

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 567**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137	(2006.01)	C07D 231/10	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61K 31/341	(2006.01)	C07D 231/12	(2006.01)		
A61K 31/381	(2006.01)	C07D 333/20	(2006.01)		
A61K 31/402	(2006.01)	C07D 413/12	(2006.01)		
A61K 31/4155	(2006.01)	C07D 471/04	(2006.01)		
A61K 31/427	(2006.01)	C07D 471/10	(2006.01)		
A61K 31/4418	(2006.01)	A61P 3/10	(2006.01)		
A61K 31/506	(2006.01)	A61P 11/06	(2006.01)		
A61K 31/5375	(2006.01)	A61P 19/00	(2006.01)		
C07D 213/36	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/US2013/030995**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13184202**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13800256 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2858975**

54 Título: **Inhibidores de FBXO3**

30 Prioridad:

08.06.2012 US 201261657423 P

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

10.12.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION (50.0%)
1st Floor Gardner Steel Conference Center, 130 Thackeray Avenue
Pittsburgh, PA 15260, US y
THE UNITED STATES GOVERNMENT AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS (50.0%)

72 Inventor/es:

CHEN, BEIBEI y MALLAMPALLI, RAMA, K.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 734 567 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

Inhibidores de FBXO3

Antecedentes

5 Los trastornos inflamatorios subyacen a numerosas enfermedades humanas caracterizadas por un sistema inmune altamente activado que conduce a la secreción de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias en circulación después de la infección con patógenos virulentos, en respuesta a la lesión de la célula huésped, o irritantes relacionados que activan los receptores en células efectoras inmunitarias. (células T, macrófagos, etc.). Por ejemplo, la sepsis ocasiona más de 500.000 muertes en los EE. UU. cada año y la neumonía es la causa principal de muerte por infecciones. Además, las enfermedades no infecciosas (colitis, artritis) también pueden involucrar a las citoquinas como mediadores principales de la patogénesis de la enfermedad. Una característica central de estos trastornos infecciosos es el estallido en la liberación de citoquinas, es decir, la tormenta de citoquinas, de células proinflamatorias que incluyen macrófagos, linfocitos y PMN. Bajo muchas condiciones, la tormenta de citoquinas es exagerada (hipercitoquinemia) y produce una reacción inmune fatal con activación constante de las células efectoras inmunes que producen niveles sostenidos y suprafisiológicos de citoquinas, incluyendo TNF α , IL- β e IL-6 que conducen a una lesión profunda del tejido. Si no se controla, esta cascada inflamatoria profunda puede tener consecuencias devastadoras para el huésped.

10 Los esfuerzos previos para bloquear la tormenta de citoquinas se han centrado en el uso de corticosteroides sistémicos o el desarrollo de agentes antiinflamatorios dirigidos a citoquinas específicas, por ejemplo, TNF α e IL-1 β que no han mejorado la mortalidad en la sepsis. Otros enfoques que se centran en la inhibición de los receptores de superficie en secuencia arriba dentro de las células T (por ejemplo, el receptor TLR4) no han sido concluyentes y los agentes similares no han tenido éxito en los ensayos clínicos de fase 3. Muchos de estos enfoques están limitados porque solo se selecciona un objetivo (un receptor o citoquina) para la inhibición; sin embargo, la inflamación sistemática y la sepsis son trastornos intrincados por los cuales se liberan multitud de mediadores inflamatorios a partir de la activación de múltiples receptores. Los agentes que se dirigen contra un único objetivo molecular no pueden impedir las actividades de otras citoquinas proinflamatorias durante la respuesta inflamatoria del huésped. Estas observaciones subrayan la importancia de identificar nuevos objetivos para la intervención que puedan regir la síntesis y secreción de una gama más amplia de biomoléculas proinflamatorias. Además, el pilar de las terapias para la sepsis son los agentes antimicrobianos que no proporcionan protección total y están limitados debido a las toxicidades concomitantes y la rápida aparición de resistencia a múltiples fármacos. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevas terapias antiinflamatorias de moléculas pequeñas con nuevos objetivos podría tener un impacto profundo en la gravedad de las enfermedades inflamatorias como la sepsis.

15 Los factores asociados al receptor del TNF (TRAF) son una familia de proteínas implicadas principalmente en la regulación de la inflamación, las respuestas antivirales y la apoptosis. Existen seis proteínas TRAF bien caracterizadas (TRAF1-6) y recientemente se identificó un TRAF7 homólogo más nuevo. Todos los miembros de TRAF comparten un dominio Extremo terminal C altamente conservado que media las interacciones con los receptores del TNF transmembrana. La identificación de las proteínas TRAF ha contribuido significativamente a la elucidación de los mecanismos moleculares de la transducción de señales que emanan de la superfamilia TNFR y de la familia del receptor similar a Toll /de interleuquina-1 (TLR/IL-1R). Las proteínas de la familia TRAF interactúan con el receptor de IL-1, los TLR, CD40, RANK, I-TAC, el receptor de NGF p75, etc. Específicamente, TRAF₂, TRAF5 y TRAF6 sirven como proteínas adaptadoras que enlazan los receptores de la superficie celular con las cascadas de quinasa más adelante, que a su vez, activa factores claves de transcripción, tales como el factor nuclear κ B (NF κ B), que resulta en la expresión del gen de citoquinas. Con una respuesta inmune exagerada, la liberación de citoquinas mediada por TRAF conduce a efectos profundos de edema, fallo multiorgánico y conmoción. Las proteínas TRAF, sin embargo, tienen un papel central ya que median la transducción de señales para provocar la activación transcripcional de varias citoquinas más adelante. Estos hallazgos sugieren que las maniobras diseñadas para modular selectivamente la abundancia de proteínas TRAF podrían servir como una estrategia novedosa para la intervención terapéutica. Sin embargo, hasta la fecha, se sabe muy poco sobre la regulación molecular de la familia TRAF en el nivel de estabilidad de la proteína. Las estrategias dirigidas a la modulación de las concentraciones de proteína TRAF en las células podrían servir como base para el diseño de una nueva clase de agentes antiinflamatorios.

20 La ubiquitinación de proteínas las marca para degradación, ya sea por el proteasoma o por medio del lisosoma, y regula diversos procesos. La conjugación de ubiquitina a una proteína objetivo está orquestada por una serie de reacciones enzimáticas que involucran una enzima de activación de ubiquitina E1, la transferencia de ubiquitina de una enzima de activación E1 a una enzima de conjugación E2 y, por último, la generación de un enlace isopeptídico entre la ϵ -amino lisina del el sustrato y el Extremo terminal C de la ubiquitina catalizada por una ubiquitina ligasa E3. De las muchas ligasas E3, la superfamilia de la caja Skp-Culina1-F (SCF) se encuentra entre las más estudiadas. El complejo SCF tiene un complejo de núcleo catalítico que consiste en Skp1, Culina1 y la enzima de conjugación de ubiquitina E2 (Ubc). El complejo SCF también contiene una subunidad receptora, denominada proteína de caja F, que se dirige a cientos de sustratos a través de las interacciones del dominio fosfoespecífico. Las proteínas de la caja F tienen dos dominios: un motivo de la caja F en el extremo terminal NH₂ y un motivo de repetición rico en leucina en el extremo terminal C (LRR) o un motivo de repetición WD. El complejo SCF utiliza el motivo de la caja F para unirse a Skp1, mientras que el motivo de repetición rico en leucina/WD se usa para reconocimiento del sustrato.

25 Chen et al ("Calmodulin Antagonizes a Calcium-Activated SCF Ubiquitin E3 Ligase Subunit, FBXL2, To Regulate

Surfactant Homeostasis", *Molecular and Cellular Biology*, vol. 31, 1905-1920) describe la calmodulina como una proteína universal que detecta calcio que tiene efectos pleiotrópicos. Los autores muestran que la calmodulina inhibe un nuevo componente de la ligasa E3 de SCF (Skp1-Culina-Caja-F), FBXL2. Durante la infección por *Pseudomonas aeruginosa*, SCF (FBXL2) dirige a la enzima clave, CCTa, para su monoubiquitinación y degradación, reduciendo así la síntesis del componente indispensable de la membrana y el surfactante, la fosfatidilcolina. *P. aeruginosa* provoca la entrada de calcio y la activación dependiente de calcio de FBXL2 dentro del complejo de Golgi, donde se engancha a CCTa. FBXL2 a través de su extremo terminal C se une al motivo IQ de CCTa. La desactivación de FBXL2 aumenta los niveles de CCTa y la síntesis de fosfolípidos. La interacción molecular de FBXL2 con CCTa se opone a la calmodulina, que transita al complejo de Golgi, se une a FBXL2 (residuos 80 a 90) a través de su extremo terminal C, y compite con la ligasa para la ocupación dentro del motivo IQ. Estas observaciones se recapitulaban en modelos murinos de deficiencia de surfactante inducida por *P. aeruginosa*, donde la transferencia del gen de calmodulina redujo las acciones de FBXL2 al estabilizar el CCTa y disminuir la gravedad de la lesión inflamatoria pulmonar. Los resultados proporcionan un modelo único de competencia intermolecular regulada por calcio entre una subunidad de la ligasa E3 y un antagonista que es de importancia crítica para la neumonía y la homeostasis lipídica.

15 Resumen

Una realización descrita en este documento es un compuesto, o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 1.

Una descripción en el presente documento que no forma parte de la invención es un método para inhibir la liberación de citoquinas proinflamatorias en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un inhibidor de FBXO3.

20 Una descripción en el presente documento que no forma parte de la invención es un método para tratar un trastorno inflamatorio en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de FBXO3.

Una descripción en el presente documento que no forma parte de la invención es un método para inhibir la ubiquitinación y degradación inducidas por FBXO3 de FBXL2, que comprende poner en contacto tejidos o células que contienen FBXO3 con un compuesto de benzatrina, un diaminoalcano opcionalmente sustituido, una quinolina sustituida, hematoxilina, tetrametilenbis, naftacaina, ampicilina, o eliptina.

25 Una descripción en el presente documento que no forma parte de la invención es un método para inhibir el crecimiento bacteriano en un sujeto o una superficie de un objeto, que comprende administrar al sujeto o la superficie del objeto una cantidad eficaz de un inhibidor de FBXO3.

30 Una descripción en el presente documento que no forma parte de la invención es un método para inhibir una bioactividad de la proteína FBXO3, que comprende poner en contacto FBXO3 con un compuesto que interactúa con los residuos de aminoácidos Y308, N335, E341, T368 y S370 que están presentes en una cavidad del dominio ApaG de la proteína FBXO3.

35 Lo anterior se hará más evidente a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Figs. 1A-1E. FBXL2 se dirige a las TRAF para la poliubiquitinación.

40 Fig. 1A. Inmunotransferencia que muestra niveles de TRAF y proteínas de control negativo, después del plásmido de control (CON) o de la expresión del plásmido ectópico FBXL2. Fig. 1B. Las células se transfectaron con un plásmido FBXL2 inducible bajo control de doxiciclina exógena. Las células se trataron con doxiciclina varias veces, luego se recolectaron las células y se analizaron los lisados celulares para detectar FBXL2, TRAF y β -actina mediante inmunotransferencia. Fig. 1C. Se inmunoprecipitó FBXL2 endógeno seguido por inmunotransferencia de TRAF 1-6. Fig. 1D. Ensayos de ubiquitinación in vitro. Los componentes purificados del complejo SCF se incubaron con V5-TRAF individuales y el complemento completo de los componentes de la reacción de ubiquitinación (segundo carril de la izquierda) que muestran proteínas TRAF poliubiquitinadas. Fig. 1E. Se muestra la semivida de cada proteína TRAF con o sin sobreexpresión de FBXL2.

45 Las Figs. 2A-2D. FBXL2 está poliubiquitinado en el sitio de Lisina 201. Figs. 2A-C. Se diseñaron y clonaron varias mutaciones de eliminación (Figs. 2A, 2B) y puntuales (Fig. 2C) de FBXL2 en un vector pcDNA3.1D/V5-HIS (panel superior). Los plásmidos que codifican los mutantes FBXL2 se transfectaron en células, seguido por el tratamiento con MG132. Las células se recolectaron y los lisados celulares se analizaron en busca de V5-FBXL2 y β -actina mediante inmunotransferencia después de la exposición de las células al vehículo (abajo a la izquierda) o a MG132 (abajo a la derecha). Fig. 2D. Estudios de semivida de FBXL2 de tipo silvestre (WT) y FBXL2 K201R.

55 Figs. 3A-3K. FBXL2 se fosforila y se selecciona mediante el FBXO3 de la ligasa E3 de la de SCF en el residuo T404. Fig. 3A. Esquema de sitios de fosforilación potenciales dentro de FBXL2 (predicción de GPS2.1). Fig. 3B. El FBXL2 endógeno se inmunoprecipitó y se siguió mediante inmunotransferencia con fosfotreonina. Fig. 3C. FBXL2 endógeno se

inmunoprecipitó y fue seguido mediante inmunotransferencia por varias quinasas candidatas. Fig. 3D. FBXL2 endógeno se inmunoprecipitó y se siguió mediante inmunotransferencia con FBXO3. Fig. 3E. Ensayos de ubiquitinación in vitro. Los componentes del complejo SCFFBXO3 purificados se incubaron con V5-FBXL2 y el complemento completo de los componentes de la reacción de ubiquitinación (carril derecho) que muestra FBXL2 poliubiquitinado. Fig. 3F. Las células se transfectoron con los plásmidos mutantes con eliminación de FBXL2 marcado con his, seguido de la eliminación de his; la proteína FBXO3 unida a las perlas de cobalto se eluyó y luego se resolvió en SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia con FBXO3. Fig. 3G. Estudios de semivida de mutantes de eliminación del extremo terminal C de FBXL2 WT y FBXL2. Fig. 3H. Secuencia de consenso GSK3 β dentro de FBXL2. Fig. 3I. Las células se transfectoron con plásmidos que codifican mutantes puntuales T404A de V5-WT FBXL2 o V5-FBXL2, las células transfectadas se sometieron luego a inmunoprecipitación con anticuerpo V5 seguido de inmunotransferencia con fosfotreonina. Fig. 3J. Ensayos de ubiquitinación in vitro. Los componentes del complejo SCFFBXO3 purificados se incubaron con el mutante T404A de FBXL2 WT marcado con V5 o el FBXL2 y el complemento completo de los componentes de la reacción de ubiquitinación que muestran FBXL2 poliubiquitinado (segundo carril desde la izquierda). Fig. 3K. Modelo de FBXO3 que se dirige a FBXL2.

Figs. 4A-4F. FBXO3 contiene una mutación natural en V220. Fig. 4A. Análisis SNP de la proteína FBXL2 que indica una mutación V220I. Fig. 4B. El ADN genómico se extrajo por primera vez de células PBMC de veinte donantes sanos caucásicos, seguido de un genotipado SNP utilizando una sonda SNP TaqMan® con PCR en tiempo real. Fig. 4C. Tres muestras de células PBMC WT y tres células PBMC que contenían la mutación V220I heterocigótica se trataron con 2 μ g/mL de LPS durante 24 h antes de los ensayos de liberación de citoquinas utilizando una matriz de citoquinas humanas (R&D). Fig. 4D. Ensayos de ubiquitinación in vitro. Los componentes del complejo mutante SCFFBXO3 o SCFFBXO3V220I purificados se incubaron con V5-FBXL2 y el complemento completo de los componentes de la reacción de ubiquitinación que muestran niveles de FBXL2 poliubiquitinado. Fig. 4E. Las células se transfectoron con los plásmidos mutantes FBXO3 V5-WT o V5-FBXO3V220I, seguido de inmunotransferencia para las proteínas V5, FBXL2 y TRAF. Fig. 4F. Las células U937 se trataron con LPS durante 24 h adicionales antes de analizar la secreción de citoquina utilizando una matriz de citoquinas humanas (R&D).

Figs. 5A-5I. FBXO3V220I es un mutante de pérdida de función de FBXO3 in vivo. La transferencia del gen FBXO3 lentiviral aumenta la gravedad de la inflamación y lesión pulmonar inducida por *P. aeruginosa*. A los ratones C57BL/6J se les administró en forma intratraqueal (it) Lenti-LacZ, Lenti-FBXO3 o Lenti-FBXO3V220I (10^7 CFU/ratón) durante 120 h, y 4 ratones/grupo se inocularon con *P. aeruginosa* (PA103, 10^4 PFU/mouse) durante 24 h. Los ratones se monitorizaron en un FlexiVent para medir la mecánica pulmonar (Figs. 5A-5D). Los ratones se sacrificaron y los pulmones se lavaron con solución salina, se recogieron y luego se homogeneizaron; la proteína de lavado, los recuentos celulares y la secreción de citoquinas se determinaron en (Figs. 5E-5F, 5I). Fig. 5G. La tinción con H&E se realizó en muestras de pulmón en (Fig. 5A). Fig. 5H. Estudios de supervivencia de ratones administrados en forma it Se determinó PA103 (10^5 PFU/ratón, 7 ratones por grupo). Los ratones fueron monitoreados cuidadosamente con el tiempo; Los animales prematuros moribundos fueron inmediatamente sacrificados y registrados como fallecidos. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se generaron utilizando el software Prism.

Figs. 6A-6I. La desactivación de FBXO3 mejora la lesión pulmonar inducida por *Pseudomonas*.

La inactivación de FBXO3 lentiviral atenúa la gravedad de la inflamación y lesión pulmonar inducidas por *P. aeruginosa*. Se administró a ratones C57BL/6J en forma it lentivirus que codifica ARNhp de control (CON) o ARNhp de Lenti-FBXO3 (10^7 CFU/ratón) durante 120 h, y se inocularon 4 ratones/grupo con PA103 (10^4 PFU/ratón) durante 24 h. Los ratones se monitorizaron en FlexiVent para medir la mecánica pulmonar (Figs. 6A-6D). Los ratones se sacrificaron y los pulmones se lavaron con solución salina, se recogieron y se homogeneizaron. La proteína de lavado, los recuentos celulares y la secreción de citoquinas se midieron en (Figs. 6E, 6F, 6H). Fig. 6G. La tinción con H&E se realizó en muestras de pulmón en (Fig. 6A). Fig. 6I. Se realizó un estudio de supervivencia de ratones administrados en forma it con PA103 (10^5 PFU/ratón, 6 ratones por grupo). Los ratones fueron monitoreados cuidadosamente con el tiempo; los animales prematuros moribundos fueron inmediatamente sacrificados y registrados como fallecidos. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se generaron utilizando el software Prism.

Figs. 7A-7F. El análisis estructural de FBXO3 revela un dominio ApaG de tipo bacteriano.

Fig. 7A. Se diseñaron varios mutantes de eliminación de FBXO3 y se clonaron en un vector pcDNA3.1D/V5-HIS. Fig. 7B. Ensayos de ubiquitinación in vitro. Las proteínas FBXO3 de longitud completa (FL) SCFFBXO3 purificadas o truncadas se incubaron con V5-FBXL2 y el complemento completo de los componentes de la reacción de ubiquitinación muestran FBXL2 poliubiquitinado (segundo carril de la izquierda). Fig. 7C. Análisis estructural del dominio ApaG de FBXO3. Figs. 7D-7F. Estudio de acoplamiento del compuesto candidato, benzatina, que interactúa con el dominio ApaG de FBXO3.

Figs. 8A-8D. Generación de inhibidores de FBXO3 y análisis de acoplamiento.

Figs. 8A-8D. Tema general de la síntesis de análogos de benzatina. En resumen, los análogos de la benzatina objetivo se prepararon a partir de derivados de benzaldehído y derivados de diamina tales como etilendiamina. En general, los derivados de benzaldehído relevantes (0,02 moles) se agregaron a una solución de etilendiamina (0,01 mol, ~700 μ L) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se sometió a reflujo y se agitó durante 60 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se filtraron y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego

a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 moles) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente mediante evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de los derivados de benzatina se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo. Figs. 8B-8D. Estudios de estructura y acoplamiento del nuevo inhibidor de FBXO3, BC-1215.

Fig. 9. BC-1215 inhibe un amplio espectro de citoquinas del panel de Th1.

Las células PBMC (0,6 mL a razón de $1,5 \times 10^6$ /mL) se trataron con 2 μ g/mL de LPS durante 16 horas con BC-1215 a 10 μ g/mL. La liberación de citoquinas fue controlada por la matriz de citoquinas humanas (R&D Systems). Los resultados de la transferencia de puntos de la matriz de citoquinas se cuantificaron y se representaron gráficamente a continuación.

Figs. 10A-10E. BC-1215 inhibe FBXO3 y disminuye los niveles de proteína TRAF.

Fig. 10A. Las células PBMC se trataron con 2 μ g/mL de LPS en cada punto de tiempo antes de la inmunotransferencia para las proteínas indicadas. Fig. 10B. Ensayos de ubiquitinación in vitro. Los componentes del complejo SCFFBXO3 purificados se incubaron con V5-FBXL2 y el complemento completo de los componentes de la reacción de ubiquitinación con una mayor concentración de BC-1215, mostrando niveles reducidos de FBXL2 poliubiquitinado. Fig. 10C. Las células MLE también se trataron con BC-1215 a diferentes concentraciones durante 16 h. Las células se recogieron y se ensayaron por inmunotransferencia. Fig. 10D. Las células Hela se trataron con BC-1215 a diferentes concentraciones durante 24 h antes del análisis del ciclo celular (BD BioScience). Fig. 10E. Las células MLE se trataron con BC-1215 (10 μ g/mL) durante 24 h antes de analizar la actividad de COX-2 (Cayman).

Figs. 11. BC-1215 inhibe la liberación de citoquinas en un modelo de choque séptico por endotoxinas. BC-1215 se solubilizó en agua utilizando ácido acético en una proporción molar de 1:2; La solución madre de BC-1215 fue de 5 mg/mL. Los ratones C57BL6 se anestesiaron profundamente con ketamina (80-100 mg/kg por vía intraperitoneal (ip) y xilazina (10 mg/kg ip). Se administraron a los ratones 500 μ g, 100 μ g, 20 μ g, 4 μ g y 0,8 μ g de BC-1215 a través de una inyección intraperitoneal (ip). 10 minutos más tarde, a los ratones se les administraron 100 μ g de LPS (*E. coli*) a través de una inyección IP. 90 minutos más tarde, se sacrificaron los ratones; se recogió la sangre y se realizaron ensayos para IL1- β , IL-6 y TNF α . (n = 3/grupo de ratones a cada dosis).

Fig. 12. BC-1215 inhibe la liberación de citoquinas en un modelo de sepsis de ligadura y punción cecal (CLP). BC-1215 se solubilizó como anteriormente. Los ratones C57BL6 se anestesiaron profundamente con ketamina (80-100 mg/kg ip) y xilazina (10 mg/kg ip). Se administraron 100 μ g de BC-1215 a ratones mediante una inyección IP. 30 minutos más tarde, se realizó la CLP. 6 h más tarde, los ratones se sacrificaron; la sangre se recogió y se analizó para determinar los niveles de IL1- β , IL-6 y TNF α (n = 4-5 ratones/grupo, * p <0,05 frente a CLP)

Figs. 13A-13H. BC-1215 reduce la lesión pulmonar en la neumonía por *Pseudomonas*.

BC-1215 (100 μ g) se administró a ratones C57BL6 a través de una inyección IP, los ratones se retaron con *Pseudomonas* (cepa PA103, 10^4 CFU/ratón, it) durante 18 h adicionales. Los ratones se monitorizaron en un FlexiVent para medir la mecánica pulmonar (Figs. 13A-13D). Los ratones se sacrificaron y los pulmones se lavaron con solución salina, se recogieron y se homogeneizaron. La proteína de lavado, el recuento celular y la secreción de citoquinas se midieron en (Fig. 13E, 13F, 13H). Fig. 13G. La tinción con H&E se realizó en muestras de pulmón. (n = 4-6 ratones/grupo, * p <0,05 frente al vehículo).

Figs. 14A-14H. BC-1215 disminuye la gravedad de la neumonía por influenza H1N1. Figs. 14A-14D. Los ratones C57BL6 fueron retados con H1N1 (10^6 PFU/ratón, it) hasta 9 días. Para el tratamiento con BC-1215, se añadió una solución madre (5 mg/mL) al agua de bebida (que contiene 2% de sacarosa) hasta la concentración final de 30 μ g/mL. La mecánica pulmonar se midió el día 5 utilizando FlexiVent (Figs. 14A-14C). Fig. 14D. Estudio de supervivencia de ratones administrados it con H1N1 (10^5 PFU/ratón, 8 ratones/grupo). Los ratones fueron monitoreados cuidadosamente con el tiempo; los animales prematuros moribundos fueron inmediatamente sacrificados y registrados como fallecidos. Los ratones se sacrificaron y los pulmones se lavaron con solución salina, se recogieron y se homogeneizaron. La proteína de lavado y el recuento de células se midió en (Fig. 14E, 14F). Fig. 14G. Fotografía de pulmones de ratones tratados con vehículo o BC-1215. Fig. 14H. La tinción con H&E se realizó en muestras de pulmón. (n = 5-8 ratones/grupo, * p <0,05 frente a H1N1).

Figs. 15A-15C. BC-1215 reduce el edema de oreja inducido por TPA. Fig. 15A-15C. Los ratones C57BL6 se anestesiaron profundamente con ketamina (80-100 mg/kg ip) y xilazina (10 mg/kg ip). Se aplicaron 20 μ L de solución de etanol de BC-1215 en las orejas a razón de 8, 40, 200 μ g/oreja 30 min después de la administración de TPA (2 μ g/oreja). Las comparaciones incluyeron volúmenes iguales de etanol (control del vehículo). 18 h después de la administración de TPA, los ratones se sacrificaron; el grosor de la oreja se midió utilizando un micrómetro (Fig. 15B). También se tomaron de inmediato biopsias de punción de oreja, se pesaron y se graficaron (Fig. 15C).

Figs. 16A-16C. BC-1215 reduce el edema de pata inducida por carragenina. Figs. 16A-16C. Los ratones C57BL6 se anestesiaron profundamente con ketamina (80-100 mg/kg ip) y xilazina (10 mg/kg ip). Los ratones recibieron una administración subplantar de 25 μ L de solución salina o 25 μ L de carragenina (1% en solución salina), seguida de una

inyección IP de 100 µg de BC-1215 diariamente durante dos días. Los ratones fueron luego sacrificados; se midió el espesor y el volumen de la pata (Fig. 16B-16C). (n = 4 ratones/grupo, * p <0,05 frente al vehículo)

Figs. 17A-17D. BC-1215 reduce la inflamación del colon inducida por DSS. Figs. 17A-17C. Los ratones C57BL6 fueron alimentados con agua que contenía 3,5% de sulfato de dextrano sódico (DSS) hasta por cinco días. Los ratones se trataron con vehículo o con 100 µg de BC-1215 diariamente (mediante inyección IP). Los ratones fueron luego sacrificados; la longitud del colon se midió y graficó en (Fig. 17A). Los tejidos colónicos también se analizaron para detectar IL1β (Fig. 17B) y TNFα (Fig. 17C) mediante ELISA. (n = 4 ratones/grupo, * p <0,05 frente a DSS) Fig. 17D. La tinción con H&E se realizó en muestras de colon. (n = 4 ratones/grupo, * p <0,05 frente a DSS)

Fig. 18. Una nueva vía inflamatoria propuesta catalizada por FBXO3.

