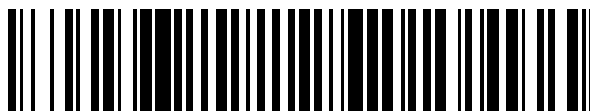


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 279**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 413/12 (2006.01)

C07D 249/08 (2006.01)

C07D 401/10 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2013** **PCT/US2013/040404**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013** **WO13170068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2013** **E 13779943 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018** **EP 2858991**

54 Título: **Moduladores del transporte nuclear y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.05.2012 US 201261644802 P

15.03.2013 US 201361798188 P

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

28.02.2019

73 Titular/es:

BIOGEN MA INC. (100.0%)

225 Binney Street

Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

SANDANAYAKA, VINCENT P.;

SHECHTER, SHARON;

SHACHAM, SHARON;

MCCAULEY, DILARA y

BALOGLU, ERKAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 702 279 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

Moduladores del transporte nuclear y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

El documento WO 2011/109799 se publicó el 9 de septiembre de 2011 y se titula "Nuclear transport modulators and uses thereof".

10 Las células de la mayoría de las neoplasias malignas sólidas y hematológicas humanas exhiben una localización celular anormal de diversas proteínas oncogénicas, proteínas de supresión tumoral y reguladores del ciclo celular Cronshaw et al, 2004, Falini et al 2006). Por ejemplo, ciertas mutaciones en p53 conducen a la localización en el citoplasma en lugar de en el núcleo. Esto tiene como resultado la pérdida de regulación del crecimiento normal, a pesar de que haya una función de supresión tumoral intacta. En otros tumores, el p53 salvaje se secuestra en el
15 citoplasma o se degrada rápidamente, lo que conduce de nuevo a la pérdida de su función supresora. La restauración de la localización nuclear adecuada de la proteína p53 funcional puede normalizar algunas propiedades de las células neoplásicas (Cai et al, 2008; Hoshino et al 2008; Lain et al 1999a; Lain et al 1999b; Smart et al 1999), puede restablecer la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes de daños del ADN (Cai et al, 2008) y puede conducir a la regresión de tumores establecidos (Sharpless & DePinho 2007, Xue et al, 2007). Se han
20 obtenido datos similares para otras proteínas supresoras tumorales tales como *forkhead* (Turner y Sullivan 2008) y c-Abl (Vignari and Wang 2001). Además, la localización anormal de varias proteínas supresoras tumorales y reguladoras del crecimiento puede estar implicada en la patogénia de las enfermedades autoinmunitarias (Davis 2007, Nakahara 2009). La inhibición de CRM1 puede proporcionar una utilidad particularmente interesante en los síndromes familiares de cáncer (por ejemplo, síndrome de Li-Fraumeni debido a la pérdida de un alelo de p53, síndromes de cáncer de BRCA1 o 2), en los que las proteínas específicas de supresión tumoral (TSP) se eliminan o
25 son disfuncionales y en los que el incremento de los niveles de las TSP mediante la administración sistémica (o local) de inhibidores de CRM1 podría ayudar a restablecer la función de supresión tumoral normal.

Las proteínas y ARN específicos entran y salen del núcleo mediante moléculas de transporte especializadas que se clasifican como importinas si transportan las moléculas al núcleo y exportinas si transportan las moléculas hacia fuera del núcleo (Terry et al, 2007; Sorokin et al 2007). Las proteínas que son transportadas hacia dentro o hacia fuera del núcleo contienen secuencias de importación/localización (NLS) o exportación (NES) que les permiten interactuar con los vehículos relevantes. La proteína del mantenimiento de la región cromosómica 1 (CRM1) que también se denomina exportina-1 o Xpo1 es una exportina fundamental.

35 Se ha comunicado sobreexpresión de Crm1 en varios tumores, incluyendo cáncer de ovarios humano (Noske et al, 2008), cáncer cervical (van der Watt et al, 2009), cáncer pancreático (Huang et al, 2009), carcinoma hepatocelular (Pascale et al, 2005) y osteosarcoma (Yao et al, 2009) y se correlaciona de forma independiente con malos resultados clínicos en estos tipos de tumores.

40 La inhibición de Crm1 bloquea la salida del núcleo de las proteínas de supresión tumoral y/o los reguladores del crecimiento tales como p53, c-Ab1, p21, p27, pRB, BRCA1, Ikb, ICp27, E2F4, KLF5, YAP1, ZAP, KLF5, HDAC4, HDAC5 o proteínas *forkhead* (por ejemplo, FOXO3a) que están asociadas con la expresión génica, la proliferación celular, la angiogénesis y la epigenética. Se ha demostrado que los inhibidores de Crm1 inducen apoptosis en las células cancerosas en presencia de señales de activación oncogénicas o de estimulación del crecimiento, mientras que no afectan a las células normales (no transformadas). La mayoría de los estudios de inhibición de Crm1 han usado el producto natural inhibidor de Crm1 Leptomycin B (LMB). La LMB es muy tóxica para las células neoplásicas pero mal tolerada con una toxicidad gastrointestinal marcada en animales (Roberts et al, 1986) y seres humanos. (Newlands et al, 1996). La derivación de LMB para mejorar las propiedades de tipo fármaco conduce a compuestos que retienen la actividad antitumoral y son mejor tolerados en modelos de tumores animales (Yang et al, 2007, Yang et al, 2008, Mutka et al, 2009). Por tanto, los inhibidores de la exportación nuclear podrían tener efectos beneficiosos en trastornos neoplásicos y otros proliferativos. No obstante, hasta la fecha, los inhibidores de Crm1 de tipo fármaco y molécula pequeña para su uso *in vitro* e *in vivo* son poco frecuentes.

55 Además de las proteínas de supresión tumoral, la Crm1 también exporta varias proteínas clave que participan en muchos procesos inflamatorios. Estas incluyen Ikb, NF-kB, Cox-2, RXRα, Commd1, HIF1, HMGB1, FOXO, FOXP y otras. La familia del factor nuclear kappa B (NF-kB/rel) de los activadores de la transcripción, nombrada por el descubrimiento de que dirige la expresión del gen kappa de la inmunoglobulina, regulan la expresión del ARNm de varios genes implicados en la inflamación, proliferación, inmunidad y supervivencia celular. En condiciones basales, un inhibidor proteico de NF-kB, denominado Ikb, se une a NF-kB en el núcleo y el complejo Ikb-NF-kB inactiva la función transcripcional de NF-kB. En respuesta a estímulos inflamatorios, Ikb se disocia del complejo Ikb-NF-kB, que libera NF-kB y desenmascara su potente actividad transcripcional. Muchas señales que activan NF-kB lo hacen apuntando a Ikb para su proteólisis (la fosforilación de Ikb lo convierte en "marcado" para ubiquitinación y después proteólisis). La Crm1 puede exportar el complejo Ikb-NF-kB nuclear al citoplasma, donde se disocia y se puede reactivar el NF-kB. El Ikb ubiquitinado también se puede disociar del complejo NF-kB, lo que restablece la actividad transcripcional de NF-kB. La inhibición de la exportación inducida por Crm1 en neutrófilos y células de tipo

macrófagos humanos (U937) por la LMB no solo da lugar a la acumulación de complejo I κ Ba-NF- κ B nuclear transcripcionalmente inactivo sino que también evita la activación inicial de NF- κ B tras la estimulación (Ghosh 2008, Huang 2000). En un estudio diferente, el tratamiento con LMB inhibió la unión al ADN de NF- κ B inducida por IL-1 β (la primera etapa en la actividad transcripcional de NF- κ B), la expresión de IL-8 y la expresión de la molécula de adhesión intercelular en células endoteliales microvasculares pulmonares (Walsh 2008). COMMD1 es otro inhibidor nuclear de la actividad transcripcional tanto de NF- κ B como del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1). El bloqueo de la exportación nuclear de COMMD1 inhibiendo la Crm1 tiene como resultado un aumento de la inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B y de HIF1 (Muller 2009).

La Crm1 también participa en el transporte del receptor α del retinoide X (RXR α). El RXR α se expresa considerablemente en el hígado y desempeña un papel central en la regulación del metabolismo y la homeostasis de los ácidos biliares, colesterol, ácidos grasos, esteroides y xenobióticos. Durante la inflamación del hígado, los niveles de RXR α nucleares se reducen significativamente principalmente a causa de la exportación nuclear mediada por la inflamación de RXR α por la Crm1. Lep B puede evitar el incremento citoplasmático inducido por IL-1 β en los niveles de RXR α en las células derivadas de hígado humano (Zimmerman 2006).

El papel de la exportación nuclear mediada por Crm1 en la señalización de NF- κ B, HIF-1 y RXR α indica que el bloqueo de la exportación nuclear puede ser potencialmente beneficioso en muchos procesos inflamatorios a través de múltiples tejidos y órganos, incluyendo la vasculatura (vasculitis, arteritis, polimialgia reumática, aterosclerosis), dermatológicos (véase en lo que antecede), reumatológicos (artritis reumatoide y relacionadas, artritis psoriásica, espondiloartropatías, artropatías por cristales, lupus eritematoso sistémico, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, síndromes de miositis, dermatomiositis, miositis con cuerpos de inclusión, enfermedad del tejido conjuntivo indiferenciado, síndrome de Sjögren, esclerodermia y síndromes solapantes, etc.).

La inhibición de CRM1 afecta a la expresión génica inhibiendo/activando una serie de factores de transcripción como ICp27, E2F4, KLF5, YAP1, ZAP.

La inhibición de CRM1 tiene potenciales efectos terapéuticos en muchos síndromes dermatológicos, incluyendo dermatosis inflamatorias (atopia, dermatitis alérgica, dermatitis química, psoriasis), daños producidos por el sol (daños por rayos ultravioleta/UV) e infecciones. La inhibición de CRM1, mejor estudiada con la LMB, mostró efectos mínimos sobre los queratinocitos normales y ejerció actividad antiinflamatoria sobre los queratinocitos sometidos a UV, TNF α u otros estímulos inflamatorios (Kobayashi & Shinkai 2005, Kannan & Jaiswal 2006). La inhibición de CRM1 también regula por aumento la actividad de NRF2 (factor nuclear eritroide-factor 2 relacionado), que protege a los queratinocitos (Schafer et al, 2010, Kannan & Jaiswal 2006) y otros tipos de células (Wang et al, 2009) del daño oxidativo. La LMB induce apoptosis en los queratinocitos infectados con cepas del papilomavirus humano oncogénico (HPV) tales como HPV16, pero no en los queratinocitos no infectados (Jolly et al, 2009).

La CRM1 también participa en el transporte de proteínas neuroprotectoras clave que pueden ser útiles en enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica. Por ejemplo, (1) forzar la retención nuclear de reguladores neuroprotectores clave tales como NRF2 (Wang 2009), FOXA2 (Kittappa et al, 2007), aparcando en las células neuronales y/o mediante (2) la inhibición de la actividad transcripcional de NF κ B secuestrando I κ B en el núcleo en las células de la glía, la inhibición de Crm1 podría ralentizar o prevenir la muerte celular neuronal hallada en estos trastornos. También existen pruebas que relacionan la proliferación anormal de las células de la glía con anomalías en los niveles de CRM1 o la función de CR1 (Shen 2008).

Asimismo, la exportación nuclear intacta, mediada principalmente por la CRM1, es necesaria para la maduración intacta de muchos virus. Los virus en los que se ha implicado a la exportación nuclear, y/o la propia CRM1, en su ciclo de vida incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), adenovirus, el retrovirus de simio de tipo 1, el virus de la enfermedad de Borna, gripe (las cepas habituales así como las cepas H1N1 y H5N1 aviar), los virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC), el papilomavirus humano (HPV), el virus sincitial respiratorio (VSR), Dungee, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo, el virus de la fiebre amarilla, el virus del Nilo occidental, el virus del herpes simple (HSV), el citomegalovirus (CMV), y el poliomavirus de las células de Merkel (MCV). (Bhuvanankantham 2010, Cohen 2010, Whittaker 1998). Se ha previsto que en el futuro cercano se descubrirán infecciones virales adicionales que dependen de una exportación nuclear intacta.

La proteína Rev del VIH-1, que viaja a través del nucleolo y transporta entre el núcleo y el citoplasma, facilita la exportación de transcritos del VIH sin corte y empalme y con un único corte y empalme que contienen ARN de elementos de respuesta a Rev (RRE) mediante la ruta de exportación de la CRM1. La inhibición del transporte del ARN mediado por Rev usando inhibidores de CRM1 como LepB o PKF050-638 puede detener el proceso de la transcripción del VIH-1, inhibir la producción de los nuevos viriones de VIH-1 y, de este modo, reducir los niveles de VIH-1 (Pollard 1998, Daelemans 2002).

El virus del dengue (VDEN) es el agente causal de la frecuente enfermedad viral transmitida por artrópodos, la fiebre del dengue (FD) y su fiebre hemorrágica del dengue más grave y potencialmente mortal (FHD). La FHD parece ser el resultado de una hiperrespuesta inflamatoria exuberante al VDEN. La NS5 es la proteína del VDEN más grande y

más conservada. La CRM1 regula el transporte de la NS5 desde el núcleo al citoplasma, en el que se realizan la mayoría de las funciones de la NS5. La inhibición de la exportación mediada por CRM1 de NS5 tiene como resultado una cinética alterada de la producción del virus y reduce a inducción de la quimioquina inflamatoria interleuquina-8 (IL-8), lo que presenta una nueva vía para el tratamiento de enfermedades causadas por el VDENV y otros flavivirus

Otras proteínas de unión a ARN codificadas por virus que usan la CRM1 para salir del núcleo incluyen la proteína del tegumento de tipo 1 del VSH (VP13/14, o hUL47), la proteína pp65 del CMV, la proteína 3b del ORF del coronavirus del SARS y la proteína (M) de la matriz del VSR (Williams 2008, Sanchez 2007, Freundt 2009, Ghildyal 2009).

Es interesante el hecho de que muchos de estos virus están asociados con tipos específicos de cáncer humano, incluyendo el carcinoma hepatocelular (CHC) debido a la infección crónica por VHB o al VHC, cáncer cervical debido al HPV, y carcinoma de células de Merkel asociado con el VCM. Los inhibidores de la CRM1 podrían tener efectos beneficiosos sobre el proceso infeccioso viral así como sobre el proceso de transformación neoplásica debido a estos virus.

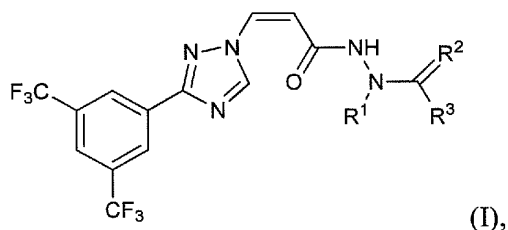
La CRM1 controla la localización nuclear y, por consiguiente, la actividad de múltiples enzimas metabolizantes del ADN, incluidas la histona desacetilasas (HDAC), las histona acetiltransferasas (HAT) y las histona metiltransferasas (HMT). Se ha demostrado que la supresión de la hipertrofia de los cardiomiocitos con inhibidores irreversibles de la CRM1 y se cree que está relacionada con la retención nuclear (y activación de HDAC 5, una enzima que se sabe que suprime un programa genético hipertrófico (Monovich et al, 2009). Por tanto, la inhibición de CRM1 puede tener efectos beneficiosos en los síndromes hipertróficos, incluyendo ciertas formas de insuficiencia cardíaca congestiva y miocardiopatías hipertróficas.

Asimismo, la CRM1 se ha relacionado con otros trastornos. El trastorno de Leber, un trastorno hereditario caracterizado por la degeneración de las células ganglionares de la retina y la pérdida de visión, está asociado con la inactivación del cambio de CRM1 (Gupta N 2008). También existen pruebas que relacionan los trastornos neurodegenerativos con anomalías en el transporte nuclear.

A la luz de lo anterior, es deseable el descubrimiento de compuestos que modulan el transporte nuclear.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a compuestos, y sales farmacéuticamente de los mismos, útiles como moduladores del transporte nuclear, a composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden compuestos de la presente invención y dichos compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento de diversos trastornos. En la actualidad se ha descubierto que los moduladores del transporte nuclear de la presente invención, y sales y/o composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos, proporcionan una deseable exposición *in vivo* medida por la AUC en ratones al tiempo que exhiben niveles menores de penetración en el cerebro en comparación con otros moduladores. Los compuestos de la invención tienen la fórmula general I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en los que cada variable es como se define y describe en el presente documento.

Los compuestos de la presente invención y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos son útiles para tratar diversas enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con respuestas celulares anormales desencadenadas por un inadecuado transporte nuclear. Dichas enfermedades trastornos o afecciones incluyen los descritos en el presente documento.

Los compuestos proporcionados por la presente invención también son útiles para el estudio de la modulación del transporte nuclear en fenómenos biológicos y patológicos; el estudio de las vías de transducción de la señal intracelular mediada por dichas quinasas y la evaluación comparativa de nuevos moduladores del transporte nuclear.

Breve descripción de los dibujos

Lo anterior será evidente a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones de ejemplo de la invención.

- 5 La Figura 1 es un gráfico del volumen tumoral medio frente al tiempo y muestra el volumen medio del grupo de tumores de xenoinjerto Z-138 en ratones tratados con vehículo, 80 mg/kg de ciclofosfamida, 15 mg/kg del compuesto 2 o 7,5 mg/kg del compuesto 2 (las barras de error representan la SEM para cada grupo).

- 10 La Figura 2 es un gráfico del volumen tumoral medio frente al tiempo y muestra el volumen medio del grupo de tumores de xenoinjerto A549 en ratones tratados con vehículo, 5 mg/kg de cisplatino, 10 mg/kg del compuesto 2 o 5 mg/kg del compuesto 2 (las barras de error representan la SEM para cada grupo).

- 15 La Figura 3A es un gráfico de la puntuación de la artritis total frente al tiempo y muestra la puntuación de la artritis clínica de ratones BALB/c macho con artritis inducida por anticuerpos anticolágeno tratados con vehículo, dexametasona, 4 mg/kg del compuesto 2 o 7,5 mg/kg del compuesto 2 durante un periodo de observación de 12 días (¥ = grupo tratado con dexametasona significativamente diferente del grupo tratado con vehículo; n.º = grupo tratado con 7,5 mg/kg del compuesto 2 significativamente diferente del grupo tratado con vehículo; † = grupo tratado con 4 mg/kg del compuesto 2 significativamente diferente del grupo tratado con vehículo).

- 20 La Figura 3B es un gráfico de pata trasera media frente al tiempo y muestra el grosor medio de la pata trasera del grupo para ratones BALB/c macho con artritis inducida por anticuerpos anticolágeno tratados con vehículo, dexametasona, 4 mg/kg del compuesto 2 o 7,5 mg/kg del compuesto 2 durante un periodo de observación de 12 días (¥ = grupo tratado con dexametasona significativamente diferente del grupo tratado con vehículo; n.º = grupo tratado con 7,5 mg/kg del compuesto 2 significativamente diferente del grupo tratado con vehículo; † = grupo tratado con 4 mg/kg del compuesto 2 significativamente diferente del grupo tratado con vehículo).

- La Figura 4A es un gráfico de la inflamación articular frente al tiempo y muestra la inflamación articular medida en una escala de 0-4 en ratas no tratadas anteriormente y ratas tratadas de acuerdo con el modelo CIA, con control positivo o con el compuesto 2.

- 30 La Figura 4B es un gráfico de las puntuaciones clínicas como una función del tiempo y muestra las puntuaciones de la artritis clínica de ratas no tratadas anteriormente y ratas tratadas de acuerdo con el modelo CIA, con control positivo o con el compuesto 2.

- 35 La Figura 5 son imágenes representativas de cada grupo de tratamiento en el modelo CIA y muestra la histopatología de las patas traseras de ratas no tratadas anteriormente y ratas tratadas de acuerdo con el modelo, con control positivo o con el compuesto 2.

- 40 La Figura 6A es un gráfico del grosor de la oreja frente al tiempo y muestra el grosor medio de la oreja izquierda del grupo de ratones BALB/c hembra tratados con vehículo, PMA y vehículo, PMA y compuesto 2 o PMA y betametasona.

- 45 La Figura 6B es un gráfico del grosor de la oreja frente al tiempo y muestra el grosor medio de la oreja derecha del grupo de ratones BALB/c hembra tratados con vehículo, PMA y vehículo, PMA y compuesto 2 o PMA y betametasona.

- La Figura 6C es un gráfico de la actividad de la enfermedad frente al tiempo y muestra la actividad media de la enfermedad en la oreja izquierda del grupo de ratones BALB/c hembra tratados con vehículo, PMA y vehículo, PMA y compuesto 2 o PMA y betametasona.

- 50 La Figura 6D es un gráfico de la actividad de la enfermedad frente al tiempo y muestra la actividad media de la enfermedad en la oreja derecha del grupo de ratones BALB/c hembra tratados con vehículo, PMA y vehículo, PMA y compuesto 2 o PMA y betametasona.

- 55 La Figura 7A es un gráfico del índice de la actividad de la enfermedad frente al tiempo y muestra la actividad de la enfermedad de ratones BALB/c macho tratados con vehículo, IMQ y vehículo, IMQ y compuesto 2 1 µM o IMQ y 10 mg/kg de ciclofosfamida antes de la administración de IMQ.

- 60 La Figura 7B es un gráfico del índice de la actividad de la enfermedad frente al tiempo y muestra la actividad de la enfermedad de ratones BALB/c macho tratados con vehículo, IMQ y vehículo, IMQ y compuesto 1 µM o IMQ y 10 mg/kg de ciclofosfamida después de la administración de IMQ.

- 65 La Figura 8A es un gráfico de la ingesta acumulada de alimentos frente al tiempo y muestra la ingesta acumulada de alimentos de ratas Zucker delgadas y ratas Zucker obesas tratadas con vehículo (VEH), 1,5 mg/kg del compuesto o 3,0 mg/kg del compuesto 2.

La Figura 8B es un gráfico de la ingesta media de alimentos frente al tiempo y muestra la ingesta media de alimentos de ratas Zucker delgadas y ratas Zucker obesas tratadas con vehículo (VEH), 1,5 mg/kg del compuesto o 3,0 mg/kg del compuesto 2.

5 La Figura 9 es un gráfico de barras del porcentaje de cambio del peso corporal frente al tiempo y muestra el porcentaje de cambio del peso corporal de ratas Zucker delgadas y de ratas Zucker obesas tratadas con vehículo (VEH), 1,5 mg/kg del compuesto y 3,0 mg/kg del compuesto 2 durante el periodo de tratamiento (días del estudio 10 y 17) y durante el periodo de lavado (día 24 del estudio) del experimento.

10 La Figura 10A es un gráfico de la ingesta acumulada de alimentos frente al tiempo y muestra la ingesta acumulada de alimentos de ratas alimentadas con pienso normal y ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con vehículo, 1,5 mg/kg del compuesto o 3,0 mg/kg del compuesto 2 durante las fases basal, de tratamiento y de lavado del estudio.

15 La Figura 10B es un gráfico del peso corporal medio frente al tiempo y muestra el peso corporal medio de ratas alimentadas con pienso normal y ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con vehículo, 1,5 mg/kg del compuesto o 3,0 mg/kg del compuesto 2 durante las fases basal, de tratamiento y de lavado del estudio.

20 La Figura 11 es un gráfico de barras del porcentaje del cambio del peso corporal frente al tiempo y muestra el porcentaje del cambio del peso corporal de ratas alimentadas con pienso normal y ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con vehículo, 1,5 mg/kg del compuesto y 3,0 mg/kg del compuesto 2.

La Figura 12A es un gráfico de la expresión de Nrf2 en diversas condiciones, incluyendo condiciones de interferencia génica.

25 La Figura 12B es un gráfico de la expresión de NQO1 en diversas condiciones, incluyendo condiciones de interferencia génica.

30 La Figura 12C es un gráfico de la expresión de EPHX1 en diversas condiciones, incluyendo condiciones de interferencia génica.

La Figura 13A es un gráfico de barras del cambio de la expresión del ARNm de COX-2 y muestra que el compuesto 1 no afecta a la transcripción de COX-2. El análisis de la expresión del ARNm de COX-2 mediante PCR-RTc de células HeLa sin tratar (control) se comparó con las células HeLa tratadas con el compuesto 1 10 μ M, 20 ng/ml de TNF α , o compuesto 1 10 μ M + 20 ng/ml de TNF α .

35 La Figura 13B es un gráfico de la intensidad de la expresión proteica de COX-2 y muestra que el compuesto 1 inhibe la expresión proteica de COX-2 inducida por TNF α .

40 La Figura 14A es una imagen de células tratadas con DMSO, 20 ng/ml de TNF α , o compuesto 1 + 20 ng/ml de TNF α y muestra la localización de varias proteínas de carga CRM1 relacionadas con la inflamación.

La Figura 14B es una imagen de células tratadas con DMSO, 20 ng/ml de TNF α , o compuesto 1 + 20 ng/ml de TNF α y muestra la localización de I κ B, NF κ B, NRF2, PPAR γ y RXR α .

45 La Figura 15A es un gráfico de la latencia para alcanzar la plataforma en la prueba de MWM en función del tiempo y muestra el efecto del tratamiento simulado, el tratamiento control, el tratamiento con progesterona y varias dosis del compuesto 1 sobre la latencia de los ratones hasta alcanzar la plataforma durante la fase de adquisición de la prueba de MWM (los datos representan la media $\pm$ SEM).

50 La Figura 15B es un gráfico de la concentración de citoquinas y muestra la concentración de varias citoquinas en plasma de rata.

55 La Figura 15C son fotografías de cerebros enteros de animales que reciben tratamiento simulado (simulado), CCI + vehículo (Control), o CCI + Compuesto 1 (6 mg/kg) y muestra los resultados de una inspección visual cualitativa de cerebros enteros antes de seccionar con vibratomo. La inspección indicó que ninguno (0 de 4) de los animales tratados simuladamente exhibió daños en el tejido cortical dorsal-medial. En marcado contraste, los cuatro controles CCI exhibieron lesiones bilaterales graves restringidas a esta región de la corteza. Los animales CCI que recibieron el compuesto 1 mostraron daños variables de moderados a mínimos. En particular, el cerebro que muestra la lesión más grave en el grupo de Compuesto 1 fue menos espectacular que todos los cerebros del grupo de control CCI.

60 La Figura 15D es una micrografía de potencia baja de marcaje con NeuN de la zona cortical dorsal y la zona cortical ventral de los animales tratados simuladamente (Simulados), CCI + tratados con vehículo (Control), y CCI + tratados con el compuesto 1 (KPT).

65 La Figura 15E son microfotografías de marcaje inmunofluorescente de IgG de rata y TNF α en animales tratados

simuladamente (Simulados), CCI + tratados con vehículo (Control), y CCI + tratados con el compuesto 1 (KPT).

La Figura 16A es un gráfico de la puntuación clínica como una función del tiempo y muestra las puntuaciones de la artritis clínica de ratas de Lewis hembras no tratadas anteriormente, ratas de Lewis artríticas hembras control o ratas de Lewis artríticas hembras tratadas con el compuesto 2.

La Figura 16B es un gráfico de la inflamación de las articulaciones como una función del tiempo y muestra la inflamación de las articulaciones medida en una escala de 0-4 en ratas de Lewis hembras no tratadas anteriormente, ratas de Lewis artríticas hembras control o ratas de Lewis artríticas hembras tratadas con el compuesto 2.

La Figura 17A es un gráfico de la densidad mineral ósea (DMO) de los huesos tarsos de ratas de Lewis hembras no tratadas anteriormente, ratas de Lewis artríticas hembras control o ratas de Lewis artríticas hembras tratadas con el compuesto 2.

La Figura 17B es una visualización mediante prueba de imagen micro CT tridimensional de las patas traseras de ratas de Lewis hembras no tratadas anteriormente, ratas de Lewis artríticas hembras control o ratas de Lewis artríticas hembras tratadas con el compuesto 2.

La Figura 17C es un gráfico de la concentración de IL-1 β en el líquido sinovial en función del tiempo y muestra la concentración de IL-1 β en el líquido sinovial recogido de ratas en el Grupo A (no tratados anteriormente), Grupo B (modelo) y el Grupo C (compuesto 2 a 5 mg/kg de todos los días) los días 21 y 27 del estudio CIA N.º 2.

La Figura 17D es un gráfico de la concentración de IL-6 en el líquido sinovial en función del tiempo y muestra la concentración de IL-6 en el líquido sinovial recogido de ratas en el Grupo A (no tratados anteriormente), Grupo B (modelo) y el Grupo C (compuesto 2 a 5 mg/kg de todos los días) los días 21 y 27 del estudio CIA N.º 2.

La Figura 17E es un gráfico de la concentración de MCP-1 en el líquido sinovial en función del tiempo y muestra la concentración de MCP-1 en el líquido sinovial recogido de ratas en el Grupo A (no tratados anteriormente), Grupo B (modelo) y el Grupo C (compuesto 2 a 5 mg/kg de todos los días) los días 21 y 27 del estudio CIA N.º 2.

La Figura 17F es un gráfico de la concentración de CRP en el líquido sinovial en función del tiempo y muestra la concentración de CRP en el líquido sinovial recogido de ratas en el Grupo A (no tratados anteriormente), Grupo B (modelo) y el Grupo C (compuesto 2 a 5 mg/kg de todos los días) los días 21 y 27 del estudio CIA N.º 2.

La Figura 17G es un gráfico de la concentración de IL-1 β en suero en función del tiempo y muestra la concentración de IL-1 β en muestras de suero de rata recogido de ratas en el Grupo A (no tratados anteriormente), Grupo B (modelo) y el Grupo C (compuesto 2 a 5 mg/kg de todos los días) los días 15, 21 y 27 del estudio CIA N.º 2.

La Figura 18A es un esquema del modelo murino de EAE inducido por MOG en ratones hembra descritos en el presente documento.

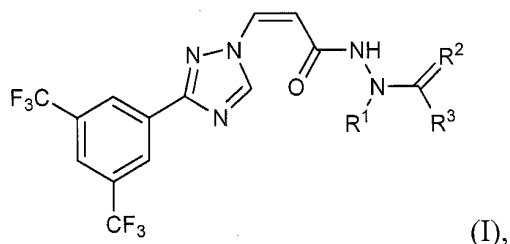
La Figura 18B es un gráfico de la puntuación clínica en función del día del estudio y muestra los efectos del tratamiento con vehículo, tratamiento con dexametasona y tratamiento con el compuesto 1 sobre la puntuación clínica de ratones hembra en el modelo murino de EAE inducido por MOG descrito en el presente documento.

La Figura 19 son fotografías de heridas tratadas por vía tópica o sistémica con el compuesto 1 o su vehículo adecuado y muestra los resultados de una evaluación de la morfología de la herida realizada al quinto día de la herida.

Descripción detallada de la invención

Compuestos de la invención

Una primera realización proporciona un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:

- 5 R¹ se selecciona entre hidrógeno y alquilo C₁-C₄;
 R² se selecciona de O y S; y
 R³ se selecciona de -N(R⁴)-(cicloalquilo C₃-C₆), alquilo C₁-C₆, -(alquilenos C₀-C₄)-heterociclilo y -(alquilenos C₀-C₄)-heteroarilo, en el que cualquier porción alquilo, alquilenos, heterociclilo o heteroarilo de R³ está opcionalmente sustituida; y
 10 R⁴ se selecciona entre hidrógeno y alquilo C₁-C₄.

En un primer aspecto de la primera realización, R¹ se selecciona entre hidrógeno y metilo. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización.

- 15 En un segundo aspecto de la primera realización, R¹ es hidrógeno. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización.

En un tercer aspecto de la primera realización, R² es O. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o el primer o segundo aspecto de la misma.

- 20 En un cuarto aspecto de la primera realización, R² es S. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o el primer a tercer aspectos de la misma.

En un quinto aspecto de la primera realización, R⁴ es hidrógeno.

- 25 En un sexto aspecto de la primera realización, R³ se selecciona de -N(R⁴)-(cicloalquilo C₃-C₆), -alquilo C₃-C₆, -(alquilenos C₀-C₁)-heterociclilo y -(alquilenos C₀-C₁)-heteroarilo, en el que cualquier porción alquilo o alquilenos de R³ está opcionalmente sustituida con -N(R⁵)₂, en el que cada R⁵ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₄; cualquier porción heterociclilo y heteroarilo de R³ comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo; y cualquier porción heterociclilo y heteroarilo de R³ está opcionalmente sustituida con alquilo C₁-C₄. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

- 35 En un séptimo aspecto de la primera realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropilo, -(CH₂)₀₋₁-pirazinilo, piperidinilo, hidroxipiperidinilo, N-metilpiperidinilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y metilpirazolilo. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

- 40 En un octavo aspecto de la primera realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropilo, -(CH₂)₀₋₁-pirazin-2-ilo, piperidin-3-ilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y 5-metil-1H-pirazol-4-ilo. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

- 45 En un noveno aspecto de la primera realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -NH-ciclopropilo, -(CH₂-pirazin-2-ilo, -pirazin-2-ilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y 5-metil-1-H-pirazol-4-ilo. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

Una segunda realización es un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R³ se selecciona de -N(R⁴)-(cicloalquilo C₃-C₆), -alquilo C₃-C₆, -(alquilenos C₀-C₁)-heterociclilo y -(alquilenos C₀-C₁)-heteroarilo, en el que:

- 50 cualquier porción alquilo o alquilenos de R³ está opcionalmente sustituida con -N(R⁵)₂, donde cada R⁵ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₄;
 cualquier porción heterociclilo y heteroarilo de R³ comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo; y
 cualquier porción heterociclilo y heteroarilo de R³ está opcionalmente sustituida con alquilo C₁-C₄.

- 55 En un primer aspecto de la segunda realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropilo, -(CH₂)₀₋₁-pirazinilo, piperidinilo, hidroxipiperidinilo, N-metilpiperidinilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y metilpirazolilo.

- 60 En un segundo aspecto de la segunda realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropilo, -(CH₂)₀₋₁-pirazin-2-ilo, piperidin-3-ilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y 5-metil-1H-pirazol-4-ilo.

En un tercer aspecto de la segunda realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -NH-ciclopropilo, -(CH₂-pirazin-2-ilo, -pirazin-2-ilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y 5-metil-1-H-pirazol-4-ilo.

- 65 Una tercera realización proporciona un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

donde R^3 se selecciona de $-N(R^4)$ -(cicloalquilo C_3-C_6), -alquilo C_3-C_6 , -(alquileo C_0-C_1)-heterociclilo y -(alquileo C_0-C_1)-heteroarilo, en el que:

cualquier porción alquilo o alquileo de cualquier R^3 está opcional e independientemente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en oxo y $-N(R^5)_2$, en el que cada R^5 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_4 ;

cualquier porción heterociclilo de R^3 comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo, y está opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo C_1-C_4 y oxo; y

cualquier porción heteroarilo de R^3 comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo y está opcionalmente sustituida con uno o más alquilo C_1-C_4 . Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

En un primer aspecto de la tercera realización, R^3 es -(alquileo C_0-C_1)-heterociclilo. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

En un segundo aspecto de la tercera realización, R^3 es -(alquileo C_0-C_1)-heterociclilo, en el que el heterociclilo se selecciona de pirazinilo, piperidinilo, morfolinilo, y pirazolilo. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

En un tercer aspecto de la tercera realización, R^3 es -(alquileo C_0-C_1)-heterociclilo, en el que el heterociclilo es morfolinilo. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

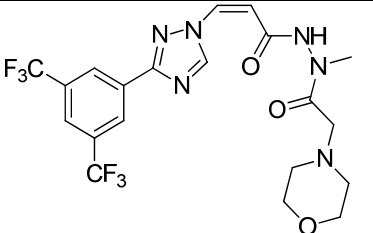
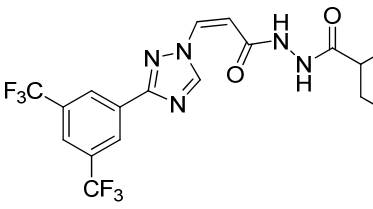
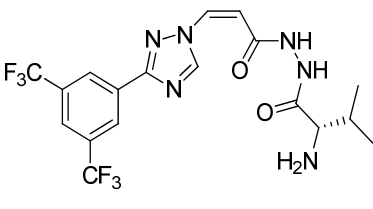
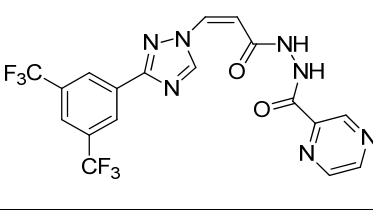
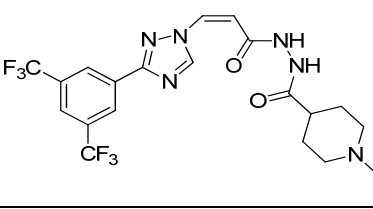
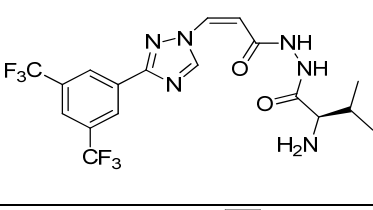
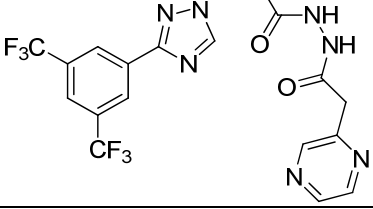
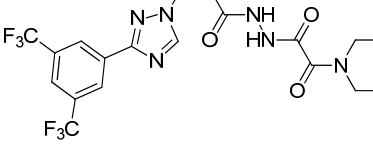
En un cuarto aspecto de la tercera realización, R^3 es -(alquileo C_1)-heterociclilo. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

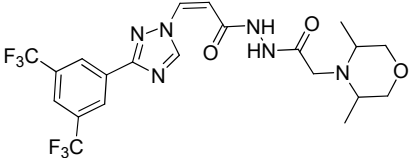
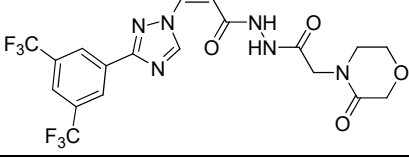
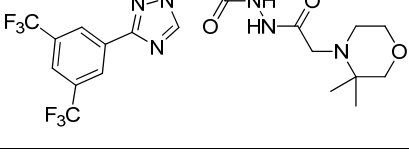
En un quinto aspecto de la tercera realización, R^3 es -(alquileo C_1)-morfolinilo. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización o del primer al quinto aspectos de la misma.

Compuestos de ejemplo de fórmula I se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1. Compuestos de ejemplo de fórmula I.

N.º de compuesto	Estructura del compuesto	Datos físicos (RMN de 1H y CLEM (M+H) $^+$)
1		RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,35 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,48-7,50 (d, J=8 Hz, 1H), 6,00-6,03 (d, J=12 Hz, 1H), 1,15 (s, 9H), CLEM calcd.: 450,36, hallado: 450,19 (tiempo de retención 2,89 min, pureza: 94,5 %),
2		RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,56 (s, 1H), 9,94 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,28 (s, 2H), 7,48-7,51 (d, J=10,8 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J=10,4 Hz, 1H), 3,60-3,62 (t, 4H), 3,08 (s, 2H), CLEM calcd.: 493,38, hallado: 493,24 (tiempo de retención 2,29 min, pureza: 99,48 %)
3		RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 13,01 (sa, 1H), 10,47 (sa, 1H), 10,03 (s, 1H), 9,70 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,97 (sa, 1H), 7,51-7,54 (d, J=10,8 Hz, 1H), 6,06-6,08 (d, J=10,4 Hz, 1H), 2,41 (s, 3H), CLEM calcd.: 474,34, hallado: 474,14 (tiempo de retención 2,51 min, pureza: 99,88 %)
4		RMN de 1H (400 MHz, MeOD, ppm) δ = 9,67 (s, 1H), 8,66 (s, 2H), 8,09 (s, 1H), 7,44-7,47 (d, J=10,8 Hz, 1H), 6,02 (m, 1H), 4,64 (s, 1H), 3,33 (m, 1H), 2,88 (m, 1H), 0,91 (m, 2H), 0,79 (m, 2H), CLEM calcd. para: $C_{17}H_{15}F_6N_6OS$ [M+H] $^+$: 465,40, hallado: 465,19 (tiempo de retención 2,78 min, pureza: 99,63 %)

5		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,36 (s, 1H), 9,10 (s, 1H), 8,53 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,32-7,34 (d, $J=10,0$ Hz, 1H), 6,05-6,07 (d, $J=10,0$ Hz, 1H), 3,56 (s, 4H), 3,10 (s, 3H), 3,05 (s, 2H), 2,51 (s, 4H), CLEM calcd. para: $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 507,41, hallado: 507,24 (tiempo de retención 2,40 min, pureza: 99,61 %)
6		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 9,73 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,41-7,44 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 5,98-6,00 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 2,91 (d, 1H), 2,81 (d, 1H), 2,34-2,58 (m, 4H), 1,77 (m, 1H), 1,54 (m, 2H), 1,34 (m, 1H), 1,23 (s, 2H), CLEM calcd.: 477,38, hallado: 477,24 (tiempo de retención 2,38 min, pureza: 95,46 %),
7		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,88 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,31 (s, 1H), 8,24 (s, 2H), 7,53-7,56 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 6,06-6,09 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 3,69 (s, 1H), 2,13 (m, 1H), 1,01 (d, 6H), CLEM calcd.: 465,37, hallado: 465,24 (tiempo de retención 2,45 min, pureza: 95,19 %)
8		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,95 (s, 1H), 10,82 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 9,22 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,56-7,53 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 6,10-6,08 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), CLEM calcd.: 472,32, hallado: 472,14 (tiempo de retención 2,68 min, pureza: 93,5 %)
9		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,61 (s, 1H), 10,26 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,52-7,49 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 6,02-6,05 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 3,38 (m, 3H), 2,91 (m, 2H), 2,70 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,76 (m, 2H), CLEM calcd.: 491,41, hallado: 491,24 (tiempo de retención 2,28 min, pureza: 99,97 %)
10		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,88 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,31 (s, 1H), 8,24 (s, 2H), 7,53-7,56 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 6,06-6,09 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 3,69 (s, 1H), 2,13 (m, 1H), 1,01 (d, 6H), CLEM calcd.: 465,37, hallado: 465,24 (tiempo de retención 2,45 min, pureza: 95,19 %)
11		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,69 (s, 1H), 10,54 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,58 (m, 2H), 8,56 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, $J=10,8$ Hz, 1H), 6,01-6,04 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 3,84 (s, 2H), CLEM calcd.: 486,35, hallado: 486,29 (tiempo de retención 2,49 min, pureza: 99,96 %)
12		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,70-10,88 (m, 2H), 9,56 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,52-7,55 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 6,0-6,03 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 3,51-3,64 (m, 8H), CLEM m/z 507,25 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 2,012$ min

5	13		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,58 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,54-8,56 (m, 2H), 8,25-8,30 (m, 1H), 7,49-7,51 (d, J=10,4 Hz, 1H), 6,01-6,04 (d, J=10,4 Hz, 1H), 3,44-3,57 (m, 2H), 3,28-3,34 (m, 2H), 3,21 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 2,84-2,88 (m, 2H), 0,93-1,04 (m, 6H); CLEM m/z 521,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R 1,898 min
10	14		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,33 (sa, 2H), 9,63 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,50-7,52 (d, J = 8 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J = 8 Hz, 1H), 4,08-4,12 (m, 4H), 3,85-3,87 (m, 2H), 3,41-3,44 (m, 2H), CLEM m/z 507,13 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R 1,950 min
15	15		RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,55 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 3,65-3,67 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 2H), 3,08 (sa, 2H), 2,55-2,58 (m, 2H), 0,96 (s, 6H), CLEM m/z 521,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R 1,937 min

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se selecciona a partir de uno cualquiera de los compuestos 1 a 11. En un aspecto de estas realizaciones, el compuesto se selecciona de uno cualquiera de los compuestos 1, 2, 3, 4, 8 y 11.

La farmacocinética (FC) desempeña un papel cada vez mayor en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. La farmacocinética es el estudio cuantitativo de la evolución temporal de la absorción, la distribución, el metabolismo y/o excreción de un fármaco. Cuando se administra un fármaco, se distribuye rápidamente desde su sitio de administración en la circulación sanguínea sistémica. Una medida de la extensión de la distribución de un agente terapéutico es el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC), calculada con la última concentración medida (AUC_t) y extrapolada al infinito (AUC_{inf}). Por tanto, la AUC es un indicador utilizado frecuentemente para cuantificar la exposición al fármaco. extrapolada al infinito (AUC_{inf}). Por tanto, la AUC es un indicador utilizado frecuentemente para cuantificar la exposición al fármaco

En general, cuanto mayor es la exposición de un agente terapéutico, mayores son los efectos del agente. Sin embargo, la alta exposición de un agente terapéutico puede tener efectos perjudiciales sobre ciertos tejidos tales como el cerebro. Si bien la barrera hematoencefálica (BHE), una red de protección que consta de uniones estrechas entre las células endoteliales, restringe la difusión de moléculas hidrófilas y/o grandes, los fármacos con una AUC alta siguen siendo capaces de atravesar la BBB y/o entrar en el líquido cefalorraquídeo. Tal penetración es a menudo indeseable y puede conducir a efectos secundarios no deseados. Los actuales esfuerzos de descubrimiento de fármacos están dirigidos, en parte, a un equilibrio sorprendente entre la maximización de la exposición al fármaco (es decir, AUC) y la reducción al mínimo la penetración en el cerebro.

La proporción cerebro: plasma (C:P) es una vez que dicho método de cuantificación de la distribución relativa de un agente terapéutico en el tejido cerebral y en la circulación. Dicha proporción proporciona una indicación de la penetración en el cerebro de un agente terapéutico dado. Se prefiere una alta relación entre el cerebro y el plasma cuando se apunta a enfermedades localizadas en el sistema nervioso central (SNC), incluyendo el cerebro y el fluido cefalorraquídeo. Sin embargo, una proporción entre el cerebro y el plasma baja suele ser preferible para los agentes terapéuticos no del SNC para minimizar la penetración en el cerebro para evitar efectos secundarios potenciales. Por lo tanto, una proporción cerebro: plasma baja es preferible para evitar la acumulación no deseada de los agentes terapéuticos en el cerebro y el tejido del SNC.

Como se ha establecido con mayor detalle en la sección de Ejemplos, los compuestos de la presente invención muestran una AUC mayor y/o una C:P menor en comparación con otros inhibidores del transporte nuclear, como los divulgados en la solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común N.º 13/041.377, presentada el 5 de marzo de 2011 y publicada como US 2011/275607 el 10 de noviembre de 2011. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I, en el que el compuesto tiene $<1\mu\text{M}$ (menos de $1\mu\text{M}$) actividad de exportación nuclear, una AUC_{inf} de más de aproximadamente 3500; y una C:P de menos de aproximadamente 2,5 cuando se administra en un ratón a 10 mg/kg por vía oral.

Las características novedosas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la siguiente descripción detallada de la invención.

Compuestos y Definiciones

Los compuestos de la presente invención incluyen los descritos generalmente anteriormente y se ilustran además mediante las clases, subclases y especies divulgadas en el presente documento. Como se usa en el presente documento, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que indique lo contrario. Para los fines de la presente invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª Ed. Además, los principios generales de química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5ª Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001.

A menos que se especifique lo contrario en esta memoria descriptiva, la nomenclatura utilizada en esta memoria descriptiva generalmente sigue los ejemplos y reglas establecidas en Nomenclatura de Química Orgánica, Secciones A, B, C, D, E, F, y H, Pergamon Press, Oxford, 1979. Opcionalmente, un nombre de un compuesto se puede generar usando un programa de nomenclatura química: ACD/ChemSketch, Versión 5.09/septiembre de 2001, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canadá.

Los compuestos de la presente invención pueden tener centros asimétricos, ejes quirales y planos quirales (por ejemplo, como se describe en: E. L. Eliel y S. H. Wilen, Stereo-chemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, New York, 1994, páginas 1119-1190), y se producen en forma de racematos, mezclas racémicas y como diastereómeros o enantiómeros individuales, estando todos los posibles isómeros y mezclas de los mismos, incluidos los isómeros ópticos, incluidos en la presente invención.

El término "halo" o "halógeno" como se usa en el presente documento significa halógeno e incluye, por ejemplo, y sin limitaciones, flúor, cloro, bromo, yodo y similares, tanto en formas radiactivas como no radiactivas.

El término "alquilo", como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, significa radicales de hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada saturados, típicamente C₁-C₁₂, preferiblemente C₁-C₆. Como tal, "alquilo C₁-C₆" significa un radical de hidrocarburo monovalente saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Ejemplos de grupos alquilo incluyen, entre otros, metilo, etilo, propilo, isopropilo y t-butilo. Como los procedimientos expuestos más adelante. En general, el término "sustituido", ya sea precedido por el término "opcionalmente" o no, significa que uno o más hidrógenos del resto designado están reemplazados con un sustituyente adecuado. A menos que se indique lo contrario, un "grupo opcionalmente sustituido" puede tener un sustituyente adecuado en cada posición sustituible del grupo y cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede estar sustituida con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser igual o diferente en cada posición. Alternativamente, un "grupo opcionalmente sustituido" puede ser no sustituido.

Las combinaciones de sustituyentes prevista por la presente invención son, preferentemente, aquellas que tienen como resultado la formación de compuestos estables o químicamente viables. Si un sustituyente está sustituido en sí mismo con más de un grupo, se entiende que estos múltiples grupos pueden estar en el mismo átomo de carbono o en diferentes átomos de carbono, siempre que tenga como resultado una estructura estable. El término "estable", como se usa en el presente documento, hace referencia a los compuestos que no se alteran sustancialmente cuando están sometidos a condiciones que permitan su producción, detección y, en determinadas realizaciones, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines divulgados en el presente documento.

Sustituyentes monovalentes adecuados en un átomo de carbono sustituible de un "grupo opcionalmente sustituido" son independientemente halógeno; $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$; $-O(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}Ph$, que puede estar sustituido con R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$ que puede estar sustituido con R° ; $-CH=CHPh$, que puede estar sustituido con R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -piridilo que puede estar sustituido con R° ; $-NO_2$; $-CN$; $-N_3$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$; $-C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^\circ$; $SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$; $-C(S)NR^\circ_2$; $-C(S)SR^\circ$; $-SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$; $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-C(NOR^\circ)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^\circ$; $-S(O)_2NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$; $-N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(NH)NR^\circ_2$; $-P(O)_2R^\circ$; $-P(O)R^\circ_2$; $-OP(O)R^\circ_2$; $-OP(O)(OR^\circ)_2$; SiR°_3 ; $-(alquilenos C_{1-4})O-N(R^\circ)_2$; o $-(alquilenos C_{1-4} \text{ lineal o ramificado})C(O)O-N(R^\circ)_2$, en el que cada R° puede estar sustituido como se define más adelante y es independientemente hidrógeno, C₁₋₆ alifático, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, $-CH_2$ -(anillo heteroarilo de 5-6 miembros), o un anillo de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o arilo que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre o, a pesar de la definición anterior, las dos apariciones independientes de R° , junto con sus átomo(s) intermedios, forman un anillo de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o arilo monocíclico o bicíclico que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, que pueden estar sustituidos como se define a continuación.

Los sustituyentes monovalentes adecuados sobre R° (o el anillo formado tomando dos apariciones independientes de R° junto con sus átomos intermedios), son independientemente halógeno, $-(CH_2)_{0-2}R^\bullet$, $-(haloR^\bullet)$, $-(CH_2)_{0-2}OH$, $-$

(CH₂)₀₋₂OR^{*}, -(CH₂)₀₋₂CH(OR^{*})₂, -O(haloR^{*}), -CN, -N₃, -(CH₂)₀₋₂C(O)R^{*}, -(CH₂)₀₋₂C(O)OH, -(CH₂)₀₋₂C(O)OR^{*}, -(CH₂)₀₋₂SR^{*}, -(CH₂)₀₋₂SH, -(CH₂)₀₋₂NH₂, -(CH₂)₀₋₂NHR^{*}, -(CH₂)₀₋₂NR^{*}₂, -NO₂, -SiR^{*}₃, -OSiR^{*}₃, -C(O)SR^{*}, - (alquileo C₁₋₄ lineal o ramificado) C(O)OR^{*}, o -SSR^{*} en los que cada R^{*} está no sustituido o cuando está precedido por "halo" está sustituido únicamente por uno o más halógenos y se selecciona independientemente de alifático C₁₋₄, -CH₂Ph, -O(CH₂)₀₋₁Ph, o un anillo de 5-6-miembros saturado, parcialmente insaturado o arilo que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de R^o incluyen =O y =S.

Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de un "grupo opcionalmente sustituido" incluyen los siguientes: =O, =S, =NNR^{*}₂, =NNHC(O)R^{*}, =NNHC(O)OR^{*}, =NNHS(O)₂R^{*}, =NR^{*}, =NOR^{*}, -O(C(R^{*})₂)₂₋₃O-, y -S(C(R^{*})₂)₂₋₃S-, en los que cada aparición independiente de R^{*} se selecciona entre hidrógeno, alifático C₁₋₆ que puede estar sustituido como se define a continuación, o un anillo no sustituido de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o arilo que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, y azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados que están unidos carbonos vecinos sustituibles de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen: -O(CR^{*})₂₋₃O-, en el que cada aparición independiente de R^{*} se selecciona entre hidrógeno, alifático C₁₋₆ que puede estar sustituido como se define a continuación o un anillo no sustituido de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o arilo que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, y azufre.

Los sustituyentes adecuados en el grupo alifático de R^{*} incluyen halógeno, -R^{*}, -(haloR^{*}), -OH, -OR^{*}, -O(haloR^{*}), -CN, -C(O)OH, -C(O)OR^{*}, -NH₂, -NHR^{*}, -NR^{*}₂, y -NO₂, en el que cada R^{*} es no sustituido o cuando están precedido con "halo" está sustituido únicamente con uno o más halógenos y es independientemente alifático C₁₋₄, -CH₂Ph, -O(CH₂)₀₋₁Ph, o un anillo de 5-6-miembros saturado, parcialmente insaturado o arilo que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, y azufre.

Los sustituyentes adecuados en un nitrógeno sustituible de un "grupo opcionalmente sustituido" incluyen -R[†], -NR[†]₂, -C(O)R[†], -C(O)OR[†], -C(O)C(O)R[†], -C(O)CH₂C(O)R[†], -S(O)₂R[†], -S(O)₂NR[†]₂, -C(S)NR[†]₂, -C(NH)NR[†]₂, y -N(R[†])S(O)₂R[†]; en el que cada R[†] es independientemente hidrógeno, alifático C₁₋₆ que puede estar sustituido como se define más adelante, -OPh no sustituido o un anillo no sustituido de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o arilo que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, y azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de R[†], junto con sus átomo(s) intermedio(s) forman un anillo no sustituido de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o arilo monocíclico o bicíclico que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, y azufre.

Los sustituyentes adecuados en el grupo alifático de R[†] son independientemente halógeno, -R^{*}, -(haloR^{*}), -OH, -OR^{*}, -O(haloR^{*}), -CN, -C(O)OH, -C(O)OR^{*}, -NH₂, -NHR^{*}, -NR^{*}₂, o -NO₂, en el que cada R^{*} es no sustituido o cuando está precedido con "halo" está sustituido únicamente con uno o más halógenos y es independientemente alifático C₁₋₄, -CH₂Ph, -O(CH₂)₀₋₁Ph, o un anillo de 5-6-miembros saturado, parcialmente insaturado o arilo que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, y azufre.

Los sustituyentes preferidos en heteroarilo se pueden seleccionar del grupo que consiste en -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, alquilo C₁-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂, haloalquilo C₁-C₁₂, haloalcoxi C₁-C₁₂ y alquilo C₁-C₁₂ sulfanilo. Sustituyentes preferidos en alquilo, alquileo y heterociclilo incluyen los sustituyentes preferidos en heteroarilo y oxo. En una realización, el sustituyente en un grupo alquilo, alquileo, heterociclilo o heteroarilo es un grupo amino que tiene la fórmula -N(R⁵)₂, en donde cada R⁵ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₄.

