

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 548**

51 Int. Cl.:

C07F 13/00	(2006.01)	A61P 9/00	(2006.01)
C07F 15/00	(2006.01)		
C07F 15/02	(2006.01)		
C07F 15/06	(2006.01)		
A61K 31/28	(2006.01)		
A61K 31/295	(2006.01)		
A61K 33/24	(2009.01)		
A61K 33/26	(2006.01)		
A61K 33/32	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2015 PCT/EP2015/056024**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140337**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015 E 15710821 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 3119791**

54 Título: **Híbridos de molécula de liberación de CO-fumarato, su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o cardiovasculares y su procedimiento de preparación**

30 Prioridad:

21.03.2014 EP 14305408

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL VAL DE MARNE (33.3%)
61 Avenue du Général de Gaulle
94000 Créteil, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%) y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MOTTERLINI, ROBERTO;
FORESTI, ROBERTA;
MARTENS, THIERRY y
RIVARD, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 718 548 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

Híbridos de molécula de liberación de CO-fumarato, su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o cardiovasculares y su procedimiento de preparación.

5

Campo de la invención:

La presente invención se refiere a moléculas híbridas de liberación de CO-fumarato aptas para activar la actividad de la heme oxigenasa-1 (HO-1) y la expresión de la proteína HO-1, su síntesis y su utilización en aplicaciones terapéuticas, en particular su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y cardiovasculares.

10

Antecedentes de la técnica:

15 El sistema HO-1/CO es una parte significativa de la defensa contra el daño infligido por una diversidad de condiciones de estrés mediadas por metales pesados, especies de oxígeno reactivo, lipopolisacáridos (LPS) y otros procesos inflamatorios, desempeñando de esta manera un papel crucial en la regulación de las respuestas citoprotectoras y antiinflamatorias.

20 El gas CO administrado a dosis bajas (250 ppm) durante un periodo restringido de tiempo se ha demostrado que reproduce (restaura) muchos de los efectos beneficiosos de HO-1 en modelos de disfunción cardiovascular, hipertensión pulmonar y condiciones inflamatorias, tales como sepsis y enfermedad intestinal inflamatoria.

25 Debido al interés en el potencial terapéutico de HO-1/CO, se han desarrollado compuestos que liberan cantidades controladas de CO (moléculas de liberación de CO, CO-RM) en sistemas biológicos y se ha demostrado que ejercen un amplio abanico de efectos farmacológicos relacionados con la liberación de CO. La amplia mayoría de las CO-RM farmacológicamente activas descritas en la literatura son carbonilos de metal que contienen Ru, Fe, Mn, Co y Mo.

30 El factor de transcripción Nrf2 es un iniciador crucial de la respuesta de estrés celular, ya que coordina la expresión de varios genes antioxidantes y detoxificantes que reparan los daños y restauran la homeostasis celular. Como parte de esta respuesta inducible, la heme oxigenasa-1 (HO-1) desempeña un papel prominente mediante la utilización de heme para producir CO, biliverdina/bilirrubina y hierro, importantes moléculas de señalización y protectoras contra el estrés oxidativo y la inflamación.

35

Se han identificado muchos compuestos químicos que actúan como activadores de Nrf2/HO-1 y, entre ellos, varios compuestos derivados naturalmente con una funcionalidad carbonilo α,β -insaturada, incluyendo curcumina, el primer compuesto químico que se ha observado que incrementa la expresión de HO-1 y las chalconas. La lista de activadores de Nrf2/HO-1 actualmente ha crecido con la inclusión de varios cientos de compuestos. Debido a su mecanismo de acción, los activadores de Nrf2/HO-1 requieren tiempo para montar la respuesta de estrés celular, resultando en un efecto beneficioso retardado, aunque esencial.

40

45 La síntesis de una molécula que posea tanto la capacidad de liberar rápidamente CO como de estimular simultáneamente un proteoma protector dependiente de Nrf2 de mayor duración, ofrece ventajas terapéuticas significativas en comparación con los agentes activadores CO-RM o Nrf2 por sí solos en enfermedades en las que estas rutas resultan cruciales para la protección de los tejidos y, por lo tanto, existe una necesidad de tales moléculas.

45

50 Zhu *et al.* (J. Organomet. Chem. 691, 485-490, 2006) divulga el compuesto $[\text{Co}_2(\text{CO})_6(\text{NH}_2\text{CCH}_2\text{O})_2](\text{CO})_2$; sin embargo, en referencia únicamente a su utilización en agregados mariposa puenteados con alquino unidos mediante metales mixtos que contienen $\text{C}_2\text{Co}_2\text{R}_2$, con aplicaciones en la síntesis de materiales poliméricos.

50

55 El documento WO 2012/076696 divulga derivados de curcumina unidos a una molécula de liberación de CO. Sin embargo, en el contexto de la presente invención se muestra que estas moléculas no liberan monóxido de carbono. Esta falta de liberación de CO resulta en moléculas que no muestran la amplia diversidad de efectos terapéuticos beneficiosos relacionados con la activación de HO-1 por CO.

55

60 El documento WO 2008/003953 describe además moléculas de liberación de CO de fórmula (I): $\text{Mn}(\text{CO})_4\text{XY}$ en la que X e Y son ligandos monodentados, o juntos forman un ligando bidentado, para la administración terapéutica de CO en seres humanos y animales. Más específicamente, el documento WO 2008/003953 describe el compuesto 364 liberador de CO, en el que X representa $\text{O}(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ e Y representa Br. Sin embargo, esta molécula demuestra una capacidad reducida de liberador de CO.

60

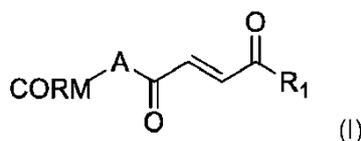
65 Inesperadamente, se ha encontrado que las moléculas híbridas que comprenden una fracción fumarato y una molécula de liberación de CO (CORM) resultan aptas para liberar rápidamente CO y activar la ruta de Nrf2/HO-1 dando como resultado una activación dual de las defensas inflamatorias en las células y una eficacia terapéutica

65

mejorada.

La presente invención se refiere a ambos compuestos, con una fracción CORM (compuestos mono-CORM) y con dos fracciones CORM (compuestos bi-CORM). Más específicamente, la presente invención se refiere a compuestos mono-CORM y composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, y además se refiere a compuestos mono-CORM y bi-CORM para la utilización como fármacos. En el contexto de la presente invención se ha descubierto que ambos tipos de molécula presentan actividades terapéuticas mejoradas. Además, se ha observado que las moléculas mono-CORM liberan muy rápidamente muy elevados de CO, ejerciendo de esta manera un "efecto estallido". Por otra parte, los compuestos bi-CORM liberan niveles más elevados de CO (en particular debido a la presencia de una segunda fracción CORM), aunque menos rápidamente y durante un periodo de tiempo más prolongado. Por lo tanto, los compuestos mono-CORM de la invención se utilizarán en el caso de que se busque un "efecto estallido", mientras que los compuestos bi-CORM de la invención se utilizarán en el caso de que una liberación sostenida durante un periodo de tiempo más prolongado resulte más apropiada para el paciente o en referencia a la enfermedad o condición que debe tratarse.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a moléculas híbridas de liberación de monóxido de carbonofumarato (CORM-fumarato), sus sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables, de fórmula (I):



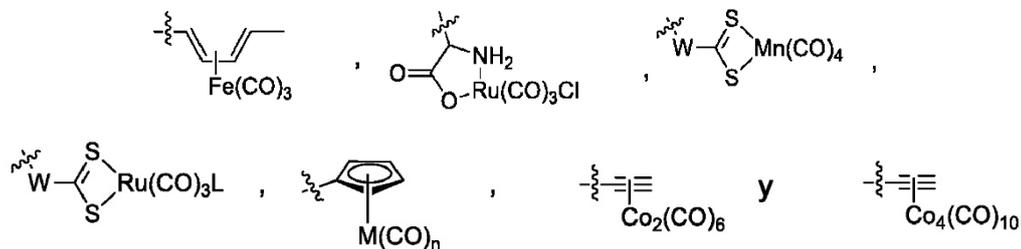
en la que:

A representa:

- un enlace sencillo, o
- -Z-Q-, donde:
 - Q representa O, S o NR₂, donde R₂ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo o alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), cicloalquilo (C₃-C₁₄), o R₂ y Z están conectados formando un heterociclilo (C₃-C₈),
 - Z representa -alquilo (C₁-C₆)-, -alqueno (C₂-C₆)-, -arilo-, -heteroarilo-, -alquino (C₂-C₆)-, -heterociclilo (C₃-C₈)-, -cicloalquilo (C₃-C₁₄)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alqueno (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alqueno (C₂-C₆)-, -alqueno (C₂-C₆)-R₃-alqueno (C₂-C₆)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquino (C₂-C₆)-, -alquino (C₂-C₆)-R₃-alquino (C₂-C₆)-, -alquino (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquino (C₂-C₆)-R₃-alqueno (C₂-C₆)-, -alquil (C₁-C₆)-OCO-, o -CH₂-(CHOR₃)CH₂O-alquilo (C₁-C₆)-, donde R₃ representa arilo, heteroarilo, heterociclilo (C₃-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₁₄),

CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

Mn(CO)₅,



donde W representa O o NR₄, donde R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

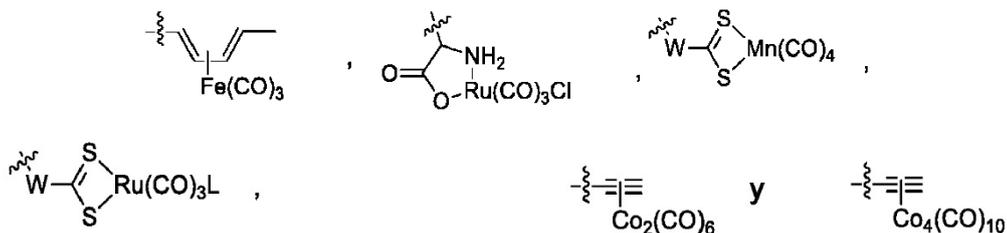
L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

M representa Rh, Co, Ru, Mn, Mo, V o Fe, preferentemente Co, Ru o Mn, y

n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre,

preferentemente, CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionada de entre:

Mn(CO)₅,



donde W representa O o NR₄, donde R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

y R₁ representa:

• -Q'-Y, donde

15

- Q' representa O, S o NR₅, donde R₅ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo o alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₁₄),

20

- Y representa H, -alquilo (C₁-C₆), -alqueno (C₂-C₆), -arilo, -heteroarilo, -alquino (C₂-C₆), -heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₁₄), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alqueno (C₂-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alqueno (C₂-C₆), -alqueno (C₂-C₆)-R₆-alqueno (C₂-C₆), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alqueno (C₂-C₆), -alquino (C₂-C₆)-R₆-alqueno (C₂-C₆), -alquino (C₂-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alquino (C₂-C₆)-R₆-alqueno (C₂-C₆), alquil (C₁-C₆)-R₆, alqueno (C₂-C₆)-R₆, -alquino (C₂-C₆)-R₆, donde R₆ representa arilo, heteroarilo, heterociclilo (C₃-C₈), o cicloalquilo (C₃-C₁₄), -CH₂(CHOR₆)CH₂-OR₇, donde R₇ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), alquil (C₁-C₆)-cicloalquilo (C₃-C₁₄),

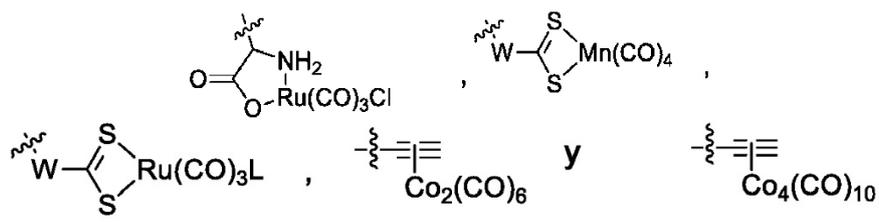
o,

30

- A'-CORM' donde A' y CORM' son tal como se define respectivamente para A y CORM para la utilización como fármaco.

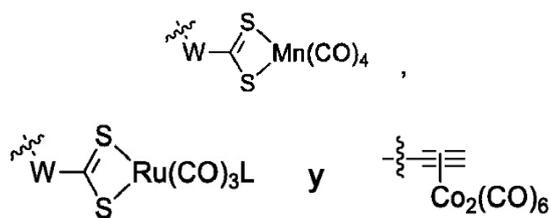
Ventajosamente, CORM se selecciona de entre:

Mn(CO)₅,

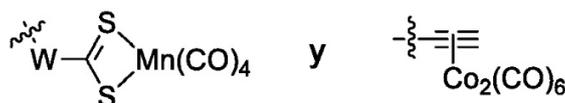


más ventajosamente de:

Mn(CO)₅,



todavía más ventajosamente de



La presente invención se refiere preferentemente a moléculas híbridas de liberación de monóxido de carbono-fumarato (CORM-fumarato), sus sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables, de fórmula (I) para la utilización anteriormente, en la que:

A representa:

- un enlace sencillo, o
- -Z-Q-, donde:
 - Q representa O, S o NR₂, donde R₂ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo o alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), cicloalquilo (C₃-C₁₄), o R₂ y Z están conectados formando un heterociclilo (C₃-C₈),
 - Z representa -alquilo (C₁-C₆-), -alquenilo (C₂-C₆-), -arilo-, -heteroarilo-, -alquinilo (C₂-C₆-), -heterociclilo (C₃-C₈-), -cicloalquilo (C₃-C₁₄-), -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆-), -alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆-), -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquenilo (C₂-C₆-), -alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquenilo (C₂-C₆-), -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquinilo (C₂-C₆-), -alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquinilo (C₂-C₆-), -alquinil (C₂-C₆)-R₃-alquinilo (C₂-C₆-), -alquinil (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆-), -alquinil (C₂-C₆)-R₃-alquenilo (C₂-C₆-), -alquil (C₁-C₆)-OCO-, o -CH₂-(CHOR₃)CH₂O-alquilo (C₁-C₆-), donde R₃ representa arilo, heteroarilo, heterociclilo (C₃-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₁₄),

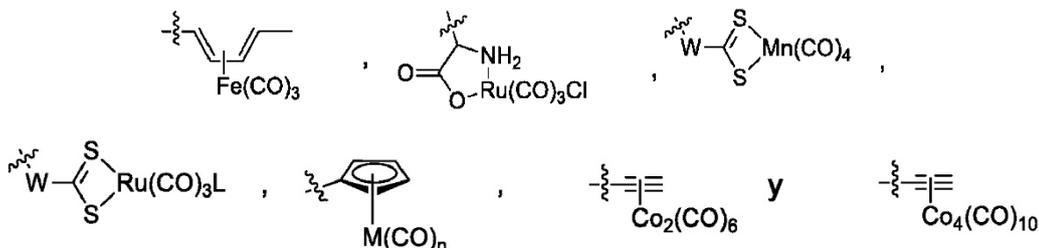
R₁ representa:

- -Q'-Y, donde:
 - Q' representa O, S o NR₅, donde R₅ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo o alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₁₄),
 - Y representa H, -alquilo (C₁-C₆-), -alquenilo (C₂-C₆-), -arilo-, -heteroarilo-, -alquinilo (C₂-C₆-), -heterociclilo (C₃-C₈-), -cicloalquilo (C₃-C₁₄-), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆-), -alquenil (C₂-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆-), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquenilo (C₂-C₆-), -alquenil (C₂-C₆)-R₆-alquenilo (C₂-C₆-), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquinilo (C₂-C₆-), -alquenil (C₂-C₆)-R₆-alquinilo (C₂-C₆-), -alquinil (C₂-C₆)-R₆-alquinilo (C₂-C₆-), -alquinil (C₂-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆-), -alquinil (C₂-C₆)-R₆-alquenilo (C₂-C₆-), alquil (C₁-C₆)-R₆-, -alquenil (C₂-C₆)-R₆-, -alquinil (C₂-C₆)-R₆-, donde R₆ representa arilo, heteroarilo, heterociclilo (C₃-C₈), o cicloalquilo (C₃-C₁₄), -CH₂(CHOR₆)CH₂-OR₇, donde R₇ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), alquil (C₁-C₆)-cicloalquilo (C₃-C₁₄),

o,

- A'-CORM' donde A' y CORM' son tal como se define respectivamente para A y CORM y, en el caso de que R₁ representa -Q'-Y, CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

Mn(CO)₅,



donde W representa O o NR₄, donde R₄ representa -alquilo (C₁-C₆-),

L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

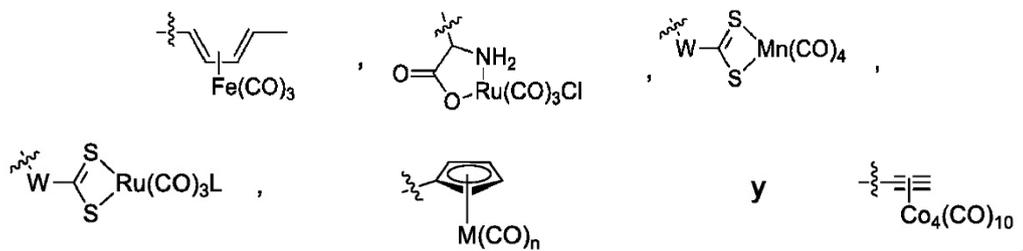
M representa Rh, Co, Ru, Mn, Mo, V o Fe, preferentemente Co, Ru o Mn, y

n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre,

Y en el caso de que R₁ representa A'-CORM', CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

5

Mn(CO)₅,



10

donde W representa O o NR₄, donde R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

15

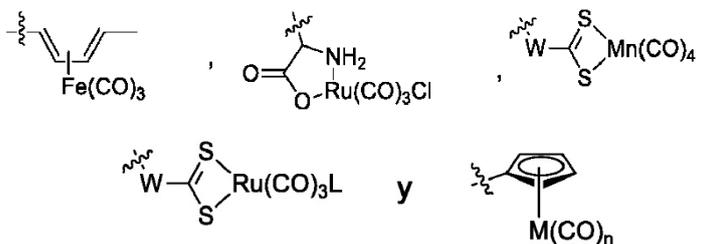
M representa Rh, Co, Ru, Mn, Mo, V o Fe, preferentemente Fe, Co, Ru o Mn, y

n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre,

20

preferentemente, CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

Mn(CO)₅,



25

donde W representa O o NR₄, donde R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

30

M representa Rh, Ru, Mn, Mo, V o Fe, preferentemente Fe, Ru o Mn, y

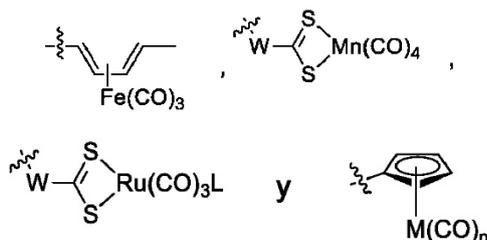
n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre,

35

todavía más preferentemente, CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

Mn(CO)₅,

40



45

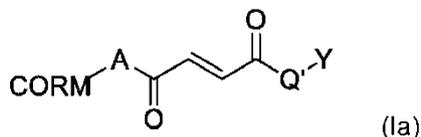
donde W representa O o NR₄, donde R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

M representa Fe o Mn, y

n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre.

5 La presente invención todavía más preferentemente se refiere a moléculas híbridas de liberación de monóxido de carbono-fumarato (CORM-fumarato), sus sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables, de fórmula (Ia):



10 en la que A, CORM y -Q'-Y son tal como se define en la reivindicación 1.

En el caso en que CORM represente un complejo de carbonilo metálico de fórmula:



15 M representa Rh, Co, Ru, Mn, Mo, V o Fe, preferentemente Co, Ru o Mn, y

20 n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre, más preferentemente

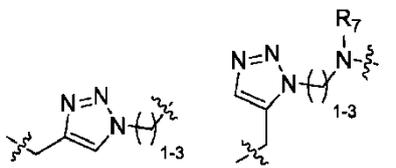
25 n es un número entero de 1 a 4, de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre. En particular, en el caso de que M represente Rh, n representa 2; en el caso de que M represente Co, n representa 2; en el caso de que M represente Ru, n representa 2; en el caso de que M represente Mn, n representa 3; en el caso de que M represente Mo, n representa 3; en el caso de que M represente V, n representa 4; en el caso de que M represente Fe, n representa 3.

Ventajosamente, Q representa O o NR₂, preferentemente O y R₂ representa H o alquilo (C₁-C₆).

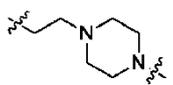
30 Ventajosamente, Z representa -alquilo (C₁-C₆)-, -alquenoilo (C₂-C₆)- o -heterociclilo (C₃-C₈)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquénil (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)- y R₃ representa heteroarilo o heterociclilo (C₃-C₈).

35 Ventajosamente, Q representa O, S o NR₂, en la que R₂ representa H, alquilo (C₁-C₆) y Z representa -alquilo (C₁-C₆)-, -alquenoilo (C₂-C₆)-, -heterociclilo (C₃-C₈)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquénil (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, en la que R₃ representa heteroarilo o heterociclilo (C₃-C₈).