La infección o los trastornos autoinmunes pueden involucrar la siguiente vía: FBXO3- | FBXL2- | TRAF → producción de citoquinas → inflamación del tejido, lesión y edema. Específicamente, la inflamación local y sistémica está regulada en parte, por una vía única por la cual un componente de la ligasa E3 no reconocido previamente, FBXO3, desencadena la ubiquitinación y degradación de otra subunidad de la ligasa E3, FBXL2, lo que aumenta los niveles de proteínas TRAF que median la secreción de citoquinas de las células inflamatorias. En esencia, FBXL2 parece ser un inhibidor de retroalimentación de inflamación. Como los TRAF son elementos moleculares críticos para la expresión del gen de las citoquinas a través de NF-κ, la mutación o inhibición de FBXO3 evitará la inducción de las proteínas TRAF y suprimirá la producción de citoquinas. El FBXO3 sirve como un nuevo objetivo molecular como la pieza central de esta invención que ha conducido a la génesis de los inhibidores de la ligasa E3 de ubiquitina de la proteína de la caja F.

Fig. 19. Prueba de antibióticos de Kirby-Bauer. BC-1215 se probó en pruebas de sensibilidad a los antibióticos utilizando agar Mueller-Hinton. En resumen, se agregaron papeles de filtro de 6 mm que contenían diferentes cantidades de BC-1215 o gentamicina (control positivo) en el agar Mueller-Hinton previamente expuesto a *Staphylococcus aureus*. Las placas se incubaron a 37 grados durante 24 h. Los tamaños de las zonas se midieron y se marcaron con un círculo rojo que indicaba resultados positivos. Los datos sugieren que el BC-1215 puede inhibir el crecimiento bacteriano a través de la interacción con la proteína ApaG bacteriana.

Las Figs. 20A-20J son una tabla que representa compuestos de benzatina y resultados de ensayos. Las células PBMC (0,6 mL a $1,5 \times 10^6$ /mL) se trataron con 2 µg/mL de LPS durante 16 horas junto con cada compuesto a diferentes concentraciones. La liberación de citoquinas IL1β y TNFα se monitorizó mediante ELISA para calcular la IC50. Se trató el monocito U937 (0,6 mL a razón de $1,5 \times 10^6$ /mL) con cada compuesto a diferentes concentraciones durante 16 h. Luego, las células se tiñeron con azul tripano para diferenciar las células muertas y calcular la LD50. Índice terapéutico (TI) = LD50/IC50. Los compuestos marcados en rojo son objetivos de alto valor (IC50 baja, LD50 baja) y requieren más pruebas in vivo.

Figs. 21A-21E. BC-1261 reduce la inflamación pulmonar inducida por *P. aeruginosa*. BC-1261 se administró a ratones a través de una inyección IP, y los ratones fueron retados inmediatamente con *P. aeruginosa* (cepa PA103, $2,5 \times 10^4$ cfu/ratón, it) o sin (control, CON) durante 18 h adicionales. Los ratones se sacrificaron y los pulmones se lavaron con solución salina, se recogieron y luego se homogeneizaron. La proteína de lavado, los recuentos de células y la secreción de citoquinas se midieron en (A-C). D. Las células de lavado se procesaron con citosina y se tiñeron con May-Grunwald y Geimsa. E. La tinción con H&E se realizó en muestras de pulmón. Los datos representan n = 4 ratones/grupo, *P < 0,05 frente a PA103.

Figs. 22A-22C. BC-1261 reduce la inflamación pulmonar crónica inducida por el humo. Los ratones se expusieron al humo del cigarrillo durante 5 semanas antes de recibir en forma ip la inyección de BC1261 (100 µg), 18 h más tarde, los ratones se sacrificaron y los pulmones se lavaron con solución salina, se recogieron y se homogeneizaron. La proteína de lavado, los recuentos de células y la secreción de citoquinas se midieron en (A-C). Los datos representan n = 3 ratones/grupo, *P < 0,05 frente a con.

Figs. 23A-23D. BC-1261 reduce el edema de oreja inducido por TPA. Se aplicó una dosis diferente de BC-1261 a las orejas de los ratones a diferentes dosis 30 min después de la administración de TPA (2 µg/oreja). A. Las comparaciones aproximadas se hicieron con volúmenes iguales de etanol como control de vehículo (CON). Dieciocho horas después de la administración de TPA, los ratones se sacrificaron y se midió el grosor de la oreja con un micrómetro (B). También se tomó una muestra de autopsia para medir la actividad de la MPO (C) y calcular el edema de la oreja (D). Los datos representan n = 6 ratones/grupo, *P < 0,05 frente a TPA.

Figs. 24A-24D. BC-1261 reduce la inflamación colónica aguda inducida por DSS. A-D. Los ratones C57BL6 fueron alimentados con agua a voluntad que contenía 3,5% de sulfato de dextrano sódico (DSS) hasta por cinco días. Los ratones se trataron con vehículo (control [CON]) o BC-1261 (150 µg) diariamente (mediante una inyección IP), o se administró BC-1261 en agua potable a razón de 30 µg/mL (po). Los ratones se sacrificaron y se midió la longitud del colon y se graficó en (A-B). Los tejidos colónicos también se analizaron para TNFα (C) e IL6 (D). E. La tinción con H&E se realizó en secciones de colon. Los datos representan n = 4 ratones/grupo, *P < 0,05 frente a DSS y **P < 0,05 frente a con.

Figs. 25A-25J. BC-1261 reduce la inflamación crónica del colon inducida por DSS. A. Los ratones C57BL6 se alimentaron con agua a voluntad que contenía 2% de sulfato de dextrano sódico (DSS) durante seis días, luego se cambiaron a agua hasta tres ciclos. BC-1261 se administró en agua potable a razón de 30 µg/mL, comenzando en el día 7. Los ratones se

sacrificaron al final del experimento y se midió la longitud del colon y se representó gráficamente en (B-C). El índice de enfermedad se midió y se graficó en (D). Los niveles de citoquinas en suero se midieron en (E-F). También se analizaron las citoquinas de tejidos colónicos y la actividad de la MPO (GJ). Los datos representan n = 7 ratones/grupo, *P < 0,05 frente a con.

5 Figs. 26A-26C. Estudio de acoplamiento del compuesto BC-1234 con el dominio ApaG de FBXO3. A. Estructura de BC-1234. B. BC-1234 interactúa con los residuos Glu64 y Thr91 dentro del motivo ApaG de FBXO3. C. Las cinco poses del BC-1234 con las mejores puntuaciones de acoplamiento interactuando con el motivo ApaG de FBXO3. D. BC-1234 se probaron adicionalmente en MLE (células de epitelio murino). En resumen, las células MLE se trataron con BC-1234 a diferentes concentraciones durante 16 h. Las células se recogieron y ensayaron para determinar la inmunotransferencia de Aurora B, ciclina D3, FBXL2 y FBXO3.

10 Figs. 27A-27G. BC-1258 Induce la detención de G2/M y la apoptosis en células cancerosas. A. PBMC de 5 controles, sujetos con AML y ALL se cultivaron en medio RPMI durante 18 h. Luego se recogieron las células, se lisaron y se analizaron para determinar la inmunotransferencia de proteínas. B-D. Se trataron células de leucemia humana (células U937, K562 y THP1) con BC-1258 a diferentes concentraciones durante 16 h. Las células se recogieron y ensayaron para determinar la inmunotransferencia de Aurora B, ciclina D2, ciclina D3 y FBXL2. E-F. Las células MLE se trataron con BC-1258 a diferentes concentraciones durante 16 h, las células se procesaron mediante captación de BrdU y tinción con 7-AAD seguida del análisis del ciclo celular mediante FACS (E), los histogramas de ADN 2N, 4N y 8N se cuantificaron y se representaron gráficamente en (F). G. Cuantificación del análisis FACS que muestra los niveles de células MLE apoptóticas después del tratamiento con BC-1258 en cada punto temporal.

20 Figs. 28A-28I. BC-1258 suprime el crecimiento tumoral en xenoinjerto. A-E. Efecto de BC-1258 y otros compuestos sobre el crecimiento de los implantes de tumores U937 en ratones desnudos, n = 4 ratones/grupo con concentración de fármaco a razón de 30 µg/mL en el agua potable. El panel A mostró imágenes representativas de tamaños variables de xenoinjerto en tres ratones desnudos (flechas) después del tratamiento farmacológico. B. Mediciones del volumen del tumor a lo largo del tiempo (n = 4 ratones/grupo, *P < 0,05 frente a con). D. El tejido tumoral de C se pesó y se graficó (n = 4 ratones/grupo, *P < 0,05 frente a con). E. Se recogieron los tumores de tres controles y tres implantes U937 tratados con fármacos en ratones en el punto final y se analizaron las proteínas Aurora B, CaM y FBXL2 mediante inmunotransferencia. F-I. El suero de cada ratón se recogió en el punto final y se procesó para la creatinina, LDH, ALT y la actividad de la creatina quinasa.

Fig. 29. Motivo de unión al fármaco ApaG.

Fig. 30. Interacción de FBXO3-ApaG con los compuestos BC-1261 y BC-1234.

30 Fig. 31. Interacción de FBXO3-ApaG con el compuesto BC-1304.

Fig. 32. Interacción de FBXO3-ApaG con el compuesto BC-1305.

Fig. 33. Interacción de FBXO3-ApaG con el compuesto BC-1305 (posición secundaria).

Fig. 34. Interacción de FBXO3-ApaG con el compuesto BC-1306.

Fig. 35. Interacción de FBXO3-ApaG con el compuesto BC-1307.

35 Fig. 36. Interacción de FBXO3-ApaG con el compuesto BC-1308.

Fig. 37. Interacción de FBXO3-ApaG con el compuesto BC-1309.

Fig. 38. Tabla que resume la detección de toxicidad para los compuestos BC-1215 y BC-1261.

Listado de secuencias

40 La secuencia de aminoácidos enumerada en el listado de secuencias adjunta se muestra utilizando el código estándar de tres letras para los aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. El listado de secuencias se envía como un archivo de texto ASCII, creado el 11 de marzo de 2013, 4,47 KB, que se incorpora en el presente documento como referencia.

Descripción detallada

Terminología

45 Como se usa en este documento, los términos singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, como se usa en el presente documento, el término "comprende" significa "incluye".

Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente descripción, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Para facilitar la revisión de los diversos ejemplos de esta descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

- 5 "Acilo" se refiere a un grupo que tiene la estructura $-C(O)R$, en la que R puede ser, por ejemplo, opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. Los grupos "acilo inferior" son aquellos que contienen de uno a seis átomos de carbono.
- "Aciloxi" se refiere a un grupo que tiene la estructura $-OC(O)R-$, en la que R puede ser, por ejemplo, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. Los grupos de "aciloxi inferior" contienen de uno a seis átomos de carbono.
- 10 La "administración" tal como se usa en el presente documento incluye la administración por parte de otra persona al sujeto o la autoadministración por parte del sujeto.
- El término "alifático" se define como que incluye grupos alquilo, alqueno, alquino, alquilo halogenado y cicloalquilo. Un grupo "alifático inferior" es un grupo alifático ramificado o no ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.
- "Alcanodiilo", "cicloalcanodiilo", "arildiilo", "alcanoarildiilo" se refieren a un radical divalente derivado de hidrocarburos alifáticos, cicloalifáticos, arilo y alcanoarilo.
- 15 "Alqueno" se refiere a un grupo de cadena lineal, ramificada o cíclica que contiene solo carbono e hidrógeno, y contiene uno o más enlaces dobles que pueden o no estar conjugados. Los grupos alqueno pueden estar no sustituidos o sustituidos. Los grupos "alqueno inferior" contienen de uno a seis átomos de carbono.
- El término "alcoxi" se refiere a una configuración de hidrocarburo lineal, ramificado o cíclico y combinaciones de los mismos, que incluyen de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 8 átomos de carbono (denominado "alcoxi inferior"), más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, que incluyen un átomo de oxígeno en el punto de unión. Un ejemplo de un "grupo alcoxi" está representado por la fórmula $-OR$, en la que R puede ser un grupo alquilo, opcionalmente sustituido con un grupo alqueno, alquino, arilo, aralquilo, cicloalquilo, alquilo halogenado, alcoxi o heterocicloalquilo. Los grupos alcoxi adecuados incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, i-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, ciclopropoxi, ciclohexiloxi y similares.
- 20 "Alcoxycarbonilo" se refiere a un radical carbonilo sustituido con alcoxi, $-C(O)OR$, en el que R representa un alquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo o una fracción similar opcionalmente sustituida.
- El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. Un grupo "alquilo inferior" es un hidrocarburo ramificado o no ramificado saturado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo preferidos tienen de 1 a 4 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser "alquilos sustituidos" en los que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos con un sustituyente tal como halógeno, cicloalquilo, alcoxi, amino, hidroxilo, arilo, alqueno o carboxilo. Por ejemplo, un alquilo inferior o alquilo (C1-C6) puede ser metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, pentilo, 3-pentilo o hexilo; cicloalquilo (C3-C6) puede ser ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo; el cicloalquil (C3-C6) alquilo (C1-C6) puede ser ciclopropilmetilo, ciclobutilmetilo, ciclopentilmetilo, ciclohexilmetilo, 2-ciclopropiletilo, 2-ciclobutiletilo, 2-ciclopentiletilo o 2-ciclohexiletilo; el alcoxi (C1-C6) puede ser metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi, pentoxi, 3-pentoxi o hexiloxi; el alqueno (C2-C6) puede ser vinilo, alilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo o 5-hexenilo; el alquino (C2-C6) puede ser etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo o 5-hexinilo; el alcanoilo (C1-C6) puede ser acetilo, propanoilo o butanoilo; el haloalquilo (C1-C6) puede ser yodometilo, bromometilo, clorometilo, fluorometilo, trifluorometilo, 2-cloroetilo, 2-fluoroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo o pentafluoroetilo; el hidroxi-alquilo (C1-C6) puede ser hidroximetilo, 1-hidroxietilo, 2-hidroxietilo, 1-hidroxipropilo, 2-hidroxipropilo, 3-hidroxipropilo, 1-hidroxibutilo, 4-hidroxibutilo, 1-hidroxipentilo, 5-hidroxipentilo, 1-hidroxihexilo, o 6-hidroxihexilo; el alcoxycarbonilo (C1-C6) puede ser metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, propoxycarbonilo, isopropoxycarbonilo, butoxycarbonilo, pentoxycarbonilo o hexiloxycarbonilo; el alquiltio (C1-C6) puede ser metiltio, etiltio, propiltio, isopropiltio, butiltio, isobutiltio, pentiltio o hexiltio; El alcanoiloxi (C2-C6) puede ser acetoxi, propanoiloxi, butanoiloxi, isobutanoiloxi, pentanoiloxi o hexanoiloxi.
- 30 "Alquino" se refiere a un grupo de cadena lineal, ramificada o cíclica que contiene solo carbono e hidrógeno, y contiene uno o más enlaces triples. Los grupos alquino pueden estar no sustituidos o sustituidos. Los grupos "alquino inferior" son aquellos que contienen de uno a seis átomos de carbono.
- El término "amina" o "amino" se refiere a un grupo de la fórmula $-NRR'$, en la que R y R' pueden ser, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo, aralquilo, cicloalquilo, alquilo halogenado, o heterocicloalquilo. Por ejemplo, un "alquilamino" o "amino alquilado" se refiere a $-NRR'$, en el que al menos uno de R o R' es un alquilo.
- 35 "Aminocarbonilo" solo o en combinación, significa un radical carbonilo sustituido con amino (carbamoilo), en el que el radical amino puede estar opcionalmente mono o disustituido, tal como con alquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, alcanoilo, alcoxycarbonilo, aralcoxycarbonilo y similares. Un grupo aminocarbonilo puede ser $-N(R)C$

(O)-R (en el que R es un grupo sustituido o H). Un grupo aminocarbonilo adecuado es acetamido.

El término "amida" o "amido" está representado por la fórmula $-C(O)NRR'$, donde R y R' pueden ser independientemente un hidrógeno, un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo, aralquilo, cicloalquilo, alquilo halogenado, o heterocicloalquilo descrito anteriormente.

5 Un "análogo" es una molécula que se diferencia en la estructura química de un compuesto original, por ejemplo, un homólogo (que se diferencia en un incremento en la estructura química o masa, tal como una diferencia en la longitud de una cadena de alquilo o la inclusión de uno o más isótopos), un fragmento molecular, una estructura que difiere en uno o más grupos funcionales, o un cambio en ionización. Un análogo no necesariamente se sintetiza a partir del compuesto original. Un derivado es una molécula derivada de la estructura base.

10 Un "animal" se refiere a organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye tanto mamíferos humanos como no humanos. De manera similar, el término "sujeto" incluye tanto seres humanos como no humanos, incluidos aves y mamíferos no humanos, tales como primates no humanos, animales de compañía (tales como perros y gatos), ganado (tal como cerdos, ovejas, vacas), así como animales no domesticados, tales como los grandes felinos. El término sujeto se aplica independientemente de la etapa en el ciclo de vida del organismo. Por lo tanto, el término sujeto se aplica a un organismo en el útero o en el huevo, dependiendo del organismo (es decir, si el organismo es un mamífero o un ave, tal como un ave doméstica o salvaje).

15 "Ariolo" se refiere a un grupo carbocíclico aromático insaturado monovalente que tiene un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, naftilo o antrilo), que pueden estar opcionalmente no sustituidos o sustituidos. Un "grupo heteroarilo" se define como un grupo aromático que tiene al menos un heteroátomo incorporado dentro del anillo del grupo aromático. Los ejemplos de heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. El heteroarilo incluye, pero no se limita a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo y similares. El grupo arilo o heteroarilo puede estar sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alquino, alqueno, arilo, haluro, nitro, amino, éster, cetona, aldehído, hidroxilo, ácido carboxílico o alcoxi, o el grupo arilo o heteroarilo puede estar no sustituido.

20 "Ariolo" se refiere a un grupo carbocíclico aromático insaturado monovalente que tiene un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, naftilo o antrilo), que pueden estar opcionalmente no sustituidos o sustituidos. Un "grupo heteroarilo" se define como un grupo aromático que tiene al menos un heteroátomo incorporado dentro del anillo del grupo aromático. Los ejemplos de heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. El heteroarilo incluye, pero no se limita a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo y similares. El grupo arilo o heteroarilo puede estar sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alquino, alqueno, arilo, haluro, nitro, amino, éster, cetona, aldehído, hidroxilo, ácido carboxílico o alcoxi, o el grupo arilo o heteroarilo puede estar no sustituido.

25 El término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo arilo está sustituido por un hidrógeno del grupo alquilo. Un ejemplo de un grupo aralquilo es un grupo bencilo.

"Arioxi" o "heteroarioxo" se refiere a un grupo de la fórmula $-OAr$, en la que Ar es un grupo arilo o un grupo heteroarilo, respectivamente.

30 Las coordenadas atómicas o coordenadas de estructura se refieren a coordenadas matemáticas derivadas de ecuaciones matemáticas relacionadas con los patrones obtenidos en la difracción de un haz monocromático de rayos X por los átomos (centros de dispersión) tales como una proteína. En algunos ejemplos, esa proteína puede ser proteína FBXO3 en un cristal. Los datos de difracción se utilizan para calcular un mapa de densidad electrónica de la unidad de repetición del cristal. Los mapas de densidad de electrones se utilizan para establecer las posiciones de los átomos individuales dentro de la celda unitaria del cristal. En un ejemplo, el término "coordenadas de la estructura" se refiere a las coordenadas cartesianas derivadas de las ecuaciones matemáticas relacionadas con los patrones obtenidos en la difracción de un haz monocromático de rayos X, tal como los átomos de una proteína FBXO3 en forma de cristal. Los expertos en la técnica entienden que un conjunto de coordenadas de estructura determinadas por cristalografía de rayos X no está exenta de error estándar. Para el propósito de esta descripción, cualquier conjunto de coordenadas de estructura que tenga una desviación cuadrática media de los átomos de la cadena principal de la proteína (N, C α , C y O) de menos de aproximadamente 1.0 Angstrom cuando se superponen, como aproximadamente 0.75, o aproximadamente 0.5, o aproximadamente de 0,25 Angstroms, utilizando átomos de la cadena principal, deben (en ausencia de una declaración explícita en contrario) considerarse idénticos.

35 El término "coordenadas de la estructura" se refiere a las coordenadas cartesianas derivadas de las ecuaciones matemáticas relacionadas con los patrones obtenidos en la difracción de un haz monocromático de rayos X, tal como los átomos de una proteína FBXO3 en forma de cristal. Los expertos en la técnica entienden que un conjunto de coordenadas de estructura determinadas por cristalografía de rayos X no está exenta de error estándar. Para el propósito de esta descripción, cualquier conjunto de coordenadas de estructura que tenga una desviación cuadrática media de los átomos de la cadena principal de la proteína (N, C α , C y O) de menos de aproximadamente 1.0 Angstrom cuando se superponen, como aproximadamente 0.75, o aproximadamente 0.5, o aproximadamente de 0,25 Angstroms, utilizando átomos de la cadena principal, deben (en ausencia de una declaración explícita en contrario) considerarse idénticos.

40 El término "carboxilato" o "carboxilo" se refiere al grupo $-COO^-$ o $-COOH$.

45 El término "coadministración" o "administración conjunta" se refiere a la administración de un inhibidor de FBXO3 con al menos otro agente terapéutico dentro del mismo período de tiempo general, y no requiere la administración en el mismo momento exacto (aunque la coadministración conjunta incluye la administración en el mismo momento exacto en el tiempo). Por lo tanto, la administración conjunta puede ser el mismo día o en días diferentes, o en la misma semana o en semanas diferentes. El agente terapéutico adicional puede incluirse en la misma composición que el inhibidor de FBXO3.

50 El término "cicloalquilo" se refiere a un anillo basado en carbono no aromático compuesto por al menos tres átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. El término "grupo heterocicloalquilo" es un grupo cicloalquilo como se definió anteriormente, en el que al menos uno de los átomos de carbono del anillo está sustituido con un heteroátomo tal como, pero no se limita a, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo.

55 El término "éster" se refiere a un grupo carboxilo que tiene el hidrógeno reemplazado con, por ejemplo, un grupo alquilo C $_{1-6}$ ("alquil-carboxil-alquilo C $_{1-6}$ " o "alquiléster"), un grupo arilo o aralquilo ("ariléster" o "arilalquilester") y así sucesivamente. Se prefieren los grupos CO $_2$ -alquilo C1-C3, tales como, por ejemplo, metiléster (CO $_2$ Me), etiléster (CO $_2$ Et)

y propiléster (CO₂Pr) e incluyen sus ésteres inversos (por ejemplo, -OCOMe, -OCOEt y -OCOPr).

El término "halógeno" se refiere a los sustituyentes flúor, bromo, cloro y yodo.

Los términos "alquilo halogenado" o "grupo haloalquilo" se refieren a un grupo alquilo como se definió anteriormente con uno o más átomos de hidrógeno presentes en estos grupos sustituidos con un halógeno (F, Cl, Br, I).

5 El término "hidroxilo" está representado por la fórmula -OH.

"Inhibición" se refiere a la inhibición del desarrollo completo de una enfermedad o afección. "Inhibición" también se refiere a cualquier reducción cuantitativa o cualitativa en la actividad o la unión biológica, en relación con un control.

10 "N-heterocíclico" o "N-heterociclo" se refiere a anillos o sistemas de anillo mono o bicíclicos que incluyen al menos un heteroátomo de nitrógeno. Los anillos o sistemas de anillos generalmente incluyen de 1 a 9 átomos de carbono además del o los heteroátomos y pueden ser saturados, insaturados o aromáticos (incluyendo pseudoaromáticos). El término "pseudoaromático" se refiere a un sistema de anillos que no es estrictamente aromático, pero que se estabiliza por medio de la deslocalización de electrones y se comporta de manera similar a los anillos aromáticos. Aromático incluye sistemas de anillos pseudoaromáticos, tales como anillos de pirrolilo.

15 Los ejemplos de N-heterociclos monocíclicos de 5 miembros incluyen pirrolilo, H-pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, oxazolilo, oxadiazolilo (incluyendo 1,2,3 y 1,2,4-oxadiazolilos), isoxazolilo, furazanilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, triazolilo (incluyendo 1,2,3 y 1,3,4-triazolilos), tetrazolilo, tiadiazolilo (incluyendo 1,2,3 y 1,3,4-tiadiazolilos) y ditiazolilo. Los ejemplos de N-heterociclos monocíclicos de 6 miembros incluyen piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piperazinilo y triazinilo. Los heterociclos pueden estar opcionalmente sustituidos con una amplia gama de sustituyentes, y preferiblemente con alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, halo, hidroxi, mercapto, trifluorometilo, amino, ciano o mono o di(alquil C₁₋₆) amino. El grupo N-heterocíclico se puede fusionar a un anillo carbocíclico tal como fenilo, naftilo, indenilo, azuleno, fluorenilo y antraceno.

20 Los ejemplos de heterociclos bicíclicos de 8, 9 y 10 miembros incluyen 1H-tieno[2,3-c]pirazolilo, indolilo, isoindolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzisoxazolilo, benzimidazolilo, indazolilo, isoquinolinilo, quinolinilo, quinoxalinilo, purinilo, cinolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, benzotriazinilo, y similares. Estos heterociclos pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo con alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, halo, hidroxi, mercapto, trifluorometilo, amino, ciano o mono o di(alquil C₁₋₆)amino. A menos que se defina lo contrario, los N-heterocíclicos opcionalmente sustituidos incluyen sales de piridinio y la forma N-óxido de nitrógenos en el anillo adecuados.

"Nitro" se refiere a un grupo R que tiene la estructura -NO₂.

30 Un "grupo R" o "sustituyente" se refiere a un solo átomo (por ejemplo, un átomo de halógeno) o un grupo de dos o más átomos que están covalentemente unidos entre sí, que están covalentemente unidos a un átomo o átomos en una molécula para satisfacer los requisitos de valencia del átomo o átomos de la molécula, típicamente en lugar de un átomo de hidrógeno. Los ejemplos de grupos R/sustituyentes incluyen grupos alquilo, grupos hidroxilo, grupos alcoxi, grupos aciloxi, grupos mercapto y grupos arilo.

35 El término "sujeto" incluye tanto sujetos humanos y no humanos, incluyendo aves y mamíferos no humanos, tales como primates no humanos, animales de compañía (tales como perros y gatos), ganado (tales como cerdos, ovejas, vacas), así como animales no domesticados, tales como los grandes felinos. El término sujeto se aplica independientemente de la etapa en el ciclo de vida del organismo. Por lo tanto, el término sujeto se aplica a un organismo en el útero o en el huevo, dependiendo del organismo (es decir, si el organismo es un mamífero o un ave, tal como un ave doméstica o salvaje).

40 "Sustituido" o "sustitución" se refieren al reemplazo de un átomo de hidrógeno de una molécula o un grupo R con uno o más grupos R adicionales. A menos que se defina lo contrario, el término "opcionalmente sustituido" u "sustituyente opcional", como se usa en este documento, se refiere a un grupo que puede o no estar más sustituido con 1, 2, 3, 4 o más grupos, preferiblemente 1, 2 o 3, más preferiblemente 1 o 2 grupos. Los sustituyentes pueden seleccionarse, por ejemplo, entre alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₈, hidroxilo, oxo, alcoxi C₁₋₆, ariloxi, alcoxi C₁₋₆, arilo, halo, alquil C₁₋₆-halo (tal como C_{F3} y CH_{F2}), alcoxi C₁₋₆-halo (tal como OC_{F3} y OCH_{F2}), carboxilo, ésteres, ciano, nitro, amino, amino sustituido, amino disustituido, acilo, cetonas, amidas, aminoacilo, amidas sustituidas, amidas disustituidas, tiol, alquiltio, tioxo, sulfatos, sulfonatos, sulfonilo, sulfonilo sustituido, sulfonilo sustituido, sulfonilamidas, sulfonamidas sustituidas, sulfonamidas disustituidas, arilo, aralquilo C₁₋₆, heterociclilo y heteroarilo, en los que cada alquilo y alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo y heterociclilo, grupos que los contienen pueden estar además opcionalmente sustituidos. Los sustituyentes opcionales en el caso de N-heterociclos también pueden incluir, pero no se limitan a, alquilo C₁₋₆, es decir, N- alquilo C₁₋₃, más preferiblemente metilo, particularmente N-metilo.

