(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 686 599**

(51) Int. CI.:

C07D 311/74 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013 PCT/NL2013/050915**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14098586**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013 E 13818495 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2935232**

(54) Título: **Compuestos para la protección de células**

(30) Prioridad:

19.12.2012 NL 2010010

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2018

(73) Titular/es:

SULFATEQ B.V. (100.0%)
Admiraal de Ruyterlaan 5A
9726 GN Groningen , NL

(72) Inventor/es:

VAN DER GRAAF, ADRIANUS CORNELIS;
HEERES, ANDRE y
SEERDEN, JOHANNES PAULUS GERARDUS

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Compuestos para la protección de células

[0001] Esta invención se refiere a un compuesto para la protección de células, en particular células cultivadas, células sanguíneas y tisulares y plaquetas sanguíneas, o trombocitos. Se refiere adicionalmente a un compuesto para su uso como o en medicamentos. Además, la invención se refiere a un método para la protección de células, en particular un método para la protección de células durante el almacenamiento.

[0002] Se conocen en la técnica compuestos que protegen las células y que se usan como un medicamento para proteger las células contra, por ejemplo, daño celular inducido por estrés oxidativo. Por ejemplo, los derivados de tropolona muestran actividad neuroprotectora como se describe en Koufaki et al. (Eur J Med Chem. 2010 Mar; 45(3):1107-12). El estrés oxidativo en las células y el daño celular a menudo están relacionados con el envejecimiento y enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Estudios recientes revelaron que compuestos tales como las nitronas pueden usarse en el tratamiento del ictus isquémico y como agentes anticancerosos (revisado en Floyd et al. Free Radic Biol Med. 2011 Sep 1;51(5):931-41). Jacobsen et al. Medicinal Chemistry 1992 35(23): 4464-4472 divulgan 2-(aminometil)cromanos que protegen contra el trauma del sistema nervioso central y la isquemia.

[0003] Otros ejemplos de compuestos que presentan propiedades protectoras de células, en particular actividad neuroprotectora, son híbridos de restos de cromano y catecol como se describe en Koufaki et al. (Bioorg Med Chem. 2010 Jun 1;18(11):3898-909; Bioorg Med Chem. 2009 Sep 1;17(17):6432-41), y cromanos sustituidos con isoxazol (Bioorg Med Chem. 2011 Aug 15; 19 (16) : 4841-50).

[0004] La protección celular también se requiere durante el almacenamiento de las células. Este es especialmente el caso cuando las células se enfrían a, por ejemplo, 4 °C o -80 °C, y se calientan de nuevo para su uso en ensayos celulares o aplicaciones clínicas.

[0005] Las plaquetas sanguíneas son tipos de células que son muy difíciles de almacenar. Actualmente, las plaquetas sanguíneas se almacenan bajo agitación constante a 20-24 °C. El almacenamiento a temperatura ambiente proporciona un entorno en el que proliferan bacterias, flora cutánea u otros microorganismos de la sangre o la piel que se introducen en el componente sanguíneo durante el proceso de recogida, ya que el crecimiento a estas temperaturas no está limitado. Estas plaquetas sanguíneas contaminadas ya no se pueden usar para la transfusión. Por esta razón, el almacenamiento no puede exceder los cinco días, lo que da como resultado el hecho de que más del 15 % de las plaquetas sanguíneas recolectadas expiren antes de que puedan ser utilizadas. El almacenamiento a baja temperatura evitará la proliferación bacteriana. Sin embargo, las plaquetas muestran lesión por almacenamiento de plaquetas (PSL) inducido por frío, [ya que esta abreviatura se usa más adelante] cuando se enfrían, incluso brevemente a 4 °C. Estas lesiones por almacenamiento en frío de plaquetas comienzan a aparecer incluso después de una breve exposición a temperaturas inferiores a 20 °C, e incluso se observan en pacientes sometidos a cirugía durante la cual la temperatura de todo el cuerpo o de partes del cuerpo disminuye a menos de 20 °C. La exposición de las plaquetas a temperaturas inferiores a 20 °C da como resultado una lesión estructural y la activación funcional de las plaquetas normales. Las características clave de la lesión por almacenamiento en frío de plaquetas son (1) cambio morfológico reversible a irreversible de una célula discoide a esferas especuladas con filopodia saliente, dependiendo de la duración de la exposición a temperaturas inferiores a 20 °C y (2) microagregación inmunoindependiente irreversible de plaquetas por el aumento de la interacción célula-célula, (3) agrupamiento de membrana de la glucoproteína GPIb en la superficie de las plaquetas, que es la señal para que los micrófagos eliminen las plaquetas del torrente sanguíneo; y (4) reconocimiento posterior y fagocitosis de las plaquetas transfundidas por macrófagos tras la transfusión a un receptor. Se han estudiado varios compuestos y su efecto sobre el almacenamiento de plaquetas. Por ejemplo, la patente US 7.964.339 describe el uso de polietilenglicol y derivados para modificar plaquetas que tiene un efecto sobre el almacenamiento en frío. Además, Amorini (Blood Transfus. 2007 Jan;5(1):24-32) mostró que una solución de glucosa puede tener un efecto positivo en el almacenamiento de plaquetas sanguíneas. La patente de Estados Unidos N.º 6.833.236 y la patente EP n.º 1 221 835 B1describen el uso de trehalosa para la protección de trombocitos cuando se liofilizan o se secan en un secador FTS, para el almacenamiento de las plaquetas sanguíneas.

[0006] A pesar de este conocimiento de compuestos que tienen un efecto sobre el almacenamiento de plaquetas sanguíneas, existe la necesidad adicional de elaborar nuevos compuestos que tengan un efecto positivo en el almacenamiento de plaquetas sanguíneas. Además, se requiere adicionalmente encontrar nuevos compuestos que protejan las células contra el daño celular *in vitro* e *in vivo*, donde el daño celular puede ser causado por estrés oxidativo, entre otros.

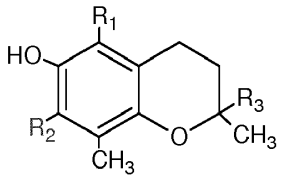
[0007] Es un objeto de esta invención proporcionar compuestos que puedan usarse para proteger células, tales como células de mamífero, contra lesiones celulares.

[0008] Es otro objeto proporcionar compuestos que se puedan usar para proteger las plaquetas sanguíneas contra la lesión por almacenamiento en frío.

[0009] Además, un objeto es proporcionar compuestos que proporcionen protección de las células contra el daño causado por varias indicaciones médicas, tales como indicaciones implicadas por enfermedades por envejecimiento, indicaciones implicadas por estrés oxidativo, y/o indicaciones implicadas por la formación de un coágulo de sangre.

[0010] Estos objetos y otros objetos se resuelven parcialmente, si no completamente por un compuesto como se describe en la reivindicación adjunta 1.

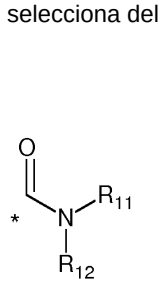
[0011] Se divulgan compuestos con la fórmula estructural (I)



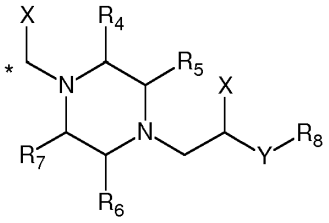
(I)

en la que,

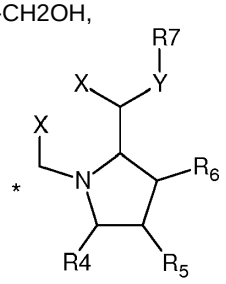
R1, y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 y es preferiblemente metilo, etilo, propilo o isopropilo;
R3 se selecciona del grupo que consiste en CH_2NHR_9, $C(=O)YR_{10}$, -CH2OH,



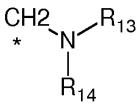
(ii)



(iii),

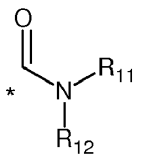


(iv),



(v)

donde * indica el punto de unión de R_3 al resto de la molécula;
R_4, R_5, R_6, R_7, R_8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -OH, alquilo, alquilo sustituido, preferiblemente hidroxialquilo, arilo, arilo sustituido, halógeno, oxígeno, heteroarilo, heteroarilo sustituido; preferiblemente en la que R_7 no es arilo,
X se selecciona del grupo que consiste en H, =O, =S;
Y se selecciona del grupo que consiste en O, NH, S;
R_9 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, preferiblemente hidroxialquilo, alquenilo, arilo, heteroarilo;
R_{10} se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, preferiblemente hidroxialquilo o cianoalquilo, arilo, OH;
R_{11} y R_{12} junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo saturado o insaturado de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros, que incorpora uno o más adicionales, tales como uno, dos o tres átomos de N, O, o S;
R_{13} y R_{14} junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo saturado o insaturado de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros, opcionalmente con alcohol alquílico, y en caso de que R_3 sea CH_2NHR_9, $C(=O)YR_{10}$, -CHOH o



que sea R_1 y R_2 isopropilo.

[0012] Se divulgan compuestos en el presente documento, R_7 o R_{10} no es OH si Y es O.

[0013] Se divulga un compuesto que no es 5-[4-[N-[(2RS)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ilmetil]-(2S)-pirrolidin-2-metoxi]fenilmetilen]tiazolidin-2,4-diona.

[0014] En una realización, la invención se refiere al presente compuesto para su uso como un medicamento.

[0015] En un aspecto, la invención se refiere además al uso de (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en el tratamiento o profilaxis de ictus isquémico, convulsión cerebral, trombosis, embolia, hemorragia, enfermedad cardiovascular, artritis, diabetes, cáncer, en particular cáncer relacionado con el envejecimiento, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, infartos de miocardio, esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome X frágil, enfermedad de células falciformes, y síndrome de fatiga crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una enfermedad neurodegenerativa tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Huntington, lesión por hipotermia/reperfusión, choque hemorrágico, envejecimiento, hipertensión, insuficiencia renal debida a diversas enfermedades renales, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, hepatitis y cirrosis hepática, migraña, hiper-homocisteinemia, enfermedades de infección implicadas en el ataque de trombocitos, tal como fiebre hemorrágica, en particular ébola y Chagas.

[0016] Los inventores encontraron sorprendentemente que los compuestos que tienen la fórmula como se ha descrito anteriormente protegen las células contra el daño celular. Los inventores desarrollaron varios compuestos nuevos como se ha descrito anteriormente, y encontraron que son capaces de proteger las células contra el daño celular. El daño celular puede tener varias causas y se establece en condiciones de estrés. El daño celular puede eventualmente conducir a necrosis celular o apoptosis. Los inventores realizaron ensayos en varios tipos de células y, sorprendentemente, encontraron que los compuestos anteriores tienen un efecto sobre las células y protegen la célula contra el daño celular o la lesión celular en condiciones de estrés. Con las condiciones de estrés se entiende la privación de oxígeno (hipoxia e isquemia); ocurrencia de agentes físicos (tales como trauma mecánico, temperaturas extremas, quemaduras y frío profundo, cambios repentinos en la presión atmosférica, radiaciones, descargas eléctricas); ocurrencia de agentes químicos y fármacos; ocurrencia de agentes infecciosos, reacciones inmunológicas; enfermedades genéticas; desequilibrios nutricionales, tal como lesiones, infecciones, cáncer, infarto, envenenamiento, ocurrencia de ROS (especies de oxígeno reactivo), e inflamación. El compuesto de acuerdo con la invención se puede usar como un medicamento para proteger las células contra las causas de lesión celular mencionadas anteriormente.

[0017] En una realización, la invención está se refiere a (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona para su uso en el tratamiento de estrés oxidativo, inflamación, descarrilamiento de la proteostasis, daño en el ADN (por ejemplo, irradiación), sobrecarga de calcio, venenos/agentes tóxicos, descarrilamiento o errores del metabolismo inducidos por daño celular.

[0018] En otra realización, la invención se refiere a (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona para su uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades que están relacionadas con el envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, infección, diabetes y otras indicaciones en las que está involucrado el daño celular.

[0019] En otra realización, la invención se refiere a (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona para el tratamiento o profilaxis de afecciones relacionadas con el envejecimiento o el estrés oxidativo, en particular ictus isquémico, convulsiones cerebrales, trombosis, embolia, hemorragia, enfermedad cardiovascular, artritis, diabetes, cáncer, en particular cáncer relacionado con el envejecimiento, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, infartos de miocardio, esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome X frágil, enfermedad de células falciformes, síndrome de fatiga crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Lou Gehrig y enfermedad de Huntington, daño tisular mediado por una infección vírica o bacteriana.