Más ventajosamente, Z representa: -CH₂-CH₂-,

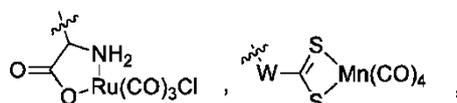


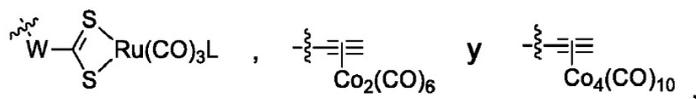
40 o



45 Ventajosamente, CORM se selecciona de entre:

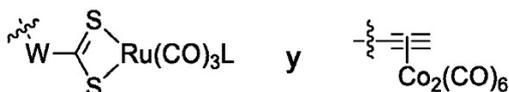
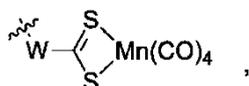
Mn(CO)₅,



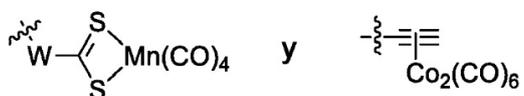


más ventajosamente de entre $\text{Mn}(\text{CO})_5$,

5



10 todavía más ventajosamente de entre:



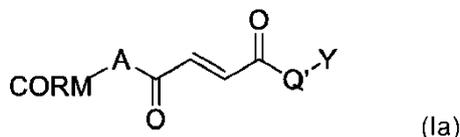
Ventajosamente, Q' es O o NR_5 , preferentemente O.

15

Ventajosamente, Y se selecciona de H, -alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), -alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_6$), -arilo, -heteroarilo, -alquino ($\text{C}_2\text{-C}_6$), -heterociclilo ($\text{C}_3\text{-C}_8$), -cicloalquilo ($\text{C}_3\text{-C}_8$) o -alquil ($\text{C}_1\text{-C}_6$)-arilo.

20

Según una primera forma de realización, la invención se refiere a una molécula híbrida de liberación de monóxido de carbono-fumarato (CO-RM-fumarato), en la que la fracción fumarato se sustituye por un lado por un complejo de carbonilo de liberación de CO y, por otro lado, por un ácido, un éster, un tioéster o una amida, de fórmula (Ia):



25

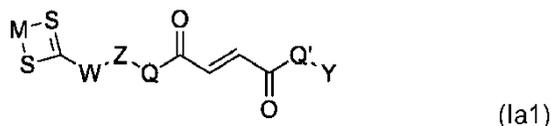
en la que A, CORM y -Q'-Y son tal como se define en la reivindicación 1.

30

Inesperadamente, se ha descubierto que los compuestos de fórmula (Ia) son capaces de liberar CO a una velocidad rápida. Por ejemplo, el compuesto A de los ejemplos, posteriormente, ilustrativo de los compuestos de fórmula (Ia), es capaz de liberar CO con una semivida de aproximadamente 38 minutos bajo las condiciones in vitro descritas en los ejemplos, que es una velocidad rápida en el contexto de la presente invención. Por lo tanto, los compuestos de fórmula (Ia) resultan ventajosos para una actividad biológica relativamente rápida. Además, los experimentos demuestran que los compuestos de la invención que comprenden únicamente un grupo CORM son potentes activadores de Nrf2 e inductores de la expresión de la proteína HO-1, y resultan más eficaces que el dimetilfumarato.

35

Algunos compuestos ventajosos según dicha primera forma de realización presentan la fórmula (Ia1):



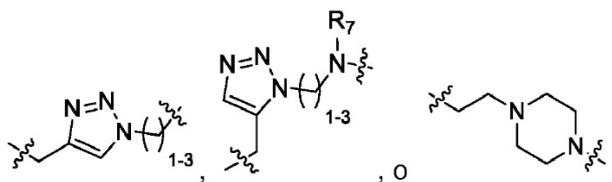
40

en la que:

M representa $\text{Mn}(\text{CO})_4$ o $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}$, y
Q, Q', W, Z e Y son tal como se define para la fórmula (I).

45

Ventajosamente, en los compuestos de fórmula (Ia1), Z-W es $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NR}_7-$,



en la que R₇ representa alquilo (C₁-C₃).

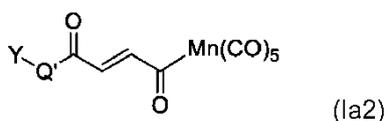
5 Ventajosamente, Q es O o NR₂, preferentemente O.

Ventajosamente, Q' es O o NR₅, preferentemente O.

Ventajosamente, Y representa H, -alquilo (C₁-C₆) o -alquenilo (C₂-C₆).

10

Algunos otros compuestos ventajosos según dicha primera forma de realización presentan la fórmula (Ia2):



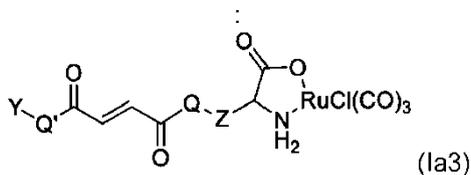
15 en la que:

Q' e Y son tal como se define para la fórmula (I).

Ventajosamente, Y es H, -alquilo (C₁-C₆) o -alquenilo (C₂-C₆) y Q' representa O.

20

Algunos otros compuestos ventajosos adicionales según dicha primera forma de realización presentan la fórmula (Ia3):



25

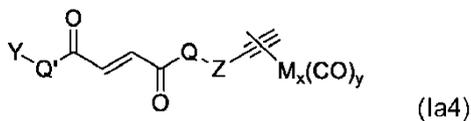
en la que:

Q, Q', Y y Z son tal como se define para la fórmula (I).

30 Ventajosamente, Y es H, -alquilo (C₁-C₆) o -alquenilo (C₂-C₆), Q' es O, y Q y Z son tal como se define para la fórmula (I). Más ventajosamente, Q-Z es la cadena lateral de un aminoácido, tal como serina, cisteína, tirosina o lisina.

Algunos compuestos ventajosos según dicha primera forma de realización presentan la fórmula (Ia4):

35



en la que:

40 M_x(CO)_y representa Co₂(CO)₆ or Co₄(CO)₁₀,
Q', Q, Y y Z son tal como se define para la fórmula (I).

Ventajosamente, Y es H, -alquilo (C₁-C₆) o -alquenilo (C₂-C₆), Q' es O, y Q y Z son tal como se define para la fórmula (I).

45

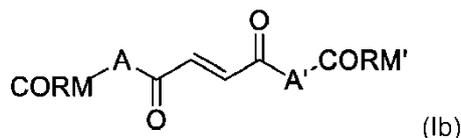
Más ventajosamente, Q es O y Z es -alquilo (C₁-C₆), preferentemente -alquilo (C₁-C₃).

En una segunda forma de realización, la invención describe una molécula híbrida de liberación de monóxido de carbono-fumarato (CO-RM-fumarato) en la que la fracción fumarato se sustituye ne ambos lados con un

complejo de carbonilo liberador de CO.

Estos compuestos bimetálicos se ha encontrado que liberan una cantidad más elevada de CO que el compuesto monometálico, a lo largo de un periodo de tiempo prolongado y, por lo tanto, resultan ventajosos para una actividad biológica sostenida en el tiempo. Por ejemplo, el compuesto B de los ejemplos, posteriormente, ilustrativo de los compuestos de fórmula (Ic) descrita después, es capaz de liberar CO durante 480 minutos bajo las condiciones in vitro indicadas en los ejemplos, que son un periodo de tiempo prolongado en el contexto de la presente invención.

En algunos compuestos según dicha segunda forma de realización, la molécula híbrida de liberación de monóxido de carbono-fumarato se sustituye, por un lado, por un complejo de carbonilo liberador de CO y, por otro lado, por un complejo de carbonilo liberador de CO diferente, según la fórmula (Ib):



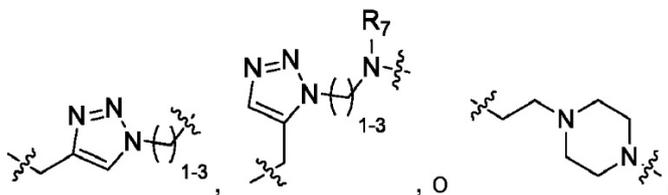
en la que A-CORM y A'-CORM' son tal como se ha definido anteriormente o posteriormente para la fórmula (I).

Ventajosamente, CORM y CORM' son, respectivamente



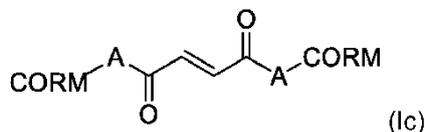
en la que M es Mn(CO)₄ o Ru(CO)₃Cl.

Ventajosamente, en los compuestos de fórmula (Ib), A es Q-Z-W en la que Z-W es -CH₂-CH₂-NR₇,



en la que R₇ representa alquilo (C₁-C₃) y A' es Q'-Z', en la que Z' es -alquilo (C₁-C₆), preferentemente alquilo (C₁-C₃). Ventajosamente, Q es O o NR₂, preferentemente O y Q' es O o NR₂, preferentemente O.

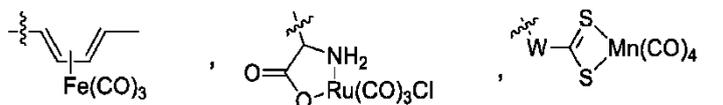
Ventajosamente, los compuestos según la segunda forma de realización presentan la fórmula (Ic), en la que la fracción fumarato se sustituye en ambos lados con el mismo complejo de carbonilo liberador de CO:



en el que A-CORM es tal como se define para los compuestos de fórmula (I).

En dicha forma de realización, CORM preferentemente representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

Mn(CO)₅,





donde W representa O o NR₄, donde R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

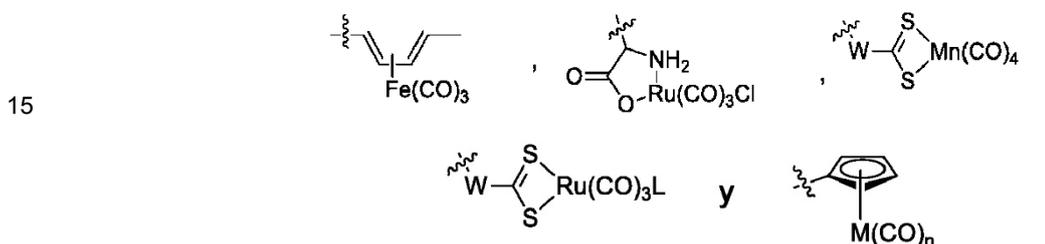
5 L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

M representa Rh, Co, Ru, Mn, Mo, V o Fe, preferentemente Fe, Co, Ru o Mn, y

10 n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre,

preferentemente, CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

Mn(CO)₅,



20 donde W representa O o NR₄, donde R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

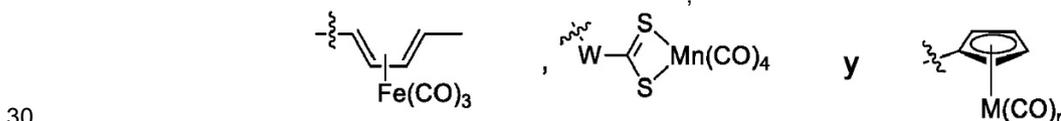
L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

M representa Rh, Ru, Mn, Mo, V o Fe, preferentemente Fe, Ru o Mn, y

25 n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre,

todavía más preferentemente, CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

Mn(CO)₅,



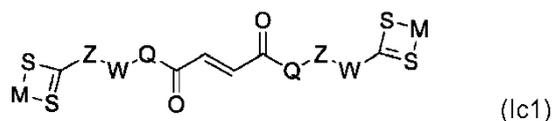
30 donde W representa O o NR₄, donde R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

35 L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

M representa Fe o Mn, y

n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre.

40 Algunos compuestos ventajosos de fórmula (Ic) presentan la fórmula (Ic1):

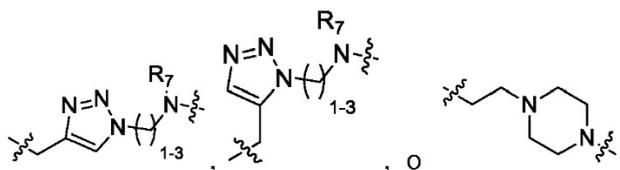


en la que:

45 M representa Mn(CO)₄ o Ru(CO)₃Cl, y

Q y Z son tal como se ha definido para la fórmula (I).

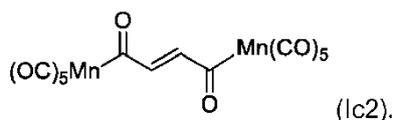
50 Ventajosamente, en los compuestos de fórmula (Ic1), Z-W es -CH₂-CH₂-NR₇-,



en la que R₇ representa alquilo (C₁-C₃).

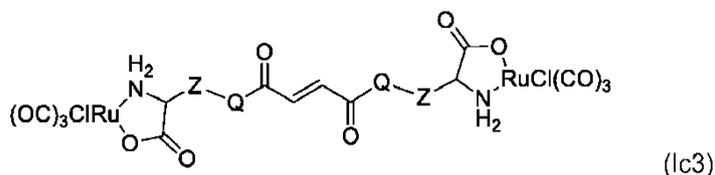
5 Ventajosamente, Q es O o NR₂, preferentemente O.

Algunos otros compuestos ventajosos de fórmula (Ic) presentan la fórmula (Ic2):



10

Algunos otros compuestos ventajosos de fórmula (Ic) presentan la fórmula (Ic3):



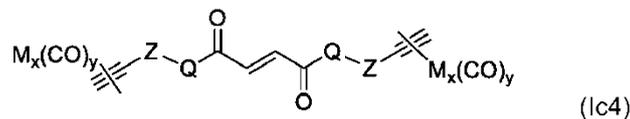
15 en la que:

Q y Z son tal como se ha definido para la fórmula (I).

Ventajosamente, Q-Z es la cadena lateral de un aminoácido, tal como serina, cisteína, tirosina o lisina.

20

Algunos compuestos ventajosos adicionales de fórmula (Ic) presentan la fórmula (Ic4):

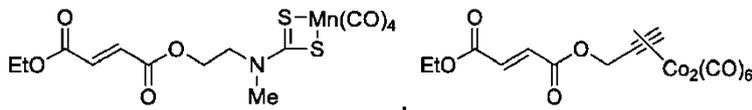


25 en la que:

M_x(CO)_y representa Co₂(CO)₆ o Co₄(CO)₁₀, preferentemente Co₄(CO)₁₀,
Q y Z son tal como se ha definido para la fórmula (I).

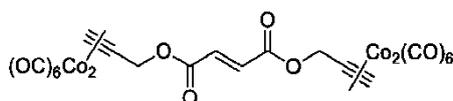
30 Más ventajosamente, Q es O y Z es -alquilo (C₁-C₆), preferentemente -alquilo (C₁-C₃).

Ventajosamente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre:

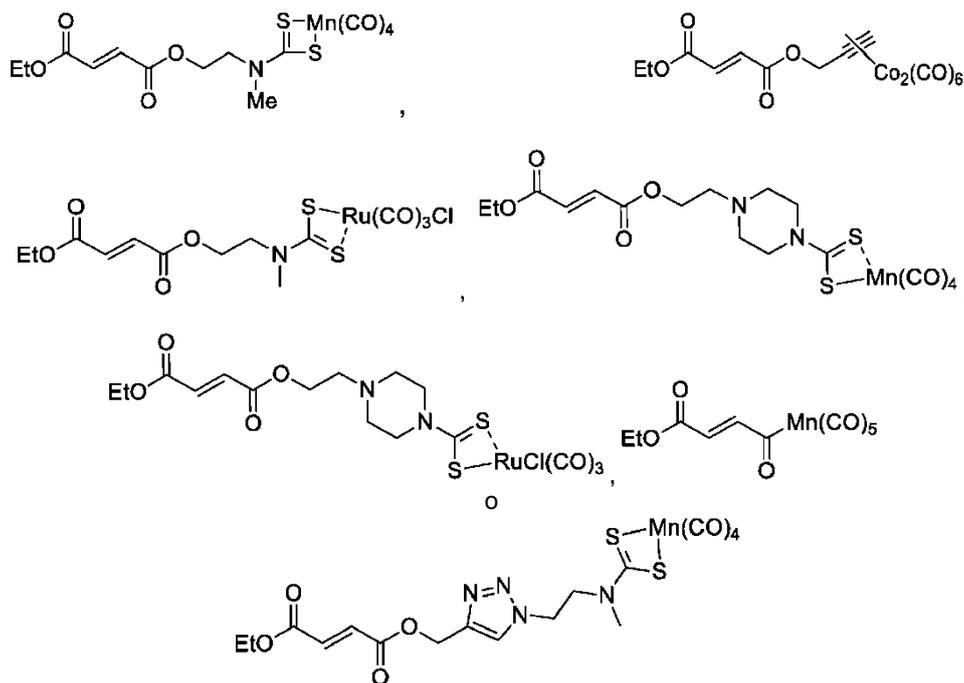


35

y



40 En una forma de realización particular, el compuesto de fórmula (I) es:



5

10 La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de fórmula (Ia) tal como se define en la reivindicación 1 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se ha definido anteriormente y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención resultan ventajosamente adecuadas para la administración por vía oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, tópica o rectal. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse mediante inhalación, por ejemplo mediante un aerosol. El principio activo puede administrarse en formas unitarias para la administración, mezcladas con portadores farmacéuticos convencionales, en animales o en seres humanos.

20 En el caso de que se prepare una composición sólida en forma de comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutica y otros excipientes convencionales conocidos por el experto en la materia.

25 Los compuestos de la invención pueden utilizarse en una composición farmacéutica en una dosis comprendida entre 0,01 mg y 1.000 mg al día, administrados en una única dosis una vez al día o en varias dosis durante el día, por ejemplo dos veces al día. La dosis administrada diariamente comprende ventajosamente entre 5 mg y 500 mg, y más ventajosamente entre 10 mg y 200 mg. Sin embargo, puede resultar necesario utilizar dosis fuera de estos intervalos, que podría concebir el experto en la materia.

30 La presente invención se refiere además a un compuesto de fórmula (I), a una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, o a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de fórmula (I), una sal, solvato o hidrato del mismo, para la utilización como fármaco.

35 La presente invención se refiere además a por lo menos un compuesto de fórmula (I), a una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, o a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de fórmula (I), una sal, solvato o hidrato del mismo, para la utilización en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares o inflamatorias.

40 La presente invención se refiere además a la utilización de por lo menos un compuesto de fórmula (I), a una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para la utilización en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares o inflamatorias.

45 La presente exposición se refiere además a un método de tratamiento de enfermedades cardiovasculares o inflamatorias, que comprende la administración de por lo menos un compuesto de fórmula (I), a una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, o a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de fórmula (I), una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en una persona que lo necesita.

Entre las enfermedades inflamatorias y cardiovasculares según la presente invención se incluyen la isquemia miocárdica y enfermedades cardíacas, artritis reumatoide, lesiones agudas y crónicas de la piel (cicatrización de

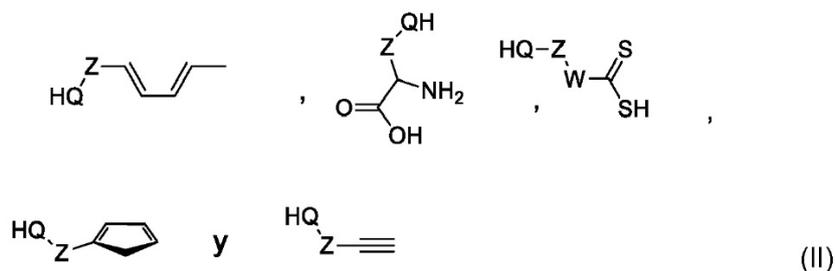
heridas), enfermedad intestinal inflamatoria, íleo postoperatorio, isquemia cerebral, soriasis, diabetes, nefropatía diabética, síndrome metabólico, enfermedad de células falciformes, enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson, dolor neuropático, hipertensión, hipertensión arterial pulmonar, septicemia, choque séptico o endotóxico, choque hemorrágico, esclerosis múltiple, cáncer y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Las enfermedades inflamatorias y cardiovasculares preferentes según la presente invención son lesiones cutáneas (cicatrización de heridas), isquemia cerebral y cardíaca, soriasis, diabetes, esclerosis múltiple, cáncer y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar los compuestos de fórmula (Ia) tal como se define en la reivindicación 1, y a sus sales, hidratos o solvatos.

Los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse según dos métodos.

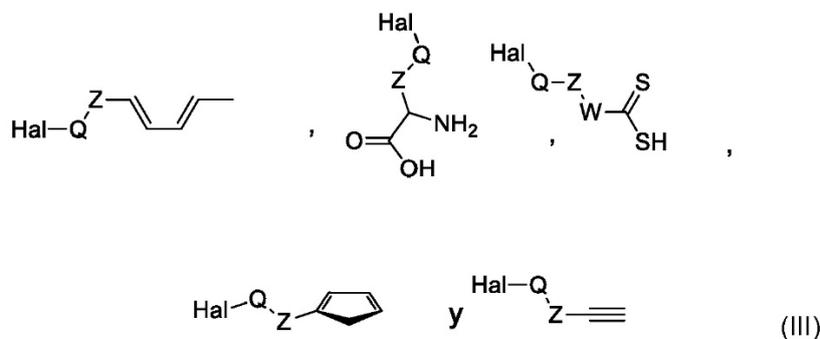
Método (a):

Etapa (1): el diacil cloruro, bromuro, fluoruro o éster diactivo de ácido fumárico o monoacil cloruro, bromuro, fluoruro o éster monoactivado de un monoéster, monoamida o monotioéster de ácido fumárico se esterifica con un compuesto de fórmula (II) seleccionado de:



en la que Z y Q son tal como se ha definido anteriormente.

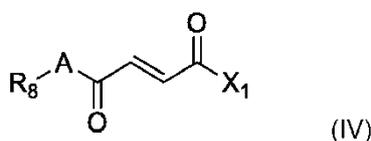
Alternativamente, el ácido fumárico o el monoéster de ácido fumárico puede alquilarse con un compuesto de fórmula (III) seleccionado de:



en la que Z y Q son tal como se ha definido anteriormente y Hal representa un grupo saliente, tal como halógeno o sulfonato, tal como trifluorometano-sulfonato.