55 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente especificado suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado con ese agente. Por ejemplo, una cantidad terapéutica puede ser una cantidad de un inhibidor de FBXO3 que es suficiente para inhibir la inflamación en un sujeto. Idealmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente es una cantidad suficiente para inhibir o tratar la enfermedad o afección sin causar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto. La cantidad terapéuticamente eficaz de un agente dependerá del sujeto que

se trate, la gravedad de la afección y la forma de administración de la composición terapéutica.

"Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o condición patológica una vez que ha comenzado a desarrollarse. Como se usa en el presente documento, el término "mejorar", con referencia a una enfermedad o afección patológica, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento.

5 El efecto beneficioso se puede evidenciar, por ejemplo, por un inicio tardío de los síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto susceptible, una reducción en la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, una progresión más lenta de la enfermedad, una mejora en la salud general o el bienestar del sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos de la enfermedad particular. La frase "tratar una enfermedad" se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad, por ejemplo, en un sujeto que está en riesgo de contraer una enfermedad como el cáncer. "Prevenir" una enfermedad o afección se refiere a la administración profiláctica de una composición a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad o muestra solo signos tempranos con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología o afección, o disminuir la gravedad de una patología o condición. En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, el tratamiento inhibe la inflamación en un sujeto.

15 Las "composiciones farmacéuticas" son composiciones que incluyen una cantidad (por ejemplo, una dosis unitaria) de uno o más de los compuestos descritos junto con uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables no tóxicos, incluidos vehículos, diluyentes y/o adyuvantes, y opcionalmente otros ingredientes biológicamente activos. Dichas composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante técnicas de formulación farmacéutica estándar, tales como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA (decimonovena edición).

20 Los términos "sal o éster farmacéuticamente aceptable" se refieren a sales o ésteres preparados por medios convencionales que incluyen sales, por ejemplo, de ácidos inorgánicos y orgánicos, que incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido málico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fenilacético, ácido mandélico y similares. Las "sales farmacéuticamente aceptables" de los compuestos actualmente descritos también incluyen aquellas formadas a partir de cationes tales como sodio, potasio, aluminio, calcio, litio, magnesio, zinc y de bases tales como amoníaco, etilendiamina, N-metil-glutamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencilfenetilamina, dietilamina, piperazina, tris(hidroximetil)aminometano e hidróxido de tetrametilamonio. Estas sales pueden prepararse mediante procedimientos estándar, por ejemplo, haciendo reaccionar el ácido libre con una base orgánica o inorgánica adecuada. Cualquier compuesto químico mencionado en esta memoria descriptiva puede administrarse alternativamente como una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las "sales farmacéuticamente aceptables" también incluyen las formas libres de ácido, base y zwitteriónicas. Las descripciones de las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas se pueden encontrar en el Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use, Wiley VCH (2002). Cuando los compuestos descritos en el presente documento incluyen una función ácido tal como un grupo carboxilo, entonces los expertos en la técnica conocen bien los pares de cationes farmacéuticamente aceptables adecuados para el grupo carboxilo e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio, amonio cuaternario y similares. Tales sales son conocidas por los expertos en la técnica. Para ejemplos adicionales de "sales farmacológicamente aceptables", véase Berge et al., J. Pharm. Sci. 66: 1 (1977).

40 Los "ésteres farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellos derivados de compuestos descritos en el presente documento que se modifican para incluir un grupo carboxilo. Un éster hidrolizable in vivo es un éster, que se hidroliza en el cuerpo humano o animal para producir el ácido o alcohol parental. Los ésteres representativos incluyen ésteres de ácido carboxílico en los que la fracción no carbonilo de la porción de ácido carboxílico del grupo éster se selecciona de alquilo de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metilo, n-propilo, t-butilo o n-butilo), cicloalquilo, alcoxilquilo (por ejemplo, metoximetilo), aralquilo (por ejemplo, bencilo), ariloxialquilo (por ejemplo, fenoximetilo), arilo (por ejemplo, fenilo, opcionalmente sustituido con, por ejemplo, halógeno, alquilo C1-4 o alcoxi C1-4 o amino); ésteres de sulfonato, tales como alquil o aralquilsulfonilo (por ejemplo, metanosulfonilo); o ésteres de aminoácidos (por ejemplo, L-valilo o L-isoleucilo). Un "éster farmacéuticamente aceptable" también incluye ésteres inorgánicos tales como ésteres de mono, di o trifosfato. En tales ésteres, a menos que se especifique lo contrario, cualquier fracción alquilo presente contiene ventajosamente de 1 a 18 átomos de carbono, particularmente de 1 a 6 átomos de carbono, más particularmente de 1 a 4 átomos de carbono. Cualquier fracción cicloalquilo presente en tales ésteres contiene ventajosamente de 3 a 6 átomos de carbono. Cualquier fracción arilo presente en tales ésteres comprende ventajosamente un grupo fenilo, opcionalmente sustituido como se muestra en la definición de carboxiciclilo anterior. Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen, por lo tanto, ésteres de ácidos grasos C1-C₂₂, tales como acetilo, t-butilo o ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga o ramificada insaturados o ácidos grasos mono insaturados omega-6 tales como palmoil, estearoil y similares. Los ésteres arilo o heteroarilo alternativos incluyen benzoilo, piridilmetiloil, y similares, cualquiera de los cuales puede estar sustituido, como se definió en el carbociclilo anteriormente. Ésteres farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen ésteres de L-aminoácidos alifáticos tales como leucilo, isoleucilo y especialmente valilo.

55 Para uso terapéutico, las sales de los compuestos son aquellas en las que el contraión es farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden ser útiles, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

60 Las sales de adición de ácido y base farmacéuticamente aceptables, como se mencionó anteriormente, pretenden comprender las formas de sal de adición de ácido y base no tóxicas terapéuticamente activas cuyos compuestos son

capaces de formarse. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse convenientemente tratando la forma base con el ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos hidrohálicos, por ejemplo, ácido clorhídrico o bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es decir, ácido hidroxibutanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónicos, bencenosulfónico, p-toluensulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico y similares. Por el contrario, dichas formas de sal se pueden convertir por tratamiento con una base apropiada a la forma de base libre.

Los compuestos que contienen un protón ácido también se pueden convertir en sus formas de sal de adición de metal o amina no tóxicas por tratamiento con bases orgánicas e inorgánicas apropiadas. Las formas de sal de base apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, por ejemplo, las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, por ejemplo, la benzatina, la N-metil-D-glucamina, las sales de hidrabamina y las sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

El término "sal de adición", como se uso en el presente documento anteriormente, también comprende los solvatos que los compuestos descritos en este documento son capaces de formar. Tales solvatos son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares.

El término "amina cuaternaria" como se usa en el presente documento anteriormente define las sales de amonio cuaternario que los compuestos pueden formar por reacción entre un nitrógeno básico de un compuesto y un agente de cuaternización apropiado, tal como, por ejemplo, un haluro de alquilo, arilhaluro o arilalquilhaluro opcionalmente sustituidos, por ejemplo, yoduro de metilo o yoduro de bencilo. También se pueden usar otros reactivos con buenos grupos salientes, tales como trifluorometanosulfonatos de alquilo, metanosulfonatos de alquilo y p-toluenosulfonatos de alquilo. Una amina cuaternaria tiene un nitrógeno cargado positivamente. Los contraiones farmacéuticamente aceptables incluyen cloro, bromo, yodo, trifluoroacetato y acetato. El contraión de elección se puede introducir utilizando resinas de intercambio iónico.

Algunos de los compuestos descritos en el presente documento también pueden existir en su forma tautomérica.

Los profármacos de los compuestos descritos también se contemplan en el presente documento. Un profármaco es un compuesto activo o inactivo que se modifica químicamente a través de la acción fisiológica in vivo, tal como la hidrólisis, el metabolismo y similares, en un compuesto activo después de la administración del profármaco a un sujeto. El término "profármaco" tal como se usa en todo este texto significa los derivados farmacológicamente aceptables tales como ésteres, amidas y fosfatos, de modo que el producto de biotransformación in vivo resultante del derivado es el fármaco activo tal como se define en los compuestos descritos en este documento. Los profármacos preferiblemente tienen excelente solubilidad acuosa, mayor biodisponibilidad y se metabolizan fácilmente en los inhibidores activos in vivo. Los profármacos de un compuesto descrito en el presente documento pueden prepararse modificando los grupos funcionales presentes en el compuesto de tal manera que las modificaciones se escindan, ya sea mediante manipulación rutinaria o in vivo, al compuesto original. Los expertos en la técnica conocen bien la idoneidad y las técnicas implicadas en la fabricación y el uso de profármacos. Para una discusión general de profármacos que involucran ésteres, véase Svensson y Tunek, *Drug Metabolism Reviews* 165 (1988) y Bundgaard, *Design of Prodrugs*, Elsevier (1985).

El término "profármaco" también pretende incluir cualquier vehículo unido covalentemente que libere un fármaco original activo de la presente invención in vivo cuando el profármaco se administra a un sujeto. Dado que los profármacos a menudo tienen propiedades mejoradas en relación con el agente farmacéutico activo, tal como, la solubilidad y la biodisponibilidad, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse en forma de profármacos. Por lo tanto, también se contemplan los profármacos de los compuestos actualmente descritos, los métodos de administración de profármacos y las composiciones que contienen dichos profármacos. Los profármacos de los compuestos descritos típicamente se preparan modificando uno o más grupos funcionales presentes en el compuesto de tal manera que las modificaciones se escinden, ya sea en la manipulación rutinaria o in vivo, para producir el compuesto original. Los profármacos incluyen compuestos que tienen un grupo fosfonato y/o amino funcionalizado con cualquier grupo que se escinde in vivo para producir el correspondiente grupo amino y/o fosfonato, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, sin limitación, compuestos que tienen un grupo amino acilado y/o un grupo éster de fosfonato o amida de fosfonato. En ejemplos particulares, un profármaco es un éster de fosfonato de alquilo inferior, tal como un éster de fosfonato de isopropilo.

Los derivados protegidos de los compuestos descritos también se contemplan. Una variedad de grupos protectores adecuados para uso con los compuestos descritos se describen en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*; tercera ed.; John Wiley & Sons, Nueva York, 1999.

En general, los grupos protectores se eliminan en condiciones que no afectarán a la porción restante de la molécula. Estos métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen hidrólisis ácida, hidrogenólisis y similares. Un método preferido implica la eliminación de un éster, tal como la escisión de un éster de fosfonato usando condiciones ácidas de Lewis, tales como la escisión del éster mediada por TMS-Br para producir el fosfonato libre. Un segundo método preferido implica la eliminación de un grupo protector, tal como la eliminación de un grupo bencilo mediante hidrogenólisis utilizando paladio sobre carbono en un sistema disolvente adecuado tal como un alcohol, ácido acético y similares o mezclas de los mismos.

Un grupo basado en t-butoxi, que incluye grupos protectores de t-butoxicarbonilo, puede eliminarse utilizando un ácido orgánico o inorgánico, tal como HCl o ácido trifluoroacético, en un sistema disolvente adecuado, tal como agua, dioxano y/o cloruro de metileno. Otro ejemplo de grupo protector, adecuado para proteger las funciones amino e hidroxilo, es tritilo. Se conocen otros grupos protectores convencionales y los expertos en la técnica pueden seleccionar grupos protectores adecuados en consulta con Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*; 3ª ed.; John Wiley & Sons, Nueva York, 1999. Cuando una amina se desprotege, la sal resultante se puede neutralizar fácilmente para producir la amina libre. De manera similar, cuando se revela una fracción ácido, tal como una fracción de ácido fosfónico, el compuesto puede aislarse como el compuesto ácido o como una sal del mismo.

Los ejemplos particulares de los compuestos actualmente descritos incluyen uno o más centros asimétricos; por lo tanto, estos compuestos pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas. Por consiguiente, los compuestos y composiciones pueden proporcionarse como enantiómeros puros individuales o como mezclas estereoisoméricas, incluyendo mezclas racémicas. En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento se sintetizan o se purifican para estar en forma sustancialmente enantiopura, tal como en un exceso enantiomérico del 90%, un exceso enantiomérico del 95%, un exceso enantiomérico del 97% o incluso en un exceso enantiomérico mayor al 99%, tal como en forma enantiopura.

Los grupos que están sustituidos (por ejemplo, alquilo sustituido), en algunas realizaciones pueden estar sustituidos con un grupo que está sustituido (por ejemplo, arilo sustituido). En algunas realizaciones, el número de grupos sustituidos unidos entre sí está limitado a dos (por ejemplo, el alquilo sustituido está sustituido con arilo sustituido, en el que el sustituyente presente en el arilo no está sustituido). En algunas realizaciones, un grupo sustituido no está sustituido con otro grupo sustituido (por ejemplo, alquilo sustituido está sustituido con arilo no sustituido).

Descripción general

Se ha descubierto que los agentes patógenos activan una subunidad de la ligasa E3 de ubiquitina identificada relativamente recientemente, denominada FBXO3 (SEQ ID NO.1), que es suficiente para ubiquitinar y mediar la degradación proteasomal de otra subunidad de ligasa E3 de ubiquitina identificada relativamente recientemente, denominada FBXL2. Además, también se ha descubierto que FBXL2 actúa como una "interrupción" en la inflamación, al atacar la familia de proteínas TRAF para su eliminación en epitelios y monocitos. Por lo tanto, los patógenos, a través de la activación de FBXO3, dan como resultado la ubiquitinación y degradación de FBXL2 que resulta en un aumento de TRAF inmunorreactivas, un aumento en la producción de citoquinas y una estabilidad pulmonar alterada. Específicamente, los datos descritos en el presente documento muestran que i) FBXL2 se dirige a seis proteínas de la familia TRAF (TRAF1-6) para su ubiquitinación y degradación, (ii) FBXO3 se dirige específicamente a FBXL2 para su ubiquitinación y degradación, (iii) la glucógeno sintetasa quinasa (GSK3 β) fosforila FBXL2 sirviendo así como una nueva señal molecular para la ubiquitinación de FBXO3 de FBXL2, y (iv) comparado con FBXO3 de tipo silvestre (WT), la expresión de un mutante puntal FBXO3 de origen natural (FBXO3V220I) no logra estimular la producción de citoquinas después de la infección por *P. aeruginosa* y la expresión de FBXO3V220I disminuye la gravedad de la lesión pulmonar inflamatoria en modelos murinos de neumonía.

El descubrimiento de FBXO3 es de particular importancia ya que contiene una firma molecular de tipo bacteriano dentro de su estructura terciaria no detectada en proteínas de mamíferos. Este motivo, denominado ApaG, condujo al desarrollo descrito en la actualidad de un phylum altamente selectivo único de terapias de moléculas pequeñas que bloquean la actividad de FBXO3, reducen los niveles de TRAF a niveles nativos, inhiben profundamente la liberación de citoquinas de las células humanas y disminuyen la gravedad de la inflamación en modelos de animales sépticos. Se generó una serie de inhibidores de molécula pequeña de FBXO3 que, cuando se analizan, atenúan la secreción de citoquinas inducida por lipopolisacáridos (LPS) de células mononucleares de sangre periférica humana. En una realización, el inhibidor de FBXO3 BC-1215 inhibe la inflamación y previene el daño tisular en varios modelos animales.

En este documento se proporciona un nuevo modelo molecular de inmunidad innata en lo que se refiere a la señalización de citoquinas. Se han descubierto dos proteínas previamente mal caracterizadas (FBXO3, FBXL2) recientemente vinculadas a la respuesta de las citoquinas a través de la señalización de la proteína TRAF. Los estudios descritos en el presente documento son los primeros en dilucidar el comportamiento enzimático de FBXO3 que parece activar el eje de FBXL2-TRAF-citoquinas. Basados en el nuevo mecanismo no reconocido previamente de la actividad de FBXO3 en la vía inflamatoria de TRAF, los agentes descritos en este documento se dirigen a una firma molecular procariota única dentro de la proteína de la caja F. En el presente documento se describen compuestos de benzatina que sirven como inhibidores altamente selectivos de molécula pequeña de FBXO3, y que pueden ser útiles en la profilaxis y el tratamiento del choque séptico, la neumonía y otras afecciones inflamatorias.

Compuestos

En el presente documento se describen inhibidores de FBXO3. Los inhibidores ilustrativos de FBXO3 incluyen compuestos de benzatina, diaminoalcanos opcionalmente sustituidos (por ejemplo, 1,10-diaminodecano), quinolinas sustituidas (por ejemplo, quinidina, hidroxiclo-roquina, primaquina), hematoxilina, tetrametilénbis, naftacaina, ampicilina y eliptina y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El compuesto de benzatina puede ser benzatina o un análogo de benzatina. En ciertas realizaciones, el compuesto de

benzatina no es penicilina benzatina. En una descripción de la aplicación, el análogo de benzatina incluye una fracción central de diamina divalente, una primera fracción que contiene arilo en un primer extremo terminal de la fracción central de diamina divalente, y una segunda fracción que contiene arilo en un segundo extremo terminal de la fracción central de la diamina divalente. Cada uno de los grupo amino del grupo diamina puede ser individualmente -NH- o -NR-, en los que R es un grupo sustituido como se describió, tal como un alquilo, alcoxi, hidroxilo, acilo, aciloxi, alcocarbonilo, arilo, carboxilo o éster inferior. La fracción central de diamina divalente puede incluir un alcanodiilo opcionalmente sustituido, un cicloalcanodiilo opcionalmente sustituido, un arildiilo opcionalmente sustituido, o un alcanoarildiilo opcionalmente sustituido posicionado entre los dos grupos amino. En una descripción de la solicitud, los dos grupos amino de la diamina pueden, junto con los átomos de carbono, formar un grupo heteroarildiilo. Los grupos terminales que contienen arilo pueden ser cada uno individualmente un grupo aralquilo (preferiblemente un grupo bencilo) o un grupo N-heteroaralquilo tal como -alquil-pirazinilo, -alquil-pirimidinilo, -alquil-piridazinilo, o -alquil-piridinilo. El anillo arilo del grupo aralquilo puede estar sustituido con un grupo N-heterocíclico opcionalmente sustituido. En una descripción, el grupo N-heterocíclico opcionalmente sustituido está situado en una posición para del anillo con respecto al punto de unión del grupo aralquilo a la fracción central de diamina divalente.

Los análogos de benzatina ilustrativos incluyen benzatinas N-heterocíclico sustituidas opcionalmente sustituidas. En una descripción, los análogos de benzatina incluyen dos anillos de fenilo, en donde al menos uno, y preferiblemente ambos, de los anillos de fenilo están sustituidos con un grupo N-heterocíclico opcionalmente sustituido, cuyo N-heterocíclico opcionalmente sustituido puede ser el mismo o diferente. En una descripción, el grupo N-heterocíclico opcionalmente sustituido está localizado en una posición para en el anillo con respecto al punto de unión del anillo de fenilo al andamiaje molecular de benzatina.

Los grupos N-heterocíclicos ilustrativos incluyen, por ejemplo, pirrolilo, H-pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, oxazolilo, oxadiazolilo (incluyendo 1,2,3; 1,2,4; y 1,3,4-oxadiazolilos), isoxazolilo, furazanilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, triazolilo (incluyendo 1,2,3 y 1,3,4-triazolilos), tetrazolilo, tiadiazolilo (incluyendo 1,2,3 y 1,3,4-tiadiazolilos), ditiazolilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piperazinilo y triazinilo. Los grupos N-heterocíclicos particularmente preferidos incluyen imidazolilo, piridilo, pirazolilo, oxadiazolilo y pirimidinilo.

En la presente memoria se describen compuestos, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos, que tienen una estructura de fórmula II como se define en la reivindicación 1.

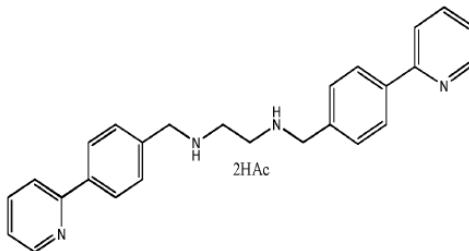
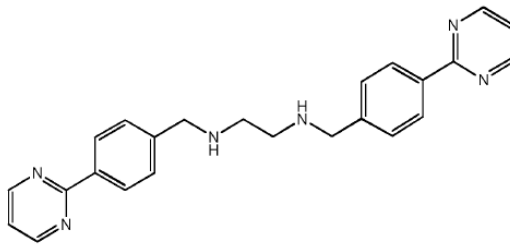
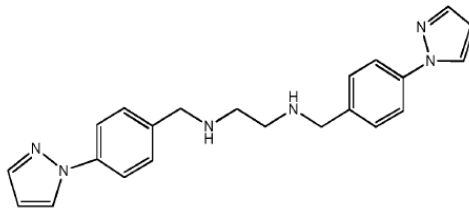
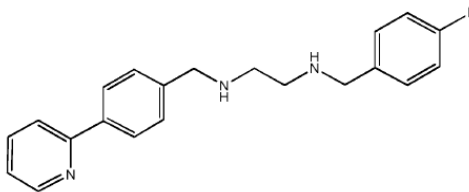
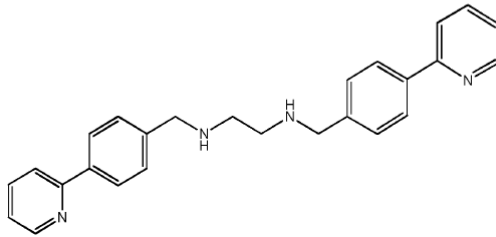
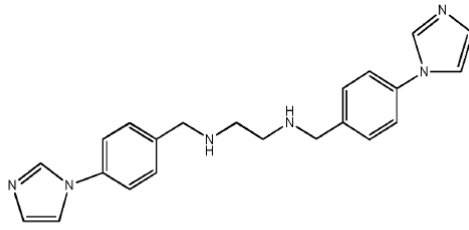
En ciertas realizaciones de la fórmula II, X es un alcanodiilo opcionalmente sustituido. Por ejemplo, X es un alcanodiilo que tiene una estructura de $-C_nH_{2n}-$ en la que n es de 2 a 5. Un fracción X particularmente preferido es $-CH_2-CH_2-$.

En ciertas realizaciones de fórmula II, al menos uno de R^1-R^{10} es un N-heterocíclico, particularmente un N-heterocíclico de 5 miembros o 6 miembros. En ciertas realizaciones de fórmula II, al menos uno de R^3 o R^8 , y preferiblemente ambos de R^3 y R^8 , son un N-heterocíclico, particularmente un N-heterocíclico de 5 miembros o 6 miembros. Los grupos N-heterocíclicos ilustrativos incluyen, por ejemplo, pirrolilo, H-pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, oxazolilo, oxadiazolilo (incluyendo 1,2,3; 1,2,4; y 1,3,4-oxadiazolilos), isoxazolilo, furazanilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, triazolilo (incluidos 1,2,3 y 1,3,4-triazolilos), tetrazolilo, tiadiazolilo (incluyendo 1,2,3 y 1,3,4-tiadiazolilos), ditiazolilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piperazinilo y triazinilo. Los grupos N-heterocíclicos particularmente preferidos incluyen imidazolilo, piridilo, pirazolilo, oxadiazolilo y pirimidinilo. Los grupos N-heterocíclicos especialmente preferidos incluyen imidazolilo, piridilo y pirazolilo. En ciertas realizaciones de fórmula II, R^1 , R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^9 y R^{10} son cada uno H. En ciertas realizaciones de fórmula II, R^1 , R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^9 y R^{10} son cada uno H; X es un alcanodiilo opcionalmente sustituido, y R^3 y R^8 son cada uno individualmente un N-heterocíclico de 5 miembros o 6 miembros opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones de fórmula II, R^3 y R^8 son cada uno el mismo grupo.

En ciertas realizaciones de las fórmulas I-VII, los compuestos pueden estar en forma de una sal. Por ejemplo, la fracción diamina dentro de la estructura del compuesto de benzatina puede formar una sal con un anión tal como acetato (por ejemplo, compuesto BC-1215 HAc), carbonato, haluro, citrato, nitrato, nitrito, fosfato, fosfonato, sulfato, sulfonato, o ácido láctico. En ciertas realizaciones, los compuestos de las fórmulas I-VII son solubles en agua permitiendo así su formación de sal. La solubilidad en agua de los compuestos también permite la formulación de los compuestos en el suministro de aerosol para los pulmones, la administración oral o las emulsiones para la administración tópica.

Los compuestos ilustrativos de fórmulas I y II se muestran en la tabla 1 de la Fig. 20.

Los compuestos ilustrativos también se muestran a continuación:



Métodos de uso

- 5 En una realización, los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar trastornos inflamatorios, particularmente trastornos inflamatorios que están mediados por la liberación de citoquinas, especialmente una tormenta de citoquinas. Por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar trastornos inflamatorios que subyacen a numerosas enfermedades humanas caracterizadas por un sistema inmune altamente activado que conduce a la secreción de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias en circulación
- 10 después de la infección con patógenos virulentos, en respuesta a la lesión de una célula huésped, o irritantes relacionados

que activan los receptores en las células efectoras inmunes (células T, macrófagos, etc.). Una característica central de estos trastornos infecciosos es el estallido en la liberación de citoquinas, es decir, la tormenta de citoquinas, de células proinflamatorias que incluyen macrófagos, linfocitos y PMN. Bajo muchas condiciones, la tormenta de citoquinas es exagerada (hipercitoquinemia) y produce una reacción inmune fatal con la activación constante de las células efectoras inmunes que producen niveles sostenidos y supra fisiológicos de TNF α , IL- β e IL-6 que conducen a una lesión profunda del tejido. Los compuestos descritos en el presente documento pueden inhibir la liberación de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF α , IL- β y/o IL-6). En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento son panreactivos para numerosas citoquinas nocivas. Los compuestos descritos en este documento inhiben la inflamación y previenen el daño tisular (por ejemplo, daño pulmonar, particularmente daño pulmonar por infección bacteriana) en un sujeto. Por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento pueden inhibir la hipercitoquinemia y/o pueden prevenir o disminuir los niveles supra fisiológicos de TNF α , IL- β y/o IL-6 o moléculas dañinas relacionadas.

Los trastornos inflamatorios que pueden tratarse con los compuestos descritos en el presente documento incluyen cualquier trastorno que posea un componente inflamatorio. Los trastornos inflamatorios ilustrativos incluyen trastornos de inflamación aguda y crónica como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, neumonitis (incluida neumonitis por hipersensibilidad y neumonitis por radiación), neumonía, fibrosis quística, psoriasis, artritis/artritis reumatoide, rinitis, faringitis, cistitis, prostatitis, dermatitis, alergia incluyendo fiebre del heno, nefritis, conjuntivitis, encefalitis, meningitis, oftalmítis, uveítis, pleuritis, pericarditis, miocarditis, aterosclerosis, inflamación relacionada con el virus de inmunodeficiencia humana, diabetes, osteoartritis, artritis psoriásica, enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa)/colitis, sepsis, vasculitis, bursitis, enfermedad del tejido conectivo, enfermedades autoinmunes tal como el lupus eritematoso sistémico (SLE), polimialgia reumática, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, arteritis temporal, vasculitis, crioglobulinemia y esclerosis múltiple, inflamación viral o inducida por influenza, o edema. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ser particularmente efectivos para tratar sepsis, neumonía, inflamación inducida por la influenza, edema, neuropatía, colitis, artritis, enfermedad de Crohn, diabetes, inflamación de la piel, los ojos y los oídos (por ejemplo, Psoriasis, uveítis/oftalmítis, otitis externa), lupus eritematoso sistémico (SLE). Los compuestos descritos en el presente documento pueden ser útiles para tratar una inflamación y daño tisular inducidos por infección patógena, por ejemplo, con, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Escherichia coli*. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ser especialmente eficaces para tratar sepsis o neumonía.

