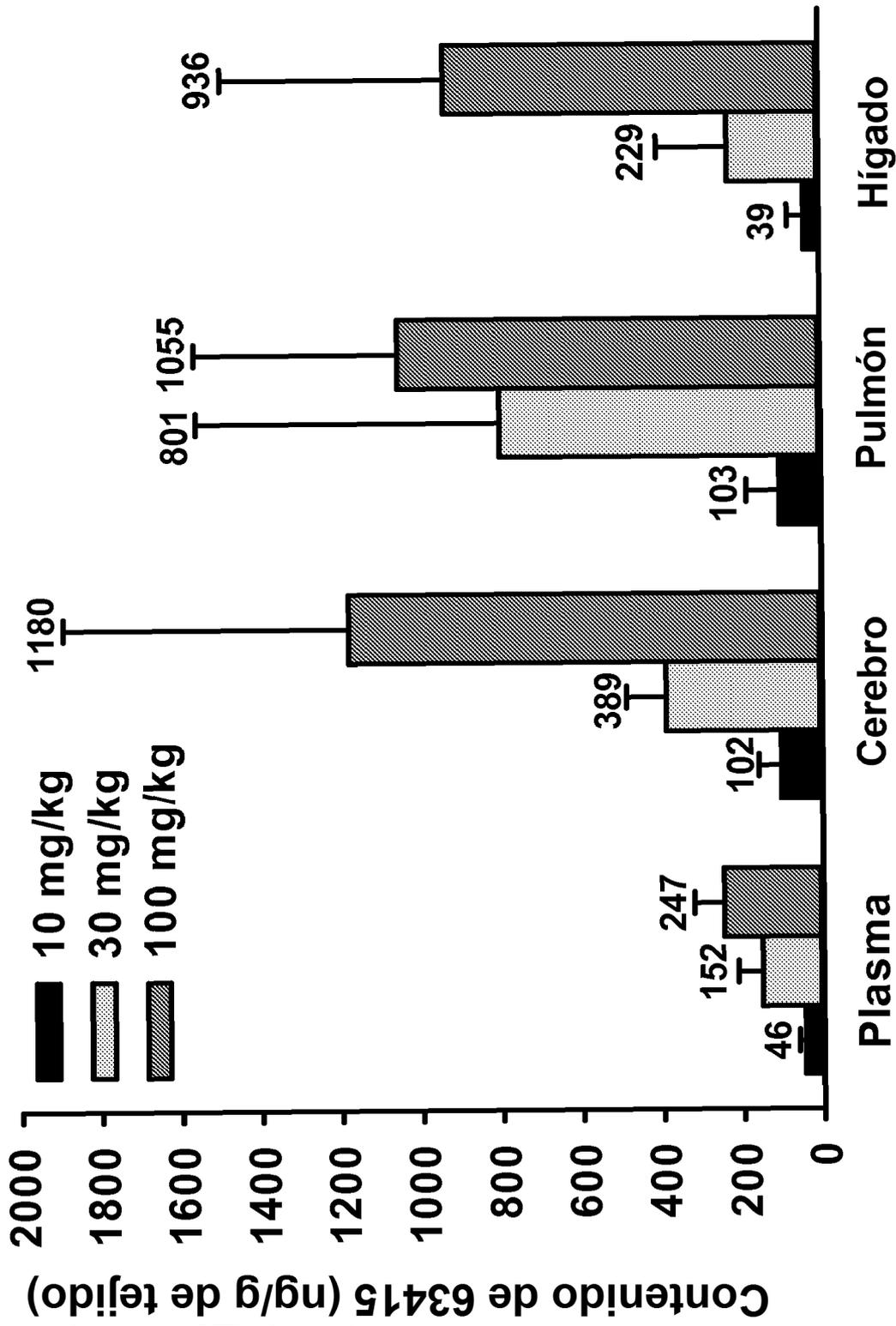