[0020] En otra realización, la invención se refiere a (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona para su uso en el tratamiento de lesión por isquemia/reperfusión.

[0021] En otra realización, la invención se refiere a (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona para su uso en el tratamiento de indicaciones involucradas con el daño celular inducido por estrés oxidativo.

[0022] En un aspecto, los inventores también encontraron que (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona protege las plaquetas sanguíneas y evita que las plaquetas sanguíneas se adhieran o se agreguen, y evitan experimentar el cambio de forma.

[0023] En otra realización, la invención se refiere a (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona para su uso en el tratamiento o la profilaxis de trastornos que conducen a o son causados por una disfunción plaquetaria, tal como trombosis arterial, fibrilación arterial, embolia pulmonar (PE), trombosis venosa profunda (TVP) o tromboembolismo venoso (TEV), insuficiencia cardíaca congestiva, ictus, infarto de miocardio, hipercoagulabilidad genética o adquirida, o defectos plaquetarios causados por fiebres hemorrágicas tal como ébola, enfermedad de Marburg y chagas.

[0024] En otro aspecto, la invención se refiere a una solución que comprende (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona y células. Los inventores encontraron que (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona protege las células contra una lesión celular, lo que eventualmente puede conducir a muerte celular por necrosis o apoptosis. (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona proporciona protección contra una lesión celular. La protección se puede proporcionar durante el almacenamiento. Las células almacenadas con los compuestos de acuerdo con la invención tienen una muerte celular disminuida en comparación con las células almacenadas sin el compuesto.

[0025] En una realización, (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona protege las células de mamífero, tales como líneas celulares cultivadas (por ejemplo, de origen humano), células madre, células primarias, plaquetas sanguíneas, células sanguíneas y células tisulares. Las líneas celulares pueden ponerse en cultivo para la fabricación de vacunas virales, productos biológicos producidos por tecnología de ADN recombinante en los cultivos celulares, tales como proteínas, hormonas, enzimas, anticuerpos, etc.

[0026] En otra realización, la invención se refiere a un medio que comprende (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona, en el que se cultivan células para formar un cultivo celular bidimensional o tridimensional. Además, los compuestos se pueden usar para proteger las células que se usan para la ingeniería de tejidos.

[0027] A partir de la siguiente tabla 1, solamente (6-hidroxi-2,5,7,8-tertrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona forma parte de la invención.

Tabla 1:

Código	Nombre químico
SUL-083	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-ol
SUL-084	ácido (S)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
SUL-085	ácido (R)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
SUL-089	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida
SUL-090	N,6-dihidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-091	N-butil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-092	6-hidroxi-N-isopropil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-093	(E)-N-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-095	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (morfolino)metanona;
SUL-097	N-(4-fluorobencil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-098	6-hidroxi-N-((S)-2-hidroxi-1-feniletil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-100	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-N-(2-(metilamino)etil)croman-2-carboxamida;
SUL-101	6-hidroxi-N,2,5,7,8-pentametil-N-(2-(metilamino)etil)croman-2-carboxamida;
SUL-102	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-N-(3-(piperidin-1-il)propil)croman-2-carboxamida;
SUL-104	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-N-(3-nitrofenil)croman-2-carboxamida;
SUL-106	N-(4-fluorofenil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-107	4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamido) benzoato de metilo;
SUL-108	(4-butilpiperazin-1-il)(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metanona;
SUL-109	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona;
SUL-110	((2S,5R)-4-alil-2,5-dimetilpiperazin-1-il)(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metanona;
SUL-111	N-((R)-2-amino-2-oxo-1-feniletil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-112	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metanona;
SUL-114	N-(2-bromoetil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-115	N'-(2-cianoetil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbohidrazida;
SUL-116	2-(((4-fluorobencil)amino)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol;
SUL-117	2-((butilamino)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol;
SUL-118	ácido 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxílico;
SUL-119	2-(hidroximetil)-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-6-ol;
SUL-120	6-hidroxi-*N*-((*R*)-1-hidroxipropan-2-il)-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida

SUL-121	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(piperazin-1-il)metanona
SUL-122	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-1-il)metanona;
SUL-123	N-(2-cianoetil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-124	6-hidroxi-N-(2-((2-hidroxietil) (metil)amino)etil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-125	(R)-N,6-dihidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-126	(S)-N,6-dihidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida;
SUL-128	2-(((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol;
SUL-129	2-((((S)-2-hidroxi-1-feniletil)amino)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol;
SUL-130	2,5,7,8-tetrametil-2-(piperidin-1-ilmetil)croman-6-ol;
SUL-131	N,6-dihidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxamida;
SUL-132	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona;
SUL-133	(6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona;
SUL-134	2-(((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol;
SUL-135	2-(((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol;
SUL-136	ácido 2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético;
SUL-137	(6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-il) (piperazin-1-il)metanona;
SUL 138	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona;
SUL-139	ácido 2-(4-(6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético;
SUL-140	2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acetato de etilo;
SUL-141	ácido (S)-2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético;
SUL-142	ácido (R)-2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético;
SUL-143	ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico;
SUL-144	ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico;
SUL-145	ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico;

[0028] Una realización preferida de acuerdo con la invención es un medio que comprende plaquetas sanguíneas y (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona.

[0029] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la protección de células que comprende añadir (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona a una célula. Preferiblemente, el presente método es un método *ex vivo*. Por consiguiente, el compuesto puede usarse para protección durante el almacenamiento de las células. El almacenamiento puede tener lugar a una temperatura que es adecuada para el almacenamiento de la célula particular y puede estar a y por debajo de 37 °C, preferiblemente entre -80 y 37 °C, tal como entre 10-25 °C; 0-10 °C, aproximadamente 4 °C; entre -20 y 0 °C y entre -80 y -20 °C, a temperatura ambiente, -80 °C, etc. Los inventores encontraron que (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona protege las células contra la lesión celular durante y después del enfriamiento, y especialmente contra la lesión que se produce durante el calentamiento de nuevo a la temperatura funcional. Más células sobreviven a estas condiciones de estrés y, por lo tanto, la capacidad de almacenamiento aumenta cuando las células se almacenan junto con (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona, en comparación con las células que se almacenan sin la adición de (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona.

[0030] En una realización, el medio, que puede ser un tampón de almacenamiento de plaquetas típico o una solución de aditivo, comprende (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona que tiene una concentración que está entre 1. 10^{-3} - 1.10^{-10}M, preferiblemente aproximadamente 1.10^{-6}, 1.10^{-7}, 1.10^{-8}, 1.10^{-9}, 1.10^{-10}M.

[0031] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el almacenamiento de células, en el que las células son plaquetas sanguíneas que comprenden añadir (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona a las plaquetas sanguíneas. Como se ha descrito anteriormente, las plaquetas sanguíneas se almacenan a temperatura ambiente, antes de que puedan usarse para transfusión. El almacenamiento de plaquetas sanguíneas a 4 °C da como resultado una rápida pérdida de la viabilidad y función plaquetaria. Los inventores encontraron que cuando las plaquetas sanguíneas se almacenan a una temperatura inferior a 20 °C, por ejemplo, a 4 °C con (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona, la capacidad de almacenamiento es mucho mayor y, por lo tanto, puede almacenarse durante más tiempo en comparación con las plaquetas sanguíneas almacenadas sin 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona. Por lo tanto, puede usarse (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona para obtener una mayor capacidad de almacenamiento de las plaquetas sanguíneas durante el almacenamiento en frío. Además, cuando se añade (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona a las plaquetas sanguíneas, disminuyen la agregación y la adhesión de las plaquetas sanguíneas. Además, las plaquetas almacenadas con (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-

hidroxietil)piperazin-1-il)metanona aún pueden mostrar una respuesta de agregación tras la estimulación con ADP o epinefrina. (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona ayuda a mantener la funcionalidad de las plaquetas.

[0032] Se divulga un método para la protección de las plaquetas sanguíneas contra las lesiones por almacenamiento de plaquetas. Esto significa que un compuesto de acuerdo con la invención está implicado en el proceso que afecta a los cambios morfológicos de las plaquetas cuando se almacenan en frío. El compuesto de acuerdo con la invención proporciona un cambio de forma reducido, una disminución de la coagulación y tiene un efecto sobre la liberación del contenido de gránulos, la exocitosis de proteínas citosólicas o sobre los patrones de glucoproteínas en las plaquetas. El compuesto de acuerdo con la invención tiene una influencia sobre el mecanismo de activación plaquetaria, y proporciona una disminución de la PSL (PSL de plaquetas = lesión por almacenamiento de plaquetas), o una cantidad disminuida de plaquetas activadas, conduciendo posteriormente a una disminución de la apoptosis. El compuesto anterior conserva la función plaquetaria de las plaquetas sanguíneas después de haber sido almacenadas en un entorno frío.

[0033] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona conserva mejor la capacidad de las plaquetas para agregarse o adherirse tras la estimulación, incluso cuando se han almacenado a 4 °C.

[0034] Se divulgan plaquetas almacenadas con un compuesto de acuerdo con la invención para su uso como transfusión de plaquetas.

[0035] Las plaquetas sanguíneas se pueden obtener a partir del plasma rico en plaquetas (PRP). Las plaquetas se pueden derivar de una capa leucocitaria (BC) o el método de la aféresis. Las plaquetas para transfusión pueden prepararse por tres métodos diferentes: (a) el método de plasma rico en plaquetas (PRP); (b) el método de capa leucocitaria (BC); y (c) el método de la aféresis. Los estudios que compararon plaquetas PRP y BC no mostraron diferencias en la calidad *in vitro* de dichos concentrados de plaquetas cuando se almacenan durante hasta 5 días a temperatura ambiente. En la aféresis de plaquetas o plaquetoféresis, las plaquetas se obtienen de un donante específico. Los tres métodos están bien descritos y se conocen por el experto en la técnica.

[0036] Se divulga Sul 109 para aumentar la tolerancia isquémica en frío de órganos de trasplante, preferiblemente corazones. En otras palabras, también se divulga el uso de Sul 109 para almacenar órganos de trasplante, tal como corazones.

[0037] Los efectos técnicos y las ventajas de las diversas realizaciones y aspectos de los métodos de la invención corresponden *mutatis mutandis* a los descritos para los productos de la invención y viceversa.

[0038] A continuación, esto generalmente describe la invención, pero para facilitar la comprensión, se hará referencia ahora a la comparación adjunta y los ejemplos y figuras no limitantes.

Descripción de las figuras:

Figura 1: Resumen esquemático del ensayo de inducción de lesión por hipotermia/reperfusión donde el compuesto se añade en primer a las células a 37 °C, se incuba durante 1 h, se enfría a 4 °C durante 24 h, se calienta de nuevo y se ensaya a 37 °C.

Figura 2: Ensayo de absorción de azul de tripano. Se usa NOD como control positivo. Sul 112 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) ((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metanona), Sul 121 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(piperazin-1-il)metanona) Sul 127 (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de metilo), Sul 136 (ácido 2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético), Sul 89 (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), Sul 85 (ácido (R)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Sul 141 (ácido (S)-2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético), Sul 142 (ácido (R)-2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético). Sul 136 es una mezcla racémica. Sul 141 y Sul 142 son respectivamente el isómero S y R. Los compuestos se añadieron a las células SMAC a diferentes concentraciones. Se realizó el ensayo de absorción después del recalentamiento hasta 37 ºC. 4 ºC significa que las células se enfriaron primero hasta 4 ºC. C37 ºC y C4 ºC son ensayos de células SMAC en los que las células se mantienen a 37 °C y se enfrían primero a 4 °C y luego se calientan de nuevo hasta 37 °C, respectivamente, sin la presencia de compuestos.

[0040] En los siguientes ejemplos, solamente (6-hidroxi-2,5,7,8-tertrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona forma parte de la invención.

