

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 830**

51 Int. Cl.:

C07C 49/743	(2006.01)	A61K 31/135	(2006.01)
C07C 69/78	(2006.01)	A61P 29/02	(2006.01)
C07C 69/612	(2006.01)		
C07C 69/28	(2006.01)		
C07C 69/96	(2006.01)		
C07C 225/14	(2006.01)		
C07C 251/42	(2006.01)		
C07C 49/707	(2006.01)		
C07C 59/90	(2006.01)		
A61K 31/122	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2013 PCT/US2013/049788**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14011680**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2013 E 13817170 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2870133**

54 Título: **Derivados de tetrahidro-isohumulona, métodos para su preparación y uso**

30 Prioridad:

09.07.2012 US 201261669441 P

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

27.09.2019

73 Titular/es:

**KINDEX PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
800 Fifth Avenue, Suite 4100
Seattle, WA 98104, US**

72 Inventor/es:

**KONDA, VEERA;
URBAN, JAN;
DESAI, ANURADHA;
DAHLBERG, CLINTON J. y
CARROLL, BRIAN J.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 725 830 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

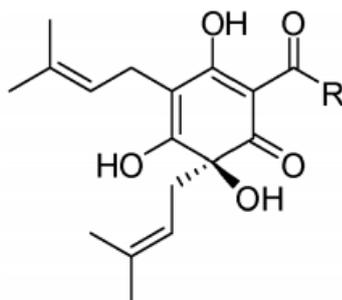
DESCRIPCIÓN

Derivados de tetrahidro-isohumulona, métodos para su preparación y uso

5 Antecedentes de la invención

El Lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una planta que se ha usado con fines medicinales durante siglos y se usa actualmente en la industria cervecera. El lúpulo contiene tanto alfa-ácidos (humulonas) como beta-ácidos (lupulonas). Los alfa-ácidos/humulonas tienen la estructura general:

10



15

20

Fórmula I

25

Los tres tipos principales de alfa-ácidos son la humulona ($R=CH_2CH(CH_3)_2$), la cohumulona ($R=CH(CH_3)_2$), y la adhumulona ($R=CH(CH_3)CH_2CH_3$). Además, existen dos alfa-ácidos menos comunes en el lúpulo, la prehumulona y la posthumulona. Los alfa-ácidos pueden convertirse en *cis* o *trans* iso-alfa-ácidos/isohumulonas por isomerización inducida por calor de los alfa-ácidos, y estos iso-alfa-ácidos pueden convertirse a su vez en *cis* o *trans* iso-alfa-ácidos reducidos por hidrogenación. Los tres tipos principales de iso-alfa-ácidos reducidos son los dihidro- (también conocidos como rho-), tetrahidro- y hexahidro-iso-alfa-ácidos (RIAA, THIAA y HIAA, respectivamente).

30

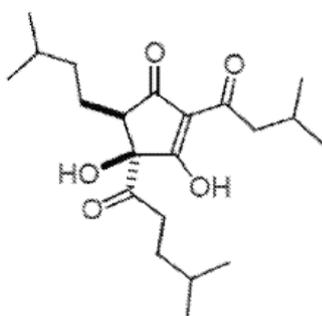
Se ha encontrado que varios compuestos derivados del lúpulo poseen actividad antiinflamatoria (Hall 2008; Desai 2009; Tripp 2009; Konda 2010). Se ha demostrado que los extractos de THIAA inhiben la inflamación (Desai 2009), reducen los síntomas de la artritis en un modelo en ratón de artritis inducida por colágeno (Konda 2010) y mejoran la homeostasis de la glucosa en un modelo de endotoxemia metabólica inducida por una dieta alta en grasas (Everard 2012). En cada uno de estos casos, los compuestos THIAA compartieron un motivo de 1,3-ciclopentadiona sustituida.

35

Los primeros intentos para identificar la configuración estereoquímica de los alfa-ácidos y sus derivados fueron incorrectos, se comenzó con los alfa-ácidos (que naturalmente tienen rotación óptica (-)) y se continuó hasta los alfa-ácidos isomerizados. A los alfa-ácidos se les asignó originalmente la configuración 6R, pero ahora se conoce que son 6S. La configuración estereoquímica correcta se identificó en la publicación de patente de los Estados Unidos Núm. 2012/0108671, que describe la configuración estereoquímica del THIAA *cis* 3,4-dihidroxi-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopent-2-en-1-ona ("KDT500", también conocida como *cis*tetrahidro-isohumulona) basado en datos de cristalografía de rayos X. Existen dos enantiómeros de KDT500: (+)-(4S,5R)-3,4-dihidroxi-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopent-2-en-1-ona ("(+)-KDT500") y (-)-(4R,5S)-3,4-dihidroxi-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopent-2-en-1-ona ("(-)-KDT500"). Las estructuras de (+)-KDT500 y (-)-KDT500 se exponen en las Fórmulas II y III, respectivamente.

40

45



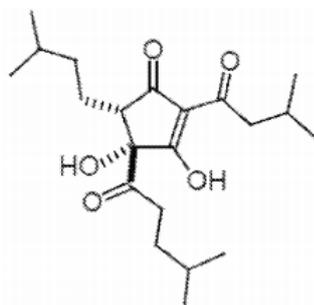
50

55

Fórmula II

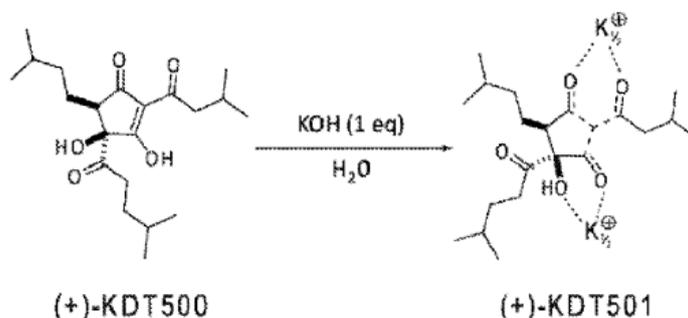
60

65



Fórmula III

La publicación de patente de los Estados Unidos Núm. 2012/0108671 describe la purificación y caracterización de KDT500 y su sal potásica KDT501. Se obtuvo un extracto de THIAA enriquecido que contiene predominantemente diastereoisómeros cis durante el procesamiento del lúpulo y se purificó mediante el uso de cromatografía a contracorriente (CCC), y el (+)-KDT500 aislado se convirtió en (+)-KDT501 al reaccionar con 1 equivalente de sal potásica (por ejemplo, KOH).



Se encontró que (+)-KDT501 exhibía tanto efectos antiinflamatorios como antidiabéticos.

El documento US 2011/0257074 A1 (METAPROTEOMICS LLC) describe métodos para preparar congéneres de ciclohexa-2,4-dienonas sustituidas, ciclohexano-1,3,5-trionas sustituidas, ciclopent-2-en-1-onas sustituidas, y 1,3-ciclopentadionas sustituidas y composiciones que usan estos compuestos para tratar la inflamación.

El documento US 2010/0222262 A1 (METAPROTEOMICS LLC) describe composiciones y métodos para reducir el riesgo cardiovascular mediante el uso de compuestos de 1,3-ciclopentadionas sustituidas.

El documento US 2004/0086580 A1 (METAPROTEOMICS, LLC) describe fracciones de compuestos de lúpulo que incluyen ciclopenten-2-en-1-onas para tratar la inflamación.

En la presente descripción se describen derivados de THIAA, así como también composiciones enantioméricamente puras y composiciones farmacéuticas que comprenden estos derivados. Los derivados de THIAA descritos se seleccionan de KDT100, KDT700, KDT0005, KDT0017, KDT0020, KDT0024, KDT0033, KDT0034, KDT0035, KDT0036, KDT0037, KDT0038, KDT0039, KDT0040, KDT0001/2, KDT0041, KDT0042, y KDT0043 o sales o cristales de estos. Las sales de los derivados de THIAA pueden ser sales inorgánicas u orgánicas, lo que incluye, pero no se limita a, sales de potasio, aluminio, calcio, cobre, guanidinio, hierro, litio, magnesio, sodio, zinc, cinchonidina, cinchonina y dietanolamina.

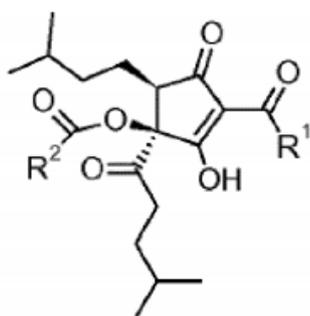
En la presente descripción se describen, además, métodos para sintetizar los nuevos derivados de THIAA. Estos métodos de síntesis usan uno o más de los protocolos de acilación, enamina, oxima y reducción expuestos en la presente descripción.

Además, se describe el uso de uno o más de los derivados de THIAA o composiciones de estos descritos en la presente descripción, en métodos para activar PPAR γ ya sea de forma selectiva o en combinación con PPAR α y métodos para disminuir los niveles de uno o más marcadores inflamatorios *in vitro* o *in vivo*. La composición puede ser una composición farmacéutica sustancialmente enantioméricamente pura que comprende un derivado de THIAA y uno o más portadores aceptables farmacéuticamente. Como se describe, los métodos pueden usarse para tratar una afección asociada con una actividad de PPAR γ disminuida en un sujeto que necesita de esta.

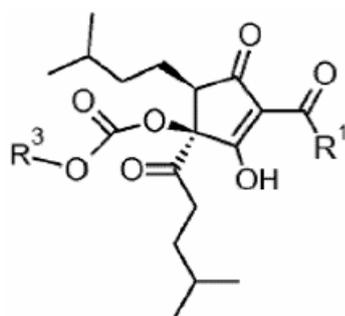
Además, se describe el uso de uno o más de los derivados de THIAA o composiciones de estos descritos en la presente descripción para inhibir la inflamación, tratar una afección asociada con la inflamación, activar PPAR γ ya sea de forma selectiva o en combinación con PPAR α , tratar una afección que responde a la modulación de PPAR γ o disminuir los

niveles de uno o más marcadores inflamatorios en un sujeto que necesita de esto mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz terapéuticamente de estos. Los derivados pueden administrarse mediante una composición farmacéutica sustancialmente enantioméricamente pura como se describe en la presente descripción. La afección que responde a la modulación de PPAR γ puede ser diabetes tipo II, obesidad, hiperinsulinemia, síndrome metabólico, enfermedad del hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, un trastorno autoinmunitario o un trastorno proliferativo. La afección asociada con la inflamación puede ser la diabetes.