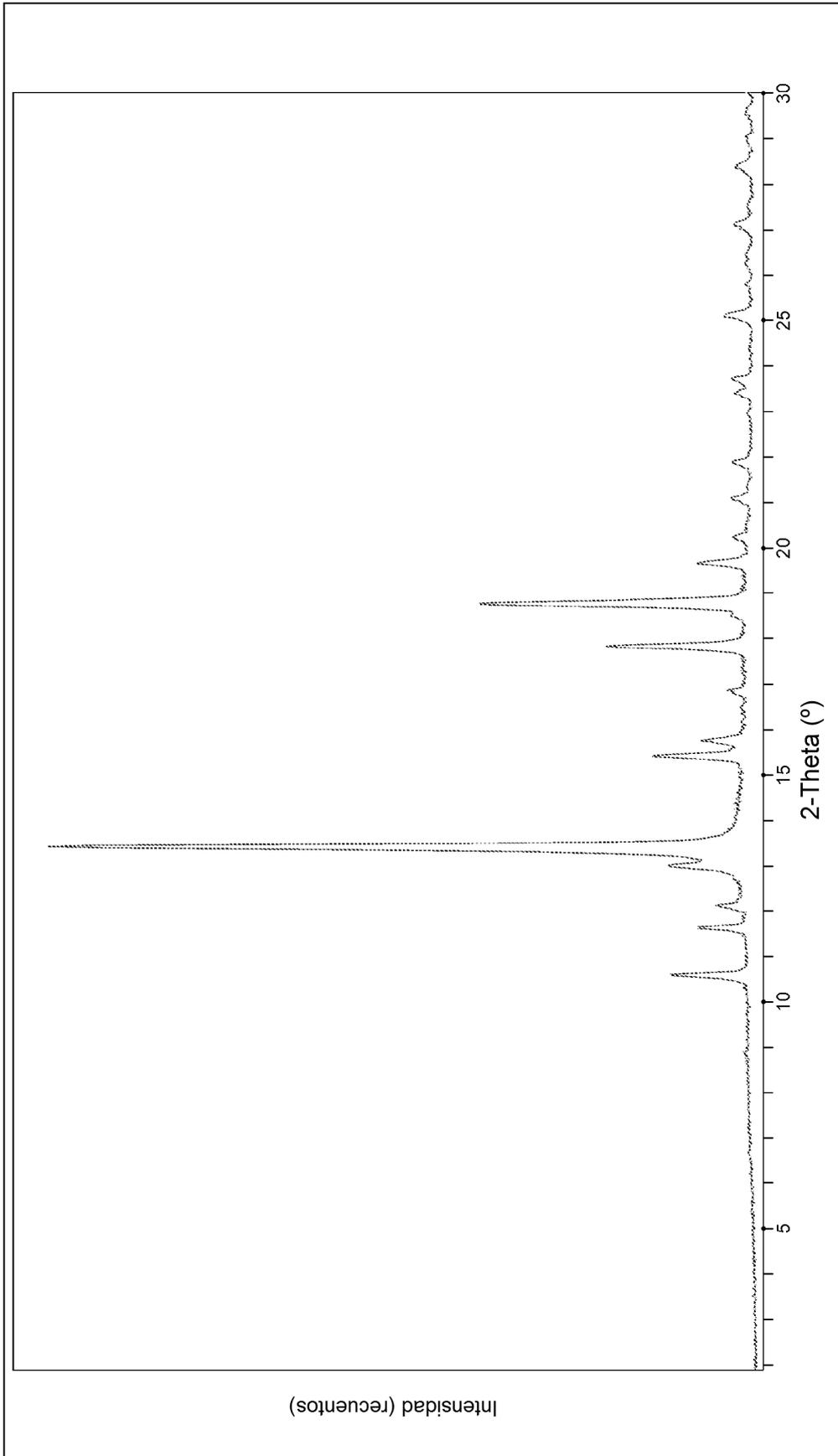