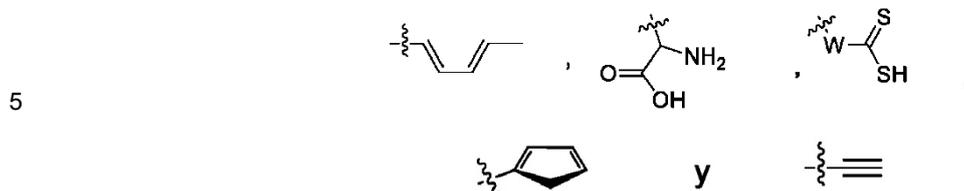
Etapa (2): el compuesto obtenido en la etapa (1) se hace reaccionar con un complejo de metal carbonilo adecuado de fórmula $L_1L_2M_x(CO)_y$ en la que x es 1 o 2 e y es 1 a 10, L_1 y L_2 representan, cada uno, un ligando monodentado o L_1L_2 representa un ligando bidentado, rindiendo, tras la desprotección opcional, el compuesto de fórmula (I).

Por lo tanto, la exposición se refiere a un procedimiento para la síntesis de un compuesto de fórmula (I) que comprende la reacción de un derivado de ácido fumárico de fórmula (IV):



en la que:

X₁ representa A-R₈, A-CORM, A'-CORM' o Q'-Y tal como se define para la fórmula (I), y R₈ representa un grupo seleccionado de entre:



10 con un complejo de metal carbonilo de fórmula L₁L₂M_x(CO)_y en la que x es 1 o 2 e y es 1 a 10, L₁ y L₂ representan, cada uno, un ligando monodentado o L₁L₂ representa un ligando bidentado.

Método (b):

15 El diacil cloruro, bromuro, fluoruro o éster diactivo de ácido fumárico o monoacil cloruro, bromuro, fluoruro o éster monoactivado de un monoéster, monoamida o monotioéster de ácido fumárico se esterifica con un compuesto de fórmula H-A-CORM.

20 Alternativamente, ácido fumárico o el monoéster de ácido fumárico puede alquilarse con un compuesto de fórmula Hal-A-CORM, en la que A es tal como se ha definido anteriormente y Hal representa un grupo saliente, tal como halógeno o sulfonato, tal como trifluorometano-sulfonato.

Por lo tanto, la exposición se refiere a un procedimiento para la síntesis de un compuesto de fórmula (I) que comprende la reacción de un derivado de ácido fumárico de fórmula (V):



en la que:

30 X₁ representa Cl, F, Br o un éster, ventajosamente un éster activado,

X₂ representa Cl, F, Br o un éster, ventajosamente un éster activado, A-CORM, A'-CORM' o Q'-Y tal como se define para la fórmula (I),

35 con un compuesto de fórmula H-A-CORM en la que A-CORM es tal como se define para la fórmula (I),

o,

40 la reacción de un compuesto de fórmula (I), en la que X₁ y/o X₂ representa OH con un compuesto de fórmula Hal-A-CORM en la que Hal representa un grupo saliente, tal como halógeno o sulfonato, por ejemplo un trifluorometano-sulfonato.

En el contexto de la presente invención, la expresión "grupo saliente" se refiere a un grupo químico que puede sustituirse fácilmente por un nucleófilo durante una reacción de sustitución de nucleófilo.

45 En el contexto de la presente invención, la expresión "éster activado" pretende referirse a un éster que potencia la reactividad del grupo o grupos carbonilo del ácido fumárico. Dichos ésteres activados pueden prepararse antes de la reacción o generarse *in situ* según procedimientos bien conocidos.

50 Entre los ejemplos de reactivos utilizables para preparar los ésteres activados se incluyen agentes de acoplamiento, tales como diisopropilcarbodiimida (DIC), dicitlohexilcarbodiimida (DCC), hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), carbonildiimidazol (CDI), hexafluorofosfato de 2H benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), hexafluorofosfato O(7-azobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) o hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolodionofosfonio (PyBOP), opcionalmente asociado con un acoplamiento auxiliar, tal como N-hidroxisuccinimida (NHS), N-hidroxibenzotriazol (HOBT), 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazol (HOBT), I-hidroxi-7-azabenzotriazol (HAt) o N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo NHS).

55 En caso de hallarse presentes, los grupos funcionales que pueden interferir con la reacción deseada, por ejemplo heteroátomos, tales como N o O, pueden protegerse para evitar reacciones no deseables durante los

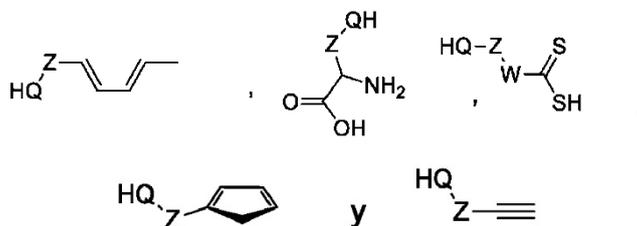
procedimientos sintéticos.

El experto en la materia podrá determinar si los grupos protectores resultan necesarios. Los grupos protectores adecuados son conocidos de la técnica y se dan a conocer en, por ejemplo, Greene, "Protective Groups In Organic synthesis", (John Wiley & Sons, New York (1981).

Los monoésteres de ácido fumárico, es decir, los compuestos de fórmula (II), en la que X_1 representa Q'-Y, pueden prepararse mediante esterificación, amidación o tioesterificación de ácido fumárico o un derivado del mismo con un compuesto de fórmula H-Q'-Y, o mediante alquilación de ácido fumárico con un compuesto de fórmula Hal-Y, en la que Hal es un grupo saliente, tal como Br, Cl, I o OSO_2CF_3 e Y es tal como se ha definido anteriormente bajo condiciones convencionales.

Los compuestos de fórmula (V) en la que X_1 representa A-CORM puede prepararse haciendo reaccionar ácido fumárico con un compuesto de fórmula H-A-CORM o Hal-A-CORM según el método (b) descrito anteriormente, y en caso de requerirse para la transformación del ácido carboxílico en un acil cloruro, bromuro, fluoruro o éster activado.

Los compuestos de fórmula (Ic) pueden obtenerse en un procedimiento en una etapa haciendo reaccionar el cloruro de diacilo de ácido fumárico con dos equivalentes de un compuesto de fórmula H-A-CORM o dos equivalentes de un compuesto seleccionado de:



seguido de la reacción con por lo menos dos equivalentes de un complejo de carbonilo metálico de fórmula $L_1L_2M_x(CO)_y$, en la que x es 1 o 2 e y es 1 a 10, L_1 y L_2 representa cada uno de un ligando monodentado o L_1L_2 representa un ligando bidentado con respecto a la cantidad del éster de fumarato.

El compuesto de fórmula (Ia2) y (Ic2) puede obtenerse haciendo reaccionar el monoacil cloruro de un éster de fumarato o el diacil cloruro de ácido fumárico con una cantidad apropiada de un complejo de carbonilo-manganeso aniónico, tal como $Na^+[Mn(CO)_5]$.

Las condiciones para preparar los compuestos de fórmula H-A-CORM o los compuestos de fórmula (I) según el método (a) implican métodos y procedimientos conocidos de la técnica.

Definiciones:

La presente invención comprende únicamente compuestos estables. A este respecto, en referencia a "isómeros", sólo se consideran isómeros estables.

Dentro de los grupos, radicales o fragmentos definidos en la descripción y en las reivindicaciones, el número de átomos de carbono se especifica dentro de los paréntesis. Por ejemplo, alquilo (C_1-C_6) designa un grupo o radical alquilo con 1 a 6 átomos de carbono.

En las fórmulas,  indica el enlace unido al resto de la molécula.

Para los grupos que comprenden dos o más subgrupos, la unión se indica con "-". Por ejemplo, "-alquil (C_1-C_6)-aril-alqueno (C_1-C_6)-" indica un radical alquilo unido a un radical arilo que a su vez está unido a un alqueno, en el que los grupos alquilo y alqueno se encuentran unidos al resto de la molécula.

En el contexto de la presente invención, la expresión "-alquilo (C_1-C_6)" designa una cadena hidrocarburo acíclica, saturada, lineal o ramificada que comprende 1 a 6 átomos de carbono. Entre los ejemplos de grupos -alquilo (C_1-C_6) se incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o hexilo. A menos que se indique explícitamente, las definiciones de propilo, butilo, pentilo y hexilo incluyen todos los isómeros estructurales posibles. Por ejemplo, butilo comprende n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo.

En el contexto de la presente invención, la expresión "-alqueno (C_2-C_6)" designa una cadena hidrocarburo acíclica, saturada, lineal o ramificada que comprende 2 a 6 átomos de carbono, por lo menos 2 de los cuales están unidos mediante un doble enlace. Entre los ejemplos de "-alqueno (C_2-C_6)" se incluyen etenilo o vinilo,

propenilo, butenilo, pentenilo o hexenilo. A menos que se indique explícitamente, entre las definiciones de propenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo se incluyen todos los isómeros de posición posibles.

5 En el contexto de la presente invención, la expresión "-alquinilo (C₂-C₆)" designa una cadena hidrocarburo acíclica, saturada, lineal o ramificada que comprende 2 a 6 átomos de carbono, por lo menos 2 de los cuales están unidos mediante un triple enlace. Entre los ejemplos de "-alquinilo (C₂-C₆)" se incluyen etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo o hexinilo. A menos que se indique explícitamente, entre las definiciones de propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo se incluyen todos los isómeros de posición posibles.

10 El término sustituido tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que cualquiera de los átomos de hidrógeno puede sustituirse por un sustituyente, tal como flúor.

15 En el contexto de la presente invención, la expresión "-cicloalquilo (C₃-C₁₄)" designa una estructura mono-, di- o tri-cíclica saturada o parcialmente saturada que comprende 3 a 14 átomos de carbono. Entre los ejemplos de "-cicloalquilo (C₃-C₁₄)" se incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclopentenilo y ciclohexenilo.

20 Entre los ejemplos de "-cicloalquilo (C₃-C₈)" se incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo. A menos que se indique explícitamente, los cicloalquilos pueden sustituirse por uno o más grupos, tales como metilo, etilo, isopropilo, hidroxilo, flúor, cloro, bromo y yodo.

25 En el contexto de la presente invención, la expresión "-heterociclilo (C₃-C₈)" designa heterociclos saturados con 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos en el anillo, en el que 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de N, O y S sustituyen el número correspondiente de átomos de carbono. Entre los ejemplos de "-heterociclilo (C₃-C₈)" se incluyen aziridinilo, oxiranilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, oxazolilo, piperidinilo, piperazinilo y morfolinilo.

30 El término "arilo" designa un anillo monocíclico aromático que puede fusionarse con un segundo anillo saturado, insaturado o aromático. El término arilo incluye, sin restricción a los ejemplos, posteriormente, fenilo, indanilo, indenilo, naftilo, antraceno, fenantreno, tetrahidronaftilo y dihidronaftilo. El arilo más preferente son los que comprenden un anillo aromático de seis elementos. El grupo arilo puede sustituirse, preferentemente con uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alcoxi, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, trifluoro, ácido carboxílico o éster carboxílico.

35 El término heteroarilo designa un arilo mono- o policíclico tal como se ha definido anteriormente en el que uno o más átomos de carbono han sido sustituidos por uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S. A menos que se indique explícitamente, el término "heteroarilo" incluye todos los posibles isómeros de posición.

40 Entre los ejemplos de grupos heteroarilo se incluyen furilo, tienilo, imidazolilo, piridilo, pirrolilo, N-alquil pirrolilo, pirimidinilo, pirazinilo, tetrazolilo, triazolilo y triazinilo. El grupo heteroarilo puede sustituirse, preferentemente con uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alcoxi, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, trifluoro, ácido carboxílico o éster carboxílico. Los heteroarilos preferentes son aquellos que presentan 5 o 6 átomos en el anillo, tal como indolilo, pirrolilo, piridinilo, pirrazolilo, triazolilo, furanilo o tienilo.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "halógeno" designa un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

50 Para el propósito de la invención, la expresión "farmacéuticamente aceptable" pretende referirse a lo que resulta útil para la preparación de una composición farmacéutica, y que resulta generalmente seguro y no tóxico, para un uso farmacéutico.

55 La expresión "sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable" pretende significar, en el contexto de la presente invención, una sal de un compuesto que resulta farmacéuticamente aceptable, tal como se ha definido anteriormente, y que presenta la actividad farmacológica del compuesto correspondiente. Dichas sales comprenden:

(1) hidratos y solvatos,

60 (2) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico y fosfórico y similares, o formarse con ácidos orgánicos, tales como los ácidos acético, benzenosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroxinaftoico, 2-hidroxi-etanosulfónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mucónico, 2-naftalenosulfónico, propiónico, succínico, dibenzoil-L-tartárico, tartárico, p-toluenosulfónico, trimetilacético y trifluoroacético, y similares, y

65 (3) sales formadas al sustituir un protón ácido presente en el compuesto por un ión metálico, tal como un ion

metal alcalino, un ión alcalinotérreo o un ión de aluminio, o coordinados con una base orgánica o inorgánica. Entre las bases orgánicas aceptables comprenden dietanolamina, etanolamina, N-metilglucamina, trietanolamina, trometamina y similares. Las bases inorgánicas aceptables comprenden hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido potásico, carbonato sódico e hidróxido sódico.

5

Descripción de las figuras:

La figura 1 representa la absorbancia de UV de monóxido de carbono-mioglobina (MbCO) en presencia de un derivado de curcumina según el documento WO 2012/076696 (figura 1A), compuesto A (figura 1B) y compuesto B (figura 1C) en diferentes tiempos. La presencia de picos de absorbancia en 540 y 578 nm indica la formación de monóxido de carbono-mioglobina (MbCO) (figura 1A-C). El CO intracelular según el ensayo de COP-1 del Ejemplo 2 para diferentes concentraciones de compuesto C se muestra en la figura 1D.

10

La figura 2 representa la actividad de la heme oxigenasa en microglía BV2 en ausencia (CON) o en presencia de concentraciones crecientes de compuesto A (figura 2A), o compuesto C, compuesto comparativo CORM-401 del documento WO 2008/003953, y compuesto comparativo J (figura 2B). La actividad de heme oxigenasa se expresa en el eje Y como porcentaje del control.

15

La figura 3 representa en el eje Y la producción de nitrito, expresada en μM , en microglías BV2 (CON), en microglías BV2 retadas durante 24 h con lipopolisacárido (LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$) (LPS) y en microglías BV2 retadas con lipopolisacárido (LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$) (LPS) en presencia de concentraciones crecientes de compuesto A (figura 3A) o compuesto B (figura 3B). La figura 3C y figura 3D representan en el eje Y la producción de nitrito, expresada en μM , en microglías BV2 (CON), en microglías BV2 retadas durante 24 h con lipopolisacárido (LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$) y en microglías BV2 retadas con lipopolisacárido (LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$) (LPS) en presencia de concentraciones crecientes de compuesto C (1, 2,5 y 5 μM) y en presencia de 5 μM de un derivado de curcumina según el documento WO 2012/076696 (figura 3C) o en presencia de 5 μM de derivado de fumarato comparativo (compuesto J) y compuesto comparativo CORM-401 del documento WO 2008/003953 (figura 3D).

20

25

La figura 4 representa la citotoxicidad del compuesto A (figura 4A), compuesto B (figura 4B) medida en microglías BV2 y un derivado de curcumina comparativo según el documento WO 2012/076696 (figura 4C) medida en macrófagos RAW, compuesto A medido en células queratinocitos (figura 4D) o compuesto A medido en células THP-1 (figura 4E) como porcentaje del control (eje Y) con una concentración creciente de compuesto A o B (eje X).

30

35

La figura 5 representa expresión de Nrf-2 (figura 5A) en microglías BV2 (control), en microglías BV2 en presencia de compuesto A y en microglías BV2 en presencia de compuesto B. La presencia del compuesto en el experimento se indica mediante "+", y en su ausencia, mediante "-". La figura 5B representa la expresión de HO-1 en microglías BV2 en ausencia (control) o en presencia de una concentración creciente de compuesto A. La figura 5C representa la expresión de HO-1 y la expresión de Nrf-2 en microglías BV2 en presencia de una concentración creciente de compuesto C, compuesto comparativo CORM-401 del documento WO 2008/003953 o compuesto comparativo J. La figura 5D representa la expresión de HO-1 y la expresión de Nrf-2 en células queratinocitos durante el tiempo en presencia de compuesto C. La figura 5E representa la expresión de HO-1 y la expresión de Nrf-2 en células queratinocitos en presencia de una concentración creciente de compuesto C o dimetilfumarato (DMF) comparativo o C+ de control positivo comparativo (cinamaldehído, 100 μM), que es conocido que activan Nrf2. La figura 5F representa la expresión de HO-1 y la expresión de Nrf-2 en células THP-1 en presencia de una concentración creciente de compuesto A, compuesto B o compuesto C.

40

45

La figura 6 representa la concentración de CO liberado (eje Y, expresado como la cantidad de monóxido de carbono-mioglobina detectada en μM) como función del tiempo (eje X, expresado en minutos) utilizando desoximioglobina (Mb, 100 μM) en presencia de compuesto A (figura 6A, -■-) y compuesto B (figura 6A y figura 6B, -●-).

50

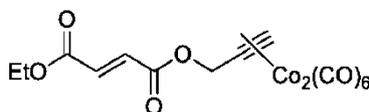
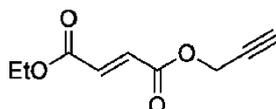
La figura 7 representa la producción de TNF- α en macrófagos humanos retados con LPS en presencia de compuesto C y compuesto E.

55

La figura 8 representa la producción de TNF- α en célula THP-1 humanas retadas con LPS en presencia de compuesto C y compuesto E.

60

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplos**Ejemplo 1: síntesis de híbridos de CO-RM-fumarato según la invención:**5 Compuesto A:10 Etapa 1: preparación de:

15 Una solución de fumarato de monoetilo (1,544 g, 10,78 mmoles), bromuro de propargilo (4,488 g, 37,73 mmoles) y carbonato de potasio (1,851 g, 13,34 mmoles) en acetona (104 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El bromuro de potasio formado se separó mediante filtración y se eliminó el solvente bajo presión reducida. La mezcla en bruto se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice, eluyendo con ciclohexano/acetato de etilo (8/2 Rf=0,5), proporcionando el producto esperado con un rendimiento de 68% en forma de un líquido incoloro.

20 RMN (400 MHz) en CDCl_3 :

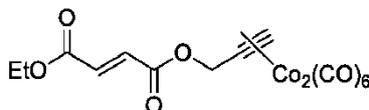
^1H δ (ppm): 1.32 (t, 3H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 2.52 (t, 1H, CH, $J=0,1$ Hz) ; 4.26 (q, 2H, CH_2 , $J=7,1$ Hz); 4.8 (d, 2H, CH_2 , $J=2,4$ Hz); 6.86 (d, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J=15,8$ Hz); 6.92 (d, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J=15,8$ Hz).

25 ^{13}C δ (ppm): 14.2 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 52.8 (CH_2O); 61.6 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 75.6 (CH); 76.8 (C); 132.5 ($\text{CH}=\text{CH}$); 134.9 ($\text{CH}=\text{CH}$); 164.3 (C=O); 164.8 (C=O).

Análisis elemental: Calc.: C, 59,34; H, 5,53. Observado: C, 59,13; H, 5,53.

30 EM (IE) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 183 (17); 137 (25,44); 127 (100); 99,1 (29,44); 81,1 (17,05); 79,1 (24,25); 71,1 (17,94); 55 (48,89); 53,1 (31,65).

IR (ATR, cm^{-1}): 3300, 1663, 1617.

35 Etapa 2: preparación de compuesto A

40 En un tubo de Schlenk protegido de la luz y bajo atmósfera inerte de argón, una solución de fumarato obtenida en la etapa 1 (0,1012 g, 0,5560 mmoles, 1 eq.) de octacarbonylo de dicobalto $(\text{CO})_8$, 0,1901 g, 0,5560 mmoles, 1 eq.) en éter dietílico anhidro (2 ml) se agita a temperatura ambiente durante 3 h 40' (la completitud de la reacción se monitoriza mediante cromatografía de capa fina, CCF). Se eliminó el solvente bajo presión reducida y con exclusión de la luz. La mezcla en bruto se introdujo en ciclohexano (15 ml) y el KBr precipitado se filtró sobre Celite. Tras la evaporación del ciclohexano, se obtuvo un residuo violeta-negro aceitoso y se purificó mediante cromatografía preparativa sobre alúmina (eluyente: pentano/éter dietílico: 9/1).

Se obtuvieron 187,4 mg de un compuesto aceitoso. La recrystalización de 101 mg del aceite en hexano a -18°C proporcionó 70 mg de compuesto A en forma de cristales rojos-negros.

50 RMN (400 MHz) in CDCl_3

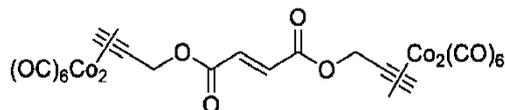
^1H δ (ppm): 1.26 (s, 3H, CH_3); 4.19 (s, 2H, CH_2O); 5.35 (s, 2H, CH_2); 6.02 (s, 1H, CH) ; 6.85 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$).

55 ^{13}C δ (ppm): 13.1 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 60.4 (OCH_2); 64.8 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 70.9 (CH); 86.7 (C); 131.6 ($\text{CH}=\text{CH}$); 133.6 ($\text{CH}=\text{CH}$); 163.3 (C=O); 163.8 (C=O); 197.9 (C=O).

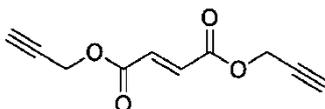
Análisis elemental: Calc.: C, 38,49; H, 2,15. Observado: C, 38,45; H, 2,25.

IR (ATR, cm^{-1}): 2100, 2050 (CO); 1967 (CO); 1717.