En consecuencia, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula V o VI:



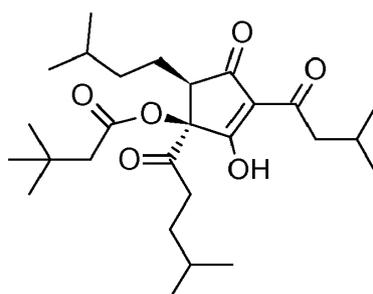
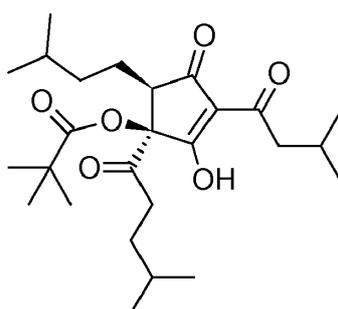
Fórmula V



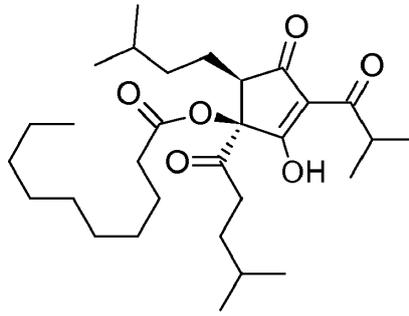
Fórmula VI

en donde R¹ se selecciona entre isopropilo, isobutilo y sec-butilo; R², se selecciona entre cualquier alquilo o arilo, lo que incluye alquilos y arilos sustituidos o ramificados; y R³ se selecciona de cualquier alquilo que no sea un alquilo terciario; o una sal o cristal de este.

En modalidades preferidas, el compuesto se selecciona de:

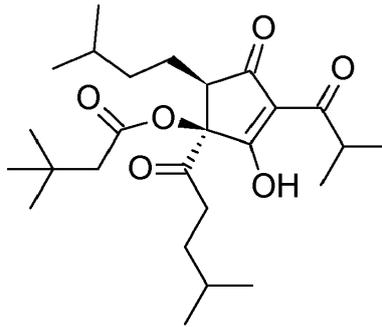


5



10

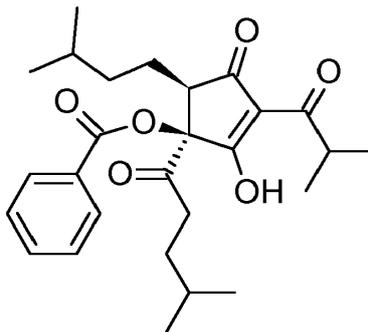
15



20

25

30



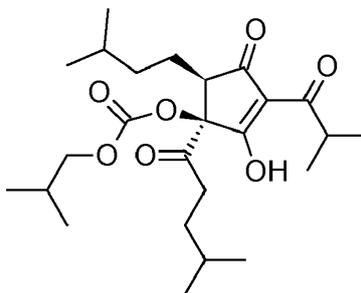
35

40

o una sal o cristal de estos.

Preferentemente el compuesto es:

45



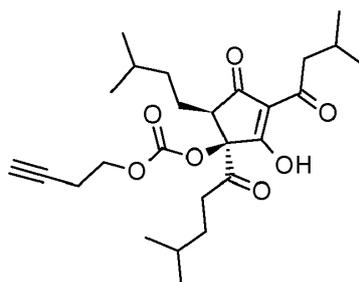
50

55

o una sal o cristal de este; o

60

65



5

10

o una sal o cristal de este.

15

La invención incluye una composición sustancialmente enantioméricamente pura que comprende un compuesto o sal como se definió anteriormente.

20

La invención proporciona, además, un compuesto o una composición como se definió anteriormente para su uso en la prevención o el tratamiento de la inflamación o una afección asociada con la inflamación.

25

Preferentemente, un compuesto o composición como se definió anteriormente para su uso en la prevención o el tratamiento de diabetes, obesidad, hiperinsulinemia, síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, un trastorno autoinmunitario o un trastorno proliferativo.

Descripción detallada

30

Como se describe en la presente descripción, los derivados de THIAA se han sintetizado y analizado por su capacidad para tratar afecciones inflamatorias y diabetes. Estos derivados se resumen en la Tabla 1. En la presente descripción se describen estos derivados de THIAA y sales y cristales de estos, lo que incluye cristales de las sales. En la presente descripción se describen, además, composiciones que comprenden estos derivados y sales y cristales de estos, lo que incluye composiciones sustancialmente enantioméricamente puras.

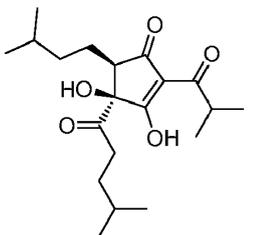
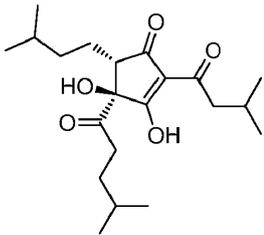
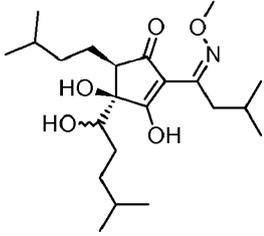
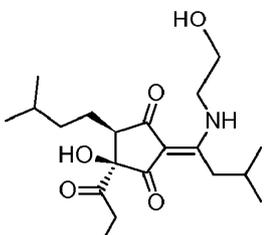
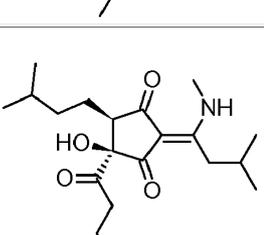
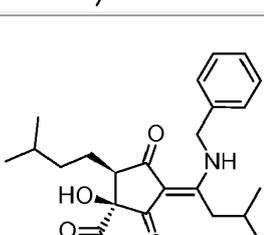
Tabla 1: Derivados de THIAA:

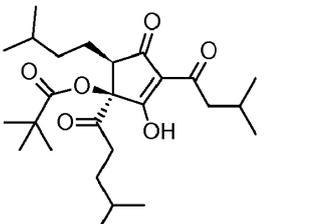
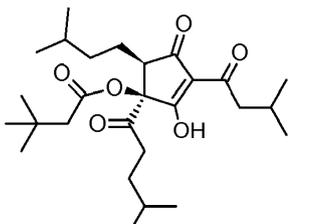
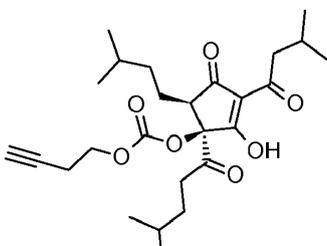
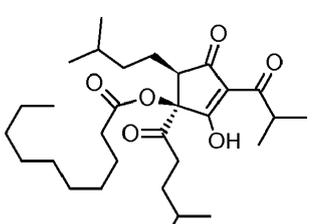
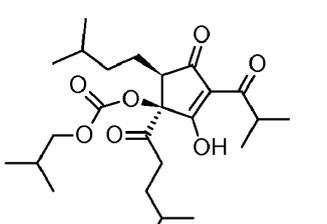
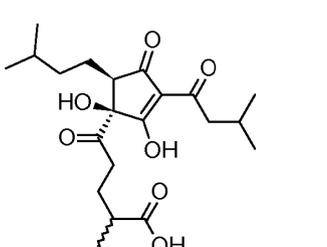
35

Nombre del compuesto	PM	Estructura	Nombre Químico
(+)-KDT500 (no forma parte de la invención)	366		(+)-(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-dihidroxi-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopent-2-en-1-ona
(+)-KDT501 (no forma parte de la invención)	404		Sal potásica de (+)-KDT500

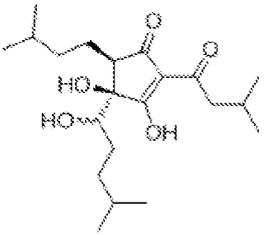
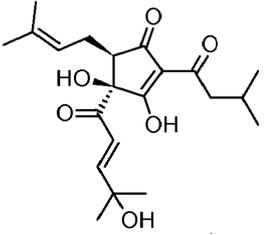
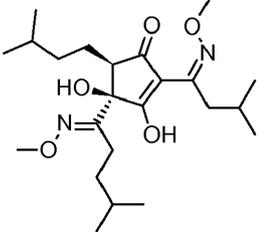
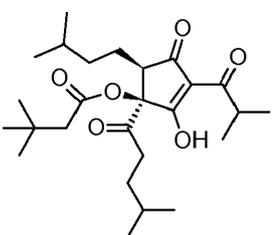
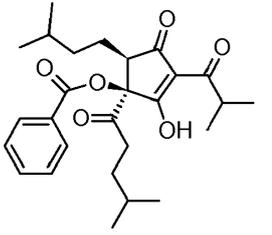
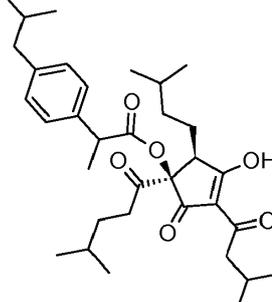
60

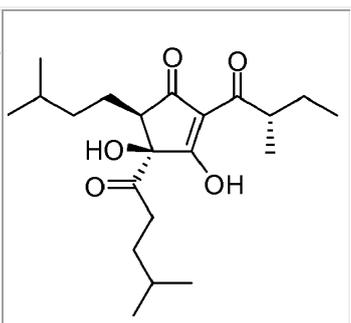
65

<p>(+)-KDT100 (Ejemplo 16)</p>	<p>342</p>		<p>(4<i>S</i>,5<i>R</i>)-3,4-dihidroxi-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)-2-(2-metilpropanoil)ciclopent-2-en-1-ona</p>
<p>(no forma parte de la invención)</p>			
<p>(+)-KDT700 (Ejemplo 18)</p>	<p>366</p>		<p>(4<i>S</i>,5<i>S</i>)-3,4-dihidroxi-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopent-2-en-1-ona</p>
<p>(no forma parte de la invención)</p>			
<p>KDT0005 (Ejemplo 13)</p>	<p>397</p>		<p>(4<i>R</i>,5<i>R</i>)-3,4-dihidroxi-4-(1-hidroxi-4-metilpentil)-2-(<i>N</i>-metoxi-3-metilbutanimidoil)-5-(3-metilbutil)ciclopent-2-en-1-ona</p>
<p>(no forma parte de la invención)</p>			
<p>KDT0017 (Ejemplo 10)</p>	<p>409</p>		<p>(4<i>R</i>,5<i>R</i>)-4-hidroxi-2-{1-[(2-hidroxietil)amino]-3-metilbutiliden}-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopentano-1,3-diona</p>
<p>(no forma parte de la invención)</p>			
<p>KDT0020 (Ejemplo 9)</p>	<p>379</p>		<p>(4<i>R</i>,5<i>R</i>)-4-hidroxi-5-(3-metilbutil)-2-[3-metil-1-(metilamino)butiliden]-4-(4-metilpentanoil)ciclopentano-1,3-diona</p>
<p>(no forma parte de la invención)</p>			
<p>KDT0024 (Ejemplo 11)</p>	<p>455</p>		<p>(4<i>R</i>,5<i>R</i>)-2-[1-(bencilamino)-3-metilbutiliden]-4-hidroxi-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopentano-1,3-diona</p>
<p>(no forma parte de la invención)</p>			