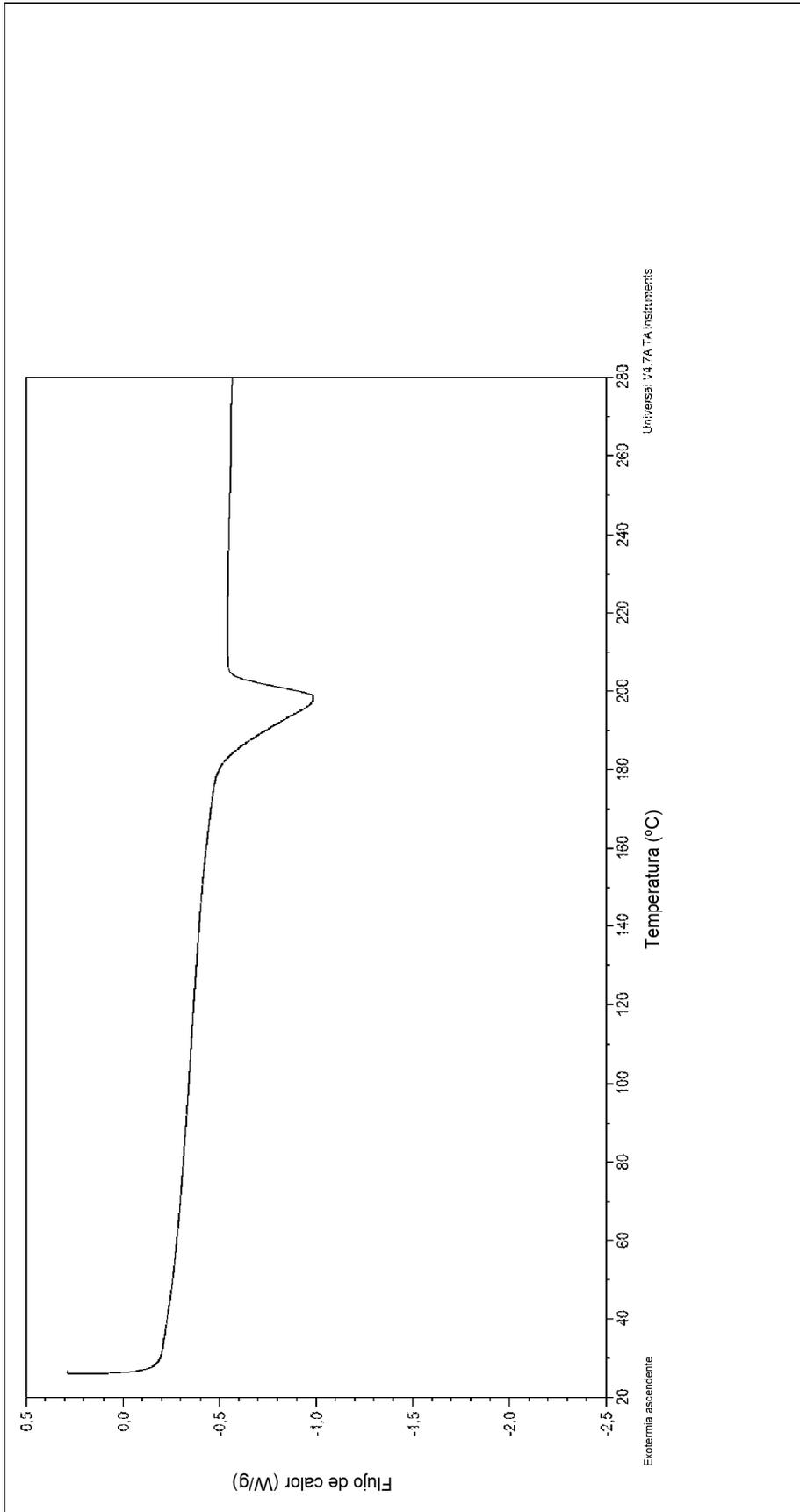