Ejemplo 1: Conservación de células HEK

Material y método:

[0041] Se cultivaron células de riñón de embrión humano (HEK) 293 en medio de cultivo celular DMEM (Life Technologies, 41965-052) complementado con suero bovino fetal, penicilina y estreptomicina. Las células se sembraron a una densidad de 0,8 - 1,2E6 ml - 1 en matraces de poliestireno de 25 cm2, se colocaron en una incubadora humidificada regulada a 37 ºC con CO2 y se dejaron proliferar durante 24 horas antes de comenzar los experimentos. Se ensayaron los compuestos SUL-090 (N,6-dihidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-091 (N-butil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-092 (6-hidroxi-N-isopropil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-093 ((E)-N-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-095 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(morfolino)metanona), SUL-097 (N-(4-fluorobencil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-098 (6-hidroxi-N-((S)-2-hidroxi-1-feniletil)-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-100 (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-N-(2-(metilamino)etil)croman-2-carboxamida), SUL-101 (6-hidroxi-N,2,5,7,8-pentametil-N-(2-(metilamino)etil)croman-2-carboxamida), SUL-102 (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-N-(3-(piperidin-1-il)propil)croman-2-carboxamida), SUL-104 (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-N-(3-nitrofenil)croman-2-carboxamida), SUL-106 (N-(4-fluorofenil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-107 (4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamido)benzoato de metilo), SUL-108 ((4-butilpiperazin-1-il)(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metanona), SUL-109 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona), SUL-111 (N-((R)-2-amino-2-oxo-1-feniletil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-112 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) ((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metanona), SUL-114 (N-(2-bromoetil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-117 (2-((butilamino)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol), SUL-118 (ácido 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxílico), SUL-120 (6-hidroxi-*N*-((*R*)-1-hidroxipropan-2-il)-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-121 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (piperazin-1-il)metanona), SUL-122 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-1-il)metanona), SUL-123 (N-(2-cianoetil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-124 (6-hidroxi-N-(2-((2-hidroxietil)(metil)amino)etil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-125 ((R)-N,6-dihidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida), SUL-126 ((S)-N,6-dihidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida, SUL-128 (2-(((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol), SUL-129 (2-((((S)-2-hidroxi-1-feniletil)amino)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol), SUL-130 (2,5,7,8-tetrametil-2-(piperidin-1-ilmetil)croman-6-ol), SUL-131 (N,6-dihidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxamida), SUL-132 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona), SUL-134 (2-(((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol), SUL-135 (2-(((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol), SUL-136 (ácido 2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético), SUL-137 ((6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-il)(piperazin-1-il)metanona), SUL 138 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona), SUL-139 (ácido 2-(4-(6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético), SUL-140 (2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acetato de etilo), SUL-141 (ácido (S)-2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético), SUL-142 (ácido (R)-2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético), SUL-143 (ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico), SUL-144 (ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico), SUL-145 (ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico.

[0042] Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a varias concentraciones. Antes de comenzar los experimentos, esta solución madre se disolvió en DMEM precalentado y se diluyó adicionalmente para obtener un intervalo de concentración de 10 nM - 1 mM. El protocolo de lesión por recalentamiento de hipotermia se usó como se indica a continuación y se resume en la Figura 1. El medio de cultivo celular se reemplazó después por estas diluciones y las células se incubaron en presencia del compuesto durante 1 hora. Después de la incubación, las tapas se cerraron herméticamente y los matraces se colocaron en una sala a 4 ºC y se enfriaron durante 24 horas. Después de este periodo de enfriamiento, las células se volvieron a colocar en la incubadora a 37 ºC con las tapas cerradas y se dejaron calentar durante 24 horas más.

Evaluación de viabilidad

[0043] Después de este periodo de recalentamiento, se tomaron imágenes microscópicas para evaluar la morfología celular (Nikon D5100, Nikon Diaphot-TMD). El medio de cultivo celular se recogió y se centrifugó (4 minutos, 2000 rpm). Se recogió el sobrenadante y se midió inmediatamente el pH para evitar el equilibrio del pH mediante el tampón de carbonato en el medio, mientras que las células granuladas se resuspendieron en 5 ml de PBS. Las células que quedaban en el matraz se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) mientras se descartó el producto de lavado. Posteriormente, las células se tripsinizaron mediante la adición de 0,5 ml de tripsina y se combinaron con el sedimento resuspendido. Esta suspensión celular se tiñó a continuación en una concentración final de azul de tripano al 0,2 % (Sigma, T8154), seguido de una evaluación manual de la viabilidad y el número de células en un hemocitómetro Bürker-Türk. Para concluir el ensayo, se midieron los niveles de glucosa del medio de cultivo celular (Roche Accutrend Plus) como una indicación de la actividad metabólica. Todas estas etapas se realizaron con cuidado para evitar que el estrés mecánico influyera o alterara la viabilidad de las células después del enfriamiento.

Resultados

[0044] La Tabla 2 muestra los resultados de la cantidad de células que sobrevivieron al proceso de enfriamiento y recalentamiento con la adición del compuesto de acuerdo con la invención en diferentes concentraciones. La cantidad representa el % de células que sobrevivieron. El número del compuesto se corresponde con el compuesto como se describe en la tabla 1. En el control, se aplicó el mismo procedimiento a dos placas de células HEK. El medio no comprendía un compuesto de acuerdo con la invención. La cantidad de células que sobrevivieron depende de la concentración utilizada y del tipo de compuesto.

Tabla 2

	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	100 µM	1 mM	Media
SUL-17		91,95	93,10	91,77	95,58	95,34	94
SUL-83		0,00	79,38	70,12	55,74	1,11	41
SUL-84		6,22	19,79	70,08	95,74	94,50	57
SUL-85		1,23	0,00	1,43	84,88	78,26	33
SUL-89		34,90	88,63	91,61	87,57		76
SUL-90		8,67	91,34	90,25	77,92	20,41	58
SUL-91		2,28	82,44	89,53	87,54	0,00	52
SUL-92		3,13	64,58	87,14	86,47	1,55	49
SUL-93		97,05	96,08	84,04	21,69	8,00	61
SUL-94		98,63	97,31	96,35	89,02	0,00	76
SUL-95		2,76	86,75	90,38	92,09	85,86	72
SUL-96		5,62	96,34	93,53	96,88	0,00	58
SUL-97		0,00	95,11	96,37	91,62	5,17	58
SUL-98		90,99	97,81	97,54	88,49	1,02	75
SUL-99	54,44		87,98	93,75	69,18	100,00	81
SUL-100	77,78	76,87	63,25	68,77	55,61	0,00	57
SUL-102	73,24	95,77	93,72	81,97	73,41	93,33	85
SUL-103	99,74	98,10	96,85	98,31	10,27	0,00	67
SUL-104	99,26	99,49	97,52	98,91	40,91	52,17	81
SUL-105	94,72	95,01	80,50	96,11	32,86	50,64	75
SUL-106	77,78	76,87	63,25	68,77	55,61	0,00	57
SUL-107	4,42	95,74	92,72	94,77	37,62	28,92	59
SUL-108	0,00	40,89	94,15	96,81	96,57	0,00	55
SUL-109	92,64	98,05	97,01	94,93	93,73	87,37	94
SUL-111	90,86	81,62	97,33	93,69	94,34	79,21	90
SUL-112	96,26	96,52	95,38	92,97	93,06	0,00	79
SUL-114	81,14	87,16	89,94	87,70	77,93	0,00	71
SUL-117	0,72	89,29	93,56	84,79	90,09	0,00	60
SUL-118	13,67	45,70	36,22	52,88	88,50	92,45	55
SUL-120	17,65	65,27	95,54	91,63	88,73	81,46	73
SUL-121	87,31	88,97	94,75	88,94	92,74	0,00	75
SUL-122	5,15	22,54	85,60	85,17	88,50	55,56	57
SUL-123	68,42	90,50	83,16	88,41	88,16	0,75	70
SUL-125	8,09	0,00	97,27	96,65	88,44	22,50	52
SUL-126	0,00	0,00	68,12	92,68	98,62	80,21	57
SUL-127	0,00	0,00	97,56	96,67	89,19	92,05	63
SUL-128	28,21	100,00	100,00	100,00	99,41	0,00	71
SUL-129	0,00	5,65	88,80	89,92	91,52	0,00	46
SUL-130	0,00	12,73	85,65	89,61	86,55	1,49	46
SUL-131	2,99	1,59	22,52	91,10	75,38	0,00	32
SUL-132	93,96	91,41	88,30	91,11	89,73	80,51	89
SUL-134	87,43	86,34	87,74	86,58	88,82	36,51	79
SUL-135	71,94	83,90	93,82	93,85	83,46	33,06	77
SUL-136	99,60	100,00	98,37	99,52	99,35	100,00	99
SUL-137	78,17	86,12	93,88	90,88	78,71	0,53	71
SUL-138	92,84	91,74	77,01	91,71	93,30	86,94	89
SUL-139	13,33	4,57	4,26	90,05	89,67	80,33	47
SUL-140	8,70	17,95	95,65	97,00	94,63	0,00	52

SUL-141	58,51	96,25	0,75	99,44	96,77	99,12	75
SUL-142	0,00	73,02	98,51	99,16	99,42	91,89	77
SUL-143	30,59	35,00	14,94	49,47	97,83	98,43	54
SUL-144	4,08	18,27	21,57	25,93	91,01	92,59	42
SUL-145	12,99	28,68	21,43	7,84	78,61	88,08	40
SUL-146	0,96	17,00	90,63	80,65	85,49	0,00	46
DMSO	0,00	0,54	0,62	0,00	0,00	0,00	0
Control					4,71	0,00	2

Ejemplo 2: Conservación de células SMAC

[0045] Se cultivaron células aórticas de músculo liso de rata (células SMAC) en medio de cultivo celular DMEM (Life Technologies, 41965-052) complementado con suero bovino fetal, penicilina y estreptomicina. Las células se pusieron en una incubadora humidificada regulada a 37 ºC con CO2 y se dejaron proliferar durante 24 horas antes de comenzar los experimentos. Los compuestos Sul 84, Sul 85, Sul 89, Sul 112, Sul 121, Sul 127, y Sul 136 se disolvieron en DMSO a una concentración final de 100 mM. Esta solución se disolvió entonces en medio de cultivo celular DMEM y se añadió a las células a diferentes concentraciones, se preincubó durante 1 hora a 37 °C, se enfrió a 4 °C y se mantuvo a 4 °C durante 24 h. Las células se volvieron a calentar durante 1 h hasta 37 °C y se analizaron. Se realizó una prueba de azul de tripano, como se ha descrito anteriormente para las células HEK. Además de este ensayo de exclusión con azul de tripano, se realizó un ensayo de absorción. La extensión de la absorción de azul de tripano se utilizó como una indicación del número de células no viables. Se añadió azul de tripano a una placa de 6 pocillos hasta una concentración final del 0,05 % y las células se incubaron a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, el exceso de colorante se eliminó lavando cuidadosamente los pocillos tres veces con PBS frío. Después del lavado, se añadieron 150 pl de SDS al 1 % a los pocillos para lisar las células y liberar el azul de tripano de cualquier célula no viable. Los lisados celulares se centrifugaron y el sobrenadante se transfirió posteriormente a una placa de 96 pocillos. Se usó SDS al 1 % como blanco y se midió la absorción a 595 nm. La muerte celular se expresó como un porcentaje de controles a 4 °C no tratados (100 %).

[0046] La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo de absorción de azul de tripano para evaluar la cantidad de células que sobrevivieron a la hipotermia y al proceso de recalentamiento. La viabilidad de las células SMAC fue de hasta el 90 %.
Sul 136 es una mezcla racémica. Sul 141 y Sul 142 son el isómero R y S, respectivamente. El enantiómero S tiene un mejor efecto que el enantiómero R o la mezcla racémica, incluso a una concentración inferior.

Ejemplo 3: Conservación de plaquetas sanguíneas

Recolección a través de PRP

[0047] Se recogieron plaquetas de PRP y se suspendieron 2,1 ml en tubos de polipropileno de 5 ml, cerrados con un tope.

[0048] Se añadieron varios compuestos de acuerdo con la invención a las plaquetas sanguíneas directamente después de preparar el plasma de PRP y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C o durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las plaquetas sanguíneas con el compuesto se almacenaron entonces a 4 °C.

[0049] Se almacenó un control en condiciones de agitación a temperatura ambiente. Otro control se almacenó a 4 °C sin la adición de un compuesto. Los compuestos que se añadieron son los enumerados en la tabla 3.

[0050] Se tomó una muestra de cada tubo después de 264 horas después de la adición del compuesto y se ensayó como se indica a continuación:

- Las propiedades de color y coagulación se analizaron visualmente.
- Se contaron las células trombocíticas que sobrevivieron y se evaluó si los trombocitos se agregaron.
- Se evaluó si los trombocitos aún podían funcionar después de la estimulación mediante la adición de ADP o bajo la influencia del colágeno en una placa de 96 pocillos.
- Se evaluó la adhesión, es decir, la capacidad de las plaquetas para unirse a colágeno en una placa de 6 pocillos preincubada con colágeno.
- A través de un ensayo ELISA, se evaluó si el tromboxano se secretaba de las plaquetas. El tromboxano facilita la agregación y se produce por plaquetas sanguíneas activadas.

[0051] La tabla 3 proporciona una visión general de los resultados de la adición de los compuestos a las plaquetas sanguíneas y evalúa la agregación de los trombocitos después de la adición del compuesto de acuerdo con la

invención y el enfriamiento hasta 4 °C.