KDT0033 (Ejemplo 3)	450		(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-hidroxi-3-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il 2,2-dimetilpropanoato
KDT0034 (Ejemplo 2)	464		(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-hidroxi-3-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il 3,3-dimetilbutanoato
KDT0035 (Ejemplo 4)	462		but-3-in-1-il (1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-hidroxi-3-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il carbonato
KDT0036 (Ejemplo 1)	506		(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-hidroxi-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-3-(2-metilpropanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il decanoato
KDT0037 (Ejemplo 5)	452		(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-hidroxi-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-3-(2-metilpropanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il 2-metilpropil carbonato
(no forma parte de la invención)	396		ácido 5-[(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-1,2-dihidroxi-3-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-4-oxociclopent-2-en-1-il]-2-metil-5-oxopentanoico

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

<p>KDT0039</p> <p>(no forma parte de la invención)</p>	<p>368</p>		<p>(4<i>R</i>,5<i>R</i>)-3,4-dihidroxi-4-(1-hidroxi-4-metilpentil)-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)ciclopent-2-en-1-ona</p>
<p>KDT0040 (Ejemplo 15)</p> <p>(no forma parte de la invención)</p>	<p>378</p>		<p>(4<i>S</i>,5<i>R</i>)-3,4-dihidroxi-4-[(2<i>E</i>)-4-hidroxi-4-metilpent-2-enoil]-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbut-2-en-1-il)ciclopent-2-en-1-ona</p>
<p>KDT0001/2 (Ejemplo 12)</p> <p>(no forma parte de la invención)</p>	<p>424</p>		<p>(4<i>R</i>,5<i>R</i>)-3,4-dihidroxi-2-(<i>N</i>-metoxi-3-metilbutanimidoil)-4-(<i>N</i>-metoxi-4-metilpentanimidoil)-5-(3-metilbutil)ciclopent-2-en-1-ona</p>
<p>KDT0041 (Ejemplo 6)</p>	<p>449</p>		<p>(1<i>S</i>,5<i>R</i>)-2-hidroxi-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-3-(2-metilpropanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il 3,3-dimetilbutanoato</p>
<p>KDT0042 (Ejemplo 7)</p>	<p>455</p>		<p>(1<i>S</i>,5<i>R</i>)-2-hidroxi-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-3-(2-metilpropanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il benzoato</p>
<p>KDT0043 (Ejemplo 8)</p>	<p>553</p>		<p>(1<i>R</i>,2<i>S</i>)-3-hidroxi-4-(3-metilbutanoil)-2-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-5-oxociclopent-3-en-1-il 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato</p>

(+)-KDT400 (Ejemplo 20)	366		(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-dihidroxi-2-[(2 <i>S</i>)-2-metilbutanoil]-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopent-2-en-1-ona
(no forma parte de la invención)			

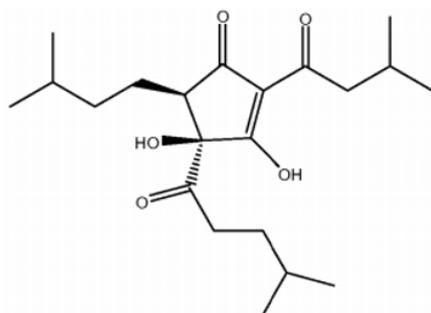
5

10

15

Los derivados de THIAA descritos en la presente descripción se sintetizaron mediante la modificación de *cis* THIAA a través de protocolos de acilación, enamina, oxima y reducción. El *cis* THIAA tiene la estructura expuesta en la Fórmula IV:

20



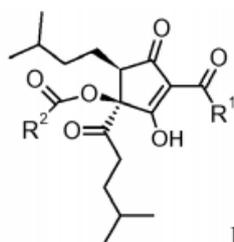
25

30

Fórmula IV

En la presente descripción se describe un protocolo de acilación para generar derivados de THIAA que tienen la estructura general expuesta en la Fórmula V (éster) y en la Fórmula VI (carbonato), así como también los compuestos generados por este protocolo.

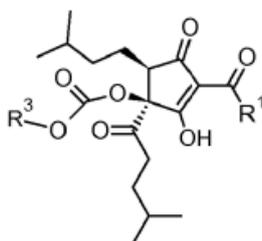
35



40

45

Fórmula V



50

55

Fórmula VI

El protocolo de acilación proporcionado describe la reacción del compuesto THIAA original (alcohol terciario con diversos grupos R¹) con cloruros de acilo o anhídridos para obtener ésteres (R²), o con cloroformatos de alquilo para obtener carbonatos (R³). Este protocolo permite la síntesis de derivados de THIAA con diferentes grupos R¹, R² y R³.

60

R¹ puede seleccionarse entre isopropilo, isobutilo y sec-butilo.

R² puede seleccionarse entre cualquier alquilo o arilo, lo que incluye alquilos y arilos sustituidos o ramificados.

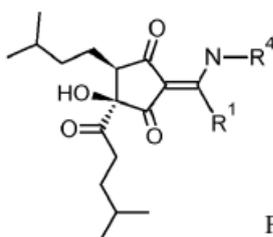
R³ puede seleccionarse de cualquier alquilo que no sea un alquilo terciario.

65

Como se expone en los Ejemplos 1-8 más abajo, los compuestos KDT0033, KDT0034, KDT0035, KDT0036, KDT0037, KDT0041, KDT0042 y KDT0043 se sintetizaron mediante un protocolo de acilación como se proporciona en la presente descripción. Se disolvió tetrahidro-isohumulona (*n*- o *co*-) en un solvente adecuado (diclorometano o cloroformo), seguido

por la adición de un exceso de piridina (5 eq.) y después se añadió un exceso de cloruro de acilo o anhídrido (3 eq.). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente y se monitoreó por HPLC. Una vez que se consumió el material de partida (típicamente 30-60 minutos para el cloruro, 12-24 horas para los anhídridos), se añadió metanol para apagar el exceso de cloruro de acilo y eliminar un posible segundo grupo acilo de la tricetona enolizada. Después de al menos una hora, la mezcla de reacción se evaporó y el residuo se disolvió en tBuOMe, se lavó con HCl 1 N (2x) y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante HPLC (fase inversa C18, acetonitrilo al 40 %, agua, TFA al 0,05 %) o cromatografía a contracorriente (CCC) para obtener el éster (KDT0033, KDT0034, KDT0036, KDT0041, KDT0042, KDT0043). El mismo procedimiento se realiza con cloroformatos de alquilo para obtener los carbonatos (KDT0035, KDT0037).

En la presente descripción se describe en ciertas modalidades un protocolo de enamina para generar derivados de THIAA que tienen la estructura general expuesta en la Fórmula VII, así como también compuestos generados mediante este protocolo.

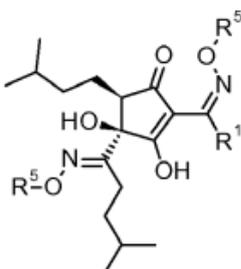


Fórmula VII

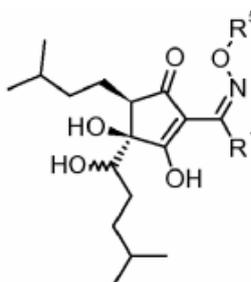
El protocolo de enamina descrito comprende hacer reaccionar el compuesto THIAA original (alcohol terciario con diversos grupos R¹) con aminas primarias. Este protocolo permite la síntesis de derivados de THIAA con diferentes grupos R⁴. R¹ puede seleccionarse entre isopropilo, isobutilo y sec-butilo. R⁴ puede seleccionarse entre cualquier alquilo o arilo, lo que incluye los alquilos y arilos sustituidos o ramificados.

Como se expone en los Ejemplos 9-11 más abajo, los compuestos KDT0017, KDT0020 y KDT0024 se sintetizaron mediante un protocolo de enamina como se proporciona en la presente descripción. Se *disolvió cis* tetrahidro-isohumulona (n- o co-) en un solvente adecuado (metanol o etanol) y se añadió un exceso de amina primaria (5 eq.). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente a 50 °C y se monitoreó por HPLC. Una vez que el material de partida ya no estaba presente (típicamente de 1 a 12 horas), el solvente se evaporó. En el caso de las aminas volátiles, el producto podría usarse sin purificación adicional. En el caso de las aminas no volátiles, el producto bruto se disolvió en tBuOMe, se lavó con HCl 1 N (2x) y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por HPLC (fase inversa C18, acetonitrilo al 40 %, agua, TFA al 0,05 %).

En la presente descripción se describe en ciertas modalidades un protocolo de oxima para generar derivados de THIAA que tienen la estructura general expuesta en las Fórmulas VIII y IX, así como también compuestos generados mediante este protocolo.



Fórmula VIII



Fórmula IX

El protocolo de oxima descrito comprende hacer reaccionar el compuesto THIAA original (alcohol terciario con varios grupos R¹) con diversas hidroxilaminas O-alkiladas. Este protocolo permite la síntesis de derivados de THIAA con diferentes grupos R⁵.

R¹ puede seleccionarse entre isopropilo, isobutilo y sec-butilo.

5 R⁵ puede seleccionarse entre cualquier alquilo o arilo, lo que incluye alquilos y arilos sustituidos o ramificados.

10 Como se expone en los Ejemplos 12 y 13 más abajo, los compuestos KDT0001/2 y KDT0005 se sintetizaron mediante un protocolo de oxima como se proporciona en la presente descripción. Se disolvió tetrahidro-isohumulona (n- o co-) en un solvente adecuado (metanol o etanol) y se añadió un ligero exceso de clorhidrato de hidroxilamina O-alkilada, seguido por 1 equivalente de NaOH (solución ac. 1 M). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente y se siguió por HPLC. Una vez que el material de partida ya no estaba presente (típicamente 1 hora), el solvente se evaporó y el residuo se particionó entre agua y tBuOMe. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (2x) y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. Si es necesario, este residuo puede purificarse por HPLC (fase inversa C18, acetonitrilo al 40 %, agua, TFA al 0,05 %).

15 En la presente descripción se describe un protocolo de óxido de selenio para generar derivados de THIAA, así como también compuestos generados mediante este protocolo. El protocolo de óxido de selenio descrito comprende hacer reaccionar el compuesto THIAA original con dióxido de selenio.

20 Como se expone en el Ejemplo 15, el compuesto KDT0040 se sintetizó mediante un protocolo de óxido de selenio como se proporciona en la presente descripción. La *cis* isohumulona disuelta en metanol se convirtió hacia una sal de magnesio, seguido por la adición de dióxido de selenio y calentamiento. Una vez completada la reacción, la mezcla se filtró y el filtrado se evaporó, después de lo cual el aceite residual se purificó mediante partición simple. Después, la fase acuosa se evaporó para producir el producto final.