Los sustituyentes en alquilo, alquileo, heterociclilo y heteroarilo se pueden seleccionar del grupo que consiste en -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, alquilo C₁-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂, haloalquilo C₁-C₁₂, haloalcoxi C₁-C₁₂ y alquilo C₁-C₁₂ sulfanilo. En una realización, el sustituyente es un grupo amino que tiene la fórmula -N(R⁵)₂, en el que cada R⁵ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₄.

El término "cicloalquilo", como se usa en el presente documento, significa hidrocarburos saturados cíclicos, es decir compuestos en los que todos los átomos del anillo son carbonos. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, entre otros, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y cicloheptilo. En algunas realizaciones, el cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de OH, SH, halógeno, amino, nitro, ciano, un grupo alquilo C₁-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ o alquinilo C₂-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂, haloalquilo C₁-C₁₂ y haloalcoxi C₁-C₁₂.

El término "heteroarilo", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (O, S o N). Un grupo heteroarilo puede ser monocíclico o policíclico, por ejemplo, un anillo heteroarilo monocíclico condensado con uno o más grupos carbocíclicos aromáticos u otros grupos heteroarilo monocíclicos. Los grupos heteroarilo de la presente invención también pueden incluir sistemas de anillo sustituidos con una o más fracciones oxo. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, entre otros, piridinilo, piridazinilo, imidazolilo, pirimidinilo, pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolizínilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, purinilo, oxadiazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo,

furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, dihidroquinolilo, tetrahidroquinolilo, dihidroisoquinolilo, tetrahidroisoquinolilo, benzofurilo, fuopiridinilo, pirolopirimidinilo, y azaindolilo.

- 5 Los grupos heteroarilo anteriores pueden estar unidos a C o unidos a N-(cuando sea posible). Por ejemplo, un grupo derivado de pirrol puede ser pirrol-1-ilo (unido a N) o pirrol-3-ilo (unido a C).

- 10 "Heterociclilo" significa un anillo alifático cíclico de 4 a 13 miembros, saturado o insaturado que contiene 1, 2, 3, 4 o 5 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O o S. Cuando un heteroátomo es S, puede estar opcionalmente mono- o di-oxigenado (es decir, -S(O)- o -S(O)₂-). El heterociclilo puede ser monocíclico, bicíclico fusionado, bicíclico con puente, bicíclico espiro o policíclico.

"Oxo" significa =O.

- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término "alquenilo" significa un hidrocarburo no cíclico saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 12 átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término "alquinilo" significa un hidrocarburo no cíclico saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 12 átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término "alquileno" significa un hidrocarburo no cíclico saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 12 átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquileno pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

- 30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquileo" se refiere a un grupo alquilo que tiene dos puntos de unión al resto del compuesto. Ejemplos no limitantes de grupos alquileo incluyen metileno (CH₂), etileno (CH₂CH₂), n-propileno (CH₂CH₂CH₂), isopropileno (CH₂CH(CH₃)), y similares. Los grupos alquileo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

El término "haloalquilo", como se usa en el presente documento, incluye un alquilo sustituido con uno o más F, Cl, Br, o I, en el que alquilo se ha definido anteriormente.

- 35 Los términos "alcoxi", como se usan en el presente documento, significan un grupo "alquil-O-", en el que alquilo se ha definido anteriormente. Ejemplos de grupo alcoxi incluyen grupos metoxi o etoxi.

- 40 Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a las sales que son, dentro del alcance del firme juicio médico, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y que son proporcionales a una razonable proporción de beneficios/riesgos. En la técnica se conocen bien sales farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, S. M. Berge, et al. describen sales farmacéuticamente aceptables con detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1 – -19, incorporado en el presente documento por referencia. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las derivadas de bases y
- 45 ácidos orgánicos e inorgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico, o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido trifluoroacético, (ácido 2,2,2-trifluoroacético), ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico, o usando otros procedimientos usados en la técnica, tal como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato,
- 50 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, incluyen sales de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando sea adecuado, cationes de amonio, de amonio cuaternario y de amina no tóxicos formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo inferior y sulfonato de arilo.

- 60 A menos que se indique lo contrario, las estructuras representadas en el presente documento también se pretende incluir todas las formas isoméricas (por ejemplo, formas enantioméricas, diaestereoméricas y geométricas (o conformacionales) de la estructura, por ejemplo las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, los isómeros (Z) y (E) de doble enlace y los isómeros conformacionales (Z) y (E). Por tanto, los isómeros estereoquímicos únicos, así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes
- 65 compuestos están dentro del alcance de la invención. A menos que se indique lo contrario, todas estas formas tautoméricas de los compuestos de la invención entran dentro del alcance de la invención. Adicionalmente, a menos

que se indique lo contrario, con las estructuras representadas en el presente documento también se pretende incluir compuestos que difieren únicamente en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras, incluyendo la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono o por carbono ^{13}C o ^{14}C están dentro del alcance de la presente invención. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas, como sondas en ensayos biológicos, o como agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de adición de ácido o una sal de adición de base que es compatible con el tratamiento de pacientes.

En algunas realizaciones, los ácidos inorgánicos de ejemplo que forman sales adecuadas incluyen, entre otras, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y sales metálicas ácidas tales como monohidrógeno ortofosfato de sodio e hidrógeno sulfato de potasio. Ácidos orgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen los ácidos mono-, di- y tricarbónicos. Ilustrativos de tales ácidos son, por ejemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético (ácido 2,2,2-trifluoroacético), glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, benzoico, hidroxibenzoico, fenilacético, cinámico, salicílico, 2-fenoxibenzoico, p-toluenosulfónico y otros ácidos sulfónicos tales como ácido metanosulfónico y ácido 2-hidroxietanosulfónico. Se pueden formar cualquiera de las sales de mono- o di-ácido y tales sales pueden existir en forma hidratada, solvatada o sustancialmente anhidra. En general, las sales de adición de ácido de estos compuestos son más solubles en agua y diversos disolventes orgánicos hidrófilos, y generalmente demuestran puntos de fusión más altos en comparación con sus formas de base libre. Otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, oxalatos se pueden utilizar por ejemplo en el aislamiento de compuestos de Fórmula I para uso en laboratorio, o para posterior conversión en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

Una "sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" es cualquier sal de adición de base orgánica o inorgánica no tóxica de los compuestos ácidos representados por la Fórmula I o cualquiera de sus intermedios. Bases inorgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen, entre otras, los hidróxidos de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio de bario. Bases orgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas tales como metilamina, trimetilamina y picolina o amoníaco. La selección de la sal apropiada puede ser importante para que una funcionalidad éster, en su caso, en otro lugar de la molécula no se hidrolice. Los criterios de selección para la sal apropiada serán conocidos por un experto en la materia.

Las sales de adición de ácido de los compuestos de Fórmula I se forman lo más adecuadamente a partir de ácidos farmacéuticamente aceptables, e incluyen, por ejemplo, las formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácidos clorhídrico, sulfúrico o fosfórico, y ácidos orgánicos, por ejemplo ácido succínico, maleico, acético, trifluoroacético o fumárico. Otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, oxalatos se pueden utilizar por ejemplo en el aislamiento de compuestos de Fórmula I para uso en laboratorio, o para posterior conversión en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable. También se incluyen dentro del alcance de la invención las sales de adición de base (tales como sales de sodio, potasio y de amonio), solvatos e hidratos de compuestos de la invención. La conversión de una sal de compuesto dado en una sal de compuesto deseada se consigue aplicando técnicas estándar, bien conocidas para un experto en la materia.

El término "estereoisómeros" es un término general para todos los isómeros de las moléculas individuales que difieren solo en la orientación de sus átomos en el espacio. Incluye isómeros de imagen especular (enantiómeros), isómeros geométricos (cis/trans) e isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes especulares uno de otro (diastereoisómeros).

El término "tratar" o "tratamiento" significa aliviar los síntomas, eliminar la causa de los síntomas, ya sea de forma temporal o permanente, o prevenir o retardar la aparición de los síntomas del trastorno o afección citados.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de compuesto que es eficaz para tratar o disminuir la gravedad de uno o más síntomas de un trastorno o afección.

Cuando se introducen elementos divulgados en el presente documento, los artículos "un", "una", "el/la", y "dicho/a" se pretende que signifique que hay uno o más de los elementos. Con los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" se pretende que sean abiertos y que signifiquen que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados.

Usos, Formulación y Administración

Composiciones farmacéuticamente aceptables

De acuerdo con otra realización, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la presente invención o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad de compuesto en las composiciones de la presente invención es tal que es eficaz para inhibir mensurablemente la CRM1, en una muestra biológica o en un paciente. En ciertas

realizaciones, una composición de la presente invención se formula para la administración a un paciente en necesidad de tal composición. El término "paciente", como se usa en el presente documento, significa un animal. En algunas realizaciones, el animal es un mamífero. En ciertas realizaciones, el paciente es un paciente veterinario (es decir, un paciente mamífero no humano). En algunas realizaciones, el paciente es un perro. En otras realizaciones, el paciente es un ser humano.

El término "excipiente, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente, adyuvante, o vehículo no tóxico que no destruye la actividad farmacológica del compuesto con el que se formula. Los excipientes, adyuvantes y vehículos, farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones de la presente invención incluyen, entre otros, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas glicéridas parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante, por ejemplo vía parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), aerosol para inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. En algunas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados se pueden administrar por vía intravenosa y/o intraperitoneal.

El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye las técnicas de administración de inyección intravenosa, intramuscular, intraocular, intravítrea, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intraperitoneal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Las formas inyectables estériles de las composiciones de la presente invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles en forma de un disolvente o un medio de suspensión.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable, incluidas, entre otras, cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas o soluciones. En el caso de los comprimidos para uso oral, los vehículos que normalmente se usan incluyen lactosa y almidón de maíz. Agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, también se añaden de forma habitual. Para la administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes de emulsión y de suspensión. Si se desea se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. En algunas realizaciones, una formulación oral proporcionada se formula para liberación inmediata o liberación sostenida/retardada. En algunas realizaciones, la composición es adecuada para administración bucal o sublingual, incluyendo comprimidos, grageas y pastillas. Un compuesto proporcionado también puede estar en forma microencapsulada.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención también pueden administrarse por vía tópica, especialmente cuando la diana del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluidas enfermedades de los ojos, la piel o el tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior se puede efectuar en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. También se pueden usar parches transdérmicos tópicos.

Para uso oftálmico, las composiciones proporcionadas farmacéuticamente aceptables pueden formularse como suspensiones micronizadas o en una pomada tal como vaselina.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden administrarse también mediante aerosol o inhalación nasales.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención se formulan para la administración intraperitoneal.

La cantidad de compuestos de la presente invención que se pueden combinar con los materiales vehículos para

producir una composición en una única forma de dosificación variará en función del huésped tratado y el modo de administración concreto. En una realización, las composiciones proporcionadas deben formularse de modo que una dosificación de entre 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal/día del inhibidor se pueden administrar a un paciente que recibe estas composiciones. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, o entre 1 mg y 1000 mg/dosis, cada 4 a 120 horas, o de acuerdo con los requisitos del fármaco en particular. Normalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces al día.

Se entenderá que una dosificación y régimen de tratamiento específicos para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el modo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y el juicio del médico encargado del tratamiento y la gravedad de la enfermedad particular que esté tratando. La cantidad de un compuesto de la presente invención en la composición también dependerá del compuesto particular en la composición.

Tras la mejora de la afección de un paciente se puede administrar, en caso necesario, una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de la presente invención. Posteriormente, la dosis o la frecuencia de administración, o ambos, pueden reducirse en función de los síntomas, hasta un nivel en el que se conserva la afección mejorada cuando los síntomas se han aliviado al nivel deseado. No obstante, los pacientes pueden requerir tratamiento intermitente sobre una base a largo plazo tras cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

Usos de compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento son generalmente útiles para la inhibición de CRM1 y son, por lo tanto, útiles para el tratamiento de uno o más trastornos asociados con la actividad de CRM1. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno mediado por CRM1. Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento también pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o a un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y/o diagnosticar varios trastornos, incluyendo los descritos en el presente documento a continuación.

La actividad de un compuesto utilizado en la presente invención como un inhibidor de CRM1 puede analizarse *in vitro*, *in vivo* o en una línea celular. Las condiciones detalladas para analizar un compuesto utilizado en la presente invención como un inhibidor de CRM1 se exponen en los Ejemplos a continuación.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión trastorno o afección "mediado por CRM1", como se usa en el presente documento, significa cualquier enfermedad u otra afección perjudicial en la que se sabe que la CRM1 desempeña un papel. De acuerdo con lo anterior, otra realización de la presente invención se refiere a tratar o disminuir la gravedad de una o más enfermedades en las que se sabe que CRM1 desempeña un papel. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos descritos en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión o la actividad de las proteínas p53, p73, p21, pRb, p27, IκB, NFκB, c-Abl, FOXO, COX-2 o HDAC (histona desacetilasas) en un sujeto. En otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto o una composición de acuerdo con la presente invención para su uso en tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad o afección seleccionada de un trastorno proliferativo (por ejemplo, cáncer), un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmune, una infección vírica, un trastorno oftalmológico o un trastorno neurodegenerativo. En una realización más específica, la presente invención se refiere a un compuesto o una composición de acuerdo con la presente invención para su uso en tratar o disminuir la gravedad de cáncer. Ejemplos específicos de los trastornos anteriores se exponen en detalle más adelante.

Los cánceres tratables por los compuestos de la presente invención incluyen, entre otros, tumores malignos hematológicos (leucemias, linfomas, mielomas, incluyendo mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico y síndrome mieloproliferativo) y tumores sólidos (carcinomas tales como de próstata, mama, pulmón, colon, páncreas, renal, de ovarios así como de tejidos blandos y osteosarcomas, y tumores estromales). El cáncer de mama (CM) puede incluir el cáncer de mama de tipo basal (CMTB), cáncer de mama triple negativo (CMTN) y cáncer de mama que es a CMTB y CMTN. Además, el cáncer de mama puede incluir carcinoma ductal o lobular invasivo o no invasivo, carcinoma de mama tubular, medular, mucinoso, papilar, cribiforme, masculino.

Los trastornos inflamatorios tratables con los compuestos de la presente invención incluyen, entre otros, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad degenerativa de las articulaciones, lupus sistémico, esclerosis sistémica, síndromes de vasculitis (de vasos pequeños, medios y grandes), aterosclerosis, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis mucosa, colitis ulcerosa, gastritis, sepsis, psoriasis y otros trastornos inflamatorios dermatológicos (tales como eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria, esclerodermia y dermatosis con componentes inflamatorios agudos, pénfigo, penfigoide, dermatitis alérgica), y síndromes que cursan con urticaria.

Las enfermedades víricas tratables con los compuestos de esta invención incluyen, entre otros, faringitis febril

aguda, fiebre faringoconjuntival, queratoconjuntivitis epidémica, gastroenteritis infantil, infecciones por Coxsackie, mononucleosis infecciosa, linfoma de Burkitt, hepatitis aguda, hepatitis crónica, cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular, infección primaria por el VSH-1 (por ejemplo, la gingivostomatitis en los niños, amigdalitis y faringitis en adultos, queratoconjuntivitis), infección latente por el VSH-1 (por ejemplo, herpes labial y aftas), infección primaria por el VSH-2, infección latente por el VSH-2, meningitis aséptica, mononucleosis infecciosa, enfermedad de inclusión citomegálica, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica, linfoma de derrame primario, SIDA, gripe, síndrome de Reye, sarampión, encefalomiелitis postinfecciosa, paperas, lesiones epiteliales (por ejemplo, verrugas comunes planas, plantares y anogenitales, papilomas laríngeos, epidermodisplasia verruciforme), carcinoma de cuello de útero, carcinoma de células escamosas, crup, neumonía, bronquiolitis, resfriado común, poliomielitis, rabia, síndrome similar a la gripe, bronquiolitis grave con neumonía, sarampión alemán, la rubéola congénita, varicela y herpes zóster. Enfermedades víricas tratables con los compuestos de la presente invención también incluyen infecciones víricas crónicas, incluyendo hepatitis B y hepatitis C.

Los trastornos oftalmológicos de ejemplo incluyen, entre otros, edema macular (edema macular diabético y no diabético), formas húmeda y seca de la degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular disciforme por la edad, edema macular cistoide, edema palpebral, edema de retina, retinopatía diabética, coriorretinopatía, maculopatía neovascular, glaucoma neovascular, uveítis, iritis, vasculitis retiniana, endoftalmitis, panoftalmitis, oftalmía metastásica, coroiditis, epitelitis pigmentaria retiniana, conjuntivitis, ciclitis, escleritis, epiescleritis, neuritis óptica, neuritis óptica retrobulbar, queratitis, blefaritis, desprendimiento de retina exudativo, úlcera de la córnea, úlcera conjuntival, queratitis numular crónica, enfermedad oftálmica asociada con hipoxia o isquemia, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética proliferativa, vasculopatía coroidea polipoidal, proliferación angiomatosa de la retina, oclusión de la arteria retiniana, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, vitreorretinopatía exudativa familiar, enfermedad sin pulso (enfermedad de Takayasu), enfermedad de Eales, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, retinopatía leucémica, síndrome de hiperviscosidad de la sangre, macroglobulinemia, retinopatía asociada a interferón, retinopatía hipertensiva, retinopatía por radiación, deficiencia de células madre epiteliales de la córnea o cataratas.

Enfermedades neurodegenerativas tratables con un compuesto de Fórmula I incluyen, entre otros, enfermedad de Parkinson, de Alzheimer y de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA/enfermedad de Lou Gehrig).

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento también se pueden usar para tratar trastornos de crecimiento anormal de tejido y fibrosis que incluyen miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía restrictiva, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, glomerulonefritis, trastorno del riñón poliquístico (TRP) y otros trastornos renales.

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento también se pueden usar para tratar trastornos relacionados con la ingesta de alimentos tales como obesidad e hiperfagia.

En otra realización, un compuesto o composición descritos en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir alergias y trastornos respiratorios, incluyendo asma, bronquitis, fibrosis pulmonar, rinitis alérgica, toxicidad del oxígeno, enfisema, bronquitis crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, y cualquier enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

En algunas realizaciones, el trastorno o afección asociado con la actividad de CRM1 es distrofia muscular, artritis, por ejemplo, osteoartritis y artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, septicemia, enfermedad reumática, aterosclerosis cancerosa, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, leptospirosis renal, glaucoma, enfermedad de la retina, envejecimiento, dolor de cabeza, dolor, síndrome de dolor regional complejo, hipertrofia cardíaca, emaciación muscular, trastornos catabólicos, obesidad, retraso del crecimiento fetal, hipercolesterolemia, enfermedades del corazón, insuficiencia cardíaca crónica, isquemia/reperfusión, apoplejía, aneurisma cerebral, angina de pecho, enfermedad pulmonar, fibrosis quística, lesión pulmonar inducida por ácido, hipertensión pulmonar, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Sjögren, enfermedad de la membrana hialina, enfermedad renal, enfermedad glomerular, enfermedad hepática alcohólica, enfermedades intestinales, endometriosis peritoneal, enfermedades de la piel, sinusitis nasal, mesotelioma, displasia ecodérmica anhidrótica-ID, enfermedad de Behçet, incontinencia pigmentaria, tuberculosis, asma, enfermedad de Crohn, colitis, alergia ocular, apendicitis, enfermedad de Paget, pancreatitis, periodonitis, endometriosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedades inducidas por sílice, apnea del sueño, colitis, alergia ocular, apendicitis, enfermedad de Paget, pancreatitis, periodonitis, endometriosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedades inducidas por sílice, apnea del sueño, SIDA, VIH-1, enfermedades autoinmunes, síndrome antifosfolípidos, lupus, nefritis lúpica, fiebre mediterránea familiar, síndrome hereditario de fiebre periódica, enfermedades estrés psicosocial, enfermedades neuropatológicas, polineuropatía amiloidótica familiar, neuropatía inflamatoria, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, cataratas o pérdida de audición.

En otras realizaciones, el trastorno o afección asociada con la actividad de CRM1 es lesión cerebral, uveítis, dolor inflamatorio, asma inducida por alérgenos, asma no inducida por alérgenos, nefritis glomerular, colitis ulcerosa,

enterocolitis necrotizante, hiperinmunoglobulinemia D con fiebre recurrente (HIDS), síndrome periódico asociado con el receptor de TNF (TRAPS), síndromes periódicos asociados a la criopirina, síndrome de Muckle-Wells (urticaria sordera amiloidosis), urticaria familiar por frío, enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal (NOMID), fiebre periódica, estomatitis aftosa, faringitis y adenitis (síndrome PFAPA), Síndrome de Blau, artritis piógena estéril, pioderma gangrenoso, acné (PAPA), deficiencia del antagonista del receptor de interleucina-1 (DIRA), hemorragia subaracnoidea, enfermedad del riñón poliquístico, trasplante, trasplante de órganos, trasplante de tejido, síndrome mielodisplásico, inflamación inducida por irritantes, inflamación inducida por irritantes vegetales, inflamación inducida por hiedra venenosa/aceite de urushiol, inflamación inducida por irritantes químicos, inflamación inducida por la picadura de abeja, inflamación inducida por picadura de insectos, quemaduras solares, quemaduras, dermatitis, endotoxemia, lesión pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda, hepatitis alcohólica, o lesión renal causada por infecciones parasitarias.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona un uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión o la actividad de las proteínas p53, p73, p21, pRb, p27, IκB, NFκ B, c-Abl, FOXO, COX-2 o un HDAC en un sujeto. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un uso de un compuesto de fórmula I en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier cáncer y/o trastorno neoplásico, angiogénesis, trastornos autoinmunes, trastornos y/o enfermedades inflamatorias, epigenética, trastornos y/o enfermedades hormonales, enfermedades virales, trastornos y/o enfermedades neurodegenerativos, heridas y trastornos oftalmológicos.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I, o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la inhibición de CRM1 en una muestra biológica.

Trastornos neoplásicos

Un compuesto o composición descrito en el presente documento se puede usar para tratar un trastorno neoplásico. Un "trastorno neoplásico" es una enfermedad o trastorno caracterizado por células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo o replicación, por ejemplo, un estado o condición anormal caracterizado por un crecimiento celular proliferativo. Los trastornos neoplásicos de ejemplo incluyen: carcinoma, sarcoma, trastornos metastásicos, por ejemplo, tumores que surgen de la próstata, cerebro, hueso, colon, pulmón, mama, ovarios, y de origen hepático, trastornos neoplásicos hematopoyéticos, por ejemplo, leucemias, linfomas, mieloma y otros trastornos malignos de células plasmáticas y tumores metastásicos. Cánceres prevalentes incluyen: cánceres de mama, de próstata, de colon, de pulmón, de hígado y pancreáticos. El tratamiento con el compuesto puede ser en una cantidad eficaz para mejorar al menos un síntoma de la enfermedad neoplásica, por ejemplo, proliferación celular reducida, masa tumoral reducida, etc.

Los compuestos descritos son útiles en la prevención y tratamiento del cáncer, incluyendo por ejemplo, tumores sólidos, tumores de tejidos blandos, y metástasis de los mismos, así como en los síndromes de cáncer familiar tales como síndrome de Li Fraumeni, síndromes de cáncer familiar de mama-ovario (mutaciones BRCA1 o BRAC2) y otros. Los compuestos divulgados también son útiles en el tratamiento de cánceres no sólidos. Los tumores sólidos de ejemplo incluyen neoplasias malignas (por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas) de los diversos sistemas de órganos, tales como los de pulmón, mama, linfoides, de los tractos gastrointestinal (por ejemplo, colon), y genitourinario (por ejemplo, tumores renales, uroteliales o testiculares), de faringe, próstata y ovario. Adenocarcinomas de ejemplo incluyen cánceres colorrectales, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma pulmonar microcítico y cáncer del intestino delgado.

Los cánceres de ejemplo descritos por el Instituto Nacional del Cáncer incluyen: leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda del adulto; leucemia linfoblástica aguda de la infancia, leucemia mieloide aguda del adulto, carcinoma adrenocortical, carcinoma adrenocortical de la infancia, linfoma relacionada con el SIDA, neoplasias malignas relacionadas con el SIDA, cáncer anal, astrocitoma cerebelar de la infancia, astrocitoma cerebelar de la infancia, cáncer de las vías biliares, extrahepático; cáncer de vejiga; cáncer de vejiga de la infancia; cáncer de huesos, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno; glioma de células madre cerebrales, infancia; tumor cerebral, adulto; tumor cerebral, glioma de células madre cerebrales, infancia; tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, infancia; tumor cerebral, astrocitoma cerebral /Glioma, maligno, infancia; tumor cerebral, ependimoma, infancia; tumor cerebral, meduloblastoma, infancia; tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, infancia; tumor cerebral, glioma hipotalámico y de las vías visuales, infancia; tumor cerebral, infancia (otros); cáncer de mama; cáncer de mama y embarazo; cáncer de mama, infancia; cáncer de mama, varones; adenomas bronquiales/carcinoides, infancia; tumor carcinoide, infancia; tumor carcinoide, gastrointestinal; carcinoma, adrenocortical; carcinoma, células de los islotes; carcinoma primario desconocido; linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma primario cerebeloso, infancia; astrocitoma cerebral/glioma maligno, infancia; cáncer cervical; cánceres de la infancia; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; sarcoma de células claras de las vainas del tendón; cáncer de colon; cáncer colorrectal, infancia; linfoma de células T cutáneo; cáncer endometrial; ependimoma, infancia; cáncer epitelial, cáncer de ovarios; cáncer esofágico; cáncer esofágico, infancia; familia de tumores de Ewing; tumor extracraneal de células germinales, infancia; tumor extragonadal de células germinales; cáncer extrahepático de las vías biliares; cáncer

ocular, melanoma intraocular; cáncer ocular, retinoblastoma; cáncer de vesícula biliar; cáncer gástrico (estómago); cáncer gástrico (estómago), infancia; tumor carcinoide gastrointestinal; tumor carcinoide gastrointestinal; tumor de células germinales, extracraneal, infancia; tumor de células germinales, extragonadal; tumor de células germinales, de ovarios; tumor trofoblástico gestacional; Glioma, células madre de la infancia; glioma, hipotalámico y de las vías visuales de la infancia; leucemia de células peludas; cáncer de cabeza y cuello; cáncer hepatocelular (hígado), Adultos (Primario); cáncer hepatocelular (hígado), infancia (Primario); linfoma de Hodgkin, Adultos; linfoma de Hodgkin, infancia; linfoma de Hodgkin durante el embarazo; cáncer hipofaríngeo; glioma hipotalámico y de las vías visuales, infancia; melanoma intraocular; carcinoma de las células de los islotes (páncreas endocrina); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón; cáncer de laringe; cáncer de laringe, infancia; leucemia linfoblástica aguda, Adultos; leucemia linfoblástica aguda, infancia; leucemia mieloide aguda, adultos; leucemia mieloide aguda, infancia; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; leucemia de células peludas; cáncer de labios y de la cavidad oral; cáncer de hígado, adultos (primario); cáncer de hígado, infancia (primario); cáncer de pulmón microcítico, de células pequeñas; leucemia linfoblástica aguda, adultos; leucemia linfoblástica aguda, infancia; leucemia linfocítica crónica, de células T, cutáneo; linfoma de Hodgkin, adultos; linfoma de Hodgkin, infancia; linfoma de Hodgkin durante el embarazo; linfoma no Hodgkin, adultos; linfoma no Hodgkin, infancia; linfoma no Hodgkin durante el embarazo; linfoma primario del sistema nervioso central; macroglobulinemia de Waldenstrom; cáncer de mama de varones; mesotelioma maligno, adultos; mesotelioma maligno, infancia; timoma maligno; meduloblastoma, infancia; melanoma; melanoma, intraocular; carcinoma de células de Merkel; mesotelioma, maligno; cáncer de cuello escamoso metastásico oculto primario; síndrome de neoplasia endocrina múltiple, infancia; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoides; síndromes mielodisplásicos; leucemia mielógena, crónica; leucemia mieloide aguda, infancia; mieloma múltiple; trastornos mieloproliferativos, crónicos; cáncer de la cavidad nasal y de los senos paranasales; cáncer nasofaríngeo; cáncer nasofaríngeo, infancia; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin, adultos; linfoma no Hodgkin, infancia; linfoma no Hodgkin durante el embarazo; cáncer de pulmón macrocítico; cáncer oral, infancia; cáncer de la cavidad oral y de los labios; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno del hueso; cáncer de ovarios, infancia; cáncer epitelial ovárico; tumor de células germinales del ovario; tumor de ovarios de bajo potencial maligno; cáncer de páncreas; cáncer de páncreas, infancia; cáncer de páncreas, células de los islotes; cáncer de los senos paranasales y de la cavidad nasal; cáncer de la paratiroides; cáncer de pene; feocromocitoma; tumores neuroectodérmico primitivo pineal y supratentorial, infancia; tumor hipofisario; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple; blastoma pleuropulmonar; cáncer de mama y embarazo; linfoma de Hodgkin y embarazo; linfoma no Hodgkin y embarazo; linfoma primario del sistema nervioso central; cáncer primario de hígado, adultos; cáncer primario de hígado, infancia; cáncer de próstata; cáncer rectal; cáncer de células renales (riñón); cáncer de células renales, infancia; cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma, infancia; cáncer de las glándulas salivales; cáncer de las glándulas salivales, infancia; sarcoma, familia de tumores de Ewing; sarcoma de Kaposi; sarcoma (osteosarcoma)/histiocitoma fibroso maligno del hueso; sarcoma, rhabdomyosarcoma, infancia; sarcoma, tejidos blandos, adultos; sarcoma, tejidos blandos, infancia; síndrome de Sezary; cáncer de piel; cáncer de piel, infancia; cáncer de piel (melanoma); carcinoma de piel, células de Merkel; cáncer de pulmón microcítico; cáncer de pulmón microcítico; cáncer de intestino delgado; sarcoma de tejidos blandos, adultos; sarcoma de tejidos blandos, infancia; cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico; cáncer de estómago (gástrico); cáncer de estómago (gástrico), infancia; tumores neuroectodérmico primitivo supratentorial, infancia; linfoma de células T, cutáneo; cáncer testicular; timoma, infancia; timoma, maligno; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides, infancia; cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter; tumor trofoblástico, gestacional; de sitio primario desconocido, cáncer de, infancia; cánceres inusuales de la infancia; cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter; cáncer de la uretra; sarcoma uterino; cáncer vaginal; glioma hipotalámico y de las vías visuales, infancia; cáncer vulvar; macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

Otros ejemplos de cánceres incluyen linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) y linfoma de células del manto (LCM).

Las metástasis de los cánceres antes mencionados también se pueden tratar o prevenir usando los compuestos y las composiciones descritos en el presente documento.

Terapias de combinación

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en el presente documento se administra junto con un "segundo" agente terapéutico o tratamiento adicional. La elección del segundo agente terapéutico puede realizarse a partir de cualquier agente que se utiliza típicamente en una monoterapia para el tratamiento de la enfermedad o afección indicada. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "administrado junto con" y términos relacionados se refiere a la administración simultánea o secuencial de los agentes terapéuticos de acuerdo con esta invención. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención puede administrarse junto con otro agente terapéutico simultánea o secuencialmente en formas de dosificación unitaria separadas o juntos en una única forma de dosificación unitaria. Por consiguiente, la presente invención proporciona una única forma de dosificación unitaria que comprende un compuesto de fórmula I, un agente terapéutico adicional, y un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la invención en la que un segundo agente terapéutico se administra a un sujeto, la cantidad

eficaz del compuesto de la presente invención es menor de lo que sería su cantidad eficaz cuando no se administra el segundo agente terapéutico. En otra realización, la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico es menor de lo que sería su cantidad eficaz en el caso en el que no se administre el compuesto de la presente invención. De este modo se pueden minimizar los efectos secundarios indeseados asociados con dosis elevadas de cualquier agente.

Otras ventajas potenciales (incluyendo, sin limitaciones, la mejora de los regímenes de dosificación y/o menores costes de fármacos) serán evidentes para los expertos en la técnica. Los agentes adicionales pueden administrarse por separado, como parte de un régimen de dosis múltiple, a partir de los compuestos de esta invención. Como alternativa, dichos agentes pueden ser parte de una forma de dosificación sencilla, mezclados con los compuestos de la presente invención en una única composición.

Terapias de combinación para el cáncer

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en el presente documento se administra junto con un tratamiento adicional para el cáncer. Ejemplos de tratamientos adicionales para el cáncer incluyen, por ejemplo: quimioterapia, terapias dirigidas, como las terapias con anticuerpos, inhibidores de la quinasa, inmunoterapia y terapia hormonal, terapia epigenética, inhibidores del proteasoma, y terapias antiangiogénicas. Ejemplos de cada uno de estos tratamientos se proporcionan a continuación. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "combinación, "combinado" y términos relacionados se refiere a la administración simultánea o secuencial de los agentes terapéuticos de acuerdo con esta invención. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención puede administrarse junto con otro agente terapéutico simultánea o secuencialmente en formas de dosificación unitaria separadas o juntos en una única forma de dosificación unitaria. Por consiguiente, la presente invención proporciona una única forma de dosificación unitaria que comprende un compuesto de la invención, un agente terapéutico adicional, y un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La cantidad tanto de un compuesto de la invención y el agente terapéutico adicional (en las composiciones que comprenden un agente terapéutico adicional como se describe anteriormente) que se pueden combinar con los materiales vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Preferiblemente, las composiciones de esta invención deberían formularse de manera que se pueda administrar una dosificación de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal/día de un compuesto de la invención.

Quimioterapia

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en el presente documento se administra con una quimioterapia. La quimioterapia es el tratamiento del cáncer con fármacos que pueden destruir las células cancerosas. "La quimioterapia" usualmente se refiere a fármacos citotóxicos que afectan a las células que se dividen rápidamente, en general, en contraste con la terapia dirigida. Los medicamentos de quimioterapia interfieren con la división celular de diversas maneras posibles, por ejemplo, con la duplicación del ADN o la separación de los cromosomas recién formados. La mayoría de las formas de quimioterapia se dirigen a todas las células que se dividen rápidamente y no son específicos para las células cancerosas, aunque algún grado de especificidad puede provenir de la incapacidad de muchas células cancerosas para reparar el daño del ADN, mientras que las células normales generalmente pueden hacerlo.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos utilizados en la terapia del cáncer incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, ácido fólico, derivados de purina, y de pirimidina) y agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, platino, sulfonatos de alquilo, hidrazinas, triazenos, aziridinas, veneno del huso, agentes citotóxicos, inhibidores de la topoisomerasa y otros). Agentes de ejemplo incluyen aclarubicina, actinomicina, alitretinoína, altretamina, aminopterina, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa, atrasentano, belotecán, bexaroteno, bendamustina, bleomicina, bortezomib, busulfán, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carboquona, carmofur, aarmustina, celecoxib, clorambucilo, clormetina, cisplatino, cladribina, clófarabina, crisantaspasa, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, decitabina, demecolcina, docetaxel, doxorubicina, efaproxiral, elesclomol, elsamitrucina, enocitabina, epirubicina, estramustina, etoglucid, etopósido, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo (5fu), fotemustina, gemcitabina, implantes de gliadel, hidroxycarbamida, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, irofulven, ixabepilona, larotaxel, leucovorina, doxorubicina liposómica, daunorubicina liposómica, lonidamina, lomustina, lucantona, mannosulfán, masoprocól, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, aminolevulinato de metilo, mitobronitol, mitoguazona, mitotano, mitomicina, mitoxantrona, nedaplatino, nimustina, oblimersen, omacetaxina, ortataxel, oxaliplatino, paclitaxel, pegaspargasa, pemetrexed, pentostatia, pirarubicina, pixantrona, plicamicina, porfimer sódico, prednimustina, procarbazona, raltitrexed, ranimustina, rubitecan, sapacitabina, semustina, sitimagena, ceradenovec, estrataplantina, estreptozocina, talaporfin, tegafur-uracilo, temoporfin, temozolomida, tenipósido, tesetaxel, testolactona, tetranitrato, tiotepa, tiazofurina, tioguanina, tipifarnib, topotecán, trabectedina, triaziquona, trietilenmelamina, triplatino, tretinoína, treosulfán, trofosfamida, uramustina, valrubicina, verteporfin, vinblastina, vincristina, vindesina, vinflunina, vinorelbina, vorinostat, zorubicina, y otros agentes citostáticos o citotóxicos descritos en el presente documento.

Debido a que algunos medicamentos funcionan mejor juntos que solos, dos o más medicamentos a menudo se

administran al mismo tiempo. A menudo, dos o más agentes de quimioterapia se utilizan como quimioterapia de combinación. En algunas realizaciones, los agentes de quimioterapia (incluyendo la quimioterapia de combinación) se pueden utilizar en combinación con un compuesto descrito en el presente documento.

5 *Terapia dirigida*

La terapia dirigida constituye el uso de agentes específicos para las proteínas con la regulación alterada de las células cancerosas. Los fármacos de molécula pequeña de terapia dirigida son generalmente inhibidores de los dominios enzimáticos sobre proteínas mutadas, sobreexpresadas o, de otra manera, críticas dentro de la célula de cáncer. Ejemplos destacados son los inhibidores de la tirosina quinasa como axitinib, bosutinib, cediranib, dasatinib, erlotinib, imatinib, gefitinib, lapatinib, lestaurtinib, nilotinib, semaxanib, sorafenib, sunitinib, y vandetanib, y también inhibidores de quinasas dependientes de ciclina también tales como alvocidib y seliciclib. La terapia con anticuerpos monoclonales es otra estrategia en la que el agente terapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína en la superficie de las células cancerosas. Ejemplos incluyen el anticuerpo anti-HER2/neu trastuzumab (Herceptin®) que se utiliza típicamente en el cáncer de mama, y el anticuerpo anti-CD20 rituximab y tositumomab típicamente utilizado en una variedad de neoplasias malignas de células B. Otros anticuerpos de ejemplo incluyen cetuximab, panitumumab, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, edrecolomab, y gemtuzumab. Proteínas de fusión de ejemplo incluyen aflibercept y denileucina difitox. En algunas realizaciones, la terapia dirigida se puede utilizar en combinación con un compuesto descrito en el presente documento, por ejemplo, Gleevec (Vignari y Wang 2001).

La terapia dirigida también puede implicar pequeños péptidos como "dispositivos domésticos" que pueden unirse a los receptores de la superficie celular o a la matriz extracelular afectada que rodea al tumor. Los radionúclidos que se unen a estos péptidos (por ejemplo, RGD) finalmente matan la célula de cáncer si el núclido se desintegra en la vecindad de la célula. Un ejemplo de tal terapia incluye BEXXAR®.

Angiogénesis

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis. Las enfermedades asociadas con la angiogénesis incluyen cáncer, enfermedad cardiovascular y degeneración macular.

La angiogénesis es el proceso fisiológico que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. La angiogénesis es un proceso normal y vital en el crecimiento y desarrollo, así como en la curación de heridas y en el tejido de granulación. Sin embargo, también es una etapa fundamental en la transición de los tumores desde un estado latente a uno maligno. La angiogénesis puede ser un objetivo de lucha contra las enfermedades que se caracterizan por una mala vascularización o una vasculatura anormal.

La aplicación de compuestos específicos que pueden inhibir o inducir la creación de nuevos vasos sanguíneos en el cuerpo puede ayudar a combatir este tipo de enfermedades. La presencia de vasos sanguíneos donde no debería haber puede afectar a las propiedades mecánicas de un tejido, aumentando la probabilidad de fallo. La ausencia de vasos sanguíneos en un tejido en reparación o de lo contrario metabólicamente activo puede inhibir la reparación u otras funciones esenciales. Varias enfermedades, tales como las heridas crónicas isquémicas, son el resultado de la falta de, o insuficiente, formación de vasos sanguíneos y pueden tratarse mediante una expansión local de los vasos sanguíneos, con lo que llevan nuevos nutrientes al sitio, lo que facilita la reparación. Otras enfermedades, tales como la degeneración macular relacionada con la edad, pueden crearse mediante una expansión local de vasos sanguíneos, lo que interfiere con los procesos fisiológicos normales.

Se ha demostrado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un importante contribuyente de la angiogénesis, lo que aumenta el número de capilares en una red dada. La regulación por aumento de VEGF es un componente importante de la respuesta fisiológica al ejercicio y su papel en la angiogénesis se sospecha que es un posible tratamiento en las lesiones vasculares. En estudios *in vitro* se demuestra claramente que el VEGF es un potente estimulador de la angiogénesis, ya que, en presencia de este factor de crecimiento, las células endoteliales de las placas proliferarán y migrarán, formando en última instancia estructuras tubulares que se asemejan a los capilares.

Los tumores inducen el crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis) mediante la secreción de varios factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF). Los factores de crecimiento tales como bFGF y VEGF pueden inducir el crecimiento capilar en el tumor, que algunos investigadores sospechan que suministran los nutrientes necesarios, permitiendo la expansión del tumor.

La angiogénesis representa una diana terapéutica excelente para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. Es un proceso fisiológico potente que subyace a la manera natural en que nuestros cuerpos responden a una disminución del suministro de sangre a los órganos vitales, es decir la producción de nuevos vasos colaterales para superar la lesión isquémica.

La sobreexpresión de VEGF causa un incremento de la permeabilidad en los vasos sanguíneos, además de estimular la angiogénesis. En la degeneración macular húmeda, el VEGF provoca la proliferación de capilares en la retina. Dado que el aumento en la angiogénesis también causa edema, se produce filtración de sangre y otros fluidos al interior de la retina, lo que causa la pérdida de la visión.

La terapia antiangiogénica puede incluir inhibidores de quinasa dirigidos al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tales como sunitinib, sorafenib, o anticuerpos monoclonales o "señuelos" receptores de los receptores de VEGF de VEGF, incluyendo bevacizumab o VEGF-Trap o talidomida o sus análogos (lenalidomida, pomalidomida), o agentes dirigidos a objetivos angiogénicos no-VEGF tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), angiopoyetinas, angiostatina o endostatina.

Epigenética

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la epigenética. La epigenética es el estudio de los cambios hereditarios en el fenotipo o la expresión génica causada por mecanismos distintos de los cambios en la secuencia del ADN subyacente. Un ejemplo de los cambios epigenéticos en la biología eucariota es el proceso de diferenciación celular. Durante la morfogénesis, las células madre se convierten en las diversas líneas de células del embrión que a su vez se convierten en células completamente diferenciadas. En otras palabras, una sola célula del huevo fecundado cambia en los muchos tipos de células, incluyendo neuronas, células musculares, epitelio, vasos sanguíneos, etc., ya que sigue dividiéndose. Lo hace mediante la activación de algunos genes, mientras que inhibe otros.

Los cambios epigenéticos se conservan cuando las células se dividen. La mayoría de los cambios epigenéticos solo se producen en el curso de la vida de un organismo individual, pero, si se ha producido una mutación en el ADN en el esperma u óvulo que produce la fertilización, algunos cambios epigenéticos se heredan de una generación a la siguiente. Procesos epigenéticos específicos incluyen paramutación, marcadores, impresión, silenciamiento génico, inactivación del cromosoma X, efecto de la posición, reprogramación, transvección, efectos maternos, el progreso de la carcinogénesis, muchos efectos de teratógenos, regulación de las modificaciones de histonas y heterocromatina, y limitaciones técnicas que afecten a la partenogénesis y la clonación.

Los ejemplos de enfermedades asociadas con la epigenética incluyen síndrome de ATR, síndrome del cromosoma X frágil, síndrome de ICF, síndrome de Angelman, síndrome de Prader-Willi, BWS, síndrome de Rett, β -talasemia, cáncer, leucemia, síndrome de Rubinstein-Taybi y síndrome de Coffin-Lowry.

La primera enfermedad humana en relacionarse con la epigenética fue el cáncer. Los investigadores encontraron que el tejido enfermo de pacientes con cáncer colorrectal tenía menos metilación del ADN que el tejido normal de los mismos pacientes. Dado que los genes metilados normalmente están inactivados, la pérdida de metilación del ADN puede provocar la activación de genes anormalmente alta por alteración de la disposición de la cromatina. Por otro lado, demasiada metilación puede deshacer el trabajo de los genes supresores de tumores de protección.

La metilación del ADN se produce en los sitios de CpG, y la mayoría de las citosinas de CpG están metiladas en los mamíferos. Sin embargo, hay tramos de ADN cerca de las regiones promotoras que tienen concentraciones más altas de sitios de CpG (conocidos como islas de CpG) que están libres de metilación en las células normales. Estas islas de CpG están excesivamente metiladas en las células cancerosas, lo que hace que se inactiven los genes no deben estar silenciados. Esta anomalía es el cambio epigenético característico que se produce en los tumores y se produce temprano en el desarrollo del cáncer. La hipermetilación de las islas de CpG puede causar tumores mediante el apagado de los genes supresores de tumores. De hecho, estos tipos de cambios pueden ser más comunes en el cáncer humano que las mutaciones de las secuencias de ADN.

Además, aunque los cambios epigenéticos no alteran la secuencia de ADN, pueden causar mutaciones. Aproximadamente la mitad de los genes que causan las formas familiares o hereditarias de cáncer se apagan por metilación. La mayoría de estos genes normalmente suprimen la formación de tumores y ayudan a reparar el ADN, incluyendo O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), inhibidor 2B de quinasa dependiente de ciclina MLH1 de (CDKN2B) y RASSF1A. Por ejemplo, la hipermetilación del promotor de MGMT hace que el número de mutaciones de G a A aumenten.

La hipermetilación también puede conducir a la inestabilidad de los microsatélites, que son secuencias repetidas de ADN. Los microsatélites son frecuentes en los individuos normales y por lo general consisten en repeticiones del dinucleótido CA. El exceso de metilación del promotor del gen de reparación del ADN MLH1 puede hacer que un microsatélite sea inestable y alargarlo o acortarlo. La inestabilidad del microsatélite se ha relacionado con muchos tipos de cáncer, incluyendo los cánceres colorrectal, endometrial, de ovarios y gástrico.

El síndrome del X frágil es la discapacidad mental hereditaria más frecuente, sobre todo en los hombres. Ambos sexos pueden verse afectados por esta afección, pero dado que los hombres solo tienen un cromosoma X, uno X frágil les afectará con mayor gravedad. De hecho, el síndrome del X frágil se presenta en aproximadamente 1 de cada 4.000 varones y 1 de cada 8.000 mujeres. Las personas con este síndrome tienen graves discapacidades

intelectuales, desarrollo verbal retrasado y comportamiento "de tipo autista".

El síndrome del X frágil recibe su nombre de la forma en que la parte del cromosoma X que contiene el gen anormal se ve con un microscopio; por lo general, aparece como si se estuviera colgando de un hilo y se puede romper con facilidad. El síndrome está causado por una anomalía en el gen *FMR1* (retraso mental 1 del X frágil). Las personas que no tienen el síndrome del X frágil tienen de 6 a 50 repeticiones del trinucleótido CGG en su gen *FMR1*. Sin embargo, los individuos con más de 200 repeticiones tienen una mutación completa, y por lo general muestran síntomas del síndrome. Demasiados CGG hacen que las islas de CpG en la región promotora del gen *FMR1* se metilen; normalmente, no lo están. Esta metilación apaga el gen, lo que detiene la producción por el gen *FMR1* de una proteína importante denominada proteína de retraso mental del X frágil. La pérdida de esta proteína específica causa el síndrome del X frágil. Aunque se ha dado mucha atención a la mutación de expansión de CGG como la causa del X frágil, el cambio epigenético asociado con la metilación de *FMR1* es el verdadero culpable del síndrome.

El síndrome del X frágil no es el único trastorno asociado con retraso mental que implica cambios epigenéticos. Otras afecciones de este tipo incluyen los síndromes de Rubenstein-Taybi, Coffin-Lowry, de Prader-Willi, Angelman, de Beckwith-Wiedemann, ATR-X y de Rett.

Las terapias epigenéticas incluyen inhibidores de las enzimas que controlan las modificaciones epigenéticas, específicamente las metiltransferasas de ADN y las histona desacetilasas, que han demostrado efectos antitumorales prometedores para algunos tumores malignos, así como oligonucleótidos antisentido y ARNs.

Inmunoterapia

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en el presente documento se administra con una inmunoterapia. Inmunoterapia del cáncer se refiere a un conjunto diverso de estrategias terapéuticas diseñadas para inducir el propio sistema inmunológico del paciente para combatir el tumor. Los métodos modernos para la generación de una respuesta inmune contra tumores incluyen la inmunoterapia con BCG intravesicular para el cáncer superficial de vejiga, la vacuna contra el cáncer de próstata Provenge, y el uso de interferones y otras citocinas para inducir una respuesta inmune en pacientes con carcinoma de células renales y melanoma.

El trasplante hematopoyético alogénico de células madre se puede considerar una forma de inmunoterapia, ya que las células inmunitarias del donante a menudo atacan al tumor en un efecto de injerto contra tumor. En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia se pueden utilizar en combinación con un compuesto descrito en el presente documento.

Terapia hormonal

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en el presente documento se administra con una terapia hormonal. El crecimiento de algunos tipos de cáncer puede inhibirse mediante el suministro o bloqueo de ciertas hormonas. Los ejemplos más habituales de tumores sensibles a las hormonas incluyen ciertos tipos de cánceres de mama y de próstata, así como ciertos tipos de leucemia que responden a ciertos retinoides/ácidos retinoico. La eliminación o el bloqueo de los estrógenos o la testosterona es a menudo un tratamiento adicional importante. En ciertos tipos de cáncer, la administración de agonistas hormonales, como los progestágenos pueden ser terapéuticamente beneficiosos. En algunas realizaciones, los agentes de terapia hormonal se pueden utilizar en combinación con un compuesto descrito en el presente documento.

Los agentes de terapia hormonal incluyen la administración de agonistas de hormonas o antagonistas de hormonas e incluyen retinoides/ácido retinoico, compuestos que inhiben el estrógeno o la testosterona, así como la administración de progestágenos.

Inflamación y enfermedades autoinmunes

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con inflamación, en particular en seres humanos y otros mamíferos. Un compuesto descrito en el presente documento se puede administrar antes de la aparición de, en, o después del inicio de la inflamación. Cuando se usa profilácticamente, los compuestos se proporcionan preferiblemente antes de cualquier respuesta o síntoma inflamatorio. La administración de los compuestos puede prevenir o atenuar las respuestas o síntomas inflamatorios. Ejemplos de afecciones inflamatorias incluyen, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad degenerativa de las articulaciones, espondiloartropatías, otras artritis inflamatorias seronegativas, polimialgia reumática, diferentes vasculitides (por ejemplo, arteritis de células gigantes, vasculitis ANCA +), artritis gotosa, lupus eritematoso sistémico, artritis juvenil, artritis reumatoide juvenil, artrosis, osteoporosis, diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus dependiente de insulina o diabetes de inicio juvenil), calambres menstruales, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis mucosa, colitis ulcerosa, gastritis, esofagitis, pancreatitis, peritonitis, enfermedad de Alzheimer, shock, espondilitis anquilosante, gastritis, conjuntivitis, pancreatitis (aguda o crónica), síndrome de lesión de múltiples órganos (por ejemplo, secundaria a septicemia o trauma), infarto de miocardio, aterosclerosis, accidente cerebrovascular, lesión

por reperusión (por ejemplo, debido a derivación cardiopulmonar o diálisis de riñón), glomerulonefritis aguda, lesión térmica (es decir, quemadura solar), enterocolitis necrotizante, síndrome asociada con la transfusión de granulocitos y o/síndrome de Sjögren. Ejemplos de afecciones inflamatorias de la piel incluyen, por ejemplo, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria, esclerodermia, psoriasis, y dermatosis con componentes inflamatorios agudos.

En otra realización, un compuesto descrito en el presente documento se puede usar para tratar o prevenir alergias y trastornos respiratorios, incluyendo asma, bronquitis, fibrosis pulmonar, rinitis alérgica, toxicidad del oxígeno, enfisema, bronquitis crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, y cualquier enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los compuestos se pueden usar para tratar la infección de hepatitis crónica, incluyendo la hepatitis B y la hepatitis C.

Además, un compuesto descrito en este documento pueden usarse para tratar enfermedades y/o la inflamación asociada con enfermedades autoinmunes, tales como enfermedades autoinmunitarias de órganos - tejido (por ejemplo, síndrome de Raynaud), esclerodermia, miastenia gravis, rechazo de trasplante, choque endotóxico, septicemia, psoriasis, eczema, dermatitis, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmune, uveítis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, enfermedad poliglandular autoinmune (también conocida como síndrome poliglandular autoinmune) y enfermedad de Grave.

En una realización particular, los compuestos descritos en este documento pueden usarse para tratar la esclerosis múltiple. En un aspecto específico, el compuesto utilizado para tratar la esclerosis múltiple es el Compuesto 1: (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-1-(3,3-difluoroazetidín-1-il)prop-2-en-1-ona).

Terapia de combinación

En ciertas realizaciones, un compuesto descrito en este documento puede administrarse solo o en combinación con otros compuestos útiles para tratar o prevenir la inflamación. Agentes antiinflamatorios de ejemplo incluyen, por ejemplo, esteroides (por ejemplo, cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisona, 6 [alfa]-metilprednisona, triamcinolona, betametasona o dexametasona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE (por ejemplo, aspirina, acetaminofeno, tolmetina, ibuprofeno, ácido mefenámico, piroxicam, nabumetona, rofecoxib, celecoxib, etodolac o nimesulida). En otra realización, el otro agente terapéutico es un antibiótico (por ejemplo, vancomicina, penicilina, amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, cefixima, rifampinmetronidazol, doxiciclina o estreptomicina). En otra realización, el otro agente terapéutico es un inhibidor de la PDE4 (por ejemplo, roflumilast o rolipram). En otra realización, el otro agente terapéutico es un antihistamínico (por ejemplo, ciclizina, hidroxizina, prometazina o difenhidramina). En otra realización, el otro agente terapéutico es un antipalúdico (por ejemplo, artemisinina, artesunato, fosfato de cloroquina, clorhidrato de mefloquina, doxiciclina hclato, clorhidrato de proguanil, atovuona o halofantrina). En una realización, el otro compuesto es drotrecogina alfa.