Tabla 3

Nombre del compuesto (véase también la Tabla 1 para el nombre iupac)	Pureza del compuesto	Concentración final de compuestos añadidos a los plaquetas sanguíneas	Agregación de plaquetas sanguíneas después del almacenamiento
SUL-100	>95 %	30 mM	+
SUL-117	92 %	30 mM	+
SUL-118	100 %	30 mM	+
SUL-120	90 %	30 mM	+
SUL-121	90 %	30 mM	+
SUL-125	90 %	30 mM	+
SUL-126	90 %	30 mM	+
SUL-132	99,6 %	30 mM	+
SUL-136	94 %	30 mM	+
SUL-138	98,5 %	30 mM	+
SUL-139	90-99 %	30 mM	+
SUL-141	97 %	30 mM	+
SUL-142	91 %	30 mM	++
SUL-143	98 %	30 mM	+
SUL-144	>90 %	30 mM	+
SUL-145	95 %	30 mM	+
- significa que la mayoría de los trombocitos se agregaron + indica que algunas células todavía eran viables pero algunas células se agregaron ++ indica que casi todas las células eran viables			

Recolección a través del método de aféresis y PRP

[0052] Las plaquetas se obtuvieron a través de procedimientos estándar de plaquetoféresis en Haemonetics (donante 2611811 y donante 2611855) o en instrumentos Cobe (donante 2611770). De acuerdo con el protocolo, todas las unidades se obtendrían con el procedimiento de plaquetoféresis con el instrumento Cobe, pero de las tres donaciones, dos no aprobaron los criterios de control de calidad del banco de sangre. Sin embargo, todas las donaciones de plaquetas tienen una concentración similar y una calidad de plaquetas similar. En ninguno de los concentrados de plaquetas se encontraron coágulos.

[0053] Las plaquetas recién recogidas se pesaron en una balanza y para el muestreo del concentrado de plaquetas se acopló de forma sellada una pequeña bolsa de PVC a la bolsa de concentrado de plaquetas principal. La homogeneización estándar del concentrado de plaquetas debe hacerse con un rodillo antes del muestreo.

[0054] Se añade una suspensión de 300 µM de Sul 136 con un procedimiento, que mantiene el contenido de la bolsa estéril y Sul 136 se mantiene en suspensión mediante rotación frecuente y se almacena a 37 °C antes de que se añada a las plaquetas recién recogidas. La suspensión de Sul 136 se añade a tres bolsas de plaquetas directamente de la bolsa. Después de la adición, el contenido de la bolsa de plaquetas se mezcla cuidadosamente. Después de 2 horas, la primera muestra se extrae con una bolsa de muestra acoplada de forma sellada. La bolsa de muestra se desconecta mediante soldadura y, de esta bolsa de muestra, las muestras se toman para el análisis hematológico, las pruebas del agregómetro y las pruebas de citometría de flujo. La turbulencia en la bolsa se informa por la experiencia del trabajador de laboratorio en el formato estándar. Se usaron plaquetas sin Sul 136 puestas en un agitador de superficie plana y almacenadas a temperatura ambiente como control. Otro control se almacena a 4 °C. Las muestras de plaquetas en las que se añade Sul 136 se almacenan sin agitar en el refrigerador a 4 °C.

[0055] Las muestras se toman después de 2, 24, 48, 96, 168, 216, 264 horas y se almacenan durante 7 semanas.

[0056] Las muestras se miden como se indica a continuación:

Prueba de anexina V:

[0057] En un citómetro de flujo Beckman Coulter FC 500 usando el kit de tinción FLUOS de anexina-V de Roche.

Procedimiento:

[0058] Se preparó una mezcla de 20 µl de anexina-V-fluoresceína del kit Roche en 1 ml de tampón de incubación y

se añadieron 20 µl de una solución de yoduro de propidio. Se centrifugaron 2 ml de concentrado de plaquetas en una centrífuga Eppendorf estándar y se descartó el sobrenadante.

[0059] Se añadió 1 ml de tampón PBS y se verificó si la concentración de células era de aproximadamente 1.000.000. Se diluyó 100 veces con la mezcla preparada de anexina V-fluoresceína y yoduro de propidio y se incubó durante 15 minutos. Se añadieron 500 µl de tampón de incubación del kit y el análisis de células se realizó en un citómetro de flujo.

Activación plaquetaria con ADP y TRAP

[0060] La activación plaquetaria se realizó en un citómetro de flujo Beckman Coulter FC 500 usando anticuerpos CD 41 PE, CD 62p FITC, IgG1 FITC/IgG1 PE de un kit Beckman Coulter.

Tubo de ensayo 1:

[0061] Se pusieron 40 µl de tampón de dilución en aproximadamente 15 minutos a 37 °C; se añadieron 10 µl de IgG FITC/IgG PE + 10 µl de CD41 PE y se mezclaron con Vortex, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente; se añadieron 1000 µl de tampón HBSS frío; la medición se realizó en el citómetro de flujo.

Tubo de ensayo 2:

[0062] Se pusieron 40 µl de tampón de dilución en aproximadamente 15 minutos a 37 °C; se añadieron 10 µl de CD41 PE + 5 µl de CD62 FITC y se mezclaron con Vortex, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente; se añadieron 1000 µl de tampón HBSS frío; la medición se realizó en el citómetro de flujo.

Tubo de ensayo 3:

[0063] Se pusieron 36 µl de tampón de dilución + 4 µl de ADP en aproximadamente 15 minutos a 37 °C; se añadieron 10 µl de CD41 PE + 5 µl de CD62 FITC y se mezclaron con Vortex, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente; se añadieron 1000 µl de tampón HBSS frío; la medición se realizó en el citómetro de flujo.

Tubo de ensayo 4:

[0064] Se pusieron 36 µl de tampón de dilución + 4 µl de TRAP en aproximadamente 15 minutos a 37 °C; se añadieron 10 µl de CD41 PE + 5 µl de CD62 FITC y se mezclaron con Vortex, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente; se añadieron 1000 µl de tampón HBSS frío; la medición se realizó en el citómetro de flujo.

[0065] La agregación de plaquetas se midió de acuerdo con el perfilador de agregación de plaquetas PAP 8 (Mölab) usando todos los reactivos de Mölab.

Preparación de la muestra:

[0066] Se centrifugaron 3 ml de concentrado de plaquetas a 3000 RPM para obtener PPP. Se mezclaron 1800 µl de PPP y 600 µl de PRP.

Ensayo:

[0067] Se pusieron 225 µl de PRP en un tubo de ensayo con agitador magnético. Se pusieron 225 µl de PPP + 25 µl de Aquadest en un tubo de ensayo sin agitador magnético. Se usó PPP como base. PRP se puso durante 2 min a 37 °C en un rodillo. La medición con PRP en el agregómetro se inició después de 30 segundos con 25 µl de inductor. La medición se realizó durante 6 min.

[0068] La determinación visual de la turbulencia se realizó de acuerdo con Bertolini, F. y Murphy, S. (1994) (A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates, Transfusion 34, 796-801.)

Resultados de los ensayos con plaquetas recogidas con PRP

[0069] Las plaquetas de PRP se ensayaron con la adición de Sul 136. La Tabla 4 muestra los resultados del número de células que sobrevivieron 24, 48, 72 y 216 horas después del almacenamiento a 4 °C. El número de células se da en % con respecto al número de células en el momento 0. El 66 % de las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente sobrevivieron después de 216 horas. Solo el 42,3 % de las células almacenadas a 4 °C sobrevivieron después de 216 horas. La adición de Sul 136 dio como resultado que sobrevivieron sustancialmente más plaquetas después del almacenamiento de 72 y 216 horas a 4 °C.

Tabla 4

	Tiempo en horas		
Muestra	**0**	**72**	***216***
PRP Temp. Amb.	100	80,7	*66,1*
PRP 4 °C	100	43,3	*42,3*
60 min 0,001 mM	100	83,8	*86,1*
60 min 0,01 mM	100	82,9	*94,8*
60 min 0,1 mM	100	76,3	*77,6*
60 min 1 mM	100	29,9	*62,9*
60 min 10 mM	100	51,8	*43,4*
10 min 0,001 mM	100	58,9	*55,1*
10 min 0,01 mM	100	66,0	*52,1*
10 min 0,1 mM	100	55,9	*50,8*
10 min 1 mM	100	59,1	*59,3*
10 min 10 mM	*100*	*64,8*	*47,9*

[0070] La Tabla 5 muestra la posibilidad de agregación de las plaquetas recogidas con PRP y cuando se añadió Sul 136, después de la estimulación con ADP. Cuando se añadió Sul 136 10 mM, las plaquetas todavía mostraron actividad después de la estimulación con ADP. (+ significa que las células muestran agregación y, por lo tanto, pueden activarse después de la estimulación, - significa que no hay agregación tras la estimulación)

Tabla 5

Muestra	0 h	24 h	48 h	72 h	216 h
PRP KT	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**
PRP 4 °C	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 0,001 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 0,01 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 0,1 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 1 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 10 mM	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**
10 min 0,001 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
10 min 0,01 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
10 min 0,1 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
10 min 1 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
10 min 10 mM	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**

[0071] La Tabla 6 muestra la posibilidad de agregación de las plaquetas de PRP con Sul 136 después de la estimulación con colágeno. Cuando se añadió Sul 136 10 mM, las plaquetas mostraron aún actividad después de la estimulación con colágeno. (+ significa que las células muestran agregación, ++ significa agregación fuerte, estas plaquetas pueden activarse de este modo después de la estimulación, - significa que no hay agregación tras la estimulación)

Tabla 6

Muestra	0 h	24 h	48 h	72 h	216 h
PRP KT	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**
PRP 4 °C	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 0,001 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 0,01 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 0,1 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 1 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
60 min 10 mM	**++**	**++**	**++**	**++**	**-**
10 min 0,001 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
10 min 0,01 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
10 min 0,1 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
10 min 1 mM	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
10 min 10 mM	**++**	**++**	**++**	**++**	**++**

Resultados con plaquetas recogidas a través de aféresis

[0072] La Tabla 7 muestra los resultados del ensayo de las plaquetas sanguíneas de aféresis almacenadas del donante 1 (2611770) almacenadas a temperatura ambiente en un agitador de superficie plana sin Sul 136. El pH el día 12 fue de 6,3. El pH el día 19 fue de 5,7.

[0073] La Tabla 8 muestra los resultados de los ensayos de las plaquetas sanguíneas de aféresis almacenadas del donante 1, almacenadas a 4 °C con la adición de Sul 136. El pH el día 12 fue de 6,2, el pH el día 19 fue de 5,9.

Tabla 7

Fecha	**Plaquetas**	**MPV**	**Agregación plaquetaria**		**Citometría de flujo**			
	/ µl	fl	Colágeno (%)	ADP (%)	P-selectina MFI	ADP	TRAP	Anexina (% de positivos)
Día 1	1.316.000	8,2	35	10	1,99	6,54	12,8	3,13
Día 2	1.248.000	9,7	72	0	2,09	3,97	12,3	5,15
Día 3	1.400.000	9,0	27	0	2,17	4,00	11,7	5,72
Día 5	1.212.000	9,6	0	0	3,21	4,09	12,6	6,41
Día 8	1.216.000	9,6	0	0	3,47	4,53	10,2	16,70
Día 10	1.324.000	8,8	0	0	3,00	3,82	7,85	14,22
Día 12	1.528.000	9,2	0	0	4,34	4,78	6,51	21,45
Día 19	1.328.000	9,0	0	0	3,89	3,74	3,67	84,53

Tabla 8

Fecha	Plaquetas	MPV	Agregación plaquetaria		Citometría de flujo			
	/ µl	fl	Colágeno (%)	ADP (%)	P-selectina MFI	ADP	TRAP	Anexina (% de positivos)
Día 1	1.000.000	10,6	0	0	2,09	3,07	3,57	4,51
Día 2	1.192.000	9,5	0	0	3,04	3,28	3,78	14,48
Día 3	1.240.000	9,2	0	0	3,73	4,12	4,95	18,24
Día 5	1.232.000	9,1	0	0	4,12	4,20	5,55	20,38
Día 8	1.352.000	9,3	0	0	4,82	4,83	5,52	34,56
Día 10	1.228.000	9,6	0	0	4,48	4,46	5,52	43,52
Día 12	1.204.000	9,8	17	12	4,57	4,43	4,42	56,91
Día 19	1.068.000	8,8	32	31	2,92	2,74	2,76	88,34

[0074] Los ensayos de citometría de flujo fueron similares para las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente y las plaquetas almacenadas a 4 ºC con el compuesto Sul 136. Además, la agregación plaquetaria tras la estimulación con colágeno y ADP se restauró el día 12 y el día 19 para las plaquetas almacenadas con el compuesto Sul 136. Este resultado es comparable con las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente el día 1-3.