25 Como se expone en los Ejemplos 25 y 26, los derivados de THIAA expuestos anteriormente se evaluaron por su efecto sobre la inflamación y la actividad de PPAR γ , y se encontró que algunos de los derivados demostraron propiedades antiinflamatorias y antidiabéticas. Como se muestra en el Ejemplo 25, se encontró que algunos de los derivados inhiben la producción de diversos mediadores inflamatorios, lo que incluye PGE₂, NO, MMP-9, IL-1 β , MCP-1, RANTES y MIP-1 α . Basado en estos resultados, se describen en la presente descripción métodos para inhibir la inflamación, disminuir los niveles de marcadores inflamatorios y tratar afecciones asociadas con la inflamación, tales como la diabetes. Como se muestra en el Ejemplo 26, se encontró que algunos de los derivados aumentan la actividad de PPAR γ , algunos compuestos aumentan selectivamente la actividad de PPAR γ y otros exhiben, además, la capacidad de aumentar la actividad de PPAR α . Basado en estos resultados, se describen en la presente descripción métodos para aumentar la actividad de PPAR γ de forma selectiva o en combinación con la actividad de PPAR α y para tratar afecciones que responden a la modulación de PPAR γ , tales como diabetes tipo II, obesidad, hiperinsulinemia, síndrome metabólico, enfermedad del hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, un trastorno autoinmunitario o un trastorno proliferativo.

40 El término "sal", como se usa en la presente descripción, puede referirse a cualquier sal aceptable farmacéuticamente, lo que incluye, por ejemplo, sales de bases inorgánicas tales como sales de potasio, aluminio, calcio, cobre, guanidinio, hierro, litio, magnesio, sodio y zinc y sales de bases orgánicas tales como sales de cinchonidina, cinchonina y dietanolamina. Ejemplos adicionales de sales y preparaciones aceptables farmacéuticamente de acuerdo con la presente invención pueden encontrarse, por ejemplo, en Berge J Pharm Sci 66:1 (1977).

45 En la presente descripción se describen composiciones que comprenden uno o más de los derivados de THIAA descritos en la presente descripción. Las composiciones pueden ser sustancialmente enantioméricamente puras. El término "sustancialmente enantioméricamente pura", como se usa en la presente descripción, se refiere a una composición en la que el 90 % o más de un compuesto particular en la composición está en una primera forma enantiomérica, mientras que el 10 % o menos está en una segunda forma enantiomérica. La "primera forma enantiomérica" de un compuesto puede incluir sales y cristales de esa forma enantiomérica. Una composición sustancialmente enantioméricamente pura puede contener 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,95 %, o 99,99 % o más de una primera forma enantiomérica de un compuesto.

55 En la presente descripción se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los derivados de THIAA descritos en la presente descripción y uno o más portadores aceptables farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas son sustancialmente enantioméricamente puras. Un "portador aceptable farmacéuticamente", como se usa en la presente descripción, se refiere a un material, composición o vehículo aceptable farmacéuticamente que se involucra en portar o transportar un compuesto de interés de un tejido, órgano o porción del cuerpo a otro tejido, órgano o porción del cuerpo. Dicho portador puede comprender, por ejemplo, un relleno líquido o sólido, un diluyente, un excipiente, un solvente, un material de encapsulación, un agente estabilizante o alguna de sus combinaciones. Cada componente del portador debe ser "aceptable farmacéuticamente", ya que debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y debe ser adecuado para el contacto con cualquier tejido, órgano o porción del cuerpo con el que pueda encontrarse, lo que significa que no debe conllevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

Los ejemplos de portadores aceptables farmacéuticamente para su uso en las composiciones descritas en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa, sacarosa o manitol; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agentes disgregantes tales como agar o carbonato de calcio; (14) agentes tampón, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol, tal como alcohol etílico y alcohol propano; (20) soluciones de tampón fosfato; (21) parafina; (22) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicol sólido o laurilsulfato de sodio; (23) agentes colorantes; (24) deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal, talco y almidón o fosfato de calcio tri-básico; y (24) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en composiciones farmacéuticas tales como acetona. El portador aceptable farmacéuticamente usado en la presente descripción puede ser un portador acuoso, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. El portador aceptable farmacéuticamente puede ser un solvente polar, por ejemplo, acetona y alcohol.

Las composiciones farmacéuticas como se describen en la presente descripción pueden comprender, además, una o más sustancias auxiliares aceptables farmacéuticamente según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender uno o más agentes de ajuste de pH, agentes tampón o agentes de ajuste de toxicidad, lo que incluye, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio.

Las composiciones farmacéuticas, como se describen en la presente descripción, pueden formularse en una forma de dosificación adecuada, lo que incluye, por ejemplo, cápsulas, bolsitas, píldoras, comprimidos, pastillas (mediante el uso de una base con sabor, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, como un elixir o jarabe, o como pastillas (mediante el uso de una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un derivado de THIAA como ingrediente activo.

Las composiciones pueden formularse como un vehículo de suministro de liberación en el tiempo, tal como, por ejemplo, una cápsula de liberación en el tiempo. Un "vehículo de liberación en el tiempo", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier vehículo de suministro que libera agente activo durante un período de tiempo en lugar de inmediatamente después de la administración. Las composiciones pueden formularse como un vehículo de suministro de liberación inmediata.

Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes complementarios. Los comprimidos fabricados por compresión pueden prepararse mediante el uso de agente aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetil celulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, almidón glicolato de sodio o carboximetil celulosa de sodio reticulada), dispersante o activo de superficie. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse al moldear en una máquina adecuada una mezcla sustancialmente enantioméricamente pura del derivado de THIAA en polvo o humedecido adicionalmente con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente lograrse o prepararse con revestimientos y capas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Además, pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada de un derivado de THIAA de esta mediante el uso de, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímeros, liposomas y/o microesferas. Pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio estéril inyectable inmediatamente antes del uso. Estas composiciones pueden contener opcionalmente, además, agentes pacificadores y pueden ser de una composición tal que libere(n) el(los) derivado(s) de THIAA solo, o preferentemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El derivado de THIAA también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

La concentración de derivados de THIAA en las composiciones descritas en la presente descripción puede variar. Las concentraciones pueden seleccionarse basado en los volúmenes de fluidos, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del sistema biológico. La concentración de un derivado de THIAA en una composición proporcionada en la presente descripción puede ser de aproximadamente 0,0001 % a 100 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 %, o de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % peso/vol.

Los métodos de síntesis proporcionados en la presente descripción pueden generar un único enantiómero de un derivado de THIAA. Los métodos de síntesis pueden dar como resultado una mezcla de formas enantioméricas de derivados de

THIAA. Pueden realizarse una o más etapas de separación y/o purificación subsecuentes para aislar una forma enantiomérica única o para generar una composición sustancialmente enantioméricamente pura como se describe en la presente descripción.

5 En ciertos métodos descritos en la presente descripción, el sujeto es un mamífero, y en algunos de estos el sujeto es un humano. Un "sujeto que necesita de esto" se refiere a un sujeto diagnosticado con una afección asociada con inflamación o una afección que responde a la modulación de PPAR γ , un sujeto que presenta o ha mostrado uno o más síntomas de una afección asociada con inflamación o una afección que responde a la modulación de PPAR γ , o un sujeto que se ha considerado en riesgo de desarrollar una afección asociada con la inflamación o una afección que responde a la modulación de PPAR γ basada en uno o más factores hereditarios o ambientales.

15 Los términos "tratar", "tratar" o "tratamiento" como se usa en la presente con respecto a una afección se refieren a prevenir la afección, retardar el inicio o la tasa de desarrollo de la afección, reducir el riesgo de desarrollar la afección, prevenir o retrasar el desarrollo de síntomas asociados con la afección, reducir o terminar los síntomas asociados con la afección, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna de sus combinaciones.

20 Una "cantidad eficaz terapéuticamente" de un derivado de THIAA o composición farmacéutica, como se usa en la presente, es una cantidad de una composición que produce un efecto terapéutico deseado en un sujeto. La cantidad eficaz terapéuticamente precisa es una cantidad del compuesto o composición que dará los resultados más eficaces en términos de eficacia terapéutica en un sujeto dado. Esta cantidad variará en dependencia de una variedad de factores, lo que incluye, pero no se limita a, las características del compuesto terapéutico (lo que incluye, por ejemplo, actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (lo que incluye, por ejemplo, edad, sexo, tipo y etapa de la enfermedad, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosificación dada y tipo de medicamento) la naturaleza del portador o portadores aceptables farmacéuticamente en la composición y la vía de administración. Un experto en las técnicas clínicas y farmacológicas podrá determinar una cantidad eficaz terapéuticamente mediante la experimentación rutinaria, a saber, mediante el monitoreo de la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y el ajuste en consecuencia de la dosificación. Para una guía adicional, ver Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21ra Edición, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005, cuya totalidad de la descripción se incorpora en la presente descripción como referencia.

30 Un compuesto o composición como se describe en la presente descripción puede administrarse una o más veces al día. El compuesto o la composición puede suministrarse menos de una vez al día. Por ejemplo, el compuesto o la composición puede administrarse una vez a la semana, una vez al mes o una vez cada varios meses. La administración de un compuesto o composición descrita en la presente descripción puede llevarse a cabo durante un período de tratamiento específico determinado de antemano, o puede llevarse a cabo de forma indefinida o hasta que se alcance una cota terapéutica específica. La frecuencia de dosificación puede cambiar a lo largo del tratamiento. Por ejemplo, un sujeto puede recibir administraciones menos frecuentes a lo largo del tratamiento a medida que se alcanzan ciertas cotas terapéuticas.

40 Los compuestos y composiciones descritos en la presente descripción pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración conocida en la técnica, lo que incluye, pero no se limita a, oral, aerosol, enteral, nasal, oftálmica, parenteral o transdérmica (por ejemplo, crema o pomada tópica, parche). "Parenteral" se refiere a una vía de administración que generalmente se asocia con la inyección, lo que incluye infraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardíaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal o transtraqueal. Los métodos para preparar composiciones que pueden administrarse por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21ra ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (2005). Una composición también puede administrarse como un bolo, electuario o pasta.

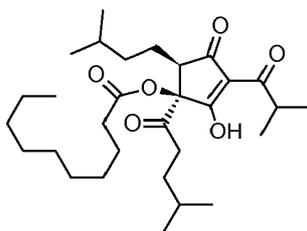
50 Pueden proporcionarse kits que comprenden uno o más de los derivados, formulaciones farmacéuticas o composiciones sustancialmente enantioméricamente puras de THIAA descritas en la presente descripción. El kit puede proporcionar instrucciones de uso, tales como la dosificación o las instrucciones de administración. Los kits pueden usarse para tratar una afección asociada con la inflamación o una afección que responde a la modulación de PPAR γ .