Otros ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, aceclofenaco, acemetacina, ácido e-acetamidocaproico, acetaminofeno, acetaminosalol, acetanilida, ácido acetilsalicílico, S-adenosilmetionina, alclofenaco, alclometasona, alfentanilo, algestona, alilprodina, alminoprofeno, aloxiprina, alfaprodina, bis (acetilsalicilato) de aluminio, amcinonida, amfenaco, aminocloartenoxazina, 3-amino-4-hidroxi-butírico, 2-amino-4-picolina, aminopropilona, aminopirina, amixetrina, salicilato de amonio, ampiroxam, amtolmetina guacil, anileridina, atipirina, antrafenina, apazona, beclometasona, bendazac, benorilato, benoxaprofeno, benzpiperilona, bencidamina, bencilmorfina, bermoprofeno, betametasona, betametasona- 17-valerato, becitrámida, [alfa] -bisabolol, bromfenaco, p-bromoacetanilida, acetato de ácido 5-bromosalicílico, bromosaligenin, bucetina, ácido buclórico, bucoloma, budesonida, bufexamac, bumadizon, buprenorfina, butacetina, butibufeno, butorfanol, carbamazepina, carbifeno, caiprofen, carsalam, clorobutanol, cloroprednisona, clortenoxazina, salicilato de colina, cincofeno, cinmetacina, ciramadol, clidanaco, clobetasol, clocortolona, clometacina, clonitaceno, clonixina, clopirac, cloprednol, clavo de olor, codeína, bromuro de metilo codeína, fosfato de codeína, sulfato de codeína, cortisona, cortivazol, cropropamida, crotetamida, ciclazocina, deflazacort, dehidrotestosterona, desomorfina, desonida, desoximetasona, dexametasona, dexametasona-21-isonicotinato, dexoadrol, dextromoramida, dextropropoxifeno, desoxicorticosterona, dezocina, diampromida, diamorfona, diclofenaco, difenamizol, difenpiramida, diflorasona, diflucortolona, diflunisal, difluprednato, dihidrocodeína, acetato de enol dihidrocodeinona, dihidromorfina, acetilsalicilato dihidroxialuminio, dimenoxadol, dimefeptanol, dimetiltiambuteno, butirato dioxafetil, dipipanona, diprocetil, dipirona, ditazol, droxicam, emorfazona, ácido enfenámico, enoxolona, epirizol, eptazocina, etersalato, etenzamida, etoheptazina, etoxaceno, etilmetiltiambuteno, etilmorfina, etodolac, etofenamat, etonitaceno, eugenol, felbinaco, fenbufeno, ácido fenclórico, fendosal, fenoprofeno, fentanilo, fentiazaco, fepradinol, feprazona, flactafenina, flazacort, fluclofenona, ácido flufenámico, flumetasona, flunisolid, flunixin, flunoxaprofen, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, acetónido de fluocinolona, butilo fluocortina, fluocitolona, fluoresona, fluorometolona, fluperolona, flupirtina, fluprednido, fluprednisolona, fluproquazona, flurandrenolida, flurbiprofeno, fluticasona, formocortal, fosfosal, ácido gentísico, glafenina, glucametacina, salicilato de glicol, guaiazuleno, halcinonida, halobetasol, halometasona, haloprednone, heroína, hidrocodona, hidro cortamate, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, succinato de hidrocortisona, hidrocortisona hemisuccinato, hidrocortisona 21-lisinato, cipionato de hidrocortisona, hidromorfona, hidroxiptetidina, ibufenaco, ibuprofeno, ibuproxam, salicilato de imidazol, indometacina, indoprofeno, isofezolac, isoflupredone, acetato isoflupredone, isoladol, isometadona, isonixin, isoxepaco, isoxicam, cetobemidona, ketoprofeno, ketorolaco,

lactofenetida, lefetamina, levalorfan, levorfanol, levofenacil-morfán, lofentanilo, lonazolaco, lornoxicam, loxoprofeno, acetilsalicilato lisina, mazipredona, ácido meclofenámico, medrisona, ácido mefenámico, meloxicam, meperidina, meprednisona, meptazinol, mesalamina, metazocina, metadona, metotrimoprazina, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, suleptnato de metilprednisolona, ácido metiazínico, metofolina, metopón, mofebutazona, mofezolac, mometasona, morazona, morfina, clorhidrato de morfina, sulfato de morfina, salicilato de morfina metiazínico, mirofina, nabumetona, nalbufina, nalorfina, salicilato de 1-naftilo, naproxeno, narceína, nefopam, nicomorfina, nifenazona, ácido niflúmico, nimesulida, 5'-nitro-2 '-propoxiacetanilida, norlevorfanol, normetadona, normorfina, norpipanona, olsalazina, opio, oxaceprol, oxametacina, oxaprozina, oxicodona, oximorfona, oxifenbutazona, papaveretum, parametasona, paranilina, parsalmida, pentazocina, perisoxal, fenacetina, fenadoxona, fenazocina, clorhidrato de fenazopiridina, fenocol, fenoperidina, fenopirazona, fenomorfano, acetilsalicilato fenil, fenilbutazona, salicilato de fenilo, feniramidol, picetoprofeno, piminodina, pipebuzone, piperilona, pirazolac, piritramida, piroxicam, pirprofeno, pranoprofeno, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, proglumetacina, proheptacina, promedol, propacetamol, properidina, propiram, propoxifeno, propifenazona, procuazona, ácido protizínico, proxazole, ramifenazona, remifentanilo, metilsulfato rimazolium, nalacetamida, salicina, salicilamida, salicilamida ácido o-acético, ácido salicílico, ácido salicilsulfúrico, salsalato, salverine, simetride, sufentanilo, sulfasalazina, sulindac, superóxido dismutasa, suprofen, suxibuzona, talniflumato, tenidap, tenoxicam, terofenamate, tetrandrina, tiazolinobutazona, ácido tiaprofénico, tiaramida, tilidina, tinoridina, tixocortol, ácido tolfenámico, tolmetina, tramadol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, tropesina, viminol, xenbucina, ximoprofen, zaltoprofeno y zomepirac.

En una realización, un compuesto descrito en el presente documento se puede administrar con un inhibidor selectivo de la COX-2 para el tratamiento o prevención de la inflamación. Ejemplos de inhibidores selectivos de la COX-2 incluyen, por ejemplo, deracoxib, parecoxib, celecoxib, valdecoxib, rofecoxib, etoricoxib, y lumiracoxib.

En algunas realizaciones, un compuesto proporcionado se administra en combinación con una antraciclina o un inhibidor de la Topo II. En ciertas realizaciones, un compuesto proporcionado se administra en combinación con doxorubicina (Dox). En ciertas realizaciones, un compuesto proporcionado se administra en combinación con bortezomib (y más ampliamente incluyendo carfilzomib). Se encontró sorprendentemente que un compuesto proporcionado en combinación con Dox o bortezomib resultó en un efecto sinérgico (es decir, más que aditivo).

Infecciones víricas

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una infección vírica en particular en seres humanos y otros mamíferos. Un compuesto descrito en el presente documento se puede administrar antes de la aparición de, en, o después del inicio de la infección vírica. Cuando se usa profilácticamente, los compuestos se proporcionan preferiblemente antes de cualquier respuesta o síntoma de infección vírica.

Las enfermedades víricas de ejemplo incluyen faringitis febril aguda, fiebre faringoconjuntival, queratoconjuntivitis epidémica, gastroenteritis infantil, infecciones por Coxsackie, mononucleosis infecciosa, linfoma de Burkitt, hepatitis aguda, hepatitis crónica, cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular, infección primaria por el VSH-1 (por ejemplo, la gingivostomatitis en los niños, amigdalitis y faringitis en adultos, queratoconjuntivitis), infección latente por el VSH-1 (por ejemplo, herpes labial y aftas), infección primaria por el VSH-2, infección latente por el VSH-2, meningitis aséptica, mononucleosis infecciosa, enfermedad de inclusión citomegálica, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica, linfoma de derrame primario, SIDA, gripe, síndrome de Reye, sarampión, encefalomiелitis postinfecciosa, paperas, lesiones epiteliales (por ejemplo, verrugas comunes planas, plantares y anogenitales, papilomas laríngeos, epidermodisplasia verruciforme), carcinoma de cuello de útero, carcinoma de células escamosas, crup, neumonía, bronquiolitis, resfriado común, poliomiелitis, rabia, síndrome similar a la gripe, bronquiolitis grave con neumonía, sarampión alemán, la rubéola congénita, varicela y herpes zóster.

Patógenos virales de ejemplo incluyen adenovirus, virus Coxsackie, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes simple de tipo 1, virus herpes simple de tipo 2, citomegalovirus, virus del herpes humano tipo 8, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la gripe, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano, virus de la parainfluenza, virus de la polio, virus de la rabia, virus sincitial respiratorio, virus de la rubéola, virus de la varicela-zóster, el virus del Nilo Occidental, Dungee, y el virus de la fiebre amarilla. Los patógenos virales también pueden incluir virus que causan las infecciones virales resistentes.

Los medicamentos antivirales son una clase de medicamentos utilizados específicamente para el tratamiento de infecciones virales. La acción antiviral generalmente entra en uno de los tres mecanismos la interferencia con la capacidad de un virus para infiltrarse en una célula diana (por ejemplo, amantadina, rimantadina y pleconaril), la inhibición de la síntesis de virus (por ejemplo, análogos de nucleósidos, por ejemplo, aciclovir y zidovudina (AZT), y la inhibición de la liberación de virus (por ejemplo, zanamivir y oseltamivir).

Oftalmología

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir un trastorno oftalmológico. Trastornos oftalmológicos de ejemplo incluyen edema macular (edema macular diabético y no diabético), formas húmeda y seca de la degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular disciforme por la edad, edema macular cistoide, edema palpebral, edema de retina, retinopatía diabética, coriorretinopatía, maculopatía neovascular, glaucoma neovascular, uveítis, iritis, vasculitis retiniana, endoftalmitis, panoftalmitis, oftalmía metastásica, coroiditis, epitelitis pigmentaria retiniana, conjuntivitis, ciclitis, escleritis, epiescleritis, neuritis óptica, neuritis óptica retrobulbar, queratitis, blefaritis, desprendimiento de retina exudativo, úlcera de la córnea, úlcera conjuntival, queratitis numular crónica, enfermedad oftálmica asociada con hipoxia o isquemia, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética proliferativa, vasculopatía coroidea polipoidal, proliferación angiomatosa de la retina, oclusión de la arteria retiniana, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, vitreorretinopatía exudativa familiar, enfermedad sin pulso (enfermedad de Takayasu), enfermedad de Eales, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, retinopatía leucémica, síndrome de hiperviscosidad de la sangre, macroglobulinemia, retinopatía asociada a interferón, retinopatía hipertensiva, retinopatía por radiación, deficiencia de células madre epiteliales de la córnea y cataratas.

Otros trastornos oftalmológicos tratables usando los compuestos descritos en el presente documento incluyen la vitreorretinopatía proliferativa y desprendimiento de retina crónico.

Las enfermedades inflamatorias de los ojos también son tratables usando los compuestos descritos en el presente documento.

Enfermedades neurodegenerativas

Neurodegeneración es el término general para la pérdida progresiva de la estructura o la función de las neuronas, incluyendo la muerte de las neuronas. Muchas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, y la enfermedad de Huntington se producen como resultado de los procesos neurodegenerativos. A medida que la investigación avanza, aparecen muchas similitudes que se refieren a estas enfermedades entre sí en un nivel subcelular. El descubrimiento de estas similitudes ofrece la esperanza de avances terapéuticos que podrían aminorar muchas enfermedades simultáneamente. Hay muchos paralelismos entre diferentes trastornos neurodegenerativos incluyendo ensamblajes de proteínas anormales, así como la muerte celular inducida.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales. Esta pérdida produce atrofia grave de las regiones afectadas, incluyendo la degeneración en el lóbulo parietal y el lóbulo temporal, y partes de la corteza frontal y la circunvolución del cíngulo.

La enfermedad de Huntington causa astrogliosis y la pérdida de neuronas espinosas medias. Las áreas del cerebro se ven afectadas de acuerdo con su estructura y los tipos de neuronas que contienen, y se reduce su tamaño a medida que se pierden células acumulativamente. Las áreas afectadas están principalmente en el cuerpo estriado, pero también en las cortezas frontal y temporal. Los núcleos subtalámicos del cuerpo estriado envían señales de control al globo pálido, el cual inicia y modula el movimiento. Las señales más débiles de núcleo subtalámico causan una reducción de la iniciación y la modulación de movimiento, lo que tiene como resultado los movimientos característicos del trastorno. Ejemplos de tratamientos para la enfermedad de Huntington incluyen tetrabenazina, neurolepticos, benzodiazepinas, amantadina, remacemida, ácido valproico, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), mirtazapina y antipsicóticos.

El mecanismo por el cual se pierden las células cerebrales en la enfermedad de Parkinson puede consistir en una acumulación anormal de la proteína alfa-sinucleína unida a la ubiquitina en las células dañadas. El complejo alfa-sinucleína-ubiquitina no puede ser dirigido al proteosoma. Esta acumulación de proteína forma inclusiones citoplasmáticas proteináceas llamadas cuerpos de Lewy. Las últimas investigaciones sobre la patogenia de la enfermedad han demostrado que la muerte de las neuronas dopaminérgicas por la alfa-sinucleína se debe a un defecto en la maquinaria que transporta proteínas entre dos grandes orgánulos celulares, el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi. Ciertas proteínas como Rab1 pueden invertir este defecto causado por la alfa-sinucleína en modelos animales. Terapias de la enfermedad de Parkinson de ejemplo incluyen levodopa, agonistas de la dopamina, como bromocriptina, pergolida, pramipexol, ropinirol, piribedil, cabergolina, apomorfina y lisurida, inhibidores de la dopa descarboxilato, inhibidores de la MAO-B como selegilina y rasagilene, anticolinérgicos y amantadina.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA/enfermedad de Lou Gehrig) es una enfermedad en la que las neuronas motoras están dirigidas selectivamente a la degeneración. Terapias para la ELA de ejemplos incluyen riluzol, baclofeno, diazepam, trihexifenidilo y amitriptilina.

Otros agentes terapéuticos neurodegenerativos de ejemplo incluyen oligonucleótidos antisentido y células madre.

Cicatrización de heridas

Las heridas son un tipo de afección caracterizada por daños celulares o tisulares. La cicatrización de heridas es un

camino dinámico que de manera óptima conduce a la restauración de la integridad y la función del tejido. El proceso de cicatrización de heridas consta de tres fases superpuestas. La primera fase es una fase inflamatoria, que se caracteriza por homeostasis, agregación plaquetaria y desgranulación. Las plaquetas como la primera respuesta, liberan múltiples factores de crecimiento para reclutar células inmunes, células epiteliales y células endoteliales. La fase inflamatoria se produce normalmente durante 0-5 días. La segunda etapa de la cicatrización de heridas es la fase proliferativa durante la cual los macrófagos y los granulocitos invaden la herida. Los fibroblastos infiltrantes comienzan a producir colágeno. Las características principales de esta fase son epitelización, angiogénesis, formación de tejido de granulación y producción de colágeno. La fase proliferativa normalmente se produce durante 3-14 días. La tercera fase es la fase de remodelación en la que se produce la formación de matriz. Los fibroblastos, las células epiteliales y las células endoteliales continúan produciendo colágeno y colagenasa así como metaloproteasas de la matriz (MMP) para la remodelación. Se produce reticulación de colágeno y la herida sufre contracción. La fase de remodelación se produce normalmente a partir de 7 días a un año.

Los compuestos y composiciones descritos en este documento pueden usarse para estimular la cicatrización de heridas (es decir, estimular o acelerar el cierre de la herida y/o la cicatrización de heridas, mitigar la fibrosis de la cicatriz del tejido y/o alrededor de la herida, inhibir la apoptosis de las células circundantes o próximas a la herida). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto (por ejemplo, un inhibidor de CRM1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en estimular la cicatrización de heridas. El compuesto no necesita lograr la curación completa o el cierre de la herida; es suficiente que el compuesto estimule cualquier grado de cierre de la herida. En este sentido, el compuesto puede emplearse solo o como adyuvante con otros métodos para la cicatrización del tejido herido.

Los compuestos y composiciones descritos en este documento pueden usarse para tratar heridas durante la fase inflamatoria (o temprano), durante la fase proliferativa (o central) de cicatrización de heridas y/o durante la fase de remodelación (o tarde) de cicatrización de heridas.

En algunas realizaciones, el sujeto en necesidad de la cicatrización de heridas es un ser humano o un animal, por ejemplo, un caballo, un cerdo, o un roedor, tal como un ratón.

En algunas realizaciones, los compuestos y composiciones descritos en el presente documento útiles para la cicatrización de heridas se administran por vía tópica, por ejemplo, próximos a la zona de la herida, o sistémicamente.

Más específicamente, el compuesto o composición descrita en el presente documento se pueden administrar (opcionalmente en combinación con otros agentes) en el sitio de la herida mediante el recubrimiento de la herida o la aplicación de un vendaje, material de vendaje, puntos, etc., que están recubiertos o tratados con el compuesto o composición descrito en el presente documento. Como tales, los compuestos y composiciones descritos en este documento pueden formularse para la administración tópica para tratar heridas superficiales. Las formulaciones tópicas incluyen aquellas para liberación a través de la boca (bucal) y en la piel de tal manera que una capa de piel (es decir, la epidermis, la dermis y/o la capa subcutánea) se pone en contacto con el compuesto o la composición descritos en este documento. Los sistemas de administración tópica se pueden usar para administrar formulaciones tópicas de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento.

Como alternativa, los compuestos y composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse en o cerca del sitio de la herida, por ejemplo, la inyección de una solución, la inyección de una formulación de liberación prolongada, o la introducción de un implante biodegradable que comprende el compuesto o la composición descrito en el presente documento.

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para tratar heridas agudas o heridas crónicas. Una herida crónica se produce cuando se interrumpe el proceso de reparación normal. Las heridas crónicas pueden desarrollarse a partir de lesiones agudas como resultado de infecciones persistentes no reconocidas o un tratamiento primario inadecuado. Sin embargo, en la mayoría de casos, las lesiones crónicas son la etapa final de la descomposición progresiva del tejido debido a enfermedad vascular venosa, arterial, o metabólica, úlceras por presión, daños por radiación, o tumores.

En las heridas crónicas, la cicatrización no se produce por diversas razones, incluyendo la circulación inadecuada en úlceras diabéticas, necrosis significativa, tal como en las quemaduras y en las infecciones. En estas heridas crónicas, la viabilidad o la fase de recuperación es a menudo la etapa limitante de la velocidad. Las células ya no son viables y, por lo tanto, la fase inicial de recuperación se prolonga por el entorno desfavorable del lecho de la herida.

Las heridas crónicas incluyen, entre otras, las siguientes: lesiones cutáneas isquémicas crónicas; úlceras por esclerodermia; úlceras arteriales; úlceras del pie diabético; úlceras por presión; úlceras venosas; heridas en las extremidades inferiores no cicatrizantes, úlceras debido a afecciones inflamatorias; y/o heridas de larga duración.

En una realización particular, los compuestos y composiciones descritos en este documento pueden usarse para la

cicatrización de la herida diabética o para acelerar la cicatrización de las úlceras de la pierna y del pie secundarias a diabetes o a isquemia en un sujeto.

En una realización, la herida es una herida superficial. En otra realización, la herida es una herida quirúrgica (por ejemplo, una herida quirúrgica abdominal o gastrointestinal). En una realización adicional, la herida es una quemadura. En aún otra realización, la herida es el resultado de la exposición a la radiación.

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento también pueden usarse para la cicatrización de heridas diabéticas, cicatrización de heridas gastrointestinales, o cicatrización de una adherencia debida, por ejemplo, a una operación.

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento también se pueden utilizar para cicatrizar heridas que son secundarias a otra enfermedad. Por ejemplo, en enfermedades inflamatorias de la piel, tales como psoriasis y dermatitis, hay numerosos casos de lesiones de la piel que son secundarias a la enfermedad, y se producen por un profundo agrietamiento de la piel o arañazos de la piel. Los compuestos y composiciones descritos aquí se pueden utilizar para curar heridas que son secundarias a estas enfermedades, por ejemplo, enfermedades inflamatorias de la piel, tales como psoriasis y dermatitis.

En una realización adicional, la herida es una herida interna. En un aspecto específico, la herida interna es una herida crónica. En otro aspecto específico, la herida interna es una herida vascular. En otro aspecto específico, la herida interna es una úlcera.

Ejemplos de heridas incluyen, entre otros, abrasiones, avulsiones, heridas por soplado (es decir, neumotórax abierto), heridas por quemaduras, contusiones, heridas de bala, heridas incisas, heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas punzantes, heridas Seton, heridas de arma blanca, heridas quirúrgicas, heridas subcutáneas, lesiones diabéticas o heridas tangenciales. Ejemplos adicionales de heridas que pueden tratarse con los compuestos y composiciones descritos en el presente documento incluyen afecciones o heridas agudas, tales como quemaduras térmicas, quemaduras químicas, quemaduras por radiación, quemaduras causadas por la exposición excesiva a la radiación ultravioleta (por ejemplo, quemaduras solares); daños en los tejidos corporales, tales como el perineo, como resultado del trabajo de parto y el parto; lesiones sufridas durante procedimientos médicos, tales como episiotomías; lesiones inducidas por traumatismo, incluyendo cortes, incisiones, excoiraciones; lesiones sufridas por accidentes; lesiones posquirúrgicas, así como enfermedades crónicas, tales como úlceras por presión, escaras, afecciones relacionadas con la diabetes y la mala circulación, y todos los tipos de acné. Además, la herida puede incluir dermatitis, tales como impétigo, intertrigo, foliculitis y eccema, heridas tras cirugía dental; enfermedad periodontal; heridas después de un traumatismo; y heridas asociadas a tumores. Otros ejemplos de heridas más incluyen mordeduras de animales, enfermedad arterial, picaduras y mordeduras de insectos, infecciones óseas, injertos musculares/de piel comprometidos, gangrena, desgarros o laceraciones de la piel, envejecimiento de la piel, incisiones quirúrgicas, incluyendo heridas quirúrgicas de cicatrización lenta o sin cicatrización, hemorragia intracerebral, aneurisma, astenia dérmica e infecciones posquirúrgica.

En realizaciones preferidas, la herida se selecciona del grupo que consiste en una herida por quemadura, una herida incisa, una herida abierta, una herida quirúrgica o posquirúrgica, una lesión diabética, una quemadura térmica, una quemadura química, una quemadura por radiación, una úlcera por presión, una escara, y una afección relacionada con la diabetes o con la mala circulación.

La presente descripción también se refiere a composiciones para su uso en reducir la formación de cicatrices durante la cicatrización de heridas en un sujeto. Los compuestos y composiciones descritos en este documento pueden administrarse directamente en la herida o en las células próximas a la herida en una cantidad eficaz para reducir la formación de cicatrices en y/o alrededor de la herida.

La herida puede incluir cualquier lesión en cualquier parte del cuerpo de un sujeto. De acuerdo con realizaciones, se proporcionan compuestos para su uso en la mejora, la reducción o la disminución de la formación de cicatrices en un sujeto que ha sufrido una lesión por quemadura. De acuerdo con realizaciones preferidas, se proporcionan compuestos para su uso en el tratamiento, la reducción de la aparición de, o la reducción de la probabilidad de desarrollar cicatrices hipertróficas en un sujeto que ha sufrido una herida o lesión aguda o crónica.

Otros trastornos

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento también se pueden usar para tratar trastornos de crecimiento anormal de tejido y fibrosis que incluyen miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía restrictiva, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, glomerulonefritis, y otros trastornos renales.

Radioterapia de combinación

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento son útiles como radiosensibilizadores. Por lo tanto, los compuestos y composiciones descritos en el presente documento se pueden administrar en combinación

con radioterapia. La radioterapia es el uso médico de radiación de alta energía (por ejemplo, rayos X, rayos gamma, partículas cargadas) para reducir los tumores y destruir las células malignas, y generalmente se utiliza como parte del tratamiento del cáncer. La radioterapia destruye las células malignas al dañar su ADN.

- 5 La radioterapia se puede administrar a un paciente de varias formas. Por ejemplo, la radiación puede liberarse desde una fuente externa, tal como una máquina fuera del cuerpo del paciente, como en la radioterapia de haz externo. La radioterapia por haz externo para el tratamiento de cáncer utiliza una fuente de radiación que es externa al paciente, típicamente un radioisótopo, tal como ^{60}Co , ^{137}Cs , o una fuente de rayos X de alta energía, tal como un acelerador lineal. La fuente externa produce un haz colimado dirigido al sitio del tumor en el interior del paciente. La radioterapia de fuente externa evita algunos de los problemas de la radioterapia de fuente interna, pero indeseable y necesariamente irradia un volumen significativo de tejido no tumoral o saludable en la trayectoria del haz de radiación junto con el tejido tumoral.

- 15 El efecto adverso de la irradiación del tejido sano puede reducirse, mientras se mantiene una dosis dada de la radiación en el tejido tumoral, mediante la proyección del haz de radiación externo en el paciente en una variedad de ángulos "pórtico" convergiendo los haces en el sitio del tumor. Los elementos de volumen particulares de tejido sano, a lo largo de la trayectoria del haz de radiación, cambian, reduciendo la dosis total a cada uno de tales elementos de tejido sano durante todo el tratamiento.

- 20 La irradiación de tejido sano también puede se puede reducir colimando estrechamente el haz de radiación en la sección transversal general del tumor tomada perpendicularmente al eje del haz de radiación. Existen numerosos sistemas para la producción de una colimación circunferencial, algunos de los cuales utilizan múltiples correderas que, por piezas, pueden generar una máscara radioopaca de contorno arbitrario.

- 25 Para la administración de la radioterapia con haz externo, la cantidad puede ser de al menos aproximadamente 1 fracción Gray (Gy) al menos una vez cada dos días a un volumen de tratamiento. En una realización particular, la radiación se administra en al menos aproximadamente 2 fracciones Gray (Gy) al menos una vez al día a un volumen de tratamiento. En otra realización particular, la radiación se administra en al menos aproximadamente 2 fracciones Gray (Gy) al menos una vez al día a un volumen de tratamiento durante cinco días consecutivos por semana. En otra realización particular, la radiación se administra en 10 fracciones Gy cada dos días, tres veces a la semana, a un volumen de tratamiento. En otra realización particular, se administra un total de al menos aproximadamente 20 Gy a un paciente en necesidad del mismo. En otra realización particular, se administra al menos aproximadamente 30 Gy a un paciente en necesidad del mismo. En otra realización particular, se administra al menos aproximadamente 40 Gy a un paciente en necesidad del mismo.

- 35 Por lo general, el paciente recibe radioterapia de haz externo cuatro o cinco veces a la semana. Todo un curso de tratamiento por lo general dura de una a siete semanas, dependiendo del tipo de cáncer y del objetivo del tratamiento. Por ejemplo, un paciente puede recibir una dosis de 2 Gy/día durante 30 días.

- 40 La radioterapia interna es radioterapia localizada, lo que significa que la fuente de radiación se coloca en el sitio del tumor o área afectada. La radioterapia interna se puede liberar colocando una fuente de radiación dentro o al lado de la zona que requiere tratamiento. La radioterapia interna también se llama braquiterapia. La braquiterapia incluye el tratamiento intracavitario y tratamiento intersticial. En el tratamiento intracavitario, los recipientes que contienen fuentes radiactivas se colocan dentro o cerca del tumor. Las fuentes se introducen en las cavidades corporales. En el tratamiento intersticial, las fuentes radiactivas solo se introducen en el tumor. Estas fuentes radiactivas pueden permanecer en el paciente de forma permanente. Típicamente, las fuentes radiactivas se retiran del paciente después de varios días. Las fuentes radiactivas se encuentran en contenedores.

- 50 Hay un número de métodos para la administración de un agente radiofarmacéutico. Por ejemplo, el agente radiofarmacéutico puede administrarse mediante liberación dirigida o liberación sistémica de conjugados radiactivos específicos, tal como un anticuerpo radiomarcado, un péptido radiomarcado y un sistema de liberación en liposomas. En una realización particular de administración dirigida, el agente farmacéutico radiomarcado puede ser un anticuerpo radiomarcado. Véase, por ejemplo, Ballangrud A. M., et al. Cancer Res., 2001; 61:2008-2014 y Goldenber, D.M. J. Nucl. Med., 2002; 43(5):693-713.

- 55 En otra realización particular de administración dirigida, el agente radiofarmacéutico se puede administrar en forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Se pueden formar liposomas a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. Véase, por ejemplo, Emfietzoglou D, Kostarelos K, Sgouros G. An analytical dosimetry study for the use of radionuclide-liposome conjugates in internal radiotherapy. J Nucl Med 2001; 42:499-504.

- 65 En otra realización particular más de administración dirigida, el agente farmacéutico radiomarcado puede ser un péptido radiomarcado. Véase, por ejemplo, Weiner RE, Thakur ML. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. Appl Radiat Isot Nov 2002;57(5):749-63.

Además de la administración dirigida, la braquiterapia se puede usar para suministrar el agente radiofarmacéutico en el sitio diana. La braquiterapia es una técnica que pone a las fuentes de radiación lo más cerca posible al sitio del tumor. A menudo, la fuente se inserta directamente en el tumor. Las fuentes radiactivas pueden ser en forma de alambres, semillas o varillas. Generalmente, se usan cesio, iridio o yodo.

La radioterapia sistémica es otro tipo de terapia de radiación e implica el uso de sustancias radiactivas en la sangre. La radioterapia sistémica es una forma de terapia dirigida. En la terapia de radiación sistémica, un paciente normalmente ingiere o recibe una inyección de una sustancia radiactiva, tal como yodo radiactivo o una sustancia radiactiva unida a un anticuerpo monoclonal.

Un "agente radiofarmacéutico," tal como se define en el presente documento, se refiere a un agente farmacéutico que contiene al menos un radioisótopo emisor de radiación. Los radiofármacos se utilizan rutinariamente en la medicina nuclear para el diagnóstico y/o terapia de diversas enfermedades. El agente farmacéutico radiomarcado, por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, contiene un radioisótopo (RI) que sirve como fuente de radiación. Como se contempla en el presente documento, el término "radioisótopo" incluye radioisótopos metálicos y no metálicos. El radioisótopo se elige en función de la aplicación médica de los agentes farmacéuticos radiomarcados. Cuando el radioisótopo es un radioisótopo metálico, un quelante se emplea típicamente para unir el radioisótopo metálico al resto de la molécula. Cuando el radioisótopo es un radioisótopo no metálico, el radioisótopo no metálico está típicamente ligado directamente, o por medio de un enlazador, al resto de la molécula.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "radioisótopo metálico" es cualquier radioisótopo metálico adecuado útil en un procedimiento terapéutico o de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*. Radioisótopos metálicos adecuados incluyen, entre otros: actinio-225, antimonio-124, antimonio-125, arsénico-74, bario-103, bario-140, berilio-7, bismuto-206, bismuto-207, bismuto-212, bismuto-213, cadmio-109, cadmio-115m, calcio-45, cerio-139, cerio-141, cerio-144, cesio-137, cromo-51, cobalto-55, cobalto-56, cobalto-57, cobalto-58, cobalto-60, cobalto-64, cobre-60, cobre-62, cobre-64, cobre-67, erbio-169, europio-152, galio-64, galio-67, galio-68, gadolinio-153, gadolinio-157 oro-195, oro-199, hafnio-175, hafnio-175 a 181, holmio-166, indio-110, indio-111, iridio-192, hierro 55, hierro-59, kriptón-85, plomo-203, plomo 210, lutecio-177, manganeso-54, mercurio-197, mercurio-203, molibdeno-99, neodimio-147, neptunio-237, níquel-63, niobio-95, osmio-185 + 191, paladio-103, paladio-109, platino-195m, praseodimio-143, prometio-147, prometio-149, protactinio-233, radio-226, renio 186, renio-188, rubidio-86, rutenio-97, rutenio-103, rutenio-105, rutenio-106, samario-153, escandio-44, escandio-46, escandio-47, selenio-75, plata-110m, plata-111, sodio-22, estroncio-85, estroncio-89, estroncio-90, azufre-35, tantalio-182, tecnecio-99m, telurio-125, telurio-132, talio 204, torio-228, torio-232, talio-170, estaño-113, estaño-114, estaño-117m, titanio-44, tungsteno-185, vanadio-48, vanadio-49, iterbio-169, itrio-86, itrio-88, itrio-90, itrio-91, de zinc-65, circonio 89, y circonio-95.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "radioisótopo no metálico" es cualquier radioisótopo no metálico (radioisótopo no metálico) adecuado útil en un procedimiento terapéutico o de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*. Radioisótopos no metálicos adecuados incluyen, entre otros: yodo-131, yodo-125, yodo-123, fósforo-32, astato-211, flúor-18, carbono-11, oxígeno-15, bromo-76 y nitrógeno-13.

La identificación del isótopo más apropiado para la radioterapia requiere sopesar diversos factores. Estos incluyen la captación y retención del tumor, depuración de la sangre, la frecuencia de administración de la radiación, la semivida y la actividad específica del radioisótopo, y la viabilidad de la producción a gran escala del radioisótopo de manera económica. El punto clave para un radiofármaco terapéutico es liberar la cantidad necesaria de la dosis de radiación en las células tumorales y para lograr un efecto citotóxico o tumoricida sin causar efectos secundarios inmanejables.

Se prefiere que la semivida física del radioisótopo terapéutico sea similar a la semivida biológica del producto radiofarmacéutico en el sitio del tumor. Por ejemplo, si la semivida del radioisótopo es demasiado corta, la mayor parte de la descomposición se habrá producido antes de que el radiofármaco haya alcanzado la máxima relación de transmisión objetivo/fondo. Por otro lado, una semivida demasiado larga podría causar una dosis de radiación innecesaria en los tejidos normales. Idealmente, el radioisótopo debería tener una semivida suficientemente larga para alcanzar una tasa de dosis mínima e irradiar todas las células durante las fases más sensibles a la radiación del ciclo celular. Además, la semivida de un radioisótopo tiene que ser lo suficientemente larga como para permitir el tiempo adecuado para la fabricación, lanzamiento y transporte.

Otras consideraciones prácticas en la selección de un radioisótopo para una aplicación dada en la terapia de tumores son la disponibilidad y la calidad. La pureza tiene que ser suficiente y reproducible, como cantidades restos de impurezas pueden afectar al radiomarcaje y la pureza radioquímica del radiofármaco.

Los sitios receptores diana en tumores suelen tener un número limitado. Como tal, se prefiere que el radioisótopo tenga una actividad específica alta. La actividad específica depende principalmente del método de producción. Los contaminantes metálicos restos deben minimizarse, ya que a menudo compiten con el radioisótopo por el quelante y sus complejos metálicos compiten por la unión al receptor con el agente quelado radiomarcado.

El tipo de radiación que es adecuado para su uso en los usos de la presente invención puede variar. Por ejemplo, la radiación puede ser de naturaleza electromagnética o particulada. La radiación electromagnética útil en la práctica

de esta invención incluye, entre otros, rayos X y rayos gamma. La radiación de partículas útil en la práctica de esta invención incluye, entre otros, haces de electrones (partículas beta), haces de protones, haces de neutrones, partículas alfa, y mesones negativos pi. La radiación se puede liberar utilizando el aparato y los métodos de tratamiento radiológico convencionales y por métodos intraoperatorios y estereotáxicos. Discusiones adicionales con respecto a los tratamientos de radiación adecuados para su uso en la práctica de esta invención se pueden encontrar en Steven A. Leibel et al., *Textbook of Radiation Oncology* (1998) (publ. W. B. Saunders Company), y particularmente en los capítulos 13 y 14. La radiación también se puede liberar otros métodos tales como liberación dirigida, por ejemplo por "semillas radioactivas", o mediante liberación sistémica de conjugados dirigidos radiactivos. J. Padawer et al., *Combined Treatment with Radioestradiol lucanthone in Mouse C3HBA Mammary Adenocarcinoma and with Estradiol lucanthone in an Estrogen Bioassay*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 7:347-357 (1981). Otros métodos de liberación de radiación se pueden usar en la práctica de esta invención.

Para la terapia de tumores, se han investigado emisores de partículas α y de partículas β . Las partículas alfa son agentes citotóxicos particularmente buenos porque disipan una gran cantidad de energía dentro de uno o dos diámetros celulares. Los emisores de partículas β tienen un rango de penetración relativamente largo (2-12 mm en el tejido) en función del nivel de energía. La penetración de largo alcance es particularmente importante para tumores sólidos que tienen el flujo de sangre heterogéneo y/o la expresión del receptor. Los emisores de partículas β rinden una distribución de dosis más homogénea incluso cuando se distribuyen heterogéneamente dentro del tejido diana.

En una realización particular, las cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento se administran en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de la terapia de radiación para tratar el cáncer (por ejemplo, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas). La cantidad de radiación necesaria puede determinarla un experto en la materia basándose en las dosis conocidas para un tipo particular de cáncer. Véase, por ejemplo, *Cancer Medicine* quinta ed., Editado por RC Bast et al., Julio de 2000, BC Decker.

Generalmente, la divulgación anterior describe la presente invención. Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención. Los cambios en la forma y sustitución de equivalentes se contemplan como circunstancias y pueden sugerirse o hacerse conveniente. Aunque en el presente documento se han usado términos específicos, tales términos están destinados en un sentido descriptivo y no con fines de limitación.

EJEMPLOS

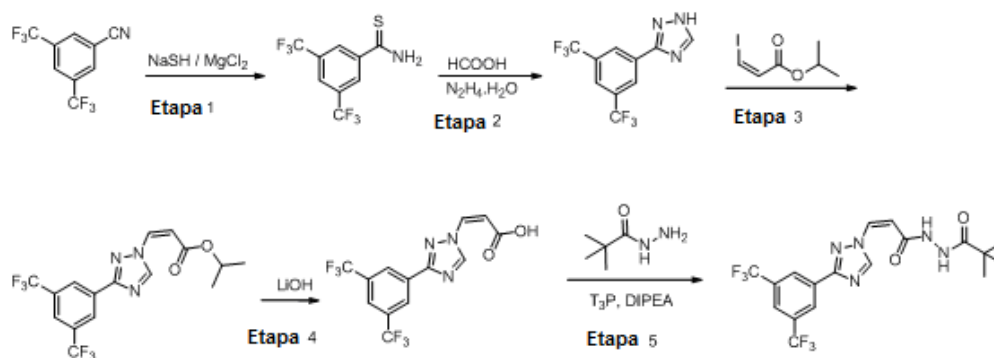
Abreviaturas

Ac.	Acuoso
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
equiv.	Equivalente o equivalentes
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
h	Hora u horas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
CLEM	Cromatografía de líquidos con espectrometría de masas
LiOH	Hidróxido de litio
RMN	Resonancia magnética nuclear
TR	Tiempo de retención o Temperatura ambiente
T3P	Anhídrido propilfosfónico
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano

A lo largo de la siguiente descripción de dichos procesos se ha de entender que, cuando sea apropiado, se añadirán grupos protectores adecuados, y después se retirarán, a los diversos reactantes e intermedios de una manera que entenderá fácilmente un experto en la materia de la síntesis orgánica. Procedimientos convencionales para usar tales grupos protectores, así como ejemplos de grupos protectores adecuados se describen, por ejemplo, en "Protective Groups in Organic Synthesis", T.W. Green, P.G.M. Wuts, Wiley-Interscience, New York, (1999). Se también se debe entender que una transformación de un grupo o sustituyente en otro grupo o sustituyente mediante manipulación química se puede realizar en cualquier producto intermedio o final en la ruta sintética hacia el producto final, en el que el tipo de transformación posible está limitado solo por la incompatibilidad inherente de otras funcionalidades realizadas por la molécula en esa etapa con las condiciones o reactivos empleados en la

transformación. Tales incompatibilidades inherentes, y maneras de eludir las realizando etapas de transformaciones adecuadas y sintéticas en un orden adecuado, lo entenderá fácilmente el experto en la materia de la síntesis orgánica. A continuación se proporcionan ejemplos de transformaciones y se debe entender que las transformaciones descritas no se limitan solamente a los grupos o sustituyentes genéricos para los cuales se ejemplifican las transformaciones. Las referencias y descripciones en otras transformaciones adecuadas se proporcionan en "Comprehensive Organic Transformations - A Guide to Functional Group Preparations" R. C. Larock, VHC Publishers, Inc. (1989). Referencias y descripciones de otras reacciones adecuadas se describen en libros de texto de química orgánica, por ejemplo, "Advanced Organic Chemistry", Marzo, 4ª ed. McGraw Hill (1992) o, "Organic Synthesis", Smith, McGraw Hill, (1994). Las técnicas para la purificación de intermedios y productos finales incluyen, por ejemplo, cromatografía de fase inversa y directa en columna o plato giratorio, recristalización, destilación y extracción líquido-líquido o sólido-líquido, que entenderán fácilmente los expertos en la técnica. Las definiciones de sustituyentes y grupos son como en la fórmula I excepto cuando se define de manera diferente. Con el término "temperatura ambiente" se entiende, a menos que se especifique lo contrario, una temperatura entre 16 y 25 °C. El término "reflujo" significa, a menos que se indique lo contrario, en referencia a un disolvente usado una temperatura en o por encima del punto de ebullición del disolvente citado.

Ejemplo 1. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-pivaloilacrilohidrazida (Compuesto 1). El compuesto 1 se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema:



3,5-bis(trifluorometil)benzotioamida (Etapa 1). Un matraz de 2 l de 3 bocas y fondo redondo se cargó con una solución de 3,5-bis-(trifluorometil)-benzonitrilo (200 g) en DMF (1 l). A continuación, la solución se trató con NaSH (123,7 g, 2,0 eq.) y MgCl₂ (186,7 g, 1,0 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 horas. La mezcla se vertió en una suspensión de hielo-agua (10 l) y el compuesto se extrajo con EtOAc (3 x 1 l). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de cloruro de sodio saturado acuoso (3 x 100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar 205 g del producto en bruto de 3,5-bis-(trifluorometil)-benzotioamida deseado (rendimiento: 90 %), que se usó sin en la etapa siguiente sin purificación adicional.

3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol (Etapa 2). Un matraz de 5 l de 3 bocas y fondo redondo se cargó con una solución de 3,5-bis-(trifluorometil)-benzotioamida (205,65 g) en DMF (1,03 l). Se añadió hidrato de hidrazina (73,2 ml, 2,0 eq.) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 hora. Se añadió HCOOH (1,03 l) gota a gota y la mezcla de reacción se sometió a reflujo a 90 °C durante 3 horas. Después de dejar enfriar hasta la TA, la mezcla de reacción se vertió en solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado (7 l) y se extrajo con EtOAc (3 x 1 l). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de cloruro de sodio saturado acuoso (3 x 500 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida (35 °C, 20 mmHg) para proporcionar 180 g del producto en bruto. El material en bruto se agitó con éter de petróleo (3 x 500 ml), se filtró y se secó para obtener 160 g del 3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol deseado obtenido como un sólido de color amarillo claro (rendimiento: 75 %).

(Z)-isopropil 3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilato de -isopropilo (Etapa 3). Un matraz de 2 l de 3 bocas y fondo redondo se cargó con una solución de 3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol (160 g) en DMF (960 ml). La solución se trató con DABCO (127,74 g, 2 eq.) y se agitó durante 30 minutos antes de la adición de 3-yodoacrilato de (Z)-isopropilo (150,32 g, 1,1 eq.) gota a gota. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se vertió en una suspensión de agua con hielo (5 l) y se extrajo con EtOAc (3 x 1 l). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de cloruro de sodio saturado acuoso (3 x 100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida (35 °C, 20 mmHg) para dar 250 g del producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando acetato de etilo/n-hexano en gradiente (la columna estaba empaquetada en hexano y el compuesto deseado comenzó a eluir en el 2 % de EtOAc/n-hexano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para dar 3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilato de (Z)-isopropilo (138 g, rendimiento: 61 %).

Ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrílico (Etapa 4). Un matraz de 5 l de 3 bocas y fondo redondo se disolvió 3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilato de (Z)-isopropilo (130 g, 1.0 eq.) en THF (1,3 l). Se añadió una solución de LiOH (69,3 g, 5,0 eq.) en agua (1,3 l) gota a gota a la solución y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 horas antes de inactivar con 400 ml de la suspensión en hielo-agua de la mezcla y se acidificó (pH = 2-3) con HCl acuoso diluido. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 1 l) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de cloruro de sodio acuosa saturada, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentraron a presión reducida para proporcionar 110 g de ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrílico (rendimiento: 94 %), (contenido cis= 90,0 %, contenido trans= 8,2 % mediante CLEM).

Ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-pivaloilacrilohidrazida (Compuesto 1). En un matraz de 50 ml, de 3 bocas y de fondo redondo, el ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-pivaloilacrilohidrazida (0,2 g, 1,0 eq.) se disolvió en EtOAc (20 ml) y se enfrió a -60 °C e introdujo pivalohidrazida (0,08 g, 1,2 eq.) gota a gota. Gota a gota se añadió T3P (50 % en EtOAc) (0,4 ml, 4 eq.) seguido de DIPEA (0,4 ml, 4 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir al 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para dar (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-pivaloilacrilohidrazida (0,11 g, rendimiento: 43 %).

Ejemplo 2. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 2).

2-morfolinoacetohidrazida. En un matraz de 25 ml, de 3 bocas y de fondo redondo, el 2-metil morfolinoacetato (0,25 g, 1,0 eq.) se disolvió en etanol (5 ml) a TA. Se introdujo gota a gota Hidrato de hidrazina (0,087 g, 1,1 eq.) a TA y la mezcla de reacción se sometió a reflujo a 95 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para proporcionar la 2-morfolinoacetohidrazida bruta (0,23 g) que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 2). Un matraz de 50 ml de 3 bocas y fondo redondo se disolvió el ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrílico Ejemplo 1, etapa 4, 0,5 g, 1,0 eq.) en CH₂Cl₂: EtOAc (20 ml, 2: 1) y se enfrió a -60 °C y se introdujo 2-morfolinoacetohidrazida (0,23 g, 1,0 eq.) gota a gota. Gota a gota se añadió T3P (50 % en EtOAc) (1,27 ml, 1,5 eq.) seguido de DIPEA (0,96 ml, 2 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir al 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para dar (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (0,1 g, rendimiento: 14 %).

Ejemplo -3. Síntesis de (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilolil-5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida (Compuesto 3).

5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida. En un tubo sellado de 25 ml, el 5-metil-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (0,25 g, 1,0 eq.) se disolvió en etanol (5 ml) a TA. Se introdujo gota a gota hidrato de hidrazina (1 ml, 5 eq.) a TA y la mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para proporcionar la 5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida bruta (0,24 g) que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilolil-5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida (Compuesto 3). En un matraz de 50 ml, de 3 bocas y de fondo redondo, el ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrílico (Ejemplo 1, etapa 4, 0,5 g, 1,0 eq.) se disolvió en EtOAc:EtOH (15 ml, 2:1) y se enfrió a -60 °C y se introdujo 5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida (0,24 g, 1,0 eq.) gota a gota. Gota a gota se añadió T3P (50 % en EtOAc) (1,69 ml, 1,5 eq.) seguido de DIPEA (2 ml, 8 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir al 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contienen los compuestos deseados se combinaron para dar (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilolil-5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida (0,2 g, rendimiento: 42 %).

Ejemplo 4. Síntesis de (Z)-2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-acrilolil)-N-ciclopropilhidrazinacarbotoamida (Compuesto 4).

En un matraz de 50 ml, de 3 bocas y de fondo redondo, el ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-

1-*il*)acrílico (Ejemplo 1, etapa 4, 0,5 g, 1,0 eq.) se disolvió en EtOAc:EtOH (15 ml, 2:1) y se enfrió a -60 °C y se introdujo N-ciclopropilhidrazinacarbotoamida (0,22 g, 1,2 eq.) gota a gota. Gota a gota se añadió T3P (50 % en EtOAc) (1,69 ml, 2 eq.) seguido de DIPEA (1 ml, 4 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir al 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para dar (Z)-2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)acrilolil-N-ciclopropilhidrazinacarbotoamida (0,06 g, rendimiento: 9 %).

Ejemplo 5. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)-N'-metil-N'-(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 5).

N-metil-2-morfolinoacetohidrazida. En un tubo sellado de 25 ml, el 2-metilmorfolinoacetato (0,5 g, 1,0 eq.) se disolvió en etanol (5 ml) a TA. Se introdujo gota a gota metilhidrazina (0,16 g, 1,1 eq.) a TA y la mezcla de reacción se sometió a reflujo a 95 °C durante 48 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para proporcionar la N-metil-2-morfolinoacetohidrazida bruta (0,27 g) que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)-N'-metil-N'-(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 5). Un matraz de 50 ml de 3 bocas y fondo redondo se disolvió el ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)acrílico Ejemplo 1, etapa 4, 0,3 g, 1,0 eq.) en THF: EtOAc (15 ml, -2: 1) y se enfrió a -60 °C y se introdujo N-metil-2-morfolinoacetohidrazida (0,23 g, 1,5 eq.) gota a gota. Gota a gota se añadió T3P (50 % en EtOAc) (1,27 ml, 2,5 eq.) seguido de DIPEA (0,45 ml, 3 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir al 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para dar (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)-N'-metil-N'-(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (0,052 g, rendimiento: 12 %).

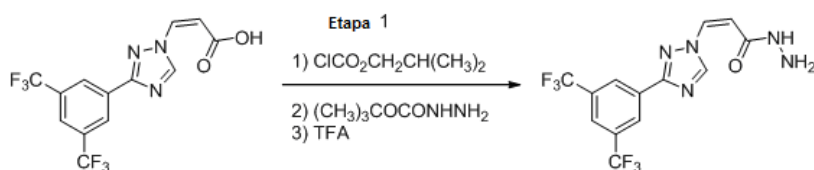
Ejemplo 6. Síntesis de (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)acrilolil)piperidin-3-carbohidrazida (Compuesto 6).

Piperidin-3-carbohidrazida. En un tubo sellado de 30 ml, el etilmetilpiperidin-3-carboxilato (1 g, 1,0 eq.) se disolvió en etanol (5 ml) a TA. Se introdujo gota a gota Hidrato de hidrazina (1,05 g, 3 eq.) a TA y la mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para proporcionar la piperidin-3-carbohidrazida bruta (0,8 g) que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)acrilolil)piperidin-3-carbohidrazida (Compuesto 6). Un matraz de 50 ml de 3 bocas y fondo redondo se disolvió el ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)acrílico Ejemplo 1, etapa 4, 0,25 g, 1,0 eq.) en THF: EtOAc (15 ml, 2: 1) y se enfrió hasta -60 °C y se introdujo piperidin-3-carbohidrazida (0,113 g, 1,1 eq.) gota a gota. Gota a gota se añadió T3P (50 % en EtOAc) (1,69 ml, 4 eq.) seguido de DIPEA (0,25 ml, 2 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir al 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contienen los compuestos deseados se combinaron para dar (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)acrilolil)piperidin-3-carbohidrazida (0,01 g, rendimiento: 2,4 %).

Ejemplo 7. Síntesis de (S,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-*il*)acrilolil)-3-metilbutanohidrazida 2,2,2-trifluoroacetato (Compuesto 7).

El compuesto 7 se sintetizó mediante el siguiente esquema:





15

40

60

Ejemplo 9. Síntesis de (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-1-metilpiperidin-4-carbohidrazida (Compuesto 9).

5 *1-metilpiperidin-4-carbohidrazida*. En un tubo sellado de 25 ml, el 1-metilpiperidin-4-carboxilato de metilo (0,2 g, 1,0 eq.) se disolvió en etanol (5 ml) a TA. Se introdujo gota a gota Hidrato de hidrazina (0,127 g, 2 eq.) a TA y la mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para proporcionar la 1-metilpiperidin-4-carbohidrazida bruta (0,145 g) que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

10 *(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-1-metilpiperidin-4-carbohidrazida (Compuesto 9)*. En un matraz de 50 ml, de 3 bocas y de fondo redondo, el ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-triazol-1-il)-1H-1,2,4) acrílico (0,25 g, 1,0 eq.) se disolvió en EtOAc:THF (15 ml; 2:1) y se enfrió a -60 °C y se introdujo 1-metilpiperidin-4-carbohidrazida (0,123 g, 1,1 eq.). Gota a gota se añadió T3P (50 % en EtOAc) (0,85 ml, 2 eq.)
 15 seguido de DIPEA (0,31 ml, 2,5 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (35 °C, 20 mm Hg) para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir al 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contienen los compuestos deseados se combinaron para dar (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-1-metilpiperidin-4-carbohidrazida (0,016 g, rendimiento: 4,5 %).

Ejemplo 10. Síntesis de (R,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-3-metilbutanohidrazida 2,2,2-trifluoroacetato (Compuesto 10).

25 *Ácido (R)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanoico*. En un matraz de 25 ml, de 3 bocas y de fondo redondo, el ácido (R)-2-amino-3-metilbutanoico (0,8 g, 1,0 eq.) se disolvió en agua (4 ml). Se añadió bicarbonato de sodio (0,394 g, 1,1 eq.), seguido de dicarbonato de dicarbonato de di-terc-butilo (1,86 g, 2,0 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a TA. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de cloruro de sodio saturado acuoso (25 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida (25 °C, 20 mmHg) para dar 0,75 g del producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando acetato de etilo/n-hexano en gradiente (la columna estaba empaquetada en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir en el 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para dar ácido (R)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanoico (0,44 g, rendimiento: 47,3 %).

35 2,2,2-trifluoroacetato de (R,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-3-metilbutanohidrazida (Compuesto 10). En un matraz de 10 ml, de 3 bocas y de fondo redondo, el ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilohidrazida (0,05 g, 1,0 eq.) se disolvió en THF (5 ml) y se enfrió a -60 °C y se introdujo ácido (R)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanoico (0,038 g, 1,3 eq.) gota a gota. Gota a gota se añadió T3P (50 % en EtOAc) (0,16 ml, 2 eq.) seguido de DIPEA (0,095 ml, 4 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir al 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contienen los compuestos deseados se combinaron para dar (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)hidrazinil-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (R,Z)-terc-butilo (0,017 g, rendimiento: 26 %). En un matraz de 10 ml y fondo redondo, el (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)hidrazinil-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (R,Z)-terc-butilo se disolvió en diclorometano (2 ml). Se añadió TFA (0,2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para dar el producto bruto (0,02 g), que se trituró con éter de petróleo y se secó a presión reducida para producir (R,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-3-metilbutanohidrazida 2,2,2-trifluoroacetato (0,007 g, rendimiento: 35 %).

Ejemplo 11. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(pirazin-2-il)Acetil)acrilohidrazida (Compuesto 11).

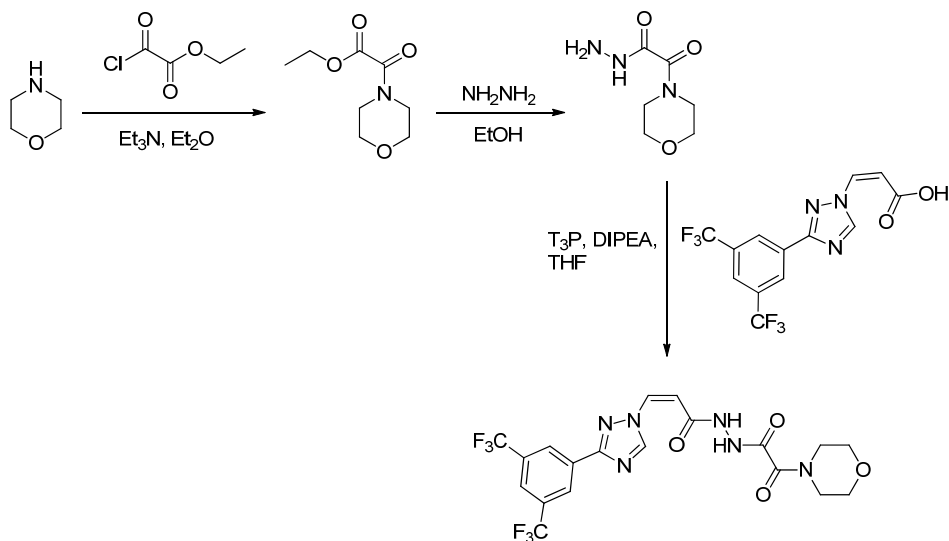
55 *2-(pirazin-2-il)acetohidrazida*. En un tubo sellado de 25 ml, el 2-(pirazin-2-il)Acetato de metilo (0,25 g, 1,0 eq.) se disolvió en etanol (5 ml) a TA. Se introdujo gota a gota Hidrato de hidrazina (0,33 g, 4 eq.) a TA y la mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para proporcionar la 2-(pirazin-2-il)acetohidrazida bruta (0,2 g) que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

65 *Ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(pirazin-2-il)acetil)acrilohidrazida (Compuesto 11)*. En un matraz de 50 ml, de 3 bocas y de fondo redondo, el ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-triazol-1-il)-1H-1,2,4) acrílico (0,3 g, 1,0 eq.) se disolvió en EtOAc:THF (15 ml; 2:1) y se enfrió a -60 °C y se introdujo 2-(pirazin-2-il)acetohidrazida (0,129 g, 1,1 eq.). Gota a gota se añadió T3P (50 % en EtOAc) (1,01 ml, 2 eq.) seguido de DIPEA

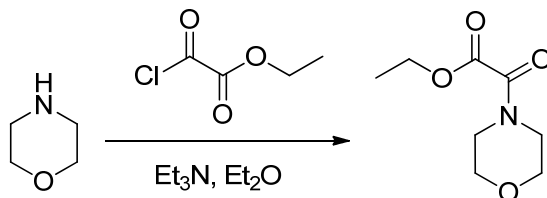
(0,35 ml, 2,5 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó a eluir al 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que

contenían los compuestos deseados se combinaron para dar (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(pirazin-2-il)acetil)acrilohidrazida (0,025 g, rendimiento: 5 %).