[0075] Las Tablas 9 y 10 muestran los resultados del ensayo realizado con plaquetas del Donante 2. Las plaquetas de la Tabla 9 se almacenaron a 4 ºC sin Sul 136. Las plaquetas de la Tabla 10 se almacenaron a 4 ºC con Sul 136.

Tabla 9

Fecha	Plaquetas	MPV	Agregación plaquetaria		Citometría de flujo			
	/ µl	fl	Colágeno (%)	ADP (%)	P-selectina MFI	ADP	TRAP	Anexina (% de positivos)
Día 1	1.008.000	7,8	89	15	1,82	4,67	7,83	3,89
Día 2	792.000	6,5	83	36	2,50	5,62	7,18	10,83
Día 3	632.000	6,3	86	22	2,76	5,51	5,87	17,92
Día 5	824.000	6,5	82	27	3,43	6,44	7,30	24,04
Día 8	816.000	6,5	77	19	3,35	5,28	7,12	22,52
Día 10	684.000	6,5	83	13	3,00	4,12	5,13	22,78
Día 12	732.000	6,5	75	12	2,93	3,92	5,15	28,12
Día 19	868.000	6,5	24	9	2,81	2,90	3,54	34,18

Tabla 10

Fecha	Plaquetas	MPV	Agregación plaquetaria		Citometría de flujo			
	/ µl	fl	Colágeno (%)	ADP (%)	P-selectina MFI	ADP	TRAP	Anexina (% de positivos)
Día 1	1.004.000	10,1	0	0	1,67	2,12	1,88	5,98
Día 2	1.272.000	7,6	0	0	2,13	2,53	2,35	10,96
Día 3	1.220.000	7,8	4	0	2,59	3,21	2,76	19,56
Día 5	1.252.000	8,0	0	0	2,95	3,19	3,16	32,11
Día 8	1.168.000	8,0	0	0	2,99	3,08	3,22	45,71
Día 10	1.104.000	8,1	0	0	2,76	2,83	2,96	53,96
Día 12	1.032.000	8,6	5	0	2,63	2,62	2,73	62,97
Día 19	860.000	8,8	0	0	2,01	1,99	2,14	72,67

[0076] Las Tablas 11 y 12 muestran los resultados del ensayo realizado con plaquetas del Donante 3. Las plaquetas de la tabla 9 se almacenaron a temperatura ambiente sin Sul 136. Las plaquetas de la Tabla 10 se almacenaron a 4 °C con Sul 136.

Tabla 11

Fecha	Plaquetas	MPV	Agregación plaquetaria		Citometría de flujo			
	/ µl	fl	Colágeno (%)	ADP (%)	P-selectina MFI	ADP	TRAP	Anexina (% de positivos)
Día 1	1.060.000	7,7	80	9	2,10	6,09	10,80	3,69
Día 2	1.004.000	9,6	81	0	2,18	3,81	9,20	3,87
Día 3	1.060.000	7,6	75	0	2,34	3,74	9,48	5,21
Día 5	964.000	10,1	34	0	2,80	4,29	10,80	6,12
Día 8	956.000	9,6	72	0	3,55	4,70	11,30	5,38
Día 10	976.000	9,3	23	0	3,30	4,36	8,44	8,09
Día 12	1.068.000	9,2	41	0	3,67	4,85	7,39	14,08
Día 19	1.028.000	9,7	0	0	4,76	4,56	4,59	90,52

Tabla 12

Fecha	Plaquetas	MPV	Agregación plaquetaria		Citometría de flujo			
	/ µl	fl	Colágeno (%)	ADP (%)	P-selectina MFI	ADP	TRAP	Anexina (% de positivos)
Día 1	980.000	10,3	0	0	1,90	2,71	2,08	5,14
Día 2	1.188.000	7,7	0	0	2,82	3,49	3,62	8,68
Día 3	1.072.000	7,7	0	0	3,84	4,96	4,42	14,34
Día 5	1.068.000	8,0	0	6	4,50	4,84	5,04	27,77
Día 8	992.000	8,3	0	0	4,82	4,91	5,24	41,97
Día 10	892.000	8,3	0	0	4,37	4,25	5,04	62,65
Día 12	912.000	9,0	8	0	3,89	3,84	4,20	70,33
Día 19	692.000	9,5	0	0	2,22	2,37	2,01	80,99

Ensayo de turbulencia

[0077] Aún después de 7 semanas se observa turbulencia en las plaquetas almacenadas con los compuestos a 4 ºC.

[0078] No se observa turbulencia en las plaquetas sin compuestos añadidos almacenados a 4 ºC, medidas después de 24 horas.

Ejemplo 4: Síntesis de los compuestos

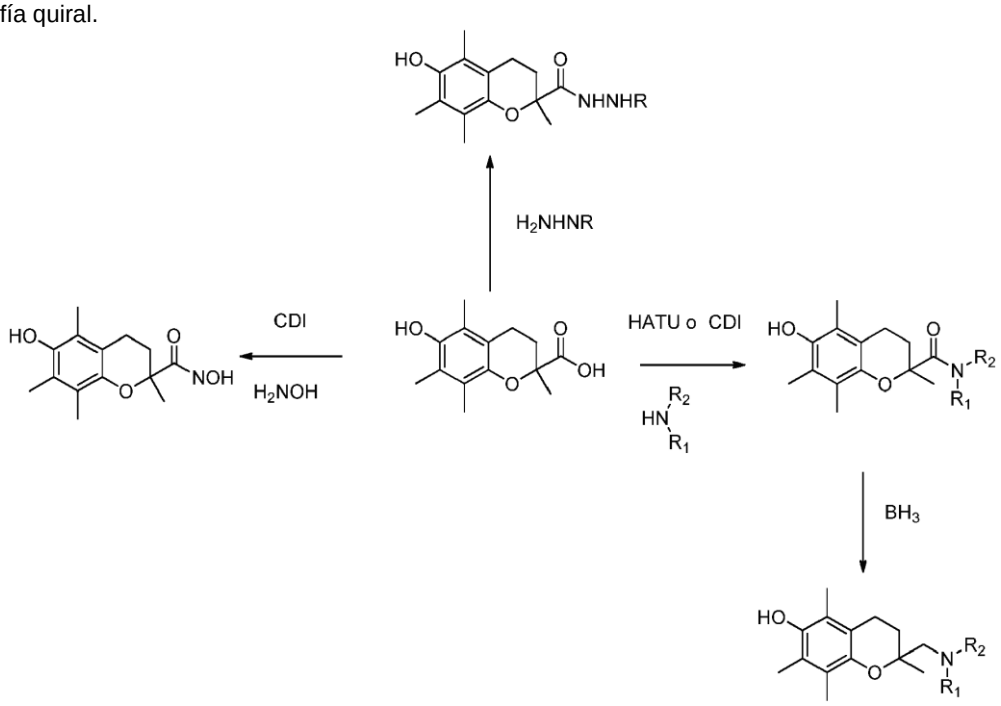
[0079] Los compuestos de acuerdo con la invención se sintetizan de acuerdo con métodos de síntesis estándar que se conocen bien por los expertos en la técnica.

[0080] SUL-0083, SUL-0084 y SUL-0085 están disponibles en el mercado.

Síntesis de SUL 089-112, 114-117, 120-126, 128-130, 132, 134-135, 138, y 140.

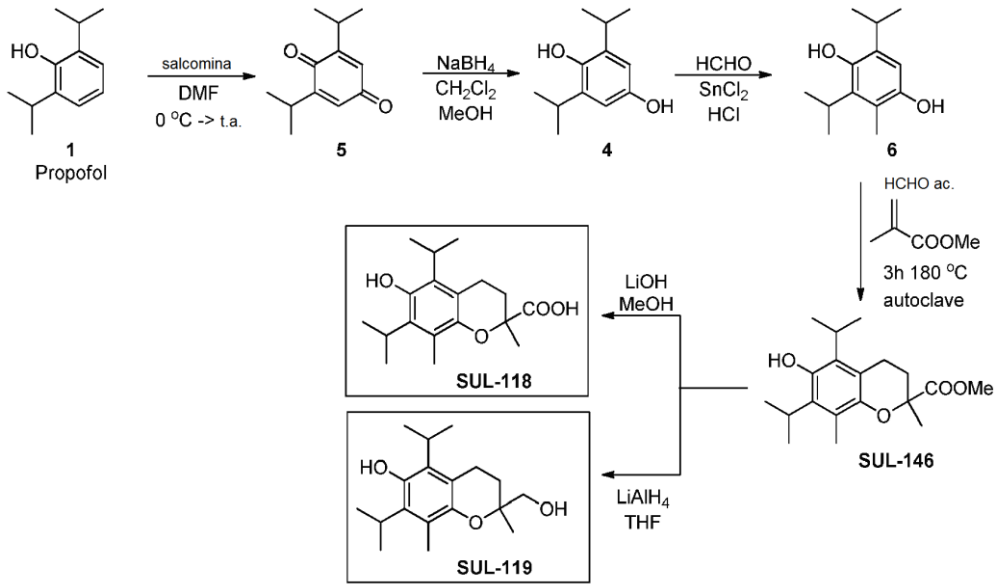
[0081] La amidación de trolox se logró por reacción con la amina apropiada en presencia de reactivos de acoplamiento estándar para la formación de amida, por ejemplo, HATU y CDI. Las aminas correspondientes se prepararon por reducción de las amidas formadas con BH_3.

Los derivados de ácido hidroxámico se prepararon por reacción con hidroxilamina/CDI. La síntesis de análogos de carbohidrazida de trolox se logró por reacción con hidrazinas (sustituidas). Los compuestos enantioméricos/diastereoméricos se prepararon partiendo de (R) o (S)-Trolox enantioméricamente puro o mediante cromatografía quiral.



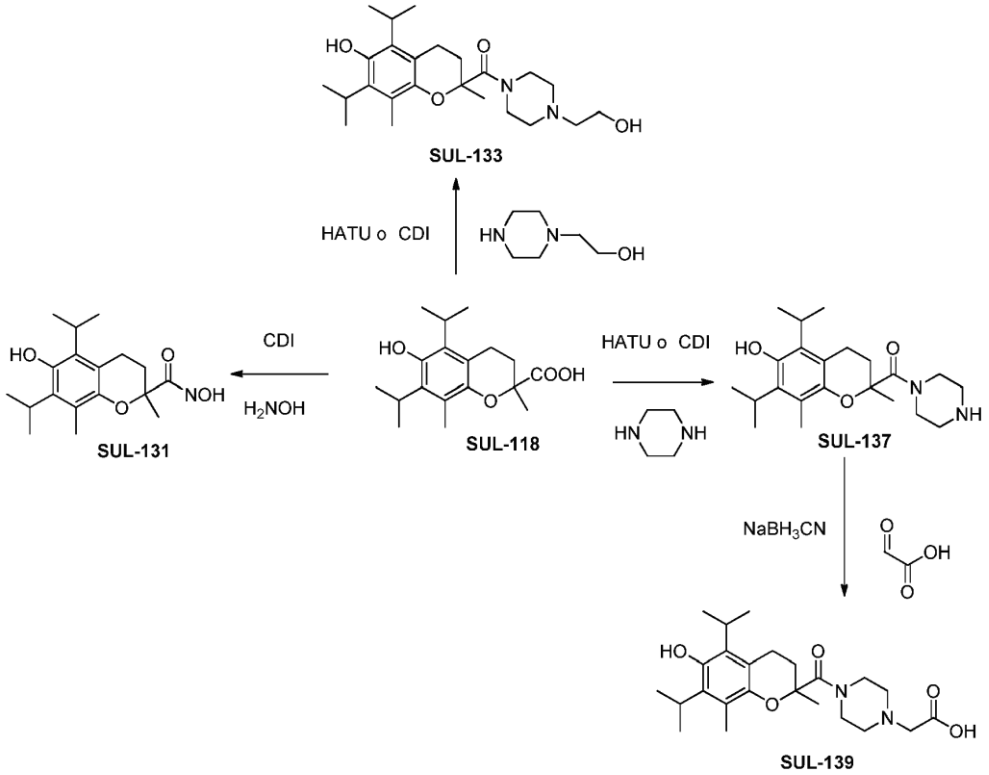
Síntesis de SUL-118, SUL-119 y SUL-146

[0082] La oxidación de propofol disponible en el mercado con salcomina, un complejo de coordinación del ligando salen con cobalto, seguido de reducción con $NaBH_4$ produjo 2,6-diisopropilbenceno-1,4-diol. La metilación posterior con $HCO/SnCl_2/HCl$ y la reacción con metacrilato de metilo proporcionó SUL-146 (6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxilato de metilo). La hidrólisis con LiOH produjo el ácido carboxílico SUL-118 (ácido 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxílico). El alcohol SUL-119 (2-(hidroximetil)-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-6-ol) se obtuvo por reducción de SUL-146 con $LiAlH_4$.