55 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis de (1S,5R)-2-hidroxi-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-3-(2-metilpropanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il decanoato (KDT0036):

60 Se *disolvió cis* tetrahidro-isocohumulona (38 mg) en cloroformo (1 ml) y se añadió piridina (75 μ l, 11 eq.), seguido inmediatamente por anhídrido acético (120 μ l, 9 eq.). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante toda la noche, se apagó con MeOH (1 ml) y se dejó durante toda la noche nuevamente. Después, la mezcla de reacción se evaporó y el residuo se disolvió en tBuOMe, se lavó con HCl 1 N (2x) y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó hasta un aceite. El producto bruto se purificó por HPLC. Las fracciones puras se combinaron y se

evaporaron para dar un producto puro en forma de un aceite incoloro (11,6 mg, rendimiento de ~21 %). MS 505,5 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 259 nm.



5

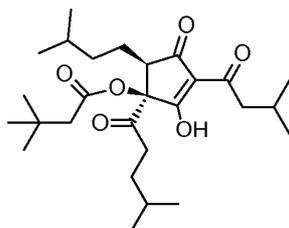
10

15 Ejemplo 2: Síntesis de (1*S*,5*R*)-2-hidroxi-3-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il 3,3-dimetilbutanoato (KDT0034):

Se *disolvió cis* tetrahydro-isohumulona (51 mg) en cloroformo (1 ml) y se añadió piridina (60 μ l, 5,3 eq), seguido inmediatamente por cloruro de dimetilpropionilo (60 μ l, 3,1 eq). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 horas, se apagó con MeOH (1 ml) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Después, la mezcla de reacción se evaporó y el residuo se disolvió en tBuOMe, se lavó con HCl 1 N (2x) y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener 58 mg de un aceite. El producto bruto se purificó por HPLC. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron para dar un producto puro en forma de un aceite incoloro (22,0 mg, rendimiento de ~34 %). MS 463,7 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 259 nm.

20

25



30

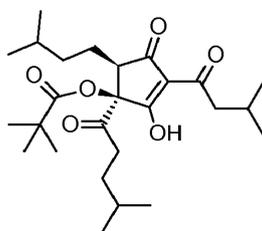
35

Ejemplo 3: Síntesis de (1*S*,5*R*)-2-hidroxi-3-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il 2,2-dimetilpropanoato (KDT0033):

40 Se *disolvió cis* tetrahydro-isohumulona (51,5 mg) en cloroformo (1 ml) y se añadió piridina (60 μ l, 5,3 eq.) seguido inmediatamente de cloruro de pivaloilo (60 μ l, 3,5 eq.). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 90 minutos, se apagó con MeOH (1 ml) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Después, la mezcla de reacción se evaporó y el residuo se disolvió en tBuOMe, se lavó con HCl 1 N (2x) y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener 58 mg de un aceite. El producto bruto se purificó por HPLC. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron para dar un producto puro en forma de un aceite incoloro (23,0 mg, rendimiento de ~36 %). MS 449,5 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 259 nm.

40

45



50

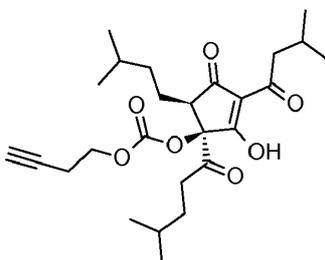
55

60 Ejemplo 4: Síntesis de but-3-in-1-il (1*S*,5*R*)-2-hidroxi-3-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il carbonato (KDT0035):

Se *disolvió cis* tetrahydro-isohumulona (60,4 mg) en cloroformo (1 ml) y se añadió piridina (50 μ l, 3,7 eq) seguido por cloroformiato de butinilo (55 μ l, 2,9 eq). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 horas, se apagó con MeOH (1 ml) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se evaporó y el producto bruto se purificó por HPLC. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron para dar un producto puro en

65

forma de un aceite incoloro (29,7 mg, rendimiento de ~39 %). MS 461 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 259 nm.



5

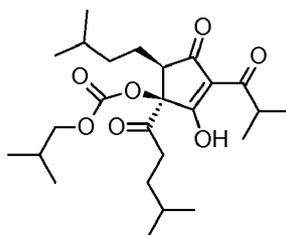
10

15 Ejemplo 5: Síntesis de (1*S*,5*R*)-2-hidroxi-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-3-(2-metilpropanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il 2-metilpropil carbonato (KDT0037):

Se *disolvió* *cis* tetrahidro-isohumulona (55,2 mg) en diclorometano (1 ml) y se añadió piridina (50 μ l, 4,0 eq) seguido por cloroforniato de isobutilo (60 μ l, 2,9 eq). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora, se apagó con MeOH (1 ml) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se evaporó y el producto bruto se purificó por HPLC. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron para dar un producto puro en forma de un aceite incoloro (10,3 mg, rendimiento de ~15 %). MS 451 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 259 nm.

25

30



35

35 Ejemplo 6: Síntesis de (1*S*,5*R*)-2-hidroxi-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-3-(2-metilpropanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il 3,3-dimetilbutanoato (KDT0041):

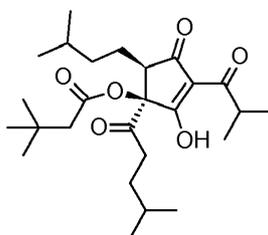
Se *disolvió* *cis* tetrahidro-isocohumulona (55,1 mg) en cloroformo (1 ml) y se añadió piridina (60 μ l, 4,8 eq.) seguido inmediatamente por cloruro de dimetilpropionilo (60 μ l, 2,8 eq). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora, se apagó con MeOH (1 ml) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante toda la noche. Después, la mezcla de reacción se evaporó para dar un aceite y el producto bruto se purificó por HPLC. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron para dar un producto puro en forma de un aceite incoloro (30,5 mg, rendimiento de ~43 %). MS 449,4 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 258 nm, ¹H RMN (600 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 0,82 - 0,90 (dd, 12 H) 1,05 (s, 3 H) 1,10 (s, 9 H) 1,12 (s, 3 H) 1,26 - 1,44 (m, 5 H) 1,44 - 1,50 (m, 4 H) 2,57 (dt, *J*=18,41, 7,33 Hz, 1 H) 2,82 (dt, *J*=7,50, 18,08 Hz, 1 H) 3,54 (t, *J*=6,62 Hz, 1 H).

40

45

50

55

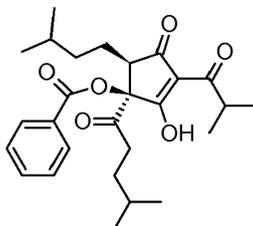


60 Ejemplo 7: Síntesis de (1*S*,5*R*)-2-hidroxi-5-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-3-(2-metilpropanoil)-4-oxociclopent-2-en-1-il benzoato (KDT0042):

Se *disolvió* *cis* tetrahidro-isocohumulona (56,2 mg) en cloroformo (1 ml) y se añadió piridina (60 μ l, 4,7 eq) seguido inmediatamente por cloruro de benzoilo (30 μ l, 1,6 eq). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora, se apagó con MeOH (1 ml) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante toda la noche. Después, la mezcla de reacción se evaporó para dar un aceite y el producto bruto se purificó por HPLC. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron para dar un producto puro en forma de un aceite incoloro (14,9 mg, rendimiento de ~20 %). MS 455,4 [MH]⁻,

65

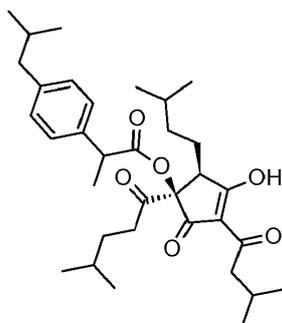
UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 234 nm, ¹H RMN (600 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 0,62 (dd, *J*=9,26, 6,62 Hz, 6 H) 0,74 - 0,78 (m, 6 H) 1,02 (d, *J*=7,06 Hz, 3 H) 1,08 - 1,12 (m, 3 H) 1,13 - 1,30 (m, 3 H) 1,30 - 1,42 (m, 3 H) 1,43 - 1,58 (m, 2 H) 2,47 - 2,56 (m, 1 H) 2,79 (ddd, *J*=18,08, 8,16, 6,39 Hz, 1 H) 3,43 (dt, *J*=13,67, 6,84 Hz, 1 H) 3,64 (t, *J*=6,17 Hz, 1 H) 7,46 - 7,55 (m, 2 H) 7,62 - 7,68 (m, 1 H) 8,01 - 8,11 (m, 2 H).



Ejemplo 8: Síntesis de (1*R*,2*S*)-3-hidroxi-4-(3-metilbutanoil)-2-(3-metilbutil)-1-(4-metilpentanoil)-5-oxociclopent-3-en-1-il 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoato (KDT0043):

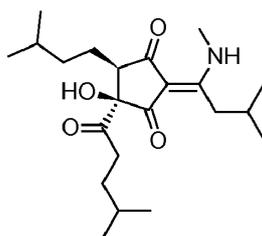
Se *disolvió cis* tetrahidro-isohumulona (52 mg) en diclorometano (2 ml) y se añadió cloruro de ibuprofeno (69 mg, 2,2 eq), seguido inmediatamente por piridina (60 µl, 5 eq.). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 horas, se apagó con MeOH (1 ml) y se dejó durante toda la noche. Después, la mezcla de reacción se evaporó y el residuo se *disolvió* en tBuOMe, se lavó con HCl 1 N (2x) y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener 124 mg de aceite. Este producto bruto se purificó por CCC en hexano/DMF en modo descendente. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron para obtener un producto puro en forma de un aceite incoloro (30 mg, rendimiento de ~38 %). MS 553,4 [M-H]⁻.

En un procedimiento alternativo, se *disolvió cis* tetrahidro-isohumulona (52 mg) en diclorometano (2 ml) y se añadió cloruro de ibuprofeno (36 mg, 1,1 eq.), seguido inmediatamente por piridina (30 µl, 2,6 eq.). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 75 minutos, se apagó con agua (100 µl) y se agitó durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se evaporó, y el residuo se *disolvió* en tBuOMe y se lavó con agua (1x), bicarbonato de sodio ac. sat. (1x), HCl 1 N (3x) y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener 73,1 mg (rendimiento del 93 %) del producto.



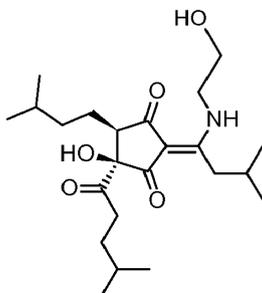
Ejemplo 9: Síntesis de (4*R*,5*R*)-4-hidroxi-5-(3-metilbutil)-2-[3-metil-1-(metilamino)butilideno]-4-(4-metilpentanoil)ciclopentano-1,3-diona (KDT0020): (no forma parte de la invención)

Se *disolvió cis* tetrahidro-isohumulona (8,1 mg) en metanol (100 µl) y se añadió metilamina (50 µl, solución al 33 % en etanol, 18 eq). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora y se evaporó para obtener un sólido blanco (8,0 mg, rendimiento de ~95 %). MS 378,3 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 248, 303 nm.