FIG. 52



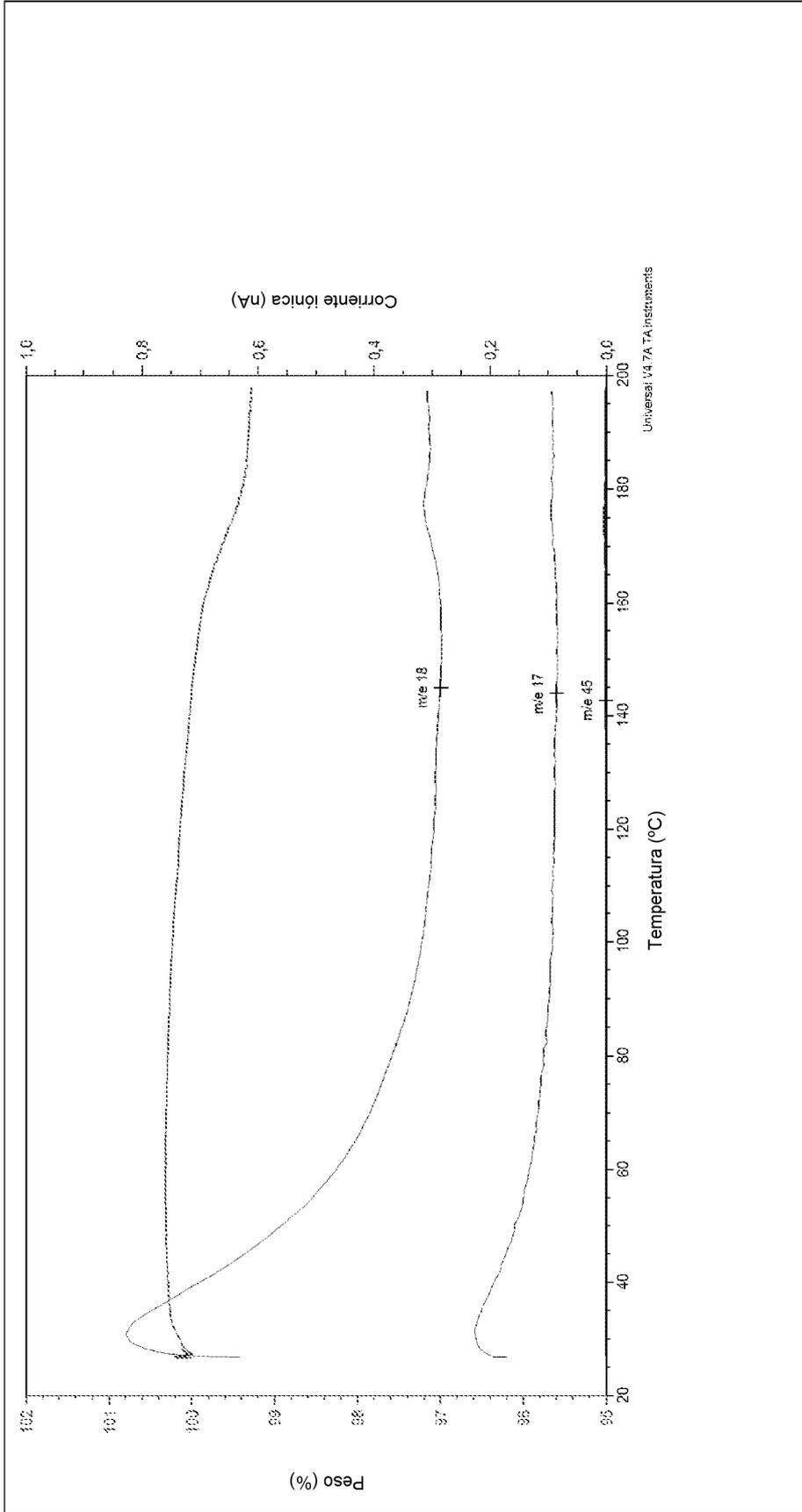
Patrón de PXRD de la forma A de RTA 408

FIG. 53