En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden ser agentes antibacterianos. Los compuestos pueden inhibir el crecimiento bacteriano (funcionan como bacteriostático) de, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Escherichia coli*. Los compuestos pueden inhibir el crecimiento bacteriano a través de la interacción con la proteína ApaG bacteriana. El crecimiento bacteriano puede inhibirse en un sujeto administrando el compuesto al sujeto. El crecimiento bacteriano en la superficie de un objeto (por ejemplo, un alimento, un instrumento quirúrgico, una superficie de cocina, una superficie de hospital, etc.) puede inhibirse administrando o aplicando el compuesto a la superficie del objeto.

En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar otros trastornos o lesiones mediadas por FBXO3 tales como, por ejemplo, malaria, exposición tóxica a los pulmones, cáncer, enfermedad de Alzheimer o una lesión relacionada con quemaduras. Los cánceres ilustrativos incluyen leucemia, linfoma, carcinoma broncogénico, adenocarcinoma de mama, colon, ovario, tiroides, páncreas, estómago y próstata, cáncer de células escamosas, cáncer de células pequeñas, melanoma, sarcoma y cáncer metastásico. Dado que un inhibidor de FBXO3 sobrerregula a FBXL2, otros sustratos de FBXL2 tales como la ciclina D2/3, la proteína Aurora B se degradarán con el tratamiento con inhibidores de FBXO3. Dado que la Ciclina D2/3 y Aurora B son oncoproteínas bien descritas, por lo tanto el inhibidor de FBXO3 puede inhibir la proliferación del cáncer mediante la inhibición de las ciclinas y la proteína Aurora B.

Otra realización descrita en el presente documento es un método para inhibir la liberación de citoquinas proinflamatorias en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un inhibidor de FBXO3. El inhibidor de FBXO3 inhibe la actividad de FBXO3, reduce los niveles de proteína TRAF en las células, inhibe la liberación de citoquinas de las células y disminuye la gravedad de la inflamación en un sujeto séptico. En ciertas realizaciones, el inhibidor de FBXO3 reduce la concentración de proteínas TRAF (por ejemplo, TRAF2, TRAF5 y TRAF6) en células en un sujeto que ha sido sometido a un evento inductor de citoquinas, tal como una infección. Al atacar la liberación de citoquinas mediada por TRAF, un inhibidor de FBXO3 puede evitar los efectos severos a largo plazo de los corticosteroides que suprimen la inflamación en múltiples vías biológicas, pero proporcionan un efecto sistémico más amplio en relación con los antiinflamatorios dirigidos a una única citoquina. En ciertas realizaciones, el análisis de células sanguíneas inflamatorias en sujetos tratados con inhibidores de FBXO3 mostrará niveles reducidos de proteína TRAF.

En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento se dirigen a una firma molecular "de tipo bacteriano" (el dominio ApaG (SEQ ID NO. 1, residuos 278-400) identificados dentro de FBXO3 que no está identificado en otras proteínas dentro de células huésped de mamíferos. Esta característica es muy atractiva, ya que potencialmente confiere selectividad al fármaco con efectos limitados fuera del objetivo. En particular, un inhibidor de FBXO3, tal como los compuestos descritos en el presente documento, ocupa una cavidad del dominio ApaG de la proteína FBXO3.

Se generó una estructura tridimensional del motivo FBXO3-ApaG a partir de un modelo de homología basado en la estructura cristalina de la proteína ApaG (2F1E.pdb) de *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri. En ciertas realizaciones, un

inhibidor de FBXO3 contacta e interactúa con los residuos de aminoácidos Y308, N335, E341, T368 y S370 que se encuentran en la cavidad del dominio ApaG. Por ejemplo, un inhibidor de FBXO3 puede acoplarse con los residuos de aminoácidos mediante enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, formación de puentes salinos o enlaces covalentes. En ciertas realizaciones, un inhibidor de FBXO3 incluye al menos un grupo amina que forma un puente salino dentro de 4 angstroms del grupo carboxilo del ácido glutámico 341, y al menos un grupo que contiene nitrógeno u oxígeno que forma un enlace de hidrógeno dentro de 3 angstroms del grupo hidroxilo de la treonina 368, el grupo hidroxilo serina 370, el grupo carboxamida de la asparagina 335 y el grupo hidroxilo de la tirosina 308.

En ciertas realizaciones, el sujeto necesita, o se ha reconocido que necesita un tratamiento con un inhibidor de FBXO3. El sujeto puede seleccionarse como susceptible de tratamiento con un inhibidor de FBXO3. Por ejemplo, el sujeto puede necesitar un agente antiinflamatorio que inhiba la inflamación causada por al menos dos citoquinas proinflamatorias diferentes.

Actualmente, se usan glucocorticoides sintéticos en el tratamiento de una amplia gama de trastornos inflamatorios; su principal mecanismo antiinflamatorio implica el bloqueo de la síntesis de lipocortina 1, seguido de la supresión de la acción de la fosfolipasa A2 y la modulación de los niveles de dos clases de productos proinflamatorios como las prostaglandinas y los leucotrienos. Sin embargo, los glucocorticoides tienen muchas otras proteínas objetivo in vivo; por lo tanto, su no especificidad con efectos fuera del objetivo puede causar una variedad de efectos adversos como hiperglicemia, resistencia a la insulina, diabetes mellitus, osteoporosis, cataratas, ansiedad, depresión, colitis, hipertensión, ictus, disfunción eréctil, hipogonadismo, hipotiroidismo, amenorrea, y retinopatía. Basándose en el nuevo mecanismo selectivo de los inhibidores de FBXO3, los compuestos descritos en el presente documento pueden proporcionar un mejor perfil de toxicidad con una potente actividad in vivo.

Los compuestos descritos en el presente documento regulan la inflamación a través de una subunidad de ligasa E3 relativamente nueva, FBXO3, y su objetivo más adelante, las proteínas TRAF. Por lo tanto, representa un mecanismo de acción totalmente distinto de los glucocorticoides y los antiinflamatorios existentes, tal como los agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAID).

25 Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la descripción incluye composiciones farmacéuticas preparadas para la administración a un sujeto y que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son útiles para tratar la inflamación, particularmente la inflamación inducida por citoquinas. La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito dependerá de la vía de administración, la especie de sujeto y las características físicas del sujeto que se está tratando. Los factores específicos que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad de la enfermedad y el estadio, el peso, la dieta y los medicamentos concurrentes. Los expertos en la técnica entenderán la relación de estos factores para determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos descritos.

Las composiciones farmacéuticas para la administración a un sujeto pueden incluir al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable adicional tal como vehículos, espesantes, diluyentes, reguladores, conservantes, agentes tensioactivos y similares, además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos adicionales tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles para estas formulaciones son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª edición (1995), describe composiciones y formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de los compuestos descritos en este documento.

En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración que se esté empleando. Por ejemplo, las formulaciones parenterales generalmente contienen fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables, tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, polvo, píldora, tableta o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes reguladores del pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen las formadas a partir de sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos descritos en particular poseen al menos un grupo básico que puede formar sales ácido-base con ácidos. Los ejemplos de grupos básicos incluyen, pero no se limitan a, grupos amino e imino. Los ejemplos de ácidos inorgánicos que pueden formar sales con dichos grupos básicos incluyen, pero no se limitan a, ácidos minerales tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Los grupos básicos también pueden formar sales con ácidos orgánicos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos sulfoácidos o fosfoácidos o ácido sulfámico N-sustituido, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido

cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico y, además, con aminoácidos, por ejemplo con α -aminoácidos, y también con ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxi metanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenodisulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, 2- o 3-fosfoglicerato, glucosa-6-fosfato o ácido N-ciclohexilsulfámico (con formación de ciclamatos) o con otros compuestos orgánicos ácidos, tales como el ácido ascórbico. En particular, las sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre muchos otros ácidos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Ciertos compuestos incluyen al menos un grupo ácido que puede formar una sal ácido-base con una base inorgánica u orgánica. Los ejemplos de sales formadas a partir de bases inorgánicas incluyen sales de los compuestos actualmente descritos con metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos, incluyendo calcio y magnesio y similares. De manera similar, se contemplan las sales de compuestos ácidos con una base orgánica, tal como una amina (como se usa en este documento, términos que se refieren a aminas, debe entenderse que incluyen sus ácidos conjugados, a menos que el contexto indique claramente que se pretende la amina libre), incluidas las sales formadas con aminoácidos básicos, aminas alifáticas, aminas heterocíclicas, aminas aromáticas, piridinas, guanidinas y amidinas. De las aminas alifáticas, las aminas alifáticas acíclicas, y las di y tri-alkilaminas cíclicas y acíclicas son particularmente adecuadas para uso en los compuestos descritos. Además, también se pueden utilizar contraiones de amonio cuaternario.

Los ejemplos particulares de bases de amina adecuadas (y sus correspondientes iones de amonio) para uso en los presentes compuestos incluyen, sin limitación, piridina, N,N-dimetilaminopiridina, diazabicyclononano, diazabicycloundeceno, N-metil-N-etilamina, dietilamina, trietilamina, diisopropilamina, mono, bis o tris-(2-hidroxi-etil) amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, tris(hidroxi-etil)metilamina, N,N-dimetil-N-(2-hidroxi-etil)amina, tri-(2-hidroxi-etil) amina y N-metil-D-glucamina. Para ejemplos adicionales de "sales farmacológicamente aceptables", véase Berge et al., J. Pharm. Sci. 66: 1 (1977).

Los compuestos descritos en el presente documento pueden cristalizarse y pueden proporcionarse en una única forma cristalina o como una combinación de diferentes polimorfos cristalinos. Como tales, los compuestos pueden proporcionarse en una o más formas físicas, tales como diferentes formas cristalinas, forma cristalina, cristalina líquida o no cristalina (amorfa). Dichas formas físicas diferentes de los compuestos pueden prepararse usando, por ejemplo, diferentes disolventes o diferentes mezclas de disolventes para la recristalización. Alternativa o adicionalmente, se pueden preparar diferentes polimorfos, por ejemplo, realizando recristalizaciones a diferentes temperaturas y/o alterando las velocidades de enfriamiento durante la recristalización. La presencia de polimorfos puede determinarse mediante cristalografía de rayos X o, en algunos casos, mediante otra técnica espectroscópica, como la espectroscopia de RMN en fase sólida, la espectroscopia IR o la calorimetría diferencial de barrido.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a sujetos mediante una variedad de modos de administración a la mucosa, que incluyen administración oral, rectal, intranasal, intrapulmonar o transdérmica, o mediante administración tópica a otras superficies. Opcionalmente, las composiciones pueden administrarse por vías diferentes a la mucosa, incluyendo por vía intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraarticular, intraperitoneal, intratecal, intracerebroventricular o parenteral. En otras realizaciones alternativas, el compuesto puede administrarse ex vivo mediante exposición directa a células, tejidos u órganos originados de un sujeto.

Para formular las composiciones farmacéuticas, el compuesto se puede combinar con diversos aditivos farmacéuticamente aceptables, así como una base o vehículo para la dispersión del compuesto. Los aditivos deseados incluyen, pero no se limitan a, agentes de control del pH, tales como arginina, hidróxido de sodio, glicina, ácido clorhídrico, ácido cítrico y similares. Además, se pueden incluir anestésicos locales (por ejemplo, alcohol bencílico), agentes isotonzantes (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol, sorbitol), inhibidores de la adsorción (por ejemplo, Tween 80 o Miglyol 812), agentes que aumentan la solubilidad (por ejemplo, ciclodextrinas y sus derivados), estabilizadores (por ejemplo, albúmina sérica) y agentes reductores (por ejemplo, glutatión). Adyuvantes, tales como hidróxido de aluminio (por ejemplo, Amphogel, Wyeth Laboratories, Madison, NJ), adyuvante de Freund, MPL^{MR} (lípidos A monofosforilo 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, IN) e IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA), entre muchos otros adyuvantes adecuados bien conocidos en la técnica, pueden incluirse en las composiciones. Cuando la composición es líquida, la tonicidad de la formulación, medida con referencia a la tonicidad de solución salina fisiológica al 0,9% (p/v) tomada como una unidad, se suele ajustar a un valor en el que no se inducirá daño tisular sustancial irreversible en el sitio de administración. En general, la tonicidad de la solución se ajusta a un valor de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3,0, tal como aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0, o aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,7.

El compuesto puede dispersarse en una base o vehículo, que puede incluir un compuesto hidrófilo que tiene una capacidad para dispersar el compuesto, y cualquier aditivo deseado. La base se puede seleccionar de una amplia gama de compuestos adecuados, incluidos, pero no se limitan a, copolímeros de ácidos policarboxílicos o sales de los mismos, anhídridos carboxílicos (por ejemplo, anhídrido maleico) con otros monómeros (por ejemplo, metil(met)acrilato, ácido acrílico y similares), polímeros de vinilo hidrófilos, tales como acetato de polivinilo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, derivados de celulosa, tales como la hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y similares, y polímeros naturales, tales como quitosano, colágeno, alginato de sodio, gelatina, ácido hialurónico, y sus sales metálicas no tóxicas. A menudo, un polímero biodegradable se selecciona como una base o vehículo, por ejemplo, ácido poliláctico, copolímero poli(ácido láctico-ácido glicólico), ácido polihidroxibutírico, copolímero poli(ácido hidroxibutírico-ácido glicólico) y mezclas de los

5 mismos. Como alternativa o adicionalmente, los ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como los ésteres de ácidos grasos de poliglicerina, los ésteres de ácidos grasos de sacarosa y similares pueden emplearse como vehículos. Los polímeros hidrófilos y otros vehículos se pueden usar solos o en combinación, y se puede impartir una integridad estructural mejorada al vehículo mediante cristalización parcial, enlace iónico, entrecruzamiento y similares. El vehículo puede proporcionarse en una variedad de formas, incluidas soluciones fluidas o viscosas, geles, pastas, polvos, microesferas y películas para aplicación directa a una superficie de la mucosa.

10 El compuesto puede combinarse con la base o el vehículo de acuerdo con una variedad de métodos, y la liberación del compuesto puede ser por difusión, desintegración del vehículo o formación asociada de canales de agua. En algunas circunstancias, el compuesto se dispersa en microcápsulas (microesferas) o nanocápsulas (nanoesferas) preparadas a partir de un polímero adecuado, por ejemplo, 2-cianoacrilato de isobutilo (véase, por ejemplo, Michael et al., J. Pharmacy Pharmacol. 43: 1-5, 1991), y se dispersa en un medio de dispersión biocompatible, que produce un suministro sostenido y actividad biológica durante un tiempo prolongado.

15 Las composiciones de la descripción pueden contener alternativamente sustancias de vehículos farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y reguladores, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán y oleato de trietanolamina. Para composiciones sólidas, se pueden usar vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

20 Las composiciones farmacéuticas para administrar el compuesto también se pueden formular como una solución, microemulsión u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de ingredientes activos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada para las soluciones se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula deseado en el caso de formulaciones dispersables y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol y sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada del compuesto se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

30 En ciertas realizaciones, el compuesto se puede administrar en una formulación de liberación prolongada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Estas composiciones pueden prepararse con vehículos que protejan contra la liberación rápida, por ejemplo, un vehículo de liberación controlada tal como un polímero, un sistema de administración microencapsulado o un gel bioadhesivo. El suministro prolongado en diversas composiciones de la descripción puede realizarse incluyendo en la composición agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, hidrogeles de monoestearato de aluminio y gelatina. Cuando se desean formulaciones de liberación controlada, los aglutinantes de liberación controlada adecuados para su uso de acuerdo con la descripción incluyen cualquier material de liberación controlada biocompatible que sea inerte al agente activo y que sea capaz de incorporar el compuesto y/u otro agente biológicamente activo. Numerosos materiales de este tipo son conocidos en la técnica. Los aglutinantes útiles de liberación controlada son materiales que se metabolizan lentamente en condiciones fisiológicas luego de su administración (por ejemplo, en una superficie mucosa o en presencia de fluidos corporales). Los aglutinantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, polímeros y copolímeros biocompatibles bien conocidos en la técnica para uso en formulaciones de liberación sostenida. Dichos compuestos biocompatibles son no tóxicos e inertes a los tejidos circundantes, y no provocan efectos secundarios adversos significativos, tales como irritación nasal, respuesta inmune, inflamación o similares. Se metabolizan en productos metabólicos que también son biocompatibles y se eliminan fácilmente del cuerpo.

45 Los ejemplos de materiales poliméricos para uso en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, matrices poliméricas derivadas de poliésteres copoliméricos y homopoliméricos que tienen enlaces éster hidrolizables. Se sabe que varios de estos son biodegradables y conducen a productos de degradación que tienen una toxicidad nula o baja. Los ejemplos de polímeros incluyen ácidos poliglicólicos y ácidos polilácticos, poli(ácido DL-láctico-ácido co-glicólico), poli(ácido D-láctico-ácido co-glicólico) y poli(ácido L-ácido láctico-ácido-co-glicólico). Otros polímeros biodegradables o bioerosionables útiles incluyen, pero no se limitan a, polímeros tales como poli(épsilon-caprolactona), poli(épsilon-aprolactona-CO-ácido láctico), poli(épsilon-aprolactona-CO-ácido glicólico), poli(ácido beta-hidroxi butírico), poli(alquil-2-cianoacrilato), hidrogeles, tales como poli(metacrilato de hidroxietilo), poliamidas, poli(aminoácidos) (por ejemplo, L-leucina, ácido glutámico, ácido L-aspártico y similares), poli(éster urea), poli(2-hidroxietil DL-aspartamida), polímeros de poliacetil, poliortoésteres, policarbonato, polimaleamidas, polisacáridos y copolímeros de los mismos. Los expertos en la técnica conocen muchos métodos para preparar tales formulaciones (véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978). Otras formulaciones útiles incluyen microcápsulas de liberación controlada (Patentes de Estados Unidos. Nos. 4.652.441 y 4.917.893), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico útiles para fabricar microcápsulas y otras formulaciones (Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.677.191 y 4.728.721) y composiciones de liberación sostenida para péptidos solubles en agua. (Patente de Estados Unidos No. 4.675.189).

60 Las composiciones farmacéuticas de la descripción típicamente son estériles y estables en condiciones de fabricación, almacenamiento y uso. Las soluciones estériles se pueden preparar incorporando el compuesto en la cantidad requerida

- en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido por esterilización filtrante. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto y/u otro agente biológicamente activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de aquellos enumerados en el presente documento. En el caso de polvos estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización que produce un polvo del compuesto más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada y filtrada del mismo. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares.
- De acuerdo con diversos métodos de tratamiento de la descripción, el compuesto puede administrarse a un sujeto de una manera consistente con las metodologías convencionales asociadas con el tratamiento del trastorno para el cual se busca tratamiento o prevención. De acuerdo con la descripción en el presente documento, una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz del compuesto y/u otro agente biológicamente activo se administra a un sujeto que necesita tal tratamiento durante un tiempo y en condiciones suficientes para prevenir, inhibir y/o mejorar una enfermedad o afección seleccionada o uno o más síntomas de la misma.
- La administración del compuesto de la descripción puede ser con fines tanto profilácticos como terapéuticos. Cuando se proporciona de forma profiláctica, el compuesto se proporciona antes de cualquier síntoma. La administración profiláctica del compuesto sirve para prevenir o mejorar cualquier proceso de enfermedad posterior. Cuando se proporciona terapéuticamente, el compuesto se proporciona en el momento (o poco después) de la aparición de un síntoma de enfermedad o infección.
- Para fines profilácticos y terapéuticos, el compuesto se puede administrar al sujeto por vía oral o en un solo bolo de administración, mediante administración continua (por ejemplo, administración transdérmica continua, mucosal o intravenosa) durante un período de tiempo prolongado, o en un protocolo de administración repetida (por ejemplo, mediante un protocolo de administración repetida por hora, por día o semanalmente). La dosis terapéuticamente efectiva del compuesto puede proporcionarse como dosis repetidas dentro de un régimen de profilaxis o tratamiento prolongado que dará resultados clínicamente significativos para aliviar uno o más síntomas o afecciones detectables asociadas con una enfermedad o afección específica como se establece en el presente documento. La determinación de las dosis efectivas en este contexto generalmente se basa en estudios en modelos animales seguidos por ensayos clínicos en humanos y está guiada por protocolos de administración que reducen significativamente la aparición o la severidad de los síntomas o afecciones de la enfermedad dirigida en el sujeto. Los modelos adecuados a este respecto incluyen, por ejemplo, murinos, ratas, aves, perros, ovejas, porcinos, felinos, primates no humanos y otros sujetos aceptados de modelos animales conocidos en la técnica. Alternativamente, las dosis efectivas se pueden determinar utilizando modelos in vitro. Usando tales modelos, solo se requieren cálculos y ajustes ordinarios para determinar una concentración y dosis apropiadas para administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto (por ejemplo, cantidades que son efectivas para aliviar uno o más síntomas de una enfermedad específica). En realizaciones alternativas, una cantidad efectiva o una dosis efectiva del compuesto puede simplemente inhibir o mejorar una o más actividades biológicas seleccionadas correlacionadas con una enfermedad o afección, como se establece en el presente documento, con fines terapéuticos o de diagnóstico.
- La dosis real del compuesto variará de acuerdo con factores tales como la indicación de la enfermedad y el estado particular del sujeto (por ejemplo, la edad, el tamaño, la aptitud física, la extensión de los síntomas, los factores de susceptibilidad y similares del sujeto), el tiempo y la vía de administración, otros fármacos o tratamientos que se administran simultáneamente, así como la farmacología específica del compuesto para provocar la actividad deseada o la respuesta biológica en el sujeto. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar una respuesta profiláctica o terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto secundario tóxico o perjudicial del compuesto y/u otro agente biológicamente activo se supera en términos clínicos por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Un intervalo no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto y/u otro agente biológicamente activo dentro de los métodos y formulaciones de la descripción es de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, tal como aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal.
- El médico a cargo puede variar la dosis para mantener una concentración deseada en un sitio objetivo (por ejemplo, los pulmones o la circulación sistémica). Las concentraciones más altas o más bajas se pueden seleccionar según el modo de administración, por ejemplo, la administración transepidérmica, rectal, oral, pulmonar, intraósea o intranasal frente a la administración intravenosa o subcutánea o intramuscular. La dosificación también puede ajustarse en función de la velocidad de liberación de la formulación administrada, por ejemplo, de un aerosol intrapulmonar frente a polvo, liberación sostenida oral frente a partículas inyectadas o formulaciones de administración transdérmica, y así sucesivamente.
- Los compuestos descritos en el presente documento también pueden coadministrarse con un agente terapéutico adicional. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, otro agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un inhibidor de la metaloproteasa de matriz, un inhibidor de lipoxigenasa, un antagonista de citoquina, un inmunosupresor, un agente anticancerígeno, un agente antiviral, una citoquina, un factor de crecimiento, un inmunomodulador, una prostaglandina o un compuesto de hiperproliferación antivascular.

La presente descripción también incluye kits, empaques y unidades de múltiples contenedores que contienen las composiciones farmacéuticas, los ingredientes activos y/o los medios para la administración de los mismos para uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades y otras afecciones en sujetos mamíferos. También se proporcionan kits para uso diagnóstico. En una realización, estos kits incluyen un recipiente o formulación que contiene uno o más de los compuestos descritos en el presente documento. En un ejemplo, este componente está formulado en una preparación farmacéutica para ser administrada a un sujeto. El compuesto está opcionalmente contenido en un contenedor o unidad de dosificación a granel o una forma de dosificación de unidades múltiples. Se pueden proporcionar medios de dispensación opcionales, por ejemplo, un aplicador de pulverización pulmonar o intranasal. Los materiales de empaque incluyen opcionalmente una etiqueta o instrucción que indica para qué fines de tratamiento y/o de qué manera se puede usar el agente farmacéutico empacado con el mismo.

Resultados

FBXL2 se dirige a las TRAF para poliubiquitinación. Actualmente se observó que la expresión ectópica de FBXL2 en epitelios pulmonares murinos (MLE) reduce específicamente los niveles de proteína TRAF1-6 y los niveles de fosforilación de la subunidad p105 en la ruta NF- κ B (Fig. 1A). FBXL2 también se expresó condicionalmente en células MLE utilizando un plásmido inducible por doxiciclina que dio como resultado la degradación de la proteína TRAF de una manera dependiente del tiempo (Fig. 1B). En experimentos de inmunoprecipitación en los que las células se lisaron y se sometieron a inmunoprecipitación (ip) de FBXL2, todas las proteínas TRAF se detectaron en inmunoprecipitados de FBXL2 mediante inmunotransferencia (Fig. 1C). Los resultados sugieren que FBXL2 interactúa con las TRAF en las células. Es importante destacar que la inclusión de SCFFBXL2 purificado con el complemento completo de las enzimas E1 y E2 más ubiquitina fue suficiente para generar especies de TRAF poliubiquitinadas *in vitro* (Fig. 1D). Por último, la expresión ectópica de FBXL2 disminuyó la semivida de la proteína TRAF (Fig. 1E) pero no sus niveles de ARNm (datos no mostrados).

FBXL2 está poliubiquitinado en el sitio de Lisina 201. Dado que FBXL2 es un regulador importante de las TRAF, se investigó el mecanismo involucrado en la estabilidad y degradación de FBXL2. En primer lugar, se construyeron varios mutantes de eliminación de FBXL2 que carecen de sitios receptores de ubiquitina lisina específicos (Fig. 2A, mapa superior) y se evaluó su vulnerabilidad a la poliubiquitinación al exponer las células al inhibidor MG132 del proteasoma 26S. Los mutantes de eliminación de FBXL2 de longitud completa (FL) y otros cuatro, mostraron todos una acumulación significativa de productos de ubiquitinación de alto peso molecular (Fig. 2A, abajo, a la derecha). Un análisis de eliminación adicional sugirió que un mutante FBXL2-C150 es resistente a la ubiquitinación ya que no se detectó una acumulación significativa de especies migratorias más lentas (Fig. 2B, abajo a la derecha). Hay dos sitios de ubiquitinación potenciales dentro de los 50 residuos entre C150 y C200 de FBXL2. La mutagénesis dirigida al sitio de estos sitios y la expresión de un plásmido que codifica estos mutantes dieron como resultado una resistencia significativa del mutante K201R de FBXL2 al inhibidor MG132 del proteasoma 26S (Fig. 2C). La estabilidad de este mutante también se probó en un estudio de semivida ($t_{1/2}$), que indicó un $t_{1/2}$ significativamente prolongado en comparación con FBXL2 WT (2,5 h, Fig. 2D).