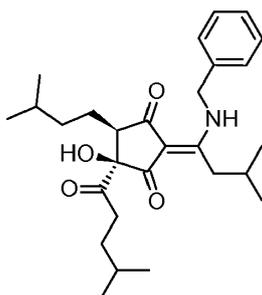
Ejemplo 10: Síntesis de (4*R*,5*R*)-4-hidroxi-2-{1-[(2-hidroxi-etil)amino]-3-metilbutilideno}-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopentano-1,3-diona (KDT0017): (no forma parte de la invención)

Se *disolvió cis* tetrahidro-isohumulona (48,0 mg) en metanol (200 μ l) y se añadió etanolamina (100 μ l, 12,7 eq.). La mezcla se agitó a 40 °C durante 15 horas, se evaporó y se purificó por HPLC para obtener un sólido blanco (31,3 mg, rendimiento de ~58 %). MS 408,5 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 247, 303 nm.



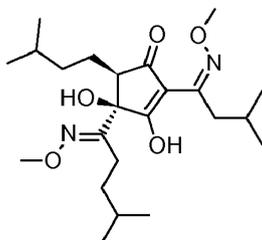
Ejemplo 11: Síntesis de (4*R*,5*R*)-2-[1-(bencilamino)-3-metilbutilideno]-4-hidroxi-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopentano-1,3-diona (KDT0024): (no forma parte de la invención)

Se *disolvió cis* tetrahidro-isohumulona (25,9 mg) en metanol (75 μ l) y se añadió bencilamina (35 μ l, 4,5 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se evaporó y se purificó por HPLC para dar un sólido blanco (20,3 mg, rendimiento de ~63 %). MS 454,5 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 247, 307 nm.



Ejemplo 12: Síntesis de (4*R*,5*R*)-3,4-dihidroxi-2-(*N*-metoxi-3-metilbutanimidoil)-4-(*N*-metoxi-4-metilpentanimidoil)-5-(3-metilbutil)ciclopent-2-en-1-ona (KDT0001/2) (no forma parte de la invención)

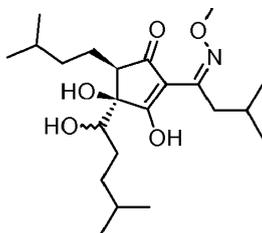
Se *disolvió sal potásica de cis* tetrahidro-isohumulona (96,8 mg) en metanol (3 ml) y *O*-Me-hidroxilamina. Se añadió HCl (50,5 mg, 2,3 eq), seguido por NaOH (280 μ l de solución acuosa 1 M, 1,06 eq). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 horas, el metanol se evaporó y el residuo se particionó entre agua y tBuOMe. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (2x) y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener un sólido blanco (107,2 mg, rendimiento de ~96 %). MS 423,5 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 271 nm.



Ejemplo 13 Síntesis de (4*R*,5*R*)-3,4-dihidroxi-4-(1-hidroxi-4-metilpentil)-2-(*N*-metoxi-3-metilbutanimidoil)-5-(3-metilbutil)ciclopent-2-en-1-ona (KDT0005): (no forma parte de la invención)

Se *disolvió cis* hexahidro-isohumulona (23,0 mg) en metanol (2 ml) y *O*-Me-hidroxilamina. Se añadió HCl (11 mg, 2,1 eq) seguido por NaOH (80 μ l de solución acuosa 1 M, 1,3 eq.). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas, el metanol se evaporó y el residuo se particionó entre agua y tBuOMe. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (2x)

y salmuera (1x), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener un sólido blanco (21,2 mg, rendimiento de ~85 %). MS 396,1 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 269 nm.



5

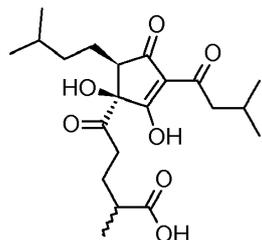
10

15 Ejemplo 14: ácido 5-[(1*S*,5*R*)-1,2-dihidroxi-3- (3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-4-oxociclopent-2-en-1-il]-2-metil-5-oxopentanoico (KDT0038): (no forma parte de la invención)

Se acidificó la orina (750 ml) de un paciente que recibió 1,2 g de THIAA/día (1/2 de recolección de 24 horas) con 50 ml de HCl 1 N, se mezcló con diclorometano (100 ml) y se eliminó el precipitado por filtración. El residuo se particionó y la capa acuosa se extrajo 2 veces adicionales con 100 ml de diclorometano. Los extractos de diclorometano combinados se filtraron a través de celita y el filtrado se lavó con salmuera (1x 100 ml), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener 168 mg de un aceite amarillo. El aceite se purificó por HPLC semipreparativa (acetato de amonio 100 mM pH 9,5, MeOH al 40 %, columna GeminiNX 4,6x250) para obtener un sólido blanco. MS 395,4 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH 9,5) 255 nm. ¹H RMN (500 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 0,86 - 0,94 (m, 4 H) 0,94 - 1,04 (m, 6 H) 1,09 - 1,15 (m, 1 H) 1,15 - 1,23 (m, 3 H) 1,24 - 1,36 (m, 3 H) 1,48 - 1,60 (m, 1 H) 1,60 - 1,78 (m, 3 H) 1,80 - 1,92 (m, 1 H) 2,08 - 2,21 (m, 1 H) 2,43 (dq, *J*=14,12, 7,21 Hz, 1 H) 2,68 - 2,81 (m, 2 H) 2,81 - 2,90 (m, 2 H) 3,08 (t, *J*=6,51 Hz, 1 H).

30

35

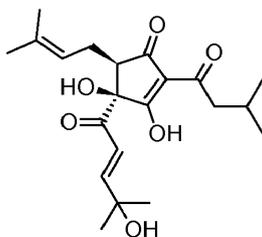


40 Ejemplo 15: (4*S*,5*R*)-3,4-dihidroxi-4- [(2*E*)-4-hidroxi-4-metilpent-2-enoil-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbut-2-en-1-il)ciclopent-2-en-1-ona (KDT0040): (no forma parte de la invención)

Se añadió óxido de magnesio (11 mg, 1,1 eq.) a *cis* isohumulona (95,0 mg) en metanol y se mezcló brevemente para formar la sal. Después, se añadió dióxido de selenio (76 mg, 2,9 eq.) y la mezcla de reacción se calentó a 65 °C durante 80 minutos, momento en el que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró a través de celita y el filtrado se evaporó. El aceite residual se purificó por partición simple en HEMWat 1111 (hexano-acetato de etilo-metanol-agua, 1:1:1 en volumen), con el producto en fase acuosa y el material de partida restante e impurezas en la fase orgánica. La fase acuosa se evaporó para obtener un sólido blanco. MS 377,1 [M-H]⁻, UV_{máx} (MeOH ac., tampón acetato de amonio 50 mM, pH=9,5) 245 nm. ¹H RMN (500 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 0,98 (m, 6 H) 1,35 (s, 6 H) 1,62 (s, 3 H) 1,66 (s, 3 H) 2,15 (m, 1 H) 2,35 - 2,57 (m, 2 H) 2,66 - 2,84 (m, 2 H) 3,19 (t, *J*=5,7, 1 H) 3,89 (s, 1 H) 5,14 (t, *J*=6,7 Hz, 1 H) 6,89 (d, *J*=15,6 Hz, 1 H) 7,05 (d, *J*=15,6 Hz, 1 H).

55

60

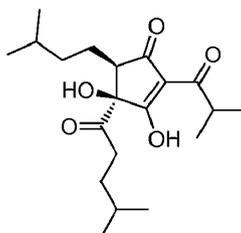


Ejemplo 16: (4*S*,5*R*)-3,4-dihidroxi-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)-2-(2-metilpropanoil)ciclopent-2-en-1-ona ((+)-KDT100; (+)-*cis* tetrahidro isocohumulona): (no forma parte de la invención)

65

Los *trans* iso- α -ácidos se eliminaron mediante la complejación con β -ciclodextrina (Khatib 2010) de 45 g de un extracto de resina isomerizada de lúpulo. El material *cis* se purificó después mediante CCC (Dahlberg 2012) para aislar la *cis* isocohumulona. La *cis* isocohumulona se redujo mediante hidrogenación catalítica y se volvió a purificar mediante CCC (Dahlberg 2010) hasta una homogeneidad de ≥ 95 %.

Anal. Encontrado: C, 68,09, H, 9,11. $C_{20}H_{32}O_5$ requiere C, 68,15, H, 9,15. p.f. 49-50 °C (50-52 °C), rotación óptica +35,3, $c=1,0$, MeOH (35,6) (Ting 1996).



Ejemplo 17: Sal de cinchonidina de (+)-KDT100: (no forma parte de la invención)

Se mezcló un equivalente de (+)-KDT100 (77,0 mg) y (-)-cinchonidina (51,9 mg, 1,00 eq.) en iPr -OH (200 μ l) y se calentó brevemente para formar una solución. Se añadió iBuOMe (200 μ l) y la solución resultante se dejó cristalizar a temperatura ambiente. Después de tres días, se observó la formación de cristales *in situ* en esta solución. Se identificó un cristal individual adecuado para el análisis de rayos X, se extrajo con cuidado, se montó y se envió para el análisis de difracción de rayos X.

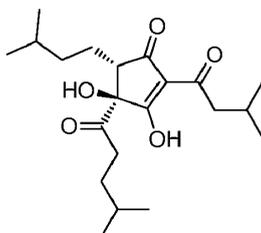
Anal. (Calc 2M + iBuOMe , fórmula correspondiente a la estructura cristalina) Encontrado: C, 72,14, H, 8,42, N, 4,09. $C_{83}H_{120}N_4O_{13}$ requiere C, 71,90, H, 8,75, N, 4,05. p.f. 118 °C.

Ejemplo 18: (4*S*,5*S*)-3,4-dihidroxi-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopent-2-en-1-ona ((+)-KDT700; (-)-*trans* tetrahydro-isohumulona): (no forma parte de la invención)

Los alfa-ácidos se aislaron de un extracto de lúpulo de CO_2 disponible en el mercado mediante una extracción a pH diferencial. Se envolvió un tanque de inmersión de vidrio de borosilicato encamisado de 450 mm con aproximadamente 17 metros de tubo de FEP de 2,7 mm de diámetro interno y se usó con una lámpara de inmersión de mercurio de presión media de 450 W para producir un fotorreactor de flujo. Los alfa-ácidos aislados (2,1 g) se disolvieron en 100 ml de metanol y se pasaron por el reactor de flujo a 5 ml/min durante dos horas, se recicló el efluente hasta que se completó la reacción.

La mezcla de ácidos libres resultante de *trans* iso-alfa-ácidos se redujo mediante hidrogenación catalítica y se purificó mediante CCC para producir *trans* tetrahydro-isohumulona (Dahlberg 2010) en ≥ 95 % de homogeneidad.