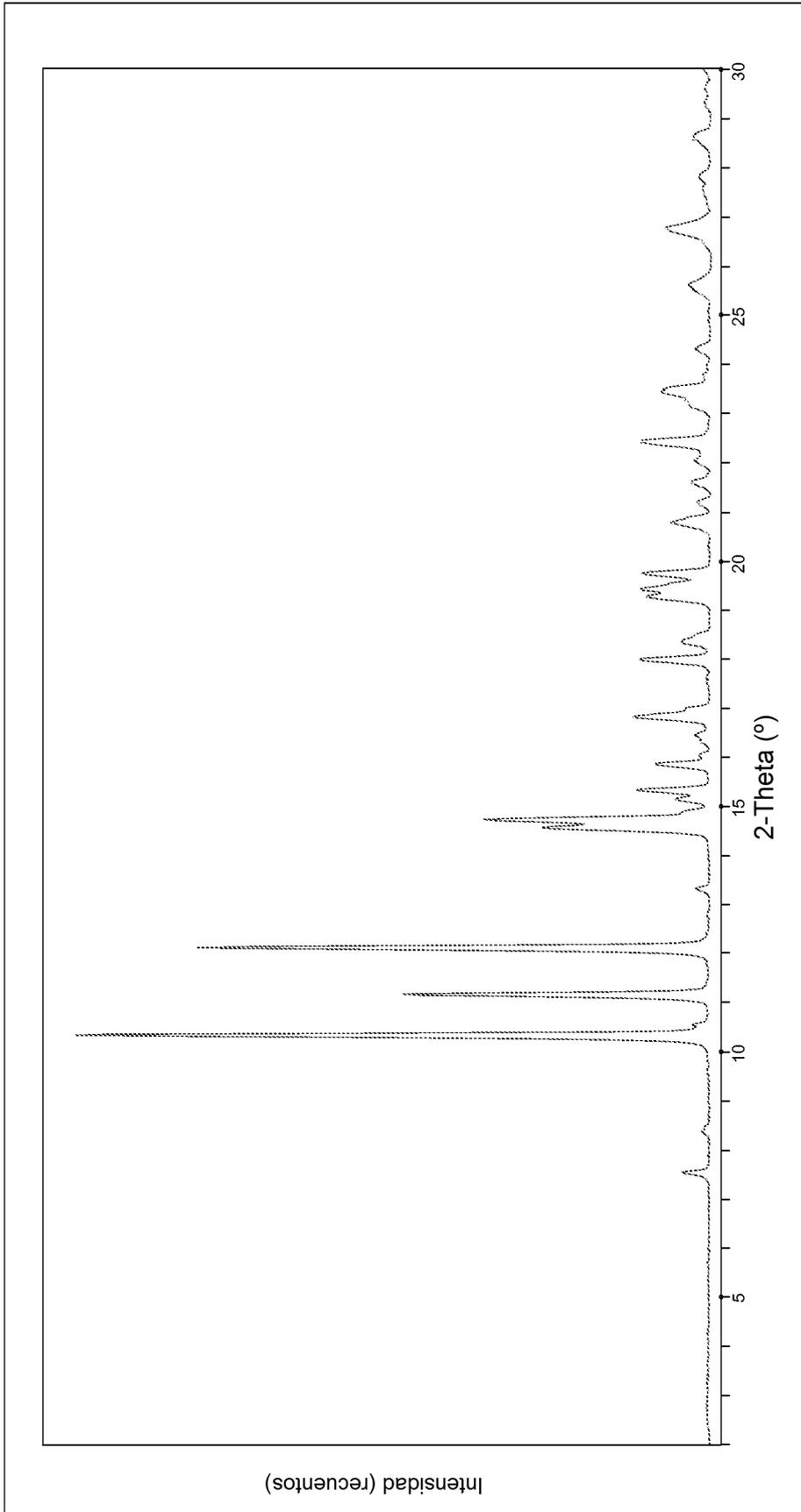
DSC de la forma A de RTA 408

FIG. 54



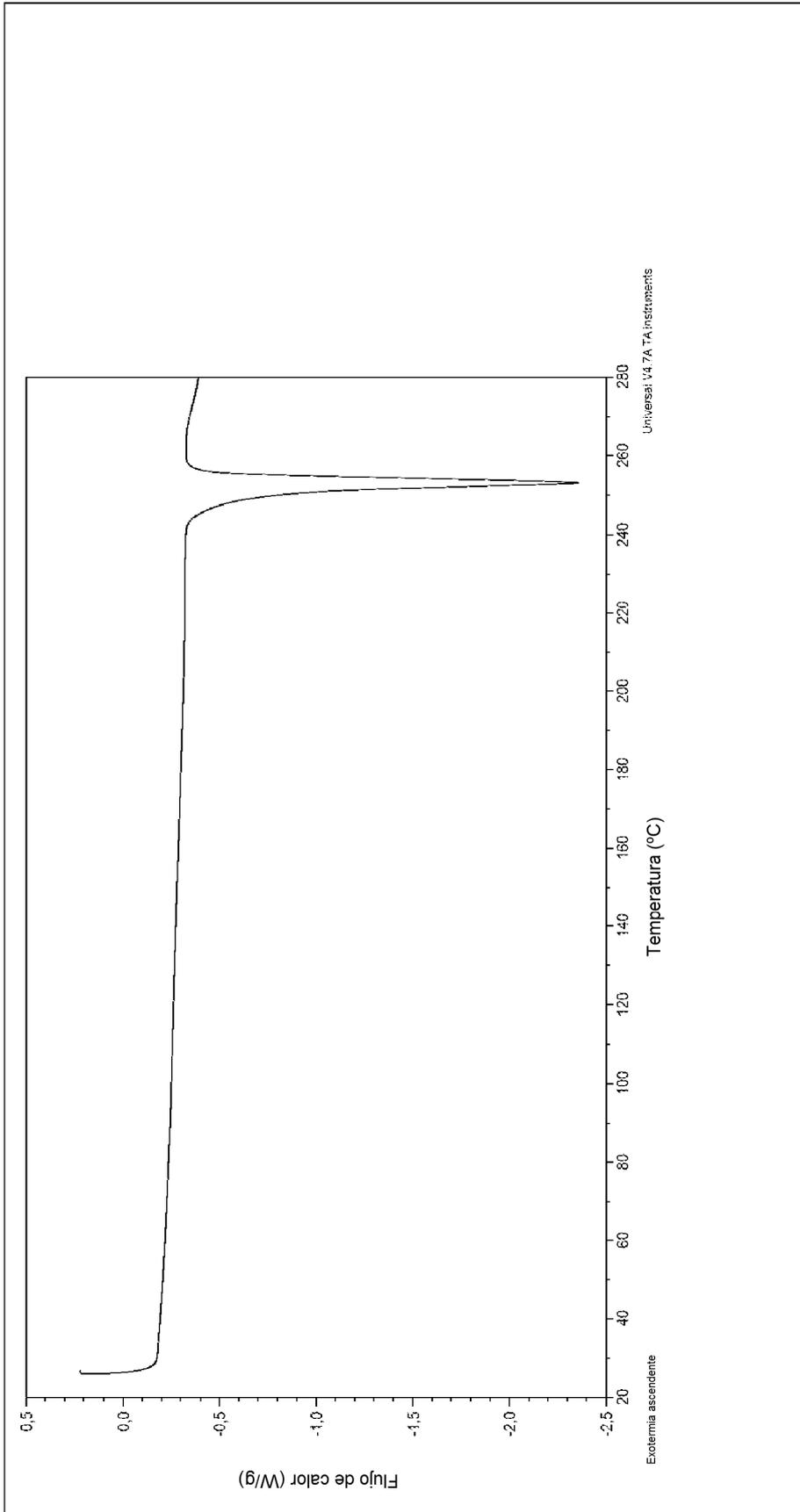