Ejemplo 12. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolino-2-oxoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 12).

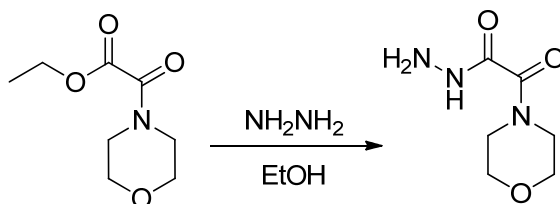


Síntesis de 2-morfolino-2-oxoacetato de etilo:



Se añadió una solución de 2-cloro-2-oxoacetato de etilo (1,25 g, 9,18 mmol) en éter dietílico (5 ml) gota a gota a una solución de morfolina (1,0 g, 11,48 mmol) en éter dietílico (20 ml) y trietilamina (1,16 g, 11,48 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El aceite de color amarillo se transfirió a 25 ml de agua helada y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida para dar 1 g del producto en bruto, que se utilizó sin purificación ulterior. Rendimiento bruto del 47 %. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,33-4,38 (c, 2H), 3,72-3,76 (m, 4H), 3,65-3,68 (m, 2H), 3,47-3,50 (m, 2H), 1,37-1,40 (t, 3H). CLEM *m/z* = 187,93 [M+H]⁺, *t_R* = 0,525 min.

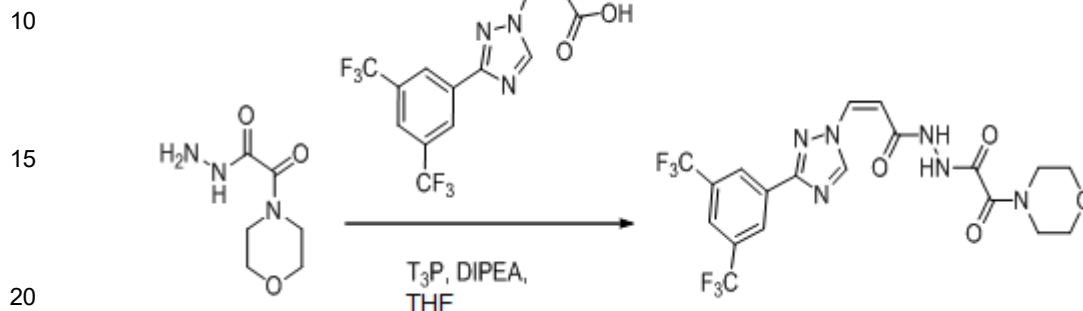
Síntesis de 2-morfolino-2-oxoacetohidrazida:



El 2-morfolino-2-oxoacetato de etilo (1,0 g, 5,34 mmol) se disolvió en etanol (7 ml) e hidrazina hidrato (0,267g, 5,34 mmol) se añadió gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La

mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar 0,9 g del producto en bruto, que se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente. Rendimiento bruto del 90 %. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 9,79 (s, 1H), 4,43-4,48 (m, 2H), 3,56-3,61 (m, 4H), 3,40-3,48 (m, 4H). CLEM m/z = 174,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R = 2,031 min.

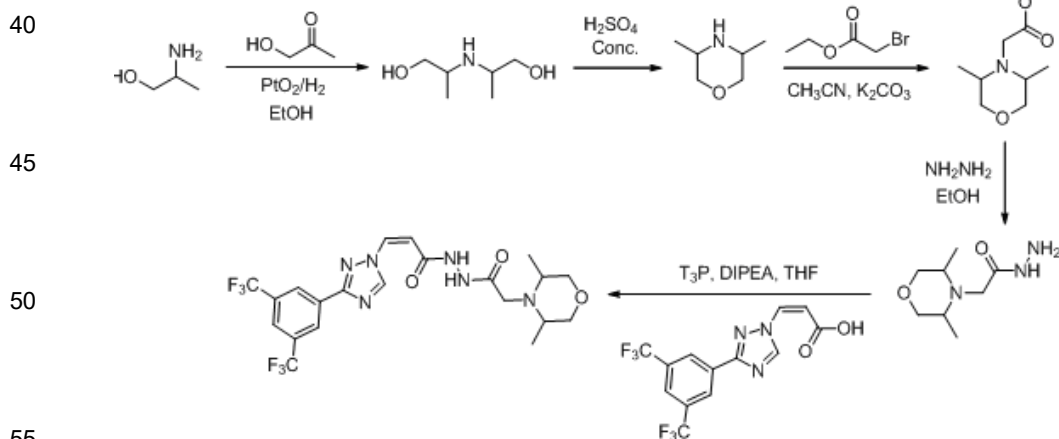
5 *Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolino-2-oxoacetil)acrilohidrazida:*



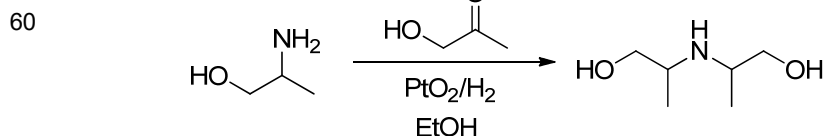
Una solución de ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) acrílico (0,2 g, 0,569 mmol) y 2-morfolino-2-oxoacetohidrazida (0,02 g, 0,175 mmol) en THF (3 ml) se enfrió hasta -60°C . Se añadió gota a gota T_3P (0,098 g, 0,569 mmol) (0,50 ml) seguido de DIPEA (0,11 g, 0,854 mmol) y se agitó a -60°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se transfirió a 25 ml de agua helada y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentraron a presión reducida para dar 0,3 g de producto bruto, que se purificó por cromatografía (0-4 % de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) para dar 0,15 g de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolino-2-oxoacetil) acrilohidrazida (rendimiento 50 %). RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,70-10,88 (m, 2H), 9,56 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,52-7,55 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 6,0-6,03 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 3,51-3,64 (m, 8H). CLEM m/z = 507,25 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R = 2,012 min.

Ejemplo 13. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,5-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida (Compuesto 13).

35



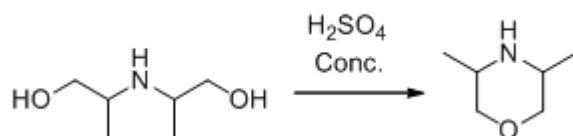
Síntesis de 2,2'-azandiildipropán-1-ol:



2-aminopropan-1-ol (5 g, 66,57 mmol) y 1-hidroxipropan-2-ona (5,77 g, 77,89 mmol) se disolvieron en etanol (115

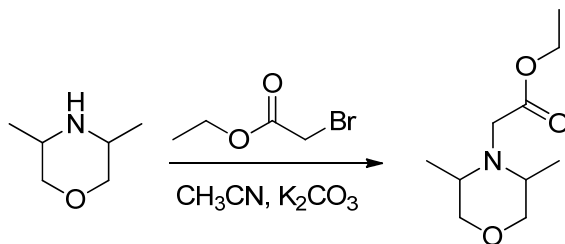
ml) y se añadieron 50 mg de PtO_2 . La mezcla de reacción se agitó a una presión de H_2 de (50 psi) a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar el producto bruto, que se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente. Rendimiento bruto: 79 %. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,45 (sa, 2H), 3,42-3,43 (m, 1H), 3,16-3,22 (m, 4H), 2,65-2,69 (m, 2H) 0,87-0,91(m, 6H). CLEM $m/z = 133,99$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ t_R : 4,077 min.

Síntesis de 3,5-dimetilmorfolina:



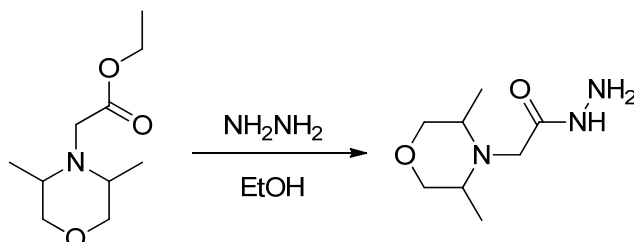
2,2'-azanedipropyl-1-ol (7 g, 52 mmol) se suspendió en H_2SO_4 concentrado (5,3 ml, 99,8 mmol) a temperatura ambiente y se calentó a 180°C durante 8 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añadió una solución de KOH (11,79 g, 21,02 mmol) en 60 ml de agua gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo con CHCl_3 :MeOH (85:15; 5 X 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida para dar 3,5 g de producto bruto, que se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente (Rendimiento bruto: 58 %).

Síntesis de 2-(3,5-dimetilmorfolino)acetato de etilo:



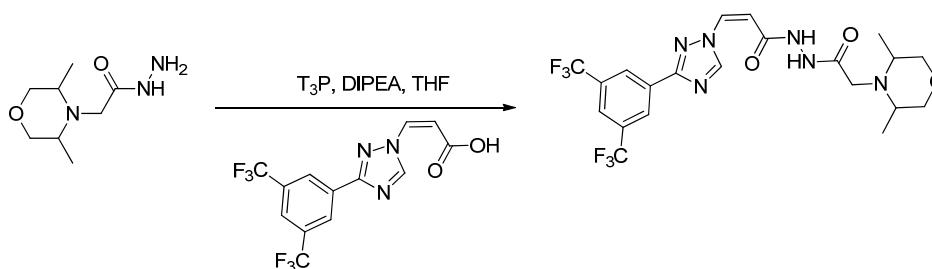
A la solución de 3,5-dimetilmorfolina (0,2 g, 1,73 mmol) en acetonitrilo (4 ml) a temperatura ambiente se añadieron carbonato de potasio (0,311 g, 2,25 mmol) y bromoacetato de etilo (0,319 g, 1,91 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 12 horas. La mezcla de reacción se transfirió a agua helada y se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto, que se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente (Rendimiento bruto: 54 %).

Síntesis de 2-(3,5-dimetilmorfolino)acetohidrazida de etilo:



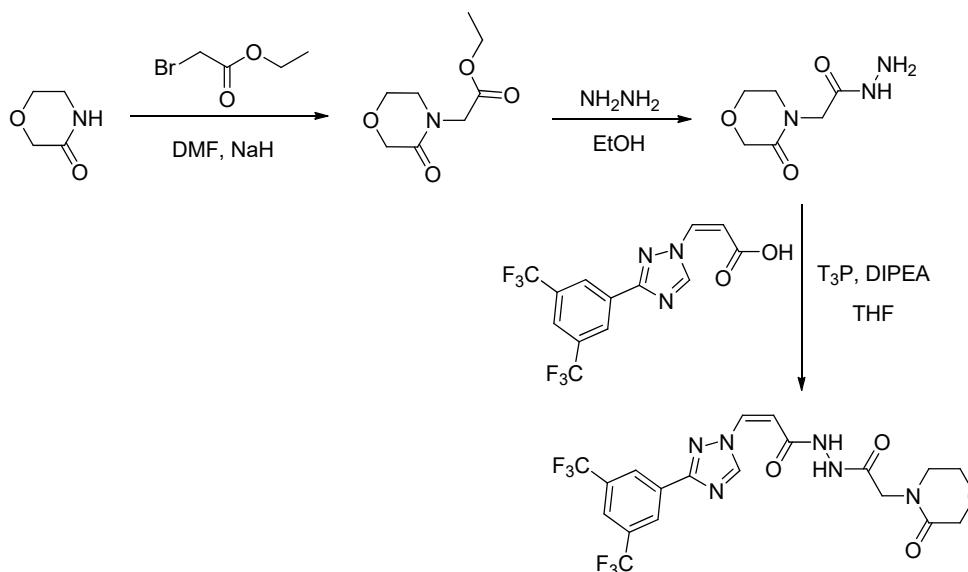
El 2-(3,5-dimetilmorfolino)acetato de etilo (0,19 g, 0,944 mmol) se disolvió en etanol (4 ml) y se añadió hidrato de hidrazina (0,047 g, 0,944 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 20 horas y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el producto bruto, que se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente. (Rendimiento bruto: 97 %). RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,95 (s, 2H), 8,84 (s, 1H), 3,60-3,63 (m, 2H), 3,25-3,29 (m, 2H), 3,14 (s, 2H), 3,05 (s, 2H), 0,86-0,88 (m, 6H): CLEM $m/z = 188,12$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 4,716$ min.

Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,5-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida:

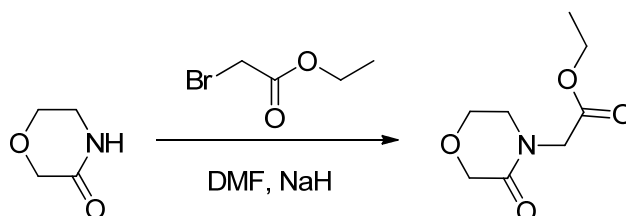


A la solución de ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) acrílico (0,2 g, 0,569 mmol) y 2-(3,5-dimetilmorfolino)acetohidrazida (0,106 g, 0,569 mmol) en THF (10 ml) se añadieron T3P (0,543 g, 0,854 mmol) seguido de DIPEA (0,110 g, 0,854 mmol) a -60 °C y se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se transfirió a 25 ml de agua helada y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto crudo, el cual se purificó por cromatografía (0-3 % de MeOH/CH₂Cl₂) para dar 0,02 g de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,5-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida (Rendimiento: 7 %). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,58 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,54-8,56 (m, 2H), 8,25-8,30 (m, 1H), 7,49-7,51 (d, J=10,4 Hz, 1H), 6,01-6,04 (d, J=10,4 Hz, 1H), 3,44-3,57 (m, 2H), 3,28-3,34 (m, 2H), 3,21 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 2,84-2,88 (m, 2H), 0,93-1,04 (m, 6H); CLEM *m/z* = 521,18 [M+H]⁺, *t_R* = 1,898 min.

Ejemplo 14. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3-oxomorfolino)acetil)acrilohidrazida (Compuesto 14).

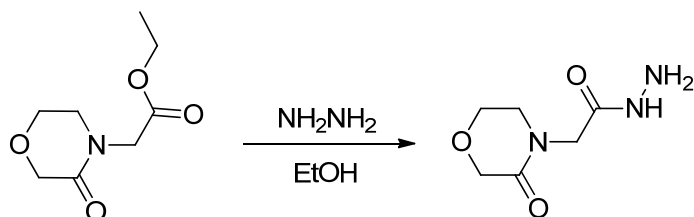


Síntesis de 2-(3-oxomorfolino)acetato de etilo:



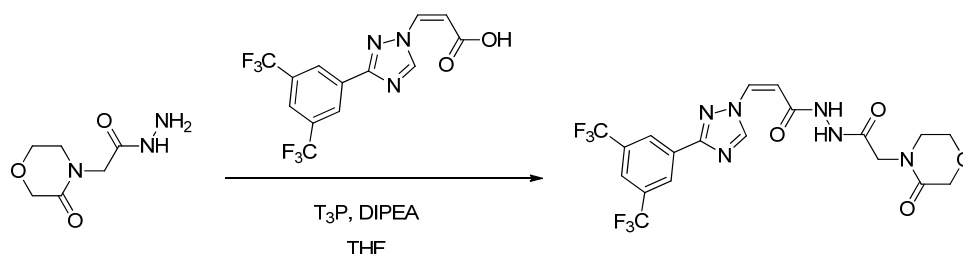
La morfolin-3-ona (3 g, 29,67 mmol) se disolvió en DMF (15 ml, 29,67 mmol) y se añadió NaH (1,78 g, 44,51 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se añadió gota a gota acetato de etilbromo (3,76 ml, 32,64 mmol). La mezcla de reacción se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 3 horas y se transfirió a 50 ml de agua y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera (2 x 50 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto, que se purificó por cromatografía (0-100 % acetato de etilo/hexano) para dar 600 mg de etil-2-(3-oxomorfolino) acetato de etilo (Rendimiento: 10 %). CLEM *m/z* = 187 [M+H]⁺, *t_R* = 2,505 min.

Síntesis de 2-(3-oxomorfolino)acetohidrazida:



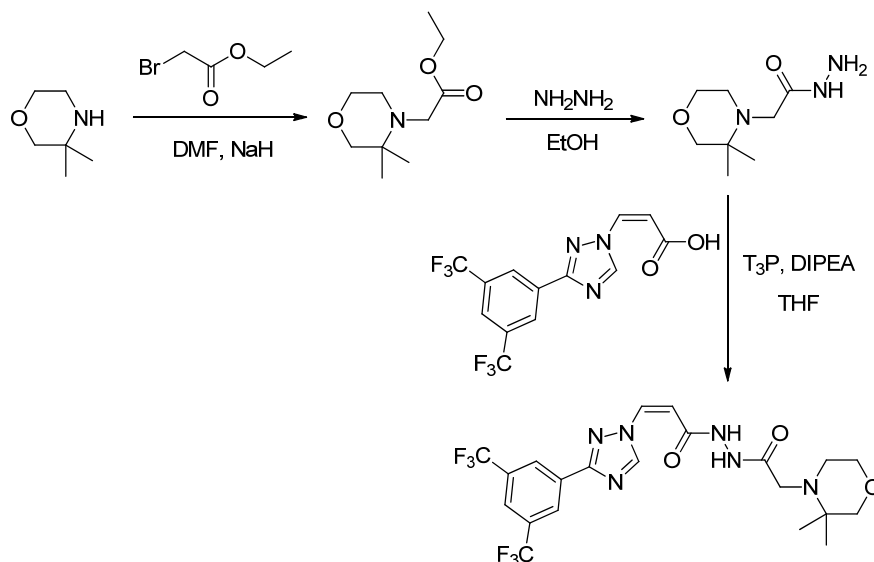
El 2-(3-oxomorfolino)acetato de etilo (600 mg, 3,21 mmol) se disolvió en etanol (3 ml) y se añadió hidrato de hidrazina (160,46 mg, 3,21 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se transfirió a ml de agua y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto, que se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente (Rendimiento bruto: 54 %). CLEM m/z = 174,05 $[M+H]^+$, t_R = 2,489 min.

Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3-oxomorfolino)acetil)acrilohidrazida:

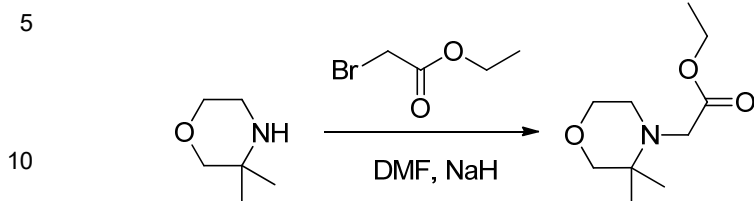


El ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrílico (0,400 g, 1,14 mmol) se disolvió en THF (4 ml) y se añadió 2-(3-oxomorfolino) acetohidrazida (0,295 g, 1,71 mmol). Se añadió T3P (1,09 g, 1,71 mmol) gota a gota seguido de DIPEA (220,80 mg, 1,71 mmol) a -60 °C y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se transfirió a 25 ml de agua helada y se extrajo con EtOAc (2 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentraron a presión reducida para dar de producto bruto, que se purificó por cromatografía (0-4 % de MeOH/CH₂Cl₂) para dar 0,05 g de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3-oxomorfolino)acetil)acrilohidrazida (rendimiento: 8 %). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,33 (a, 2H), 9,63 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,50-7,52 (d, J = 8 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J = 8 Hz, 1H), 4,08-4,12 (m, 4H), 3,85-3,87 (m, 2H), 3,41-3,44 (m, 2H). CLEM m/z = 507,13 $[M+H]^+$, t_R = 1,950 min.

Ejemplo 15. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,3-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida (Compuesto 15).

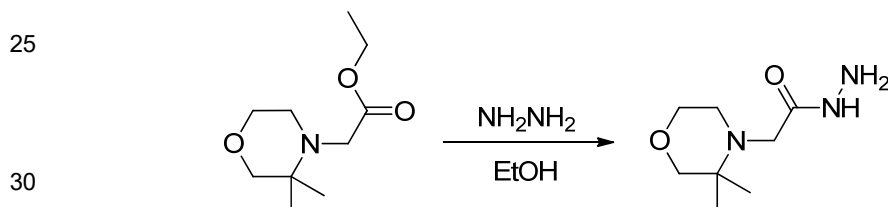


Síntesis de 2-(3,3-dimetilmorfolino)acetato de etilo:



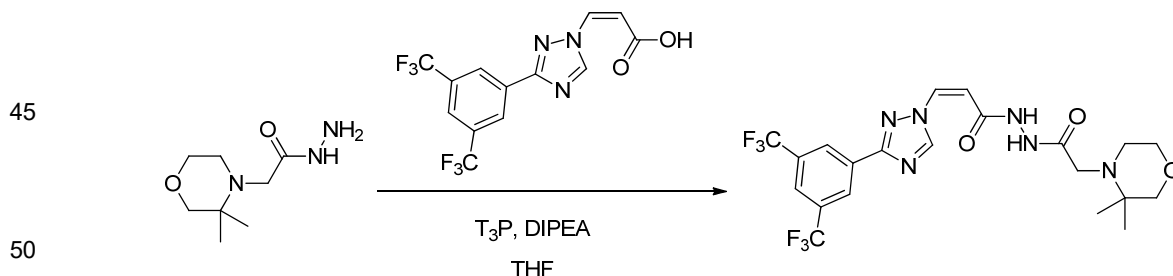
Se disolvió 3,3-dimetilmorfolina (1 g, 8,68 mmol) en acetonitrilo (5 ml) y se añadió carbonato de potasio (1,8 g, 13 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se añadió acetato de etilbromo (1,1 ml, 9,55 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se transfirió a 50 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto, que se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente (Rendimiento bruto: 91 %). CLEM m/z = 202,9 $[M+H]^+$, t_R = 2,33 min.

Síntesis de 2-(3,3-dimetilmorfolino)acetohidrazida:



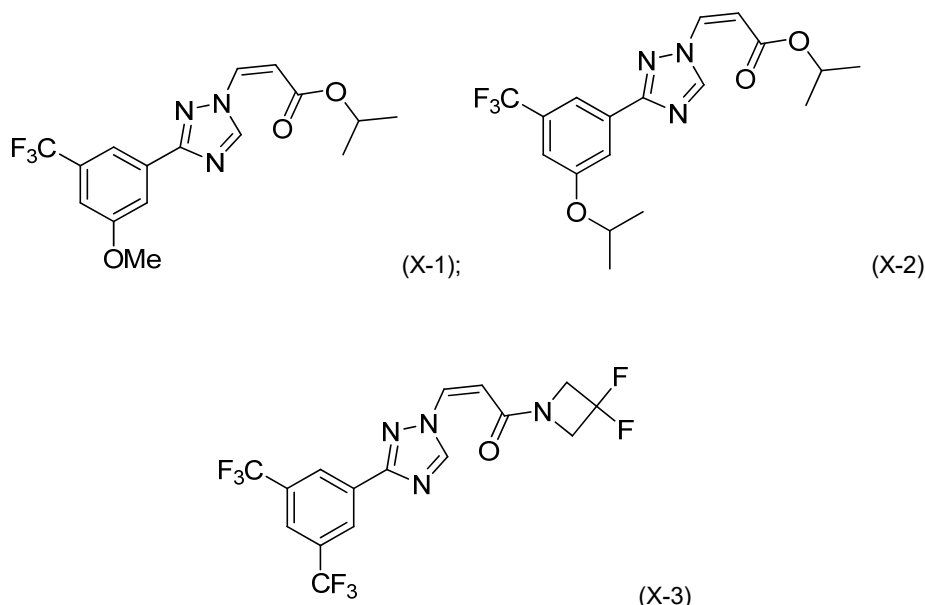
A la solución de 2-(3-oxomorfolino)acetato de etilo (600 mg, 2,98 mmol) en etanol (3 ml) se añadió hidrato de hidrazina (0,20 ml, 2,98 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 1 hora, se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente, se transfirió a 50 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto, que se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente (Rendimiento bruto: 28 %). CLEM m/z = 188 $[M+H]^+$ t_R : 188 min.

Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,3-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida:



A la solución de ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrílico (0,250 g, 0,7 mmol) y 2-(3,3-dimetilmorfolino)acetohidrazida (0,160 g, 0,85 mmol) en THF (2,5 ml) se añadió T_3P (0,63 ml, 1,06 mmol) gota a gota, seguido de DIPEA (0,18 ml, 1,06 mmol) a -60 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora, se transfirió a 25 ml de agua helada y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentraron a presión reducida para dar de producto bruto, que se purificó por cromatografía (0-4 % de MeOH/ CH_2Cl_2) para dar 0,05 g de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,3-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida (rendimiento: 13 %). RMN de 1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10,55 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 3,65-3,67 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 2H), 3,08 (a, 2H), 2,55-2,58 (m, 2H), 0,96 (s, 6H). CLEM m/z = 521,18 $[M+H]^+$, t_R = 1,937 min.

Ejemplo 16. Ensayos Ciertos compuestos de la invención, junto con los compuestos X-1, X-2 y X-3 (que se muestran a continuación) se analizaron en diversos ensayos.



25 *Inhibición de la exportación nuclear*

Se determinó la inhibición de la exportación nuclear mediada por CRM1 mediante los compuestos de la invención. Los resultados se muestran en la Tabla 2. La actividad inhibidora de los compuestos de la proteína CRM1 se determinó en el ensayo de RevGFP. Los compuestos de la invención son activos en el ensayo de Rev-GFP con CI_{50} <10 μ M con los compuestos más preferidos que tienen actividades con valores de CI_{50} de 1 μ M.

Protocolo experimental: Rev es una proteína del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y contiene una señal de exportación nuclear (NES) en su dominio C-terminal y una señal de localización nuclear (NLS) en su dominio N-terminal. La exportación nuclear de la proteína Rev depende de la vía de NES/CRM1 clásica (Neville et al, 1997, Kau et al, 2003). La acumulación nuclear de Rev se observa en las células tratadas con inhibidores específicos de CRM1, tales como LMB (Kau et al, 2003). En este ensayo, las células U2OS-RevGFP se siembran en placas de 384 pocillos negras de fondo transparente el día antes del experimento. Los compuestos se diluyeron en serie 1: 2 a partir de 40 μ M en una placa de 384 pocillos por separado en DMEM, y luego se transfirieron a las células. Las células se incuban con el compuesto durante ~ 1 hora antes de la fijación con formaldehído al 3,7 % y los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. La cantidad de GFP en los núcleos celulares se midió y se determinaron las CI_{50} de los compuestos (Kau et al, 2003).

Ensayo de proliferación de células MTT.

El ensayo de proliferación celular (Promega) CellTiter 96® Aqueous One Solution se utilizó en células MM1.S, Jurkat y HCT-116 para estudiar las propiedades citotóxicas y citostáticas de los compuestos. El ensayo se basa en la escisión de la sal de tetrazolio, MTS, en presencia de un reactivo PES para acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina). El compuesto de tetrazolio MTS se biorreduce por las células en un producto formazán coloreado que es soluble en el medio de cultivo tisular. Esta conversión se lleva a cabo presumiblemente por NADPH o NADH producido por enzimas deshidrogenasa en las células metabólicamente activas. Los ensayos se realizan mediante la adición de una pequeña cantidad de un reactivo de solución CellTiter 96® Aqueous directamente a los pocillos de cultivo, incubando durante 1-4 horas y después registrando la absorbancia a 490 nm con un lector de placas de 96 pocillos. La absorbancia revelada directamente se correlaciona con el número de células y su actividad metabólica. Las células se sembraron a de 5×10^3 a $1,5 \times 10^4$ células (dependiendo del tipo de célula) en cada pocillo de la placa de 96 pocillos en 100 μ l de medio de cultivo fresco y se permitió que las células adherentes se adhirieran durante la noche. Las soluciones madre de los compuestos se diluyeron en medio de cultivo celular para obtener ocho concentraciones de cada fármaco, que van de 1 nM a 30 μ M y DMSO a menos de 1 % v/v se utilizó como control negativo. Después de 72 h de tratamiento se añadieron en cada pocillo de las placas de 96 pocillos de ensayo 20 μ l de reactivo CellTiter 96® acuoso y la placa se incubó a 37 °C durante 1-4 horas en una atmósfera humidificada con 5 % CO₂. A continuación, la absorbancia de cada pocillo se registró a 490 nm usando un lector de placas de 96 pocillos. En la mayoría de los casos, el ensayo se realizó por triplicado y los resultados se presentaron como la concentración inhibitoria semimáxima (CI_{50}) se describe a continuación Se representó la densidad óptica frente a la concentración del compuesto y se analizó usando ecuaciones de regresión no lineal (Excel Fit) y la CI_{50} se calculó para cada compuesto. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Determinación de la farmacocinética (FC) y la relación Cerebro: Plasma. Se recogieron de los ratones (N = 3) para

contribuir al total de 10 puntos de tiempo (pre-dosis, 5 min, 15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas después de la dosis). Se extrajo sangre de los ratones en forma rotativa, cada ratón contribuyendo 3 puntos de tiempo para la recogida de sangre. En los puntos de tiempo designados, los animales fueron anestesiados con isoflurano, y se recogieron aproximadamente 110 µl de la sangre por punto de tiempo a través de la punción retro-orbital en tubos pre-enfriados con K₂EDTA (anti-coagulante). Las muestras de sangre se pusieron en hielo y se centrifugaron (2000 g, 5 min a 4 °C) para obtener plasma a los 30 minutos de la recogida de muestras. Todas las muestras se almacenaron congeladas a aproximadamente -80 °C hasta el análisis. Antes del análisis, las muestras se mezclaron con el patrón interno (dexametasona) en acetonitrilo, se agitaron con vórtice, se centrifugaron y el sobrenadante se inyectó para el análisis. La concentración de los compuestos en el plasma se determinó utilizando instrumentación CL-EM-EM (API 4000, cuádruple triple con ionización por electropulverización; columna de cromatografía líquida de ultra rendimiento Agudeza C18, con MeOH y el ácido fórmico como disolventes orgánicos). Los parámetros farmacocinéticos incluyendo, entre otros, T_{max}, C_{max}, t_{1/2}, AUC_{last}, AUC_{inf} se calcularon usando WinNonlin Profesional paquete de software 6.2, modelo farmacocinético no compartimental NCA200.

Relación cerebro: plasma (C:P). Un grupo separado de ratones (N = 3) se dosificó (vía oral a 10 mg/kg a menos que se indique lo contrario) y luego se sacrificó en el momento de la concentración plasmática máxima (T_{max} estimada a las 2 horas después de la dosis) donde se recogieron plasmática terminal y el cerebro. El tejido cerebral después de la recogida se lavó con solución salina fría, secó en papel de filtro, se pesó y se congeló ultrarrápido mediante la colocación en hielo seco. Todas las muestras se almacenaron congeladas a aproximadamente -80 °C hasta el análisis. En el momento del análisis, el tejido cerebral se homogeneizó (solución para homogeneizar PBS, pH 7,4), se mezcló con el patrón interno (dexametasona) en acetonitrilo, se agitó en vórtice, se centrifugó, y el sobrenadante se inyectó para el análisis de la concentración de compuesto utilizando la metodología CL-EM-EM (API 4000, Cuádruple Triple con ionización por electropulverización; columna de cromatografía líquida de ultra rendimiento Agudeza C18, con MeOH y ácido fórmico como disolventes orgánicos). Las muestras de plasma fueron tratados con el método idéntico (excepto etapa de homogeneización) y la concentración de compuesto, ya sea en la matriz, se calculó basándose en las curvas de calibración generadas. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del ensayo para compuestos de fórmula I y comparadores de los mismos.

Compuesto	Export. de Rev [C _{l50}]	Citotoxicidad [C _{l50}]	AUC _{inf} (h·ng/ml)*	C:P
X-1**	< 1µM	< 1µM	209‡	NA
X-2***	< 1µM	< 1µM	68,3†	1,27†
X-3	< 1µM	< 1µM	12300	5,0
1	NA	< 1µM	33100	2,25
2	< 1µM	< 1µM	28900	0,16
3	< 1µM	< 1µM	15200	0,03
4	NA	< 1µM	20929	0,028
5	NA	< 1µM	NA	NA
6	NA	< 1µM	NA	NA
7	NA	< 1µM	NA	NA
8	NA	< 1µM	9150	0,41
19	NA	< 1µM	671****	ND
10	NA	< 1µM	NA	NA
11	NA	< 1µM	8340	0,095
12	< 1µM	< 1µM	19600	0,06
13	NA	< 1µM	1103	1,5
14	NA	< 1µM	1419	0
15	NA	< 1µM	588	0

* Dosificado en ratones a 10 mg/kg vía oral.

** Compuesto 26 del documento US 2009/0275607.

*** Compuesto 44 del documento US 2009/0275607.

**** Dosificado en ratones a 5 mg/kg vía oral.

‡ Los valores de AUC_{inf} para el compuesto X-1 dosificado en ratones a 10 mg/kg vía oral estaban por debajo del límite de cuantificación. Datos notificados para 5 mg/kg i.v.

† Dosificado en ratones a 10 mg/kg vía oral.

NA = no analizado

N/D= por debajo del límite cuantificable

El AUC_{Inf} para el compuesto X-1 estaba por debajo del límite de detección cuando se administró a ratones a 10 mg/kg vía oral. Cuando se administró a 5 mg/kg i.v., el compuesto X-1 mostró una exposición mínima, como se indica por la baja AUC_{Inf} de 209 h·ng/ml. La proporción entre el cerebro y el plasma para el compuesto X-1 no se determinó debido a sus niveles insignificantes (por debajo del límite de cuantificación) en el cerebro cuando se administra por vía oral.

El AUC_{Inf} para el compuesto se calculó X-2 que era 68,3 h·ng/ml cuando se administra en ratas a 10 mg/kg por vía oral. Tales niveles de exposición son extremadamente bajos en comparación con el compuesto X-3 y los compuestos de la Fórmula I de la presente invención. Sin embargo, el compuesto X-2 exhibe una proporción cerebro: plasma moderada. La baja AUC_{Inf} junto con una proporción cerebro: plasma no despreciable sugiere que el compuesto X-2 puede cruzar la BHE a pesar de los bajos niveles de exposición. Los solicitantes creen que el Compuesto X-2 tendría una proporción cerebro: plasma significativamente mayor si se aumentó su AUC_{Inf}.

La AUC_{Inf} para el compuesto se calculó X-3 que era 12300 h·ng/ml cuando se administra en ratas a 10 mg/kg por vía oral, indicativo de una buena exposición. Sin embargo, X-3 demostró una alta proporción C: P de 5,0.

Los compuestos de Fórmula I, todos muestran una AUC_{Inf} alta (> 3500 h·ng/ml) y una proporción C: P relativamente baja (<2,5). Generalmente, mayores niveles de exposición de un agente terapéutico a menudo aumentan la probabilidad de penetración en el cerebro. Por tanto, es sorprendente e inesperado que los compuestos de fórmula I exhiben altos niveles de AUC_{Inf} y proporciones cerebro: plasma relativamente bajas.

Ejemplo 17 Modelos

Evaluación de los efectos del Compuesto 2 sobre el crecimiento del tumor en la línea celular de linfoma Z-138 cultivada como un xenoinjerto en ratones SCID

Las células Z-138 (ATCC n.º CRL-3001) de linfoma de células del manto se obtuvieron de la ATCC. Estas células se cultivaron en medio IMEM suplementado con 10 % de suero de caballo, 1 % de penicilina y estreptomina, y L-glutamina 2 mM. Las células se subcultivaron por dilución en una proporción de 1:5 a 1:10. Se utilizaron veinticuatro (24) ratones CB-17 SCID hembra (Charles River Labs, código cepa 236) de 5 a 6 semanas de edad. Los ratones SCID se inocularon en el costado izquierdo con células Z-138 en un volumen de 0,2 ml, equivalente a 4×10^7 células por ratón.

El tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 84,3 mm³. Los ratones fueron asignados a cuatro (4) grupos de ocho (8) antes de iniciar el tratamiento basado en el volumen del tumor de tal manera que el volumen medio del tumor en cada grupo estaba dentro del intervalo de 77 a 92 mm³. Los ratones se trataron con vehículo, cuidados farmacológicos estándar/fármaco de control positivo (ciclofosfamida) o el Compuesto 2, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de animales	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	8	Vehículo	10 ml/kg	v.o.	LMV
2	8	ciclofosfamida	80 mg/kg	i.p.	Días 1, 3, 5
3	8	Compuesto 2	15 mg/kg	v.o.	LMV
4	8	Compuesto 2	7,5 mg/kg	v.o.	LMV

Los animales fueron alimentados con comida para roedores Labdiet® 5001 y agua estéril *ad libitum*. Los tumores se midieron una vez cada dos días, con micropinzas, y el volumen del tumor se calculó como (longitud x anchura x anchura)/2. Se pesó a todos los animales todos los días con el fin de evaluar las posibles diferencias en el peso de los animales entre los grupos de tratamiento como una indicación de la posible toxicidad resultante de los tratamientos. Se sacrificaron los animales con pérdida de peso de más del 20 % con respecto a su peso inicial. Los ratones con una pérdida de peso de más del 15 % con respecto a su peso de partida no fueron tratados de nuevo hasta que la pérdida de peso se recuperó a menos del 5 % de su peso inicial. Se sacrificó a todos los animales con un volumen tumoral de más de 1.500 mm³.

Las soluciones de dosificación se prepararon frescas cada día de la dosificación. El compuesto 2 se suministró como un polvo liofilizado que contiene 69,61 % de compuesto 2 y el resto formado por compuestos de Pluronic F-68 y PVP K29/32. Este se preparó disolviendo el polvo liofilizado en agua estéril. La ciclofosfamida se disolvió a 8 mg/ml en agua estéril para inyección. Todos los artículos de ensayo se administraron en un volumen de 10 ml/kg de peso corporal.

Las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento se determinaron mediante pruebas de Mann-Whitney de suma de rangos o ANOVA con un valor crítico de 0,05.

La Figura 1 muestra que todos los grupos de tratamiento mostraron reducciones estadísticamente significativas en el crecimiento del tumor respecto al vehículo cuando se evaluó comparando el área bajo las curvas de crecimiento utilizando una prueba de ANOVA tanto para el volumen del tumor como para el volumen del tumor en porcentaje.

Estos grupos de tratamiento mostraron reducciones significativas en el crecimiento del tumor $p < 0,0001$. Se observó alguna pérdida de peso en el grupo tratado con el compuesto 2 a 15 mg/kg y, aunque es estadísticamente significativa en comparación con los controles vehículo, la pérdida de peso intensa se limitó a unos pocos animales.

El Compuesto 2, administrado por vía oral, tuvo efecto antitumoral tanto a dosis de 7,5 mg/kg como de 15 mg/kg de una manera dependiente de la dosis.

Actividad antitumoral del Compuesto 2 en el modelo de carcinoma de pulmón de células pequeñas A549

La línea celular A549 derivó de cultivo de explantes de tejido de carcinoma alveolar de uno varón caucásico de 58 años de edad. Las células se cultivaron en medio de cultivo tisular F12-K de Ham con 10 % de suero de ternera fetal y 1 % de penicilina/estreptomicina. Las células se digirieron con tripsina y se pasaron rutinariamente 1:10. Se usaron treinta y dos (32) ratones CB-17 SCID hembra (Charles River Labs código cepa 236), de entre 5 y 6 semanas de edad con un peso corporal medio de pretratamiento de 16,3 gramos. Los ratones se dividieron en cuatro (4) grupos de ocho (8) antes de la iniciación del tratamiento basado en el volumen del tumor. El día de la implantación, las células se lavaron en PBS, se digirieron con tripsina y se resuspendieron en medio completo a una densidad de 2×10^7 células/ml antes de mezclar con un volumen igual de Matrigel. Esta mezcla se inoculó por vía subcutánea en ratones en un volumen de 0,1 ml utilizando una aguja 23G.

Los ratones fueron tratados con vehículo, fármacos habituales/medicamentos de control positivo (cisplatina) o Compuesto 2, como se muestra en la Tabla 4. Los pesos de los animales y el estado se registraron a diario, y se midieron los tumores, los lunes, miércoles y viernes con micro-pinzas, y el volumen del tumor se calculó como (longitud x anchura x anchura)/2.

Tabla 4. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de animales	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	8	Vehículo	10 ml/kg	v.o.	LMV
2	8	Cisplatino	5 mg/kg	i.p.	Días 1, 15
3	8	Compuesto 2	10 mg/kg	v.o.	LMV
4	8	Compuesto 2	5 mg/kg	v.o.	LMV

Se sacrificaron los animales con pérdida de peso de más del 20 % con respecto a su peso inicial. Los ratones con una pérdida de peso de más del 15 % con respecto a su peso de partida no fueron tratados de nuevo hasta que la pérdida de peso se recuperó a menos del 5 % de su peso inicial. Se sacrificó a todos los animales con un volumen tumoral de más de 1.500 mm³.

Las soluciones de dosificación se prepararon frescas cada día de la dosificación. El compuesto 2 se suministró como un polvo liofilizado que contiene 69,61 % de compuesto 2 y el resto formado por compuestos de Pluronic F-68 y PVP K29/32. Este se preparó disolviendo el polvo liofilizado en agua estéril. El cisplatino se disolvió en 5 mg/ml en DMSO y se diluyó 1:10 en agua estéril para inyección. Todos los artículos de ensayo se administraron en un volumen de 0,1 ml/10g de peso corporal.

Las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento se determinaron mediante pruebas de Mann-Whitney de suma de rangos o ANOVA con un valor crítico de 0,05.

Los datos del cambio de volumen tumoral durante el estudio se muestran en La Figura. 2. El volumen medio del tumor para el grupo de control del vehículo aumentó desde 95 mm³ el día 1 a 1669 mm³ el día 29. El grupo tratado con cisplatino tuvo un volumen tumoral medio de 104 mm³ el día 1, aumentando a 1136 mm³ el día 29. Los ratones tratados con el compuesto 2 a 10 mg/kg por vía oral (Grupo 3) tuvieron un volumen tumoral medio de 101 mm³ el día 1, que aumentó a 686 mm³ el día 29. Los ratones tratados con el compuesto 2 a 5 mg/kg por vía oral (Grupo 6) tenían un volumen tumoral medio de 101 mm³ el día 1, que aumentó a 1231 mm³ el día 29.

Los análisis adicionales de los datos de volumen tumoral se realizaron mediante el cálculo del área media bajo la curva (AUC) para cada tumor y la comparación de los grupos mediante una prueba de ANOVA de una sola vía. Este análisis indicó que no había diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control de vehículo y el grupo tratado con el compuesto 2 a 10 mg/kg ($p = 0,0005$). Cabe señalar que no hubo una reducción estadísticamente significativa en el crecimiento tumoral en el grupo control positivo (cisplatina).

El Compuesto 2, administrado por vía oral, tuvo un efecto antitumoral tanto a dosis de 5 mg/kg como de 10 mg/kg de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, fue solo el grupo de 10 mg/kg el que mostró una diferencia

estadísticamente significativa en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Evaluación del Compuesto 2 en el modelo de ratón de artritis reumatoide inducida por anticuerpos anti-colágeno (CAIA)

Se utilizaron veinticuatro (24) ratones Balb/c macho con edades entre 6 a 8 semanas. La variación de peso de los animales en el momento de la iniciación del tratamiento no fue superior a ± 20 % del peso medio. Los animales fueron asignados aleatoriamente a 3 grupos que recibirían vehículo, dexametasona o el Compuesto 2. El día de estudio 0 (inicio del estudio), se realizó en todos los ratones una inyección intravenosa de 2 mg de cóctel de anticuerpos ArthritoMABTM (MD Biosciences n.º S1203001) seguida de una inyección intraperitoneal de LPS (100 μ g/ratón) el día de estudio 3. Los animales de estudio recibieron tratamiento con 7,5 mg/kg del compuesto 2 o 4 mg/kg del compuesto 2 por vía oral; 1 mg/kg de dexametasona por vía intraperitoneal; o vehículo por vía oral. Los tratamientos se administraron una vez al día los días 4, 6, 8 y 10 para todos los grupos, excepto cuando se aplican los descansos de las dosis. Si el peso de un animal disminuyó por debajo del 87 % de su peso inicial el día 0, no se administró la dosis al animal hasta que ganó peso equivalente a 90 % o más del peso el día 0.

El desarrollo de la artritis, los signos y los pesos corporales se monitorizaron en todos los ratones los días de estudio 0, 3-8, 10 y 12. Las observaciones incluyeron cambios en la piel, el pelaje, los ojos, las membranas mucosas, la presencia de secreciones y excreciones (por ejemplo, diarrea) y la actividad autónoma (por ejemplo, lagrimeo, salivación, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala). Todas las patas (frontal izquierda y derecha, y la parte trasera izquierda y derecha) de cada animal se revisaron para detectar signos de respuestas artríticas antes de la inducción de la artritis y el elemento de prueba o administración elemento de control en el estudio el día 0 y, posteriormente, en los días de estudio 3-8, 10 y 12 (terminación del estudio). Las reacciones artríticas se puntuaron y registraron de acuerdo con una escala de 0-4, en orden creciente de gravedad, como se muestra la Tabla 5 siguiente. También se midió el grosor de la pata utilizando un calibrador de línea (Kroeplin, Munich, Alemania).

Tabla 5. Puntuación clínica de la artritis

Puntuación de la artritis	Grado
Sin reacción, normal	0
Enrojecimiento leve, pero definitivo e hinchazón del tobillo/muñeca o aparente enrojecimiento e inflamación limitados a los dedos individuales, sin importar el número de dedos afectados	1
Enrojecimiento moderado a grave e inflamación del tobillo/muñeca	2
Enrojecimiento e hinchazón de toda la pata incluyendo los dedos	3
Extremidad con inflamación máxima y afectación de múltiples articulaciones	4

La dosis administrada se calculó basándose en la suposición de que los animales pesan, de promedio, 20 g. Una solución madre de dexametasona se preparó en etanol al 100 % y se diluyó a la concentración apropiada en PBS antes de su uso. El vehículo para el grupo de control del vehículo se preparó disolviendo 0,6 g de Pluronic y 0,6 g de PVP en 100 ml de agua desionizada destilada. La solución madre de MAb (10 mg/ml) fue suministrada por MD Biosciences, División de Morwell Diagnostics GmbH. El ILPS se diluyó con PBS para conseguir la concentración apropiada. Se requirió agitación intensa en vórtice justo antes de su inyección. El compuesto 2 se suministró como un polvo liofilizado de fármaco que contiene 70,71 % de compuesto 2 estando el resto formado por Pluronic F-68 y PVP K29/32. Un volumen fijo de 200 μ l se administró a cada ratón.

La evaluación se basó principalmente en los valores medios de la puntuación de la artritis y la medición de los grosores de la pata. En su caso, se aplicó el análisis de los datos por ANOVA con análisis post hoc de Tukey para determinar la significación de los efectos del tratamiento.

Las Figuras 3A y 3B muestran los resultados de los experimentos CAIA modelo de ratón. Los signos clínicos asociados con la administración de LPS desarrollados en todos los grupos después de un refuerzo con LPS el día 3. En comparación con los ratones tratados con vehículo, los ratones tratados con 7,5 mg/kg o 4 mg/kg del Compuesto 2 habían reducido significativamente las puntuaciones totales de la artritis los días 5-12 y 6-12, respectivamente. El tratamiento con dexametasona redujo significativamente la puntuación total de artritis en comparación con el grupo de vehículo los días 6-12. En comparación con los ratones tratados con vehículo, los ratones tratados con 7,5 mg/kg o 4 mg/kg del Compuesto 2 habían reducido significativamente las puntuaciones de la artritis en la pata trasera los días 5-12. El tratamiento con dexametasona redujo significativamente la puntuación de la artritis de la pata trasera en comparación con el grupo de vehículo en los días 5 y 12. No hubo diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos de artículos tratados del grupo de prueba y tratados con vehículo.

En vista de los hallazgos en el presente estudio, el compuesto 2 a 7,5 mg/kg o 4 mg/kg por vía oral liberados por vía oral exhibió actividad antiartrítica significativa en el modelo inducido por anticuerpos anticógeno de artritis reumatoide, con reducciones sostenidas en las puntuaciones medias de la artritis y reducciones en el espesor de la

pata.

Estudio de eficacia del Compuesto 2 en la artritis inducida por colágeno (CIA) en ratas de Lewis

- 5 Cuarenta (40) ratas hembra Lewis (BK), de 6 a 8 semanas, con un intervalo de peso corporal antes del tratamiento de 180 a 200 g se dividieron al azar en cuatro (4) grupos (Grupos A-D) de diez (10) ratas cada uno. Las ratas de los grupos B a D se inmunizaron por vía intradérmica con CII bovina en IFA en tres sitios cerca de la base de la cola y sobre la espalda con 500 µl de la emulsión en el día 0 (200 µl, 200 µl, 100 µl para cada sitio). El día 7, se administró a las ratas de los grupos B-D inyecciones de refuerzo con la misma cantidad de la emulsión por vía intradérmica cerca de los sitios de inyección antiguos. En el modelo de tratamiento terapéutico (Grupos C y D), se administró a las ratas con CIA dexametasona o Compuesto 2 por vía oral después de la aparición de la artritis, como se muestra en la Tabla 6. Las ratas se pesaron diariamente y se proporcionó descanso del fármaco a un animal cuando la pérdida de peso era de más del 13 %.

15 **Tabla 6. Grupos Iniciales del estudio**

Grupo	Inmunización	Tratamiento		Administración	n
A	No tratadas antes	PBS	vehículo	v.o. Todos los días, desde el inicio al día 28	10
B	Modelo	Col II en IFA	vehículo	v.o. Todos los días, desde el inicio al día 28	10
C	DEX (1MPK)	Col II en IFA	DEX (1MPK)	v.o. Todos los días, desde el inicio al día 28	10
D	Compuesto 2 (4MPK)	Col II en IFA	Compuesto 2 (4MPK)	v.o. Todos los días, desde el inicio al día 28	10

El desarrollo de la CIA se evaluó a través de puntuación macroscópica y mediciones de la inflamación de la pata. Esto se evaluó cada día durante los primeros 5 días después de la sensibilización (día 7) y después dos veces a la semana (lunes y jueves) durante el tiempo restante y el sistema de puntuación clínica para cada pata se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Puntuación clínica de la artritis

Puntuación de la artritis	Grado
No hay evidencia de eritema e inflamación	0
El eritema y la inflamación se limitó a la parte media del pie (tarsos) o a la articulación del tobillo	1
Eritema e inflamación leve que se extiende desde el tobillo hasta la parte media del pie	2
Eritema e inflamación moderadas que se extiende desde el tobillo hasta el metatarso	3
El eritema y la inflamación intensos abarcan los tobillos, los pies, y los dedos	4

El volumen de la pata se midió mediante pletismometría el mismo día de la medición de la artritis durante todo el periodo de estudio. La tasa de cubicación de cada pata trasera y el índice de inflamación se midieron usando la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de inflamación} = (C_N - C_0) / C_0 \times 100 \%$$

La Figura 4A es un gráfico de la inflamación articular frente al tiempo y muestra la inflamación articular medida en una escala de 0-4 en ratas no tratadas anteriormente y ratas tratadas de acuerdo con el modelo, con control positivo o con el Compuesto 2.

El CII bovino (en 10 mM de ácido acético) a 4 mg/ml se emulsionó con un volumen igual de IFA.

Se sumaron las puntuaciones clínicas para cada animal, y el promedio total de todos los animales de cada grupo se expresó como la puntuación media de artritis. La Figura 4B es un gráfico de las puntuaciones clínicas como una función del tiempo, y muestra las puntuaciones de artritis clínica en ratas no tratadas anteriormente y en ratas tratadas de acuerdo con el modelo, con control positivo, o con el Compuesto 2.

El día 28 del estudio, se sacrificó a tres representantes de cada grupo de tratamiento y las patas traseras se recogieron y se almacenaron en 4 % de formalina tamponada neutra. Las secciones preparadas de las patas traseras se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina (H & E).

El análisis histopatológico de los animales de control mostró la erosión del cartilago y la formación de pannus en línea con la evolución de la enfermedad. Sin embargo, en las ratas tratadas con el compuesto 2, se encontró

cartílago relativamente intacto en la superficie articular y la formación de pannus fue mínima. Los resultados del análisis histológico se muestran en La Figura 5.

Los datos de puntuación clínica, inflamación articular y de los análisis histológicos mostraron correlaciones. Los resultados también mostraron la eficacia terapéutica del compuesto 2 a 4 mg/kg (MPK), como se muestra por sus efectos en las puntuaciones clínicas, Inflamación articular y el examen histológico. Los resultados del modelo de CIA en ratas Lewis se representan en Las Figuras 4A y 4B, y La Figura 5.

Actividad antipsoriasis del Compuesto 2 en psoriasis inducida por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) en ratones Balb/c hembras.

Se usaron veinticuatro (24) ratones BALB/C hembra, con edades de entre 6 a 8 semanas con un peso corporal entre 22 y 30 g. Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro (4) grupos de ocho (8) ratones cada uno. El agrupamiento de los animales fue la siguiente: Grupo I (no tratados previamente, etanol), Grupo II (PMA; etanol), Grupo III (PMA; Compuesto 2 10 μ M) y Grupo IV (PMA; betametasona). Veinte (20) μ l de PMA (4 μ g/20 μ l de acetona) se aplicaron tópicamente sobre la superficie superior del pabellón auricular de la oreja de todos los animales en los Grupo II a IV. Se aplicó PMA diariamente en la oreja izquierda y en días alternos (L-M-V), en la oreja derecha desde el día 1 hasta el día 9. Treinta (30) minutos después de la aplicación de PMA, se aplicó vehículo o compuesto estándar (betametasona) o el compuesto 2 tópicamente en las orejas de los animales de los diferentes grupos. Cabe destacar que el vehículo, el compuesto estándar y el Compuesto 2 se aplicaron diariamente en ambas orejas de los diferentes animales desde el día 1 al día 12.

Los animales se observaron diariamente durante un periodo de 12 días para detectar síntomas relacionados con el tratamiento. El grosor basal de la oreja se registró en todos los animales (antes de la aplicación de PMA) con un dispositivo digital de tornillo a tiempo T0 (Día 1). Por toda la duración del estudio, 4 horas después de la aplicación de vehículo, compuesto estándar o el Compuesto 2, se midió el grosor de las orejas diariamente usando un calibrador digital de tornillo y se registraron las puntuaciones de eritema, descamación y plegado. La gravedad del daño en el pabellón auricular de la oreja se evaluó mediante los sistemas de puntuación que se muestran en la Tabla 8

Tabla 8. Puntuaciones de psoriasis

Parámetro/Puntuación	0	1	2	3
Eritema	Normal	Leve	Moderado	Grave
Descamación				
Plegado				

Se suministro a los animales pienso en pastillas esterilizado y nutricionalmente equilibrado (Lite Sciences NUTRIVET, Pune (India)) *ad libitum* y tenían acceso a agua potable normal durante los periodos experimentales.

Se usaron 100 % de DMSO (de calidad LR) y etanol (de calidad LR) disponibles comercialmente para preparar las formulaciones. El PMA se preparó disolviendo 10 mg de PMA en 50,0 ml de acetona. El compuesto 2 se preparó disolviendo 1,47 mg de Compuesto 2 en 300 μ l de 100 % de DMSO.

Los resultados experimentales se expresaron en Las Figuras 6A-6D como la media $\pm$ SEM. No hubo diferencias significativas entre todos los grupos de tratamiento en el peso corporal, el consumo de alimentos y agua. La aplicación de PMA mostró, (i) el grosor de la oreja izquierda, así como de la oreja derecha aumentó (Grupo II frente a no tratadas) y (ii) el índice de actividad de la enfermedad (IAE) de la oreja izquierda, así como de la oreja derecha aumentó (Grupo II frente a no tratadas). Es importante destacar que la aplicación tópica del compuesto 2 condujo a una reducción importante en los aumentos inducidos por PMA en (i) el grosor de la oreja izquierda y de la oreja derecha, y (ii) el IAE de la oreja izquierda y de la derecha. Este efecto fue prominente los días 6-8 del estudio, cuando en más animales tratados con el Compuesto 2 se había reducido el grosor de la oreja izquierda/derecha (en comparación con los animales del grupo II), y el IAE (en comparación con los animales del Grupo II). Es de destacar que la reducción mediada por el Compuesto 2 de los aumentos inducidos por PMA del grosor de la oreja izquierda/derecha y del IAE disminuyó, a medida que el estudio avanzaba (Día 10 y posteriores).