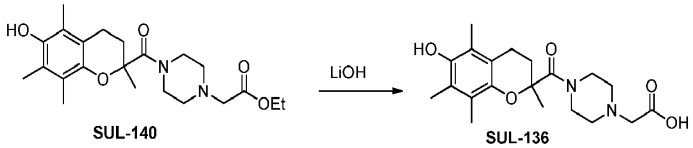
Síntesis de SUL-131, SUL-133, SUL 137 y SUL-146

[0083] Partiendo del ácido carboxílico SUL-118 (ácido 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxílico), la hidroxilamina se obtuvo por reacción con hidroxilamina usando CDI como reactivo de acoplamiento. Los compuestos SUL 133 ((6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-il) (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona) y SUL 137 ((6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-il) (piperazin-1-il)metanona) se prepararon por reacción de SUL-118 con el derivado de piperazina apropiado. Ambos reactivos de acoplamiento HATU y CDI dieron como resultado rendimientos satisfactorios. Se preparó SUL 139 (ácido 2-(4-(6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético) por aminación reductora de SUL 137 ((6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-il) (piperazin-1-il)metanona) con ácido glioxálico.



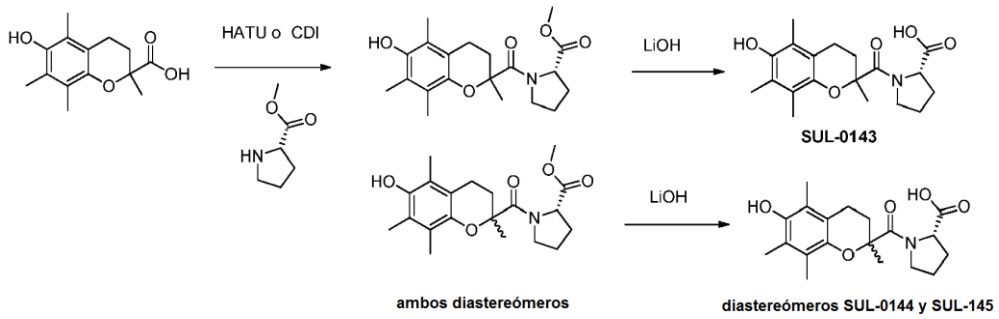
Síntesis de SUL-136, SUL-141 y SUL-142.

[0084] La hidrólisis de SUL-140 (2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acetato de etilo) en una atmósfera de N_2 proporcionó SUL-136 (ácido 2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético) con alto rendimiento. Los enantiómeros SUL-141 y SUL-142 se prepararon de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente.



Síntesis de SUL 143, 144 y 145

[0085] La amidación de trolox con pirrolidin-2-carboxilato de (S)-metilo (éster metílico de L-prolina) proporcionó, después de la cromatografía en columna, dos diastereoisómeros. La hidrólisis posterior de los diastereoisómeros individuales proporcionó SUL-144 (ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico, diastereómero 1) y SUL-145 (ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico, diastereómero 2). El análogo racémico SUL-143 (ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico) se obtuvo mezclando los ésteres de los diastereoisómeros individuales seguido de la hidrólisis del resto éster usando LiOH.



Amidación de Trolox (ejemplo general)

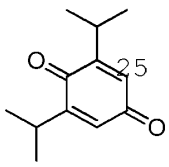
[0086] SUL-108 ((4-butilpiperazin-1-il) (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metanona). HCl. Se suspendió Trolox (11 g, 0,044 mol, 1 equiv.) en acetonitrilo (100-150 ml). Se añadió en porciones CDI (8,6 g, 0,053 mol, 1,2 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 0,5-1 hora a temperatura ambiente. Después de la adición de 1-butilpiperazina (6,9 g, 0,048 mol, 1,1 equiv.), la mezcla de reacción se agitó a 25-30 ºC durante el fin de semana. La mezcla de reacción se concentró, se añadió H_2O (200 ml) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (4x). Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía en columna (DCM/MeOH al 10 %) proporcionando el compuesto pretendido (9 g de producto, puro al 82 %). La cristalización en EtOAc/heptanos proporcionó **SUL-108** (6 g, 0,016 mol, rendimiento del 36 %, puro al 90 %) en forma de un sólido de color blanco. El material obtenido se disolvió en DCM (50-100 ml). Se añadió HCl (4 M en dioxano, 8,8 ml, 0,0035 mol, 2,2 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana. La mezcla se filtró, se aclaró con DCM, y se secó para proporcionar la sal HCl de **SUL-108** (6,3 g, puro al 97-98 %) en forma de un sólido de color blanco.
^{1}H RMN ($CDCl_3$, en ppm): 0,93 (t, 3H), 1,38 (m, 2H), 1,58 (s, 3H), 1,67 (m, 2H), 2,09 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,50-3,20 (m, 14H). M^+ = 375,3

Reducción de amidas Trolox (ejemplo general)

[0087] SUL-128. (2-(((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metil)-2,5,7,8-tetrametilcroman-6-ol).HCl. Se enfrió BH_3.THF en THF (16 ml, 0,0156 mol, 2 equiv.) a T = 0 ºC. Una solución de **SUL-112** ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metanona; 2,6 g, 0,0078 mol, 1 equiv.) en THF (50 ml) se añadió gota a gota y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota HCl (6 M, 25 ml). Se añadió DCM (100 ml) y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con DCM (3 x). Las capas org. combinadas se secaron sobre K_2CO_3 hasta que ya no se apreció formación de gas. La fase orgánica se filtró y se concentró. El producto en bruto se enfrió en un baño de hielo, y se añadió gota a gota NaOH (6 M, 50 ml). Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y se extrajo con DCM (4 x). Las capas de DCM combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron para dar 1,6 g de producto en bruto (puro al 20-40 %). El material se purificó por cromatografía en columna proporcionando **SUL-128** (300 mg, 0,94 mmol, rendimiento del 12 %, puro al 90 %). Se disolvió en DCM (10 ml) y se enfrió a T = 0 °C (baño de hielo). Se añadió HCl (4 M en dioxano, 0,3 ml, 0,94 mmol, 1,2 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El sólido formado se filtró, se lavó con Et_2O y se secó para proporcionar la sal HCl de **SUL-128** (300 mg, puro al 90 %) en forma de un sólido de color blanco (mezcla de diastereómeros).
^{1}H RMN ($CDCl_3$, en ppm): 1,20-1,90 (m, 7H), 2,12 (s, 6H), 2,17 (s, 3H), 2,20-2,90 (m, 9H), 3,4-3,65 (m, 2H). M^+ = 320,1

Síntesis de SUL-118 (ácido 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxílico).

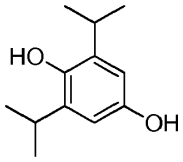
Síntesis de 2,6-Diisopropilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona.



[0089] Se disolvió Propofol 100 g, 561 mmol) en DMF (250 ml). La solución se enfrió a 0 °C mientras se agitaba. Se añadió salcomina (16,6 g, 51 mmol; 9 % en moles) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 112 h durante

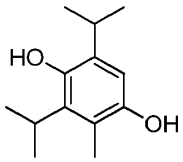
la noche mientras se calentó a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en agua (7 l). La suspensión resultante se extrajo con heptanos (5 x 1 l). Los extractos orgánicos combinados se secaron con Na_2SO_4. La concentración de la solución al vacío proporcionó la 2,6-diisopropilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona en bruto (62,5 g; 325 mmol; rendimiento del 58 %) en forma de un aceite. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis de 2,6-Diisopropilbenceno-1,4-diol.



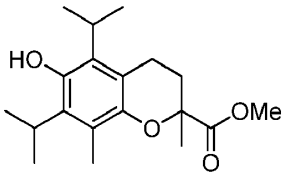
[0091] Se disolvió 2,6-diisopropilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (62,5 g, 325 mmol) en diclorometano (300 ml) y metanol (100 ml). La solución se enfrió a 0 °C con un baño de hielo. Se añadió en porciones borohidruro sódico (4,5 g, 182 mmol). Después de que se completara la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió acetona (150 ml) para inactivar el exceso de borohidruro sódico. Después de 30 minutos de agitación, se añadió HCl ac. 2 N (200 ml). Después de agitar durante 45 minutos, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (4 x 400 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4. La concentración de la solución al vacío proporcionó 2,6-diisopropilbenceno-1,4-diol en bruto (64 g, 330 mmol) en forma de un aceite de color rojo con un rendimiento cuantitativo. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis de 3,5-Diisopropil-2-metilbenceno-1,4-diol



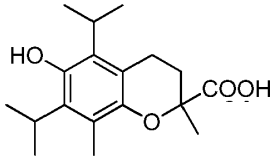
[0093] Una mezcla de 2,6-diisopropilbenceno-1,4-diol (64 g, 0,33 mol), paraformaldehído (9,8 g, 0,327 mol), $SnCl_2$ (217,9 g, 1,15 mol), HCl ac. concentrado al 37 % (0,6 l) y éter diisopropílico (2,5 l) se calentó a reflujo durante 4 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla bifásica se separó. La capa acuosa se extrajo con TBME (2000 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con HCl ac. 1 N (1000 ml), agua (1000 ml) y salmuera (1000 ml). Las fracciones orgánicas se secaron con Na_2SO_4 y se concentraron al vacío para dar una mezcla 50 : 35 de 3,5-diisopropil-2-metilbenceno-1,4-diol y 2,6-diisopropil-3,5-dimetilbenceno-1,4-diol (61 g de aceite) de acuerdo con el análisis por GCMS. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (1200 ml) eluyendo con acetato de etilo/heptanos = 97,5:2,5 (4000 ml), 95:5 (4000 ml) dio 3,5-diisopropil-2-metilbenceno-1,4-diol **6** (16,6 g, 79,8 mmol; 24 %: puro al 83 %) en forma de un aceite.

Síntesis de 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxilato de metilo.



[0095] Se disolvió 3,5-diisopropil-2-metilbenceno-1,4-diol (10,6 g, 50,9 mmol; puro al 83 %) en metacrilato de metilo (20 ml, 186 mmol). La solución se transfirió a un tubo de Teflon en un reactor Berghof. Se añadió formaldehído acuoso (10 ml; solución al 37 % en peso, estabilizada con MeOH al 10-15 %) y la mezcla de reacción se calentó a 180 °C (temperatura interna) en el reactor cerrado durante 5 horas mientras se agitaba. Después del enfriamiento aprox. 40 °C, la mezcla de reacción se vertió en MeOH (200 ml) y la mezcla se concentró al vacío. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (600 ml) eluyendo con acetato de etilo/heptanos = 95:5 (5000 ml; TLC: Fr ~0,2; punto teñido con vapor de yodo) dio el producto puro deseado 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxilato de metilo (10,0 g, 31,3 mmol, 61 %).

Síntesis de ácido 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxílico (SUL-118).