FBXL2 está fosforilado y se dirige a la subunidad FBXO3 de la ligasa E3 de SCF en el residuo T404. Las ligasas E3 basadas en SCF apuntan a las fosfoproteínas. El análisis de la base de datos indica muchos sitios de fosforilación potenciales dentro del FBXL2 (Fig. 3A, predicción del software GPS2.1). Para confirmar que FBXL2 es fosfoproteína, las células se lisaron y se sometieron a FBXL2 ip, y utilizando anticuerpos de fosfo-treonina fue posible detectar una banda que migra al tamaño predicho de FBXL2 (Fig. 3B). Con el fin de identificar la quinasa potencial que se dirige a FBXL2 para la fosforilación, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación (co-ip). Las células MLE se lisaron y se sometieron a ip de FBXL2; De forma muy interesante, de las siete quinasas analizadas, GSK3 β fue la única proteína detectada en los inmunoprecipitados de FBXL2 (Fig. 3C). Debido a que FBXL2 es una fosfoproteína que podría ser direccionada para la ubiquitinación a base de SCF, se inició una evaluación imparcial que prueba aleatoriamente las proteínas de la caja F que pueden mediar en la degradación de FBXL2. Tras la sobreexpresión de estas proteínas, solo FBXO3 fue capaz de disminuir los niveles de FBXL2 inmunorreactivo (datos no mostrados). FBXO3 pertenece a un gran grupo de proteínas de la caja F que carecen de un motivo distinto en el extremo terminal C, por lo que se consideran solo proteínas del dominio de la caja F (FBXO). Solamente un estudio mostró que FBXO3 aumenta la ubiquitinación de p300, y su autenticidad como una subunidad de SCF y sus sustratos siguen siendo en gran parte desconocidos. Para confirmar la especificidad de FBXO3 dirigida a FBXL2, se realizaron experimentos de co-ip en los que se detectó FBXO3 en los inmunoprecipitados de FBXL2 (Fig. 3D). Además, el complejo SCFFBXO3 fue capaz de inducir la poliubiquitinación de FBXL2 (Fig. 3E). Usando los mutantes de eliminación de FBXL2 descritos en la Fig. 2A, se realizaron estudios de mapeo preliminares que transfectan células con constructos FBXL2 marcados con his seguidas de por eliminación de his. Estos resultados indican que FBXO3 se acopla en el extremo terminal C (residuos 350-423) de FBXL2 (Fig. 3F). Para confirmar que esta región es importante para la estabilidad de FBXL2, se analizaron la estabilidad de FBXL2 de tipo silvestre (WT) y varios mutantes de eliminación del extremo terminal C de FBXL2 (Fig. 3G). Curiosamente, un mutante de eliminación C390 de FBXL2 exhibió una $t_{1/2}$ significativamente prolongada en comparación con FBXL2 WT, lo que sugiere que los residuos 390-423 son importantes para su estabilidad. Dentro de esta región, hay un sitio de fosforilación GSK3 β de consenso (Fig. 3H, predicción del software GPS2.1). Para confirmar que T404 es el sitio de fosforilación auténtico de FBXL2, se lisaron células transfectadas con un mutante T404A de FBXL2 WT o FBXL2 y se sometieron a ip de V5-FBXL2, e inmunotransferencia usando anticuerpos de fosfotreonina en los que se detectó una disminución significativa en los niveles de fosforilación de la proteína en T404 de FBXL2. (Fig. 3I). Curiosamente, este sitio también sirve como un motivo de direccionamiento para la interacción de FBXO3, ya que T404A de FBXL2 exhibe una resistencia significativa a

SCFFBXO3 usando ensayos de ubiquitinación in vitro (Fig. 3J). En resumen, FBXO3 se dirige a un sitio de fosforilación T404 dentro de FBXL2, que a su vez recluta el complejo SCF para poliubiquitar FBXL2 en un sitio K201 (Fig. 3K).

5 FBXO3 contiene una mutación α natural en V220. Curiosamente, el análisis de la base de datos de SNP indica una mutación natural dentro de FBXO3 (Val220Ile) con una frecuencia de mutación muy alta de ~10%, aunque solamente en caucásicos (Fig. 4A). Para confirmar que V220I es una mutación relevante de FBXO3 en células humanas, se analizaron muestras de PBMC de veinte voluntarios sanos caucásicos (disponibles comercialmente a través de Sanguine Life Science). El ADN genómico se extrajo primero de las células PBMC seguido por genotipado de SNP a través de la sonda TaqMan® SNP usando PCR en tiempo real. Se identificaron tres muestras de PBMC caucásicas que albergan mutaciones V220I de FBXO3 (Fig. 4B). Estas células PBMC que contienen esta mutación de FBXO3 se analizaron utilizando ensayos in vitro para la liberación de citoquinas. Las células PBMC WT o mutantes se cultivaron primero en medio RPMI suplementado con FBS al 10%, las células se trataron luego con 2 μ g/mL de LPS durante 24 h, y las citoquinas liberadas en el medio se analizaron utilizando una matriz de citoquinas humanas. Curiosamente, en el modelo inducido por LPS, la inducción de varias citoquinas proinflamatorias importantes se suprimió significativamente en células PBMC que albergan la mutación V220I de FBXO3 en comparación con células PBMC WT (Fig. 4C); por lo tanto, la mutación V220I de FBXO3 podría conferir un fenotipo proinflamatorio reducido en sujetos con infección u otras enfermedades autoinmunes.

10 La naturaleza de la mutación V220I de FBXO3 se probó posteriormente. En comparación con FBXO3 WT, el complejo SCF-FBXO3V220I mostró una capacidad marcadamente reducida para poliubiquitar FBXL2 con la mayor parte del sustrato intacto (Fig. 4D, abajo, exposición más ligera). Luego se estudió la función de FBXO3 en los monocitos U937, que adoptan la morfología y muchas características de los macrófagos maduros. Los datos preliminares muestran que FBXL2 ubiquitina y media la degradación de las proteínas TRAF, lo que potencialmente reduce la expresión de citoquinas. Por lo tanto, al eliminar FBXL2 en las células, se plantea la hipótesis de que FBXO3 debería ser capaz de sobreregular los niveles de proteína TRAF y estimular la expresión de citoquinas. De hecho, de acuerdo con esta hipótesis, la sobreexpresión de FBXO3 fue capaz de disminuir los niveles de proteína FBXL2, aunque aumentó significativamente los seis niveles de miembros de proteína TRAF (Fig. 4E). Sin embargo, la sobreexpresión de FBXO3V220I solo dio como resultado un aumento basal o nulo en varias proteínas TRAF. La liberación de citoquinas por células U937 tras el desafío con LPS se siguió de cerca. Las células se transfectaron primero con LacZ, FBXO3 o FBXO3V220I durante 24 h antes de la exposición a LPS a razón de 100 ng/mL durante 24 h adicionales. Se midieron treinta y seis niveles de citoquinas utilizando una matriz de citoquinas humanas. Curiosamente, se observó que el FBXO3 sobreexpresa significativamente la mayoría de las citoquinas liberadas en combinación con el desafío con LPS (Fig. 4F, rojo); sin embargo, la expresión de FBXO3V220I no alteró dramáticamente la liberación de citoquinas en comparación con el control de LacZ (Fig. 4F). Estos nuevos resultados son los primeros en vincular dos proteínas de la caja F a la respuesta inmune innata y sugieren que FBXO3V220I es una mutación de pérdida de función de FBXO3. Los resultados aumentan la posibilidad de que los individuos que albergan esta mutación hipomórfica natural puedan mostrar una respuesta contundente a la infección u otras enfermedades autoinmunes.

35 FBXO3V220I es una mutación de pérdida de función α de FBXO3 in vivo. Para ampliar las observaciones anteriores in vivo, los ratones se infectaron con un lentivirus vacío, o lentivirus que codifica FBXO3 o FBXO3V220I durante 120 h (10^7 CFU/ratón, it). Los ratones se expusieron a continuación a *P. aeruginosa* (cepa PA103, 10^4 CFU/ratón, it) durante 24 h adicionales. Los ratones se controlaron con FlexiVent para medir la mecánica pulmonar y se sacrificaron para recoger el líquido de lavado. La expresión de FBXO3 WT, pero no la de FBXO3V220I, aumentó significativamente la lesión pulmonar inducida por PA103. Específicamente, la sobreexpresión de FBXO3 aumentó significativamente la resistencia y la elastancia pulmonar, y disminuyó el cumplimiento (Fig. 5A-D). La sobreexpresión de FBXO3 aumentó significativamente la concentración de proteínas de lavado, los recuentos de células de lavado y los infiltrados celulares (Fig. 5E-G). FBXO3 también disminuyó la supervivencia de los ratones infectados con PA103 (10^5 CFU/ratón, Fig. 5H). La sobreexpresión de FBXO3 también aumentó significativamente los niveles de citoquinas de lavado en ratones infectados con PA103 en comparación con un vector vacío con o sin PA103 (Fig. 5I). Estos efectos no se observaron utilizando el mutante FBXO3V220I. Estos estudios in vivo sugieren nuevamente que FBXO3V220I es un mutante de pérdida de función de FBXO3.

50 La inactivación de FBXO3 mejoró la lesión pulmonar inducida por *Pseudomonas* in vivo. Para confirmar el papel de FBXO3 en la neumonía, se realizaron estudios de inactivación in vivo donde los ratones se infectaron con lentivirus que codifican ARNhp vacío o ARNhp de FBXO3 durante 120 h (10^7 PFU/ratón, i.t). Luego, los ratones se expusieron a PA103 (10^4 CFU/mouse, it) durante 24 h adicionales. Curiosamente, la inactivación de FBXO3 mejoró significativamente los efectos adversos de PA103 en la mecánica pulmonar. Específicamente, la inactivación de FBXO3 aumentó el cumplimiento, disminuyó la resistencia y la elastancia pulmonar (Fig. 6A-D). La inactivación de FBXO3 también disminuyó la concentración de proteínas de lavado, los recuentos de células de lavado y los infiltrados celulares (Fig. 6E-G). Además, la inactivación de FBXO3 redujo significativamente los niveles de citoquinas de lavado en ratones infectados con PA103 (Fig. 6H) y aumentó su supervivencia (10^5 CFU/ratón, Fig. 6I). Estos estudios in vivo sugieren que el FBXO3 desempeña un papel importante en la regulación de la tormenta de citoquinas y puede servir como un posible objetivo farmacéutico. Por lo tanto, para investigar la posible aplicación de la inhibición de FBXO3 en la neumonía, se analizó la estructura de FBXO3 y se analizaron los inhibidores de moléculas pequeñas.

60 Análisis estructural del dominio ApaG de FBXO3 y detección del inhibidor. FBXO3 alberga un dominio muy singular denominado ApaG dentro de su extremo terminal carboxilo. El dominio ApaG se identificó por primera vez en bacterias, que contenían aproximadamente 125 aminoácidos, que comprenden un núcleo. Sin embargo, la función de la proteína

ApaG en bacterias es desconocida. En *Salmonella typhimurium*, el dominio ApaG de la proteína, CorD, está involucrada en la resistencia al Co^{2+} y el flujo de salida de Mg^{2+} . El análisis estructural de diferentes proteínas ApaG muestra un pliegue de varias láminas beta. Dado que las proteínas de la caja F a menudo utilizan su dominio del extremo terminal carboxilo para dirigirse a sus sustratos, se planteó la hipótesis de que el dominio ApaG de FBXO3 está involucrado en el reconocimiento del sustrato de FBXO3. Para probar esto, se diseñó una serie de mutantes de eliminación de FBXO3 donde se eliminó el dominio ApaG (Fig. 7A). La transcripción y traducción in vitro (TnT) se usaron para sintetizar estos mutantes y luego se analizaron en el ensayo de ubiquitinación in vitro utilizando FBXL2 como sustrato. Curiosamente, FBXO3-C278, que carece del dominio ApaG, perdió la capacidad de inducir la poliubiquitinación de FBXL2 (Fig. 7B); FBXO3-N70, que carece del dominio de la caja F del extremo terminal NH_2 requerido para interactuar con el complejo SCF, sirvió como control negativo. Estos experimentos sugieren que el dominio ApaG de FBXO3 es necesario para el direccionamiento de FBXL2. A continuación, se planteó la hipótesis de que la inhibición del dominio ApaG interrumpe el direccionamiento de FBXO3 a su sustrato, FBXL2. Se realizó un análisis de homología estructural identificando que el dominio ApaG de FBXO3 está altamente conservado (Fig. 7C). Usando análisis de acoplamiento molecular y las operaciones de clasificación puntuada en el modelo de estructura tridimensional FBXO3-ApaG, se evaluaron los ligandos potenciales que podrían encajar en las cavidades del dominio ApaG (Fig. 7D). Los experimentos de acoplamiento se llevaron a cabo utilizando LigandFit y CDock de Discovery studio 2.5. Una biblioteca que contenía 6507 medicamentos aprobados o experimentales se utilizó por primera vez para detectar ligandos potenciales para FBXO3-ApaG. En este modelo, Glu⁶⁴ dentro del dominio ApaG (123AA) es potencialmente importante para los inhibidores que interactúan. Basándose en el acoplamiento y el análisis de mejor ajuste de los ligandos adecuados, se seleccionó benzatina como una estructura principal para desarrollar una serie de nuevas biomoléculas para probar su capacidad para inhibir la secreción de citoquinas interactuando dentro del bolsillo de unión de ApaG (Fig. 7E-F).

Preparación de inhibidores de FBXO3 y análisis de acoplamiento. Los análogos de benzatina objetivo se prepararon a partir de derivados de benzaldehído y derivados de diamina tales como etilendiamina (Fig. 8A). En general, los derivados de benzaldehído relevantes (0,02 mol) se agregaron a una solución de etilendiamina (0,01 mol, ~700 μL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se sometió a reflujo y se agitó durante 60 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. Los precipitados de los análogos de benzatina se recogieron, se lavaron con agua y se secaron, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Como se muestra en la Tabla 1, se construyeron y probaron cuarenta compuestos nuevos para su IC₅₀, LD₅₀ e índice terapéutico (TI). En resumen, los compuestos se agregaron a células PBMC humanas a diferentes concentraciones que fueron expuestas a LPS y la secreción de citoquinas se controló mediante ELISA para determinar la IC₅₀. Los compuestos también se agregaron a los monocitos U937 en diferentes concentraciones, y las células se tiñeron con azul de tripano para determinar la LD₅₀. Varios compuestos (BC-1207, BC-1215, BC-1241, BC-1250 y BC-1261) obtuvieron un alto puntaje en estudios de acoplamiento con el dominio ApaG de FBXO3 y mostraron alto IC₅₀ y bajo LD₅₀ in vitro. Es importante destacar que varias nuevas moléculas pequeñas, denominadas BC-1215 y BC-1261, mostraron interacciones óptimas con FBXO3-ApaG con base en el análisis estructural y de acoplamiento como se muestra en la Fig. 8B-D. Estos agentes específicos exhibieron índices terapéuticos notables que justificaron pruebas biológicas adicionales. Se realizaron varios estudios funcionales para evaluar los efectos antiinflamatorios centrados en BC-1215.

BC-1215 inhibe profundamente el amplio espectro α de las citoquinas. Las células PBMC se trataron con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS durante 16 horas junto con BC-1215 a razón de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La liberación de citoquinas se controló mediante una matriz de citoquinas humanas (R&D Systems). Los resultados de la Fig. 9 indican una capacidad notable de BC-1215 para suprimir significativamente la mayoría de las citoquinas del panel TH1, incluyendo G-CSF, GM-CSF, GRO α , 1-309, IL1- α , IL1- β , IL1 α , IL-6, IL-12, IL-23, MIP-1 α , MIP-1 β y TNF α . Estas citoquinas están estrechamente relacionadas con la patogénesis de muchas enfermedades proinflamatorias, algunas de las cuales han llevado al uso de anticuerpos de citoquinas bloqueadores para reducir la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo: GM-CSF impulsa la inflamación en la artritis reumatoide (RA), y actualmente, los anticuerpos bloqueadores de GM-CSF (MOR103) se probaron en el ensayo de Fase 1b/2a en pacientes que padecen de RA.

El canakinumab, un anticuerpo bloqueante de IL1- β humano, ha sido aprobado para el tratamiento de síndromes periódicos asociados a la criopirina y se está probando en ensayos de Fase 1 para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La IL-6 se ha relacionado con muchas enfermedades autoinmunes y el cáncer, y recientemente se probó el anticuerpo bloqueador de la IL-6 en ensayos de Fase 2 en pacientes que padecen cáncer de pulmón de células no pequeñas. IL-12 e IL-23 están vinculados con la autoinmunidad; Ustekinumab (nombre comercial Stelara) es un anticuerpo monoclonal humano contra IL-12 e IL-23, que ha sido aprobado para tratar la psoriasis en placa de moderada a grave. TNF α , una citoquina TH1 crítica, también promueve la respuesta inflamatoria y está relacionada etiológicamente con muchos trastornos autoinmunes como la RA, la enfermedad inflamatoria intestinal, la psoriasis y el asma refractaria. Varios anticuerpos bloqueadores del TNF α como infliximab (Remicade), adalimumab (Humira) o certolizumab (Cimzia) han sido aprobados para tratar estos trastornos autoinmunes. Sin embargo, muchos de los enfoques anteriores tienen un espectro limitado de bioactividad ya que se dirigen a una única citoquina y se dirigen contra una proteína huésped. Los datos descritos en el presente documento son significativos porque sugieren que esta nueva familia de antagonistas de la ligasa

E3 de la proteína de caja F (por ejemplo, BC-1215) descrita en el presente documento puede ser más eficaz en los trastornos inflamatorios ya que son panreactivos a varias moléculas proinflamatorias y se dirigen a una única firma molecular de tipo bacteriano en las células huésped. Estas propiedades únicas de los antagonistas de la ligasa E3 de la proteína de la caja F confieren mayores actividades antiinflamatorias y, sin embargo, tienen efectos limitados fuera del objetivo.

BC-1215 inhibe FBXO3 y disminuye los niveles de proteína TRAF. Para establecer un vínculo mecánico entre la infección y la liberación de citoquinas, las células PBMC se trataron con LPS y las proteínas de señalización secuencia abajo se analizaron mediante inmunotransferencia. Se encontró que el LPS aumenta los niveles de proteína FBXO3, disminuye los niveles de proteína FBXL2 y aumenta los niveles de proteína TRAF (Fig. 10A). Por lo tanto, la señalización proinflamatoria por las acciones de la endotoxina podría estar mediada a través de la proteína FBXO3. BC-1215 se probó por primera vez en ensayos de ubiquitinación in vitro utilizando FBXL2 como sustrato. BC-1215 fue capaz de inhibir la poliubiquitinación de FBXL2 catalizada por FBXO3 (Fig. 10B). Las células MLE también se trataron con BC-1215 a diferentes concentraciones durante 16 h. Las células se recogieron y se ensayaron para determinar la inmunotransferencia de proteínas. Como se muestra en la Fig. 10C, BC-1215 aumentó los niveles de proteína FBXL2 de una manera dependiente de la dosis, disminuyendo a su vez los niveles de proteína TRAF. Otros sustratos FBXL2 conocidos, que incluyen ciclina D2, ciclina D3 y CCTalfa, sirvieron como controles positivos. También se observó que BC-1215 no alteró significativamente la progresión del ciclo celular de células Hela en las dosis terapéuticas (Fig. 10D). BC-1215 no alteró la actividad de COX-2 en comparación con el control positivo, DuP-697 (Fig. 10E). Estos últimos resultados sugieren fuertemente que BC-1215 y los agentes relacionados representan mecánicamente un nuevo género de antiinflamatorios que ejerce actividades independientes de los mecanismos utilizados por los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) que actúan como inhibidores de COX-2. Con base en el nuevo mecanismo de acción de BC-1215, la efectividad de este agente se probó en varios modelos de inflamación diferentes en ratones.

BC-1215 inhibe potentemente la liberación de citoquinas en un modelo de choque séptico inducido por α LPS. El compuesto BC-1215 se solubilizó primero en agua usando ácido acético en una relación molar de 1:2; la solución madre de BC-1215 fue de 5 mg/mL. Se administraron 500 μ g, 100 μ g, 20 μ g, 4 μ g y 0,8 μ g de BC-1215 a ratones a través de una inyección intraperitoneal (IP). Diez minutos más tarde, los ratones recibieron 100 μ g de LPS (*E. coli*) a través de una inyección IP. Noventa minutos más tarde, los ratones fueron sacrificados; la sangre se recogió y se analizó para los ensayos de citoquinas IL1- β , IL-6 y TNF α . Los resultados de la Fig. 11 indican que $IC_{50_{IL-1\beta}} = 1$ mg/kg, $IC_{50_{IL-6}} = 2,5$ mg/kg, $IC_{50_{TNF\alpha}} = 1,2$ mg/kg. Estos IC_{50} se consideran muy bajos, considerando que la dosis predicha de LD50 oral en ratón para BC-1215 es de 1,135 g/kg; por lo tanto, BC-1215 ejerce bioactividad muy por debajo de una dosis tóxica predicha in vivo.

BC-1215 inhibe la liberación de citoquinas en el modelo de sepsis de ligación y punción α cecal (CLP). El compuesto BC-1215 se solubilizó primero como anteriormente. Se administraron 100 μ g de BC-1215 a ratones a través de una inyección IP. Treinta minutos después, se realizó el CLP. Seis h más tarde, los ratones fueron sacrificados; la sangre se recolectó y se analizó para citoquinas IL1- β , IL-6 y TNF α . Como se muestra en la Fig. 12, los ratones tratados con CLP habían aumentado significativamente la liberación de citoquinas en comparación con los ratones tratados de forma simulada. Sin embargo, el BC-1215 fue capaz de atenuar significativamente la secreción inducida por CLP de las tres citoquinas proinflamatorias circulantes en ratones.

BC-1215 reduce la lesión pulmonar en neumonía inducida por *Pseudomonas*. Para probar el inhibidor BC-1215 de la caja F en neumonía, se administraron 100 μ g de BC-1215 a ratones mediante una inyección IP, los ratones se expusieron a la cepa PA103 de *Pseudomonas aeruginosa* (10^4 CFU/ratón) durante 18 h adicionales. Curiosamente, BC-1215 mejoró significativamente los efectos adversos de PA103 en la mecánica pulmonar. Específicamente, BC-1215 aumentó el cumplimiento, disminuyó la resistencia pulmonar y redujo la elastancia (Fig. 13A-D). BC-1215 también disminuyó la concentración de proteínas de lavado, los recuentos de células de lavado y los infiltrados celulares (Fig. 13E, F, G). Además, BC-1215 también disminuyó significativamente los niveles de citoquinas proinflamatorias de lavado en ratones infectados con PA103 (Fig. 13H).

BC-1215 mejora la lesión pulmonar inducida por influenza H1N1 in vivo. Para realizar una prueba adicional de BC-1215 en neumonía, los ratones se expusieron a H1N1 (10^5 PFU/ratón, it) y se observaron durante 9 días. Para el tratamiento con BC-1215, se añadió una solución madre (5 mg/mL) al agua de bebida (que contiene 2% de sacarosa) hasta la concentración final de 30 μ g/mL. La mecánica pulmonar se midió en el día 5. Específicamente, BC-1215 aumentó el cumplimiento, disminuyó la resistencia pulmonar y redujo la elastancia (Fig. 14A-C) en ratones infectados con H1N1. Además, BC-1215 aumentó significativamente su supervivencia con la neumonía H1N1 (Fig. 14D). BC-1215 también disminuyó notablemente la concentración de proteínas de lavado, los recuentos de células de lavado (Fig. 14E, F), el edema pulmonar y los infiltrados celulares (Fig. 14G, H).

BC-1215 reduce el edema de oreja inducido por TPA. La aplicación tópica de BC-1215 como agente antiinflamatorio se probó en un modelo de edema de oreja inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Bralley et al., *J Inflamm (Lond)*, 2008. 5: p.1). En resumen, se aplicaron 20 μ L de una solución de etanol de BC-1215 a las orejas de los ratones a razón de 8, 40 y 200 μ g/oreja durante 30 minutos después de la administración de TPA (2 μ g/oreja). Las comparaciones incluyeron volúmenes iguales de etanol (control del vehículo). Diez y ocho horas después de la administración de TPA, los ratones se sacrificaron; el grosor de la oreja se midió utilizando un micrómetro. También se tomaron de inmediato biopsias de punción de oreja, se pesaron y se graficaron. Como se muestra en la Fig. 15A, se observó edema de oreja

en los animales tratados con TPA a las 18 h después de su tratamiento. Sin embargo, BC-1215 fue capaz de resolver significativamente el edema. Como se muestra en la Fig. 15B-C, BC-1215 redujo significativamente el grosor y el peso de la oreja de una manera dependiente de la dosis en comparación con el control del vehículo. Estos estudios demuestran por primera vez que el inhibidor BC-1215 de FBXO3, al inhibir el desarrollo de edema, puede tener aplicabilidad tópica y, por lo tanto, puede tener un papel en los trastornos inflamatorios dermatológicos.

BC-1215 mejora el edema de pata inducido por carragenina. BC-1215 también se probó en un modelo de edema de pata de ratón para confirmar su actividad antiinflamatoria. Los ratones recibieron administración subplantar de 25 μ L de solución salina o 25 μ L de carragenina (1% en solución salina) (Posadas et al., Br J Pharmacol, 2004. 142 (2): páginas 331-8), seguido de una inyección IP de 200 μ g de BC-1215 diariamente. Cuarenta y ocho horas más tarde, los ratones fueron sacrificados; se midió el grosor y el volumen de la pata. Como se muestra en la Fig. 16A, se observó edema de pata en animales tratados con carragenina a las 48 h. Sin embargo, BC-1215 fue capaz de suprimir significativamente este efecto. Como se muestra en la Fig. 16B-C, BC-1215 redujo significativamente el grosor de la pata y el edema en comparación con el control del vehículo. Por lo tanto, el inhibidor BC-1215 de FBXO3 suprime la inflamación en un modelo no pulmonar de edema que involucra las extremidades.

BC-1215 mejora la colitis inducida por DSS. BC-1215 también se probó en un modelo de colitis de ratón para confirmar su actividad antiinflamatoria. En resumen, los ratones C57BL6 fueron alimentados con agua que contenía 3,5% de sulfato de dextrano sódico (DSS) por hasta cinco días. Los ratones se trataron con vehículo o 200 μ g de BC-1215 diariamente (a través de inyección de ip). Los ratones fueron luego sacrificados; se midió la longitud de los cólones. Como se muestra en la Fig. 17A, se observó una disminución significativa en la longitud del colon con ratones tratados con DSS, en consonancia con la inflamación del colon. Sin embargo, los ratones tratados con BC-1215 no mostraron una disminución significativa en la longitud del colon en comparación con el control. Se analizaron los niveles de citoquinas del tejido colónico. Como se muestra en la Fig. 17B-C, los ratones tratados con BC-1215 mostraron una reducción notable en los niveles de IL1 β y TNF α en tejidos de colon en comparación con los ratones tratados con vehículo. Además, BC-1215 redujo significativamente la lesión del tejido colónico en ratones tratados con DSS (Fig. 17D). Por lo tanto, el inhibidor BC-1215 de FBXO3 suprime la inflamación en el modelo de colitis inducida por compuestos químicos en ratones.

En resumen, en este documento se describe la primera evidencia de que la inflamación está mediada en parte por una nueva vía por la cual un componente de la ligasa E3 no reconocido previamente, FBXO3, desencadena la ubiquitinación y degradación de otra subunidad de la ligasa E3, FBXL2, aumentando así los niveles de proteínas TRAF. En esencia, FBXL2 parece ser un inhibidor de retroalimentación de la inflamación. Como TRAF son entradas moleculares críticas para la expresión del gen de citoquinas impulsadas por NF- κ B, la anulación de FBXO3 es capaz de prevenir la inducción de proteínas TRAF y suprimir la producción de citoquinas (Fig. 18). Por lo tanto, sobre la base de la estructura molecular única de FBXO3 como la pieza central de este descubrimiento, se generó un nuevo phylum de inhibidores de la molécula pequeña ApaG con base en la ligasa E3 de ubiquitina de la caja F que ejerce una profunda actividad antiinflamatoria en células humanas y en modelos complementarios de animales pequeños de inflamación y lesión del tejido.