5 Compuesto B:



10 Etapa 1: preparación de:



15 A un tubo de Schlenk, se le añadieron sucesivamente 0,1g (1 eq, 7×10^{-4} moles) de carbonato de potasio y 0,275 g (2 eq, $1,4 \times 10^{-3}$ moles) de bromuro de tetraetilamonio (Et_4NBr) disueltos en 10 ml de cloroformo, 76 μl (1 eq, 7×10^{-4} moles) de cloruro de fumarilo y 82 μl (2 eq, $1,4 \times 10^{-3}$ moles) de alcohol propargílico. A continuación, la solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

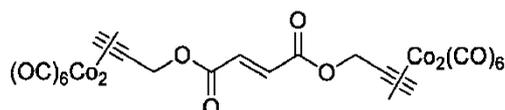
20 Se eliminó el solvente bajo presión reducida y el producto se obtuvo tras la cromatografía flash en gel de sílice (eluyente: 8/2 ciclohexano/acetato de etilo) en forma de un sólido blanco con un rendimiento de 50%.

RMN ^1H (CDCl_3): 2.46 (2H, 3Hz, t, H1), 4.74 (4H, 3Hz, t, H3), 6.87 (2H, s, H5)

25 RMN ^{13}C (CDCl_3): 75.6 (C3), 133.7 (C5), 163.8 (C4)

IR:v = 1650, 1720 cm^{-1}

30 Etapa 2: preparación de compuesto B



35 Se disolvieron 200 mg ($1,04 \times 10^{-3}$ moles) del fumarato obtenido en la etapa 1 en 10 ml de cloroformo en un tubo de Schlenk protegido de la luz. Una solución de octacarbonilo de dicobalto en cloroformo se añadió gota a gota a temperatura ambiente (356 mg, $1,04 \times 10^{-3}$ moles en 15 ml de cloroformo) y se monitorizó el avance de la reacción mediante CCF. Tras completarse la reacción, se eliminó el cloroformo bajo presión reducida y se obtuvo el producto mediante cromatografía en gel de sílice (eluyente 6/4 ciclohexano/cloroformo) como polvos rojos-negros.

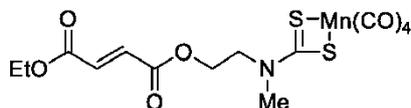
40 RMN ^1H (CDCl_3): 6,95 (1H, H5), 6,04 (1H, H1), 5,40 (2H, H3)

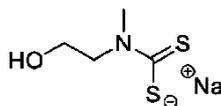
RMN ^{13}C (CDCl_3): 199 (12C, C6), 164,6 (2C, C4), 133, (2C, C5), 87,9 (2C, C2), 72 (2C, C1), 66,2 (2C, C3)

45 Análisis elemental: Calc.: C, 34,58; H, 1,06; Observado: C, 34,99; H, 1,30.

IR:v = 2097, 2013, 1714 cm^{-1}

50 Compuesto C:



Etapa 1: preparación de (2-hidroxietil)(metil)carbamoditioato de sodio

5

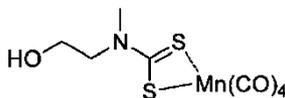
A una solución de disulfuro de carbono (452 μ l, 7,5 mmoles, 1,5 eq.) en 10 ml de THF anhidro bajo atmósfera inerte de argón, se le añadió gota a gota a 0°C 2-(metilamino)etanol (400 μ l, 5,0 mmoles, 1,0 eq.). Tras agitar a 0°C durante 5 minutos, se añadió en partes hidruro sódico (dispersión al 60% en aceite mineral, 200 mg, 5,0 mmoles, 1,0 eq.). Tras 30 minutos de agitación a 0°C, la mezcla se concentró bajo presión reducida y se lavó con ciclohexano para eliminar el aceite mineral y se secó durante la noche bajo presión reducida, rindiendo unos polvos amarillo pálido (842 mg, 4,9 mmoles, rendimiento: 97%).

10

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 3,57 (s, 3H, CH_3), 3,87 (t, J = 6 Hz, 2H, CH_2N), 4,27 (t, J = 6 Hz, 2H, CH_2O)

15

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ (ppm): 44,7 (CH_3N), 59,1 (CH_2N), 61,2 (CH_2O), 214,0 (CS_2).

Etapa 2: preparación de:

20

A una solución de $\text{Mn}(\text{CO})_5\text{Br}$ (137 mg, 0,50 mmoles, 1,0 eq., preparada según el documento US 2010/0105770) en metanol enjuagado con argón (8 ml) se le añadió (2-hidroxietil)(metil)carbamo(manganese)thioato sódico preparado en la etapa 1 (87 mg, 0,50 mmoles, 1,0 eq.). Tras 3 h 30' de agitación a 45°C bajo una atmósfera inerte de argón, la mezcla se introdujo en éter dietílico, se filtró sobre Celite y se concentró, proporcionando un aceite amarillo (149 mg, 0,47 mmoles, rendimiento: 94%) que se utilizó sin purificación adicional en la etapa 3.

25

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,34 (s, 3H, CH_3N), 3,48 (s, 1H, OH), 3,92 (s, 4H, CH_2N , CH_2O)

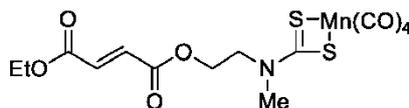
30

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 38,5 (CH_3N), 53,4 (CH_2N), 60,3 (CH_2O), 198,7 (CS_2), 208,9 (CO)

RMN ^{55}Mn (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): - 993,1.

Etapa 3: preparación de compuesto C

35



40

A una solución del compuesto obtenida en la etapa 2 (149 mg, 0,47 mmoles, 1,0 eq.) en diclorometano anhidro (10 ml) se le añadió bajo atmósfera inerte de argón, (E)-etil-4-cloro-4-oxobut-2-enoato (115 mg, 0,71 mmoles, 1,5 eq., preparados tal como se indica en J. Am. Chem. Soc., 118, 8266-8277, 1996) y trietilamina (99 μ l, 0,71 mmoles, 1,5 eq.). Tras agitación a 20°C bajo argón durante 18 horas, la mezcla se concentró bajo presión reducida. La mezcla en bruto se introdujo en éter dietílico y se filtró sobre Celite. Tras la evaporación del solvente y cromatografía flash en gel de sílice (eluyente: acetato de etilo/ciclohexano: 3/7 + NEt_3 al 0,1%), se obtuvieron 107 mg de un sólido amarillo (0,24 mmoles, rendimiento: 51%).

45

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,33 (s, 3H, CH_3C), 3,30 (s, 3H, CH_3N), 4,05 (s, 2H, CH_2N), 4,27 (s, 2H, CH_2O), 4,46 (s, 2H, CH_2O), 6,87 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 6,88 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$)

50

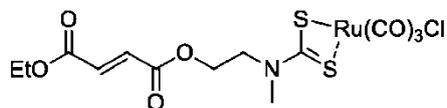
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14,1 (CH_3C), 37,8 (CH_3N), 49,8 (CH_2N), 61,4 (CH_2O), 61,5 (CH_2O), 132,4 ($\text{CH}=\text{C}$),

34,9 ($\text{CH}=\text{C}$), 164,6 ($\text{CO}_{\text{éster}}$), 164,7 ($\text{CO}_{\text{éster}}$), 197,0 (CS_2), 210,1 (CO_{metal})

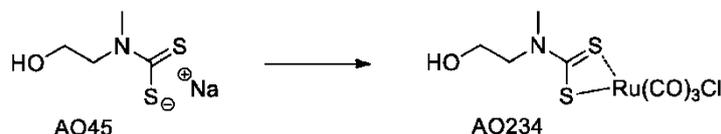
55

RMN ^{55}H (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): - 984,5

Análisis elemental: Calc.: C (37,93), H (3,18), N (3,16); Observado: C (38,12), H (3,28), N (3,09).

Compuesto D:

5

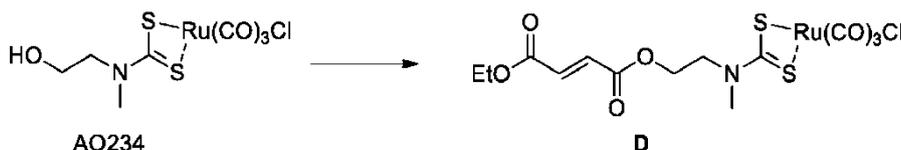
Etapa 1: preparación de compuesto AO234

10 A una suspensión de $[\text{RuCl}_2(\text{CO})_3]_2$ (324 mg, 0,63 mmoles, 0,5 equiv.) en metanol (13 ml) se le añadió (2-hidroxiethyl)(metil)carbamoditioato sódico (preparado tal como en la etapa 1 de la síntesis de compuesto C) (219 mg, 1,26 mmoles, 1,0 equiv.). Tras 3 h de agitación a 20°C bajo argón, la mezcla de reacción se concentró al vacío, se disolvió en EtOAc, se filtró sobre Celite y se concentró al vacío, proporcionando el compuesto **AO234** (435 mg, 1,17 mmoles) en forma de un sólido amarillo pálido que se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional. RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ 3.96-3.77 (M, 4H, CH_2N , CH_2O), 3.37 (s, 3H, CH_3N), RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ 210.27 (CS_2), 188.95 (CO_{metal}), 188.72 (CO_{metal}), 59.81 (CH_2O), 55.03 (CH_2N), 38.86 (CH_3N).

15

Etapa 2: preparación de compuesto D

20

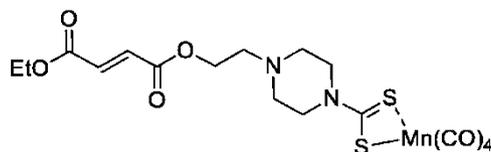


25

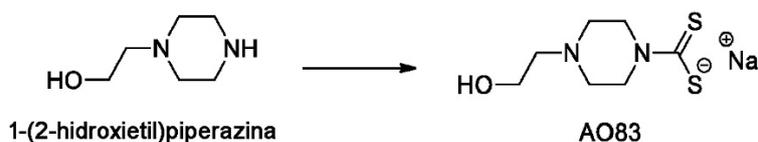
30

35

A una solución de compuesto AO234 (435 mg, 1,17 mmoles, 1,0 equiv.) en diclorometano anhidro (16 ml) se le añadió bajo argón etil-éster de ácido (*E*)-4-cloro-4-oxo-2-butenoico (285 mg, 1,76 mmoles, 1,5 equiv.) y 4-DMAP (215 mg, 1,76 mmoles, 1,5 equiv.). Tras 17 h de agitación a 40°C bajo argón, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El producto en bruto resultante se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice, eluyendo con ciclohexano/EtOAc (60/40) y se secó con una bomba de paletas durante una noche, proporcionando el **compuesto D** (312 mg, 0,63 mmoles) en forma de un sólido blanco con un rendimiento de 50% (dos etapas). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 6.89 (d, $J = 21.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 6.85 (d, $J = 21.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 4.48 (m, 2H, CH_2O), 4.30 (m, 1H, CH_2N), 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2O), 3.80 (m, 1H, CH_2N), 3.35 (s, 3H, CH_3N), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3C). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 211.09 (CS_2), 186.98 (CO_{metal}), 186.67 (CO_{metal}), 186.66 (CO_{metal}), 164.59 ($\text{CO}_{\text{éster}}$), 164.47 ($\text{CO}_{\text{éster}}$), 135.07 ($\text{CH}=\text{C}$), 132.17 ($\text{CH}=\text{C}$), 61.51 (CH_2O), 61.13 (CH_2O), 50.09 (CH_2N), 37.92 (CH_3N), 14.05 (CH_3C). Anal. calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ClNO}_7\text{RuS}_2$ (496,91): C, 31,42; H, 2,84; N, 2,82. Observado: C, 31,49; H, 2,80; N, 2,79.

Compuesto E:

40

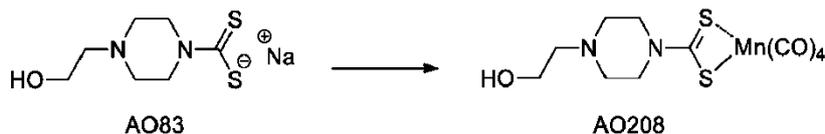
Etapa 1: preparación de compuesto AO 83

45

A una solución de 1-(2-hidroxiethyl)piperazina (651 mg, 5,00 mmoles, 1,0 equiv.) en tetrahidrofurano anhidro (15 ml) se le añadió a 0°C bajo argón y, gota a gota, disulfuro de carbono (452 μl , 7,50 mmoles, 1,5 equiv.). Tras 15

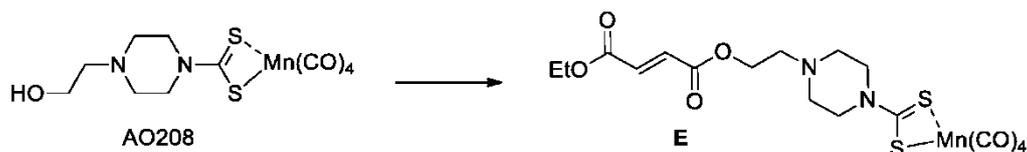
min de agitación a 0°C, se añadió en partes hidruro sódico (dispersión al 60% en aceite mineral) (200 mg, 5,00 mmoles, 1,0 equiv.). Tras 40 min de agitación a 0°C, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El producto en bruto resultante se lavó varias veces con ciclohexano para eliminar el aceite mineral y después se concentró al vacío y se secó con una bomba de paletas durante una noche, proporcionando el compuesto **AO83** (1,10 g, 4,82 mmoles) en forma de unos polvos amarillo pálido con un rendimiento de 96%, que se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional. RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ 4.46 (t, J = 4.8 Hz, 4H, CH₂N), 3.71 (t, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂O), 2.55 (t, J = 5.1 Hz, 6H, CH₂N). RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) δ 60.98 (CH₂N), 59.80 (CH₂O), 54.35 (CH₂N), 51.20 (CH₂N).

10 Etapa 2: preparación de compuesto AO208



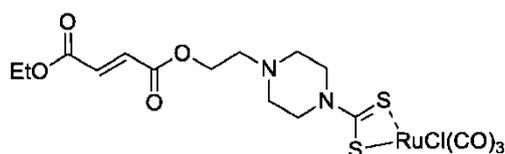
15 A una solución de compuesto **AO83** (318 mg, 1,39 mmoles, 1,1 equiv.) en metanol (20 ml) se le añadió Mn(CO)₅Br (346 mg, 1,26 mmoles, 1,0 equiv.). Tras 3 h de agitación a 45°C bajo argón, la mezcla de reacción se concentró al vacío, se disolvió en éter dietílico, se filtró sobre Celite y se concentró al vacío, proporcionando el compuesto **AO208** (443 mg, 0,32 mmoles) en forma de un aceite amarillo con un rendimiento de 94%, que se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional. RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ 3.91 (s, 4H, CH₂N), 3.68 (s, 2H, CH₂O), 2.58 (s, 6H, CH₂N). RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) δ 207.67 (CO_{metal}), 60.60 (CH₂N), 59.79 (CH₂O), 53.34 (CH₂N), 46.86 (CH₂N). RMN ⁵⁵Mn (100 MHz, MeOD) δ - 1025.7. Anal. Calc. para C₁₁H₁₃MnN₂O₅S₂ (372,30): C, 35,49; H, 3,52; N, 7,52. Observado: C, 35,64; H, 3,71; N, 7,10.

25 Etapa 3: preparación de compuesto E

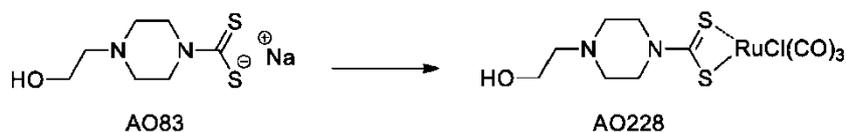


30 A una solución de compuesto **AO208** (247 mg, 0,66 mmoles, 1,0 equiv.) en diclorometano anhidro (9 ml) se le añadió bajo argón etil-éster de ácido (*E*)-4-cloro-4-oxo-2-butenóico (162 mg, 1,00 mmoles, 1,5 equiv.) y 4-DMAP (122 mg, 1,00 mmoles, 1,5 equiv.). Tras 18 h de agitación a 40°C bajo argón, la mezcla de reacción se concentró al vacío, después se disolvió en éter dietílico, se filtró sobre Celite y se concentró al vacío. El producto en bruto resultante se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice, eluyendo con ciclohexano/EtOAc (70/30 + NEt₃ al 0,1%), proporcionando el **compuesto E** (151 mg, 0,30 mmoles) en forma de un sólido amarillo con un rendimiento de 45%. RMN ¹H (400 MHz, C₆D₆) δ 6.96 (s, 2H, CH₂=C), 3.88 (s, 2H, CH₂O), 3.79 (s, 2H, CH₂O), 3.23 (s, 4H, CH₂N), 1.87 (s, 2H, CH₂N), 1.65 (s, 4H, CH₂N), 0.86 (s, 3H, CH₃C). RMN ¹³C (100 MHz, C₆D₆) δ 206.93 (CO_{metal}), 164.55 (CO_{ester}), 134.27 (CH₂=C), 133.33 (CH₂=C), 61.82 (CH₂O), 61.23 (CH₂O), 55.78 (CH₂N), 51.54 (CH₂N), 45.87 (CH₂N), 13.95 (CH₃C). RMN ⁵⁵Mn (100 MHz, C₆D₆) δ - 990.3. Anal. Calc. para C₁₇H₁₉MnN₂O₈S₂ (498,41): C, 40,97; H, 3,84; N, 5,62. Observado: C, 41,08; H, 4,06; N, 5,73.

40 Compuesto F:



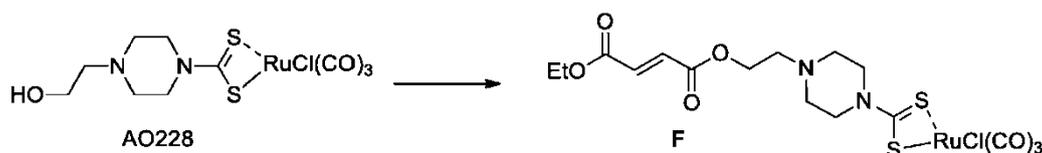
45 Etapa 1: preparación de compuesto AO228



50 A una suspensión de [RuCl₂(CO)₃]₂ (256 mg, 0,50 mmoles, 0,5 equiv.) en metanol (10 ml) se le añadió el compuesto **AO83** (228 mg, 1,00 mmoles, 1,0 equiv.). Tras 4 h de agitación a 20°C bajo argón, la mezcla de

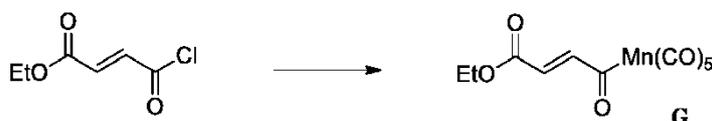
reacción se concentró al vacío, se disolvió en EtOAc, se filtró sobre Celite y se concentró al vacío, proporcionando el compuesto **AO228** (370 mg, 0,87 mmoles) en forma de un sólido amarillo pálido con un rendimiento de 87%, que se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional. RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ 3.96 (d, $J = 5.0$ Hz, 4H, CH_2N), 3.72 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH_2O), 2.76 (s, 4H, CH_2N), 2.68 (s, 2H, CH_2N). RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ 188.76 (CO_{metal}), 188.59 (CO_{metal}), 60.50 (CH_2N), 59.41 (CH_2O), 52.98 (CH_2N), 47.00 (CH_2N).

Etapa 2: preparación de compuesto F



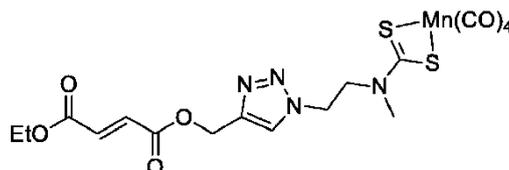
A una solución de compuesto **AO228** (370 mg, 0,87 mmoles, 1,0 equiv.) en diclorometano anhidro (11 ml) se le añadió bajo argón etil-éster de ácido (*E*)-4-cloro-4-oxo-2-butenóico (211 mg, 1,30 mmoles, 1,5 equiv.) y 4-DMAP (159 mg, 1,30 mmoles, 1,5 equiv.). Tras 16 h de agitación a 40°C bajo argón, la mezcla de reacción se concentró al vacío, se disolvió en EtOAc, se filtró sobre Celite y se concentró al vacío. El producto en bruto resultante se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice, eluyendo con ciclohexano/EtOAc (50/50) y se secó con una bomba de paletas durante una noche, proporcionando **compuesto F** (193 mg, 0,35 mmoles) en forma de un sólido blanco con un rendimiento de 40%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 6.87 (s, 2H), 4.34 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.88 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H), 2.75 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.65 (m, 4H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 186.78 (CO_{metal}), 164.82 (CO_{ester}), 134.26 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 133.07 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 62.09 (CH_2O), 61.47 (CH_2O), 56.06 (CH_2N), 51.88 (CH_2N), 46.48 (CH_2N), 14.11 (CH_3C). Anal. Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_7\text{RuS}_2$ (551,98): C, 34,81; H, 3,47; N, 5,08. Observado: C, 35,04; H, 3,59; N, 4,91.