[0097] Una mezcla de 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxilato de metilo purificado (8,3 g, 25,9 mmol) e hidróxido de litio monohidrato (4,3 g, 102,5 mmol; 4 equiv.) en MeOH (100 ml), THF (100 ml) y agua (25 ml) se calentó durante 30 minutos a presión ambiente mientras se giraba con un evaporador rotatorio en un baño de agua caliente a 60 °C. Los disolventes orgánicos se evaporaron al vacío. Se añadió agua (150 ml) al residuo, seguido de ácido acético (10 ml). Se obtuvo una mezcla de color naranja claro. La extracción con acetato de etilo (3 x 100 ml), el secado de las fracciones orgánicas combinadas con Na_2SO_4 y la concentración al vacío dieron el producto en bruto en forma de un sólido de color naranja. Los sólidos se agitaron con tBME (150 ml). Un sólido de color beige precipitó y se obtuvo una solución de color naranja. Se añadió heptano (250 ml) y la mezcla se agitó durante 15 minutos. La mezcla se filtró sobre un filtro de vidrio. Los sólidos residuales se lavaron con heptanos (2 x 50 ml) sobre el filtro bajo succión. El secado de los sólidos al vacío a 60 °C dio ácido 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxílico puro (SUL-118) en forma de un sólido de color blanquecino (3,1 g, 10,13 mmol; 39 %, puro al 100 %). ^{1}H RMN ($CDCl_3$, en ppm): 1,38 (t, 12 H), 1,52 (s, 3H), 1,87 (m, 1H), 2,20 (s, 3H), 2,30 (m, 1H), 3,20 (m, 1H), 3,38 (m, 1H). M^+ = 307,10

[0098] Ejemplo 5. Síntesis de SUL 119 (2-(hidroximetil)-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-6-ol). Una solución de 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carboxilato de metilo (500 mg, 1,56 mmol) en THF (12 ml) se añadió durante 5 minutos con una jeringa a través de un tapón de caucho a $LiAlH_4$ (238 mg, 6,26 mmol; 4 equiv.), pesada previamente en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 100 ml seco en una atmósfera de nitrógeno inerte mientras se agitaba a temperatura ambiente. La adición exotérmica del éster se acompañó de desprendimiento de gas. Después de que se completara la adición, la suspensión de color gris resultante se calentó a reflujo. Después de 3 horas, se detuvo el calentamiento y la reacción se inactivó mediante la adición gota a gota de EtOAc (6 ml, exotérmico). Se añadió agua (5 ml) en pequeñas porciones, seguido de HCl 2 N (2 ml) seguido de EtOAc (25 ml). La mezcla se vertió sobre Na_2SO_4 (aprox. 50 g) y la capa orgánica de color ligeramente amarillo se separó de la mezcla de dos fases. La fase acuosa se lavó con EtOAc (50 ml) y las fracciones orgánicas combinadas se concentraron al vacío para dar el alcohol en bruto (530 mg) en forma de un aceite transparente. Se añadió heptano (100 ml) y después de la concentración al vacío el 2-(hidroximetil)-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-6-ol (248 mg, 0,85 mmol, 54 %, LCMS: puro al 95,5 %).
M^+ = 293,2

[0099] Ejemplo 6. Síntesis de SUL 139 (2-(4-(ácido 6-hidroxi-5,7-diisopropil-2,8-dimetilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético). Se disolvió **SUL-137** (440 mg, 1,17 mmol, 1 equiv.) en MeOH (50 ml) y se añadió ácido glioxálico (216 mg, 2,35 mmol, 2 equiv.). La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y, posteriormente, se añadió $NaBH_3CN$ (183 mg, 2,94 mmol, 2,5 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió ácido acético (pocos ml) y después de la agitación a temperatura ambiente durante 0,5-1 hora, la mezcla de reacción se concentró. El residuo obtenido se disolvió en EtOAc, se lavó con H_2O (2 x), se secó, se filtró y se concentró para proporcionar **SUL-139** (500 mg, 1,16 mmol, 98 %, puro al 91-92 %) en forma de un sólido de color amarillo claro.
^{1}H RMN (CD_3OD, en ppm): 1,33 (dd, 12H), 1,59 (s, 3H), 1,62 (m, 1H), 2,09 (s, 3H), 2-5-3,0 (m, 7H), 3,1-3,6 (m, 4H), 3,81 (s a, 2H), 4,28 (s a, 2H). M^+ = 433,2.

[0100] Ejemplo 7. Síntesis de SUL 136 (ácido 2-(4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)piperazin-1-il)acético). Un matraz de tres bocas de 250 ml equipado con dos tapones (izquierdo y derecho) y una llave de paso se cargó con SUL-136 (15,5 g, 38,4 mmol) y THF/agua (240 ml de THF + 80 ml de agua). La solución transparente se agitó y se desgasificó durante al menos 30 minutos por burbujeo de argón, usando un tubo de entrada equipado con una aguja de jeringa larga a través del tapón izquierdo; el tapón derecho se equipó con una aguja corta y funcionó como salida. La solución desgasificada (que se mantuvo en una atmósfera de argón) se enfrió a 0 ºC en un baño de hielo y se añadió en una porción LiOH anhidro sólido (2,3 g,96 mmol, 2,5 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó durante 2 horas a 0 ºC después de lo cual se neutralizó por la adición de una suspensión de MeOH/agua (3/1, v/v) de una resina de intercambio iónico Dowex-50WX8-200; el pH final fue de aprox. 6. La resina Dowex se eliminó por filtración con succión y se aclaró con 3 porciones de MeOH/agua (3/1, v/v). El filtrado se redujo al vacío y al producto húmedo se le añadieron aprox. 100 ml de agua. La suspensión acuosa de color blanco resultante se liofilizó durante una noche para proporcionar SUL-136 (13,48 g, 93 %. LCMS: 99,6 %) en forma de un sólido de color blanco.
1H RMN (CD3OD, en ppm)): 1,60 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 2,05 (s, 3H), 2,10 (s, 6H), 2,55 (m, 2H), 2,62 (m, 1H), 3,0, (s

a, 4H), 3,40 (s a, 2H), 3,65 (s a, 2H), 4,25 (s a, 2H). M^+ = 377,1

[0101] Ejemplo 8. Síntesis de SUL 144 (ácido (2S)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxílico). Se disolvió 1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbonil)pirrolidin-2-carboxilato de (2S)-metilo (diastereómero 1, 3,5 g, 9,7 mmol) en THF/H_2O (60/20 ml). Se burbujeó N_2 a través de la solución durante 1 h. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió LiOH.H_2O (1,01 g, 24,2 mmol, 2,5 equiv.). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N_2 a TA durante una noche. Se añadió Dowex-50WX8-200 (lavado 4x con 3:1 de MeOH/H_2O) en forma de una suspensión en MeOH/H_2O (3:1) hasta el pH = 6. La mezcla se filtró, se lavó con MeOH/H_2O (3:1) y se concentró al vacío. Se añadió H_2O desmineralizada (50 ml) al concentrado, y la solución se liofilizó proporcionando SUL-144 (3,4 g, 9,7 mmol, cuant., puro al 99,7 %) en forma de una espuma de color blanquecino.
1H RMN ($CDCl_3$): 1,60 (s, 3H), 1,65-2,30 (m, 14H), 2,60 (m, 2H), 2,81 (m, 1H), 3,49 (m, 1H), 4,01 (t, 1H), 4,50 (d, 1H). M^+ = 348,1

Ejemplo 9: SUL 109 para tolerancia isquémica al frío de corazones porcinos

[0102] Este ejemplo estudia si SUL 109 como aditivo a los protocolos estándar de trasplante cardíaco ayudará a prolongar la máxima protección isquémica en frío de los corazones porcinos. Para el arresto a largo plazo, por ejemplo en caso de trasplante, una solución comúnmente utilizada es CUSTODIOL®. Con la solución CUSTODIOL® es posible mantener un corazón en un estado isquémico frío durante hasta seis horas antes de que sea necesaria la reperfusión con sangre oxigenada caliente.

Material y métodos

[0103] Se recogieron dos corazones de cerdos de matadero y se trataron de la siguiente manera. Los cerdos quedaron aturdidos por una descarga eléctrica en la cabeza y se desangraron cortando la vena cava superior. Después de la extracción de la sangre, el esternón se abrió rápidamente y el corazón y los pulmones se eliminaron en conjunto. El corazón se sumergió inmediatamente en un baño enfriado con hielo y la aorta se cortó proximal a las ramas laterales bracocefálicas. Se insertó una cánula de 19 mm en la aorta y se ató. La cánula cuidadosamente desaireada se usó para administrar retrógradamente una solución cardiopléjica fría. En el primer corazón, se administraron 2 litros de CUSTODIOL® estándar con 5000 UI/l de heparina añadida. Al segundo corazón se le administraron 2 litros de CUSTODIOL® con 5000 UI/l de heparina y 10 ml/l de SUL 109 en NaCl al 0,9 % a 75 µM. Ambos corazones se almacenaron en bolsas de plástico llenas con las mismas soluciones y se transportaron al laboratorio en hielo a aproximadamente 4 °C. Antes de la preparación, los corazones se almacenaron a 4 °C durante 24 horas. Al día siguiente, se prepararon ambos corazones para su montaje en la plataforma PhysioHeart como se describe en DeHart et al. 2011. Después de retirar el aire de los corazones, se inició la reperfusión retrógrada de la aorta con sangre oxigenada caliente a 38 °C. Tanto el flujo de sangre como la presión en la raíz aórtica se registraron durante el experimento.

Resultados y hallazgos

[0104] Primero, el corazón no tratado con SUL109 se sometió a reperfusión con sangre. Este corazón mostró una gran resistencia vascular en la reperfusión, dando como resultado un flujo sanguíneo coronario total de 0,5 litros por minuto a una presión aórtica establecida de 80 mmHg. No fue visible casi ninguna actividad contráctil del músculo cardíaco después de 5 minutos, solo un leve movimiento de tejido que se asemeja a la fibrilación. Después de una desfibrilación por descarga eléctrica y de ayudar al corazón con un marcapasos, se observó una contracción vaga del ventrículo izquierdo lateral y anterior.

[0105] El segundo corazón, que se trató con SUL109, también se sometió a reperfusión con sangre. Inmediatamente después del comienzo de la reperfusión, se produjo la primera diferencia notable con el corazón no tratado. El tejido muscular del corazón tratado inicialmente era duro y rígido como el corazón no tratado, pero en la reperfusión y el calentamiento el corazón gradualmente se volvió menos duro y rígido y casi se sentía como un corazón normal a reperfusión en 6 horas. Esto dio como resultado una menor resistencia vascular, como se observó por un flujo coronario de 1 1 pm a una presión de perfusión de 80 mmHg. El corazón tratado mostró inmediatamente más actividad contráctil en comparación con el no tratado y después de algunas descargas de desfibrilación se observó un patrón de contracción débil sin espaciar.

Análisis

[0106] En el procedimiento de recolección normal de los experimentos de PhysioHeart, los corazones se detienen en una solución cardiopléjica fría y se transportan a los laboratorios de LifeTec Group para una preparación e intervenciones quirúrgicas adicionales. Las preparaciones pueden tardar hasta 4 horas, después de lo cual el corazón se reactiva mediante reperfusión con sangre oxigenada caliente. Para aumentar el tiempo de preparación, o

para permitir un tiempo de recorrido más largo antes de la reperfusión, sería muy útil poder proteger los tejidos del miocardio durante el tiempo de isquemia en frío. Este ejemplo muestra una clara diferencia observada entre el corazón tratado con SUL109 y el corazón no tratado, ya que el primero mostró una actividad contractiva regular mejorada del tejido del miocardio. Por consiguiente, el uso de SUL 109 como un aditivo para los protocolos estándar de trasplante de corazón prolonga la protección contra la isquemia en frío.

REIVINDICACIONES

1. (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica.

2. (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica para su uso como un medicamento.

3. (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica para su uso en el tratamiento o profilaxis de ictus isquémico, convulsiones cerebrales, trombosis, embolia, hemorragia, enfermedad cardiovascular, artritis, diabetes, cáncer, en particular cáncer relacionado con el envejecimiento, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, infartos de miocardio, esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome X frágil, enfermedad de células falciformes, y síndrome de fatiga crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una enfermedad neurodegenerativa tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Huntington, hipotermia/reperfusión, choque hemorrágico, enfermedades infecciosas implicadas en el ataque o aumento de la descomposición de trombocitos, tal como fiebre hemorrágica, en particular ébola, enfermedad de Marburg y Chagas.

4. (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica para su uso en el tratamiento o profilaxis de lesión por isquemia/reperfusión.

5. (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica para su uso en el tratamiento o profilaxis de indicaciones involucradas con el daño celular inducido por estrés oxidativo.

6. (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica para su uso en la prevención de la agregación de plaquetas en el tratamiento o profilaxis de trombosis arterial, fibrilación arterial, embolia pulmonar (PE), trombosis venosa profunda (TVP) o tromboembolismo venoso (TEV), insuficiencia cardíaca congestiva, ictus, infarto de miocardio, hipercoagulabilidad genética o adquirida, aterosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cerebrovascular, accidente cerebrovascular, enfermedad oclusiva de la arteria periférica (PAOD).

7. Medio que comprende (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica y células.

8. Medio de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las células son plaquetas sanguíneas, células cultivadas de mamífero o células primarias de mamífero.

9. Medio que comprende (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica y un tejido.

10. Método para la protección *in vitro* de células que comprende añadir (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica a una célula.

11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la protección de las células se produce durante el almacenamiento.

12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el almacenamiento se produce a una temperatura inferior a 37 ºC, en particular a temperatura ambiente, a 4 ºC, a -20 ºC o a -80 ºC.

13. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la adición de (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica se produce antes del enfriamiento de las células.

14. Método de acuerdo con las reivindicaciones 11-13, en el que las células son células cultivadas de mamífero, células primarias de mamífero o plaquetas sanguíneas.