En un modelo de psoriasis inducida por PMA en ratones, el Compuesto 2 mostró la actividad antipsoriásica estadísticamente significativa.

Actividad antipsoriasis del compuesto 2 en el modelo de psoriasis/inflamación dérmica inducida por imiquimod (IMQ) (ESTUDIO 1)

Se usaron cuarenta (40) ratones macho BALB/c de 6 a 8 semanas con un peso corporal pretratamiento de 22 a 30 g. Los ratones BALB/c fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro (4) grupos de diez (10) ratones cada uno. Un área pequeña (aproximadamente 2 x 2 cm²) de la piel del dorso de todos los animales se afeitó cuidadosamente. Los animales del Grupo I sirvieron como animales no tratados previamente. Se indujo psoriasis en los Grupos II a IV

[Grupo II (IMQ; vehículo), Grupo III (IMQ; Compuesto 2 (1 µM)) y el Grupo IV (IMQ; ciclofosfamida (10 mg/kg)) mediante la aplicación tópica de 31,25 mg de crema de IMQ diariamente en el dorso de los animales desde el día 1 al día 13. Cuatro horas después de la aplicación de IMQ, se administró vehículo o compuesto estándar (ciclofosfamida) o compuesto 2 (vía tópica – 30 µl; por vía oral - de acuerdo con el peso corporal) al grupo apropiado desde el día 1 al día 13 al día. Dos horas después de la administración de vehículo o compuesto estándar o el Compuesto 2, se registraron la presencia de eritema, descamación, plegamiento y engrosamiento de la piel para determinar el índice de actividad de la enfermedad (IAE).

Los animales se observaron diariamente durante un periodo de 13 días para detectar síntomas relacionados con el tratamiento. Las observaciones diarias incluyen el peso corporal, consumo de alimento, engrosamiento de la piel, descamación, plegamiento, eritema, secreción nasal, movimiento, respiración, pelaje, abdomen distendido, condición de la piel, piel, membrana mucosa, presencia o ausencia de secreciones, condición de los ojos, elevación de la cola, actividad motora, postura y marcha. La gravedad del daño en la porción dorsal de la piel se evaluó mediante la asignación al eritema, la descamación, el plegado y el engrosamiento de la piel de puntuaciones basadas en las observaciones externas de la piel, de acuerdo con la rúbrica en la Tabla 9.

Tabla 9. Puntuaciones de psoriasis

Parámetro/Puntuación	0	1	2	3
Eritema	Normal	Leve	Moderado	Grave
Descamación				
Plegado				
Engrosamiento de la piel				

Se usaron 100 % de DMSO (de calidad LR) y etanol (de calidad LR), ciclofosfamida (CMC), PVP y Pluronic disponibles comercialmente para preparar las formulaciones. El Compuesto 2 se preparó disolviendo 1,47 mg de Compuesto 2 en 300 µl de 100 % de DMSO. La ciclofosfamida se preparó disolviendo 500 mg de CMC en 100 ml de agua destilada.

Los resultados mostrados en Las Figuras 7A y 7B se expresan como la media ± SEM.

No hubo diferencias significativas en el peso corporal, el consumo de alimentos y la ingesta de agua en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control durante el estudio. El compuesto 2 disminuyó manifestación de la enfermedad inducida por IMQ.

El compuesto 2 muestra actividad antipsoriásica, como se evidencia por la reducción en el índice de actividad de la enfermedad en comparación con el grupo tratado con vehículo. Además, el compuesto 2 causó este efecto sin afectar negativamente el peso corporal, la ingesta de alimentos y agua.

Actividad antipsoriasis del compuesto 2 en el modelo de psoriasis/inflamación dérmica inducida por imiquimod (IMQ) (ESTUDIO 2)

Cuarenta (40) ratones macho BALB/c (Biological E Limited, Hyderabad (número de registro CPCSEA: 36/99/CPCSEA)) se dividieron en cuatro (4) grupos compuestos por diez (10) ratones cada uno. Los animales fueron aleatorizados en función de su peso corporal. Los grupos fueron designados como Grupo-I (no tratados previamente), Grupo-II (IMQ; vehículo (PEG 400 y HPBCD)), Grupo-III (IMQ; Compuesto 2 (2,5 mg/kg)) y Grupo-IX (IMQ; ciclofosfamida (10 mg/kg)).

Un área pequeña en el dorso de cada ratón se afeitó, asegurándose de que estas áreas eran de igual tamaño/área. Se indujo psoriasis en los Grupos II a IV mediante la aplicación tópica de 50 mg de crema de IMQ diariamente desde el día 1 al día 6 en el dorso de los animales. El Día 1 y el Día 2 del estudio, cuatro horas después de la aplicación tópica de IMQ, se administró a los animales el Compuesto 2 o control positivo (ciclofosfamida) o vehículo en los grupos pertinentes. Es de destacar que los animales del Grupo II y Grupo III se sometieron a inyecciones subcutáneas, mientras que los animales del grupo IV recibieron la administración oral. El tratamiento con el compuesto 2, vehículo y ciclofosfamida se terminó en el día 2. Estos grupos de animales se mantuvieron en tratamientos diarios con IMQ hasta el día 6. El día 7, los animales con psoriasis inducida se volvieron a aleatorizar a 3 grupos constituidos por 10 animales cada uno en función del índice acumulado de actividad de la enfermedad (IAR). Desde el día 7 al día 9, los animales recibieron vehículo o control positivo o Compuesto 2. Es de destacar que en estos días los animales no fueron tratados con IMQ. Desde el Día 10 al Día 14, los animales fueron tratados alternativamente con IMQ (Días 10, 12 y 14), o vehículo, control positivo o Compuesto 2 (Días 11, 13).

Todos los animales se observaron diariamente durante un periodo de 16 días para las observaciones macroscópicas, el peso corporal y la alimentación y la ingesta de agua. Los días 1 y 2, se registraron las puntuaciones de eritema, descamación, plegado y engrosamiento de la piel 2 horas después de la administración de

compuestos vehículo/control positivo/de ensayo y en los días 3 a 14 se registraron puntuaciones 4 horas después de la aplicación de IMQ, o la administración de control positivo, el vehículo o el Compuesto 2. La gravedad de la inducción en el dorso de los animales se evaluó y se obtuvo como se muestra en la Tabla 10.

- 5 El vehículo se preparó disolviendo 40 mg de HPBCD en 70.0 ml de agua destilada. El compuesto 2 se preparó disolviendo 3,59 mg en 0,5 % de PVP y 0,5 % de Pluronic. La ciclofosfamida se preparó disolviendo 500 mg de CMC en 100 ml de agua destilada.

- 10 Los resultados experimentales mostrados en la Tabla 10 se expresan como la media $\pm$ SEM. Los datos se evaluaron mediante ANOVA de una vía y se realizó un análisis post-hoc mediante la prueba de Dunnett.

Tabla 10. Tasa de reducción del Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE)
Tasa de reducción del IAE

15	Lecturas preadministración de IMQ/fármaco										
			%cambio desde la 1ª dosis (es decir desde las lecturas preadministración de IMQ/fármaco el día 7)								
			Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15
20	Sin tto. previo, vehículo		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	IMQ, vehículo		0,0	0,0	4,2	-33,3	-66,7	-54,2	-45,8	-43,8	-43,8
	IMQ, Compuesto 2		0,0	-33,8	-58,8	-88,2	-73,5	-80,9	-61,8	-66,2	-64,7
	IMQ, ciclofosfamida		0,0	16,3	-39,5	-79,1	-25,6	-39,5	-25,6	-34,9	-41,9
25	4 h tras las lecturas de administración de IMQ/fármaco										
			%cambio desde la 1ª dosis (es decir desde las lecturas preadministración de IMQ/fármaco el día 7)								
			Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	
30	Sin tto. previo, vehículo		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	IMQ, vehículo		4,2	8,3	-35,4	-70,8	-58,3	-52,1	-39,6	-41,7	
	IMQ, Compuesto 2		-30,9	-35,3	-63,2	-88,2	-70,6	-73,5	-60,3	-63,2	
	IMQ, ciclofosfamida		23,3	20,9	-41,9	-86,0	-25,6	-34,9	-32,6	-32,6	
35											

- Se observó que la tasa de reducción del índice de actividad de la enfermedad en los animales tratados con el Compuesto 2 fue significativamente mayor que la observada en animales tratados con vehículo. No hubo diferencias significativas en el peso corporal, el consumo de alimentos y la ingesta de agua en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control durante el estudio.

- Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con el Compuesto 2 disminuye la manifestación de la enfermedad inducida por IMQ sin afectar en gran medida el consumo de alimentos o agua, y por lo tanto no muestra ningún efecto sobre el peso corporal de los animales en los grupos tratados.

45 *Efecto del compuesto 2 en ratas Zucker*

- Veintiún (21) ratas Zucker de sexo masculino de 7 meses de edad fueron asignados en 3 grupos de N = 7 en base al peso corporal y la ingesta de alimentos equivalentes. Un grupo adicional de N = 7 controles delgados de edad equivalente se incluyeron como control. Los pesos corporales y la ingesta de alimentos y agua se midieron aproximadamente a la misma hora todos los días (14: 30-15: 30h). Los días de tratamiento, la dosificación era a las 14: 30-15: 30h (aproximadamente 2 horas antes de apagar las luces).

- Los controles obesos y delgados de Zucker fueron tratados oralmente con vehículo (10 ml/kg de volumen de dosis; 0,5 % de Pluronic F68 y el 0,5 % de PVP K29/32 en agua) en cada día de la semana. Ambos grupos tratados con el compuesto 2 (1,5 mg/kg y 3 mg/kg) se trataron por vía oral en cada día de la semana (volumen 10 ml/kg dosis; 0,5 % de Pluronic F68 y 0,5 % de PVP K29/32 en agua). Antes de la fase de tratamiento, se recogieron 4 días datos de referencia. La fase de tratamiento fue de 16 días y también se incluyó una fase de lavado de 6 días.

- Las Figuras 8A y 8B y La Figura 9 muestran los efectos del Compuesto 2 en ratas Zucker. Al inicio del estudio, no hubo diferencia significativa en el peso corporal y la ingesta diaria de alimentos entre los 3 grupos de ratas Zucker obesas. Sin embargo, todos los grupos fueron significativamente diferentes del grupo de ratas delgadas Zucker.

- El Compuesto 2 (1,5-3 mg/kg oral) produjo una disminución relacionada con la dosis en la ingesta diaria de alimentos y el peso corporal durante el periodo de tratamiento de 16 días en comparación con el grupo de control Zucker. El tratamiento con el Compuesto 2 también aumentó significativamente el consumo de agua medido en el

mismo periodo. Hubo una diferencia significativa en la ganancia de peso corporal entre el grupo de 3 mg/kg de Compuesto 2 y el grupo Zucker de vehículo. No hubo diferencias significativas en la ganancia de peso corporal entre el grupo de 1,5 mg/kg de Compuesto 2 y el grupo Zucker de vehículo.

- 5 El Compuesto 2 mostró una disminución dependiente de la dosis en el efecto del consumo diario de alimentos siendo más eficaz la dosis más alta (3 mg/kg) que la dosis de 1,5 mg/kg. Además, el grupo tratado con el compuesto 2 a 3 mg/kg mostró menor ganancia de peso en comparación con el grupo de control Zucker.

Efecto del Compuesto 2 en el modelo de obesidad inducida por dieta

- 10 A ratas macho Sprague-Dawley de 2 meses de edad se administró una dieta rica en grasas (Research Diets Inc., código de producto D12492, 60 % kcal % de grasas) durante 3 meses. Un grupo de ratas de la misma edad fueron alimentados con comida de laboratorio normal (LabDiet 5001, ~ 13 % kcal % de grasa), estos animales sirvieron como controles para el grupo de OID.

- 15 A la edad de 4 meses y 2 meses después administración de la dieta rica en grasa, todas las ratas fueron asignadas a 3 grupos de N = 7 según el peso corporal y la ingesta de alimentos equivalentes. Los pesos corporales y la ingesta de alimentos y agua se midieron aproximadamente a la misma hora todos los días. Los días de tratamiento, la dosificación se produjo aproximadamente 2 horas antes de apagar las luces.

- 20 El grupo control de OID se trató con vehículo (oral, 10 ml/kg de volumen de dosis; 0,5 % de Pluronic F68 y el 0,5 % de PVP K29/32 en agua) en cada día de la semana. El grupo de tratamiento con 1,5 mg/kg de compuesto 2 se trató por vía oral en cada día de la semana a lo largo de la fase de tratamiento (volumen de dosis de dosis de 10 ml/kg; 0,5 % de Pluronic F68 y 0,5 % de PVP K29/32 en agua). El grupo tratado con 3 mg/kg del compuesto 2 (volumen dosis 10 ml/kg; 0,5 % de Pluronic F68 y 0,5 % de PVP K29/32 en agua) se trató por vía oral una vez al día inicialmente cada día de la semana para la semana 1, a continuación, dos veces por semana (lunes, miércoles) para la semana 2. Durante las semanas de tratamiento 3 y 4, el compuesto 2 de 3 mg/kg continuó tratamiento dos veces por semana, a excepción de que la dosificación se produjo el lunes y el jueves.

- 30 Antes de la fase de tratamiento, se recogieron 3 días datos de referencia. La fase de tratamiento fue de 4 semanas. También se incluyó una fase de lavado de 10 días.

- 35 El Compuesto 2 se suministró en forma de polvo. El compuesto de ensayo tenía un porcentaje activo de 65,89 %. El porcentaje activo se ajustó utilizando BEW de 1.437 y se preparó disolviendo en 0,5 % p/v de Pluronic F-68 y 0,5 % p/v de solución PVP de vehículo K-29-32. La solución de vehículo se preparó sobre una base semanal, mientras que el compuesto 2 se preparó fresco cada 2 días y se almacenó a + 4 °C. Se administró a los animales un volumen de 10 ml/kg. Las dosis individuales se calcularon basándose en el peso corporal más reciente para proporcionar la dosis de mg/kg/día adecuada.

- 40 Las Figuras 10A y 10B y La Figura 11 muestra los efectos del Compuesto 2 en el modelo de obesidad inducida por dieta. Al inicio del estudio, no hubo diferencia significativa en el peso corporal y la ingesta diaria de alimentos y agua entre los 3 grupos de OID. Sin embargo, todos los grupos de OID eran significativamente diferentes del grupo de dieta regular. Específicamente, los animales alimentados con la dieta regular tenían un peso corporal significativamente más bajo en relación con las ratas alimentadas con la dieta alta en grasas. Por el contrario, las ratas alimentadas con la dieta rica en grasas consumieron significativamente menos comida y agua al en relación con las ratas alimentadas con la dieta regular.

- 50 El compuesto 2 (1,5-3 mg/kg oral) produjo una disminución relacionada con la dosis en la ingesta diaria de alimentos y el peso corporal durante el periodo de tratamiento de 28 días en comparación con el grupo de control de OID. El tratamiento con el Compuesto 2 también aumentó significativamente el consumo de agua medido en el mismo periodo ($F_{3,27} = 11,2$, $P < 0,01$).

- 55 En términos del efecto del tratamiento sobre la ganancia de peso corporal, este se midió formalmente como EL porcentaje de cambio de peso corporal desde el día 3 del estudio. Hubo una reducción significativa en el aumento de peso en ambos grupos de Compuesto 2 en comparación con los controles de OID en los días de tratamiento 7 (DÍA DE estudio 10) y 14 (día de estudio 17).

- 60 Se midieron el peso corporal, la ingesta de comida/agua al día durante la fase de lavado. La ingesta de alimentos en el compuesto 2 grupos fue similar a la de los controles con OID. El peso corporal en los grupos tratados con el compuesto 2 permaneció menor que en los controles con OID.

El Compuesto 2 disminuye la ingesta diaria de alimentos de una manera dependiente de la dosis. Compuesto 2 también afecta a la ganancia de peso corporal a dosis de 1,5 y 3 mg/kg.

- 65 *Inducción del Compuesto 1 de la vía anti-inflamatoria Nrf2*

Se usaron células THP-1 (células de leucemia monocítica aguda humana para evaluar los efectos del Compuesto 1 sobre la vía Nrf2 en un entorno inflamación. El factor nuclear (derivado de eritroide 2) de tipo 2 (Nrf2) es un factor de transcripción antiinflamatorio. En condiciones normales, Nrf2 se mantiene en el citoplasma mediante la proteína asociada a ECH de tipo Kelch 1 (KEAP1), que degrada Nrf2 por ubiquitinación. Nrf2 también puede moverse en el núcleo y de nuevo al citoplasma de nuevo como CRM1 de carga. En el estudio actual, Nrf2 estaba protegido de la degradación por atenuación génica por KEAP1 con ARN. Luego, las células KEAP1 deplecionadas se trataron con TNF α para inducir la inflamación, y la capacidad del Compuesto 1 para revertir la inflamación mediante la regulación por aumento de la vía de Nrf2 se puso a prueba. Para demostrar la activación de la vía de Nrf2, la expresión de dos de sus genes aguas abajo NAD (P) H deshidrogenasa [quinona] 1 (NQO1) y epóxido hidrolasa 1 (EPHX1) se cuantificaron mediante PCR cuantitativa.

Se sembraron células THP-1 (leucemia monocítica aguda) se sembraron en dos placas de cultivo de 10 cm (6 * 10⁶ células/placa) con medio RPMI-1640 (Lonza) suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen) y 2-mercaptoetanol a una concentración final de 0,05 mM. Las células en un plato se transfectaron con 50 nM de Siria KEAP1 (Life Technologies, Silenciador Select, si ARN ID n.º s18982) usando Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen), mientras que las células en el otro plato fueron transfectadas con 50 nM de ARNsi de control, Block-iT (Invitrogen). Las células transfectadas se dejaron durante 72 h y la eficiencia de atenuación génica de KEAP1 se calculó con PCR cuantitativa utilizando una sonda contra KEAP1.

A continuación, las células de cada uno de los platos fueron divididos igualmente en 4 pocillos en diferentes placas de 6 pocillos. Uno de los pocillos de cada una de las placas se pre-trataron con 1 μ M del Compuesto 1 durante 1 h, seguido de 20 ng/ml TNF α durante 24 horas. Los otros pocillos se trataron con 1 μ M Compuesto 1 o 20 ng/ml de TNF α o ninguno durante 24 horas. Después del tratamiento, se extrajo el ARN de las células usando un kit de extracción de ARN (Qiagen). Las muestras de ARN de cada grupo de tratamiento se sometieron a transcripción inversa y se realizó PCR en tiempo real con las secuencias de ADNc correspondientes utilizando sondas contra Nrf2 y dos de sus genes aguas abajo, NQO1 y EPHX1. Las células THP-1 se transfectaron con ARNsi de KEAP1. Se alcanzó 40 % de eficiencia de atenuación génica. Las células KEAP1 de atenuación génica se trataron con 1 μ M del Compuesto 1 o 20 ng/ml de TNF α o con ambos juntos durante 24 horas.

La Figura 12A muestra un aumento de 2,5 veces en la expresión Nrf2 en las células tratadas con una combinación de TNF α y el Compuesto 1 en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, también se encontró un incremento similar (hasta de 3 veces) de los niveles de ARNm de Nrf2 en las células tratadas con el Compuesto 1 y TNF α sin la atenuación génica de KEAP1. Compuesto 1 o el TNF α solos no tuvieron ningún efecto significativo sobre la expresión de Nrf2 con o sin atenuación génica de KEAP1.

La Figura 12B muestra la expresión de NAD (P)H deshidrogenasa [quinona]1 o NQO1 en células con o sin atenuación génica de KEAP1. La Figura 12B muestra que la atenuación génica de KEAP1 tuvo un efecto sobre la expresión de NQO1. Incluso muestra sin ningún tipo de tratamiento mostró un aumento de 2 veces en sus niveles de ARNm sobre la atenuación génica de KEAP1. La combinación del Compuesto 1 y TNF α dio como resultado un aumento de 4 veces en la expresión de NQO1 para la muestra de atenuación génica de KEAP1 en comparación con un aumento de 2 veces, visto con la misma combinación en las células sin atenuación génica de KEAP1.

La Figura 12C muestra los niveles de ARNm de la epóxido hidrolasa 1 o EPHX1 en células con o sin atenuación génica de KEAP1 después del tratamiento con el Compuesto 1 y/o TNF α . La Figura 12C muestra que el Compuesto 1 regulaba por aumento la expresión de EPHX1 en presencia o ausencia de TNF α . La atenuación génica de KEAP1 se añadió al efecto del Compuesto 1, ya que se observó inducción de hasta 2,5 veces en las muestras con el Compuesto 1 y atenuación génica de KEAP1.

El tratamiento con el Compuesto 1 1 μ M durante 24 horas en presencia de 20 ng/ml de TNF α reguló por aumento la señalización de Nrf2. La atenuación génica de KEAP1 potenció este efecto, como se ve con una inducción mayor de NQO1 (4 frente a 2 veces) y EPHX1 (2,5 frente a 1,5 veces) en relación con sus niveles de expresión sin la atenuación génica de KEAP1. Los resultados muestran que la inhibición de CRM1 puede activar la vía de Nrf2 durante la inflamación, y sugiere que el tratamiento con el compuesto 1 en combinación con inhibidores KEAP1 podría ser más eficaz que el tratamiento con el Compuesto 1 solo.

Efectos de los compuestos 1, 2, y 12 sobre la actividad transcripcional de NF-kB

El TNF α puede inducir la actividad de transcripción de NF-kB. Esta actividad de transcripción se inicia cuando I κ B, que se une a NF κ B e inhibe su actividad, se degrada. Después, un miembro de la familia de clase II de la proteína NF-kB, RelA o p65, que forma un heterodímero con un miembro de la familia de clase I, p50, entra en el núcleo. La subunidad p65 tiene un dominio de transactivación en su C terminal, que activa la transcripción de genes relacionados con la inflamación. Como NF-kB, I κ B también puede entrar en el núcleo de la célula. La acumulación nuclear de I κ B protege a la proteína de la degradación, ya que la degradación se produce principalmente en el citoplasma. La CRM1 es responsable de la exportación nuclear de I κ B. Por lo tanto, el bloqueo de la exportación nuclear de I κ B a través de la inhibición de CRM1 minimiza la actividad de NF-kB, ya que I κ B nuclear se une al NF-kappa B y evita la unión de NF-kB a las secuencias de ADN.

Los compuestos se ensayaron en células HeLa (adenocarcinoma) para cuantificar su capacidad para inhibir la actividad transcripcional de NF- κ B. La actividad de NF- κ B se indujo en las células HeLa mediante TNF α y después se añadieron los compuestos para inhibir la actividad de NF- κ B inducida. Las concentraciones inhibitorias semimáximas (CI₅₀) de varios compuestos, a saber, el Compuesto 1, Compuesto 2 y el Compuesto 12, se determinaron mediante estudios de respuesta a la dosis.

Las células HeLa se sembraron en una placa de 12 pocillos (200.000 células/pocillo) y se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) de Lonza suplementado con 10 % de suero bovino fetal bovino inactivado con calor (Invitrogen) y 50 μ g/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), y se dejó durante la noche para que se produjera la unión. Las células se pre-trataron con compuestos diluidos en serie (comenzando a 30 μ M; dilución 1: 3) durante 1 hora y luego expuestos a 20 ng/ml de TNF α (Peprotech) durante 4 horas en medio libre de suero. Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Invitrogen), y se lisaron con tampón RIPA (Thermo Scientific). La actividad de transcripción de NF- κ B en las células se midió mediante el kit de ensayo quimioluminiscente con el de Transcripción (Thermo Scientific Catálogo n.º 89859), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1,5 mg/ml de extracto de células enteras lisado con RIPA de cada tratamiento se incubaron en una placa de 96 pocillos unidos a la secuencia consenso de NF- κ B biotinilado. El factor activo de transcripción NF- κ B unido a la secuencia de consenso se incubó con el anticuerpo primario NF- κ B p65 y luego con un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Un sustrato quimioluminiscente se añadió a los pocillos y la señal resultante se detectó usando un luminómetro. Se analizaron tres experimentos separados para cada concentración de las curvas de CI₅₀. Se usó el modelo XLFit 205 para calcular las curvas de CI₅₀.

La inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B se midió mediante diluciones en serie del Compuesto 1, Compuesto 2 y el Compuesto 12 después de 1 hora de pretratamiento con compuesto seguido de 4 horas de 20 ng/ml de exposición a TNF α . Tres experimentos independientes se puntuaron para cada concentración, presentándose el promedio en el presente documento. El compuesto 1 tenía un valor de CI₅₀ de 1,59 μ M, el compuesto 2 un valor de CI₅₀ de 1,22 μ M, y el Compuesto 12 un valor de CI₅₀ de 1,46 μ M.

Evaluación de los efectos del Compuesto 1 sobre la expresión de la proteína proinflamatoria, la COX-2, en células HeLa cultivadas in vitro

Las células HeLa se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos (2,5x10⁵ células/pocillo) con medio EMEM (Lonza) suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen). Dos de los pocillos de la placa se trataron previamente con el Compuesto 1 10 μ M durante 30 minutos, momento en el cual uno de los pocillos se expuso a 20 ng/ml TNF α (Peprotech) durante 1 hora. Los otros pocillos se trataron con 20 ng/ml TNF α o nada durante 1 hora. Después del tratamiento, se extrajo el ARN de las células usando un kit de extracción de ARN (Qiagen). Las muestras de ARN de cada grupo de tratamiento se sometieron a transcripción inversa y se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (qRT) con las secuencias de ADNc correspondientes utilizando sondas contra la COX-2 (Life Technologies).

Las células HeLa se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos (5x10⁵ células/pocillo) con medio EMEM (Lonza) suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen). Dos de los pocillos de la placa se trataron previamente con el Compuesto 1 1 μ M durante 30 minutos, momento en el cual uno de los pocillos se expuso a 20 ng/ml TNF α (Peprotech) durante 24 horas. Los otros pocillos se trataron con 20 ng/ml TNF α o nada durante 24 horas. Después del tratamiento, los lisados de células enteras se generaron a partir de las células mediante lisis con tampón RIPA suplementado con inhibidores de la proteasa y fosfatasa (Roche). La detección por inmunotransferencia de la proteína COX-2 se realizó utilizando un anticuerpo anti-COX-2 (Cayman). La intensidad de la señal para la proteína COX-2 se normalizó con la de la beta-actina (Santa Cruz) para cada muestra y se representó gráficamente como unidades arbitrarias de intensidad.

Los datos del análisis de ARNm mediante QRT-PCR se muestra en La Figura 13A. Después de 1 hora de tratamiento, el TNF α indujo un aumento de aproximadamente 8 veces en la expresión del ARNm de COX-2 en comparación con el control, mientras que el Compuesto 1 solo no tuvo ningún efecto sobre el nivel de expresión de la COX-2. Compuesto 1 no fue la causa del aumento del ARNm de COX-2.

Los datos del análisis de proteínas por inmunotransferencia se muestran en La Figura 13B. Las células HeLa se dejaron sin tratar, se trataron con 20 ng/ml TNF α o Compuesto 1 1 μ M o con 20 ng/ml TNF α y Compuesto 1 1 μ M durante 24 horas, después se evaluó para la cantidad de COX-2 proteína presente por detección de inmunotransferencia. La proteína COX-2 se incrementó en 24 horas en las células estimuladas con TNF α en comparación con el control sin tratar y las células tratadas con el Compuesto 1, mientras que el compuesto 1 disminuyó la cantidad de proteína COX-2 en presencia de TNF α . La intensidad de las señales de inmunotransferencia para la proteína COX-2 se normalizaron a la de la β -actina para cada muestra y representa gráficamente.

El compuesto 1 no afecta a la expresión inducida por TNF α de la COX-2, pero reduce la cantidad de TNF α inducida por la expresión de la proteína COX-2.

El compuesto 1 localiza cargas de CRM1 relacionadas con la inflamación en el núcleo.

Las células HeLa y THP-1 (leucemia monocítica aguda humana) se trataron con el factor inductor de la inflamación, TNF α , solo o en combinación con 1-10 μ M del Compuesto 1 durante 4-24 h, y luego se analizaron por inmunofluorescencia (IF) para la localización nuclear de las proteínas de carga CRM1 relacionados con la inflamación: I κ B, Nrf2, HMGB1, FoxP3, FOXO1a, RxR α , PPAR γ y NF κ B (subunidad p65).

Para la detección de I κ B, Nrf2, RXR α y PPAR γ , las células se pre-incubaron con 10 μ M del Compuesto 1 durante 30 minutos, seguido de incubación con 20 ng/ml de TNF α durante 4 horas en medio libre de suero. Para la detección de HMGB1, FoxP3 y FOXO1A, las células se pre-incubaron con 1 μ M de Compuesto 1 durante 2 horas, seguido de incubación con 20 ng/ml TNF α durante 24 horas. Para la detección de NF κ B, las células se pre-incubaron con 1 μ M de Compuesto 1 durante 2 horas, seguido de incubación con 20 ng/ml TNF α durante 24 horas. Las células se fijaron ya sea con metanol al 100 % helado (MeOH) y bloquearon/permeabilizaron con 0,1 % de Tween 20, glicina 0,3 M y 1 % de BSA en PBS, se fijaron con PFA o (3 % de paraformaldehído y 2 % de sacarosa en PBS) permeabilizaron y/bloquearon con 0,1 % de Triton-X100 y 1 % de BSA en PBS. I κ B se detectó con el anticuerpo monoclonal primario de conejo (E130) de Abcam (ab32518); Nrf2 detectó con el anticuerpo policlonal de conejo primaria de Santa Cruz (sc722); RxR alfa detectó mediante el anticuerpo policlonal de conejo primario de Santa Cruz (sc553); PPAR gamma detectó con el anticuerpo monoclonal de conejo primario [E130] de anticuerpos de Señalización Celular (n.º 2443); FOXO1A detectó con el anticuerpo monoclonal de conejo primario [C29H4] anticuerpos de Señalización Celular (n.º 2880); HMGB1 detectó con el anticuerpo de conejo policlonal primaria de Abcam (ab18256); FoxP3 detectó con el anticuerpo policlonal de conejo primaria de Abcam (ab10563); NF κ B-p65 se detectó mediante el anticuerpo monoclonal de conejo primario [C22B4] anticuerpos de Señalización Celular (n.º 4764). El anticuerpo secundario de conejo, Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11008) se utilizó para toda la tinción. Las imágenes se tomaron de 20 aumentos.

El bloqueo de las cargas CRM1 relacionadas con la inflamación en el núcleo tiene efectos adversos sobre la inflamación y, por lo tanto, los ensayos IF pueden servir como biomarcadores para los efectos anti-inflamatorios de los inhibidores de CRM1.

I κ B es el inhibidor de NF κ B que induce la expresión de las vías proinflamatorias. Dado que la mayoría de la degradación de I κ B se produce en el citoplasma, su localización nuclear protege a I κ B de la degradación y le permite unirse a NF κ B nuclear, bloqueando la actividad pro-inflamación de NF κ B. Nrf2 es un factor de transcripción de cremallera de leucina que induce en el núcleo de la expresión de la actividad antiinflamatoria. HMGB1 es el factor 1 del grupo de alta motilidad, y por lo general está fuertemente unido a la cromatina. Tras la secreción activa o la liberación pasiva de las células dañadas, HMGB1 funciona como una citoquina e induce la respuesta pro-inflamatoria. El bloqueo de HMGB1 en el núcleo impide que sus efectos pro-inflamatorios. FoxP3, la caja P3 forkhead, funciona como un factor de transcripción principal en el desarrollo y función de las células T reguladoras que poseen actividad inmunosupresora. FOXO1a es un factor de transcripción capaz de inducir genes antiinflamatorios, tales como la angiopoyetina-2. Por lo tanto, la localización nuclear protege a FOXO1a de la fosforilación, la exclusión nuclear y la degradación subsiguiente. RxR α es un receptor nuclear retinoide que regula la expresión de quimiocinas tales como Ccl6 y Ccl9 en los macrófagos. RxR α es esencial para el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación. El atrapamiento nuclear de RxR α se traduce en el reclutamiento y el agotamiento de co-activadores de la transcripción que, de otra manera, sirven para unir los factores de transcripción proinflamatorios tales como NF κ B. PPAR γ es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, y regula la expresión de genes antiinflamatorios.

Los resultados, mostrados en Las Figuras 14A y 14B, demuestran la localización nuclear de las cargas anteriores, incluso en presencia de TNF α , que se sabe que induce inflamación. Los resultados indican la capacidad del Compuesto 1 para inducir vías anti-inflamación para superar la inflamación.

Evaluación del efecto del Compuesto 1 sobre los déficits cognitivos después de una lesión en ratas BCCI

Se indujo la lesión por impacto cortical controlado bilateral (BCCI) de la corteza frontal medial (MFC) de ratas macho Sprague Dawley mediante un dispositivo de contusión cortical. Después de controlar cualquier hemorragia en la superficie cortical CCI se suturaron la fascia y el cuero cabelludo. Se anestesió a las ratas operadas de forma simulada, se montaron en el aparato estereotáxico y se realizó una craneotomía.

La progesterona 16 mg/ml se disolvió en 22,5 % de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina y se administró la inyección inicial (16 mg/kg) i.p.1 hora después de la lesión. Las restantes inyecciones (todas 16 mg/kg) se administraron por vía subcutánea a las 6 horas de la lesión y continuaron durante 5 días después de la lesión. Las inyecciones de progesterona se realizaron una concentración de 1 ml/kg. La progesterona se utilizó como control.

El compuesto 1 a 0,2, 0,4, y 0,6 mg/ml se suspendió en vehículo (0,6 % p/v Pluronic® F-68 y 0,6 % w/v PVP K-29/32 en agua) y se administró por vía oral a una concentración de 10 ml/kg, 16 horas antes de la lesión y 2 horas después de la lesión y las administraciones continuaron durante 4 días. Las ratas control recibieron inyecciones equivalentes

del vehículo para el Compuesto 1, en los mismos puntos de tiempo. Los grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Grupos de tratamiento

Grupo	Número de animales	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	8	Vehículo + simulado	NND	v.o.	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días
2	8	Vehículo + BCCI	NND	v.o.	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días
3	8	Progesterona	16 mg/kg	i.p.+s.c.	1 h después de la lesión, [i.p.] 6 h después de la lesión y continuó durante 5 días después de la lesión [s.c.]
4	8	Compuesto 1	2 mg/kg	v.o.	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días
5	8	Compuesto 1	4 mg/kg	v.o.	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días
6	8	Compuesto 1	6 mg/kg	v.o.	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días

La prueba de laberinto acuático de Morris (MWM) es una tarea de navegación espacial que mide el aprendizaje y la memoria en roedores utilizando señales visuales. Los sujetos aprenden durante el transcurso de días para encontrar una plataforma escondida. Se realizó una prueba MWM dos semanas después de la lesión. Se dejó a las ratas Sprague Dawley nadar en la piscina hasta que llegaron a la plataforma situada en el cuadrante suroeste de un tanque, o hasta que habían transcurrido 90 segundos. El comportamiento se rastreó por una cámara de vídeo que cuelga por encima de la piscina y grabó y analizó usando el software de pista de vídeo (CUALQUIER laberinto).

Los efectos del Compuesto 1 y la progesterona sobre la adquisición de la prueba MWM se muestran en La Figura 15^a. Un ANOVA de dos vías repetido encontró un efecto significativo del tratamiento. En comparación con ratas con lesión simulada, ratas lesionadas con BCCI mostraron un déficit de aprendizaje espacial significativo, como indica un aumento significativo en la latencia para encontrar la plataforma oculta durante la fase de adquisición de 5 días (Figura 15A). En comparación con las ratas con lesión BCCI tratadas con vehículo, el Compuesto 1 (2, 4 y 6 mg/kg) mostró una disminución dependiente de la dosis en la latencia para encontrar la plataforma oculta, con efectos significativos sobre los días 17 y 18 después de la lesión con 6 mg/kg y el día 18 con 4 mg/kg. Los datos sugieren que el Compuesto 1 tiene un efecto neuroprotector.

La Figura 15C son fotografías de cerebros enteros de animales que reciben tratamiento simulado (simulado), CCI + vehículo (Control), o CCI + Compuesto 1 (6 mg/kg) y muestra los resultados de una inspección visual cualitativa de cerebros enteros antes de seccionar con vibratomo. La inspección indicó que ninguno (0 de 4) de los animales tratados simuladamente exhibió daños en el tejido cortical dorsal-medial. En marcado contraste, los cuatro controles CCI exhibieron lesiones bilaterales graves restringidas a esta región de la corteza. Los animales CCI que recibieron el compuesto 1 mostraron daños variables de moderados a mínimos. En particular, el cerebro que muestra la lesión más grave en el grupo de Compuesto 1 fue menos espectacular que todos los cerebros del grupo de control CCI.

Se midió el nivel de expresión de varias citoquinas en el plasma recogido de ratas en cada grupo de tratamiento. Se recibieron las muestras congeladas y almacenadas a -80 °C. El día del experimento, se descongelaron las muestras, se diluyeron cuatro veces, y se analizaron para determinar la expresión de citoquinas en una plataforma Luminex. Las muestras se analizaron para las citoquinas GRO/KC, IFN γ , IL-1B, IL-6, IL-10, IL-12p70 y TNFa, utilizando un kit fabricado por Millipore multiplex. Como se muestra en La Figura 15B, se observaron los mismos patrones en los niveles de expresión entre las muestras. El cambio más grande fue en la IL-10. Compuesto 1 a 6 mg/kg redujo la IL-10 en comparación con el grupo de control tratado con vehículo.

En muchos casos, la lesión traumática provoca una respuesta lesión secundaria. En la mayoría de los casos, el resultado será la inflamación. La respuesta inflamatoria está dirigida por citocinas y quimiocinas y se propaga parcialmente mediante los productos derivados de tejido dañado (patrones moleculares asociados con el daño).

El Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (MODS), un síndrome poco conocido de pérdida secuencial y progresiva de la función del órgano, es la causa más frecuente de muertes tardías después de la lesión, lo que representa una importante morbilidad y mortalidad. El MODS se considera que se debe, en parte, a la activación

excesiva o a una mala adaptación de las vías inflamatorias.

Se recogieron las medidas cuantitativas de la densidad celular de subsecciones inmunomarcadas anti-NeuN de aproximadamente 2-3 mm anterior al bregma. Las regiones de interés (ROI) se extrajeron (con ciego respecto a la afección experimental) alrededor de las Capas IV-VI en la región cortical adyacente al sitio de la lesión en los animales de CCI tratados o en la zona equivalente (corteza dorsal) en animales de simulación. Una ROI de área similar también se evaluó en una región cortical ventral de la misma sección. La identificación de la célula se realizó utilizando el módulo de recuento de células del analizador Keyence software BZ-II. Se determinaron los coeficientes de célula-materia gris (CG) para cada ROI. Los animales simulados exhibieron un denso marcaje uniforme en ambas regiones dorsal y ventral. Como era de esperar, los animales de control CCI mostraron reducidos coeficientes de CG en las zonas corticales dorsal (-45 % en comparación con el tratamiento simulado) y ventral (-30 % en comparación con el tratamiento simulado) frente a los animales con simulación (FIGURA 15D). La reducción inducida por CCI en el coeficiente de CG se mitigó con el tratamiento con el Compuesto 1 en la corteza ventral (-3 % en comparación con el tratamiento simulado; $p = 0,09$). Aunque el efecto del Compuesto 1 en comparación con el tratamiento con vehículo en la corteza ventral no es estadísticamente significativo, se prevé que este efecto violaría la significación estadística en un estudio más amplio. No se detectó efecto del Compuesto 1 en la región cortical dorsal (-32 % en comparación con el tratamiento simulado) inmediatamente adyacente al sitio de la lesión. La diferencia en el efecto observado del compuesto 1 sobre la región ventral en comparación con la región dorsal puede ser un efecto de umbral relacionado con el grado de la lesión, que fue inversamente proporcional a la distancia desde el sitio de la lesión. Por lo tanto, el daño a la región cortical dorsal podría ser demasiado grave para ser rescatado por el Compuesto 1 en estas condiciones.

La inmunofluorescencia se realizó para evaluar el impacto de TBI en varias vías de la respuesta inmune, y para determinar si el compuesto 1 puede estar mediando sus efectos neuroprotectores a través de una o más de esas vías. Se examinaron las medidas semicuantitativas de las respuestas de la lesión secundaria usando marcaje de inmunofluorescencia para IgG anti-rata (un indicador de la barrera hematoencefálica (BHE) permeabilidad), y TNF α (un indicador de la inflamación neural). Se obtuvieron imágenes de todos los marcadores a un aumento 20X en las áreas de la corteza que rodea el lugar de la lesión en las subsecciones adyacentes dentro de 300 μ m a los utilizados para las evaluaciones del marcaje NeuN. Para cada marcador, se perfiló una ROI objetivo dentro de las capas IV-VI adyacentes al sitio de la lesión (o una región equivalente de la corteza dorsal para animales de simulación), y un retorno de la inversión de referencia ROI se recogió de las misma láminas en la corteza ventral. La intensidad de fluorescencia normalizada se evaluó en cada una de las dos ROI. Para todos los marcadores, se determinó que el sitio de referencia de la corteza ventral no era diferente entre los grupos ($p > 0,5$); por lo tanto, se determinó el objetivo en porcentaje con respecto al valor de referencia (IF).

La IgG anti-rata se expresó en las neuronas (indicado por la flecha en La Figura 15E) en el tejido lesionado. La Figura 15E muestra que la IgG anti-rata se distribuye dentro del neuropilo de las áreas dañadas del tejido cortical. No había IgG anti-rata en el tejido simulado. Las células inmunopositivas a TNF α (indicados por la flecha en La Figura 15E) eran claramente visibles en el tejido dañado que rodea el lugar de la lesión en los animales de control. Estos elementos estaban en gran medida ausentes en los animales tratados con el compuesto 1 y los tratados de forma simulada. La Figura 15E muestra que el Compuesto 1 reduce las respuestas de lesiones secundarias en ratas expuestas a una lesión cerebral.

Artritis inducida por colágeno (CIA) Estudio N.º 2

Para investigar adicionalmente el efecto de los compuestos descritos en este documento sobre los biomarcadores de inflamación, se inició un segundo modelo de CIA. En este modelo, los grupos se designaron como grupo A (sin tratar previamente), grupo B (modelo; tratados con vehículo), grupo C (Compuesto 2 a 5 mg/kg todos los días). Las ratas en los grupos B y C se inmunizaron por vía intradérmica con colágeno bovino de Tipo II en IFA el día 0, y se administró una inyección de refuerzo el día 7. El Compuesto 2 se administró por vía oral a ratas con CIA después de la aparición de la artritis (día 11). El desarrollo de la CIA se evaluó a través de puntuación macroscópica y mediciones de la inflamación de la pata. Esto se evaluó cada día durante los primeros 5 días después de la sensibilización (día 7) y después dos veces a la semana (lunes y jueves) hasta el día 28 usando el sistema de puntuación clínica descrito en la Tabla 7 anteriormente. Además, las pruebas ELISA para CD45, CRP, CCL2/MCP-1, TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-17, y las mediciones para la catepsina K y la elastasa se realizaron 4 días (día 15 del estudio) y 10 días (día 21 del estudio - pico de la enfermedad) después de tratamiento con compuesto y al final del estudio (día 28) en todos los animales del grupo. Además, en el último día del estudio (día 28), unos pocos animales representativos de cada grupo fueron sometidos a microtomodensitometría tridimensional del calcáneo, y se cuantificó la erosión ósea en las patas.

Las Figuras 16A y 16B muestran que en las ratas tratadas con el compuesto 2 a 5 mg/kg se había reducido significativamente la inflamación articular (Figura 16B) y las puntuaciones clínicas (Figura 16A) en comparación con ratas tratadas con vehículo.

Las Figuras 17A y 17B muestran que en las ratas tratadas con el Compuesto 2 a 5 mg/kg se había reducido significativamente la erosión ósea en las patas traseras en comparación con ratas tratadas con vehículo. El estado

de las articulaciones en los animales tratados con el Compuesto 2 fue comparable al de los animales no tratados previamente. Por el contrario, los animales tratados con vehículo muestran estadísticamente significativo aumento de la erosión ósea en sus patas traseras.

Un ensayo Luminex® y un ELISA se utilizaron para medir los efectos del Compuesto 2 sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias y marcadores de inflamación. El líquido sinovial se recogió el día 21, después de la primera inmunización, de 2 ratas en el modelo de grupo y 2 ratas en el grupo tratado con el Compuesto 2, y al final del estudio de 2 ratas en el grupo de animales no tratados previamente, 3 ratas en el grupo de modelo y de 3 ratas en el grupo tratado con el Compuesto 2.

Las Figuras 17C-17F muestran que, en comparación con el grupo de modelo, el Compuesto 2 mostraba efectos inhibitorios sobre la producción de citoquinas proinflamatorias y un marcador de la inflamación en muestras de líquido sinovial. Las citocinas reducidas incluyen la reducción de IL-1 β , IL-6 y MCP-1, y el marcador de la inflamación es la proteína C-reactiva (CRP).

También se utilizó un ensayo de LUMINEX® medir los niveles de citoquinas proinflamatorias en el suero. Las muestras de suero (1 ml de sangre por rata) se recogieron 4 días después del tratamiento compuesto (Día 15), 10 días después de tratamiento con el compuesto (por lo general en el pico de la enfermedad - Día 21) y al final del estudio (día 27).

Figura 17G muestra que, en comparación con el grupo de modelo, el Compuesto 2 mostró un efecto inhibitorio sobre la producción de IL-1 β en muestras de suero.

Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

El modelo de EAE es un modelo aceptado para el estudio de enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central humano, como la esclerosis múltiple. Los efectos del Compuesto 1 se investigaron en MOG inducida en un modelo murino de EAE en ratones hembra C57B1/6J. Los animales se dividieron en 3 grupos designados como Grupo I (control de vehículo), Grupo II (control dexametasona-positivo) y Grupo III (Compuesto 1 a 7,5 mg/kg). Solución salina, dexametasona y el Compuesto 1 se administraron de acuerdo con el esquema mostrado en La Figura 18A. La solución salina y la dexametasona se administraron por vía intraperitoneal todos los días a partir del día 0. El Compuesto 1 a 7,5 mg/kg se administró por vía oral a partir del día 11 (inicio de la enfermedad) el lunes, miércoles y viernes durante 3 semanas consecutivas. La enfermedad se indujo mediante inyección intradérmica única de MOG emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) el día de estudio 0, seguido de inmunoestimulación suplementaria intraperitoneal con toxina pertussis (PT) llevada a cabo el día de estudio 0, y de nuevo 48 horas más tarde en el día de estudio 2.

Como se muestra en La Figura. 18B, los primeros signos de la enfermedad se notaron 7-9 días después de la inmunización MOG y el pico de la enfermedad se desarrolló el Día de Estudio 17. El tratamiento con dexametasona a partir del día 0 a una dosis de 1 mg/kg IP redujo significativamente las puntuaciones clínicas en el estudio 8-37 días (Grupo II) en comparación con el control del vehículo (Grupo I). El tratamiento con el Compuesto 1 a partir del día 11 a una dosis de 7,5 mg/kg (Grupo III) disminuyó significativamente la puntuación de la enfermedad y la gravedad. Estos resultados se muestran en La Figura 18B.

En vista de los resultados obtenidos en las condiciones de este estudio, el tratamiento con el Compuesto 1 a una dosis de 7,5 mg/kg por vía oral comenzando el día de estudio 11 resultó en una disminución en la puntuación de la enfermedad y la gravedad.

Ejemplo 18. Modelos de cicatrización de heridas

Materiales

Ratones - C57BL/6J, machos, con edades de 6-8 semanas, SPF, obtenidos de Harlan Laboratories Ltd. Los ratones se mantuvieron en jaulas individuales ventiladas estériles (IVC) con comida y agua disponible *ad libitum*, ciclos 12h/12h de oscuridad y luz, la temperatura controlada a 19-21 °C, humedad controlada de 40 - 60 %, la presión positiva de aire en el interior la habitación de los animales y el control de la salud se realizaron cada 3 meses, efectuados en centinelas seleccionados.

Cerdos - *Sus scrofa domestica*, especie porcina doméstica (principalmente Landrace X Large White), de sexo femenino, de aproximadamente 60 kg, 4-5 meses de edad, Lahav Institute of Animal Research, Kibbutz Lahav, Israel. Los cerdos mantenidos en ambiente limpio sin SPF, agua corriente *ad libitum* directamente de la fuente pública, alimentos de acuerdo con la recomendación de las tablas de crecimiento estándar bajo la supervisión del veterinario.

ISOFLURANO 99,9 % para inhalación, lote 6027962, Abbot Laboratories Ltd, Inglaterra.

Agua - agua para inyección, lote 11481012, B. Braun Melsungen AG, Alemania.

Solución salina - cloruro sódico al 0,9 % para inyección, lote 12224012, B. Braun Melsungen AG, Alemania

5 DMSO - dimetilsulfóxido, D2650, Sigma-Aldrich Inc., US

PLURONIC® F-68

PVP K-29/32

10 *Evaluación de los efectos de la administración sistémica y la aplicación tópica del compuesto 1 sobre heridas de la piel de ratones C57BL*

15 Los efectos del compuesto 1 sobre la cicatrización de heridas se estudiaron en un modelo longitudinal incisión en la piel de grosor completo de la herida ratón. A su llegada, los animales fueron identificados mediante marcadores auriculares, se pesaron y se dejaron aclimatar durante varios días antes del inicio del experimento. El día de la herida, los ratones se pesaron y se dividieron en 6 grupos experimentales con 6 animales por grupo, de acuerdo con la aleatorización estratificada según las diferencias de peso. Antes de la intervención quirúrgica, se anestesió a los ratones con isoflurano y se recortó el dorso de los animales. Se realizaron incisiones longitudinales de 20 mm de espesor completo utilizando una hoja de bisturí de serie en la parte posterior de los animales (paralelos a la columna vertebral). Tres horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y la actividad de los animales, las incisiones asumieron formas elípticas. En esta etapa, se midió el área más amplia de la herida para establecer un ancho de línea de base de la herida. La evaluación de la curación de la herida se realizó midiendo el área más amplia de la herida. Los grupos de tratamiento consistieron en grupos tratados con sonda oral o por vía tópica. Durante el experimento, las heridas se documentaron con fotos y se realizó el análisis morfológico. Al final del experimento, 8 días después de la curación, los ratones fueron sacrificados, se midieron las anchuras de la herida y se recogieron biopsias de la zona de la herida y se sometieron a análisis.

Tabla 12. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de ratones	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	6	Control acuoso 0,6 % p/v Pluronic® F-68 y 0,6 % p/v de solución de PVP K-29/32	0,2 ml	v.o.	en días alternos
2	6	Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68	4 mg/kg	v.o.	en días alternos
3	6	Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68	7,5 mg/kg	v.o.	en días alternos
4	3	Vehículo, agua para inyectables;	0,2 ml	Tópica	A diario
5	6	Compuesto 1 en agua	2,5 µM	Tópica	A diario
6	6	Compuesto 1 en agua	1 µM	Tópica	A diario

45 Las soluciones de dosificación se prepararon frescas cada día de la dosificación. El compuesto 1 para sonda oral se suministró como un polvo liofilizado y se reconstituyó en acuosa 0,6 % w/v Pluronic® F-68 y 0,6 % p/v PVP K-29/32 para preparar una solución de 0,75 mg/ml de suspensión madre, que posteriormente se diluyó con solución acuosa de 0,6 % p/v de Pluronic® F-68 y 0,6 % w/v PVP K-29/32 para la preparación de soluciones de trabajo de 7,5 mg/kg y 4 mg/kg. El Compuesto 1 para la aplicación tópica se suministró como un polvo liofilizado y se suspendió en agua a una concentración de 10 mM, que se diluyó adicionalmente con agua para conseguir una concentración final de trabajo para la aplicación tópica.

55 Como parte de una evaluación morfológica diaria, se documentó con fotos realizadas con una cámara digital FinePix S700. La Figura 19 son fotografías de heridas representativas de cada grupo experimental en el día 5 después de la herida. La barra de escala negra representa 1 cm. Se realizó un total de 33 heridas en 33 ratones. La evaluación morfológica demostró el efecto positivo del tratamiento con el Compuesto 1, ya sea por vía oral o tópica. Todos los tratamientos inducen la curación de heridas superiores a la de los controles. Las heridas tratadas eran más pequeñas en tamaño y las costras eran más ligeras, más delgada y homogénea sin grietas, lo que indica una etapa posterior de la cicatrización de heridas. Cuando se evaluó en el mismo día en que los grupos de tratamiento, las heridas del grupo control presentaron mayor tamaño y estaban cubiertas con costras gruesas agrietadas que exponían una zona no sanada de la herida (observado como áreas rojizas y rosas), tanto en los bordes como en el centro de la heridas.

65 El análisis morfológico es el parámetro primario utilizado en la evaluación de la curación de heridas en los estudios preclínicos en animales y en los tratamientos clínicos de heridas humanas. Según el análisis morfológico, el

compuesto 1 mostró eficacia, y tuvo un impacto positivo en la cicatrización de heridas. Cabe destacar que tanto la aplicación tópica como la administración sistémica del Compuesto 1 resultó en una mejor cicatrización de la herida, medida por la reducción del tamaño de la herida y mejores propiedades de formación de costras.

5 Evaluación de los efectos de la aplicación tópica de un compuesto de ensayo en heridas de la piel de cerdo

Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas se pueden estudiar en un modelo de incisión longitudinal en la piel de grosor completo. A su llegada, los animales se identifican mediante marcadores auriculares, se pesan y se dejaron aclimatar durante varios días antes del inicio del experimento. Tres días antes de la cirugía, los cerdos se transfieren a las instalaciones de hospitalización para la aclimatación. Doce horas antes del procedimiento, se retuvo el alimento. En el día de la cirugía, el cerdo se anestesia utilizando ketamina, xilazina, diazepam e isoflurano. El pelo del tórax y el abdomen se corta cuidadosamente usando una máquina Oster® (tamaño de hoja de 30) y 20 regiones individuales de 4 cm² cada una se marcan en dos filas (10 regiones por fila). Diez pares de 2,5 cm de espesor completo de incisiones en la piel longitudinal se hacen usando una hoja de bisturí N.º 11, 4 cm a cada lado de la línea media del dorso.

Después del procedimiento quirúrgico, las heridas se dividen en grupos experimentales y se tratan diariamente por aplicación tópica en el área de la herida y en los bordes de la herida. El área de tratamiento consiste en una superficie de la piel hasta una distancia de 2 cm del centro de la herida. Se aplican gradualmente soluciones de dosificación en cada herida usando una pipeta, hasta que todo el volumen de tratamiento (por ejemplo, 1 ml de solución salina o compuesto de ensayo) es absorbido por el tejido.

Varias horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y la actividad de los animales, las incisiones asumen formas elípticas. En esta etapa, se mide el área más amplia de la herida para establecer un ancho de línea de base de la herida. La evaluación de la curación de la herida se realiza midiendo el área más amplia de la herida. Durante el experimento, las heridas se documentan con fotos y se realiza el análisis morfológico.