Anal. Encontrado: C, 68,05, H, 9,56, N, 5,77. $C_{27}H_{44}N_2O_5$ requiere C, 68,04, H, 9,30, N, 5,88. p.f. 76 °C (78-81 °C) (Ting 1996), rotación óptica -11,2, $c=1,0$, MeOH (-12,4) (Ting 1996). 1H RMN (500 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 0,88 - 0,95 (m, 12 H) 0,98 (dd, $J=16,30$, 6,68, Hz, 6 H) 1,18 - 1,26 (m, 1 H) 1,37 - 1,49 (m, 4 H) 1,50 - 1,60 (m, 2 H) 1,87 - 1,97 (m, 1 H) 2,09 - 2,19 (m, 1 H) 2,68 - 2,75 (m, 1 H) 2,75 - 2,86 (m, 4 H); ^{13}C RMN (126 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 21,26, 21,31, 21,36, 21,37, 21,49, 21,58, 22,19, 26,28, 27,25, 27,93, 31,35, 36,70, 37,04, 44,14, 47,10, 47,27, 47,44, 47,61, 47,79, 47,95, 48,12, 191,45, 196,44, 207,67, 210,23.



Ejemplo 19: Sal de cinchonidina de (-)-KDT700: (no forma parte de la invención)

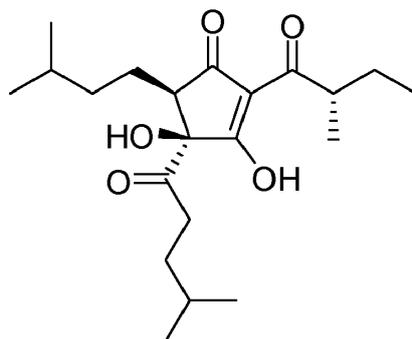
Se mezcló (-)-KDT700 (54,3 mg) con cinchonina (43,0 mg, 1 eq) en MeOH y la solución resultante se evaporó. La sal sólida resultante se suspendió en hexano y se añadió cloroformo hasta que se produjo la disolución completa. La solución se dejó abierta para permitir que el solvente se evaporara lentamente durante varios días, momento en el que se formaron cristales. Se identificó un cristal individual adecuado para el análisis de rayos X, se extrajo cuidadosamente, se montó y

se envió al análisis de difracción de rayos X. Los cristales restantes se filtraron, se secaron a alto vacío y se enviaron para análisis elemental.

Anal. (Calc. como $M+0,15CHCl_3$) Encontrado: C71,26, H, 8,35, N, 4,15. $C_{40,15}H_{56,1}Cl_{0,45}N_2O_6$ requiere C, 71,04, 8,34, N, 4,13. p.f. 137-139 °C.

Ejemplo 20: (4*S*,5*R*)-3,4-dihidroxi-2-[(2*S*)-2-metilbutanoil]-5-(3-metilbutil)-4-(4-metilpentanoil)ciclopent-2-en-1-ona ((+)-KDT400; (+)-*cis* tetrahidro-isoadhumulona): (no forma parte de la invención)

Los *trans* iso- α -ácidos se eliminaron mediante la complejación con β -ciclodextrina (Khatib 2010) de 45 g de un extracto de resina isomerizada de lúpulo. El material *cis* se purificó adicionalmente mediante CCC (Dahlberg 2012) para aislar la *cis*isoadhumulona, que después se redujo mediante hidrogenación catalítica y se volvió a purificar mediante CCC (Dahlberg 2010) hasta ≥ 95 % de homogeneidad.



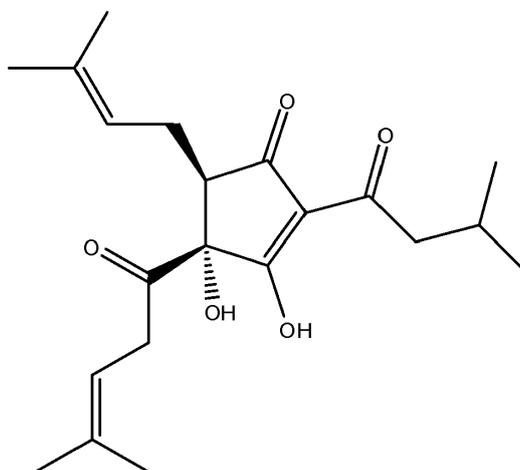
Ejemplo 21: Sal de cinchonidina de (+)-KDT400: (no forma parte de la invención)

Un equivalente de (+)-KDT400 (50,0 mg) y (-)-cinchonidina (39,9 mg, 0,99 eq.) se mezclaron en *i*Pr-OH (200 μ l) en un vial de color ámbar de 4 ml y se calentaron brevemente a 60-70 °C para formar una solución. Se añadió éter (200 μ l) y se dejó que la solución resultante formara cristales a temperatura ambiente. La solución se selló bajo un tabique, que después se perforó con una aguja 16 Gauge para permitir la evaporación gradual del solvente. Después de tres días a temperatura ambiente, se observó la formación de cristales *in situ* en esta solución. Se identificó un cristal individual adecuado para el análisis de rayos X, se extrajo con cuidado, se montó y se envió para el análisis de difracción de rayos X.

Anal. (Calc como $2M+0,6 iPrOH+0,4 Et_2O$, fórmula correspondiente a la estructura cristalina) Encontrado: C, 70,68, H, 8,35, N, 3,98. $C_{83,4}H_{120,8}N_4O_{13}$ requiere C70,57, H, 8,58, N, 3,95. p.f. 149 °C.

Ejemplo 22: (4*S*,5*R*)-3,4-dihidroxi-2-(3-metilbutanoil)-5-(3-metilbut-2-en-1-il)-4-(4-metilpent-3-enoil)ciclopent-2-en-1-ona ((+)-KDT550; (+)-*cis* isohumulona): (no forma parte de la invención)

Los *trans* iso- α ácidos se eliminaron mediante la complejación con β -ciclodextrina (Khatib 2010) de 45 g de un extracto de resina isomerizada de lúpulo. El material *cis* se purificó adicionalmente mediante CCC (Dahlberg 2012) para aislar la *cis* isohumulona, lo que se confirmó hasta ≥ 95 % de homogeneidad después de la purificación.



Ejemplo 23: Sal de cinchonidina de (+)-KDT500: (no forma parte de la invención)

Un equivalente de (+)-KDT500 (99,4 mg) y (-)-cinchonidina (80,0 mg, 0,99 eq.) se mezclaron en ⁱPr-OH (100 µl) y se calentaron brevemente para formar una solución. Se añadió ^tBuOMe (500 µl) y se dejó que la solución resultante formara cristales a temperatura ambiente. Después de tres días, se observó la formación de cristales *in situ* en esta solución. Se identificó un cristal individual adecuado para el análisis de rayos X, se extrajo con cuidado, se montó y se envió para el análisis de difracción de rayos X.

Anal. (Calc como M+0,3 H₂O) Encontrado: C, 72,65, H, 7,80, N, 4,28. C₄₀H_{52,6}O_{6,3} requiere C 72,53, H, 8,02, N, 4,23. p.f. 149 °C.

Ejemplo 24: (6S)-3,5,6-trihidroxi-2-(3-metilbutanoil)-4,6-bis(3-metilbut-2-en-1-il)ciclohexa-2,4-dien-1-ona ((+)-KDT505; (-) humulona): (no forma parte de la invención)

Se aisló (-) humulona a partir de un extracto de lúpulo de CO₂ disponible en el mercado mediante extracción a pH diferencial, seguido por una purificación por CCC de la fracción de alfa-ácidos resultante hasta una homogeneidad del 95 %. p.f. 66 °C (66 °C (Ting 1996)), rotación óptica -197,7, c=1,0, MeOH (-212 (Ting 1996)). Sal de 1,2-diaminciclohexano: Anal. Encontrado: C 68,05, H 9,56, N, 5,77. C₂₇H₄₄N₂O₅ requiere C, 68,05, H, 9,30, N, 5,88. p.f. 144 °C.

Ejemplo 25: Efecto de los derivados de THIAA en la producción mediada por LPS de mediadores inflamatorios:

Los derivados de THIAA sintetizados en los Ejemplos 1-19 se disolvieron en dimetil sulfoxido (DMSO) y se almacenaron a -20 °C. El LPS se compró a Sigma Chemicals (St. Louis, MO).

El efecto de los derivados de THIAA sobre la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) y de óxido nítrico (NO) mediada por LPS se evaluó en un modelo de macrófagos murinos RAW264.7. La línea celular RAW 264.7 se compró a ATCC (Manassas, VA) y se mantuvo de acuerdo con sus instrucciones. Las células se cultivaron y se subcultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 8x10⁴ células por pocillo, y alcanzaron una confluencia del 80-90 % al día siguiente. Los derivados de THIAA se añadieron a las células en medio libre de suero a una concentración final de DMSO al 0,1 %. Después de una hora de incubación con los derivados de THIAA, se añadió a las células LPS (1 µg/ml) o medio DMEM solo y la incubación se continuó durante 6 horas. La estimulación de células RAW 264.7 con LPS (1 µg/ml) durante 6 horas activó la producción de PGE₂ y NO. Se colectó el medio sobrenadante para medir los niveles de PGE₂. Para el NO, las incubaciones se continuaron durante toda la noche. Se colectó el medio sobrenadante para medir los niveles de NO después de 16 horas de estimulación. Los niveles de PGE₂ se midieron mediante el uso de kits de ensayo de Assay Designs, (Ann Arbor, MI) y los niveles de NO se midieron mediante el uso de kits de ensayo de Cayman Chemicals (Ann Harbor, MI).

El efecto de los derivados de THIAA sobre la producción de MMP-9, IL-1β, MCP-1, RANTES y MIP-1α mediada por LPS se evaluó en células THP-1. La estimulación de células THP-1 con LPS (1 µg/ml) activó la producción de MMP-9, IL-1β, MCP-1, RANTES y MIP-1α.

Los resultados se resumen en la Tabla 2, con los datos representados como % de inhibición de la producción de mediadores inflamatorios.