BC-1215 inhibe la proliferación de *S. aureus*. BC-1215 se probó en pruebas de sensibilidad a los antibióticos utilizando agar Mueller-Hinton como se muestra en la Fig. 19. En resumen, se agregaron papeles filtro de 6 mm que contenían diferentes cantidades de BC-1215 o antibiótico gentamicina (control positivo) en el agar de Mueller-Hinton expuesto previamente a *Staphylococcus aureus*. Las placas se incubaron a 37 grados durante 24 h. Los tamaños de las zonas se midieron y se marcaron con un círculo rojo que indicaba resultados positivos. Los datos en el presente documento sugieren que el BC-1215 puede inhibir el crecimiento bacteriano a través de la proteína bacteriana ApaG.

Síntesis de inhibidores de FBXO3

Procedimiento general para la síntesis de BC-1202. Se añadió 4-(bencil-oxi)benzaldehído (0,01 mol, 2,12 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 μ L) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1202 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1203. Se añadió 4-(dimetilamino)benzaldehído (0,01 mol, 1,49 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 μ L) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1203 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1204. Se añadió 4-metoxi-benzaldehído (0,02 mol, 2,72 g) a una solución de etilendiamina (0,01 mol, ~700 μ L) en etanol anhidro (40 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 40

minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. El producto BC-1204 se extrajo luego con EtOAc y la capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1205. Se añadió 4-(4-morfolinil)benzaldehído (0,01 mol, 1,91 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1205 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1206. Se añadió 4-(1-pirrolidin)-benzaldehído (0,01 mol, 1,75 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1206 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1207. Se añadió 4-(1H-imidazol-1-il)benzaldehído (0,01 mol, 1,72 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 moles) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1207 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1208. Se añadió 4-acetilbenzaldehído (0,01 mol, 1,48 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se sometió a reflujo y se agitó durante 60 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1208 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1209. Se añadió 2-hidroxibenzaldehído (0,01 mol, 1,22 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 10 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1209 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1210. Se añadió 4-hidroxibenzaldehído (0,01 mol, 1,22 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 10 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1210 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en etanol.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1211. Se añadió 4-(trifluorometoxi)benzaldehído (0,01 mol, 1,9 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 60 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la

adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. El producto BC-1211 se extrajo luego con EtOAc y la capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío.

5 Procedimiento general para la síntesis de BC-1212. Se añadió 4-(dimetilamino)benzaldehído (0,01 mol, 1,49 g) a una solución de 1,2-fenilendiamina (0,005 mol, 0,54 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 30 min. La reacción se enfrió hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff.
10 Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1212 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

15 Procedimiento general para la síntesis de BC-1213. Se añadió 4-(dimetilamino)benzaldehído (0,01 mol, 1,49 g) a una solución de (+/-)-trans-1,2-diaminociclohexano (0,005 mol, 0,57 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff.
20 Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1213 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

25 Procedimiento general para la síntesis de BC-1214. Se añadió 4-(1-piperidinil)benzaldehído (0,01 mol, 1,89 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se sometió a reflujo y se agitó durante 30 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1214 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.
30

35 Procedimiento general para la síntesis de BC-1215. Se añadió 4-(2-piridinil)benzaldehído (0,01 mol, 1,83 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 30 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff correspondiente. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1215 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

40 Procedimiento general para la síntesis de BC-1216. Se añadió 3,4,5-trimetoxibenzaldehído (0,01 mol, 1,96 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 30 min. La reacción se enfrió hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff.
45 Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1216 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

50 Procedimiento general para la síntesis de BC-1217. Se añadió 4-(1-pirrolidin)-benzaldehído (0,01 mol, 1,75 g) a una solución de (+/-)-trans-1,2-diaminociclohexano (0,005 mol, 0,57 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff.
55 Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1217 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

60 Procedimiento general para la síntesis de BC-1218. Se añadió 4-(1-piperidinil)benzaldehído (0,01 mol, 1,89 g) a una solución de (+/-)-trans-1,2-diaminociclohexano (0,005 mol, 0,57 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se

- 5 separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1218 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.
- 10 Procedimiento general para la síntesis de BC-1220. Se añadió 4-(4-morfolinil)benzaldehído (0,01 mol, 1,91 g) a una solución de (+/-)-trans-1,2-diaminociclohexano (0,005 moles, 0,57 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1220 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.
- 15 Procedimiento general para la síntesis de BC-1232. Se añadió 4-(1-pirrolidin)benzaldehído (0,01 mol, 1,75 g) a una solución de 1,2-fenilendiamina (0,005 mol, 0,54 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se sometió a reflujo y se agitó durante 30 min. La reacción se enfrió hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1232 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.
- 20 Procedimiento general para la síntesis de BC-1233. Se añadió 4-(1-pirrolidin)-benzaldehído (0,01 mol, 1,75 g) a una solución de (1S,2S)-(+)-1,2-diaminociclohexano (0,005 mol, 0,57 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1233 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.
- 25 30 Procedimiento general para la síntesis de BC-1234. Se añadió 4-(1-pirrolidin)-benzaldehído (0,01 mol, 1,75 g) a una solución de 1,4-diaminobutano (0,005 mol, 0,44 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1234 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.
- 35 40 Procedimiento general para la síntesis de BC-1239. Se añadió 4-(1-pirrolidin)benzaldehído (0,01 mol, 1,75 g) a una solución de 1,3-diaminopropano (0,005 mol, 0,37 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1239 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.
- 45 50 Procedimiento general para la síntesis de BC-1241. Se añadió 4-(2-piridinil)benzaldehído (0,005 mol, 0,92 g), 4-fluorobenzaldehído (0,005 mol, 0,62 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~ 350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se sometió a reflujo y se agitó durante 60 min. La reacción se enfrió hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1241 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.
- 55 60 Procedimiento general para la síntesis de BC-1248. Se añadió 4-(2-piridinil)benzaldehído (0,005 mol, 0,92 g), 2-piridincarboxaldehído (0,005 mol, 0,53 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL).

La solución resultante se sometió a reflujo y se agitó durante 60 min. La reacción se enfrió hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1248 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1250. Se añadió 4-(1H-pirazol-1-il)benzaldehído (0,004 mol, 0,7 g) a una solución de etilendiamina (0,002 mol, ~ 140 µL) en etanol anhidro (10 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 15 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. El solvente se eliminó luego por evaporación rotatoria y se agregaron 20 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1250 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1251. Se añadió 5-cloro-2-hidroxibenzaldehído (0,01 mol, 1,56 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~ 350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1251 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1252. Se añadió 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (0,01 mol, 1,52 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1252 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1253. Se añadió 2,4-dihidroxibenzaldehído (0,01 mol, 1,38 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~ 350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1253 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1254. Se añadió 4-(2-piridinil)benzaldehído (0,01 mol, 1,83 g) a una solución de 1,4-diaminobutano (0,005 mol, 0,44 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1254 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1255. Se añadió 4-(2-piridinil)benzaldehído (0,01 mol, 1,83 g) a una solución de 1,3-diamino-2-propanol (0,005 mol, 0,45 g) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1255 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

Procedimiento general para la síntesis de BC-1256. Se añadió 2-(2-hidroxietoxi)benzaldehído (0,01 mol, 1,66 g) a una solución de etilendiamina (0,005 mol, ~350 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 40 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 30 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,02 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la

adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. Luego se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se agregaron 40 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1256 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

5 Procedimiento general para la síntesis de BC-1257. 4-trifluorometoxi)Salicilaldehído (0,004 mol, 0,82 g) se añadieron a una solución de etilendiamina (0,002 mol, ~ 140 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 40 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 15 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,01 moles) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. El solvente se eliminó luego por evaporación rotatoria y se agregaron 20 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1257 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

15 Procedimiento general para la síntesis de BC-1258. Se añadió 4-(1,3-tiazol-2-il)benzaldehído (0,004 mol, 0,76 g) a una solución de etilendiamina (0,002 mol, ~140 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 15 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,01 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. El solvente se eliminó luego por evaporación rotatoria y se agregaron 20 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1258 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

25 Procedimiento general para la síntesis de BC-1259. Se añadió 4-(2-tienil)benzaldehído (0,004 mol, 0,76 g) a una solución de etilendiamina (0,002 mol, ~ 140 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 40 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 15 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,01 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. El solvente se eliminó luego por evaporación rotatoria y se agregaron 20 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1259 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

30 Procedimiento general para la síntesis de BC-1260. Se añadió 4-(2-furil)benzaldehído (0,004 mol, 0,69 g) a una solución de etilendiamina (0,002 mol, ~ 140 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 40 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 15 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,01 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. El solvente se eliminó luego por evaporación rotatoria y se agregaron 20 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1260 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

40 Procedimiento general de síntesis de BC-1261. Se añadió 4-(pirimidin-2-il)benzaldehído (0,004 mol, 0,74 g) a una solución de etilendiamina (0,002 mol, ~ 140 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 30 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff correspondiente. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 15 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,01 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. El solvente se eliminó luego por evaporación rotatoria y se agregaron 20 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1261 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

45 Procedimiento general para la síntesis de BC-1262. Se añadió 4-fenilbenzaldehído (0,004 mol, 0,73 g) a una solución de etilendiamina (0,002 mol, ~140 µL) en etanol anhidro (20 mL). La solución resultante se calentó y se agitó durante 20 minutos hasta la precipitación de la base de Schiff relevante. Las bases de Schiff se separaron por filtración y se lavaron con etanol frío. La base de Schiff se añadió luego a 15 mL de metanol absoluto. Se disolvió una solución al 10% de borohidruro de sodio (0,01 mol) en metanol absoluto y se añadió a la base de Schiff. Cuando se completó la adición gota a gota de borohidruro de sodio, la solución de reacción se sometió a reflujo durante 15 minutos adicionales. El solvente se eliminó luego por evaporación rotatoria y se agregaron 20 mL de agua fría para liberar la amina secundaria. La precipitación de BC-1262 se recogió, se lavó con agua y se secó, seguido de recristalización en acetato de etilo.

55 En vista de las muchas realizaciones posibles a las que se pueden aplicar los principios de la invención divulgada, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas son solo ejemplos preferidos de la invención y no deben tomarse como limitantes del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE PITTSBURGH – DEL SISTEMA DE LA MANCOMUNIDAD DE LA EDUCACIÓN SUPERIOR DEL GOBIERNO DE LOS ESTADOS UNIDOS REPRESENTADO POR EL DEPARTAMENTO DE ASUNTOS DE

VETERANOS, Chen, Beibei Mallampalli, Rama K.

<120> INHIBIDORES DE FBXO3

<130> 8123-89258-02

<150> US 61/657.423

5 <151> 2012-06-08

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 471

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (278) .. (400)

15 <223> motivo ApaG

<400> 1

```

Met Ala Ala Met Glu Thr Glu Thr Ala Pro Leu Thr Leu Glu Ser Leu
 1          5          10          15

Pro Thr Asp Pro Leu Leu Leu Ile Leu Ser Phe Leu Asp Tyr Arg Asp
 20          25          30

Leu Ile Asn Cys Cys Tyr Val Ser Arg Arg Leu Ser Gln Leu Ser Ser
 35          40          45

His Asp Pro Leu Trp Arg Arg His Cys Lys Lys Tyr Trp Leu Ile Ser
 50          55          60

Glu Glu Glu Lys Thr Gln Lys Asn Gln Cys Trp Lys Ser Leu Phe Ile
 65          70          75          80

Asp Thr Tyr Ser Asp Val Gly Arg Tyr Ile Asp His Tyr Ala Ala Ile
 85          90          95

Lys Lys Ala Trp Asp Asp Leu Lys Lys Tyr Leu Glu Pro Arg Cys Pro
 100         105         110

Arg Met Val Leu Ser Leu Lys Glu Gly Ala Arg Glu Glu Asp Leu Asp
 115         120         125
    
```

ES 2 734 567 T3

Ala Val Glu Ala Gln Ile Gly Cys Lys Leu Pro Asp Asp Tyr Arg Cys
130 135 140

Ser Tyr Arg Ile His Asn Gly Gln Lys Leu Val Val Pro Gly Leu Leu
145 150 155 160

Gly Ser Met Ala Leu Ser Asn His Tyr Arg Ser Glu Asp Leu Leu Asp
165 170 175

Val Asp Thr Ala Ala Gly Gly Phe Gln Gln Arg Gln Gly Leu Lys Tyr
180 185 190

Cys Leu Pro Leu Thr Phe Cys Ile His Thr Gly Leu Ser Gln Tyr Ile
195 200 205

Ala Val Glu Ala Ala Glu Gly Arg Asn Lys Asn Glu Val Phe Tyr Gln
210 215 220

Cys Pro Asp Gln Met Ala Arg Asn Pro Ala Ala Ile Asp Met Phe Ile
225 230 235 240

Ile Gly Ala Thr Phe Thr Asp Trp Phe Thr Ser Tyr Val Lys Asn Val
245 250 255

Val Ser Gly Gly Phe Pro Ile Ile Arg Asp Gln Ile Phe Arg Tyr Val
260 265 270

His Asp Pro Glu Cys Val Ala Thr Thr Gly Asp Ile Thr Val Ser Val
275 280 285

Ser Thr Ser Phe Leu Pro Glu Leu Ser Ser Val His Pro Pro His Tyr
290 295 300

Phe Phe Thr Tyr Arg Ile Arg Ile Glu Met Ser Lys Asp Ala Leu Pro
305 310 315 320

Glu Lys Ala Cys Gln Leu Asp Ser Arg Tyr Trp Arg Ile Thr Asn Ala
325 330 335

Lys Gly Asp Val Glu Glu Val Gln Gly Pro Gly Val Val Gly Glu Phe
340 345 350

Pro Ile Ile Ser Pro Gly Arg Val Tyr Glu Tyr Thr Ser Cys Thr Thr
355 360 365

Phe Ser Thr Thr Ser Gly Tyr Met Glu Gly Tyr Tyr Thr Phe His Phe

ES 2 734 567 T3

370

375

380

Leu Tyr Phe Lys Asp Lys Ile Phe Asn Val Ala Ile Pro Arg Phe His
 385 390 395 400

Met Ala Cys Pro Thr Phe Arg Val Ser Ile Ala Arg Leu Glu Met Gly
 405 410 415

Pro Asp Glu Tyr Glu Glu Met Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 420 425 430

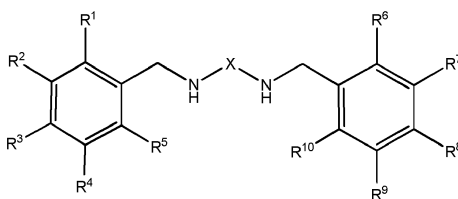
Glu Asp Glu Asp Asp Asp Ser Ala Asp Met Asp Glu Ser Asp Glu Asp
 435 440 445

Asp Glu Glu Glu Arg Arg Arg Arg Val Phe Asp Val Pro Ile Arg Arg
 450 455 460

Arg Arg Cys Ser Arg Leu Phe
 465 470

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura de fórmula II:



en el que X es un alcanodiilo que tiene una estructura de $-C_nH_{2n}-$ en la que n es 2 a 5; y

5 $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9$ y R^{10} son cada uno individualmente H, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterocíclico opcionalmente sustituido, halógeno, amino o hidroxilo, siempre y cuando al menos uno de R^3 o R^8 es un N-heterocíclico de 5 miembros o 6 miembros;

10 en el que el N-heterocíclico se selecciona entre pirrolilo, H-pirrolilo, pirrolinilo, piperidinilo, oxazolilo, oxadiazolilo, isoxazolilo, furazanilo, isotiazolilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolilo, tetrazolilo, ditiazolilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piperazinilo o triazinilo,

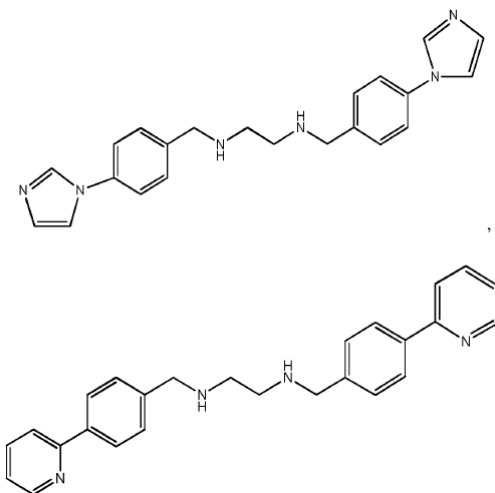
en el que X es $-CH_2-CH_2-$, o R^3 y R^8 son cada uno pirimidinilo, o X es $-CH_2-CH_2-$ y R^3 y R^8 son cada uno pirimidinilo.

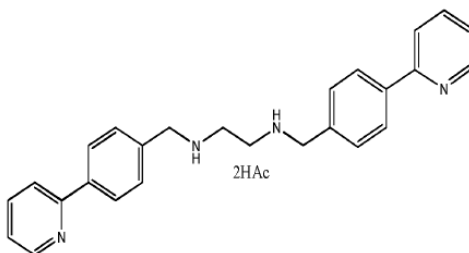
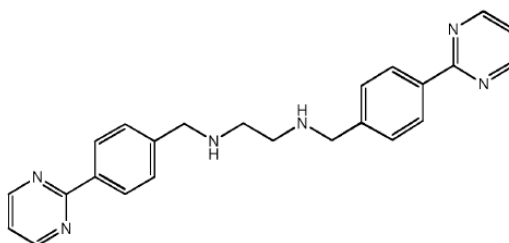
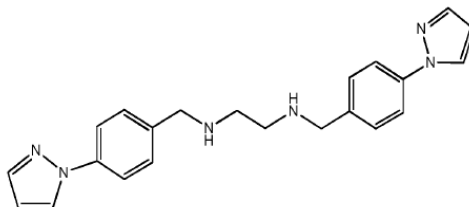
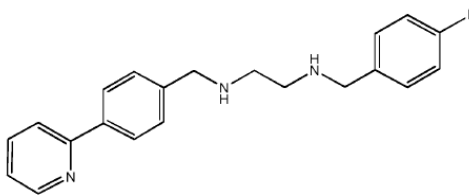
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^3 es pirimidinilo y R^8 es pirimidinilo.

15 3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el N-heterocíclico se selecciona de imidazolilo, piridilo, pirazolilo, oxadiazolilo o pirimidinilo, preferiblemente pirimidinilo.

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que X es $-CH_2-CH_2-$.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona de:





6. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable.
- 5 7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en un método para tratar un trastorno inflamatorio en un sujeto, preferiblemente en el que el trastorno inflamatorio es asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, neumonitis, neumonía, fibrosis quística, psoriasis, artritis/artritis reumatoide, rinitis, faringitis, cistitis, prostatitis, dermatitis, alergia, nefritis, conjuntivitis, encefalitis, meningitis, oftalmitis, uveítis, pericarditis, miocarditis, aterosclerosis, inflamación relacionada con el virus de inmunodeficiencia humana, diabetes, osteoartritis, artritis psoriásica, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis, sepsis, vasculitis, bursitis, enfermedad del tejido conectivo, enfermedades autoinmunes, inflamación viral o inducida por influenza, o edema, o el trastorno inflamatorio es inducido por infección con *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Escherichia coli*.
- 10 8. El compuesto para el uso de la reivindicación 7, en el que el trastorno inflamatorio es una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sepsis o neumonía.
- 15 9. El compuesto de la reivindicación 3, para uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sepsis o neumonía.
10. El compuesto de la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