Al final del experimento (por ejemplo, 12 días después de la herida), los cerdos se sacrificaron mediante la administración de anestésico y KCl. La morfología de la herida se evalúa, el ancho de la herida se mide y biopsias del área de la herida se cosechan y se fija utilizando paraformaldehído al 4 % para su posterior análisis. Tras la fijación, las biopsias de la herida son foto-documentado usando la cámara digital de alta resolución, por ejemplo, un FinePix S700, y biopsias de la zona de la herida se someten a análisis histopatológico. La evaluación de la cicatrización de la herida se lleva a cabo de una manera pareada en la que cada herida tratada con compuesto de ensayo se compara directamente a la herida de control en la misma localización anatómica en el otro lado de la línea media del dorso. Esta evaluación pareada de la curación es crucial en términos de evaluación objetiva y comparación objetiva de las heridas tratadas a no tratada debido a la variabilidad asociada con un grado de vascularización y la circulación sanguínea en la piel en diferentes zonas de la espalda del cerdo. Las heridas situadas en la zona frontal cerca de la pantalla cuello tienen propiedades curativas mucho mejores que las heridas localizadas en la parte posterior.

40 Tabla 13. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de heridas	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	5 heridas frontales en el lado derecho	Solución salina control	1 ml	Tópica	A diario
2	5 heridas posteriores en el lado derecho	Solución salina control	1 ml	Tópica	A diario
3	5 heridas frontales en el lado izquierdo	Compuestos de ensayo	3 µM	Tópica	A diario
4	5 heridas posteriores en el lado izquierdo	Compuestos de ensayo	1 µM	Tópica	A diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de la dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como un polvo liofilizado y reconstituido en más de cloruro de sodio inyectable al 0,9 % para hacer un 3 mg/ml de la suspensión madre. La suspensión madre se diluye adicionalmente con cloruro de sodio inyectable al 0,9 % a concentraciones finales de 3 µM y 1 µM para aplicación tópica.

Superficies homogéneas costra, delgadas y organizados de manera uniforme sin incidentes de supuración, sangrado o secreción de la herida son indicativos de la cicatrización de heridas. Costras altamente heterogéneas, agrietadas y de colores oscuros indican numerosos incidentes de exudación, supuración y sangrado durante el curso del proceso de cicatrización de la herida.

Evaluación de los efectos de la aplicación tópica de un compuesto de ensayo en procesos de curación temprana de heridas en cerdos

Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización temprana de heridas se pueden estudiar en un modelo de incisión longitudinal en la piel de grosor completo en cerdos. Cinco pares de incisiones longitudinales de 2,5 cm de grosor completo se realizan en la sección frontal de la espalda de los cerdos anestesiados utilizando n.º 11 hojas de bisturí, 4 cm de cada lado de la línea media del dorso. Dentro de varias horas después del procedimiento, la incisión longitudinal se convierte en una herida elíptica.

Las heridas se dividen en grupos experimentales y se trataron diariamente por aplicación tópica en el área de la herida (incluyendo los bordes y en el área de la piel cerca de la herida). La fase de tratamiento comienza 24 horas después de la herida. Se aplican gradualmente soluciones de dosificación en cada herida usando una pipeta, hasta que todo el volumen de tratamiento (por ejemplo, 1 ml de solución salina o un compuesto de ensayo) es absorbida por el tejido.

El día 5, el estado de la cicatrización de heridas y la morfología se evaluó de acuerdo con los siguientes parámetros: sangrado, supuración, hinchazón, inflamación, secreción de pus y formación de costras. La evaluación se lleva a cabo de una manera pareada en la que cada herida tratada con compuesto de ensayo se compara directamente a la herida de control en la misma localización anatómica en el otro lado de la línea media del dorso.

Tabla 14. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de heridas	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	5	Solución salina control	1 ml	Tópica	A diario
2	5	Compuestos de ensayo	3 µM	Tópica	A diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de la dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como un polvo liofilizado y se reconstituye en cloruro de sodio inyectable al 0,9 % para hacer un 3 mg/ml de la suspensión madre. Esta suspensión madre se diluye adicionalmente con cloruro sódico al 0,9 % para la preparación de la solución tópica 3 µM definitiva.

Una herida morfológica curación de evaluación se lleva a cabo el día 5 de tratamiento. La hinchazón se examina, se puntúa de acuerdo con la gravedad de cada herida y documentado como leve, moderada o severa. Las heridas que exhiben hinchazón moderada y grave se presentan como un porcentaje de heridas totales en el grupo experimental. La secreción se examina y se puntúa de un modo binario una herida que exhibió la secreción mínima se consideró positiva y, una herida sin ninguna secreción detectable se considera negativa para este parámetro. Las heridas que exhiben secreciones (positivas para este parámetro) se presentan como un porcentaje de heridas totales en el grupo experimental. Una costra se considera completa cuando forma una capa continua de una dura, seca, de color rojizo, la formación de color amarillo o marrón oscuro cubría toda la zona de la herida y está fuertemente unida al lecho de la herida y, por lo tanto, proporciona una barrera continua y fuerte entre el ambiente externo y los tejidos heridos. La formación de costra se examina y se puntúa de un modo binario las heridas que presentaban una costra completamente formada que estaba seca y fuerte se consideran positivas y las heridas sin costra o con costras en una etapa más temprana se consideran negativas para este parámetro. Las heridas con una costra completamente formado se presentan como un porcentaje del total de las heridas por grupo.

También se evalúan la hinchazón, la secreción y la formación de costras. La hinchazón y la secreción son parte de una respuesta inflamatoria excesiva que podría retrasar la reparación de tejidos e inducir una cicatrización antiestética.

Evaluación de los efectos de la aplicación tópica de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas temprana en piel de cerdo y sobre las irritaciones y el rascado asociado a la piel dañada o herida.

El efecto de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas se puede estudiar en un modelo de incisión longitudinal en la piel de grosor completo en cerdos. Tres días antes de la cirugía, los cerdos se transfieren a las instalaciones de hospitalización para la aclimatación. Doce horas antes del procedimiento quirúrgico, se retuvo el alimento. En el día de la cirugía, los cerdos se anestesian utilizando ketamina, xilazina, diazepam e isoflurano. El pelo en el tórax y el abdomen dorso se corta usando una máquina cortadora Oster® (tamaño de hoja 30). Diez pares de 4 cm² de sección se marcan y se realizan incisiones longitudinales en la piel de 2,5 cm de espesor completo usando una hoja de bisturí N.º 11, a cada lado de la línea media del dorso.

Siguiendo el procedimiento quirúrgico, las heridas se dividen en grupos experimentales y se tratan diariamente por aplicación tópica en el área de la herida (incluyendo los bordes y en el área de la piel cerca de la herida hasta una distancia de 2 cm de la herida en todas las direcciones). Se aplican gradualmente soluciones de dosificación en cada herida usando una pipeta, hasta que todo el volumen de tratamiento (por ejemplo, 1 ml de vehículo o un compuesto de ensayo) es absorbido por el tejido.

Dentro de varias horas después del procedimiento, la incisión longitudinal se convierte en una herida elíptica debido a la elasticidad de la piel y la actividad de los animales. Durante el experimento, las heridas se documentan con fotos

y se realiza el análisis morfológico. La evaluación de la cicatrización de la herida se lleva a cabo de una manera pareada en la que cada herida tratada con compuesto de ensayo se compara directamente a la herida de control en la misma localización anatómica en el otro lado de la línea media del dorso. Durante los primeros 5 días siguientes a las heridas, la morfología de la herida y el comportamiento animal se registran.

Tabla 15. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de heridas	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	5 heridas frontales en el lado derecho	0,02 % de DMSO en agua	1 ml	Tópica	A diario
2	5 heridas posteriores en el lado derecho	0,067 % de DMSO en agua	1 ml	Tópica	A diario
3	5 heridas frontales en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,02 %	3 µM	Tópica	A diario
4	5 heridas posteriores en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,067 %	1 µM	Tópica	A diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de la dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como un polvo liofilizado y se disolvió en 100 % de DMSO a una concentración madre de 15 mM. Diluciones adicionales en agua inyectable se llevan a cabo para lograr una concentración final de 3µM y 1µM para la aplicación tópica.

Como parte de la evaluación morfológica de cada día, la foto-documentación de las heridas se realiza utilizando, por ejemplo, una cámara digital de alta resolución FinePix S700. Además del estado de la herida, se observaron áreas de la piel irritada y raspadas. Por lo general, el raspado no causa daño a las heridas o interferir con el proceso de curación de la herida debido a que la herida se inflige en la parte posterior cerca de la línea media del dorso, de manera que es difícil y casi imposible para el animal para alcanzar las heridas.

Evaluación de los efectos del Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68 y el Compuesto 1 en agua sobre raspados asociados con la curación de la piel en ratones

En los estudios de la piel de heridas descritas en el presente documento en ratones, también se observó el comportamiento de los animales, y los intentos de eliminar las cicatrices, signos de malestar, y el raspado de la zona de la herida se cuantificaron. Se analizaron el comportamiento anormal del raspado y los signos de dolor de todos los estudios realizados en ratones. En estos estudios, se realizó el tratamiento con el Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68 y el Compuesto 1 en agua, y los controles de vehículo respectivos.

Durante todos los experimentos de cicatrización de heridas en ratones, se realizó un seguimiento de parámetros asociados con la curación de heridas, signos de irritaciones de la piel y otras condiciones de la piel de curación en el área cerca de la herida y el área de piel tratada. Además, durante la fase de tratamiento de todos los modelos de curación de la piel, se prestó especial atención al comportamiento de los animales, tales como señales de malestar y dolor; y signos de arañazos y la manipulación de las heridas y la piel. Los efectos relajantes y calmantes de los compuestos de tratamiento fueron muy evidentes en comparación con los animales control, que fueron predispuestos a alterar sus heridas.

En ratones, el tratamiento con el Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68 o el Compuesto 1 en agua redujo la incidencia de la manipulación de heridas en comparación con los ratones tratados con vehículo (DMSO en agua, solución salina, PVP/Pluronic o agua).

En los ratones, la manipulación de las heridas generalmente como resultado la eliminación de la costra y el sangrado o daños en el tejido recién formado en el lecho de la herida que fue fuertemente unido a la costra. La gran mayoría de estos incidentes ocurrió en los grupos tratados con vehículo (aproximadamente 20 - 30 % en todos los experimentos).

De acuerdo con el resumen de las condiciones de la piel y el comportamiento animal, se puede concluir que el tratamiento de heridas con el Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68 o el Compuesto 1 en agua impide la manipulación de heridas en ratones, posiblemente, debido a algún efecto calmante y tranquilizante de los compuestos para el tratamiento de la piel irritada y heridas.

Respuesta a la dosis de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas en ratones

Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas se pueden estudiar en un modelo de incisión longitudinal en la piel de grosor completo de ratón. A su llegada, los animales se identifican mediante marcadores auriculares, se pesaron y se dejaron aclimatar durante varios días antes del inicio del experimento. El

día de la herida, los ratones se pesan y se dividen en 7 grupos experimentales (N=6 o N=7), de acuerdo con la aleatorización estratificada según las diferencias de peso. El grupo de vehículo recibe 0,1 % de DMSO en agua mientras que el grupo de control positivo se trata con una solución acuosa al 0,6 % w/v Pluronic® F-68 y 0,6 % w/v PVP K-29/32. Antes de la intervención quirúrgica, los ratones se anestesian con isoflurano y el pelo en la parte posterior de los animales se recorta. Se realizan incisiones longitudinales de 20 mm de espesor completo utilizando una hoja de bisturí de serie en la parte posterior de los animales (paralelos a la columna vertebral). Tres horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y la actividad de los animales, las incisiones asumen formas elípticas. En esta etapa, se mide el área más amplia de la herida para establecer un ancho de línea de base de la herida. La evaluación de la curación de la herida se realiza midiendo el área más amplia de la herida. El tratamiento de heridas se realiza por aplicación tópica (diario) de soluciones de dosificación (por ejemplo, 0,2 ml) directamente sobre las heridas.

Tabla 16. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de ratones	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	7	0,1 % de DMSO en agua	0,2 ml	Tópica	A diario
2	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1 %	9 µM	Tópica	A diario
3	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1 %	3 µM	Tópica	A diario
4	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1 %	1 µM	Tópica	A diario
5	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1 %	0,3 µM	Tópica	A diario
6	7	Control acuoso 0,6 % p/v Pluronic® F-68 y 0,6 % p/v de PVP K-29/32	0,2 ml	Tópica	A diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de la dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como un polvo liofilizado y se reconstituye en DMS al 0,1 % en agua para hacer un 3 mg/ml de la suspensión madre. La suspensión madre se diluye adicionalmente con DMSO al 0,1 % en agua para preparar la solución tópica final. Las heridas en los grupos control se tratan tópicamente con 0,1 % de DMSO en agua, o acuoso 0,6 % p/v Pluronic® F-68 y 0,6 % p/v PVP K-29/32 solución.

Al final del experimento, 8 días después de la curación, los ratones se sacrifican mediante inhalación de CO₂, se miden las anchuras de la herida y se recogen biopsias de la zona de la herida y se someten a análisis. Las biopsias se fijan utilizando paraformaldehído al 4 %. Después de la fijación de toda la zona de la herida, se realiza una disección de 5 mm de la zona más ancha de la herida y estas muestras se someten a la incrustación de parafina. Los bloques de parafina se preparan utilizando procedimientos estándar de deshidratación e inclusión en parafina de los tejidos. Después, las secciones histológicas se preparan y los tejidos se tiñen con hematoxilina y eosina (H & E) tinción. Los portaobjetos teñidos con H & E se examinan y se lleva a cabo la evaluación de la eficacia de curación de heridas.

Se evalúa el cierre dérmico avanzado el día 8 por el examen de eosina que manchó la dermis sana y la dermis recién formada en los bordes de la brecha de la herida. Las heridas con bordes dérmicos observados en campo con un aumento 100x del microscopio (Olympus BX41 o Axiovert 25, Zeiss) se consideran positivas para el parámetro de curación cierre dérmico avanzada. El número de heridas con cierre dérmica avanzada se presenta como un porcentaje de heridas totales en los grupos experimentales.

El cierre epidérmico avanzado se evalúa el día 8 mediante la tinción H & E mediante el análisis de la sección histológica en la zona más amplia de la herida. Las heridas que exhiben la presencia de una capa continua de epidermis que cubren todo el hueco de la herida y las heridas con la migración más avanzado de los bordes de la epidermis observados en el campo de microscopio a un aumento de 400x se consideran positivas al parámetro cierre epidérmico avanzada. Los resultados se presentan como un porcentaje del total por grupo experimental.

La migración epidérmica se evalúa el día 8 mediante tinción H & E analizando la epidermis recién formada teñida con hematoxilina en ambos bordes de la herida. El borde de la epidermis se considera migratorio cuando recién formado borde epidérmico cubierto alrededor de 20-30 % de la brecha de la herida. Los bordes epidérmicos migratorias en los grupos se cuentan y se presentan como un porcentaje del número total de los bordes de la epidermis (dos veces el número de heridas en el grupo). Ambos bordes de la epidermis se consideran migratorios en las heridas que presentaban cierre completo o avanzado epidérmica. Se realiza un total de 62 heridas en 62 ratones.

El tratamiento de heridas con un compuesto de ensayo previene complicaciones en la cicatrización de heridas, tales como hiperplasia de la epidermis y adherencias.

Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas se pueden estudiar en un modelo de incisión longitudinal en la piel de grosor completo de ratón. Antes de la intervención quirúrgica, se anestesia a los ratones con isoflurano y se afeita el dorso de los animales. Se realizan incisiones longitudinales de 20 mm de espesor completo utilizando una hoja de bisturí en la parte posterior de los animales (paralelos a la columna vertebral). Tres horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y la actividad de los animales, las incisiones asumen formas elípticas. La evaluación de la curación de la herida se realiza midiendo el área más amplia de la herida. El tratamiento de heridas se realiza mediante la aplicación diaria tópica de, por ejemplo, 0,2 ml de compuesto de ensayo directamente en las heridas. El proceso de cuidados de la herida está parcialmente en un ambiente húmedo - después de cada tratamiento diario, las heridas están mojadas por algún tiempo. Al final del experimento, 8 días después de la curación, los ratones se sacrifican, se miden las anchuras de la herida y se recogen biopsias de la zona de la herida y se someten a análisis.

Tabla 17. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de ratones	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	7	0,1 % de DMSO en agua	0,2 ml	Tópica	A diario
2	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1 %	3 µM	Tópica	A diario
3	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1 %	1 µM	Tópica	A diario
4	7	Control acuoso 0,6 % p/v Pluronic® F-68 y 0,6 % p/v de PVP K-29/32	0,2 ml	Tópica	A diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de la dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como un polvo liofilizado y se reconstituyó en 0,1 % de DMSO en agua a un 3 mg/ml de la suspensión madre, que posteriormente se diluye con DMSO al 0,1 % en agua para conseguir una concentración de trabajo para la aplicación tópica. Las heridas en los grupos control se tratan tópicamente con 0,1 % de DMSO en agua, o acuoso 0,6 % p/v Pluronic® F-68 y 0,6 % p/v PVP K-29/32.

Al final de la fase de tratamiento, en el día 8 después de la herida, los ratones se sacrifican por inhalación de CO₂ y biopsias de la zona de la herida se cosechan. La fijación de tejidos de la herida se realiza utilizando 4 % de paraformaldehído. Después de la fijación de toda la zona de la herida, se realiza una disección de 5 mm de la zona más ancha de la herida y se someten a la incrustación de parafina. Los bloques de parafina se preparan usando procedimientos estándar de deshidratación. Después, las secciones histológicas se preparan y los tejidos se tiñen con hematoxilina y eosina (H & E). Parámetros de la cicatrización de heridas se evalúan y se representan gráficamente.

Hiperplasia de la epidermis se evaluó en el día 8. Los bordes de la epidermis no migratorias y hiperplásicos en el grupo se cuentan, y se presentan como un porcentaje del número total de los bordes de la epidermis (dos veces el número de heridas en el grupo). Los bordes epidérmicos hiperplásicos se evalúan mediante la tinción H & E mediante el análisis de las áreas de hematoxilina manchado condensados de la epidermis. Cuando el borde epidérmico aparece más grueso que la epidermis normal en un área de la piel sana y cuando dicho borde epidérmico no exhibe la migración hacia sellar la brecha de la herida, se considera para ser hiperplásico y no migratorias.

Las adherencias en el hueco de la herida se evalúan en el día 8. Las adherencias se evalúan mediante el análisis de las estructuras celulares y tisulares en el hueco de la herida. Las adherencias de la herida se califican en una escala de leve, moderada o grave. Una puntuación negativa se considera cuando hay un coágulo en el hueco de la herida o tejido normal de granulación se sustituye por otros tejidos, tales como los músculos esqueléticos o tejidos linfoides extensas. Varias adherencias o granulación anormal que ocupan más del 40 % de la superficie del espacio de la herida se consideran como severa. La adherencia se considera leve cuando es no significativa y no interfiere con la renovación normal de tejido de la piel. Las heridas con adherencias graves se calculan como un porcentaje del total de las heridas por grupo experimental y se representan como se muestra. Se realiza un total de 32 heridas (64 bordes epidérmicos) en 32 ratones.

Una de las heridas más importantes complicaciones de cicatrización es la hiperplasia de la epidermis. Como respuesta a las señales de estrés asociados con la herida, la proliferación de células en la capa basal de la epidermis se produce para compensar la pérdida de la piel. Normalmente, en la curación de heridas sin incidentes, las células epidérmicas inician la migración hacia el sellado de la brecha de la herida poco después de la proliferación. Cuando la migración no se produce o se ralentiza, por ejemplo, en las complicaciones de la piel causados por la hiperglucemia en las heridas diabéticas, hiperplasia epidérmica se hace más frecuente, y puede causar aún más complicaciones en la cicatrización de heridas. En heridas abiertas agudas, como en el modelo empleado en este experimento, o en heridas agudas suturado, tales como heridas post-quirúrgicas, una disminución

en la cicatrización de la epidermis asociado con hiperplasia de los bordes de la epidermis aumenta el riesgo de contaminación y otra de cicatrización de heridas tales como complicaciones de la herida dehiscencia, líquido de drenaje de la herida, o tejido que sobresale de la herida.

En un proceso de curación eficaz de la herida, el coágulo de sangre primaria sufre cambios graduales con el fin de formar tejido de granulación en la brecha de la herida, que, después de la remodelación, con el tiempo se convierte en tejido de la piel recién formada con funciones completamente restauradas. Cuando la adherencia de tejidos no se produce en la piel relacionada con la brecha de la herida, tejido de granulación no se forma correctamente y, como resultado, la remodelación del tejido final es limitada. Esto puede causar más limitaciones en las funciones de la piel que ha sanado.

El tratamiento de heridas con un compuesto de ensayo en una formulación a base de solución salina mejora la cicatrización de heridas y evita adherencias graves.

Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas se estudiaron en un modelo longitudinal incisión en la piel de grosor completo de la herida ratón. Los procedimientos quirúrgicos se realizan en 7-8 semanas de edad ratones machos C57BL anestesiados con isoflurano. Antes de la intervención quirúrgica, los ratones se anestesian con isoflurano y se corta el pelo. Las incisiones longitudinales de espesor total de 20 mm se realizan utilizando una hoja de bisturí estándar. Tres horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y la actividad de los animales, las incisiones asumen formas elípticas. En esta etapa, se mide el área más amplia de la herida para establecer un ancho de línea de base de la herida. La evaluación de la curación de la herida se realiza midiendo el área más amplia de la herida. El tratamiento de heridas se realiza mediante una aplicación diaria de una solución tópica de 0,2 ml directamente sobre la herida. El proceso de cuidados de la herida se realiza parcialmente en un ambiente húmedo porque después de cada tratamiento diario, las heridas están mojadas por algún tiempo (3-5 horas). Al final del experimento, 8 días después de la curación, los ratones se sacrifican, se miden las anchuras de la herida y se recogen biopsias de la zona de la herida y se someten a análisis.

Tabla 18. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de ratones	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	5	Solución salina	0,2 ml	Tópica	A diario
2	7	Compuesto de ensayo en solución salina	3 μ M	Tópica	A diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de la dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como un polvo liofilizado y se reconstituyó en solución salina para preparar 3 mg/ml de la suspensión madre, que posteriormente se diluye con solución salina para conseguir una concentración de trabajo de 3 μ M para la aplicación tópica. Las heridas en los grupos de control se trataron tópicamente con solución salina.

Al final de la fase de tratamiento, 8 días después de la herida, los ratones se sacrifican por inhalación de CO₂ y biopsias de la zona de la herida se cosechan. La fijación de tejidos de la herida se realiza utilizando 4 % de paraformaldehído. Después de la fijación de toda la zona de la herida, se realiza una disección de 5 mm de la zona más ancha de la herida y el área diseccionada se somete a la incrustación de parafina. Los bloques de parafina se preparan usando procedimientos estándar de deshidratación. Después, las secciones histológicas se preparan y los tejidos se tiñen con hematoxilina y eosina (H & E). Parámetros de la cicatrización de heridas se evalúan y se representan gráficamente.

El cierre epidérmico avanzado se evalúa el día 8 mediante la tinción H & E mediante el análisis de las secciones histológicas en la zona más amplia de la herida. Las heridas que exhiben la presencia de una capa continua de epidermis que cubren todo el hueco de la herida y las heridas con la migración más avanzada de los bordes de la epidermis cuando ambos bordes se observan en el campo de microscopio a un aumento de 400x se consideran positivas al parámetro cierre epidérmico avanzada. Los resultados se presentan como un porcentaje del total por grupo experimental.

Se evalúa la cicatrización dérmica avanzada por el examen de eosina que mancha la dermis sana y la dermis recién formada en los bordes de la brecha de la herida. Las heridas con bordes dérmicos observados en campo con un aumento 100x del microscopio (Olympus BX41 o Axiovert 25, Zeiss) se consideran positivas para el parámetro de curación cierre dérmico avanzada. El número de heridas con cierres dérmicos avanzados se presenta como un porcentaje de heridas totales en los grupos experimentales.

El tejido de granulación se evalúa utilizando tinción H & E. Cuando el coágulo de fibrina primaria es reemplazado por tejido conectivo fibroso que contiene adipocitos, nuevos capilares y un infiltrado que contiene células, macrófagos, y células plasmáticas linfoides el tejido de granulación se considera temprano. El tejido de granulación temprana reemplazado por tejido con una alta abundancia de fibroblastos y fibras de colágeno se considera avanzada. En general, las áreas de tejido de granulación avanzada en la brecha de la herida se documentan como porcentaje del

área total de brecha de la herida. Una brecha de la herida se presentan formación de tejido de granulación avanzada que cubre 40 % de la brecha de la herida se considera positiva para este parámetro. Los resultados se calculan como un porcentaje de las heridas totales por grupo.

- 5 Las adherencias se evalúan mediante el análisis de las estructuras celulares y tisulares en la brecha de la herida Las adherencias de la herida se califican en una escala de leve, moderada o grave. Una puntuación negativa se considera cuando hay un coágulo en el hueco de la herida o tejido normal de granulación se sustituye por otros tejidos, tales como los músculos esqueléticos o tejidos linfoides extensas. Varias adherencias o granulación anormal que ocupan más del 40 % de la superficie del espacio de la herida se consideran como severa. La adherencia se considera leve cuando es no significativa y no interfiere con la renovación normal de tejido de la piel Las heridas con adherencias graves se calculan como un porcentaje del total de las heridas por grupo experimental. Se realizaron diecinueve heridas (38 bordes de la epidermis) en 19 ratones.

15 *Evaluación de los efectos de la aplicación tópica de un compuesto de ensayo sobre el proceso de curación y cicatrización en las últimas etapas de la cicatrización de heridas en piel de cerdo*

Los efectos de un compuesto de ensayo en las últimas etapas de la cicatrización de heridas se estudian en un modelo de herida porcino de incisión longitudinal de grosor completo. El día de la cirugía, el cerdo se anestesia utilizando ketamina, xilazina, diazepam e isoflurano. El pelo del tórax y el abdomen dorso se corta y 10 pares de 2,5 cm de espesor completo incisiones en la piel longitudinal se realizan usando una hoja de bisturí n.º 11, 4 cm de cada lado de la línea media del dorso Siguiendo el procedimiento quirúrgico, las heridas se dividen en grupos experimentales y se tratan diariamente por aplicación tópica en el área de la herida y en los bordes de la herida, incluyendo el tratamiento de la piel cerca de la herida hasta una distancia de 2 cm de la herida en todas las direcciones). Se aplican gradualmente soluciones de dosificación en cada herida usando una pipeta, hasta que todo el volumen de tratamiento (por ejemplo, 1 ml de vehículo o compuesto de ensayo) se absorbe por el tejido. La piel cerca de la herida se trata con gasa empapada en solución de compuesto de ensayo o vehículo.

30 Durante el experimento, las heridas se documentan con fotos y se realiza el análisis morfológico. Al final de la fase de tratamiento (por ejemplo, 19 días después de la herida), los cerdos se sacrifican mediante la administración de anestésico y KCl. Se examina la morfología de las heridas, las heridas son foto-documentados y biopsias del área de la herida se cosechan para la fijación y posterior análisis morfológico e histológico.

Tabla 19. Grupos Iniciales del estudio

Grupo	Número de heridas	Artículo del ensayo	Dosis	Vías de administración	Programa
1	5 heridas frontales en el lado derecho	0,02 % de DMSO en agua	1 ml	Tópica	A diario
2	5 heridas posteriores en el lado derecho	0,067 % de DMSO en agua	1 ml	Tópica	A diario
3	5 heridas frontales en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,02 %	3 µM	Tópica	A diario
4	5 heridas posteriores en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,067 %	1 µM	Tópica	A diario

45 Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de la dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como un polvo liofilizado y se disolvió en 100 % de DMSO para preparar una solución madre de 15 mM. Después, se realizan diluciones adicionales en agua inyectable para lograr una concentración final de 3µM y 1µM para la aplicación tópica.

50 Al final de la fase de tratamiento (día 19 después de la herida), se realiza la evaluación de la curación de heridas. Heridas completamente cicatrizadas se informan como un porcentaje del total de las heridas por grupo. También se indican la anchura media de cicatrices en las heridas que sanó completamente y exhibió completa costra desprendimiento. Se midieron las cicatrices (mm) y se calculan la anchura media de cicatrices y la desviación estándar. Se realizó un total de 20 heridas.

60 Al final de la fase de tratamiento (19 días después de la herid) se sacrifica a los cerdos mediante sobredosis de anestésico y KCl se recogen biopsias de la zona de la herida. La fijación de las biopsias de las heridas se realiza utilizando 4 % de paraformaldehído. Tras la fijación, las biopsias de heridas son foto-documentado el uso de, por ejemplo, una cámara digital FinePix S700 con la máxima resolución.

Bibliografía

65 Cronshaw JM y Matunis MJ. 2004. The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations TRENDS Endocrin Metab. 15:34-39

- Falini B et al. 2006. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML Blood. 107:4514-4523.
- 5 Cai X y Liu X. 2008. Inhibition of Thr-55 phosphorylation restores p53 nuclear localization and sensitizes cancer cells to DNA damage.PNAS. 105:16958-16963.
- Daelemans D, Afonina E, Nilsson J 2002 A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export. Proc Natl Acad Sci U S A 99(22):14440-5.98052-2517.
- 10 Davis JR et al. 2007. Controlling protein compartmentalization to overcome disease Pharmaceut Res. 24:17-27.
- Freundt E, Yu L, Park E, et al 2009 Molecular determinants for subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame 3b protein. J Virol 83(13):6631-40.
- 15 Ghildyal R, Ho A, Dias M, et al 2009 The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a Crm1-mediated nuclear export mechanism. J Virol 83(11):5353-62.
- Ghosh CC et al 2008 Analysis of nucleocytoplasmic shuttling of NF kappa B proteins in human leukocytes.Methods Mol Biol. 457:279-92.
- 20 Gupta N et al 2008 Retinal tau pathology in human glaucomas. Can J Ophthalmol. 2008 Feb;43(1):53-60.
- Hoshino L et al. 2008. Combined effects of p53 gene therapy and leptomycin B in human esophageal squamous cell carcinoma. Oncology. 75:113-119.
- 25 Lain S et al. 1999a An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs Exp Cell Res. 248:457-472.
- Lain S et al. 1999b. Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function Exp Cell Res. 253:315.
- 30 Muller PA et al. 2009 Nuclear-cytosolic transport of COMMD1 regulates NF-kappaB and HIF-1 activity. Traffic 10(5):514-27.
- 35 Mutka S 2007 Nuclear Export Inhibitors (NEIs) as novel cancer therapies AACR Annual Meeting. Poster 5609.
- Mutka S, Yang W, Dong S, et al. 2009. Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity *in vivo*. Cancer Res. 69: 510-7.
- 40 Nakahara J et al. 2009. Abnormal expression of TIP30 and arrested nucleocytoplasmic transport within oligodendrocyte precursor cells in multiple sclerosis J Clin Invest. 119:169-181.
- Noske A et al. 2008. Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer. Cancer. 112:1733-1743.
- 45 Pollard V & Malim M. 1998 The HIV-1 Rev protein Annu Rev Microbiol 52:491-532.
- Rawlinson S, Pryor M, Wright P, Jans D 2009 CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. J Biol Chem 284(23):15589-97.
- 50 Sanchez V, Mahr J, Orazio N, et al 2007 Nuclear export of the human cytomegalovirus tegument protein pp65 requires cyclin-dependent kinase activity and the Crm1 exporter. J Virol 81(21):11730-6.
- Sorokin AV et al. 2007. Nucleocytoplasmic transport of proteins. Biochemistry 72:1439-1457.
- 55 Terry LJ et al. 2007. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. Science 318:1412-1416.
- Van der Watt PJ et al. 2008. The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation. Int J Canc. 124:1829-1840.
- 60 Walsh MD et al. 2008 Exportin 1 inhibition attenuates nuclear factor-kappaB-dependent gene expression. Shock 29:160-166.
- 65 Williams P, Verhagen J, Elliott G 2008 Characterization of a CRM1-dependent nuclear export signal in the C terminus of herpes simplex virus type 1 tegument protein UL47. J Virol 82(21):10946-52.

Yang W 2007 Anti-tumor activity of novel nuclear export inhibitors (NEIs) in multiple murine leukemia models. AACR Annual Meeting. Poster 5597.

- 5 Yao Y et al. 2009. The expression of CRM1 is associated with prognosis in human osteosarcoma. Oncol Rep. 21:229-35.

Zimmerman TL et al 2006 Nuclear export of retinoid X receptor alpha in response to interleukin-1beta-mediated cell signaling: roles for JNK and SER260. J Biol Chem281:15434-15440.

- 10 Las enseñanzas de todas las patentes, solicitudes publicadas y referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

- 15 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones de ejemplo de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

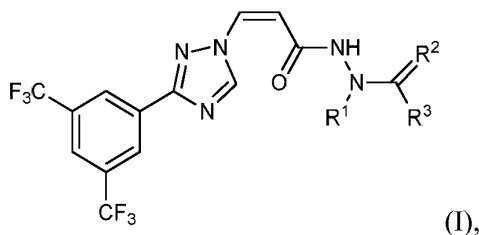
Yao Y et al. 2009. The expression of CRM1 is associated with prognosis in human osteosarcoma. Oncol Rep. 21:229-35.

- 20 Zimmerman TL et al 2006 Nuclear export of retinoid X receptor alpha in response to interleukin-1beta-mediated cell signaling: roles for JNK and SER260. J Biol Chem281:15434-15440.

- 25 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones de ejemplo de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que:

R^1 se selecciona de hidrógeno y alquilo C_1-C_4 ;

R^2 se selecciona de O y S; y

R^3 se selecciona de $-N(R^4)$ -(cicloalquilo C_3-C_6), alquilo C_1-C_6 , -(alquilen C_0-C_4)-heterociclilo y -(alquilen C_0-C_4)-heteroarilo, en el que cualquier porción alquilo, alquilen, heterociclilo y heteroarilo de R^3 está opcional e independientemente sustituida; y

R^4 se selecciona de hidrógeno y alquilo C_1-C_4 .

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que:

R^1 se selecciona de hidrógeno y metilo;

R^1 es hidrógeno;

R^2 es O; y/o

R^4 es hidrógeno.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que R^3 se selecciona de $-N(R^4)$ -(cicloalquilo C_3-C_6), -alquilo C_3-C_6 , -(alquilen C_0-C_1)-heterociclilo y -(alquilen C_0-C_1)-heteroarilo, en el que:

cualquier porción alquilo o alquilen de cualquier R^3 está opcional e independientemente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en oxo y $-N(R^5)_2$, en el que cada R^5 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_4 ;

cualquier porción heterociclilo de R^3 comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo, y está opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo C_1-C_4 y oxo; y

cualquier porción heteroarilo de R^3 comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo y está opcionalmente sustituida con uno o más alquilo C_1-C_4 .

4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que:

R^3 se selecciona de $-C(CH_3)_3$, -NH-ciclopropilo, $-CH_2$ -pirazin-2-ilo, -pirazin-2-ilo, $-CH_2$ -morfolin-4-ilo y 5-metil-1-H-pirazol-4-ilo;

R^3 es -(alquilen C_0-C_1)-heterociclilo; o

R^3 es -(alquilen C_1)-heterociclilo.

5. El compuesto de la reivindicación 3, en el que R^3 es -(alquilen C_0-C_1)-heterociclilo en el que:

el heterociclilo se selecciona de pirazinilo, piperidinilo, morfolinilo, y pirazolilo; o

el heterociclilo es morfolinilo.

6. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que:

(i) cualquier porción alquilo, alquilen, heterociclilo y heteroarilo de R^3 está opcional e independientemente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en -OH, SH, nitro, halógeno, amino, ciano, alquilo C_1-C_{12} , alquilenilo C_2-C_{12} o alquiniilo C_2-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} , haloalquilo C_1-C_{12} , haloalcoxi C_1-C_{12} y alquil C_1-C_{12} sulfanilo;

(ii) cualquier porción alquilo, alquilen, heterociclilo y heteroarilo de R^3 están opcional e independientemente sustituidos con un grupo amino que tiene la fórmula $-N(R^5)_2$, en el que cada R^5 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_4 ;

(iii) cualquier porción heteroarilo de R^3 está opcional e independientemente sustituida con uno o más

sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, alquilo C₁-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂, haloalquilo C₁-C₁₂, haloalcoxi C₁-C₁₂ y alquilo C₁-C₁₂ sulfanilo; y cualquier porción alquilo, alquileo o heterociclilo de R³ está opcional e independientemente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, alquilo C₁-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂, haloalquilo C₁-C₁₂, haloalcoxi C₁-C₁₂ y alquilo C₁-C₁₂ sulfanilo;

(iv) R³ se selecciona de -N(R⁴)-(cicloalquilo C₃-C₆), -alquilo C₃-C₆, -(alquilen C₀-C₁)-heterociclilo y -(alquilen C₀-C₁)-heteroarilo, en el que:

cualquier porción alquilo o alquileo de R³ está opcionalmente sustituida con -N(R⁵)₂, en la que cada R⁵ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₄;

cualquier porción heterociclilo y heteroarilo de R³ comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo; y cualquier porción heterociclilo y heteroarilo de R³ está opcionalmente sustituida con alquilo C₁-C₄;

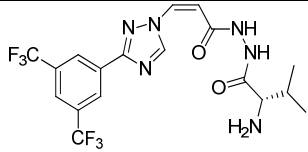
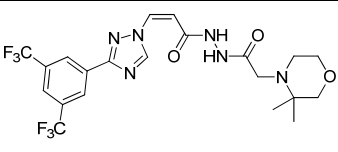
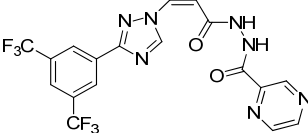
(v) R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropilo, -(CH₂)₀₋₁-pirazinilo, piperidinilo, hidroxipiperidinilo, N-metilpiperidinilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y metilpirazolilo.

(vi) R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropilo, -(CH₂)₀₋₁-pirazin-2-ilo, piperidin-3-ilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y 5-metil-1H-pirazol-4-ilo.

(vii) R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -NH-ciclopropilo, -CH₂-pirazin-2-ilo, -pirazin-2-ilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y 5-metil-1H-pirazol-4-ilo.

7. El compuesto de la reivindicación 1 representado por una cualquiera de cualquiera de las fórmulas estructurales establecidas a continuación:

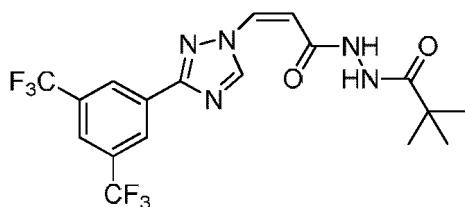
N.º de compuesto	Estructura del compuesto	N.º de compuesto	Estructura del compuesto
1		9	
2		10	
3		11	
4		12	
5		13	
6		14	

5	7		15	
10	8			

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. El compuesto de la reivindicación 7, seleccionado de uno cualquiera de los compuestos 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12 y 13, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

9. El compuesto de la reivindicación 8, representado por la siguiente fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado con la actividad CRM1.

12. El compuesto para su uso o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el trastorno se selecciona de un trastorno proliferativo, un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmune, una infección vírica, un trastorno oftalmológico, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno del crecimiento anormal de tejido, un trastorno relacionado con la ingesta de alimentos, alergias y un trastorno respiratorio.

13. El compuesto para su uso o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el trastorno es cáncer; opcionalmente en el que el cáncer es linfoma.

14. El compuesto para su uso o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición se administra junto con un segundo agente terapéutico útil para tratar el cáncer.

15. El compuesto para su uso o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que:

el trastorno es artritis;
 el trastorno es psoriasis;
 el trastorno es obesidad;
 el trastorno es accidente cerebrovascular;
 el trastorno es lesión cerebral traumática; o
 el trastorno se selecciona de esclerosis múltiple, lupus y esclerosis lateral amiotrófica.

16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso estimulando la cicatrización de heridas en un sujeto en necesidad del mismo.

17. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que:

la herida es una herida superficial, una herida quirúrgica, una herida interna, una herida crónica, una úlcera, una

quemadura, o un resultado de la exposición a la radiación; o

la herida se selecciona del grupo que consiste en una herida por quemadura, una herida incisa, una herida abierta, una herida quirúrgica o posquirúrgica, una lesión diabética, una quemadura térmica, una quemadura química, una quemadura por radiación, una úlcera por presión, una escara, y una afección relacionada con la diabetes o con la mala circulación.

5

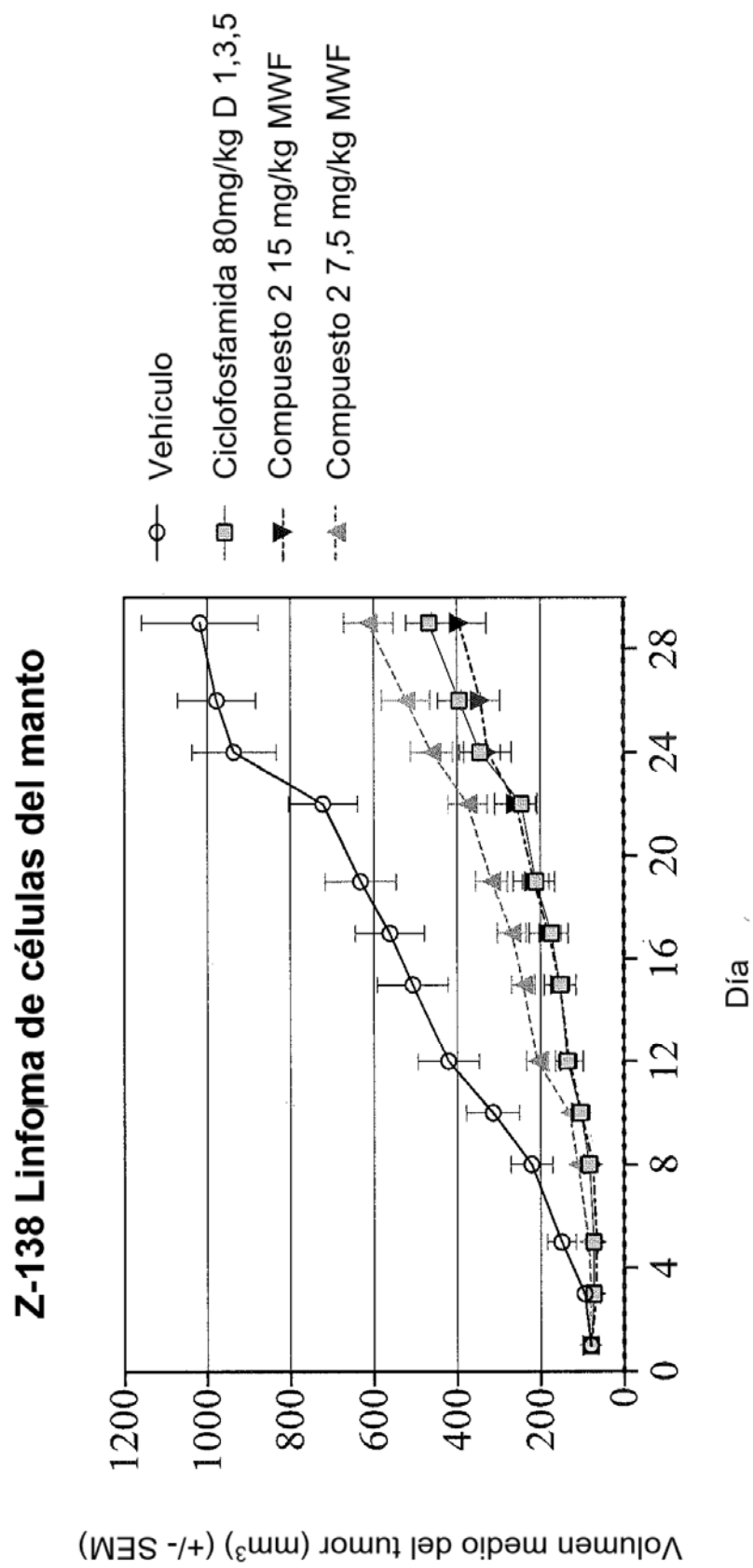


FIG. 1

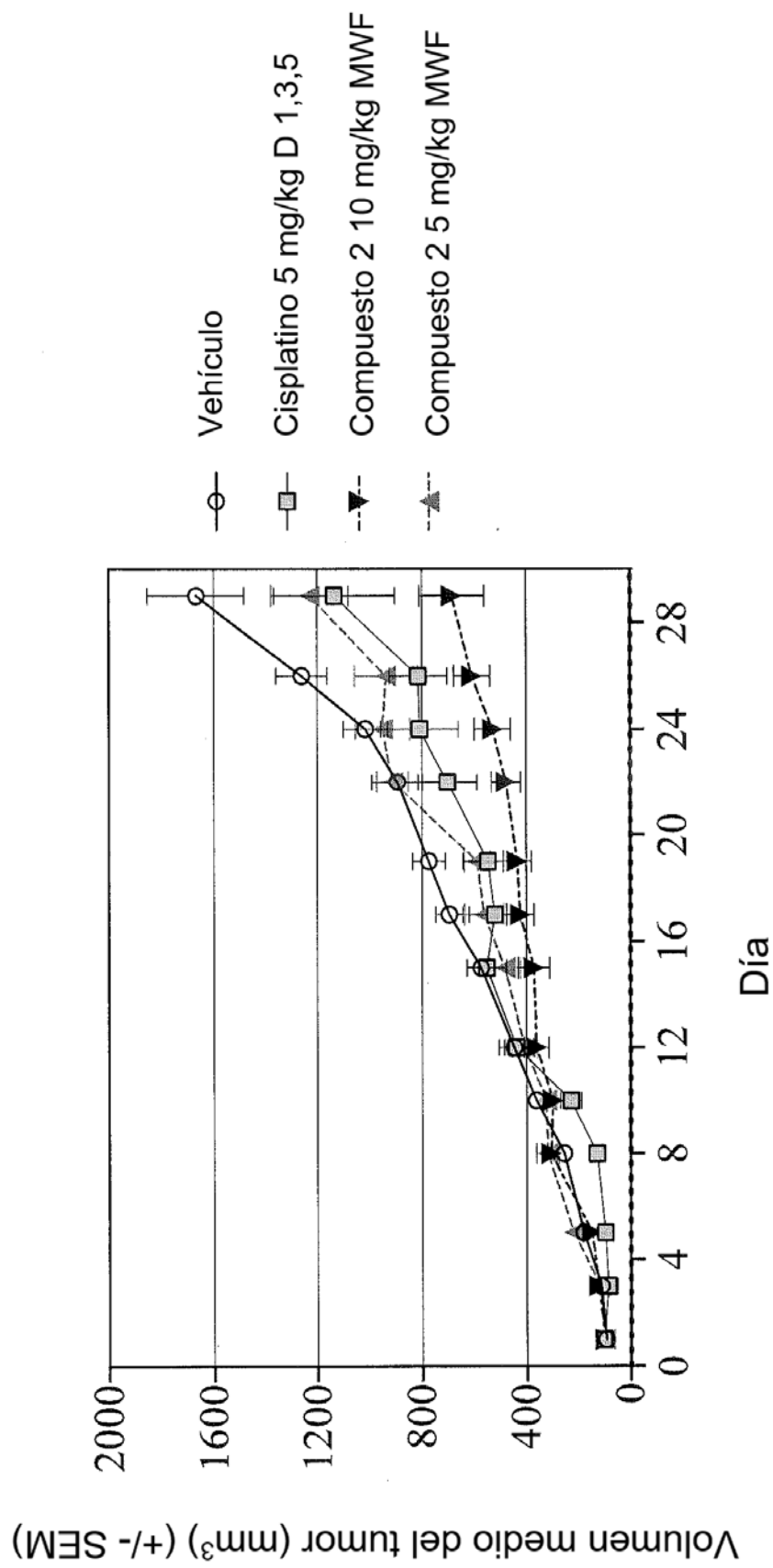


FIG. 2

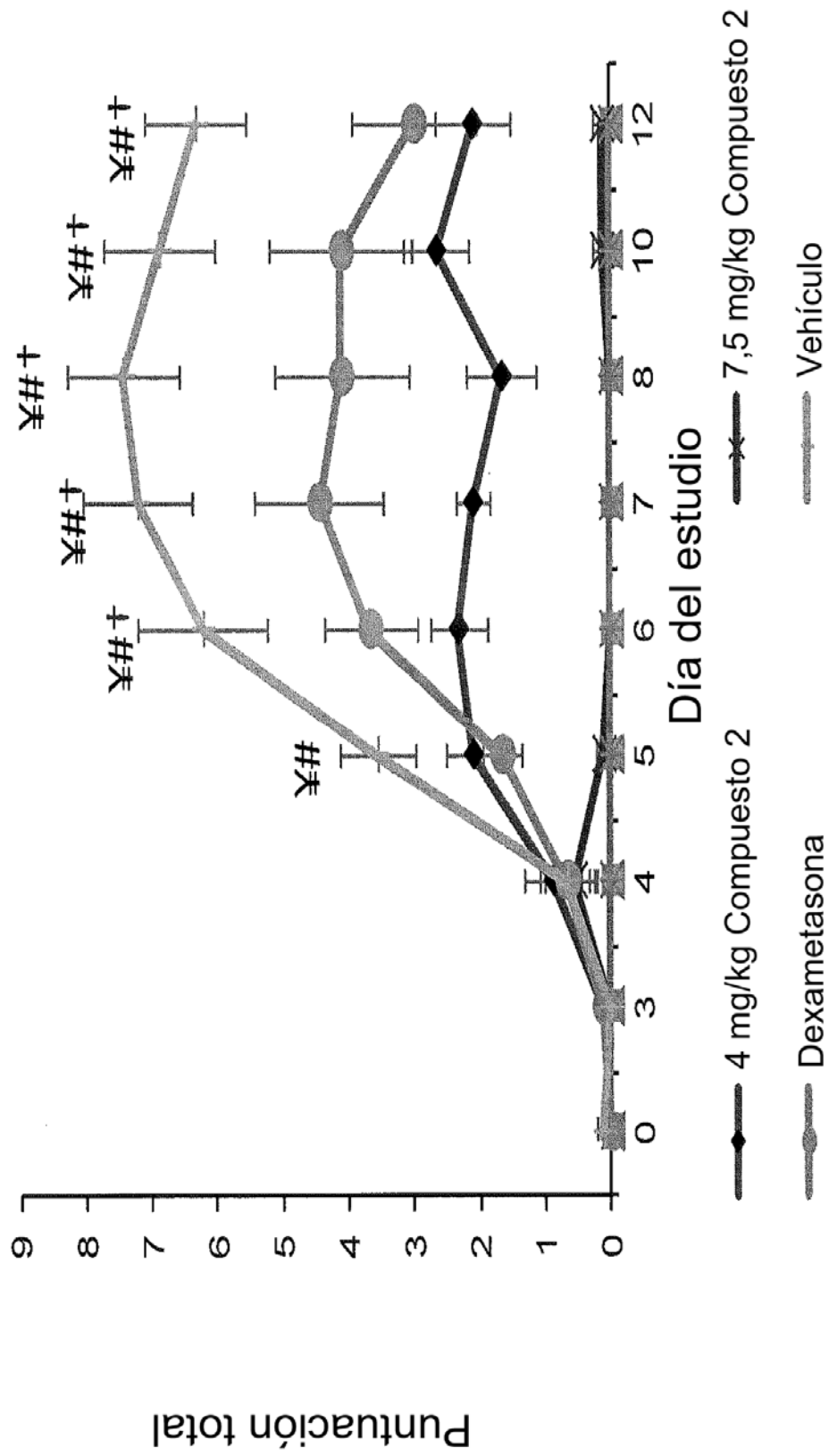


FIG. 3A

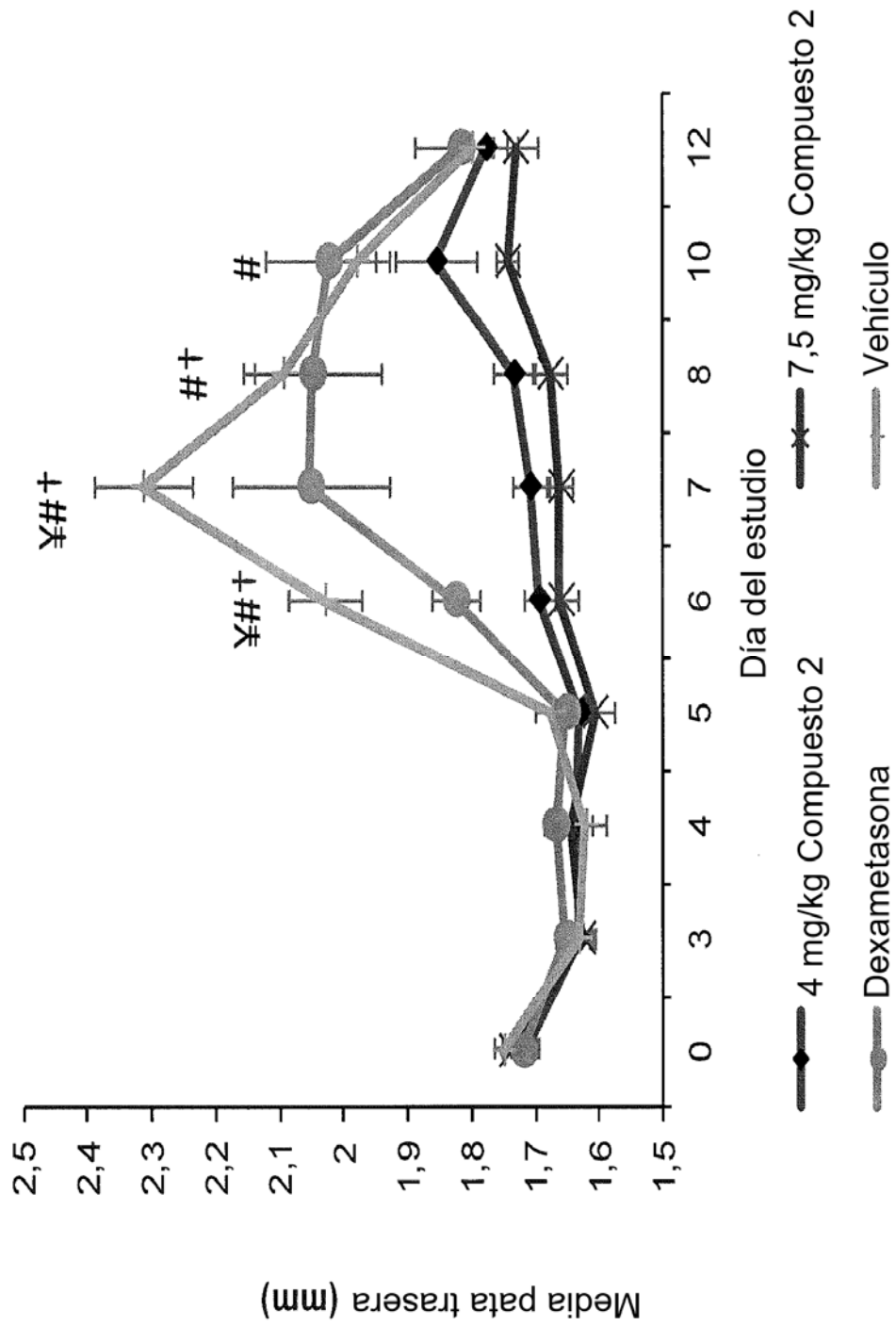


FIG. 3B

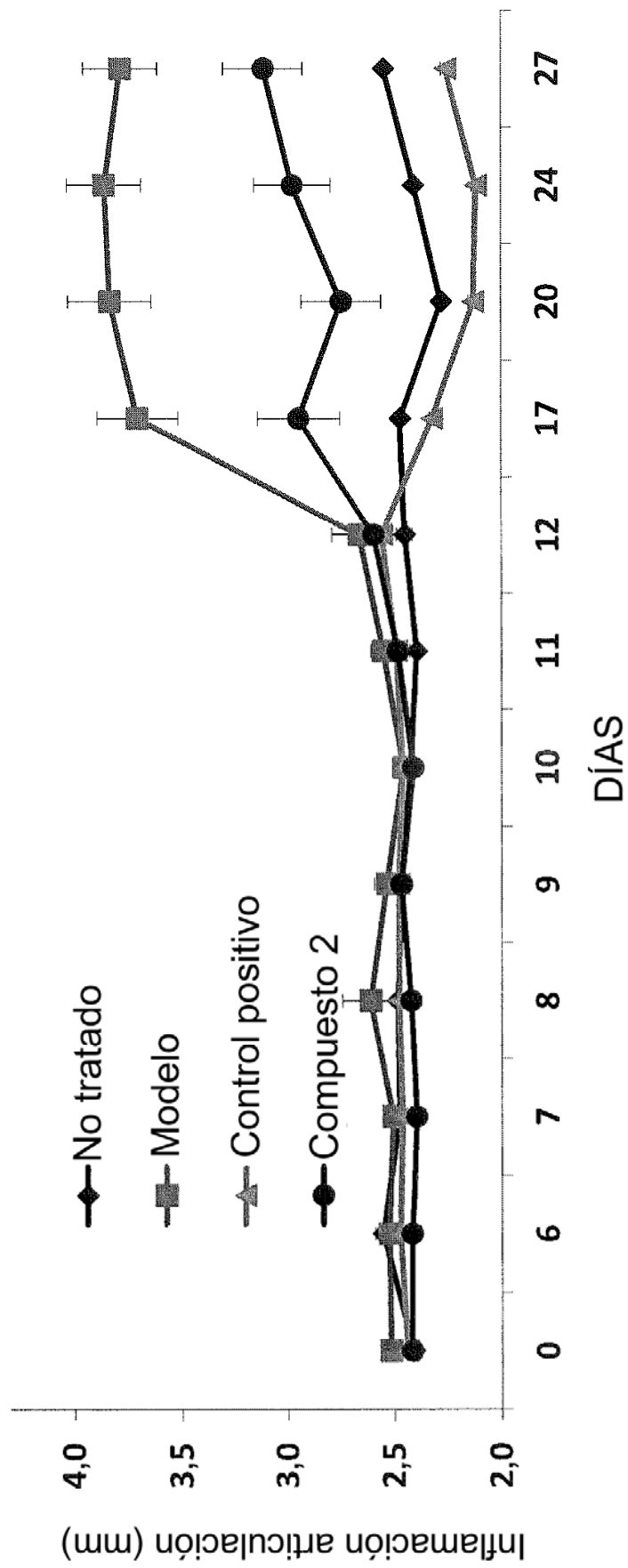


FIG. 4A

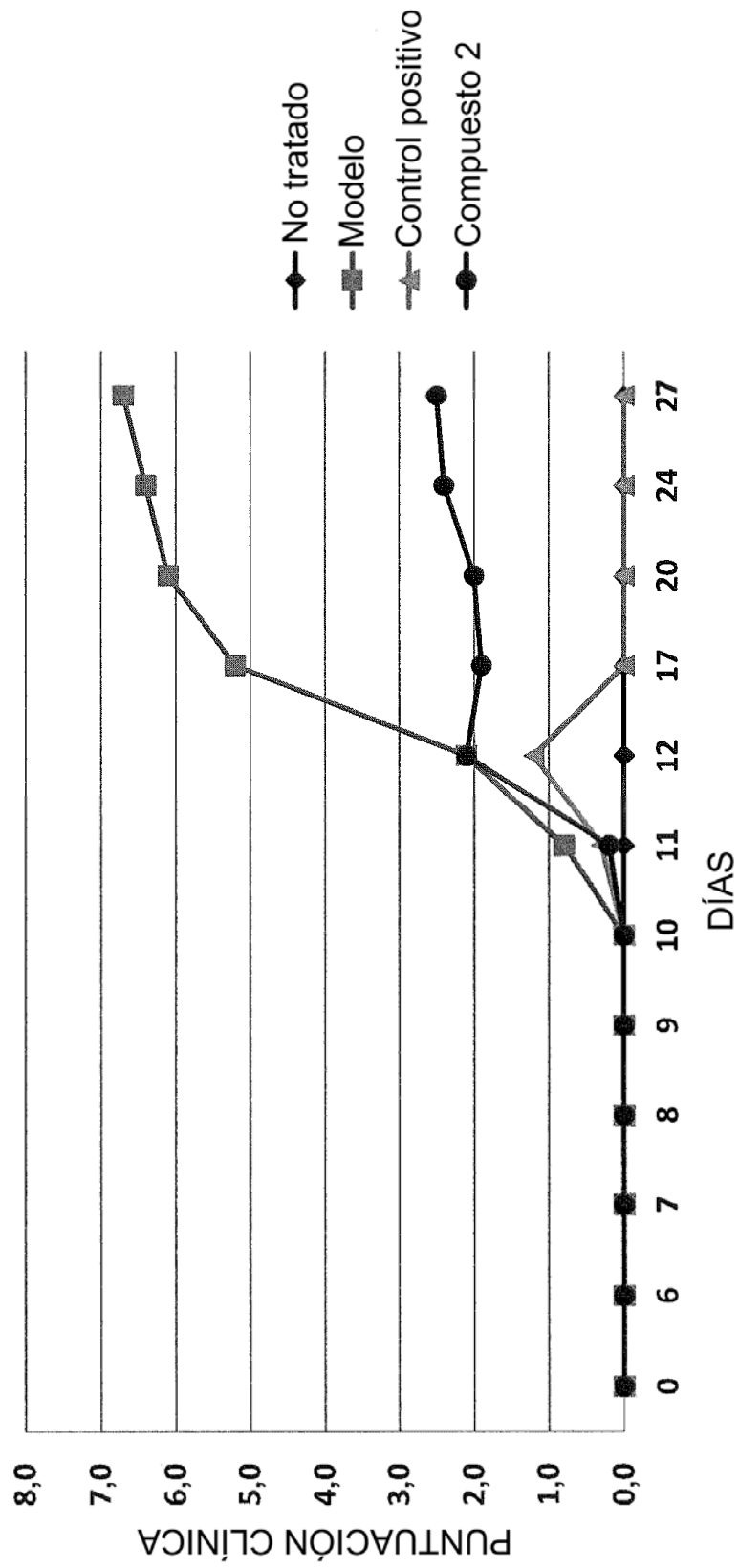
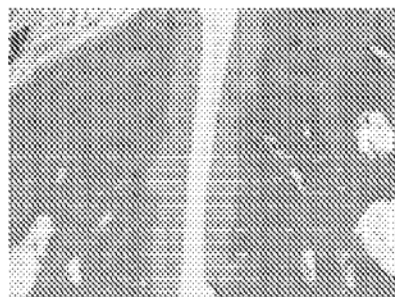
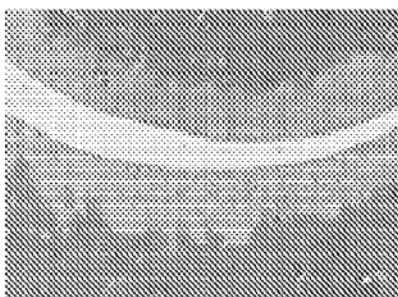
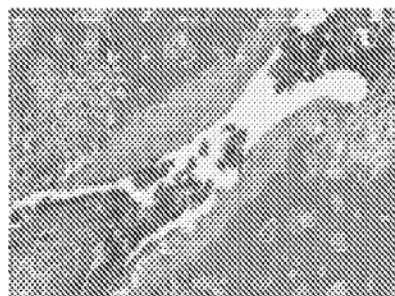
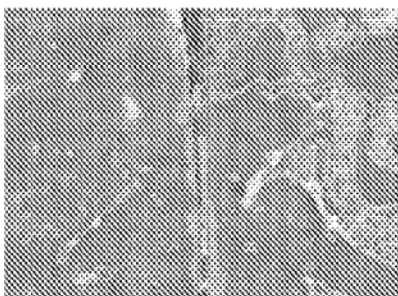