Compuesto G:

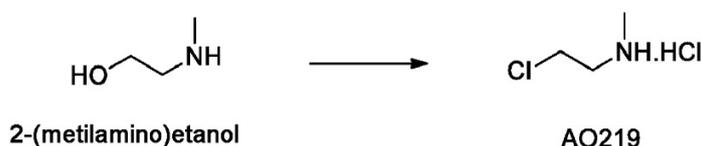


En un tubo de Schlenk a 20°C bajo argón, se añadió en partes sodio (30 mg, 1,28 mmoles, 2,8 equiv.) a mercurio (240 μl) bajo agitación vigorosa. Tras la desaparición del sodio, se introdujo tetrahidrofurano anhidro (5 ml), seguido de la adición de deca carbonilo de dimanganeso (179 mg, 0,46 mmoles, 1,0 equiv.). Tras 3 h de agitación vigorosa a 20°C y 10 min de decantación, se transfirió la capa superior mediante cánula a otro tubo de Schlenk y se enfrió a -78°C antes de añadir gota a gota etil-éster de ácido (*E*)-4-cloro-4-oxo-2-butenóico (242 mg, 1,00 mmol, 2,2 equiv.). Tras 1 h de agitación a -78°C y 18 h de agitación a 20°C, la mezcla se concentró al vacío. El producto en bruto se disolvió en hexano (6 ml), se agitó durante 30 min a 20°C, se filtró por un vidrio fritado y el filtrado se almacenó a -18°C durante 18 h para la cristalización. El sólido cristalizado se recogió mediante eliminación del solvente y se secó brevemente con una bomba de paletas, proporcionando el **compuesto G** (29 mg, 0,090 mmoles) en forma de un sólido naranja-rojo con un rendimiento de 5%. RMN ^1H (400 MHz, C_6D_6) δ 7.40 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.87 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 3.90 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 0.87 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). RMN ^{55}Mn (100 MHz, C_6D_6) δ - 1779.7. Anal. Calc. para $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{MnO}_8$ (322,11): C, 41,02; H, 2,19. Observado: C, 40,76; H, 2,50.

Compuesto I:



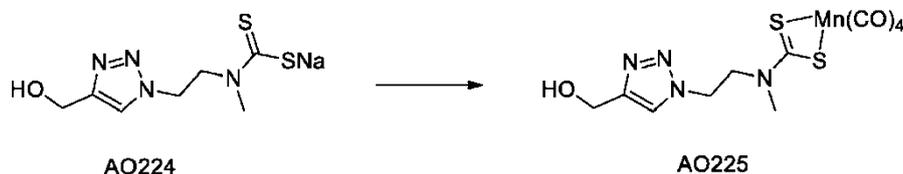
Etapa 1: preparación de compuesto AO219



rendimiento de 69%, que se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional. RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ 7.93 (s, 1H, CH=C), 4.68 (s, 2H, CH₂O), 4.51 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂N), 3.04 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂N), 2.39 (s, 3H, CH₃N). RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ 149.10 (C=C), 124.51 (CH=C), 56.48 (CH₂O), 51.76 (CH₂N), 50.50 (CH₂N), 35.74 (CH₃N).

5

Etapa 5: preparación de compuesto AO225

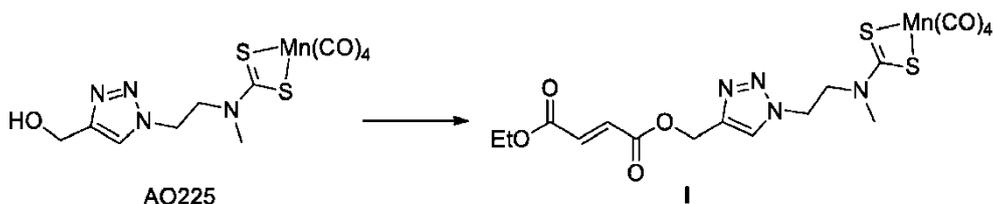


10 A una solución de compuesto **AO224** (444 mg, 1,75 mmoles, 1,0 equiv.) en metanol (30 ml) se le añadió Mn(CO)₅Br (487 mg, 1,75 mmoles, 1,0 equiv.). Tras 3 h de agitación a 45°C bajo argón, la mezcla de reacción se concentró al vacío, se disolvió en éter dietílico, se filtró sobre Celite y se concentró al vacío, proporcionando el compuesto **AO225** (464 mg, 1,16 mmoles) en forma de un aceite amarillo con un rendimiento de 67%, que se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional. RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ 7.93 (s, 1H, CH=C), 4.75 (t, J = 5.7 Hz, 2H, CH₂N), 4.67 (s, 2H, CH₂O), 4.26 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂N), 3.19 (s, 3H, CH₃N). RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ 210.99 (CO_{metal}), 177.03 (CS₂), 149.30 (C=C), 124.76 (CH=C), 56.50 (CH₂O), 51.63 (CH₂N), 47.86 (CH₂N), 37.31 (CH₃N). RMN ^{55}Mn (100 MHz, MeOD) δ - 1019,2.

15

Etapa 6: preparación de compuesto I:

20



25 A una solución de compuesto **AO225** (462 mg, 1,16 mmoles, 1,0 equiv.) en diclorometano anhidro (15 ml) se le añadió bajo argón etil-éster de ácido (*E*)-4-cloro-4-oxo-2-butenoico (282 mg, 1,74 mmoles, 1,5 equiv.) y 4-DMAP (213 mg, 1,74 mmoles, 1,5 equiv.). Tras 16 h de agitación a 40°C bajo argón, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El producto en bruto resultante se lavó con ciclohexano, se secó, se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se diluyó con ciclohexano con el fin de precipitarlo. Tras la filtración y el secado, el residuo se extrajo con acetato de etilo (x6). La capa orgánica se filtró sobre Celite, se concentró al vacío, se secó con una bomba de paletas y se cristalizó en una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo, proporcionando

30 **compuesto** en forma de un sólido amarillo con un rendimiento de 25%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) δ 6.96 (d, J = 16.0 Hz, 1H, CH=C), 6.91 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH=C), 6.81 (s, 1H, CH=C), 5.12 (s, 2H, CH₂O), 3.86 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂O), 3.53 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂N), 3.11 (t, J = 6.1 Hz, 2H, CH₂N), 2.14 (s, 3H, CH₃N), 0.85 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃C). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) δ 205.06 (CO_{metal}), 164.75 (CO_{éster}), 164.74 (CO_{éster}), 143.09 (C=C), 134.65 (CH=C), 132.88 (CH=C), 124.55 (CH=C), 61.14 (CH₂O), 58.38 (CH₂O), 50.24 (CH₂N), 45.85 (CH₂N), 36.98 (CH₃N), 13.92 (CH₃C). RMN ^{55}Mn (100 MHz, CDCl₃) δ - 1011,8.

35

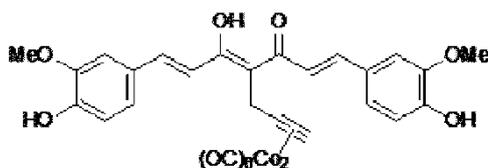
Ejemplo 2: evaluación de la liberación de CO por compuestos de la invención

Evaluación de la liberación de CO en ensayo de oxidación de mioglobina por los compuestos A y B:

40

Se preparó mioglobina (corazón de caballo liofilizado, concentración final: 44 μM) en solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS, pH 7,4) en una cubeta a partir de una solución madre 500 μM y se convirtió en desoximioglobina (desoxiMb) mediante la adición de ditionita sódica. La solución se mantuvo a 37°C en la cámara del espectrofotómetro durante todo el ensayo utilizando un controlador de temperatura JASCO. Se registró un espectro de desoxiMb, revelando un pico característico a 560 nm. A continuación, se añadió un exceso de 2 veces de una molécula de CO-RM a la cubeta, obteniendo un espectro máximo de monóxido de carbono-mioglobina (Mb-CO) (Mb-CO saturado). Tal como se esperaba para los espectros de Mb-CO, se observaron los picos de absorción típicos a 542 y 576 nm. Se midió la liberación de CO a partir del compuesto A, compuesto B (30 μM) o curcumina-CO-RM según el documento WO 2012/076696 (30 μM) de la fórmula siguiente:

50



mediante la adición de los compuestos a desoxiMb 44 μM y la solución se superpuso a 400 μl de aceite de oliva para evitar la pérdida de CO o la difusión de oxígeno, los cuales competirían con la unión de CO a la mioglobina. Las muestras se escanearon inmediatamente después de la adición de los compuestos y en puntos temporales consecutivos para monitorizar la formación de Mb-CO (μM).

Los datos de Mb-CO en bruto se corrigieron utilizando un método de regresión no lineal de 4 puntos para compensar un desplazamiento de la absorbancia debido a los compuestos liberadores de CO. La concentración de Mb-CO en cada punto temporal se calculó utilizando los valores de absorbancia a 540 nm y el coeficiente de extinción derivado del espectro de Mb-CO saturado, tal como se ha descrito anteriormente. Las concentraciones de ⁵ Mb-CO (μM) se representaron gráficamente frente al tiempo (min) y se determinó $t_{1/2}$ utilizando el software GraphPad Prism, versión 5.0 (San Diego, CA) mediante la aplicación de un ajuste a la curva de regresión no lineal sigmoide de Boltzmann. $t_{1/2}$ representa el tiempo necesario para que la concentración de Mb-CO sea igual a la mitad del máximo de MbCO formado bajo las condiciones de ensayo.

La presencia de picos de absorción a 540 y 578 nm indica la formación de MbCO por el monóxido de carbono liberado por las moléculas de CO-RM.

Se presentan los resultados en la figura 1A-C.

Tal como muestran estos resultados, el compuesto A y el compuesto B liberan monóxido de carbono, mientras que el derivado de curcumina según el documento WO 2012/076696, no.

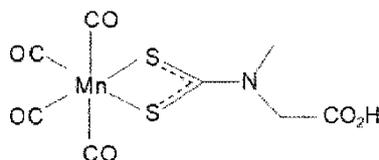
También se midió la cantidad de CO liberada como función del tiempo para los compuestos A y B. Los resultados se presentan en la figura 6.

Los resultados indican que el compuesto A libera CO a una tasa más rápida que el compuesto B, pero que la cantidad de CO finalmente liberada es mucho más alta en el caso del compuesto B de acuerdo con la presencia de dos complejos de carbonilo bimetálicos.

De esta manera, puede concluirse que los híbridos monometálicos de fórmula (Ia) liberan CO a una tasa más elevada que el híbrido bimetálico de fórmula (Ic), pero que la cantidad de CO finalmente liberada es mucho más elevada en el caso del compuesto (Ic), de acuerdo con la presencia de dos complejos de carbonilo bimetálicos. Por lo tanto, los compuestos de fórmula (Ia) resultan ventajosos para una actividad biológica rápida (efecto estallido). Sin embargo, debido a que los híbridos bimetálicos de fórmula (Ic) son capaces de liberar más CO durante un periodo de tiempo más prolongado, resultan ventajosos para una actividad biológica sostenida.

Detección de CO en microglías BV2 expuestas al compuesto C en ensayo de COP-1

Con el fin de detectar la liberación de CO, se lavaron las células de microglía BV2 (10^6 células/ml) una vez, se incubaron con PBS que contenía Ca^{2+} y Mg^{2+} y a continuación se trataron durante 15 min en la oscuridad a 37°C con compuesto C y compuesto comparativo CORM-401 según el documento WO 2008/003953 (5 μM) con la fórmula siguiente:



Compuesto comparativo CORM 401.

A continuación, las células se cargaron con la sonda fluorescente sensible a CO llamada COP-1 (0,001 mM) durante 30 min en la oscuridad a 37°C . Los resultados se expresan como intensidad media corregida de intensidad de fluorescencia (IMFc) utilizando citometría de flujo. $\text{IMFc} = \text{IMF}_{\text{células tratadas teñidas}} - \text{IMF}_{\text{fondo de COP-1}}$

Se presentan los resultados en la figura 1D.

Tal como muestran estos resultados, el compuesto C libera significativamente más monóxido de carbono que el

compuesto comparativo CORM-401 según el documento WO 2008/003953.

Estos resultados demuestran que la fracción fumarato de los compuestos de la invención inducen un efecto positivo sobre la liberación de monóxido de carbono *in cellulo*. Además, estos resultados demuestran que la combinación de una fracción fumarato con una molécula de liberación de CO (CORM) presenta una acción sinérgica sobre la liberación de monóxido de carbono.

Ejemplo 3: evaluación de la actividad biológica de los compuestos A y B:

Ejemplo 3.1a: evaluación de la actividad de heme oxigenasa con los compuestos A y B

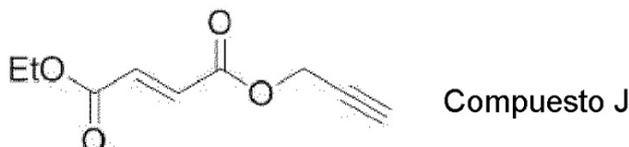
Se determinó la actividad de la heme oxigenasa mediante un ensayo espectrofotométrico que mide la formación de bilirrubina como diferencia de absorbancia a 464 y a 530 nm (coeficiente de extensión para la bilirrubina: $40 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Se incubaron las microglías BV2 con concentraciones crecientes de compuesto A durante 6 h. Tras la incubación, las células se recolectaron en PBS helado (pH 7,4) que contenía MgCl_2 2 mM y se almacenaron a -80°C . Las muestras celulares se incubaron en la oscuridad a 37°C durante 1 h en una mezcla de reacción que contenía PBS/ MgCl_2 , hemeina 20 μM (Frontier Scientific, Newark, DE) como sustrato de heme oxigenasa, citosol de hígado de rata como fuente de biliverdina reductasa, glucosa-6-fosfato 2 mM, 0,5 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP 0,8 mM. La reacción se terminó mediante la adición de 1 ml de cloroformo puro y una solución que contenía sólo bilirrubina se extrajo mediante ciclos de centrifugación con vórtex. Los valores de absorbancia correspondientes a la formación de bilirrubina se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro visible Ultraspec™ 500 *pro* (GE Healthcare Life Sciences) y los datos se presentaron en pmoles de bilirrubina/mg de proteína/h. Se midieron las concentraciones de proteínas utilizando un kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific).

Se presentan los resultados en la figura 2A.

Los resultados muestran que el compuesto A mejora significativamente la actividad de HO-1 a una concentración de tan sólo 5 μM .

Ejemplo 3.1b: evaluación de la actividad de heme oxigenasa con compuesto C

Se determinó la actividad de heme oxigenasa del compuesto C tal como se ha indicado anteriormente y se comparó con el compuesto comparativo CORM-401 y con el derivado de fumarato comparativo (compuesto J:



Se presentan los resultados en la figura 2B.

Estos resultados muestran que el compuesto C mejora significativamente la actividad de HO-1 a una concentración de tan sólo 1 μM . Además, el compuesto C muestra una actividad de HO-1 mejorada en comparación con el compuesto comparativo J, que es un derivado de fumarato que no comprende nada de CORM. De esta manera, esto demuestra que la combinación de una fracción fumarato y una molécula de liberación de CO (CORM) presenta una acción sinérgica sobre la actividad de la heme oxigenasa.

Ejemplo 3.2: Efecto del compuesto A, el compuesto B y el compuesto C sobre la inflamación:

Determinación de la producción de nitrito

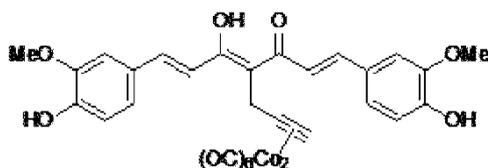
Se midió la producción de nitrito, un índice de inflamación, en células BV2 retadas durante 24 h con lipopolisacárido (LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$) en presencia o en ausencia de concentraciones crecientes de compuesto A o compuesto B. Al final de la incubación, se midieron los niveles de nitrito utilizando el método de Griess 12,14. Brevemente, las placas celulares se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 5 min y el sobrenadante libre de células se incubó con un volumen igual de reactivo de Griess (N-(1-naftil)etilendiamida 2 mM, sulfanilamida 30 mM y ácido o-fosfórico 140 mM) durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 560 nm. Se calcularon las concentraciones de nitrito (μM) a partir de una curva patrón de nitrito sódico.

Se presentan los resultados en la figura 3.

El compuesto A redujo marcadamente la acumulación de nitrito mediada por LPS, mostrando que el grupo $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ contribuye a la reducción de los niveles de nitrito. Inesperadamente, el compuesto B también redujo la

producción de nitrito de una manera dependiente de la concentración, aunque no resultó tan eficaz como el compuesto A.

5 El compuesto C se evaluó asimismo para su capacidad de reducir el nivel de nitrito en un ensayo comparativo con un derivado de curcumina según el documento WO 2012/076696 de la fórmula siguiente:



10 Se presentan los resultados en la figura 3C.

Tal como ponen de manifiesto estos resultados, el compuesto C es significativamente más activo (en prácticamente 2 veces) que el derivado de curcumina según el documento WO 2012/076696, ya que la misma reducción de producción de nitrito se observó con 2,5 μM de compuesto C y 5 μM del derivado de curcumina.

15 El compuesto C se evaluó asimismo para su capacidad de reducir el nivel de nitrito en un ensayo comparativo con los compuestos comparativos CORM-401 y el compuesto comparativo J mencionado anteriormente.

Se presentan los resultados en la figura 3D.

20 Tabla 1. Comparación de la potencia antiinflamatoria del compuesto comparativo dimetilfumarato, compuesto comparativo J y compuesto A.

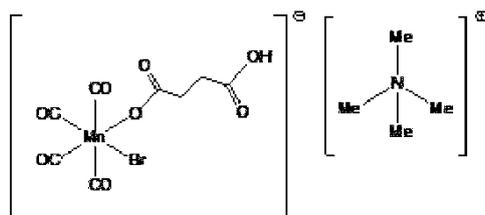
Compuesto (5 μM)	Niveles de nitrito (μM)		% de reducción vs. LPS
	LPS	LPS + compuesto	
Dimetilfumarato	86.3 \pm 2.9	69.2 \pm 1.0	19.8%
Compuesto J	86.7 \pm 1.6	43.2 \pm 1.0 [†]	50.1 %
Compuesto A	78.0 \pm 1.3	28.6 \pm 1.3 ^{†‡}	63.3 %

25 Los niveles de nitrito se midieron en las células tras 24 h de incubación con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de lipopolisacárido (LPS) \pm 5 μM del compuesto comparativo dimetilfumarato, compuesto comparativo J o compuesto A. Todos los valores (medias \pm SEM) se muestran como porcentajes de LPS solo. *p<0,05 vs. LPS solo; †p<0,05 vs. dimetilfumarato; ‡ p<0,05 vs. compuestos comparativos.

30 Tal como ponen de manifiesto estos resultados, el compuesto C es significativamente más activo (en prácticamente 5 veces) que el derivado de fumarato (compuesto comparativo J), ya que se observa prácticamente la misma reducción de producción de nitrito con 1 μM de compuesto C y 5 μM del derivado de fumarato J. Además, el compuesto comparativo CORM-401 no es activo.

35 El compuesto A se comparó asimismo con el derivado de dimetilfumarato (compuesto comparativo J) en el ensayo de producción de nitrito. Tal como se muestra en la Tabla 1, el compuesto A permite una reducción significativa de la inflamación causada por LPS (63,3%), que es más de 3 veces la reducción inducida por la misma concentración de derivado de dimetilfumarato (compuesto comparativo J). De esta manera, estos resultados demuestran que la combinación de una fracción fumarato con un CORM induce un gran beneficio en el tratamiento de las enfermedades, más particularmente en el tratamiento de la inflamación.

40 Se evaluó un derivado de CORM según el documento WO 2008/003953 de la fórmula siguiente:



45 (compuesto 364 del documento WO 2008/003953) en un ensayo comparativo de producción de nitrito.

Tal como se muestra en la figura 3E, el compuesto 364 del documento WO 2008/003953 pudo reducir la producción de nitrito a menos de 50% a una concentración de hasta 100 μM . El compuesto 364 del documento WO 2008/003953 es, de esta manera, mucho menos activo que el compuesto A de la presente invención, que

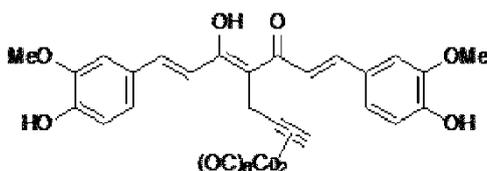
reduce la producción de nitrito en más de 60% a una concentración de tan solo 5 μM (Tabla 1).

Ejemplo 3.3: evaluación de la citotoxicidad de compuestos de la invención

5 Evaluación de la citotoxicidad del compuesto A y del compuesto B sobre los macrófagos RAW.

Se evaluó la citotoxicidad en células de microglía BV2 24 h después de la incubación con concentraciones crecientes de compuesto A o compuesto B y sobre macrófagos RAW con un derivado de curcumina según el documento WO 2012/076696 de la fórmula siguiente:

10



utilizando un kit de detección de citotoxicidad (LDH) (Roche Applied Science) para medir la lactato deshidrogenasa liberada de las células dañadas. Se utilizó solución de Triton X-100 (al 2%) en medio como control positivo (citotoxicidad de 100%). El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, al final de la incubación, las placas celulares se centrifugaron a 300xg durante 5 min y se transfirieron 100 μl de sobrenadante libre de células a una placa de 96 pocillos. Se añadió una mezcla de reacción al sobrenadante y la placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente bajo agitación suave durante 10 min. Se midió la absorbancia a 485 nm.

15

20

Los datos se expresan como porcentaje de LDH liberado mediante el tratamiento de las células con Triton al 2% (toxicidad de 100%).

25

Se presentan los resultados en la figura 4.

La citotoxicidad del compuesto A no resulta significativa a concentraciones inferiores a 50 μM .

El compuesto B sólo mostraba citotoxicidad a una concentración de 100 μM y no resulta citotóxico a menos de esta concentración.

30

En contraste, el derivado de curcumina según el documento WO 2012/076696 ya muestra citotoxicidad a una concentración de 20 μM sobre macrófagos RAW.

Evaluación de la citotoxicidad del compuesto A sobre las células queratinocitos

35

Se evaluó la citotoxicidad en células queratinocitos 24 h después de la incubación con concentraciones crecientes de compuesto A.