15. Uso de (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona en su forma racémica o enantiomérica para el almacenamiento *in vitro* de células a una temperatura por debajo de 37 °C, en particular a 4 °C, temperatura ambiente, -20 °C o -80 °C.

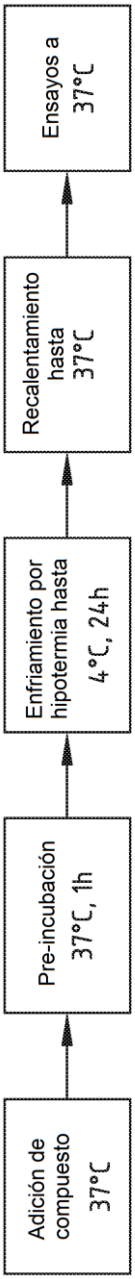

Adición de compuesto 37°C
Pre-incubación 37°C, 1h
Enfriamiento por hipotermia hasta 4 °C, 24h
Recalentamiento hasta 37°C
Ensayos a 37°C

FIG. 1

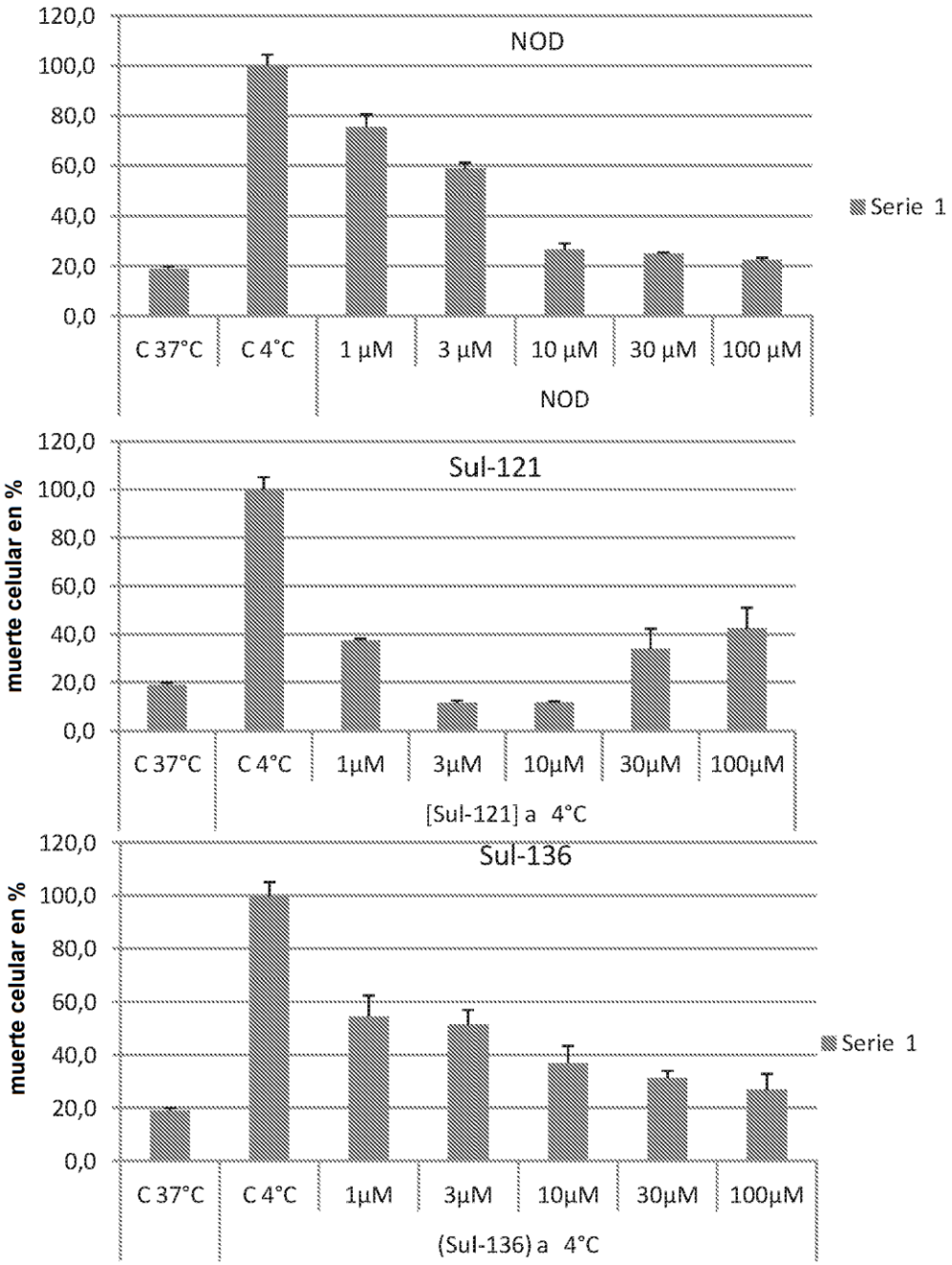

NOD
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
C 37°C
C 4°C
1 µM
3 µM
10 µM
30 µM
100 µM
NOD
Serie 1
Sul-121
muerte celular en %
1µM
3µM
10µM
30µM
100µM
[Sul-121] a 4°C
Sul-136
(Sul-136) a 4°C

FIG. 2

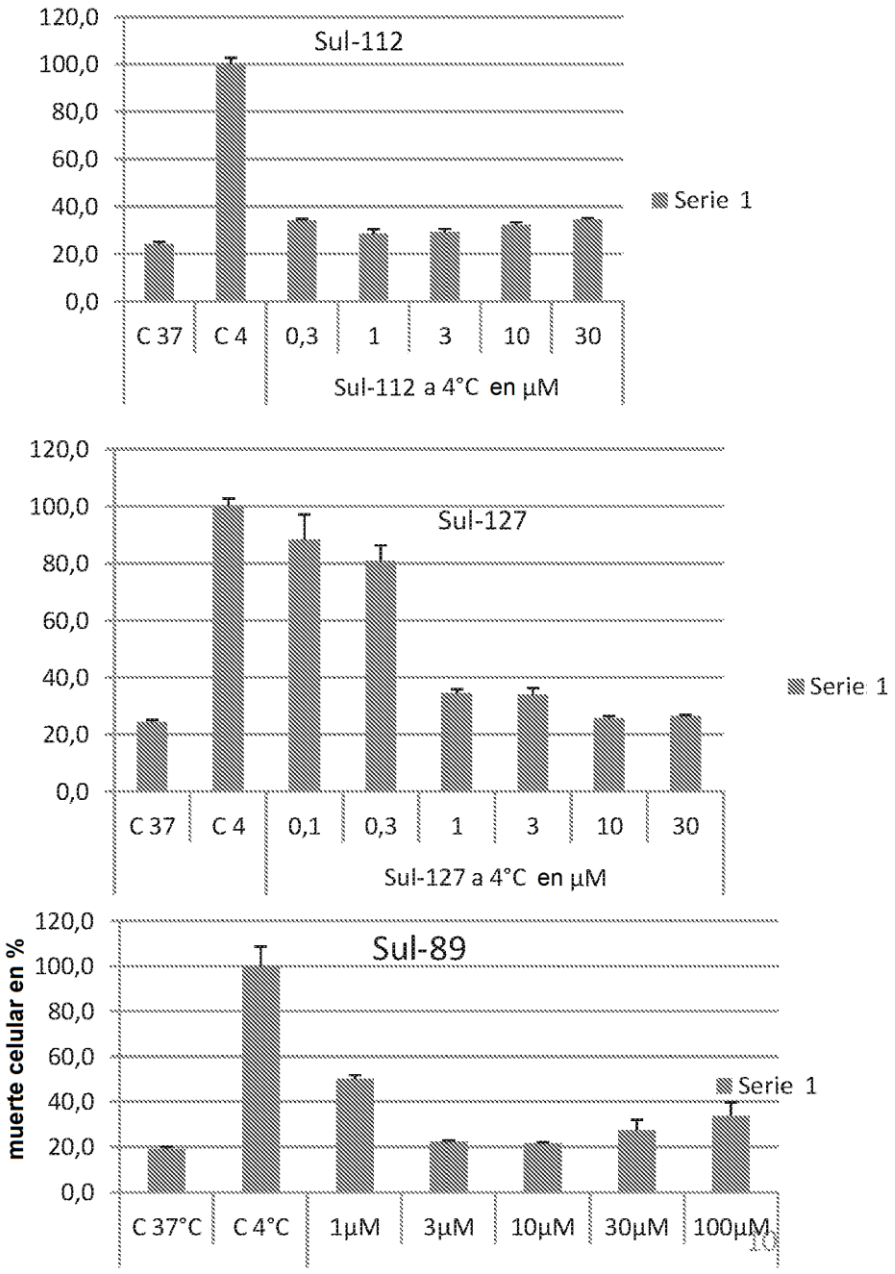


FIG. 2 continuación

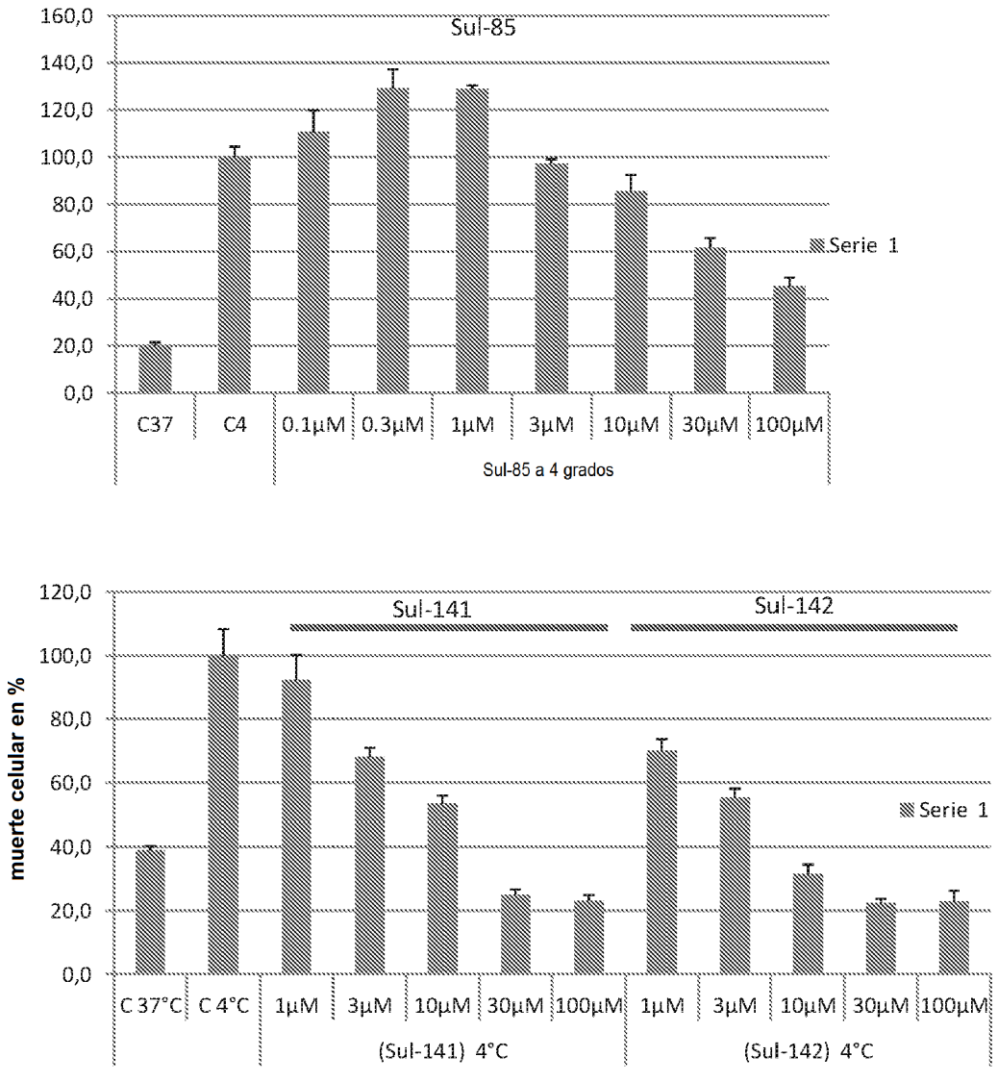

Sul-85
160,0
140,0
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
Serie 1
C37
C4
0.1µM
0.3µM
1µM
3µM
10µM
30µM
100µM
Sul-85 a 4 grados
Sul-141
Sul-142
muerte celular en %
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
Serie 1
C 37°C
C 4°C
1µM
3µM
10µM
30µM
100µM
1µM
3µM
10µM
30µM
100µM
(Sul-141) 4°C
(Sul-142) 4°C

FIG. 2 fin