FIG. 4B

A) No tratado



B) Modelo



C) Control positivo



D) Compuesto 2

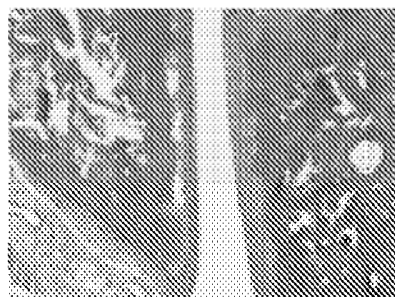
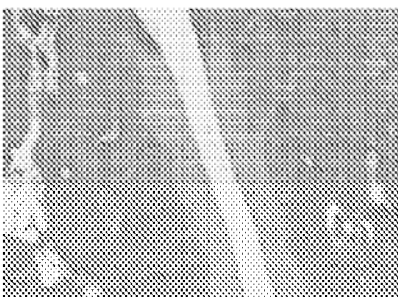


FIG. 5

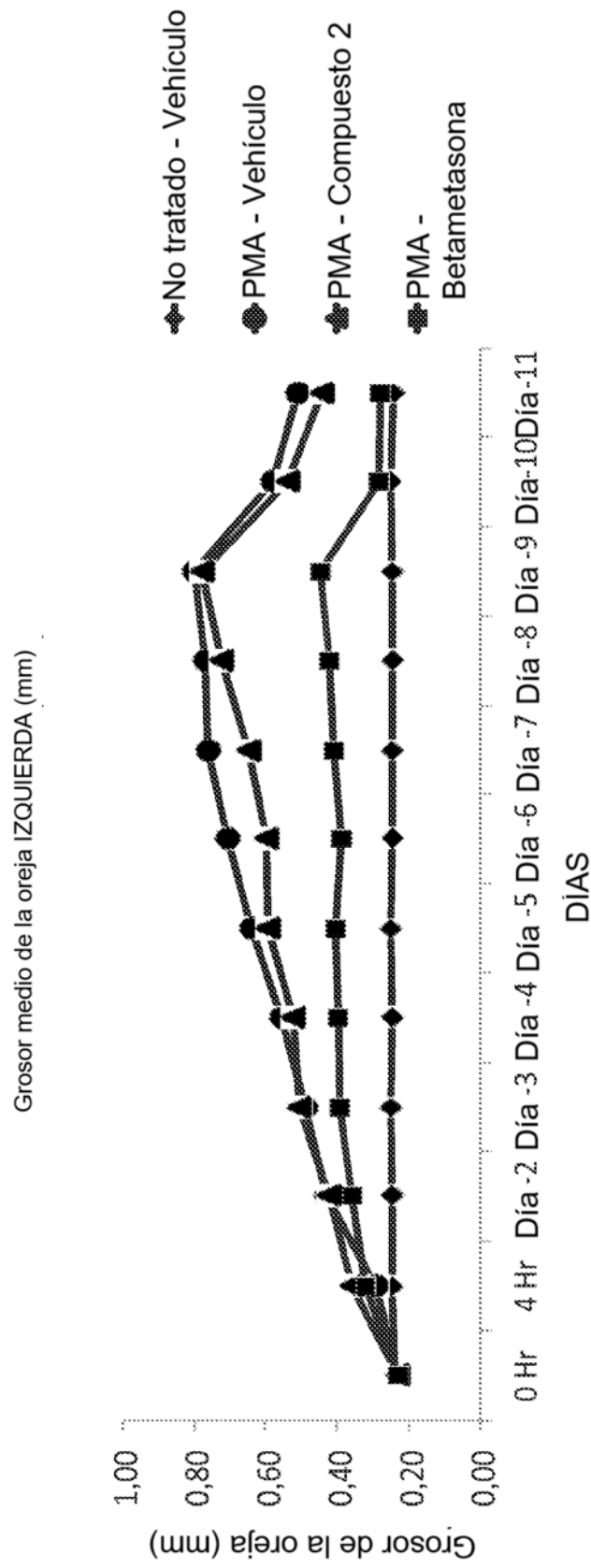


FIG. 6A

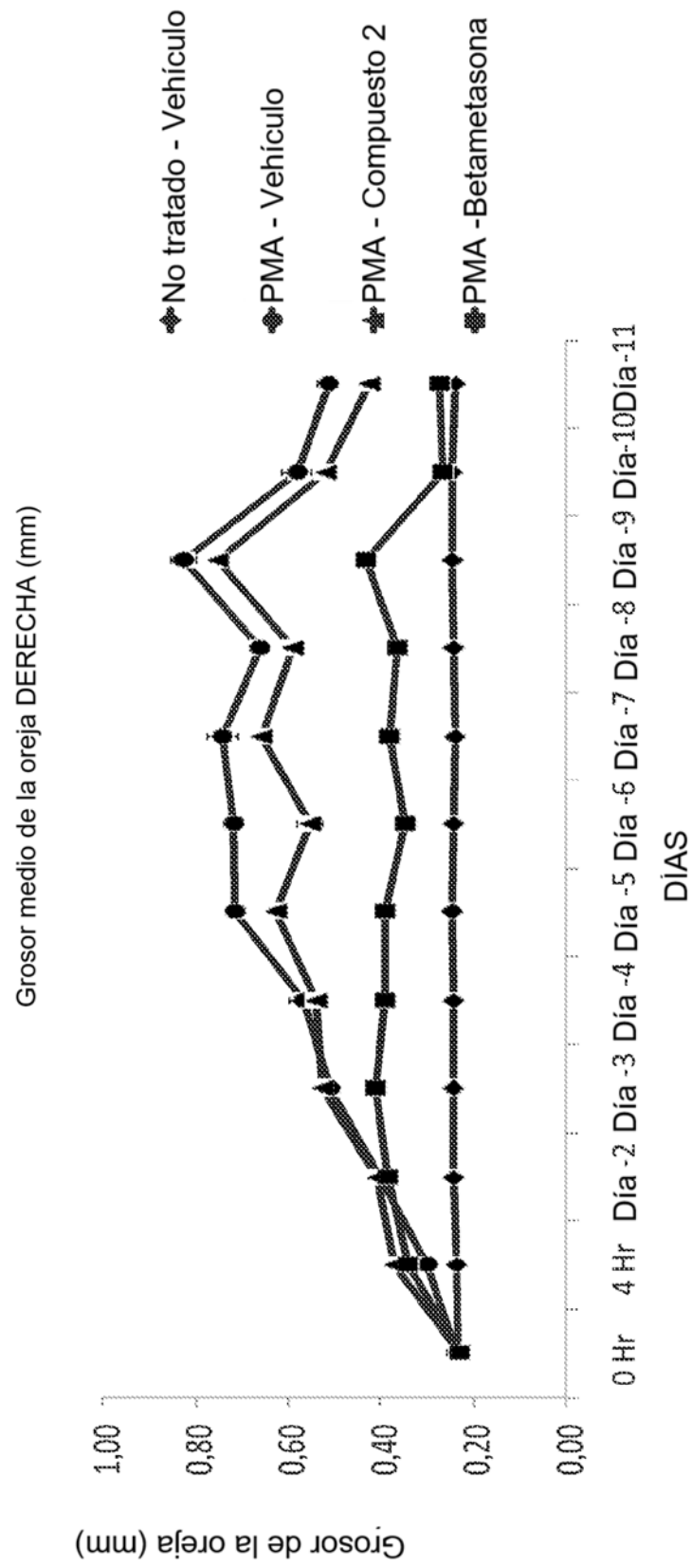


FIG. 6B

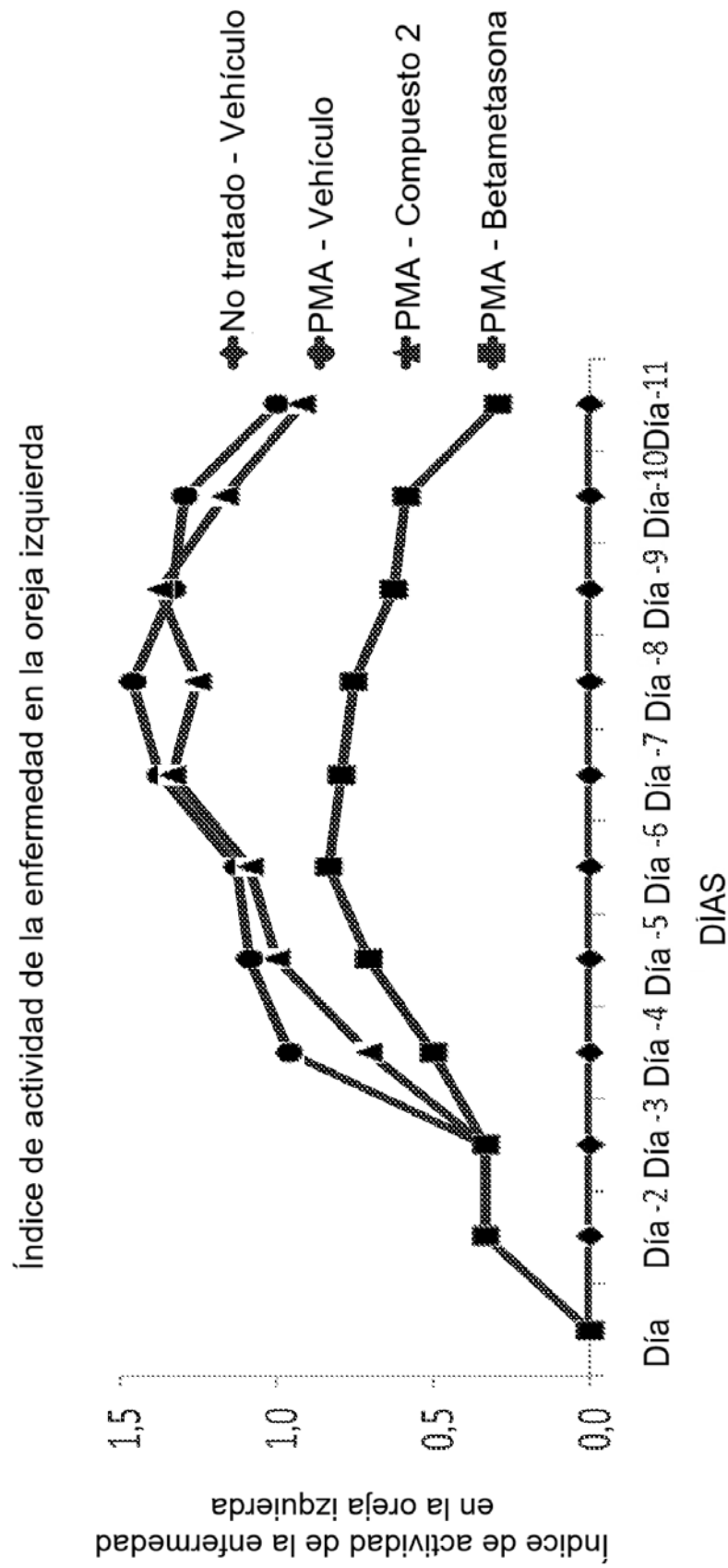


FIG. 6C

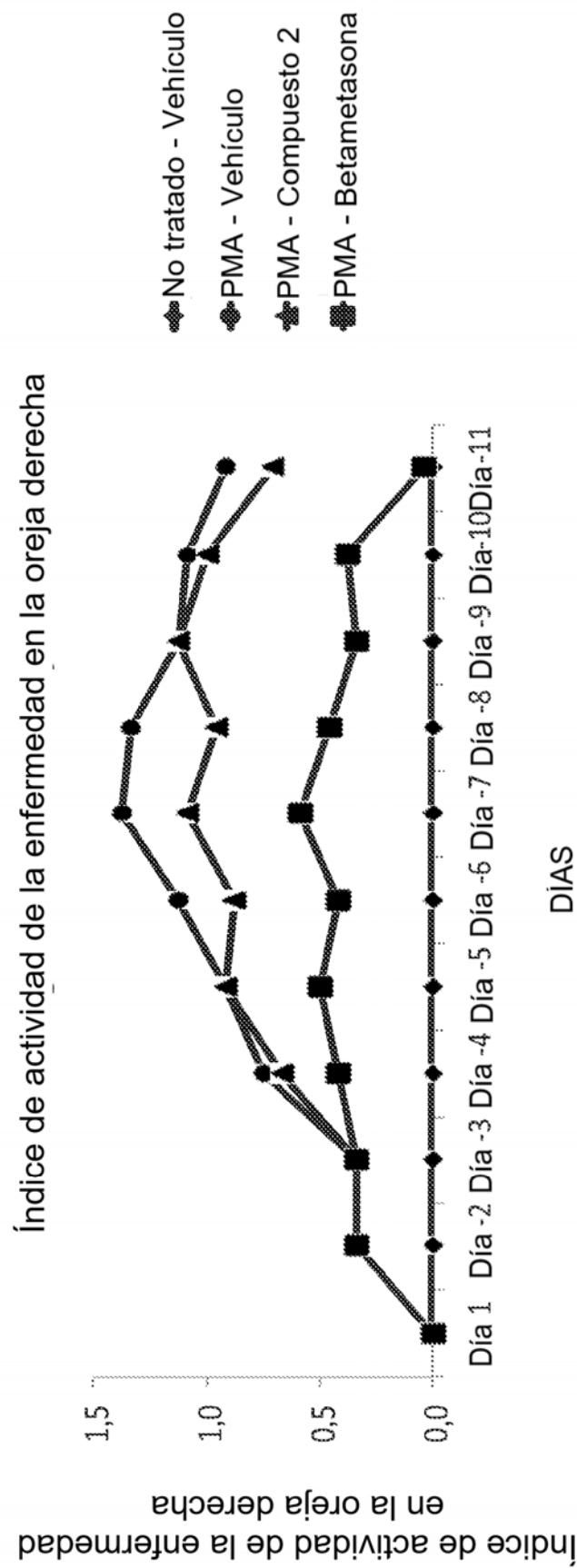


FIG. 6D

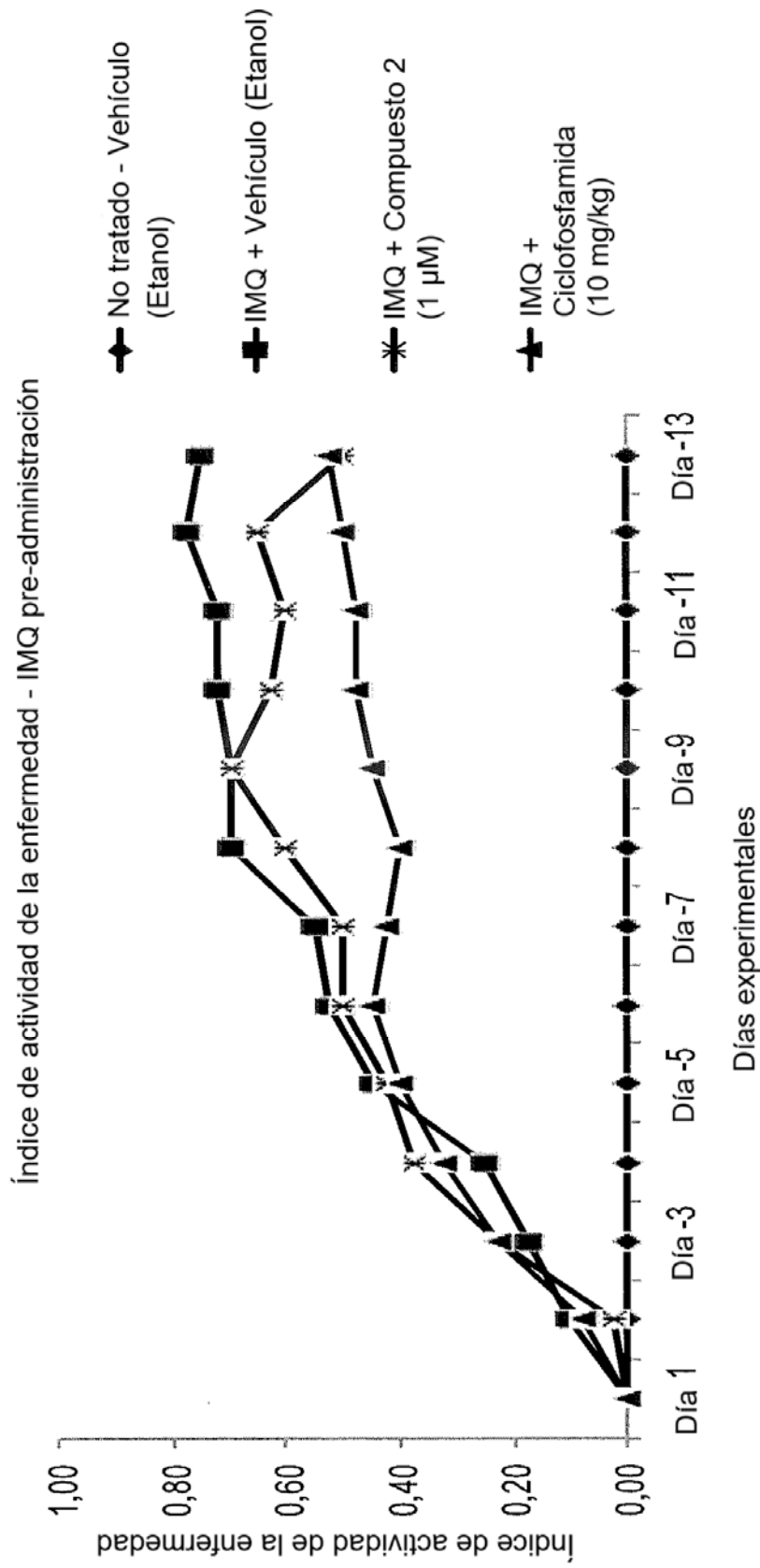


FIG. 7A

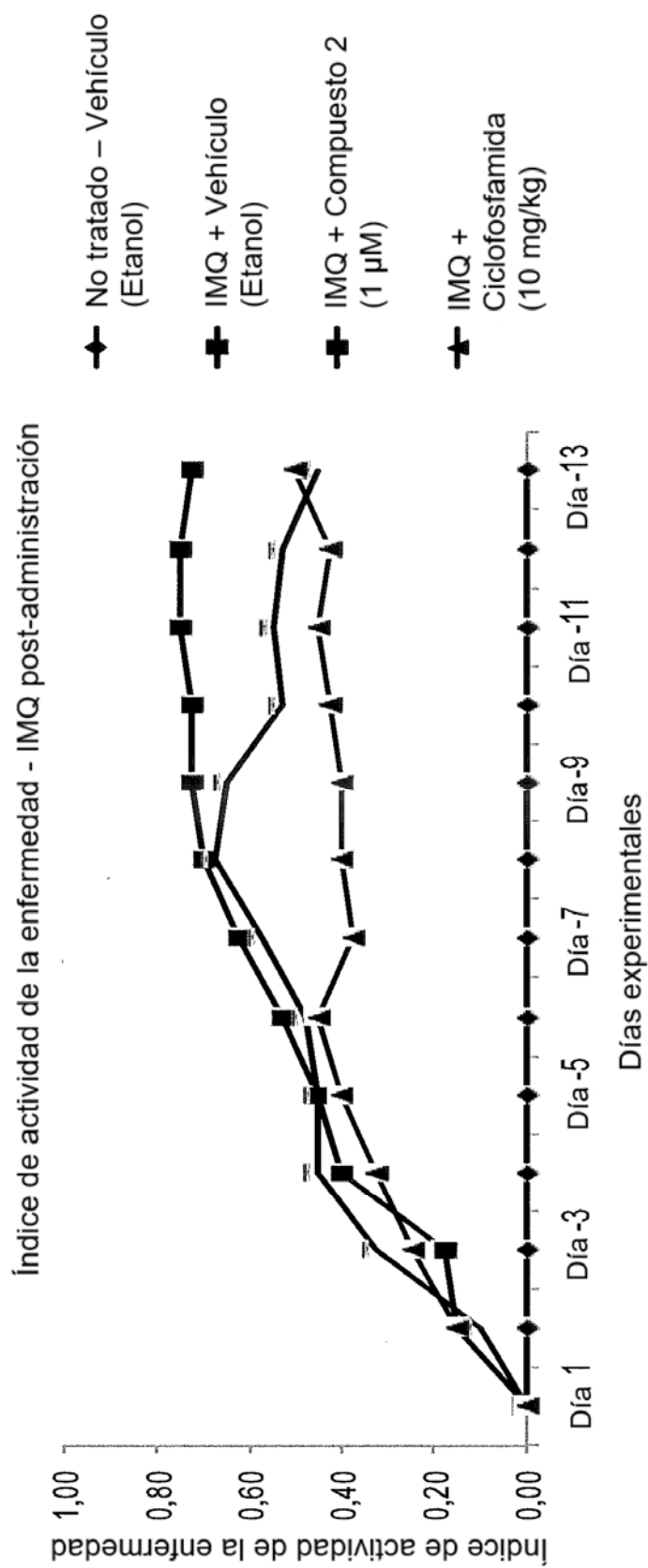


FIG. 7B

Ratas Zucker: Ingesta acumulativa de comida

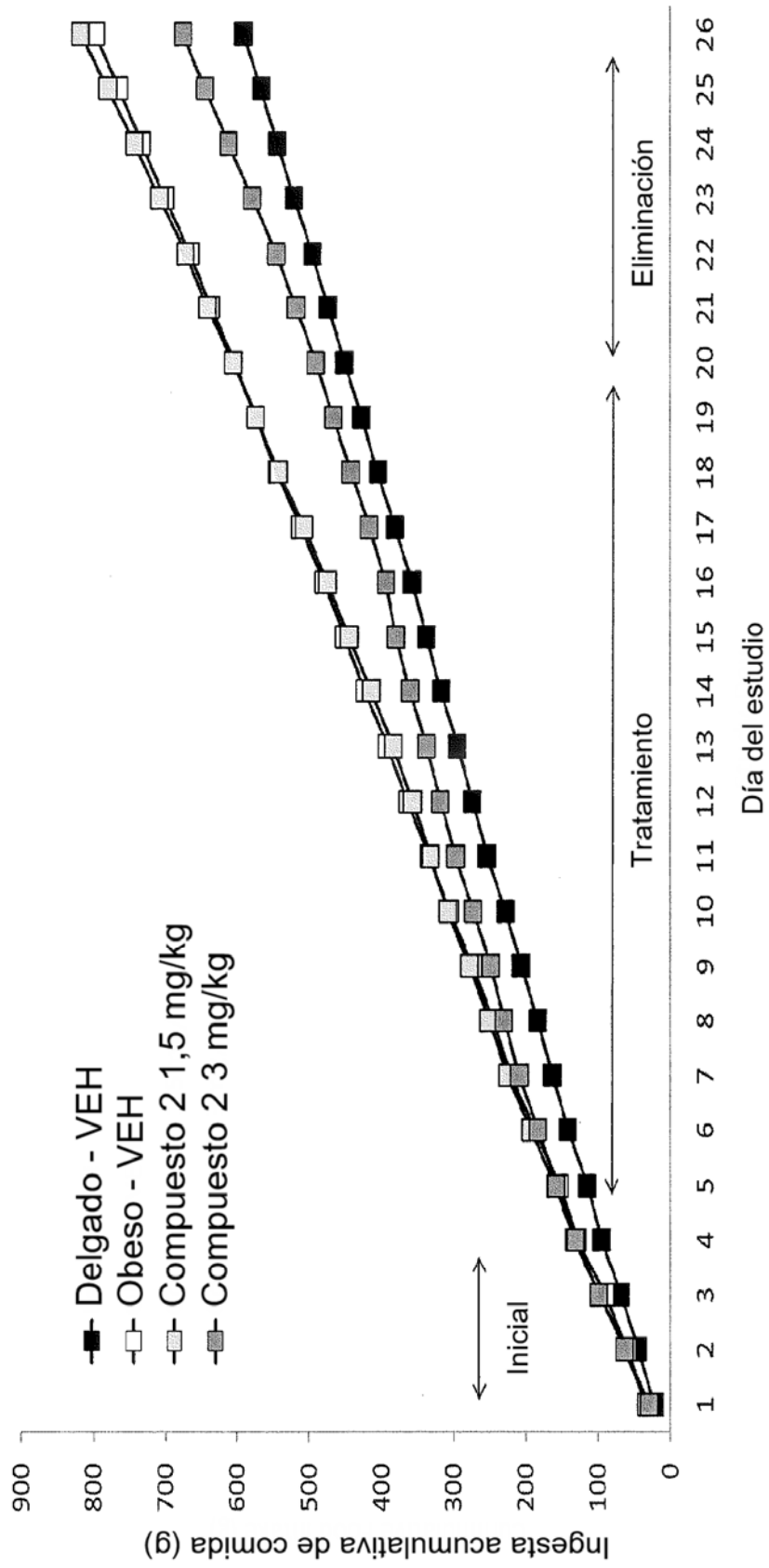


FIG. 8A

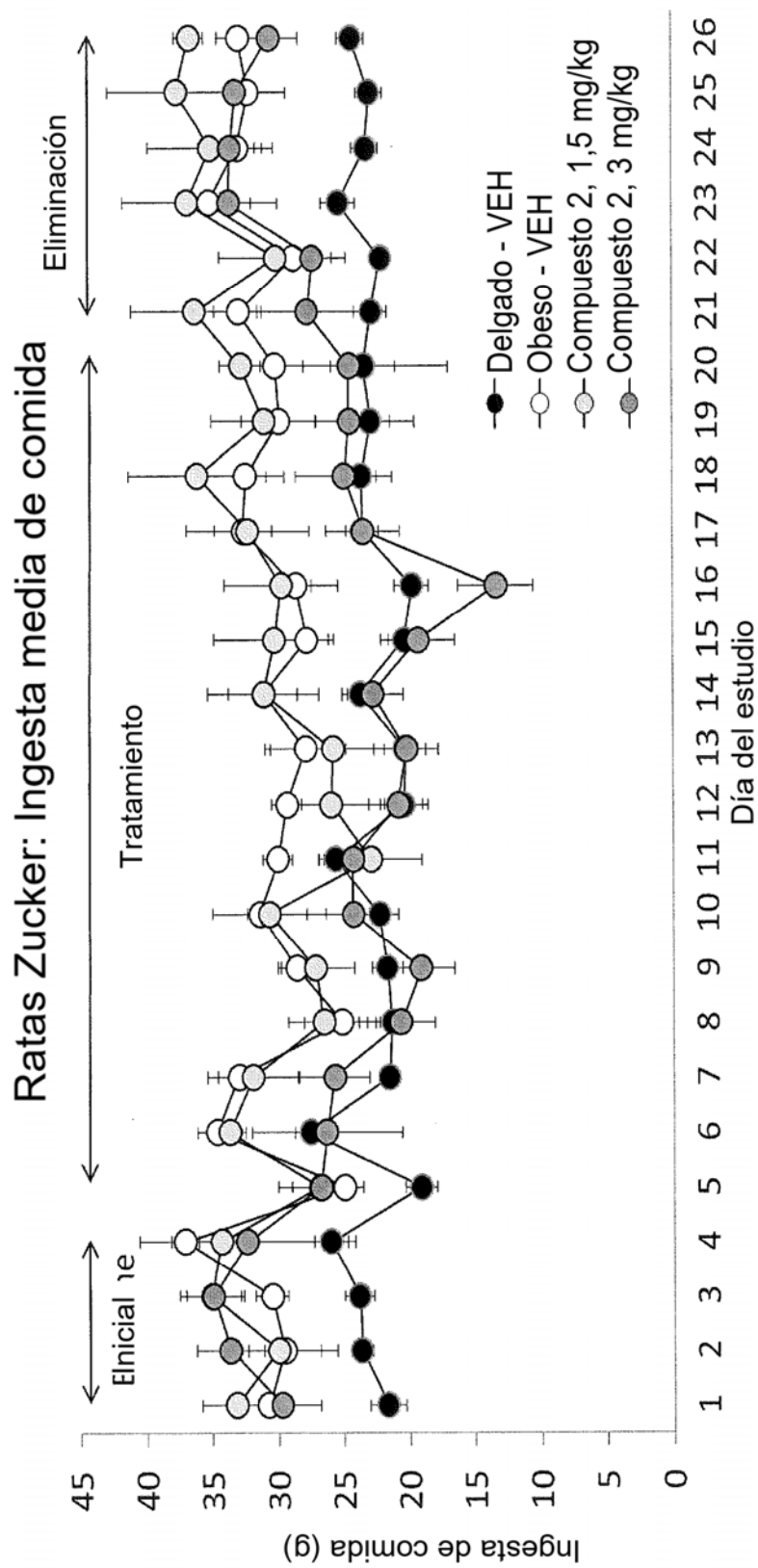


FIG. 8B

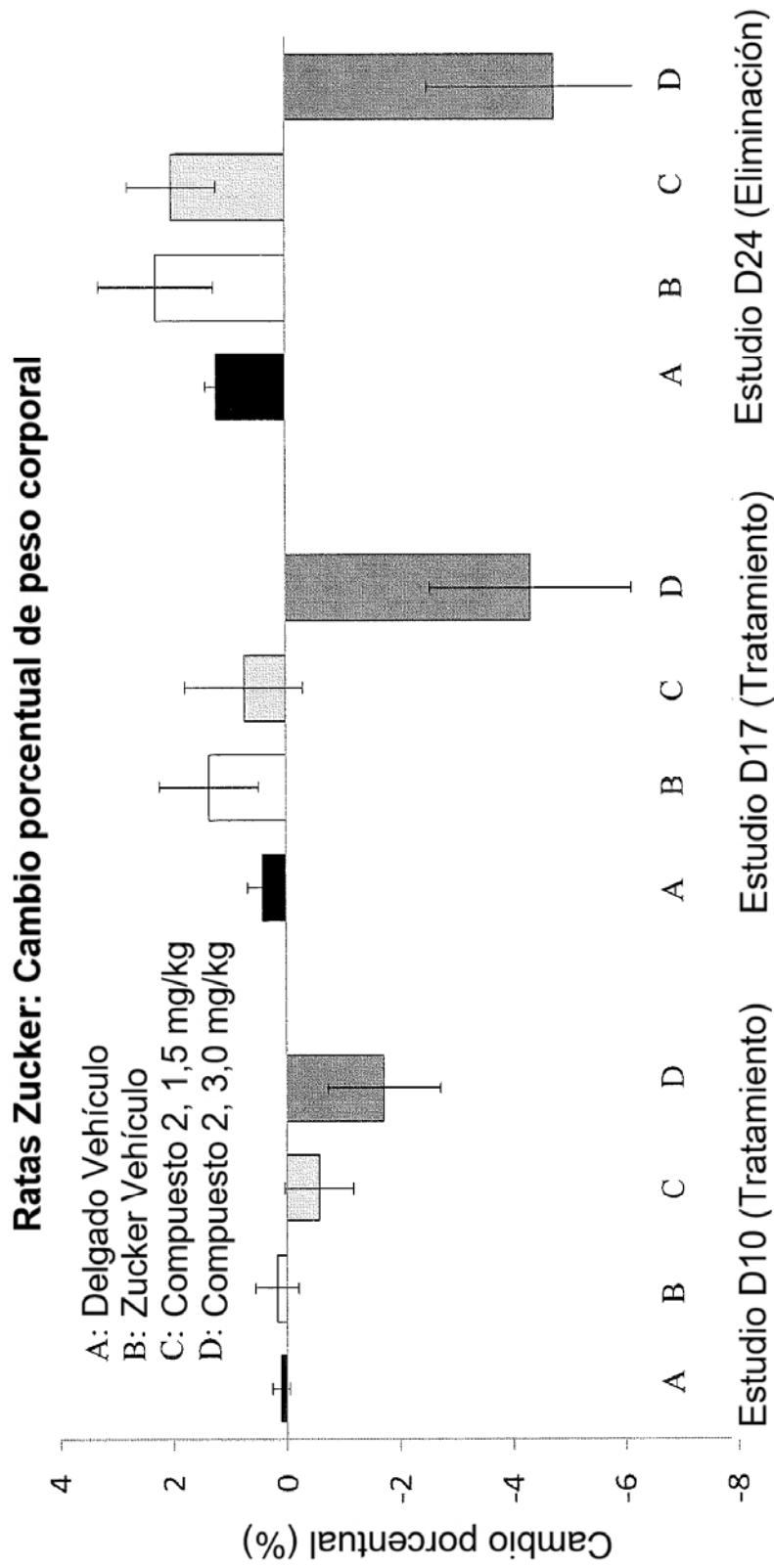


FIG. 9

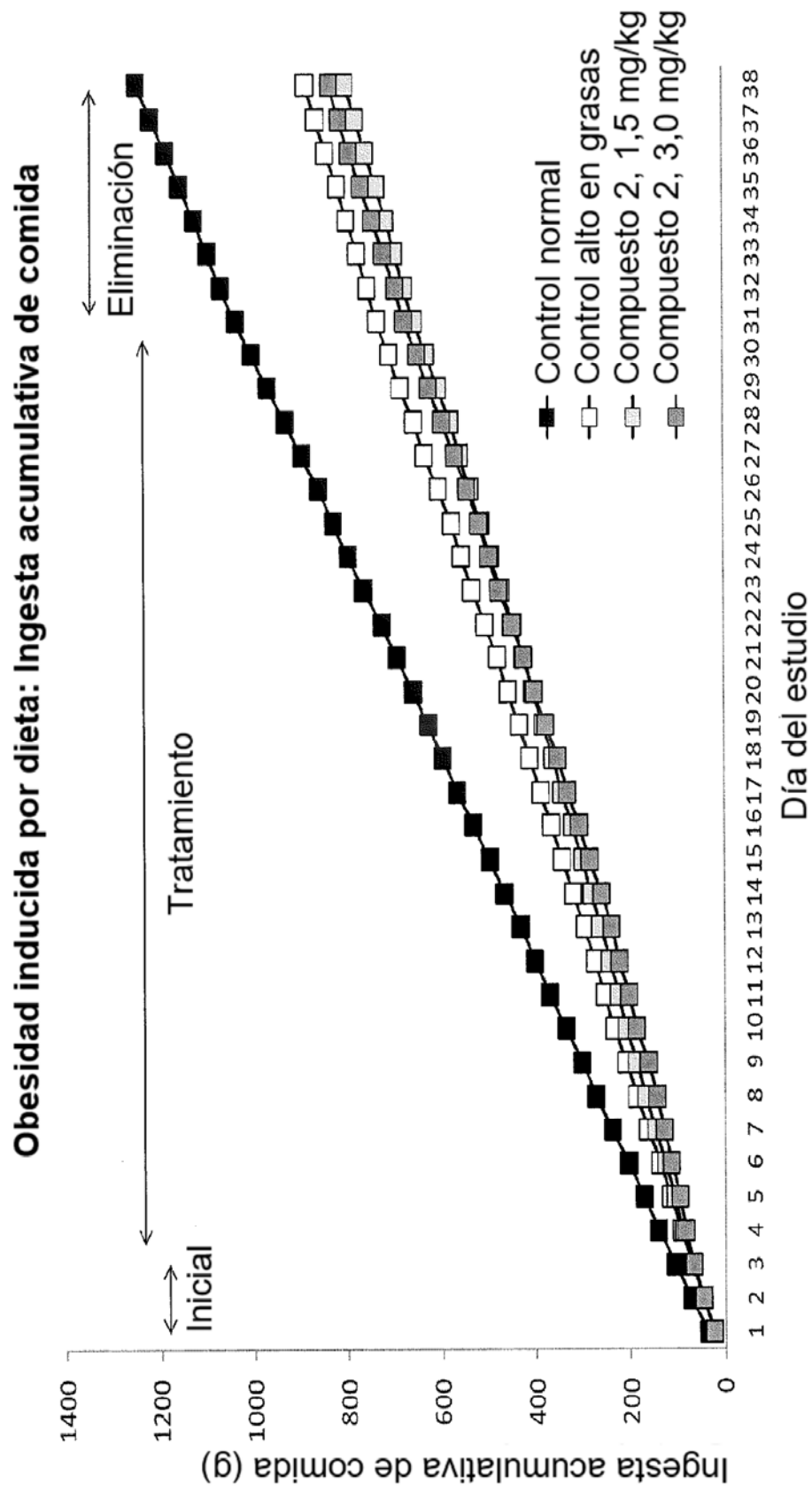


FIG. 10A

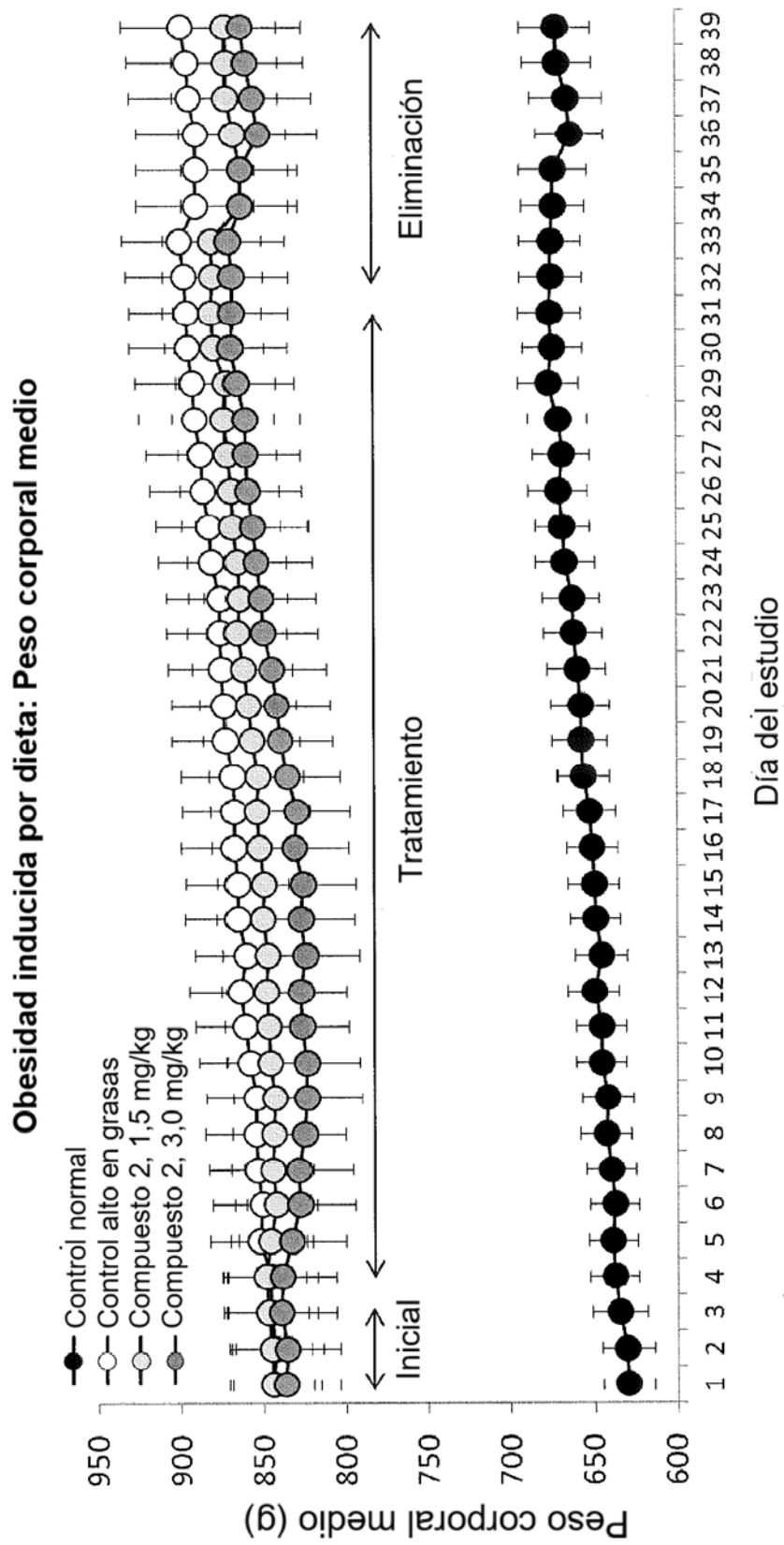


FIG. 10B

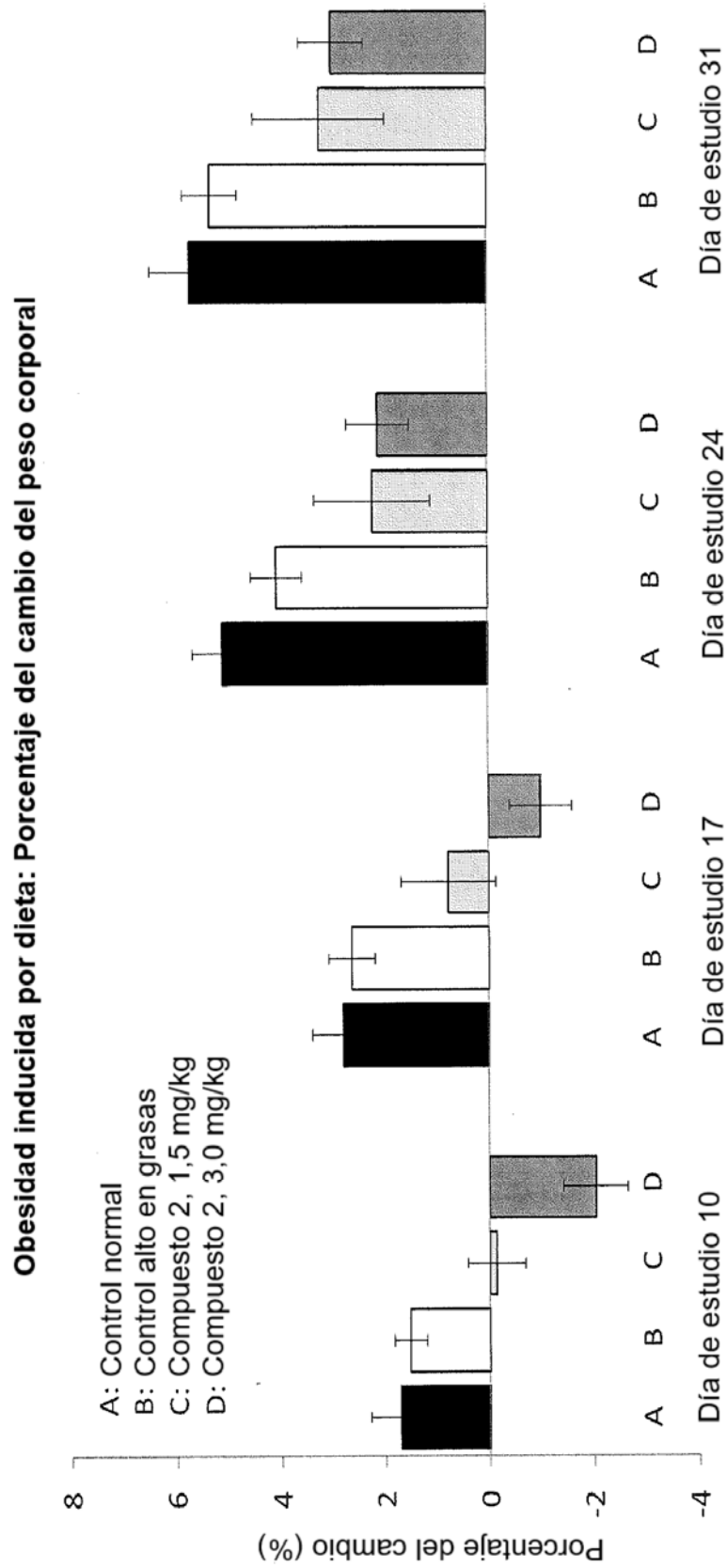


FIG. 11

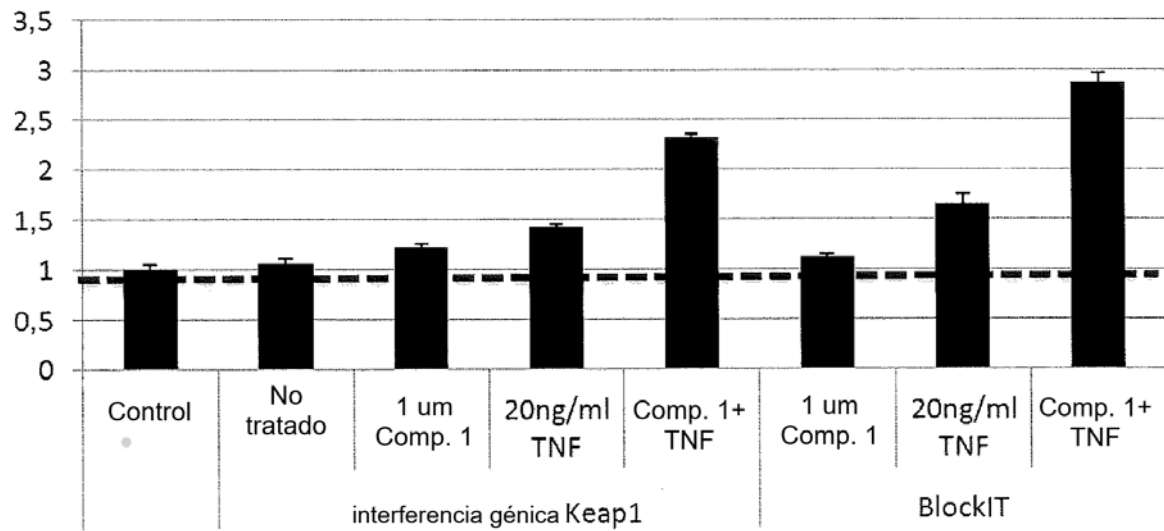


FIG. 12A

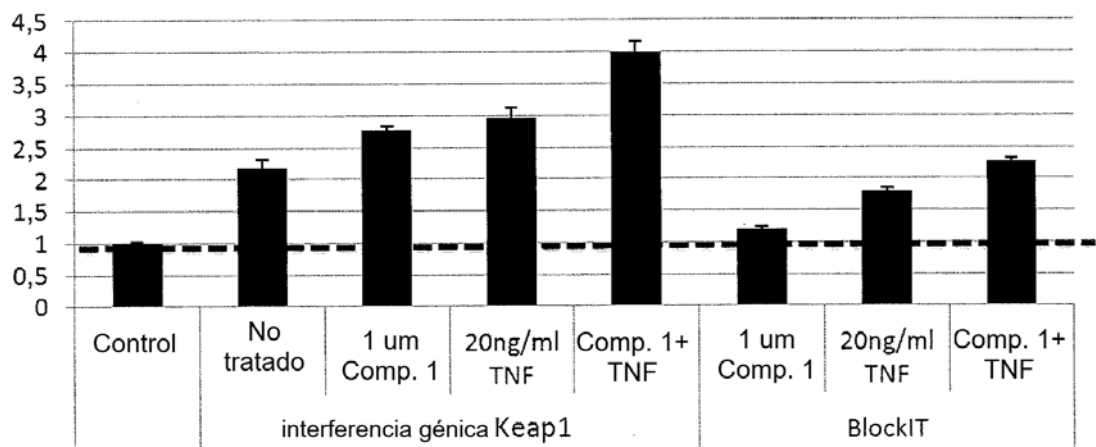


FIG. 12B

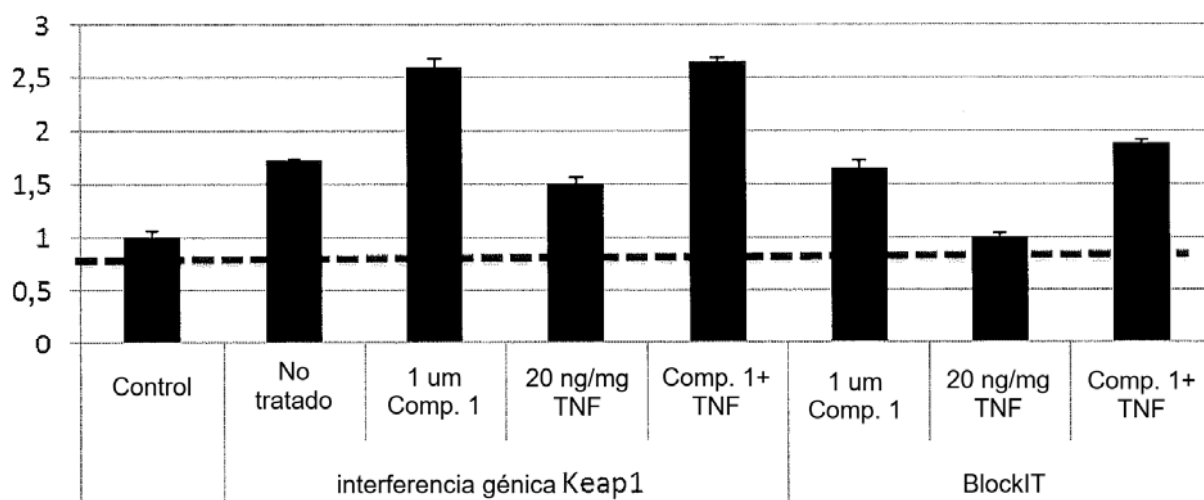


FIG. 12C

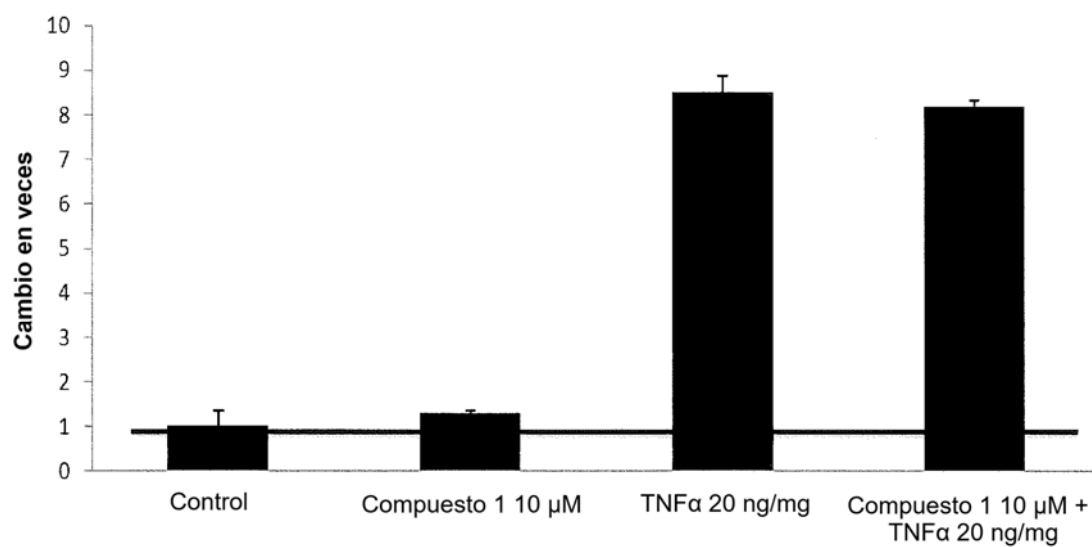


FIG. 13A

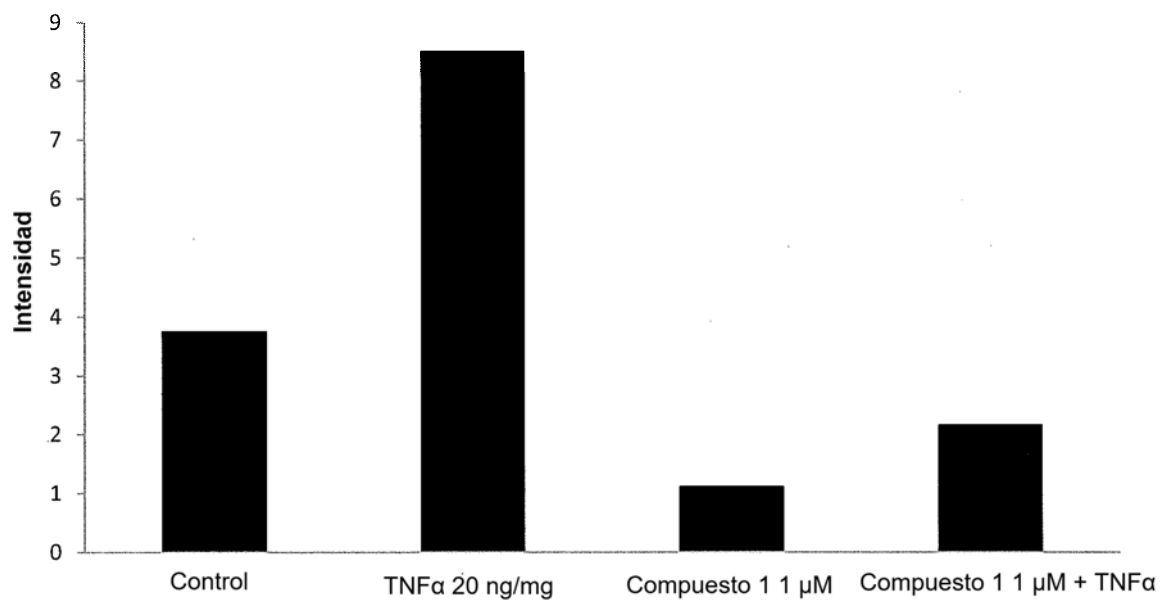


FIG. 13B

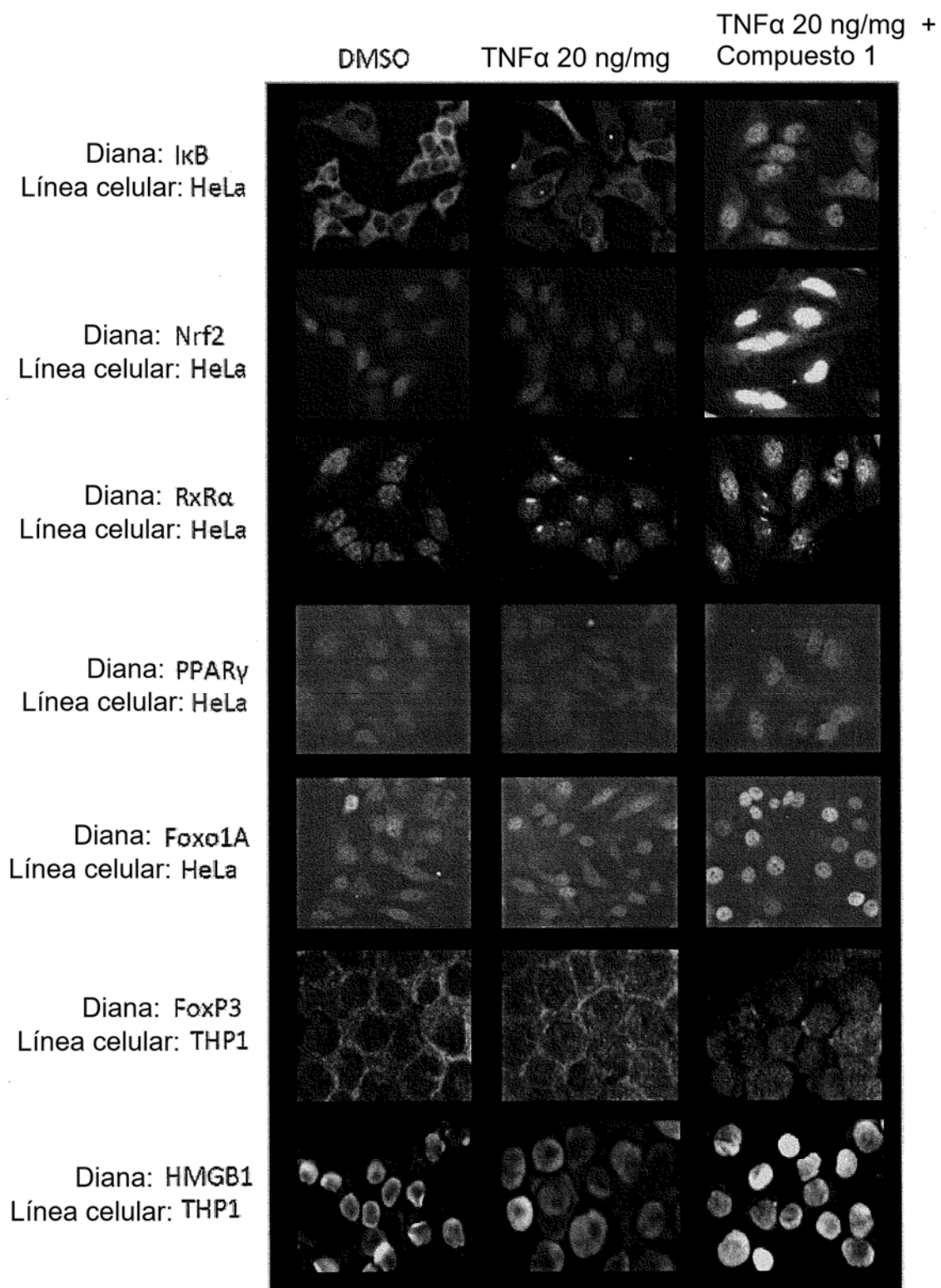


FIG. 14A

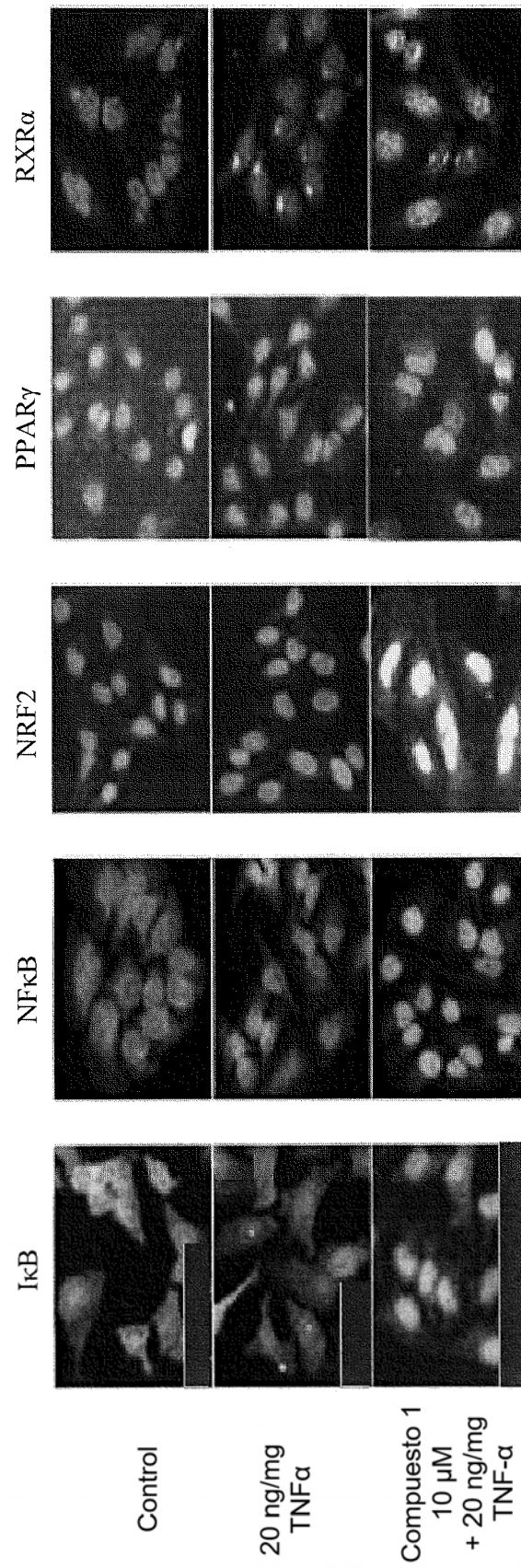


FIG. 14B

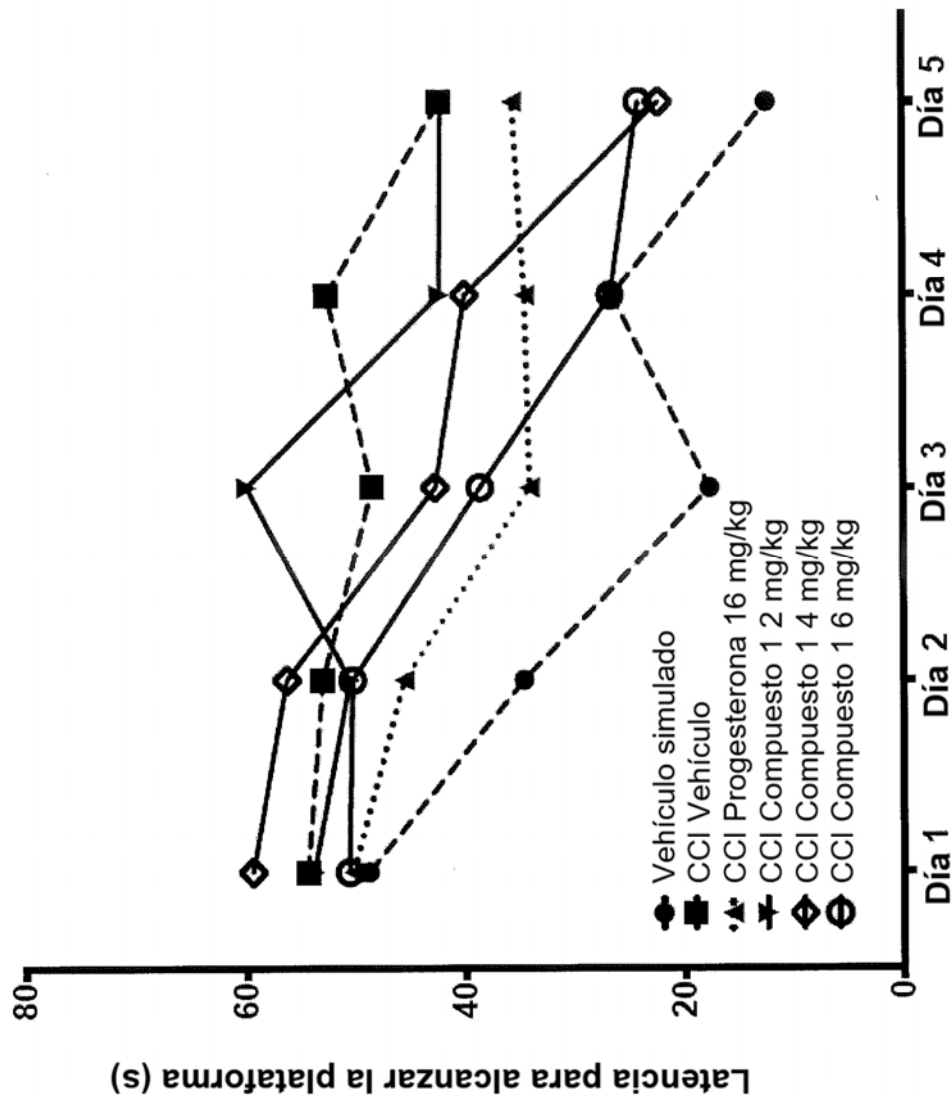