Se cultivaron queratinocitos humanos (células HaCaT) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con penicilina/estreptomicina al 1%, piruvato sódico al 1% y suero de feto bovino al 10%. Las células en confluencia se lavaron con PBS y se trataron con compuesto A a diferentes concentraciones y durante diferentes periodos de tiempo según el protocolo experimental. El compuesto A se disolvió en DMSO a 0,1% como concentración final en medio completo. Al alcanzar las células la confluencia en placas de 24 pocillos, el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco antes del tratamiento con compuesto A a diferentes concentraciones (1-100 μM) durante 24 h. Las células se incubaron durante la noche a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Se utilizó DMSO al 100% como control positivo. 24 h después las células se incubaron con una solución de MTT (0,5 mg/ml) durante 1 h 30 min. El tratamiento de las células vivas con MTT produjo un producto formazán azul oscuro, mientras que no se observó tinción en las células muertas.

45

50

Se presentan los resultados en la figura 4E.

La citotoxicidad del compuesto A no era significativa a concentraciones inferiores a 50 μM .

Evaluación de la citotoxicidad del compuesto A sobre las células THP-1

55

Se evaluó la citotoxicidad en células THP-1 24 h después de la incubación con concentraciones crecientes de compuesto A.

Se cultivaron monocitos humanos (células THP-1) en medio RPMI 1640-Glutamax complementado con penicilina/estreptomicina al 1%, piruvato sódico al 1% y suero de feto bovino al 10% (RPMIc). Las células en

60

confluencia se lavaron con PBS y se trataron con compuesto A a diferentes concentraciones y durante diferentes periodos de tiempo según el protocolo experimental. El compuesto A se disolvió en DMSO a 0,1% como concentración final en medio completo. Antes del tratamiento, las células se lavaron una vez con RPMI, se contaron y después se sembraron a razón de 1×10^6 células/ml. A continuación, las células se trataron durante 24 h con compuesto A a diferentes concentraciones (1-100 μM). 24 h después, se recolectaron los sobrenadantes de las diferentes condiciones y se evaluó el ensayo de LDH utilizando el kit de detección de citotoxicidad (LDH) (Roche, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó Triton al 2% como control positivo.

Se presentan los resultados en la figura 4E.

La citotoxicidad del compuesto A no era significativa a concentraciones inferiores a 100 μM .

Ejemplo 3,4: evaluación de la expresión de Nrf-2

Evaluación de la expresión de Nrf-2 inducida por compuesto A, compuesto B, compuesto C y de la expresión de HO-1 por compuesto A y compuesto C.

Las microglías BV2 se incubaron con 20 μM de compuesto A o compuesto B durante 2 h para evaluar la traslocación nuclear de Nrf2. Se aislaron las fracciones nucleares utilizando un kit de extracto nuclear de Active Motif (La Hulpe, Bélgica), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se almacenaron a -80°C . Se midieron las concentraciones de proteína utilizando un kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific).

Para determinar la expresión de la proteína HO-1, se incubaron las microglías BV2 con concentraciones crecientes de compuesto A durante 6 h. Al final de la incubación, las células se lavaron con DPBS helado (-Ca, -Mg; cultivo celular Gibco®, Life Technologies) y se lisaron durante 30 min de incubación a 4°C en tampón de lisis celular (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, NaF 50 mM, Na_3VO_4 50 μM , Triton X-100 al 1% v/v e inhibidor de proteasas de mamífero al 1%). Los lisados se centrifugaron durante 10 min a $15.000 \times g$ y a 4°C ; se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C . Se midieron las concentraciones de proteína utilizando un kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific).

Se resolvieron los extractos nucleares (50 μg de proteína/muestra) y lisados de células completas (20 μg de proteína/muestra) en geles de acrilamida al 10% o 12%, respectivamente, y las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore, Brussels, Bélgica). Las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en solución salina tamponada con Tris 1x (pH 7,5) que contenía Tween-20 al 0,1% v/v y leche seca no grasa al 5% p/v y se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario siguiente para Nrf2: anticuerpo policlonal de conejo clon C-20, Santa Cruz Biotechnology). A continuación, las membranas e incubaron con anticuerpos secundarios acoplados con peroxidasa de rábano picante (anticuerpo de cabra antiratón o anticonejo, Cell Signaling Technology o anticuerpo de burro anticabra, Jackson ImmunoResearch) durante 1 h a temperatura ambiente. Las bandas se detectaron con sustratos quimioluminiscentes (Pierce ECL®, Thermo Scientific or RevelBIOT® Intense, Ozyme) y las imágenes se capturaron utilizando un G:Box F3 Imagery Station y software GeneSys (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

Se presentan los resultados en la figura 5A-C.

La exposición de células de microglía BV2 a 20 μM de compuesto A durante 2 h estimuló fuertemente la acumulación de Nrf2 en el núcleo. Además, tras 6 h de tratamiento, el compuesto A indujo un incremento dependiente de la concentración de la expresión de la proteína HO-1. El compuesto B era menos eficaz, como activador de Nrf2 y como agente inductor de HO-1.

Estos experimentos demuestran que el compuesto A, el compuesto B y el compuesto C son potentes activadores de HO-1 e inductores de la expresión de la proteína HO-1 mediante el eje Nrf2/HO-1 a concentraciones claramente inferiores al intervalo de concentraciones tóxicas.

Además, la comparación de la actividad del compuesto C con los compuestos comparativos CORM-401 y J muestran que, a concentraciones idénticas (5 μM), el compuesto C es más potente que el derivado de fumarato (compuesto comparativo J) y que el compuesto comparativo CORM-401 en la activación de Nrf2 y de HO-1 (figura 5C).

La inducción de Nrf2 y HO-1 por el compuesto C en células queratinocitos.

La exposición de las células queratinocitos a 5 μM de compuesto C durante el tiempo estimuló fuertemente la acumulación de Nrf2 en el núcleo y la expresión de proteína HO-1 (figura 5D).

Estos experimentos demuestran que el compuesto C es, en las células queratinocitos, un potente activador de HO-1 mediante el eje Nrf2/HO-1 a concentraciones claramente inferiores al intervalo de concentraciones tóxicas. Por lo tanto, puede utilizarse para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, más particularmente de

inflamación de la piel, tal como la cicatrización de heridas o la soriasis.

La inducción de Nrf2 y HO-1 por el compuesto C en THP-1.

5 Respecto a las células queratinocitos y las células microglías BV2, la exposición de las células THP-1 a compuesto C durante 6 horas estimuló fuertemente la acumulación de Nrf2 en el núcleo y la expresión de la proteína HO-1 (figura 5E). Además, en comparación con la activación de HO-1 con el compuesto comparativo J, el compuesto C indujo un incremento dependiente de la concentración de la expresión de la proteína HO-1 partiendo de 5 μ M de compuesto C, mientras que resulta necesaria una concentración 10 veces dicha concentración para observar los mismos resultados con el compuesto comparativo J.

Estos experimentos demuestran que el compuesto C es un potente activador de HO-1 mediante el eje Nrf2/HO-1 también en las células THP-1.

15 Por lo tanto, se ha demostrado que los compuestos de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.

La inducción de Nrf2 y HO-1 por los compuestos A, B y C en THP-1.

20 Las células THP-1 se expusieron a una concentración diferente de los compuestos A, B y C durante 6 horas. Tal como se ha mostrado anteriormente con las células microgliales BV2, los compuestos A y C indujeron un incremento dependiente de la concentración de la expresión de la proteína HO-1 y una activación de Nrf2, mientras que el compuesto B resultó menos eficaz como activador de Nrf2 y como agente inductor de HO-1 (figura 5F).

25 Estos experimentos demuestran que los compuestos de la invención que comprenden únicamente un grupo CORM (también denominado mono-CORM, es decir, compuestos de fórmula (I), en la que R¹ representa -Q'-Y), tales como el compuesto A y el compuesto C, son potentes activadores de Nrf2 e inductores de la expresión de la proteína HO-1.

Ejemplo 4: evaluación de compuesto de la invención sobre la producción de TNF- α en macrófagos humanos retados con LPS

35 Se mantuvieron células THP-1 humanas (ATCC n° TIB-202) a 37°C y con 5% de CO₂ en RPMI 1640-Glutamax (Gibco, Francia) complementado con suero de feto bovino al 10%, piruvato sódico al 1%, penicilina-estreptomicina al 1% y β -mercaptoetanol 50 μ M. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (5x10⁵/pocillo/ml) y se trataron con acetato de miristato de forbol [PMA (50 ng/ml)] durante 24 h para inducir la diferenciación de los macrófagos. A continuación, se lavaron los macrófagos humanos con PBS, se incubaron con medio y se trataron con LPS solo o con LPS en presencia de los diversos compuestos durante 24 h. Se recolectó medio de cultivo tras 24 h y se almacenó a -20°C. Se llevó a cabo un ensayo de ELISA para TNF- α siguiendo las instrucciones del fabricante (BD OptEIA Set). Brevemente, las placas (F96 maxisorp-Nunc-Immuno, Thermofischer) se recubrieron con el anticuerpo de captura durante la noche. A continuación, las placas se lavaron con PBS/Tween al 0,05% y se saturaron durante 1 h con PBS/FBS al 10% a 37°C. Tras varios lavados, los patrones y muestras se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después, al anticuerpo de detección y estreptavidina-HRP se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Al final, se añadió el sustrato (TMB), conduciendo a un color azul. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico, llevando a un color amarillo. Las placas se leyeron a 450 nm utilizando un lector de microplacas. Los resultados se expresaron en picogramos por ml.

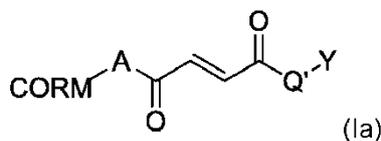
50 Tal como se muestra en la figura 7, la exposición de los macrófagos humanos a LPS durante 24 h resultó en un incremento significativo de la producción de TNF-alfa, un marcador de inflamación. Este efecto se redujo significativamente al cotreatar los macrófagos con concentraciones crecientes (1-10 μ M) de compuesto C, D o E. El compuesto D aparentemente resultó ser el más eficaz de los tres compuestos sometidos a ensayo.

Ejemplo 5: evaluación de compuesto de la invención sobre la producción de TNF- α en células THP-1 retadas con LPS

55 Se trataron células THP-1 humanas cultivadas tal como en el Ejemplo 3 con LPS (100 μ g/ml) solo o en presencia de 5 μ M de compuesto C, compuesto E o el compuesto comparativo dimetilfumarato (DMF) durante 24 h. Tal como se muestra en la figura 8, tanto el compuesto C como el compuesto E redujeron significativamente la producción de TNF- α , mientras que el dimetilfumarato (DMF) no presentó ningún efecto.

REIVINDICACIONES

1. Molécula de liberación de monóxido de carbono-fumarato híbrida de fórmula (Ia):



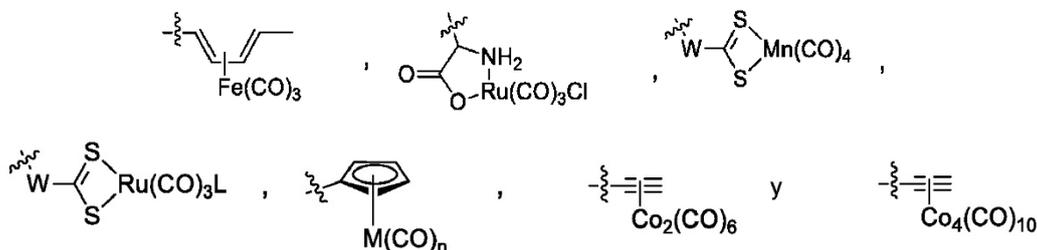
en la que:

A representa:

- un enlace sencillo, o
- -Z-Q-, en la que:
 - Q representa O, S o NR₂, en la que R₂ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo o alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₁₄), o R₂ y Z están conectados para formar un heterociclilo (C₃-C₈),
 - Z representa -alquilo (C₁-C₆)-, -alquenilo (C₂-C₆)-, -arilo-, -heteroarilo-, -alquinilo (C₂-C₆)-, -heterociclilo (C₃-C₈)-, -cicloalquilo (C₃-C₁₄)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquenilo (C₂-C₆)-, -alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquenilo (C₂-C₆)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquinilo (C₂-C₆)-, -alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquinilo (C₂-C₆)-, -alquinil (C₂-C₆)-R₃-alquinilo (C₂-C₆)-, -alquinil (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquinil (C₂-C₆)-R₃-alquenilo (C₂-C₆)-, en la que R₃ representa arilo, heteroarilo heterociclilo (C₃-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₁₄), -alquil (C₁-C₆)-OCO- o -CH₂-(CHOR₃)CH₂O-alquilo (C₁-C₆)-,

CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

Mn(CO)₅,



en la que W representa O o NR₄, en la que R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

L representa un ligando iónico tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

M representa Rh, Co, Ru, Mn, Mo, V o Fe, preferentemente Co, Ru o Mn, y

n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre,

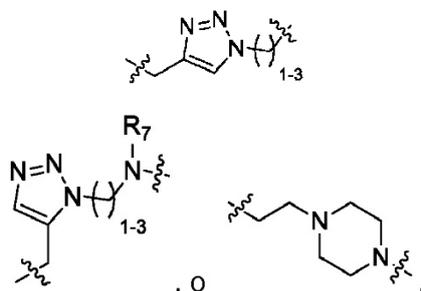
Q' representa O, S o NR₅, en la que R₅ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo o alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₁₄), e

Y representa H, -alquilo (C₁-C₆), -alquenilo (C₂-C₆), -arilo, -heteroarilo, -alquinilo (C₂-C₆), -heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₁₄), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alquenil (C₂-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquenilo (C₂-C₆), -alquenil (C₂-C₆)-R₆-alquenilo (C₂-C₆), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquinilo (C₂-C₆), -alquenil (C₂-C₆)-R₆-alquinilo (C₂-C₆), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alquinil (C₂-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alquinil (C₂-C₆)-R₆-alquenilo (C₂-C₆), alquil (C₁-C₆)-R₆, -alquenil (C₂-C₆)-R₆, -alquinil (C₂-C₆)-R₆, en la que R₆ representa arilo, heteroarilo, heterociclilo (C₃-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₁₄), -CH₂(CHOR₆)CH₂-OR₇, en la que R₇ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), alquil (C₁-C₆)-cicloalquilo (C₃-C₁₄).

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Q representa O, S o NR₂, en el que R₂ representa H, alquilo (C₁-C₆) y Z representa -alquilo (C₁-C₆)-, -alquenilo (C₂-C₆)-, -heterociclilo (C₃-C₈)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, en el que R₃ representa heteroarilo o heterociclilo (C₃-C₈).

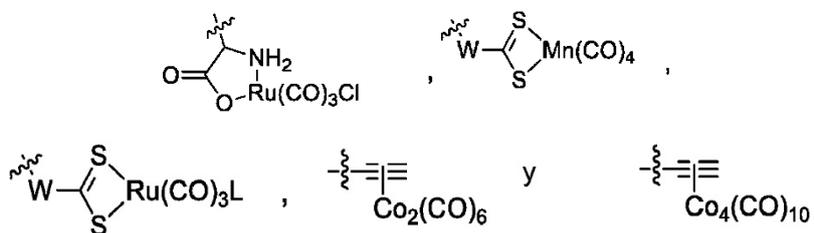
3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que Z- representa -CH₂-CH₂-,

5



4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que CORM se selecciona de entre: Mn(CO)₅,

10

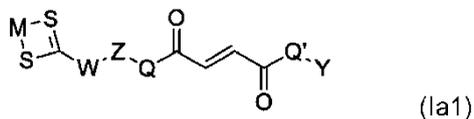


5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que Y representa H, -alquilo (C₁-C₆), -alqueno (C₂-C₆), -arilo, -heteroarilo, -alquino (C₂-C₆), -heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₈) o -alquil (C₁-C₆)-arilo.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que Q' es O.

20

7. Compuesto de fórmula (Ia1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6:

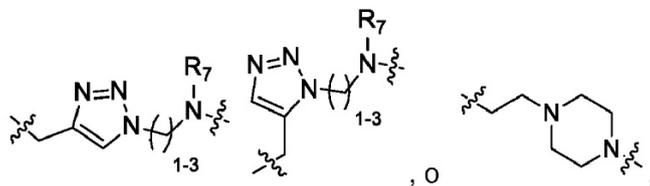


25 en el que:

M representa Mn(CO)₄ o Ru(CO)₃Cl.

8. Compuesto según la reivindicación 7, en el que Z-W representa: -CH₂-CH₂-NR₇-,

30

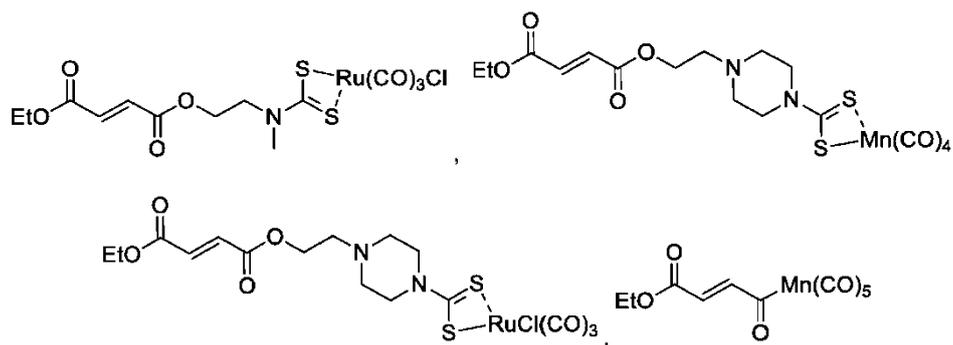


en el que R₇ representa alquilo (C₁-C₃), Q' representa O e Y representa H, -alquilo (C₁-C₆) o -alqueno (C₂-C₆).

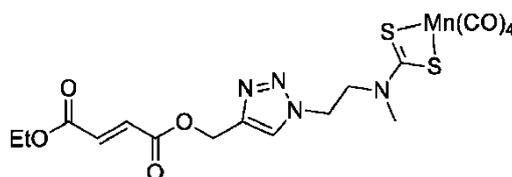
9. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de entre:

35



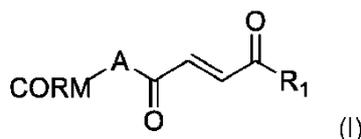


5 o



10

10. Molécula de liberación de monóxido de carbono-fumarato híbrida de fórmula (I):



en la que:

15 A representa:

- un enlace sencillo, o
- -Z-Q-, en la que:

20

- Q representa O, S o NR₂, en la que R₂ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo o alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₁₄), o R₂ y Z están conectados para formar un heterociclilo (C₃-C₈),

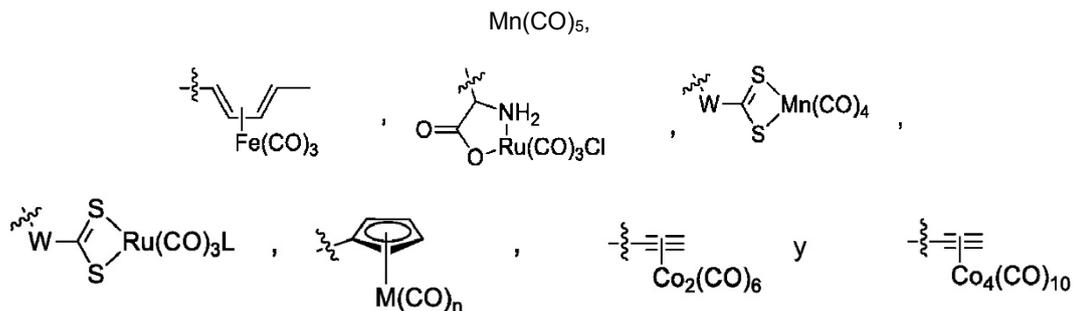
25

- Z representa -alquilo (C₁-C₆)-, -alquenilo (C₂-C₆)-, -arilo-, -heteroarilo-, -alquinilo (C₂-C₆)-, -heterociclilo (C₃-C₈)-, -cicloalquilo (C₃-C₁₄)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquenilo (C₂-C₆)-, -alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquenilo (C₂-C₆)-, -alquil (C₁-C₆)-R₃-alquinilo (C₂-C₆)-, -alquenil (C₂-C₆)-R₃-alquinilo (C₂-C₆)-, -alquinil (C₂-C₆)-R₃-alquinilo (C₂-C₆)-, -alquinil (C₂-C₆)-R₃-alquilo (C₁-C₆)-, -alquinil (C₂-C₆)-R₃-alquenilo (C₂-C₆)-, en la que R₃ representa arilo, heteroarilo, heterociclilo (C₃-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₁₄), -alquil (C₁-C₆)-OCO- o -CH₂-(CHOR₃)CH₂O-alquilo (C₁-C₆)-,

30

CORM representa un complejo de carbonilo metálico seleccionado de entre:

35



40

en la que W representa O o NR₄, en la que R₄ representa -alquilo (C₁-C₆)-,

L representa un ligando iónico, tal como halógeno, o un contraión, tal como BF₄ o PF₆,

M representa Rh, Co, Ru, Mn, Mo, V o Fe, preferentemente Co, Ru o Mn, y

5 n es un número entero seleccionado de manera que el metal M no presenta ninguna valencia libre,

y R₁ representa:

• -Q'-Y, en la que

10 ◦ Q' representa O, S o NR₅, en la que R₅ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo o alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₁₄),

15 ◦ Y representa H, -alquilo (C₁-C₆), -alquenilo (C₂-C₆), -arilo, -heteroarilo, -alquinilo (C₂-C₆), -heterociclilo (C₃-C₈), -cicloalquilo (C₃-C₁₄), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alquenil (C₂-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquenilo (C₂-C₆), -alquenil (C₂-C₆)-R₆-alquenilo (C₂-C₆), -alquil (C₁-C₆)-R₆-alquinilo (C₂-C₆), -alquenil (C₂-C₆)-R₇-alquinilo (C₂-C₆), -alquinil (C₂-C₆)-R₆-alquinilo (C₂-C₆), -alquinil (C₂-C₆)-R₆-alquilo (C₁-C₆), -alquinil (C₂-C₆)-R₆-alquenilo (C₂-C₆), alquil (C₁-C₆)-R₆, -alquenil (C₂-C₆)-R₆, -alquinil (C₂-C₆)-R₆, en la que R₆ representa arilo, heteroarilo, heterociclilo (C₃-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₁₄), -CH₂(CHOR₆)CH₂-OR₇, en la que R₇ representa H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-arilo, alquil (C₁-C₆)-heteroarilo, alquil (C₁-C₆)-heterociclilo (C₃-C₈), alquil (C₁-C₆)-cicloalquilo (C₃-C₁₄),

o,

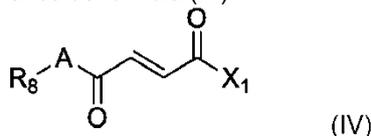
25 • A'-CORM' en la que A' y CORM' son como se define respectivamente para A y CORM para la utilización como un fármaco.