TGA-EM de la forma A de RTA 408

FIG. 55



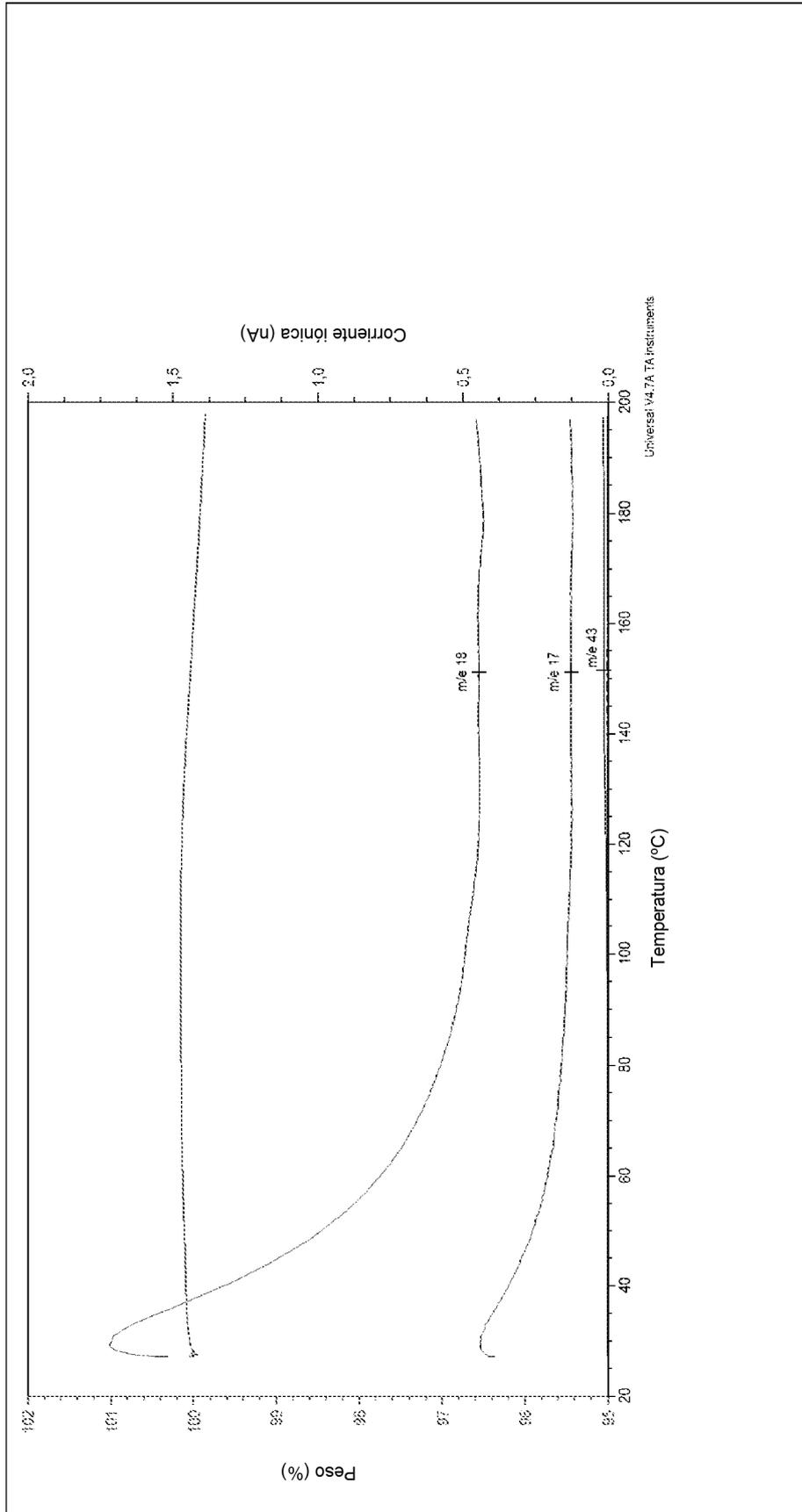
Patrón de PXRD de la forma B de RTA 408

FIG. 56



DSC de la forma A de RTA 408

FIG. 57



TGA-EM de la forma B de RTA 408

FIG. 58