FIG. 15A

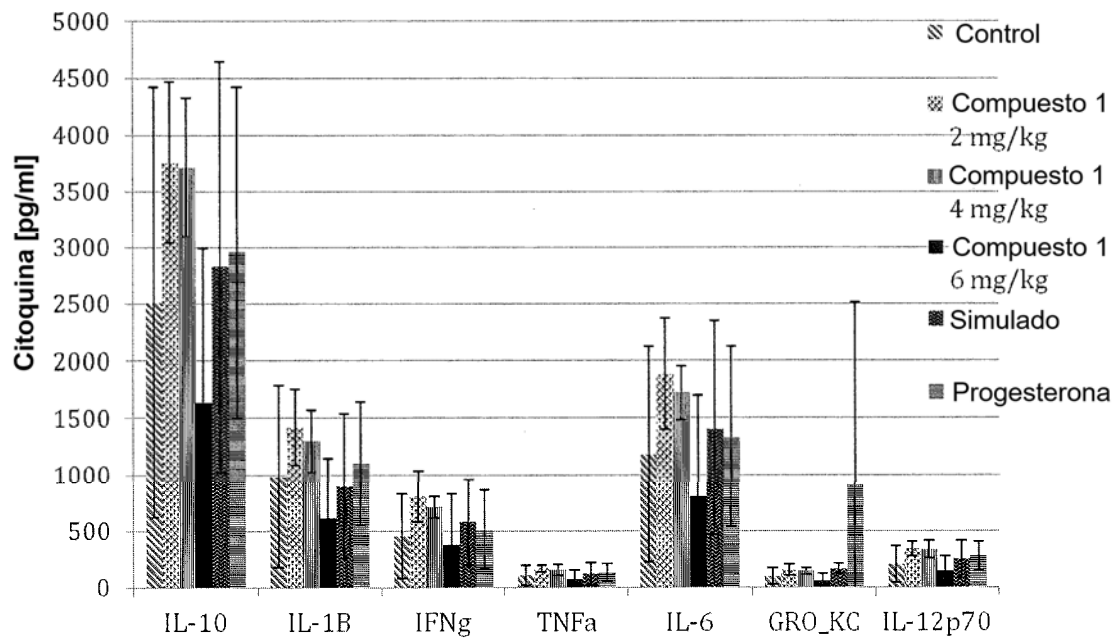


FIG. 15B

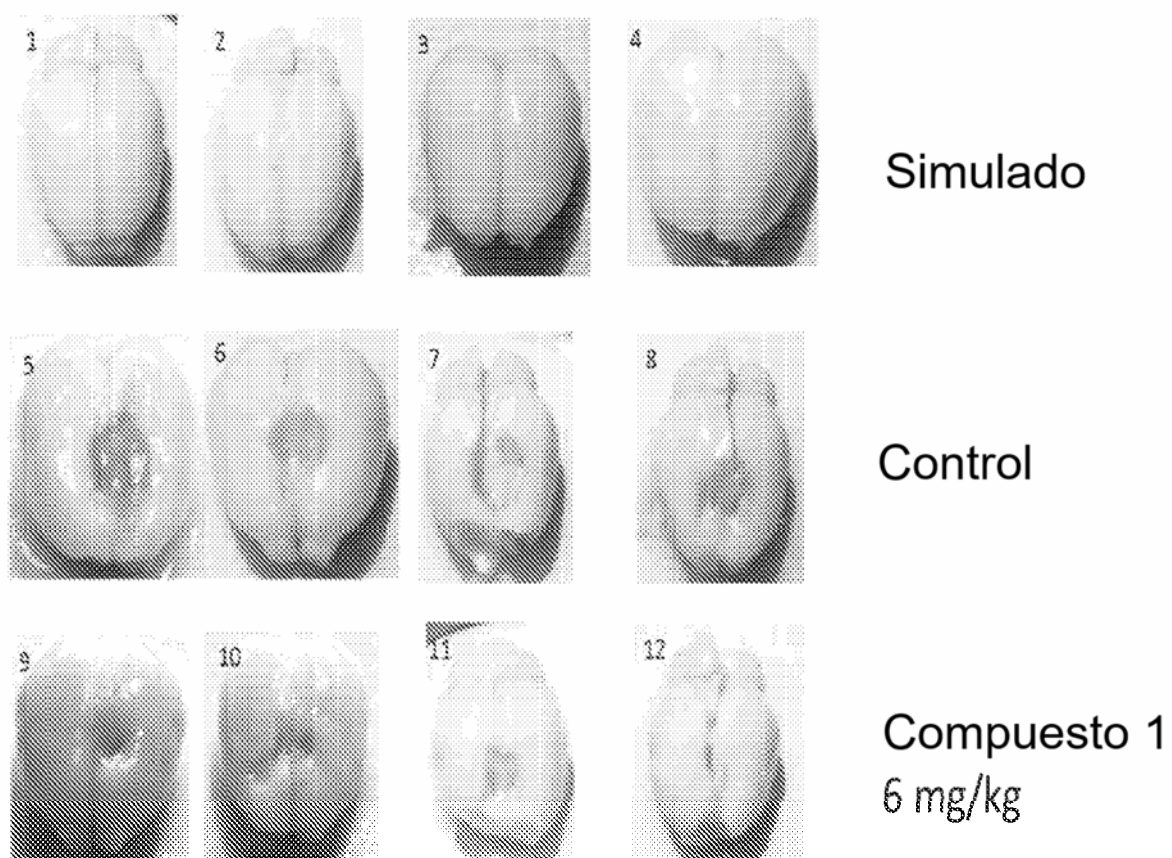


FIG. 15C

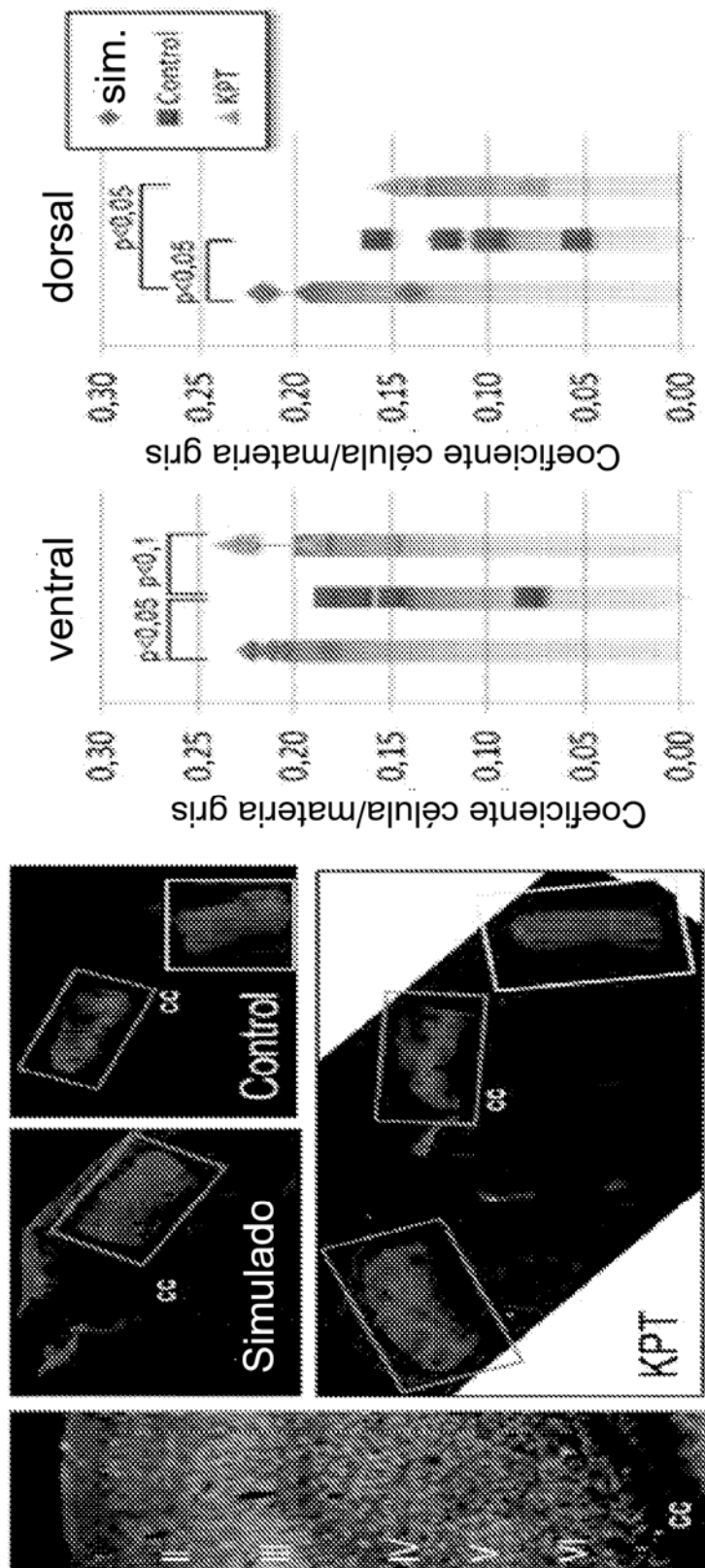


FIG. 15D

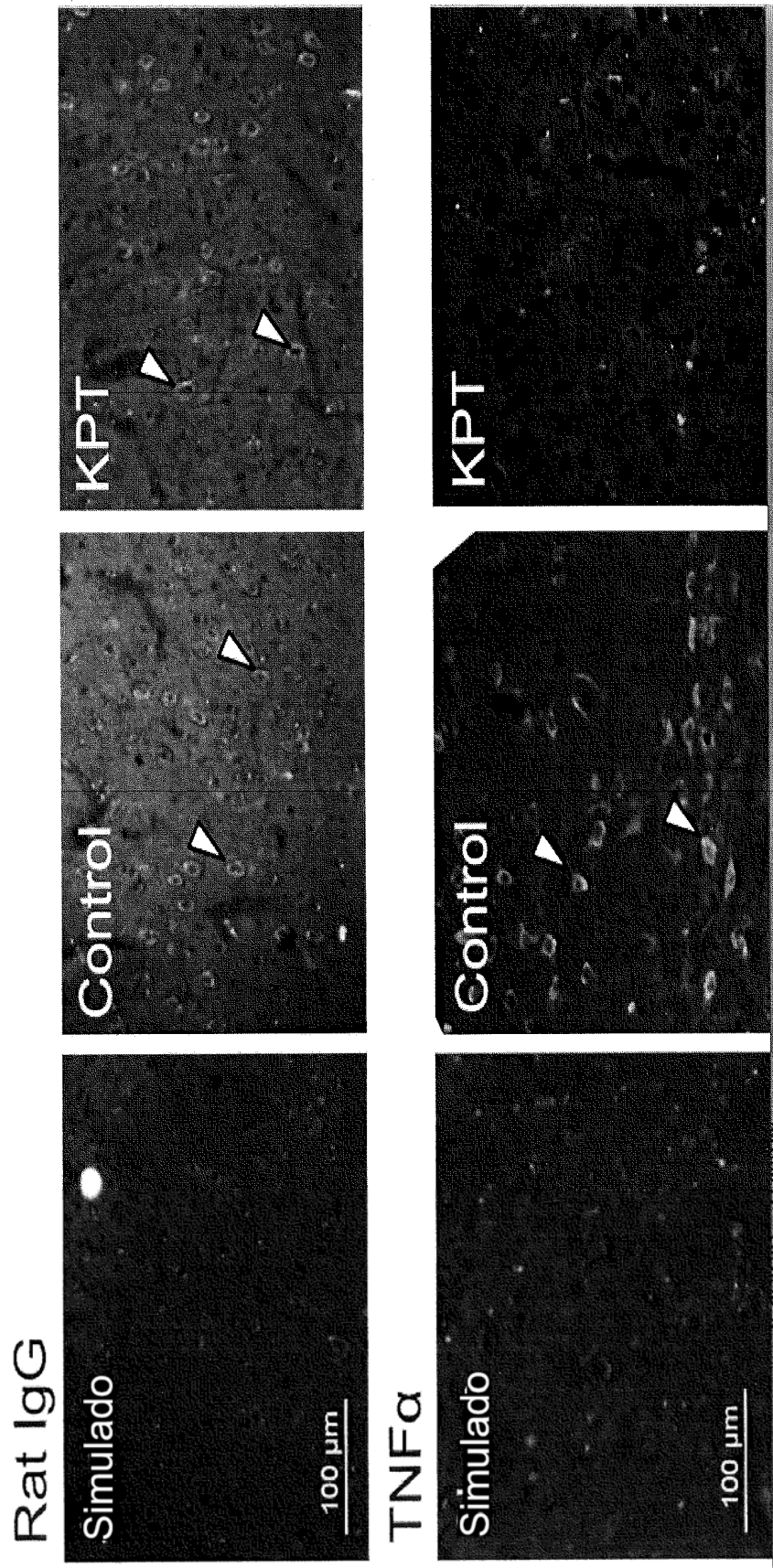


FIG. 15E

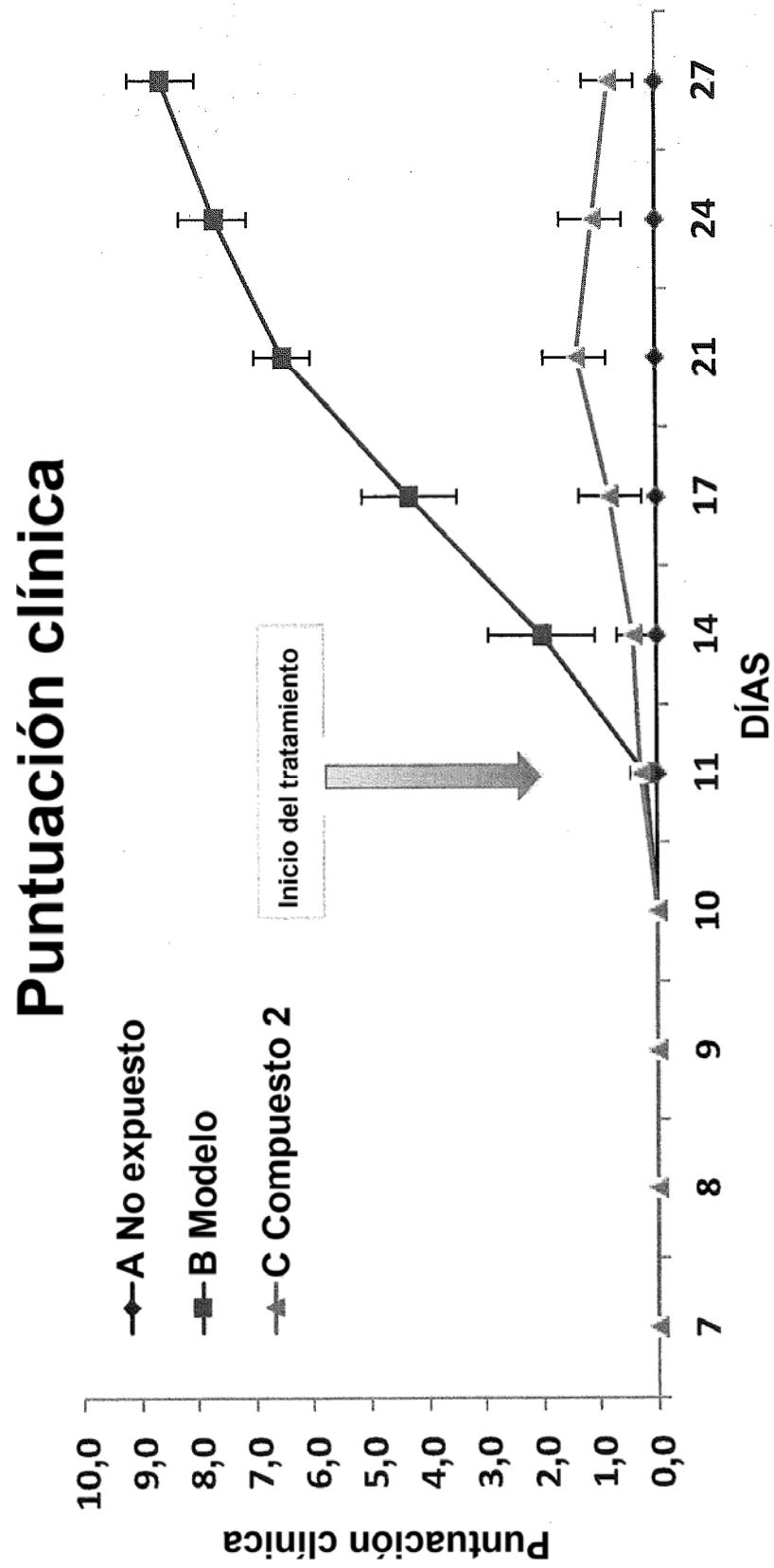


FIG. 16A

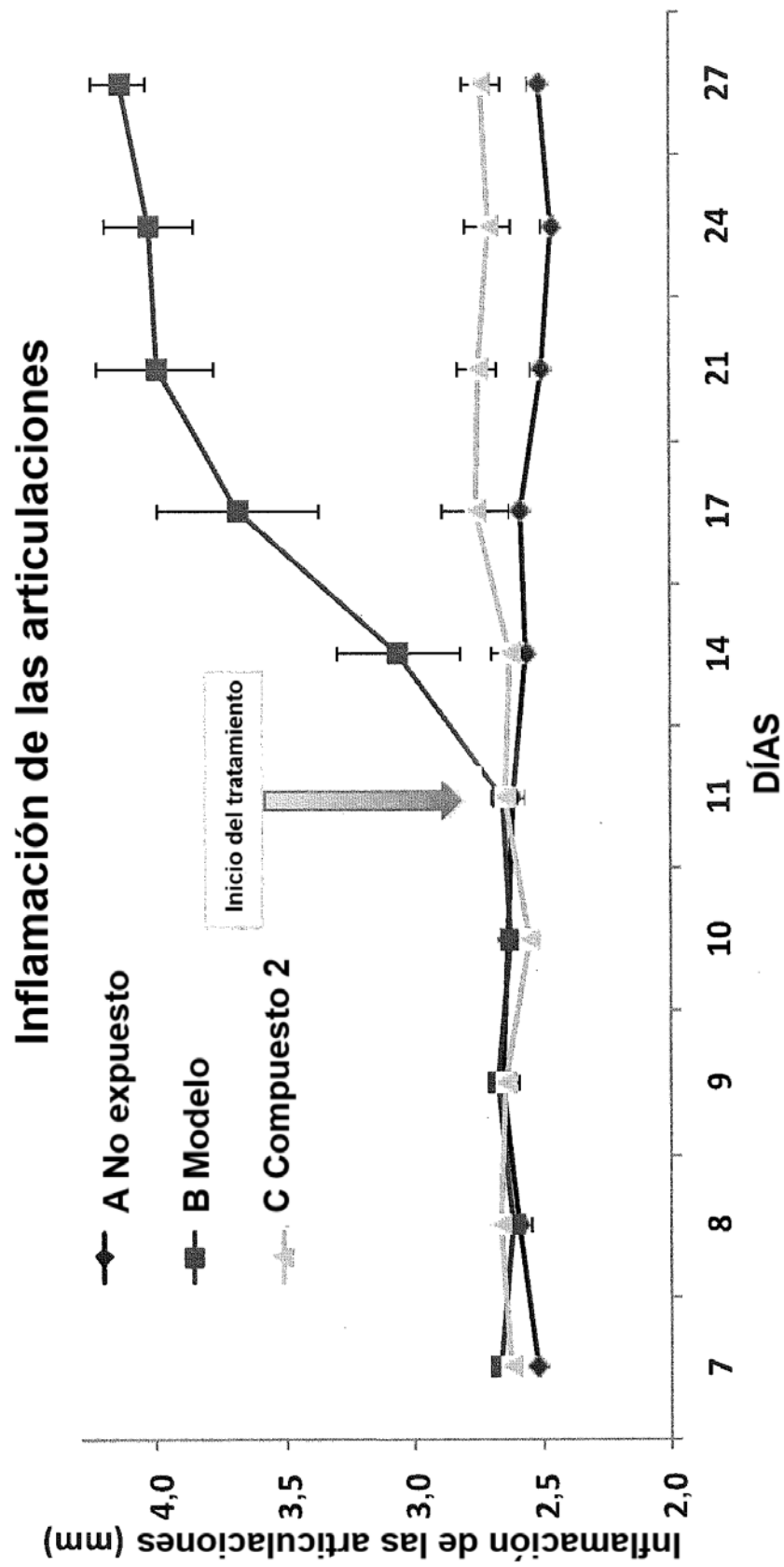


FIG. 16B

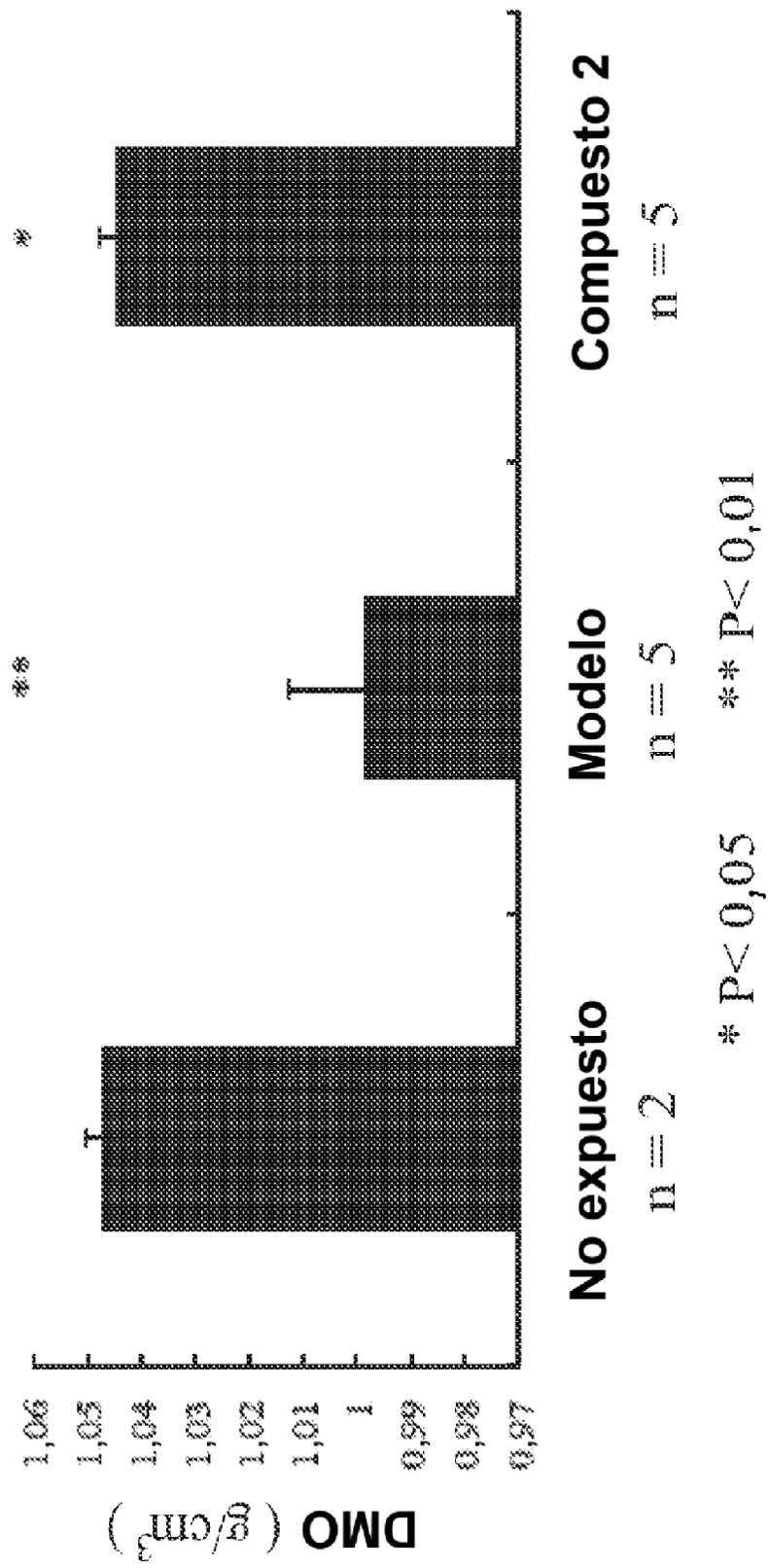


FIG. 17A

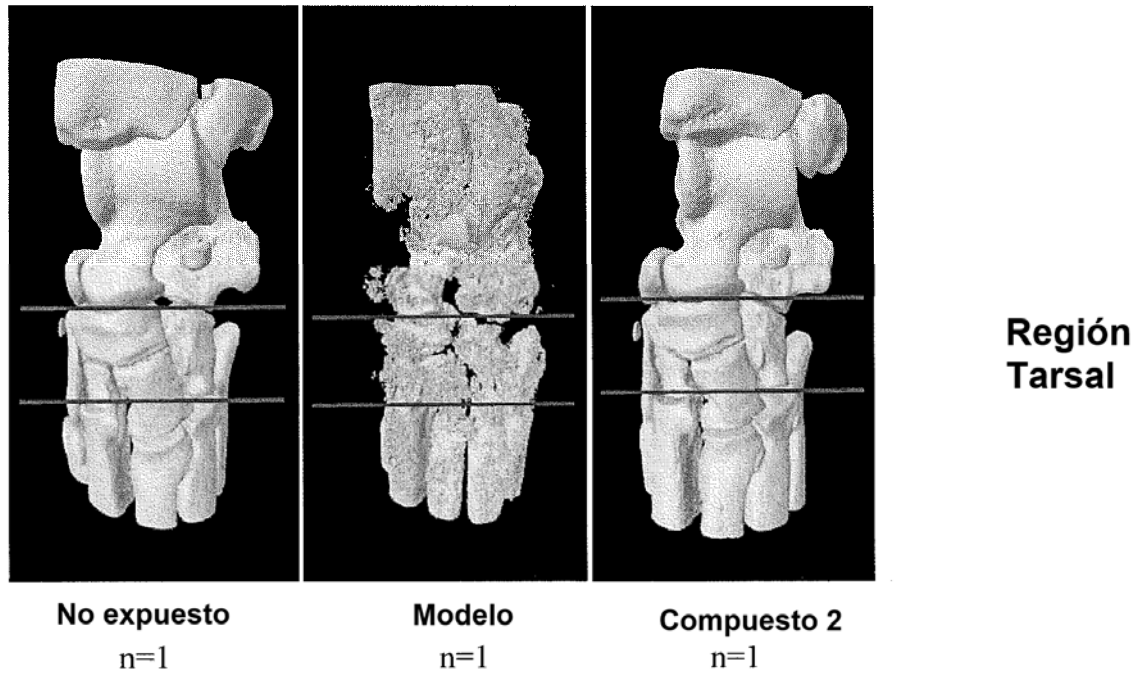


FIG. 17B

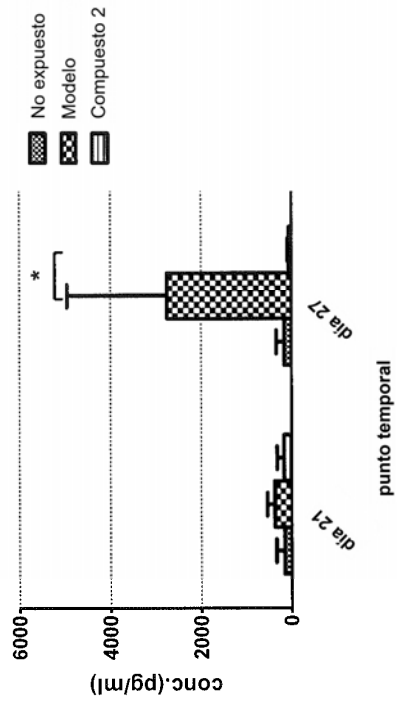


FIG. 17D

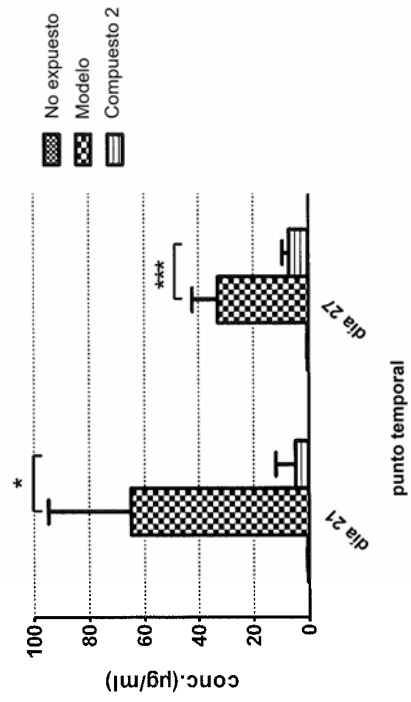


FIG. 17F

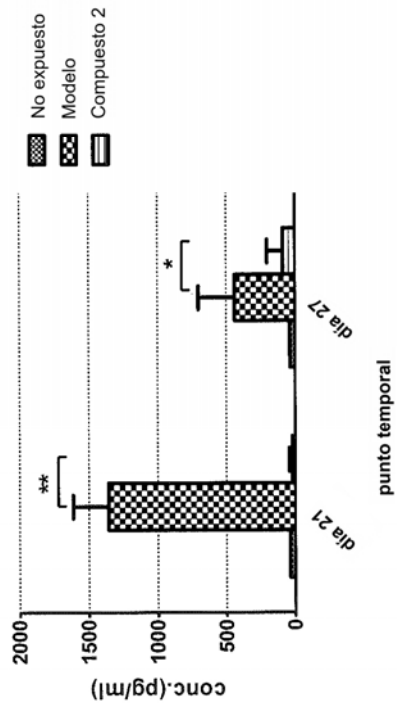


FIG. 17C

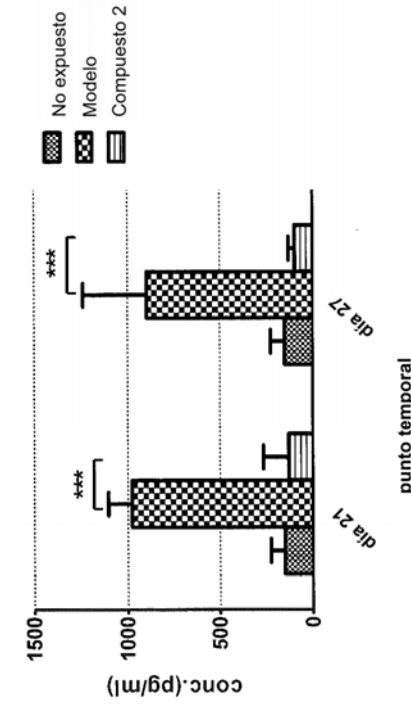


FIG. 17E

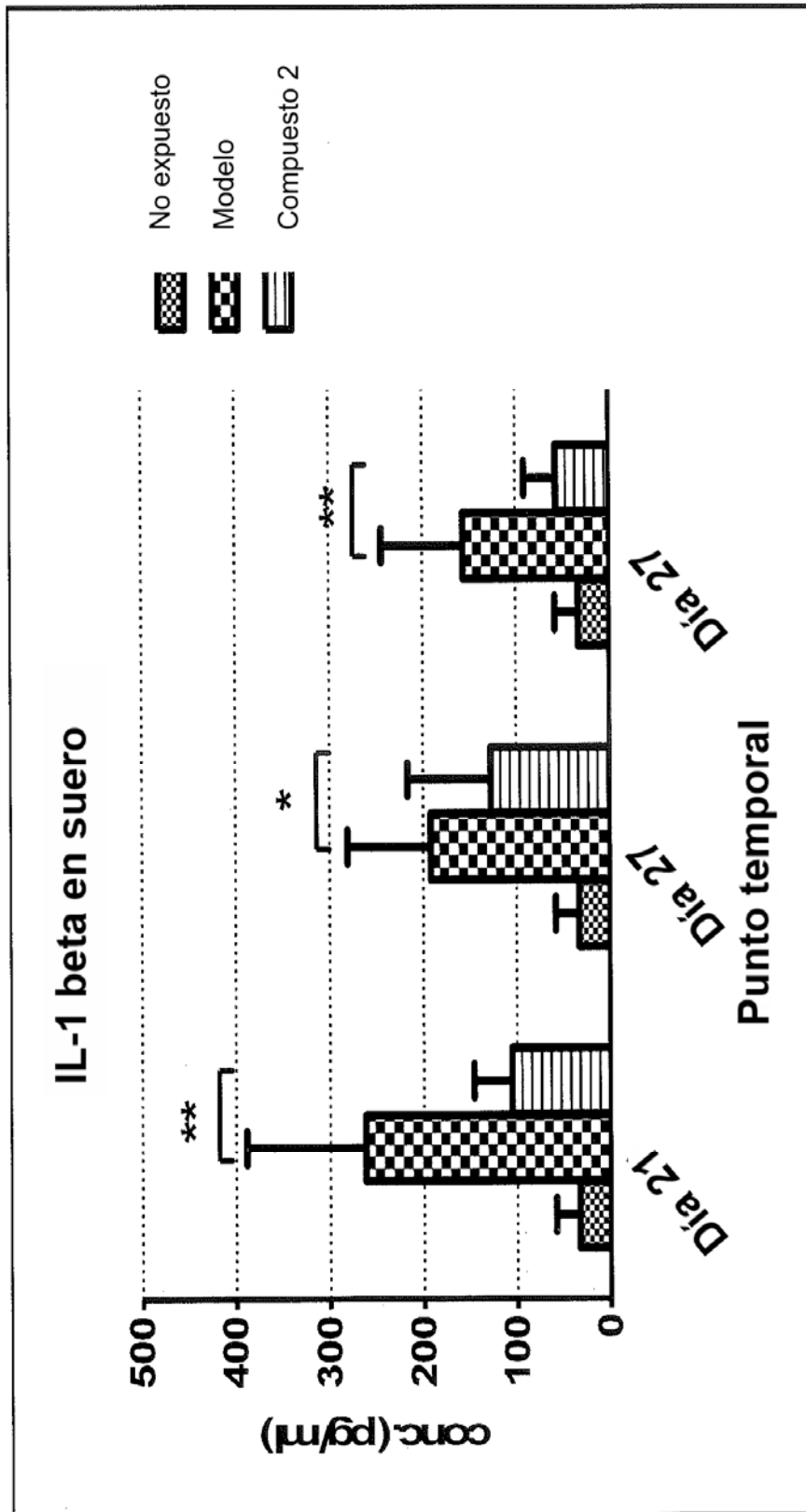


FIG. 17G

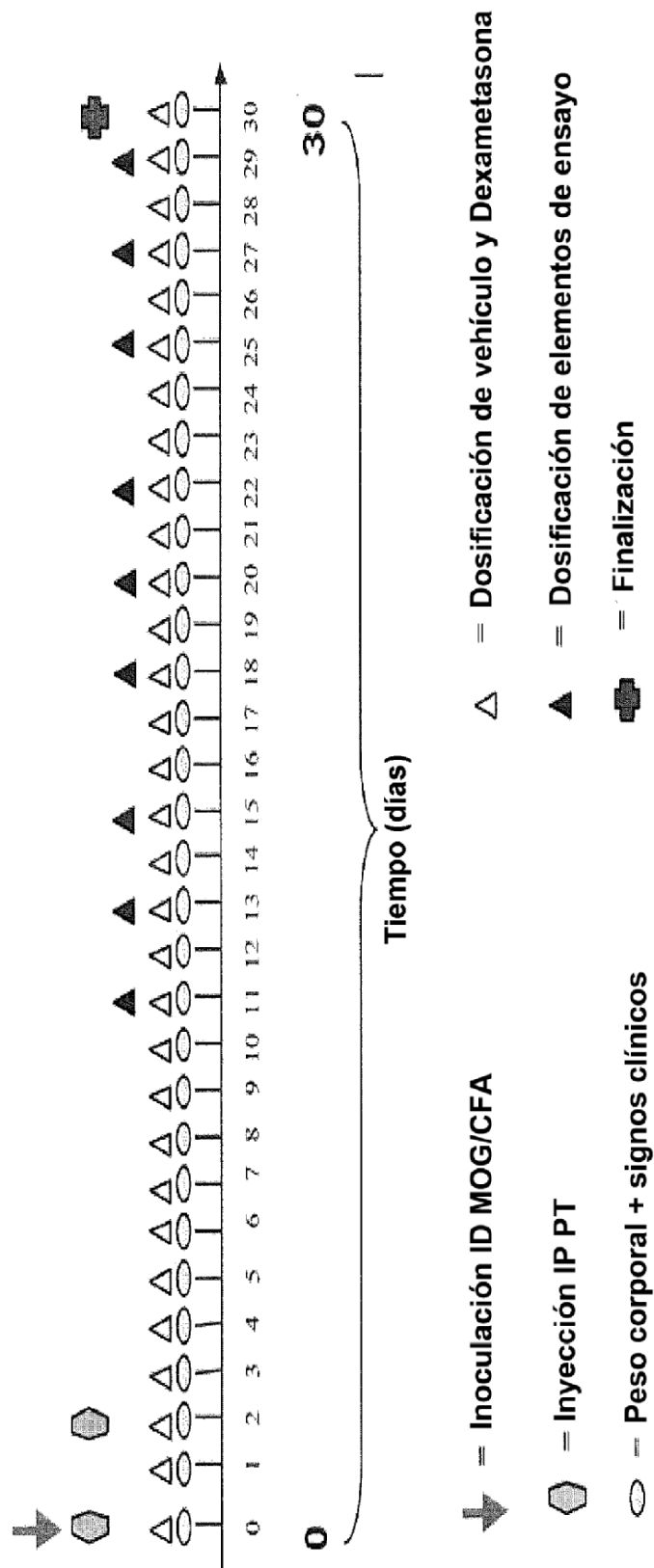


FIG. 18A

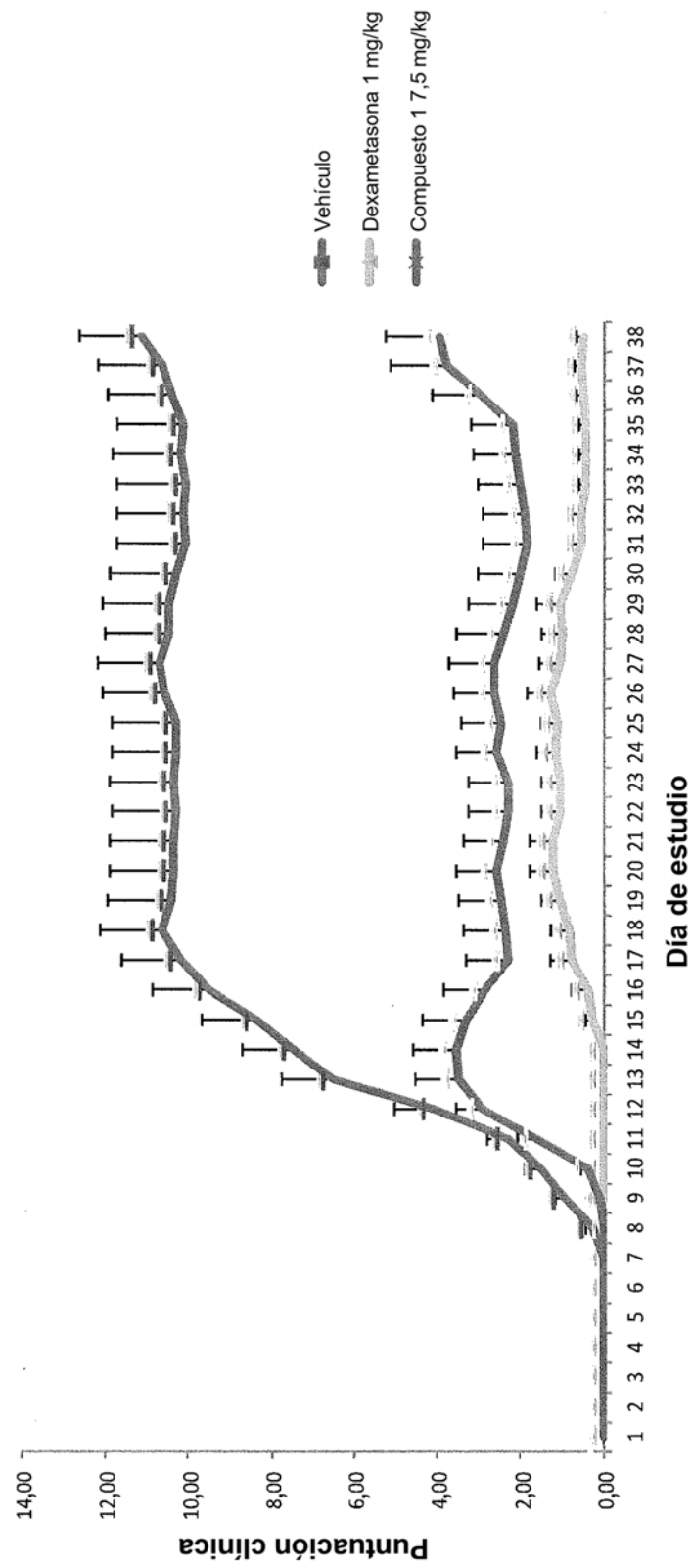


FIG. 18B

Morfología de la herida realizada 5 días después de la herida

Administración tópica sobre heridas

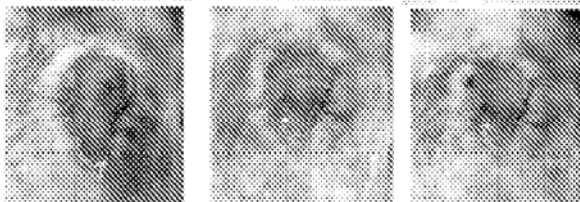
Control,
agua tópica



Compuesto 1
vía tópica diaria,
2,5 μ M



Compuesto 1
vía tópica diaria,
1 μ M



Administración sistémica - administración oral forzada

PO control PVP/
pluronic



PO compuesto 1
4 mg/kg cada dos días



PO compuesto 1
7,5 mg/kg cada dos días



FIG. 19