30 11. Compuesto para la utilización según la reivindicación 10 en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares o inflamatorias.

12. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de fórmula (Ia) como se define en la reivindicación 1, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo,

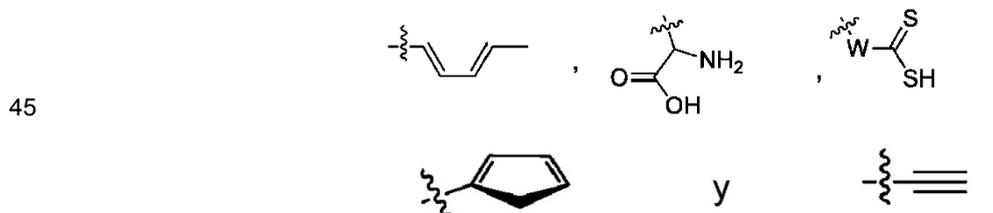
35 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. Procedimiento para la síntesis de un compuesto de fórmula (Ia) según la reivindicación 1, que comprende la reacción de un derivado de ácido fumárico de fórmula (IV):



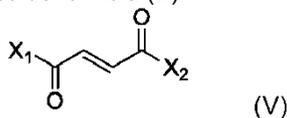
40 en el que:

X₁ representa Q'-Y como se define en la reivindicación 1, y R₈ representa un grupo seleccionado de entre:



50 con un complejo de metal carbonilo de fórmula L₁L₂M_x(CO)_y en la que x es 1 o 2 e y es 1 a 10, L₁ y L₂ representan cada uno un ligando monodentado o L₁L₂ representa un ligando bidentado.

14. Procedimiento para la síntesis de un compuesto de fórmula (Ia) según la reivindicación 1, que comprende la reacción de un derivado de ácido fumárico de fórmula (V):



en el que:

X₁ representa Cl, F, Br o un éster, ventajosamente un éster activado,
X₂ representa Q'-Y,

5

con un compuesto de fórmula H-A-CORM,

o,

10

la reacción de un compuesto de fórmula (V)

en el que X₁ representa OH,

15

con un compuesto de fórmula Hal-A-CORM en la que Hal representa un grupo saliente, tal como halógeno o sulfonato, tal como trifluorometano-sulfonato,

siendo A-CORM y Q'-Y como se define en la reivindicación 1.

FIGURA 1

Fig. 1A

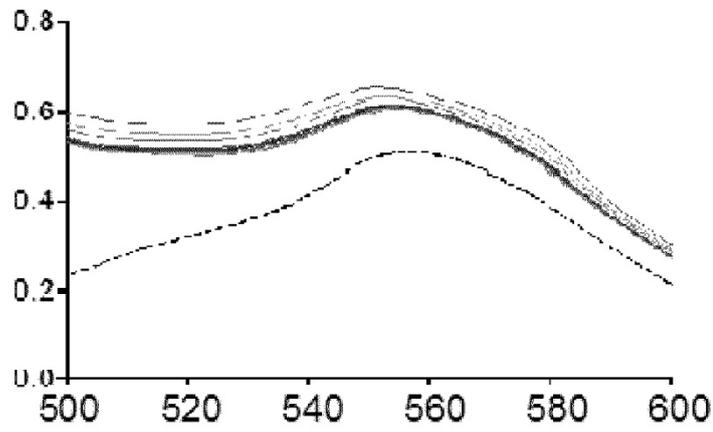


Fig. 1B

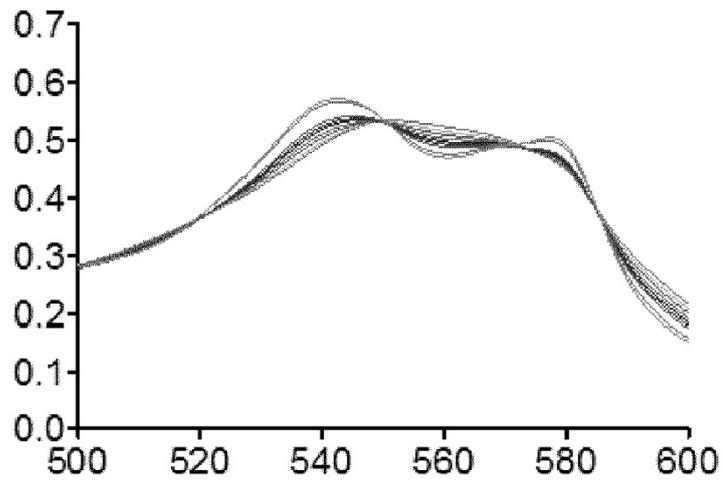


Fig. 1C

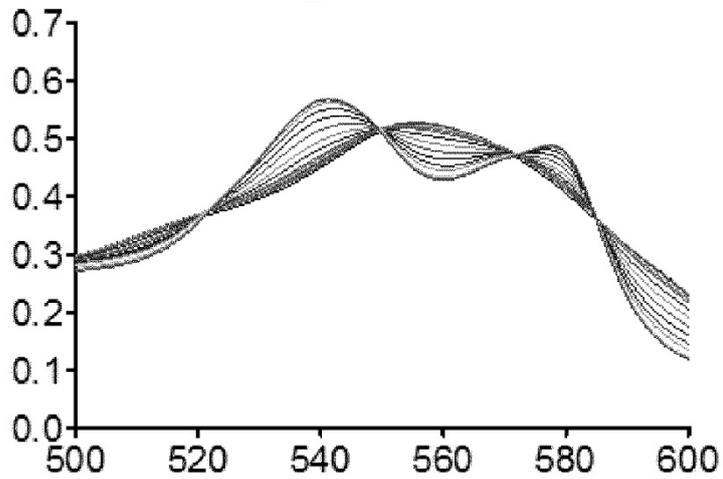


Fig. 1D

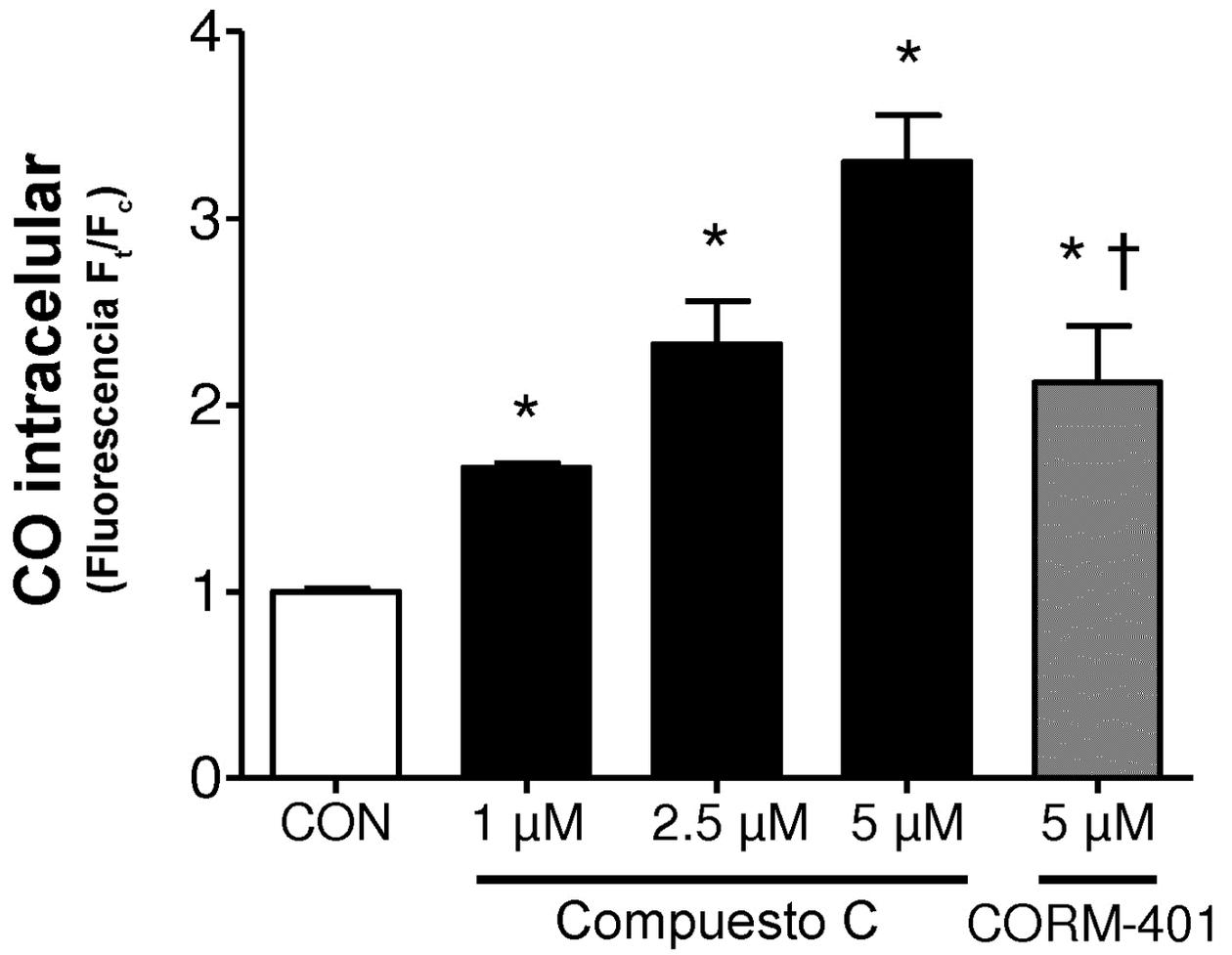


FIGURA 2

Fig. 2A

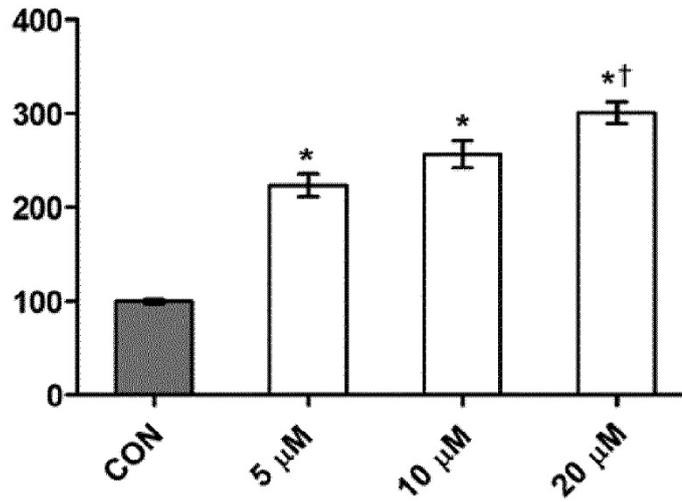


Fig. 2B

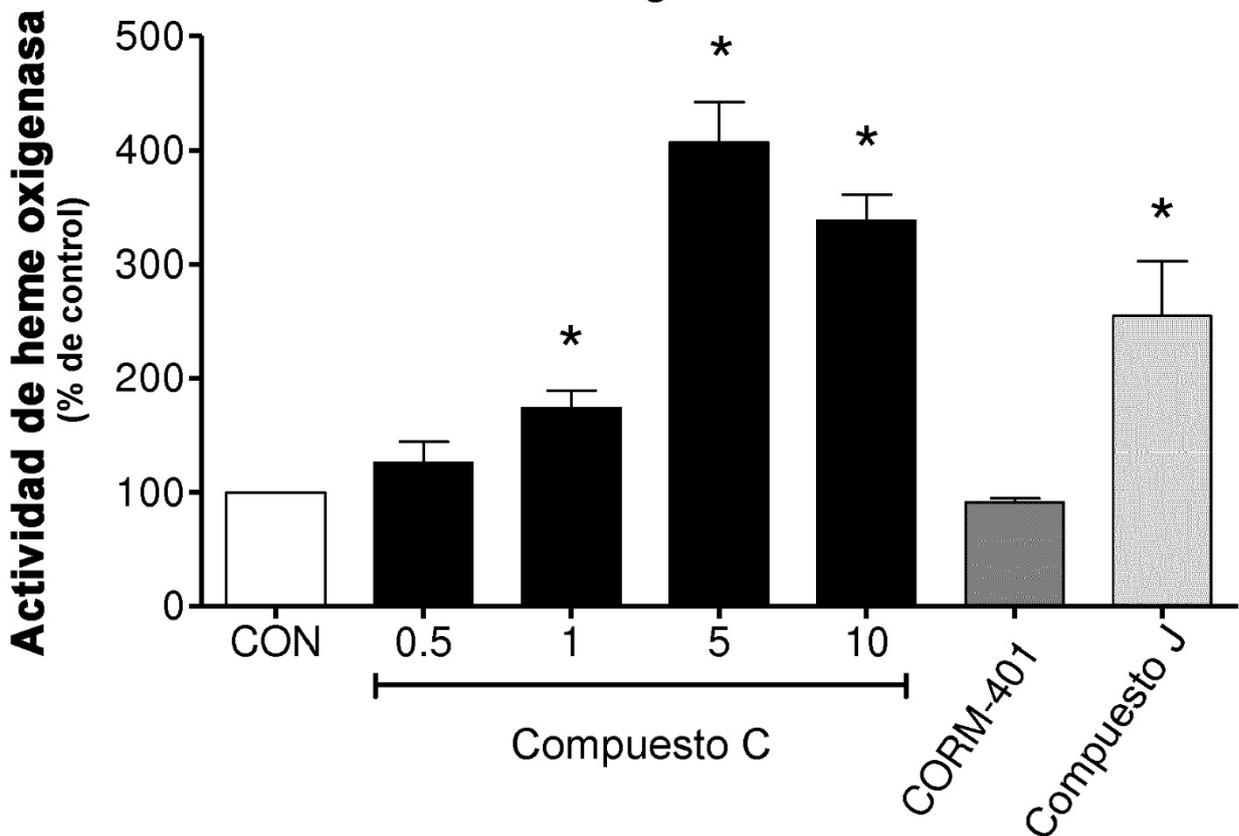


FIGURA 3

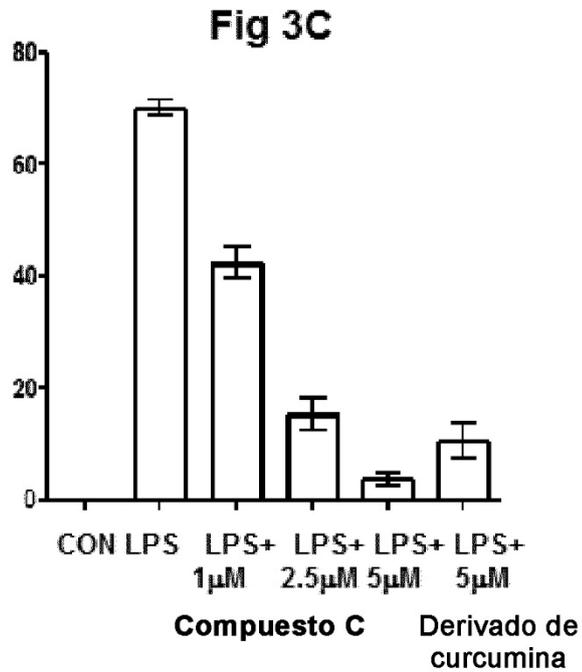
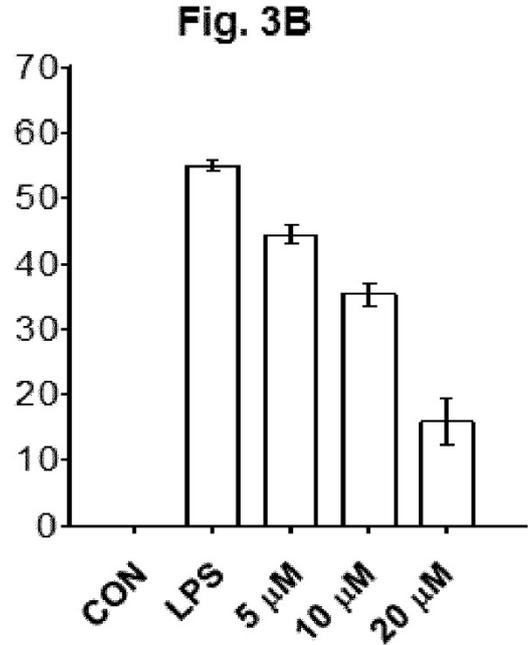
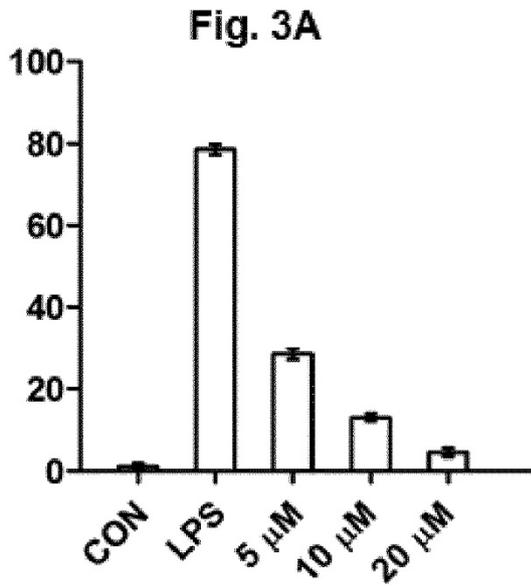