Tabla 2: Efecto de los derivados de THIAA sobre mediadores inflamatorios mediados por LPS en células RAW264.7 y THP-1:

Compuesto de prueba (12,5 µM)	Células RAW264.7		Células THP-1				Inhibición media
	% de inhibición de la producción de PGE ₂	% de inhibición de la producción de NO	% de inhibición de la producción de IL-6	% de inhibición de la producción de MCP-1	% de inhibición de la producción de MIP-1α	% de inhibición de la producción de RANTES	
KDT501	Ninguna inhibición (NI)	23	49	77	62	77	48
KDT100	NI	NI	<20 %	61	NI	22	<20 %
KDT700	<20 %	NI	<20 %	88	36	64	34
KDT0005	NI	NI	<20 %	38	20	25	<20 %
KDT0017	NI	<20 %	50	80	NI	NI	23
KDT0020	75	<20 %	70	82	<20 %	35	46
KDT0024	81	27	53	80	NI	20	44

5	KDT0033	87	68	87	100	95	97	89
	KDT0034	87	65	84	100	94	98	88
	KDT0035	89	44	65	95	82	84	77
	KDT0036	45	97	83	98	25	88	73
	KDT0037	82	87	61	98	22	83	72
10	KDT0038	NI	NI	NI	46	NI	<20 %	<20 %
	KDT0039	NI	<20 %	22	50	23	58	26
	KDT0040	54	26	NI	53	NI	18	25
15	KDT0001/2	55	NI	60	74	<20 %	45	39
	Rosiglitazona (10 µM)	NI	6	NI	NI	NI	24	<20 %

20 En las células RAW264.7, muchos de los compuestos de prueba inhibieron la producción de PGE₂ y de NO mediada por LPS en un grado significativo (definido como mayor del 20 %). La eficacia de la inhibición varió entre los compuestos de prueba. Por ejemplo, KDT0033, KDT0034 y KDT0037 inhibieron la producción de PGE₂ y NO en más del 50 %, mientras que KDT100, KDT700, KDT0005, KDT0017, KDT0038 y KDT0039 mostraron débil (<20 %) o ninguna inhibición de ambos mediadores inflamatorios. La rosiglitazona, un agonista control positivo para PPAR_γ, no inhibió la producción de PGE₂ e inhibió la producción de NO muy débilmente (6 %), lo que sugiere que los efectos antiinflamatorios de los derivados de THIAA son independientes de la activación de PPAR_γ en el modelo celular RAW264.7.

25 En las células THP-1, todos los compuestos de prueba KDT inhibieron la expresión inducida por LPS de uno o más de MMP-9, IL-1 β , MCP-1, RANTES y MIP-1 α a una concentración de 12,5 µM. De nuevo, la rosiglitazona no mostró inhibición o solo una inhibición débil de la producción de mediadores inflamatorios, lo que sugiere que los efectos antiinflamatorios de las moléculas de prueba KDT son independientes de la activación de PPAR_γ en el modelo celular THP-1.

30 Se calculó la inhibición media de los seis mediadores inflamatorios para cada uno de los derivados de THIAA. Muchos de los compuestos de prueba mostraron niveles de inhibición media significativos, KDT0033 y KDT0034 exhibieron niveles de inhibición media de casi el 90 %. Curiosamente, los derivados de THIAA funcionalizados en la posición R² (es decir, KDT0033, KDT0034, KDT0035, KDT0036 y KDT0037) parecen tener efectos antiinflamatorios mejorados en ambos modelos celulares.

35 Ejemplo 26: Efecto de los derivados de THIAA sobre la actividad de PPAR α y PPAR γ :

40 El efecto funcional de los derivados de THIAA sobre la actividad de PPAR α y PPAR γ se evaluó mediante el uso de un ensayo informador de PPAR (INDIGO Biosciences, PA). Este ensayo usa células de mamíferos no humanos diseñadas para proporcionar una expresión constitutiva de alto nivel de PPAR α o PPAR γ y contiene un gen informador de luciferasa específico para el PPAR apropiado. Después de la activación por la unión del agonista, PPAR induce la expresión del gen informador de luciferasa. Por lo tanto, la actividad de la luciferasa proporciona un sustituto para medir la actividad de PPAR en células tratadas con agonistas.

45 Se colocaron células informadoras en una placa de 96 pocillos a 100 µl por pocillo, y se añadieron a cada pocillo por duplicado 100 µl de compuestos de prueba KDT (50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 µM). Para el ensayo de PPAR γ , se usó rosiglitazona (1.000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 nM) como control positivo. Para el ensayo de PPAR α , se usó GW590735 (5.000, 1.670, 560, 185, 62 y 21 nM) como control positivo. Se usó DMSO al 0,1 % como control de solvente para cada ensayo. Las placas se incubaron durante 20 horas en un incubador humidificado a 37 °C y CO₂ al 5 %. Después de la incubación, el medio celular se descartó y las células se trataron con 100 µl de reactivo de detección de luciferasa durante 15 minutos. Las placas se analizaron mediante el uso de un luminómetro (Victor2, Perkin Elmer). Se midieron la unidad relativa de luz (RLU, por sus siglas en inglés) promedio y la desviación estándar.

50 Los resultados se resumen en la Tabla 3, con los datos informados como % de nivel de actividad de PPAR γ en comparación con rosiglitazona (500 nM) o actividad de PPAR α en comparación con GW590735 (21 nM).

60		PPAR α	PPAR γ
	Compuesto de prueba (12,5 µM)	% de GW590735 (20,6 nM)	% de rosiglitazona (500 nM)
	KDT501	<5	31
65	KDT 100	<5	23

	KDT700	<5	<5
	KDT0005	<5	<5
5	KDT0017	<5	<5
	KDT0020	<5	<5
	KDT0024	<5	<5
10	KDT0033	<5	10
	KDT0034	9	5
	KDT0035	40	43
15	KDT0036	<5	8
	KDT0037	<5	34
	KDT0038	<5	<5
	KDT0039	<5	<5
20	KDT0040	<5	<5
	KDT0001/2	<5	<5

25 Como se esperaba, la rosiglitazona y el GW590735 aumentaron la actividad de PPAR γ y PPAR α , respectivamente. Cuatro de los derivados de THIAA (KDT100, KDT0033, KDT036 y KDT0037) aumentaron la actividad de PPAR γ en un 5 % o más de una manera consistente con su actividad como agonistas parciales de PPAR γ , a la vez que no muestran ningún efecto sobre la actividad de PPAR α , lo que sugiere que estos compuestos son agonistas específicos de PPAR γ .
 30 Inesperadamente, se encontró que KDT0034 y KDT0035 actúan como agonistas duales de PPAR α y PPAR γ .

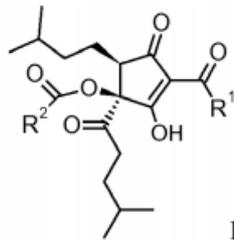
Referencias

1. Berge J Pharm Sci 66:1 (1977)
2. Dahlberg J Sep Sci 33:2828 (2010)
- 35 3. Dahlberg J Sep Sci 35:1183 (2012)
4. Desai Inflamm Res 58:229 (2009)
5. Everard PLoS One 7:e33858 (2012)
6. Hall Phytochem 69:1534 (2009)
7. Khatib Food Chem 119:354 (2010)
- 40 8. Konda Arthritis Rheum 62:1683 (2010)
9. Ting J Am Soc Brew Chem 54:103 (1996)
10. Tripp Acta Hort (ISHS) 848:221 (2009)

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula V o VI:

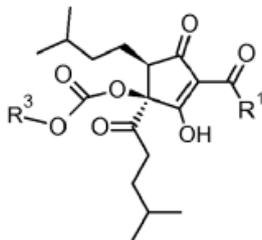
5



Fórmula V

10

15



Fórmula VI

20

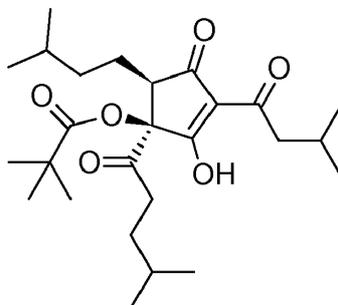
25

en donde R¹ se selecciona entre isopropilo, isobutilo y sec-butilo;
R², se selecciona entre cualquier alquilo o arilo, lo que incluye alquilos y arilos sustituidos o ramificados; y
R³ se selecciona entre cualquier alquilo que no sea un alquilo terciario;
una sal o cristal de estos.

30

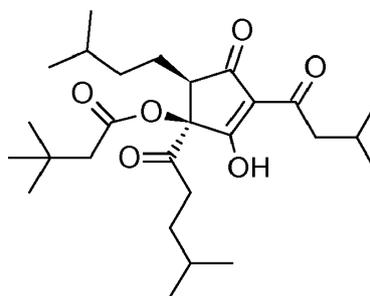
2. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1, que se selecciona de:

35



40

45



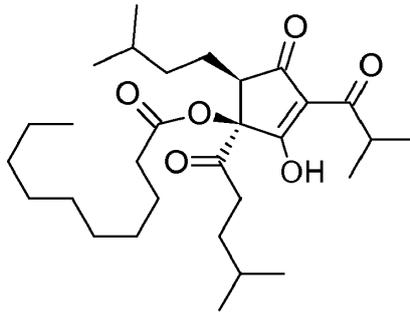
50

55

60

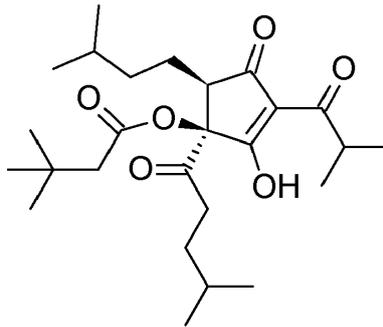
65

5



10

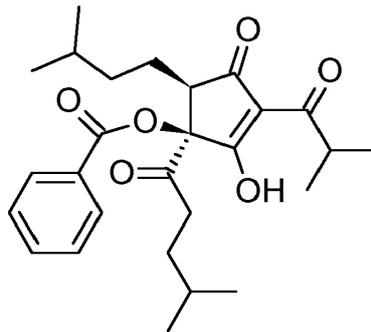
15



20

25

30



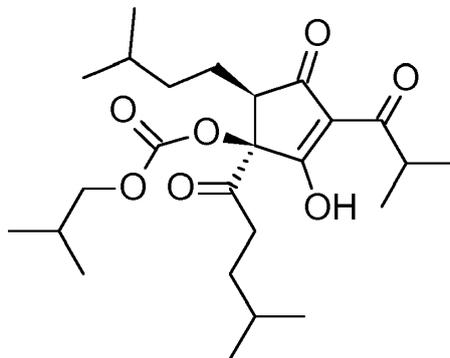
35

40

una sal o cristal de estos.

3. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1, que se selecciona de:

45



50

55

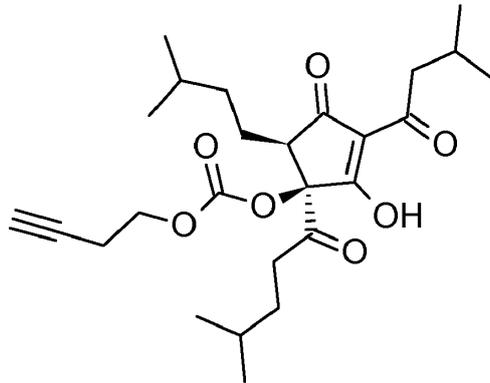
60

65

5

10

15



20

una sal o cristal de estos.

25

30

4. Una composición sustancialmente enantioméricamente pura que comprende un compuesto o sal o cristal de cualquier reivindicación precedente.
5. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición de conformidad con la reivindicación 4 para su uso en la prevención o tratamiento de la inflamación o una afección asociada con la inflamación.
6. Un compuesto o una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición de conformidad con la reivindicación 4 para el uso en la prevención o tratamiento de diabetes, obesidad, hiperinsulinemia, síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, un trastorno autoinmunitario, o un trastorno proliferativo.