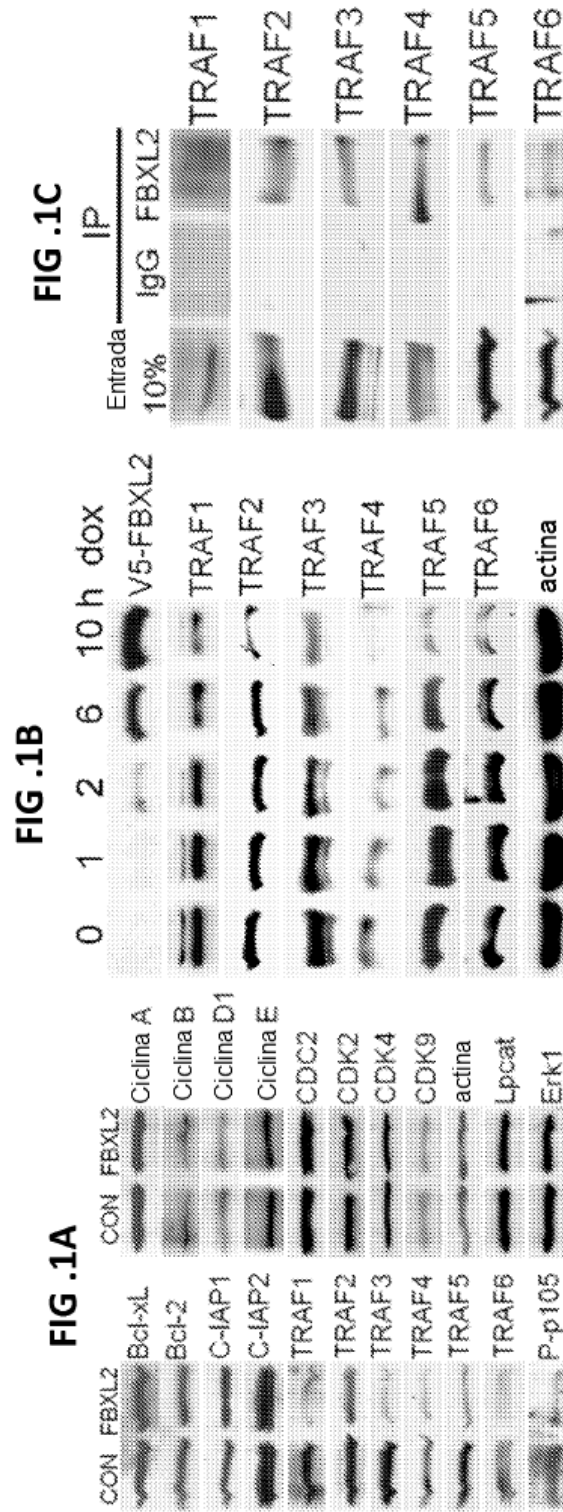


FIG .1E

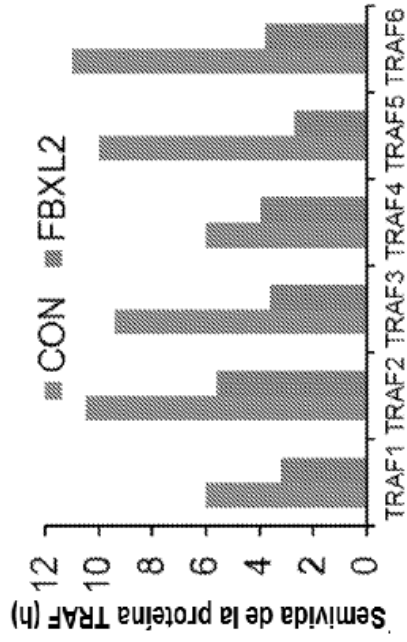


FIG .1D

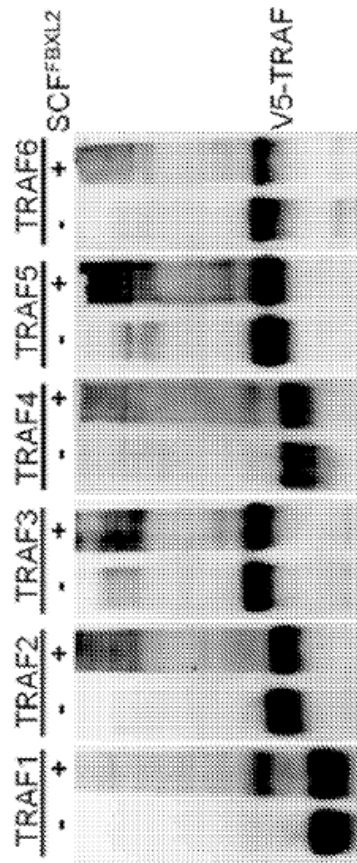


FIG. 2A

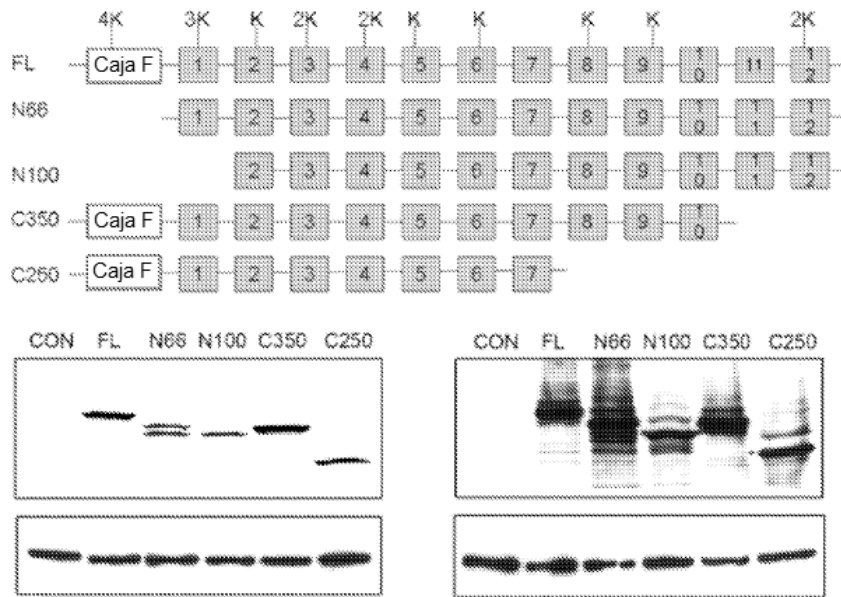


FIG. 2B

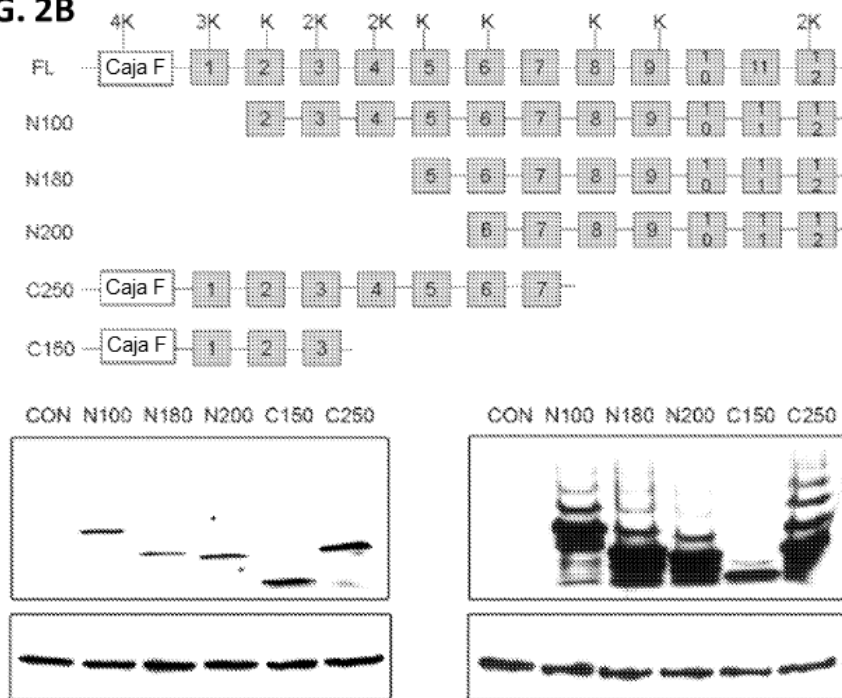


FIG. 2C

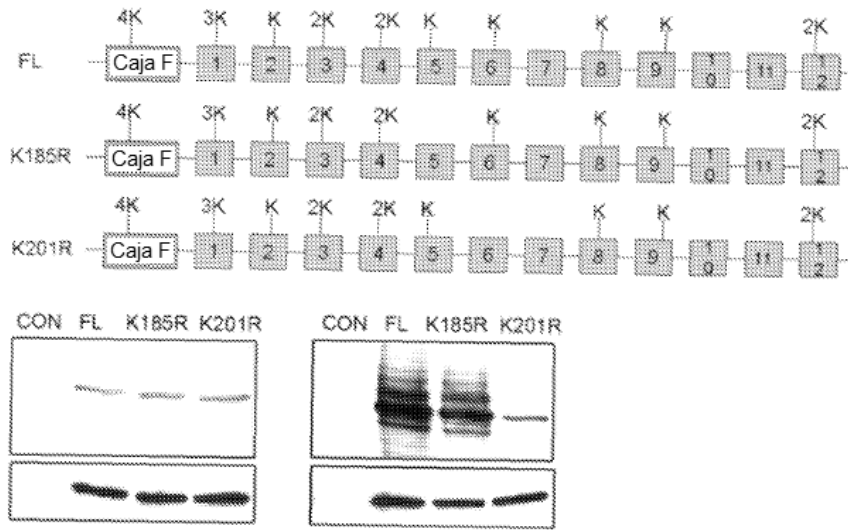


FIG. 2D

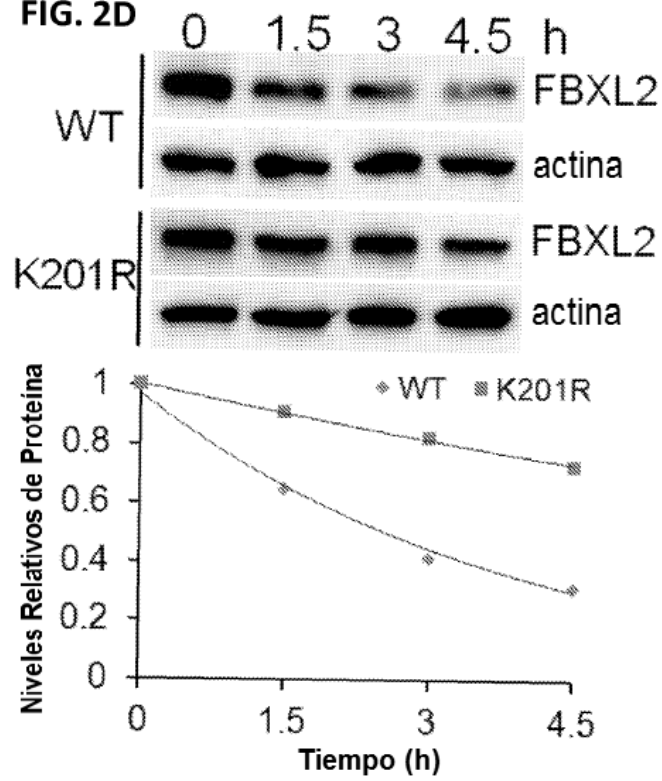


FIG. 3A

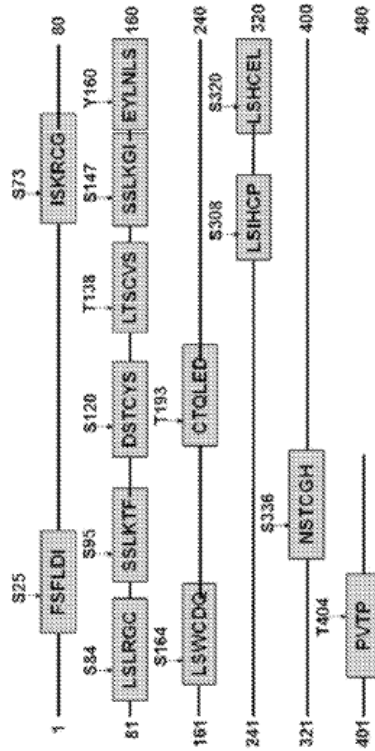


FIG. 3B

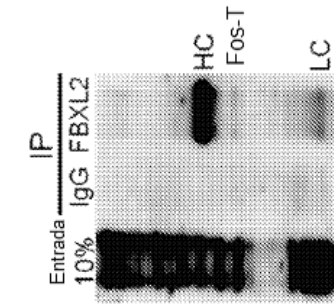


FIG. 3C

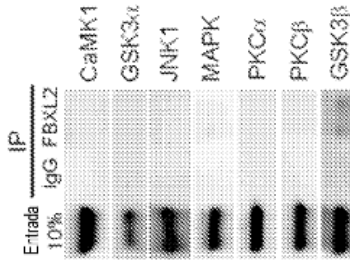


FIG. 3D



FIG. 3E

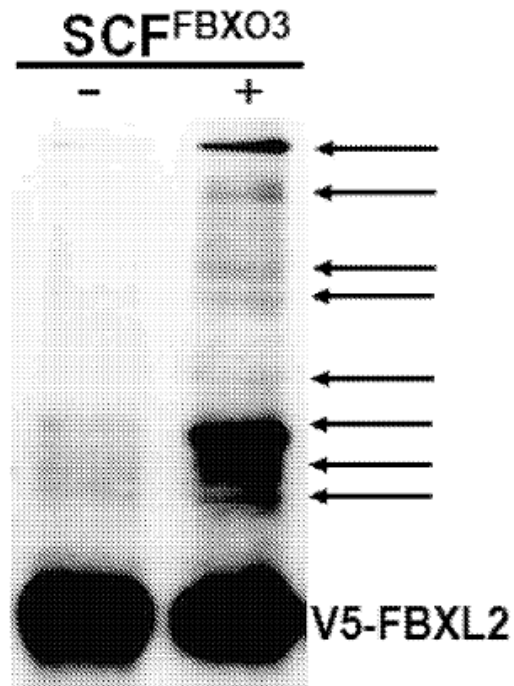


FIG. 3F

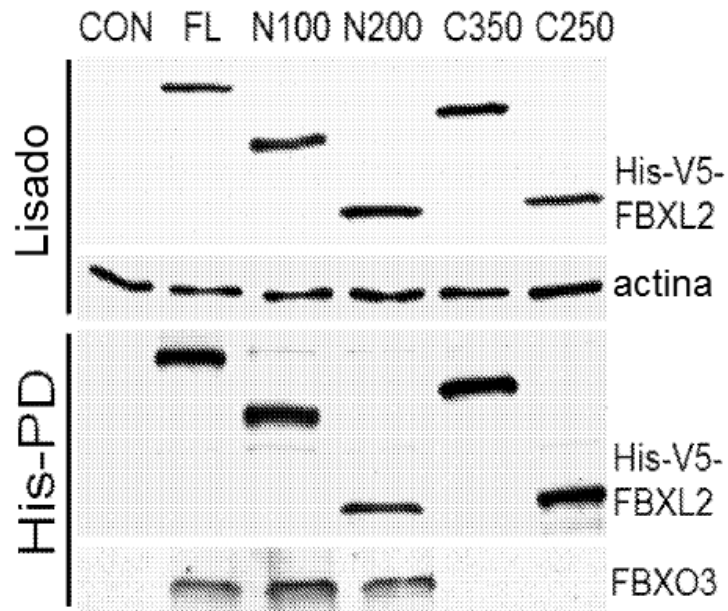


FIG. 3G

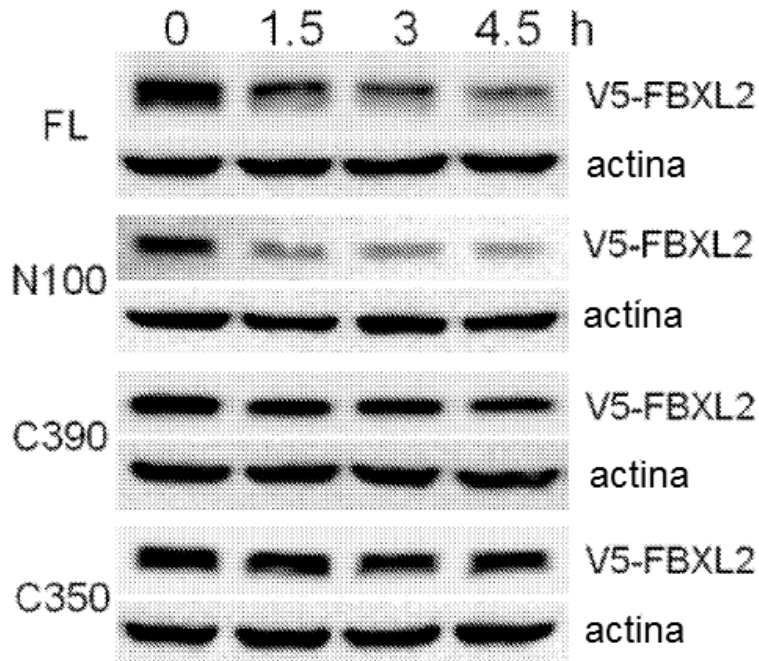


FIG. 3H

Sitio de fosforilación GSK3 β

Secuencia de consenso FBXL2	PX _p TP 402 PV _p TP
-----------------------------------	--

FIG. 3I

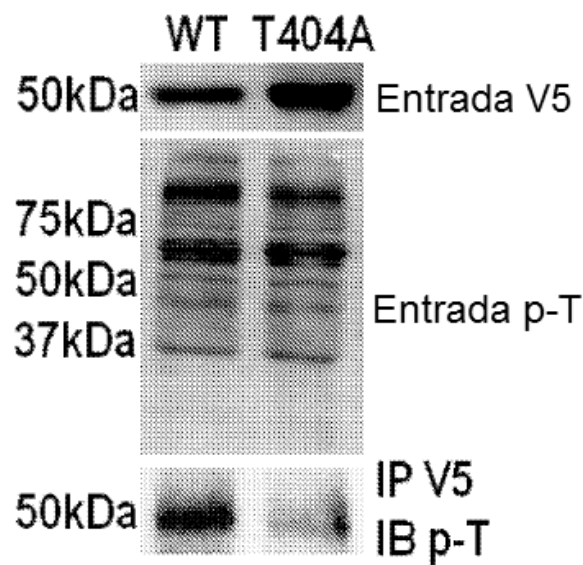


FIG. 3J

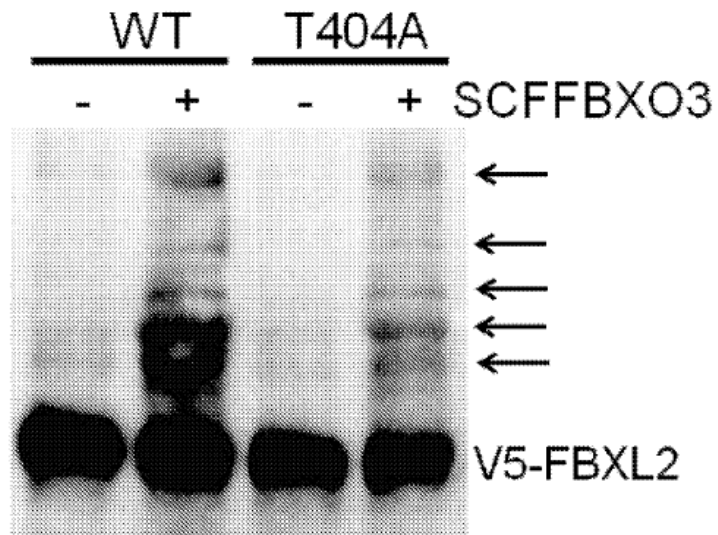


FIG. 3K

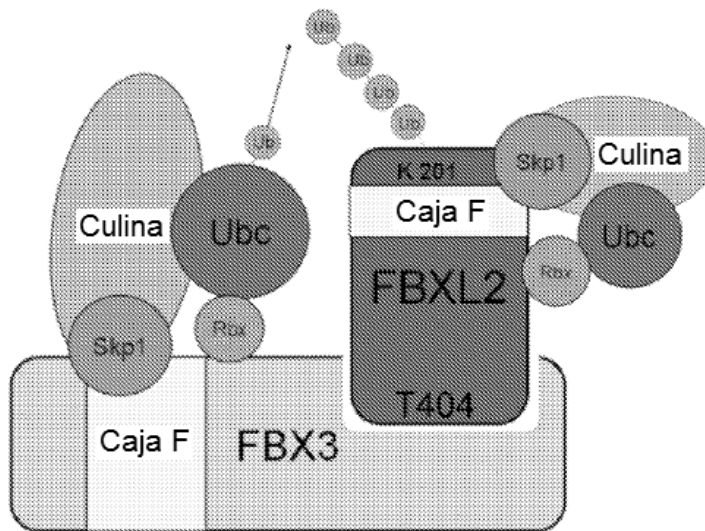


FIG. 4A

SNP ID	Chr	Pos	Secuencia	Cambio de AA
rs1423964	3	377334	GACATTTGGAGAAATAT	V223K
rs23656323	3	377334	TTCATTTTGGTGGC	

SNP ID	Chr	Pos	Secuencia	Cambio de AA	Alelos de Comprobación de la Muestra	
					Grupo Individual	Recuento Comarido de muestra
rs234423443	3	442343	TTCATTTTGGTGGC	1	Europeo	43
					Africano	46
rs23656323	3	377334	GACATTTGGAGAAATAT	1	Europeo	48
					Asiático	223
rs23656323	3	377334	GACATTTGGAGAAATAT	1	Europeo	90
					Asiático	88
rs23656323	3	377334	GACATTTGGAGAAATAT	1	Africano	120
					Italiano	174
rs23656323	3	377334	GACATTTGGAGAAATAT	1	Europeo	123
					Asiático	90
rs23656323	3	377334	GACATTTGGAGAAATAT	1	Asiático	90
					Africano	120

FIG. 4B
Discriminación Alélica de FBXO3

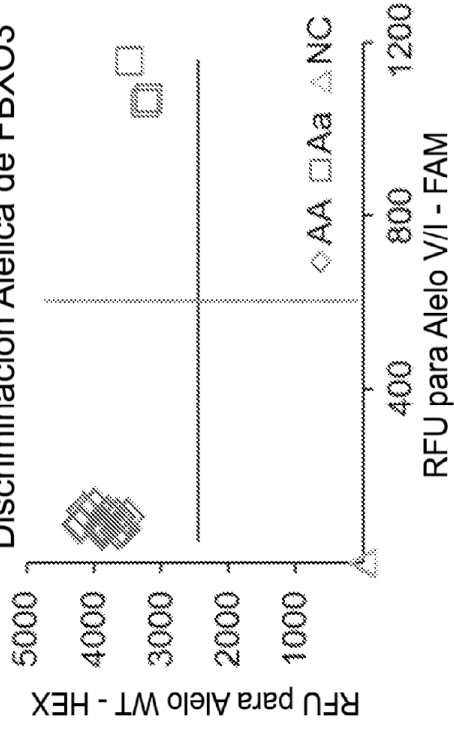
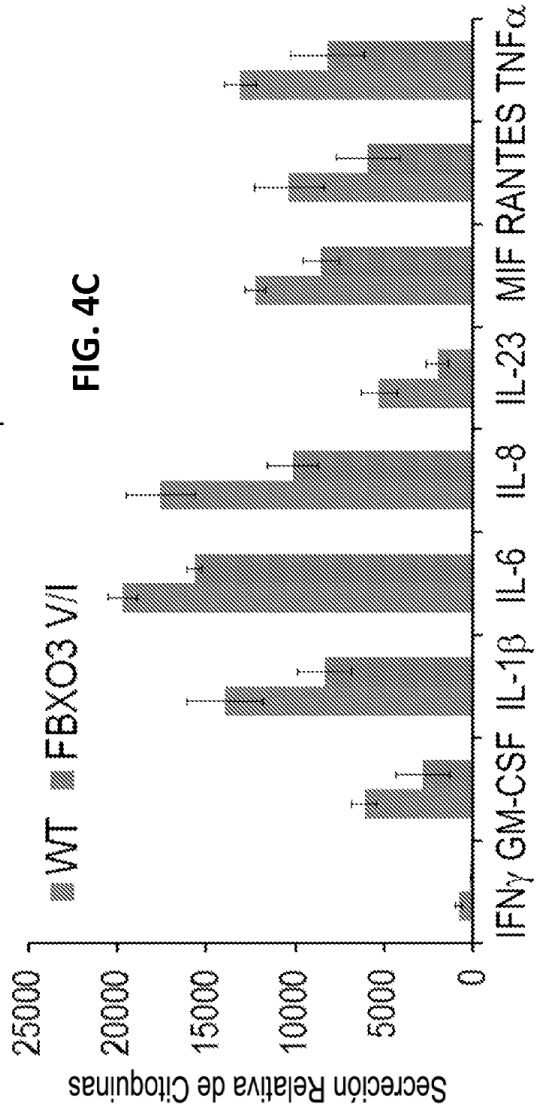
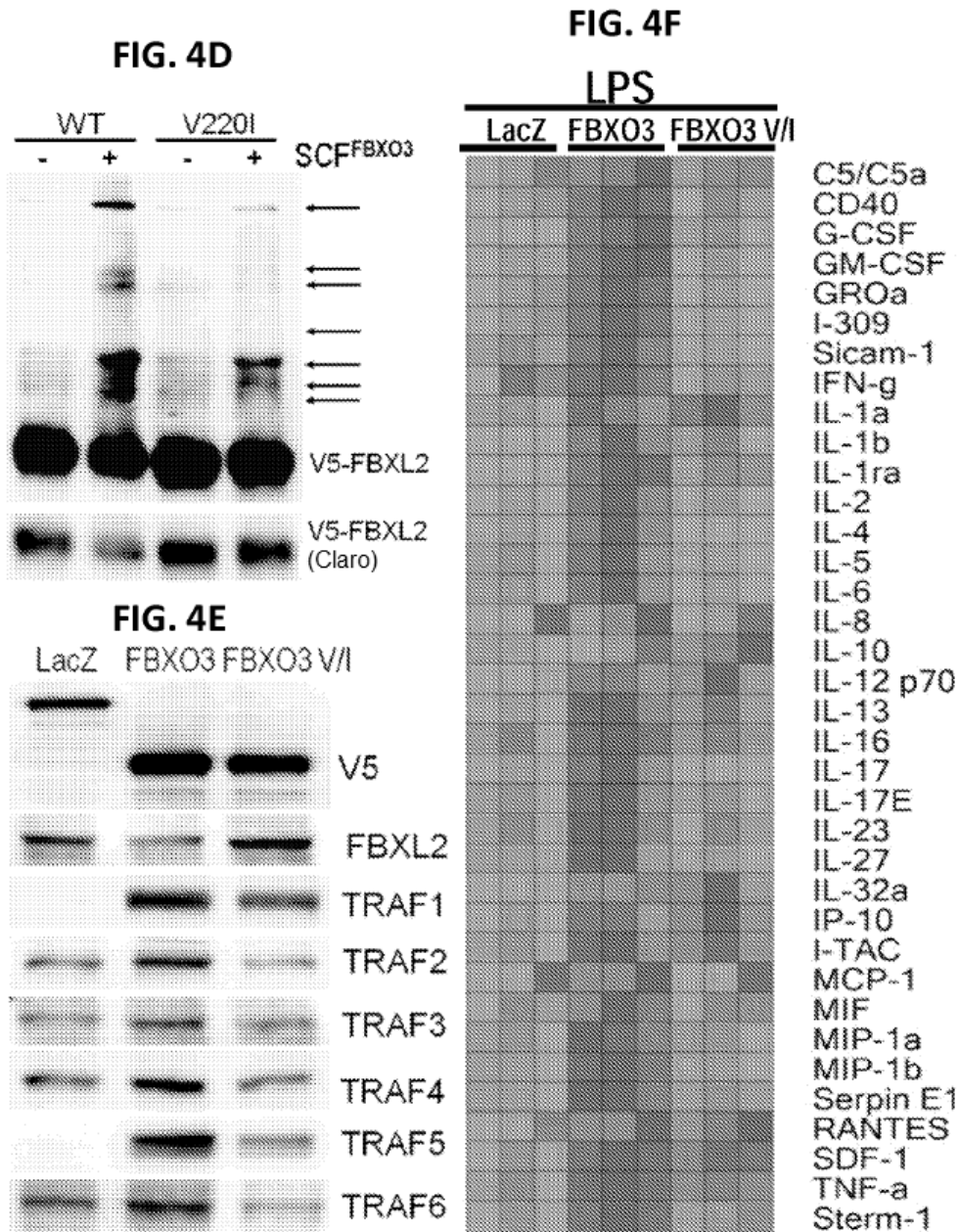
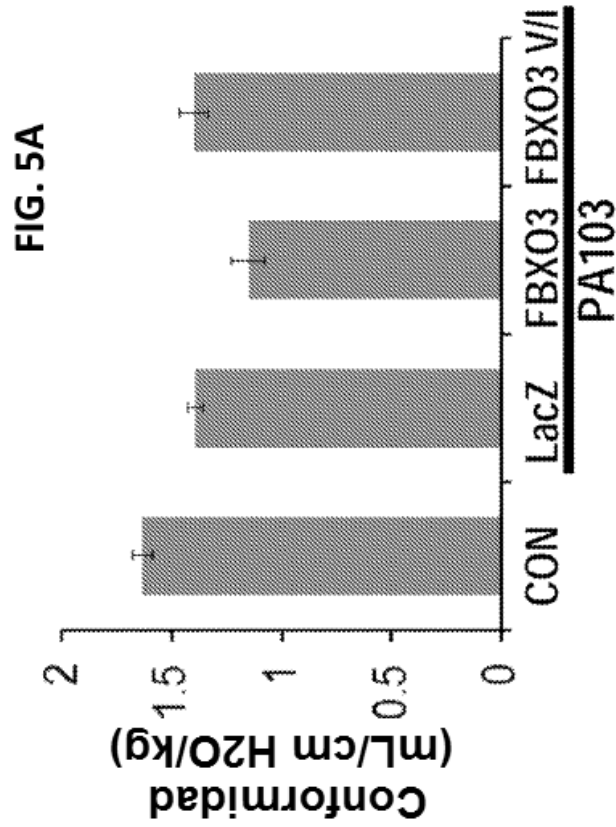
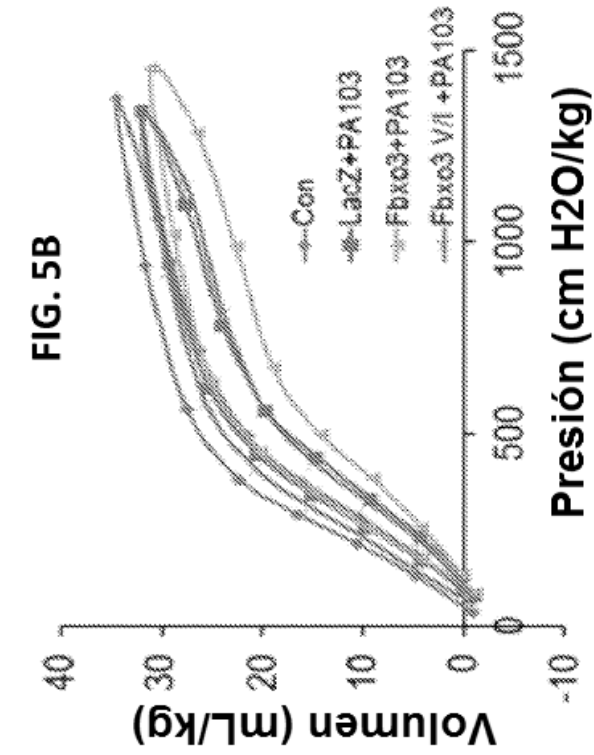
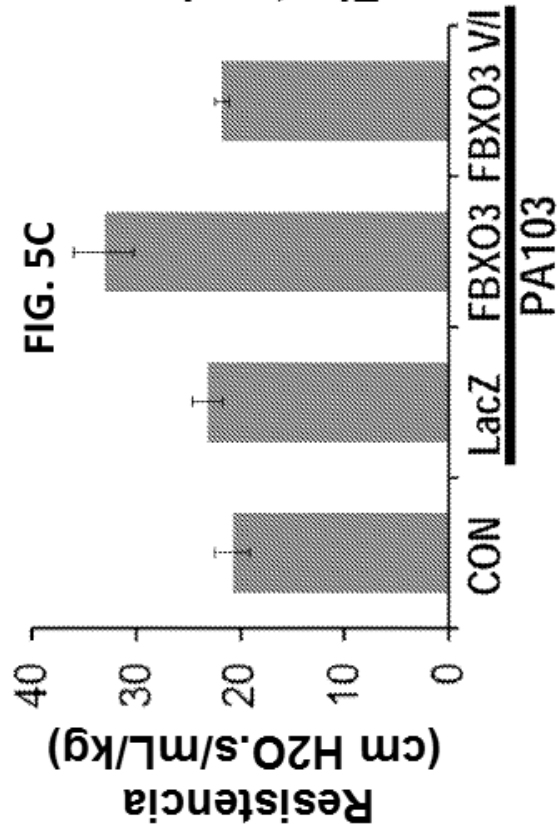
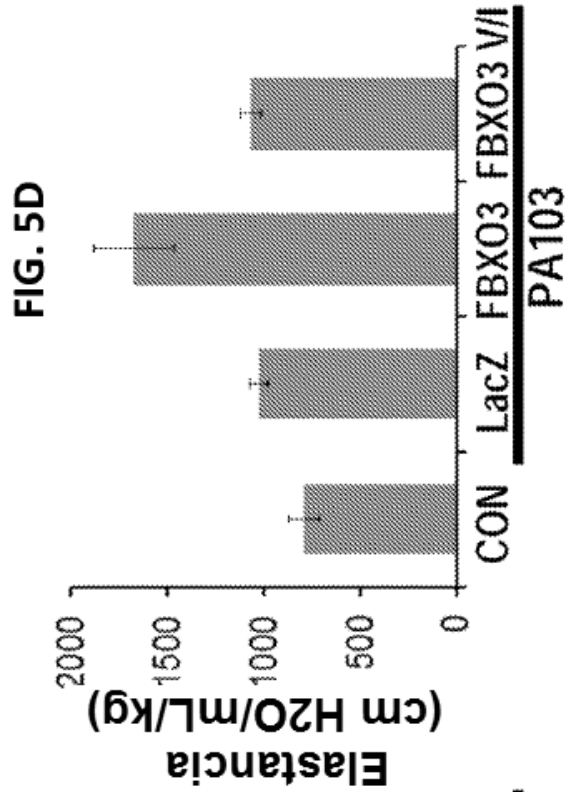