Fig.3D

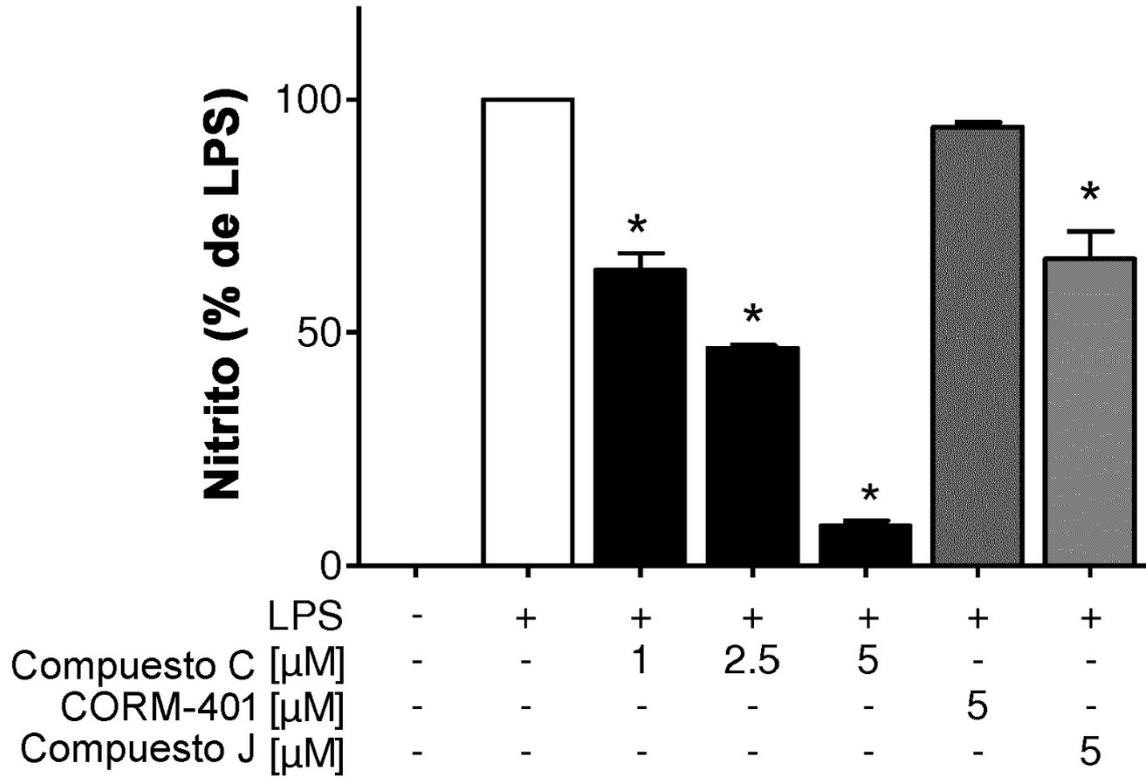


Fig.3E

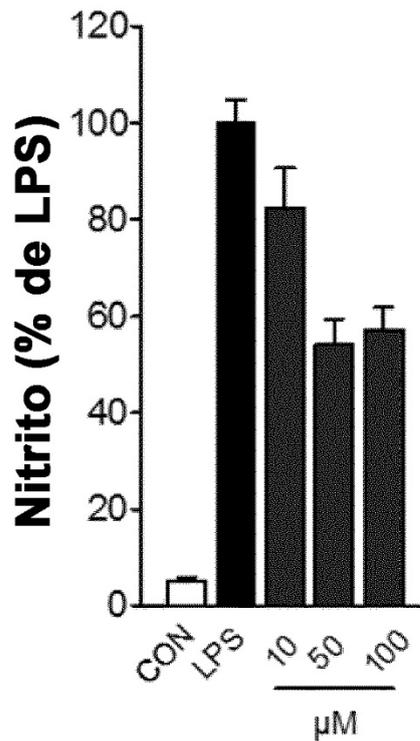


FIGURA 4

Fig. 4A

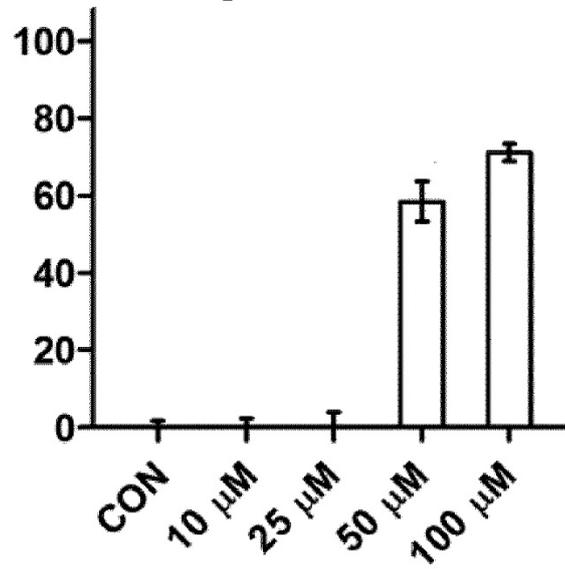


Fig. 4B

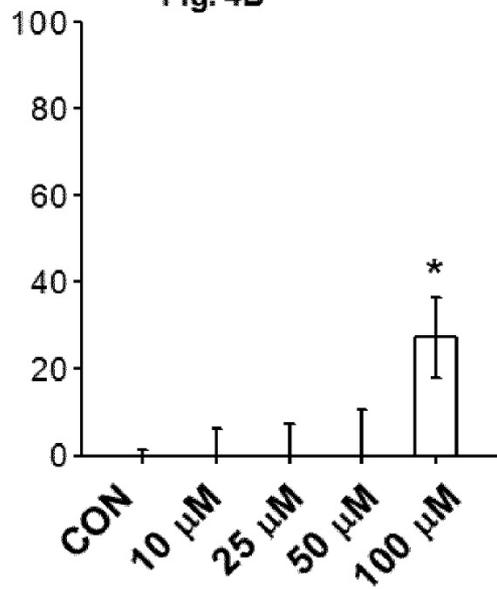


Fig. 4C

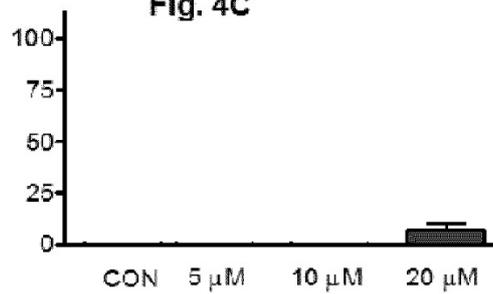


Fig. 4D

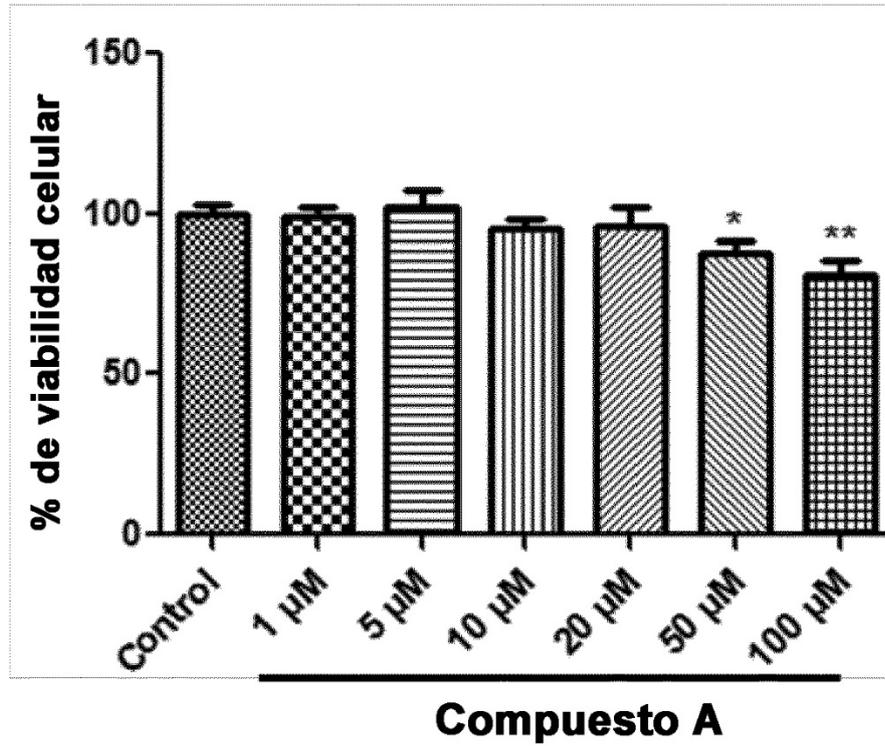


Fig. 4E

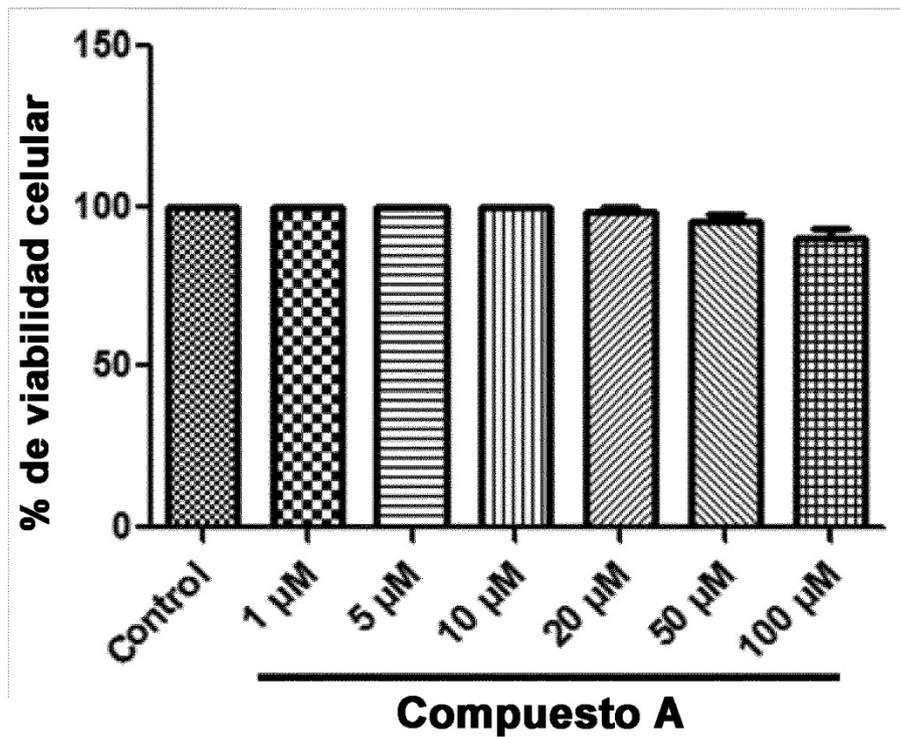


FIGURA 5

Fig. 5A

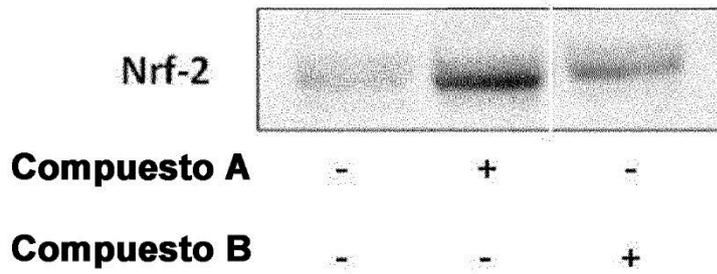


Fig. 5B

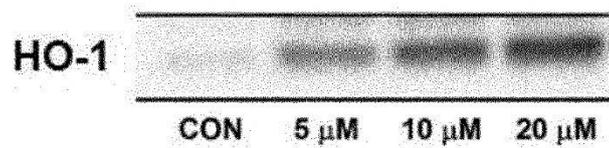


Fig.5C

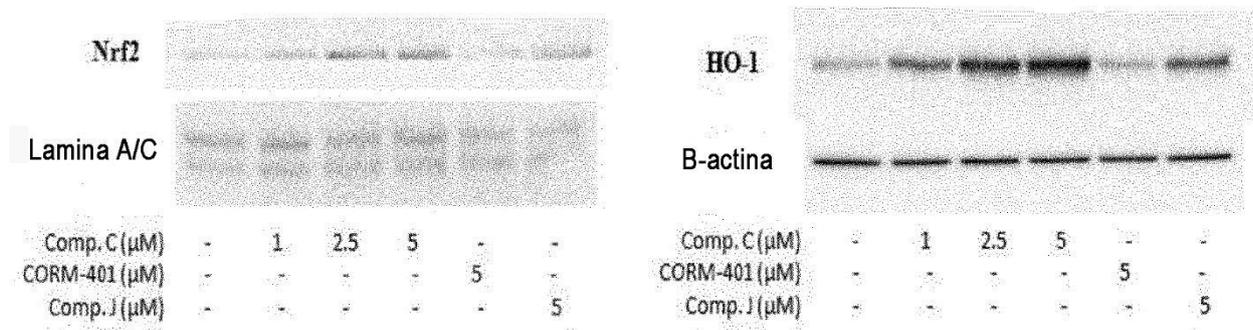


Fig.5D

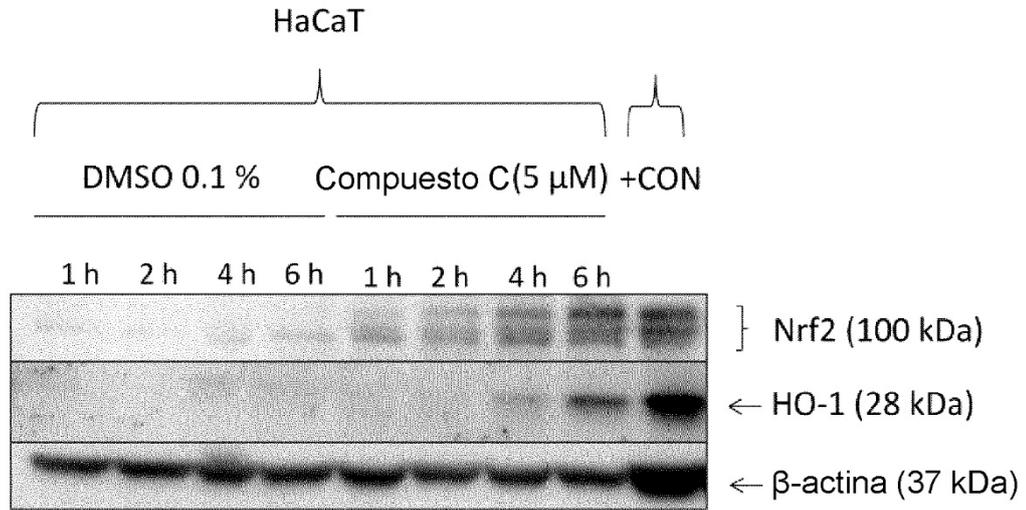


Fig.5E

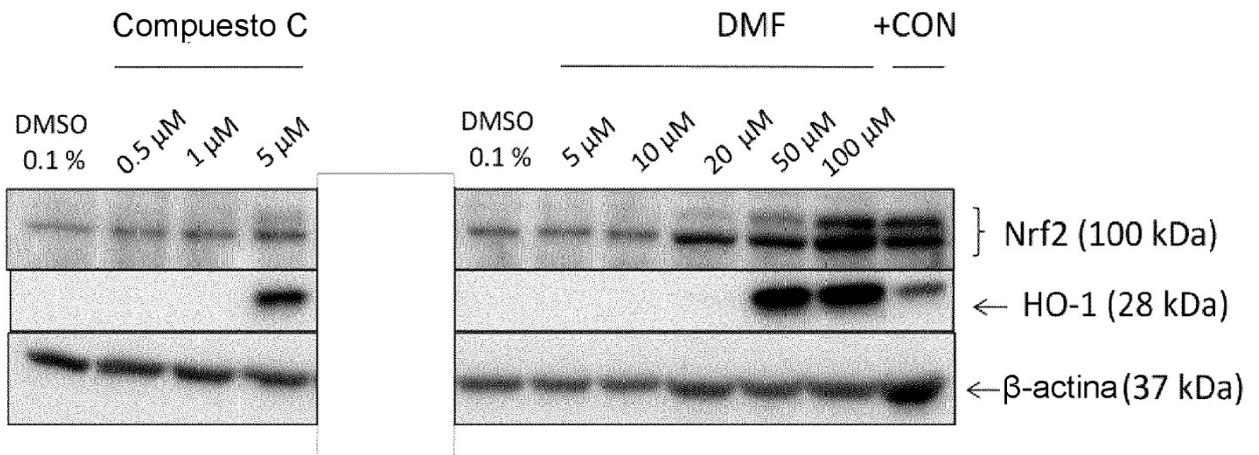


Fig.5F

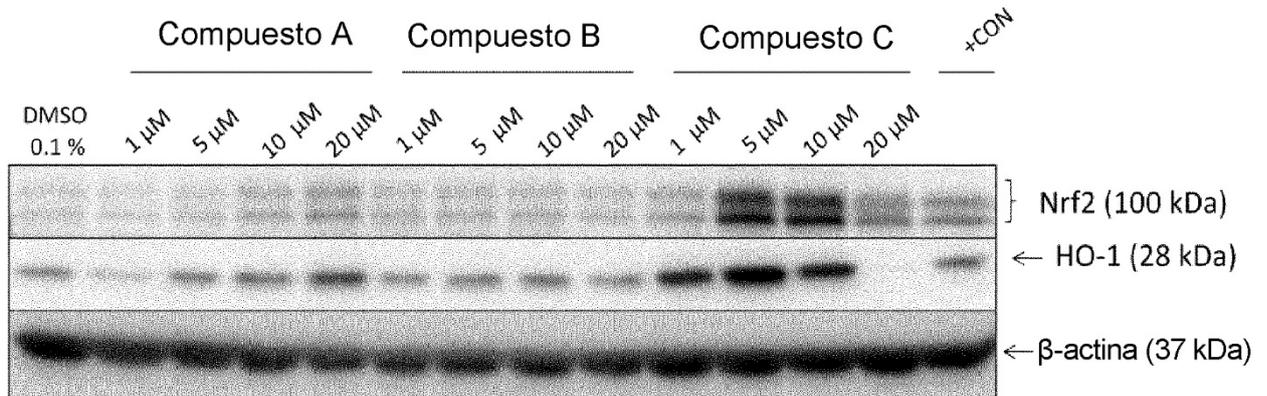


FIGURA 6

Fig 6A

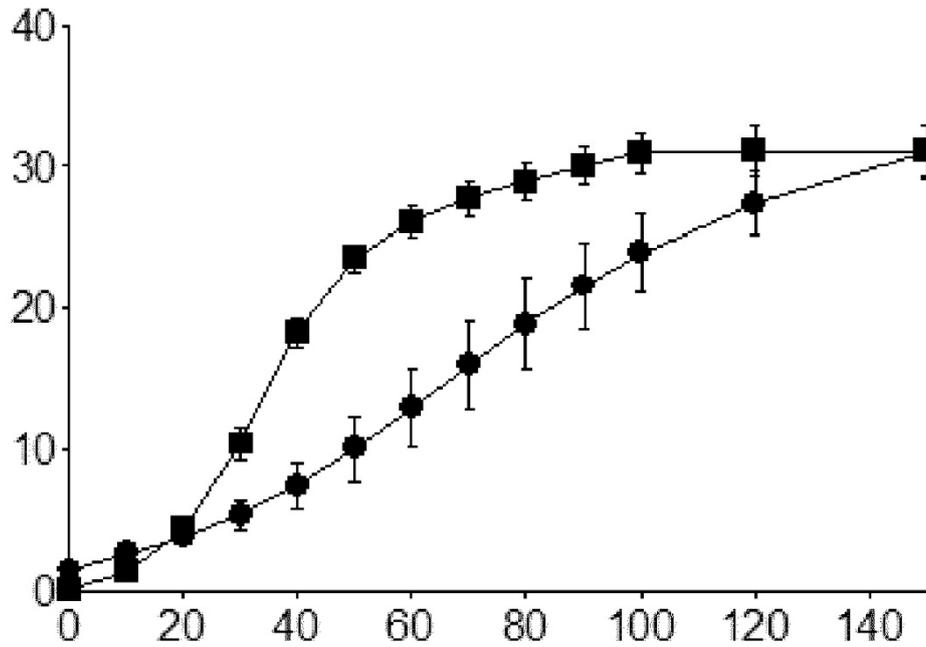


Fig 6B

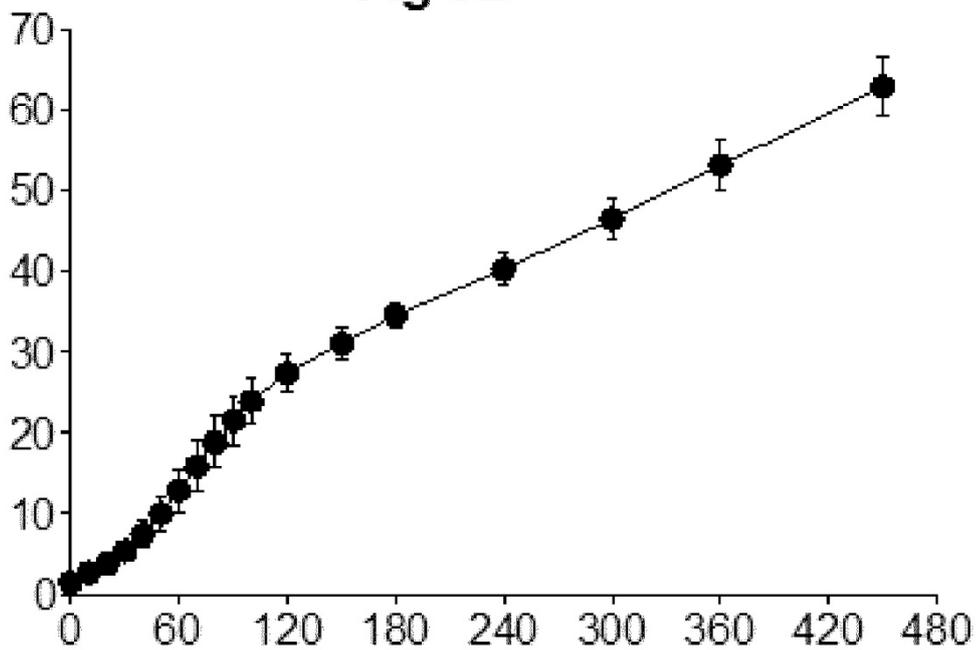


FIGURA 7

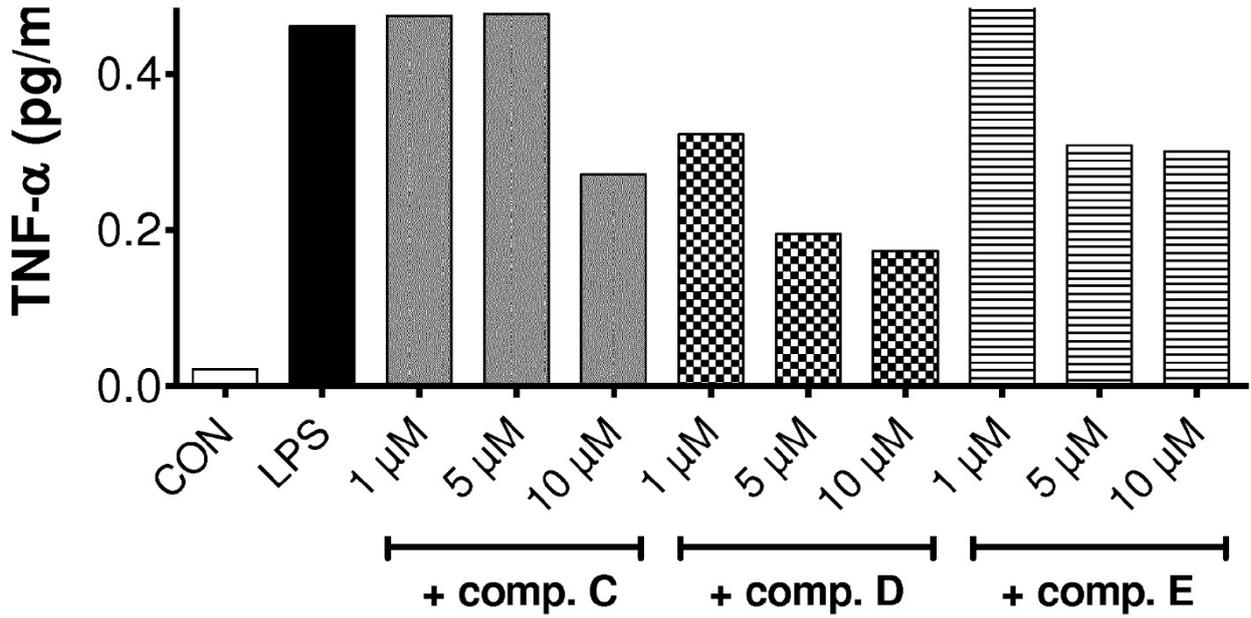


FIGURA 8