FIG. 4C









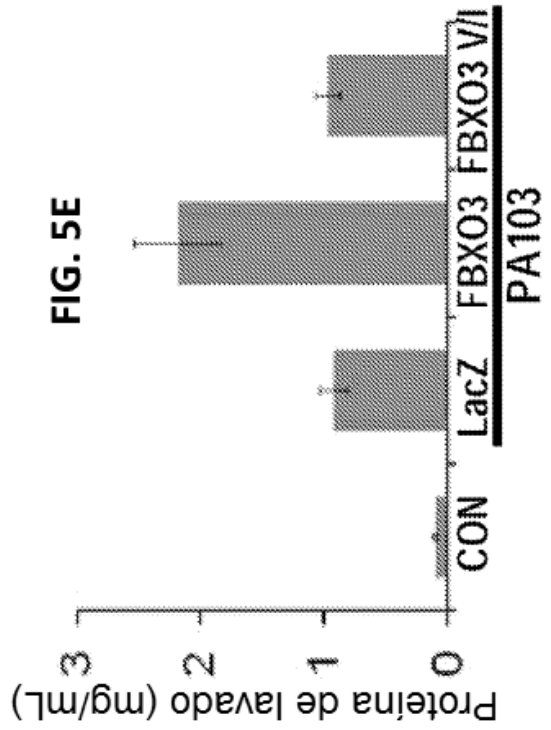
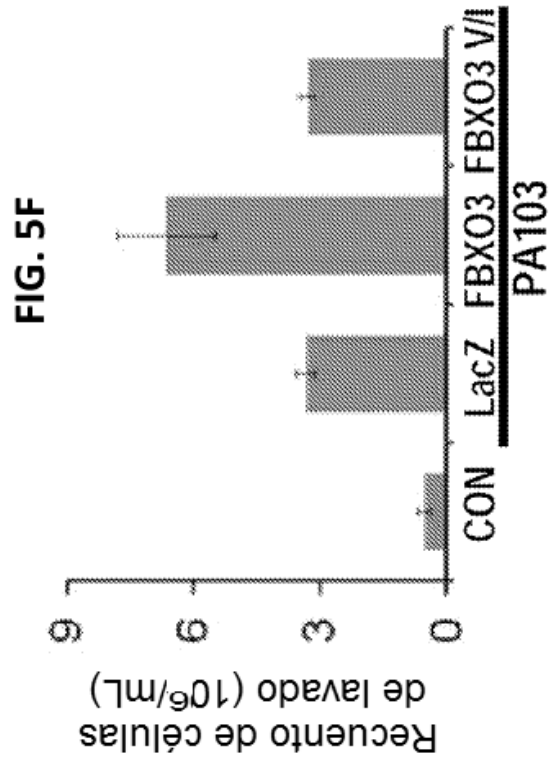
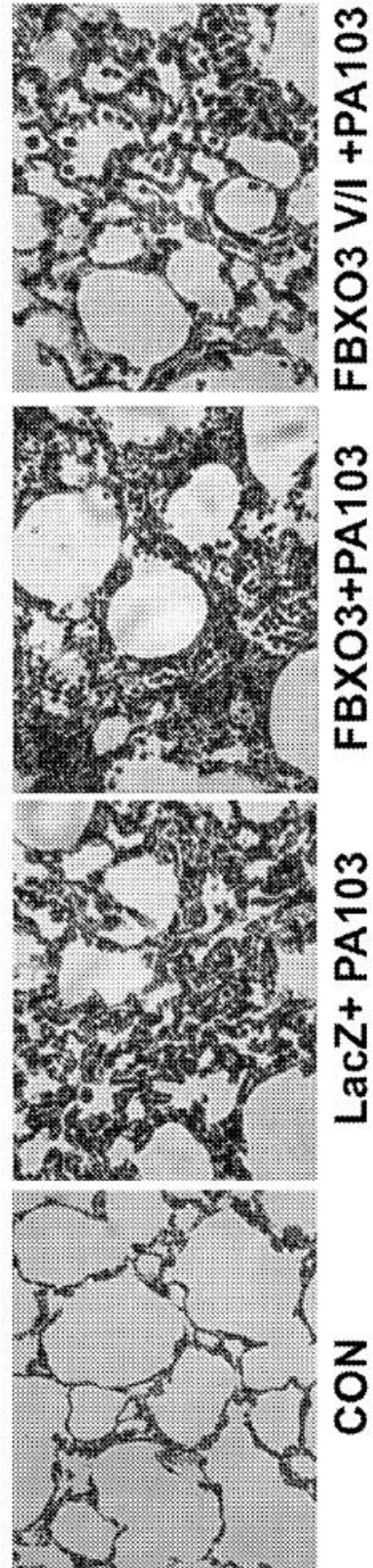


FIG. 5G



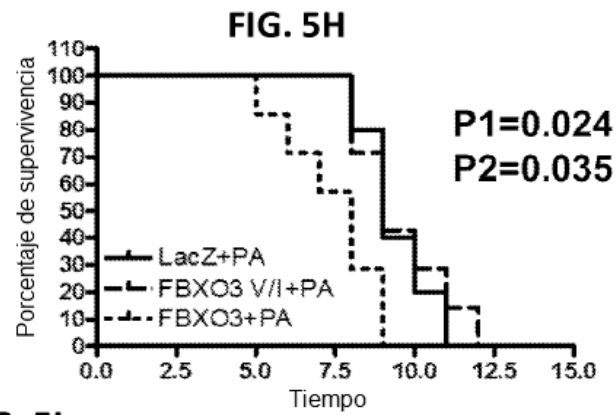


FIG. 5I

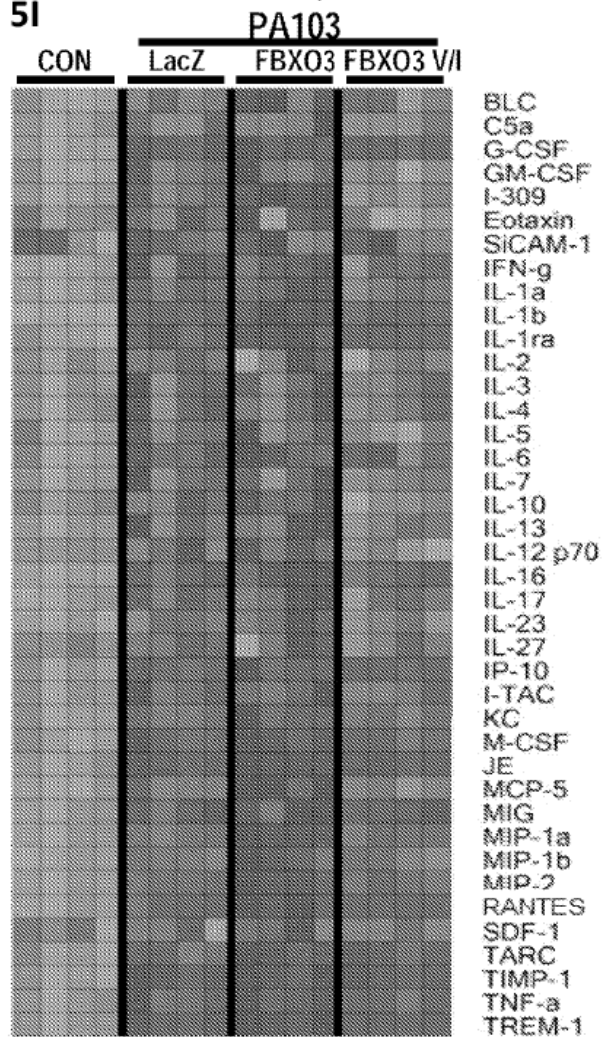


FIG. 6B

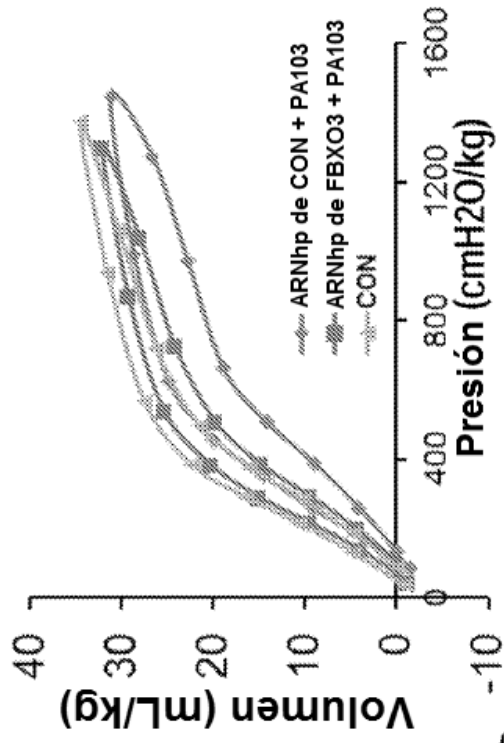
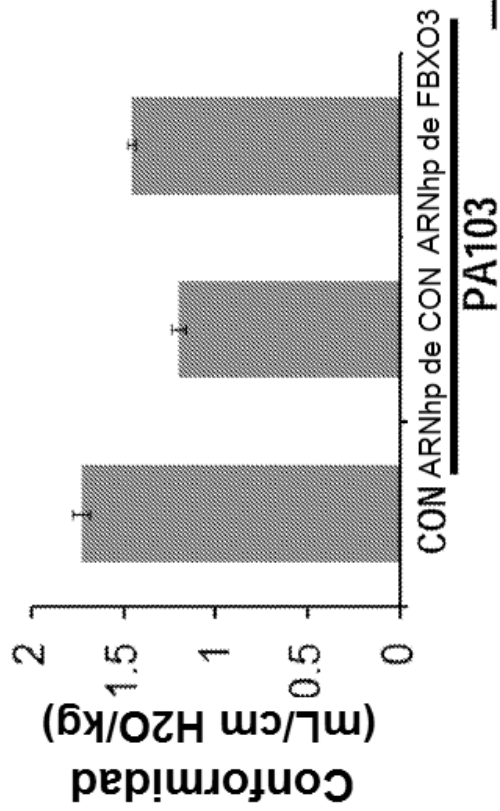
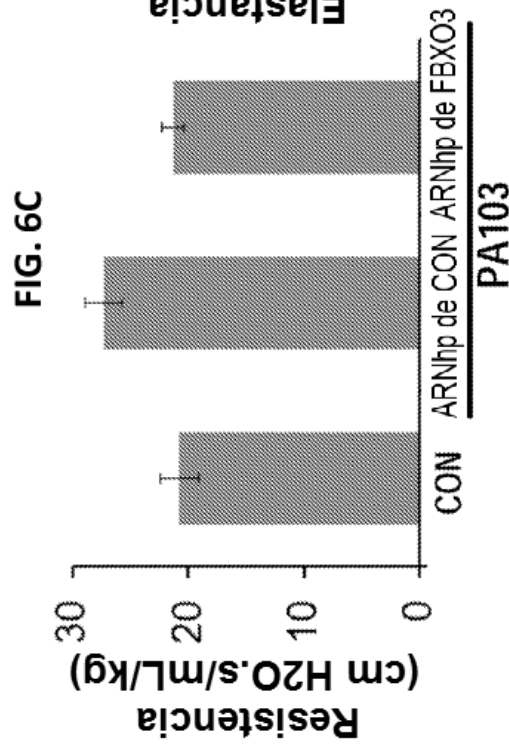
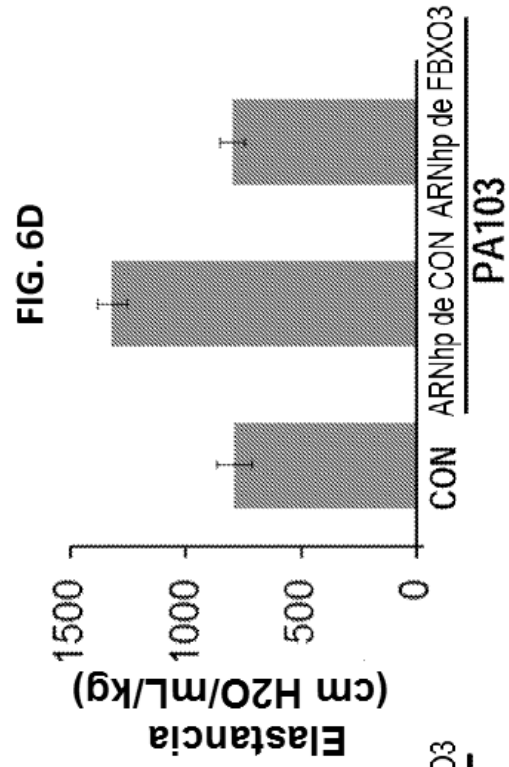


FIG. 6A





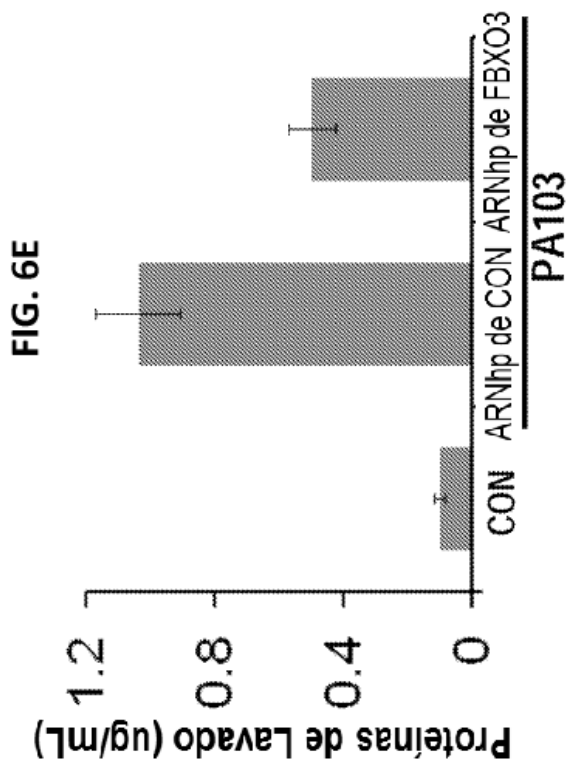
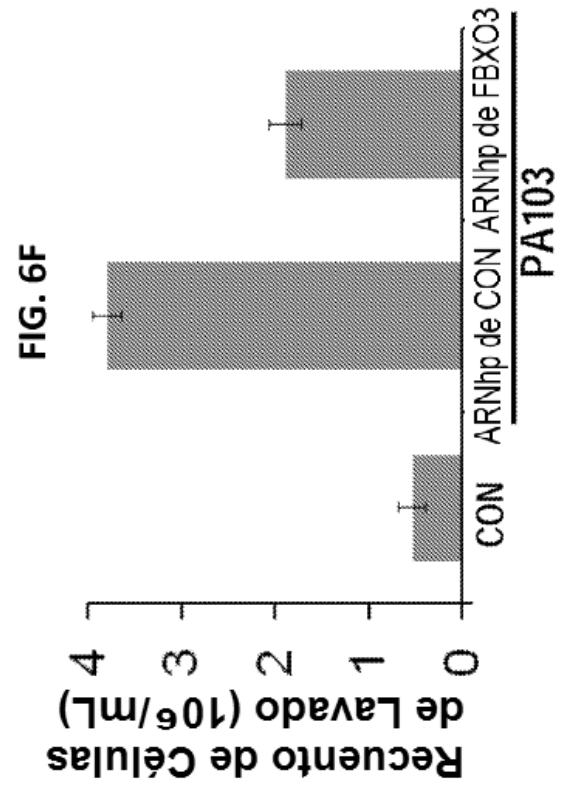
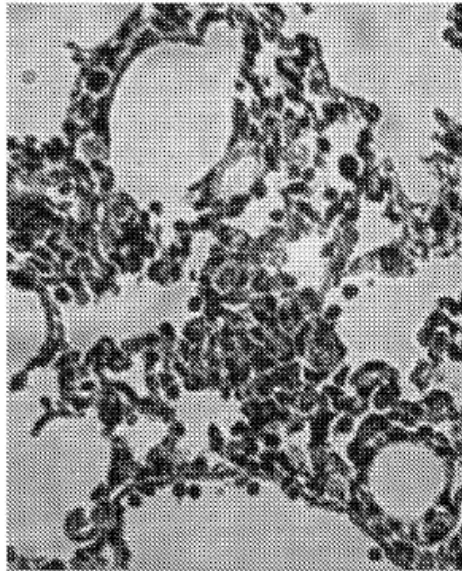
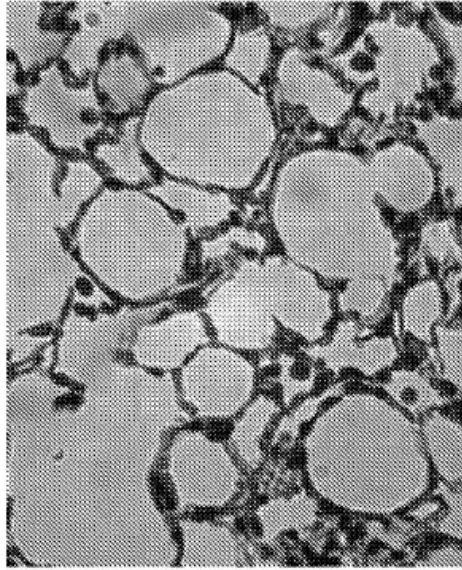


FIG. 6G



ARNhp de CON + PA103



ARNhp de FBXO3 + PA103

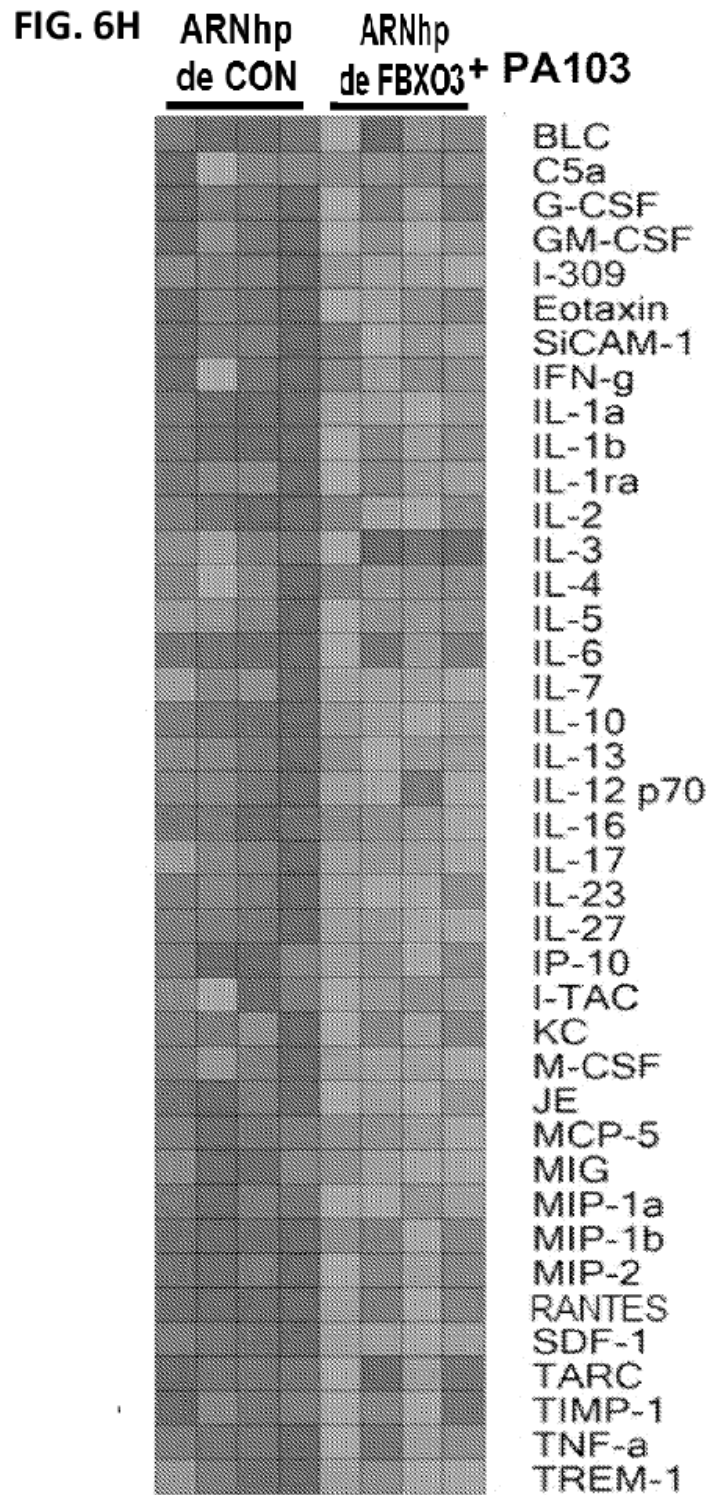


FIG. 6I

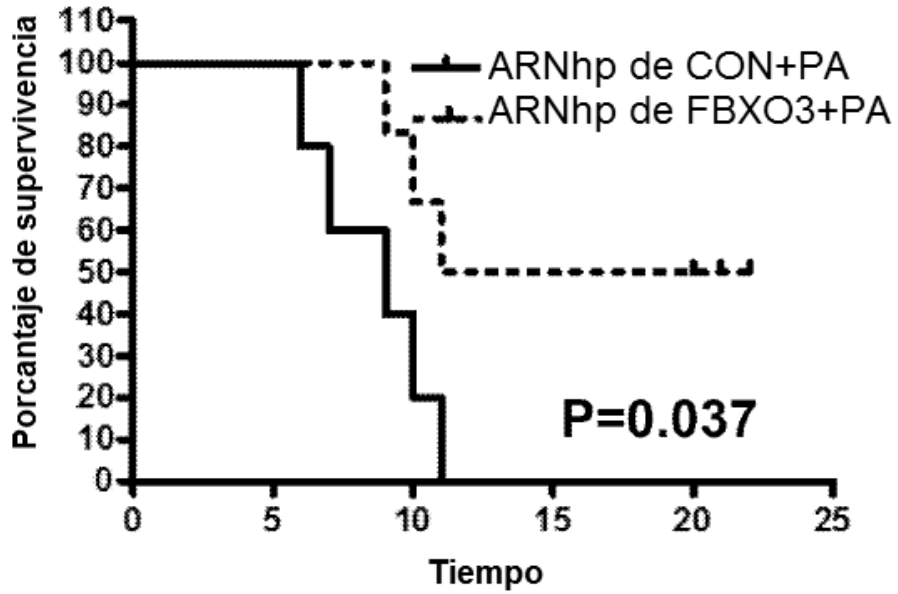


FIG. 7A

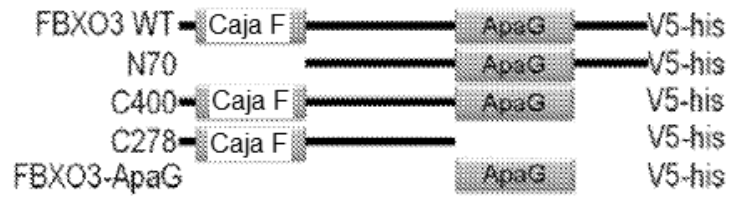
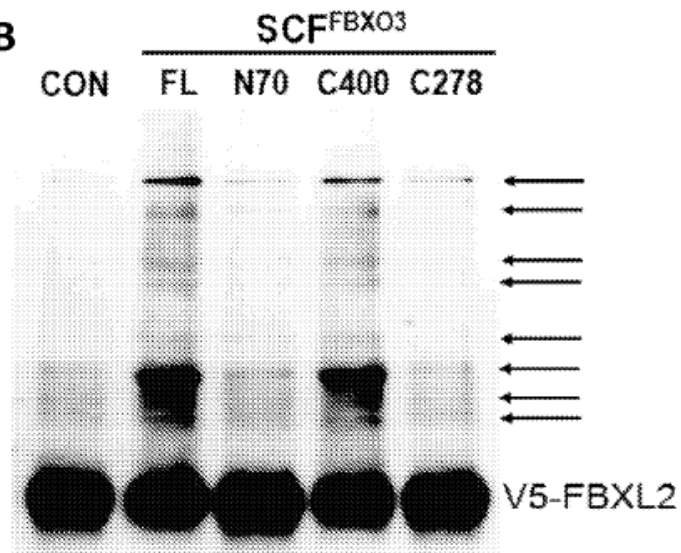


FIG. 7B



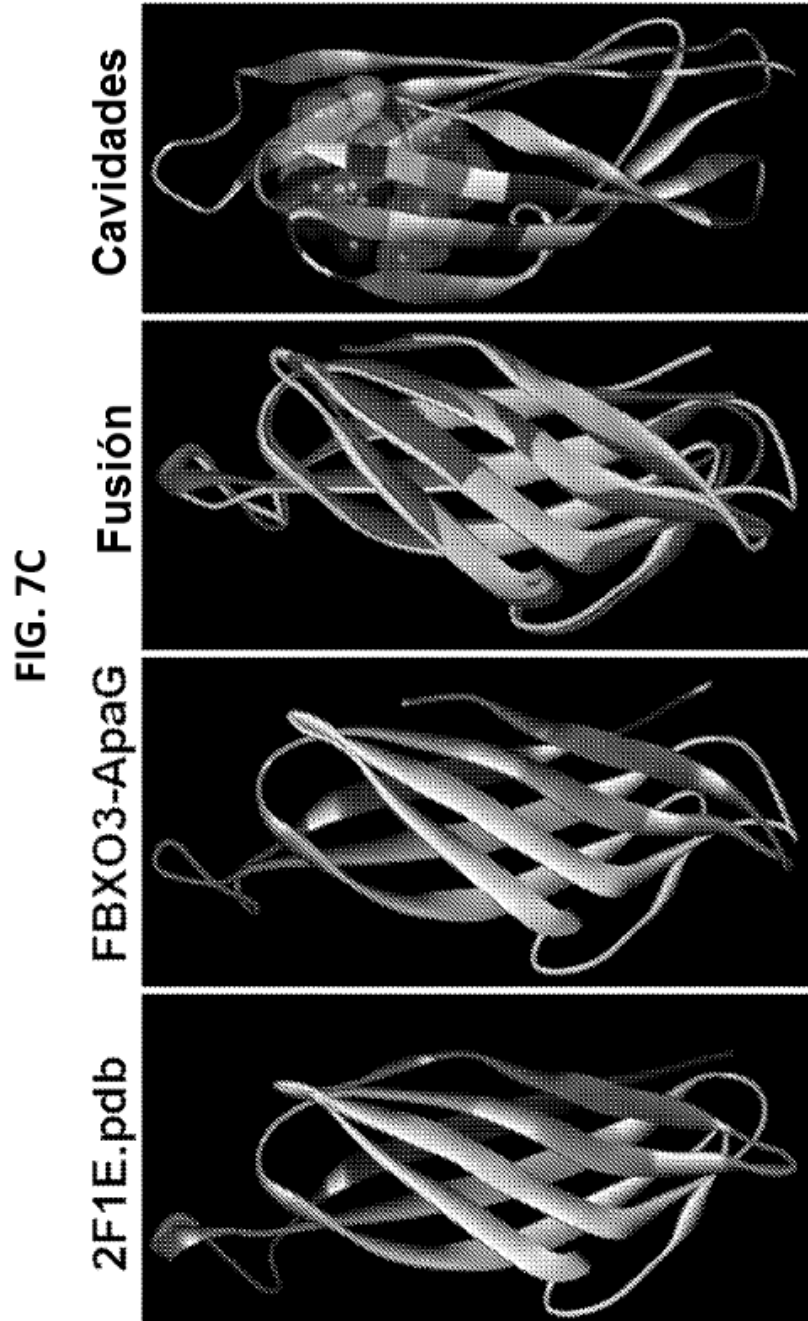


FIG. 7F



FIG. 7E



FIG. 7D

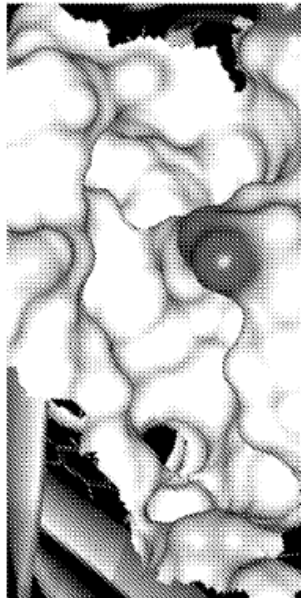
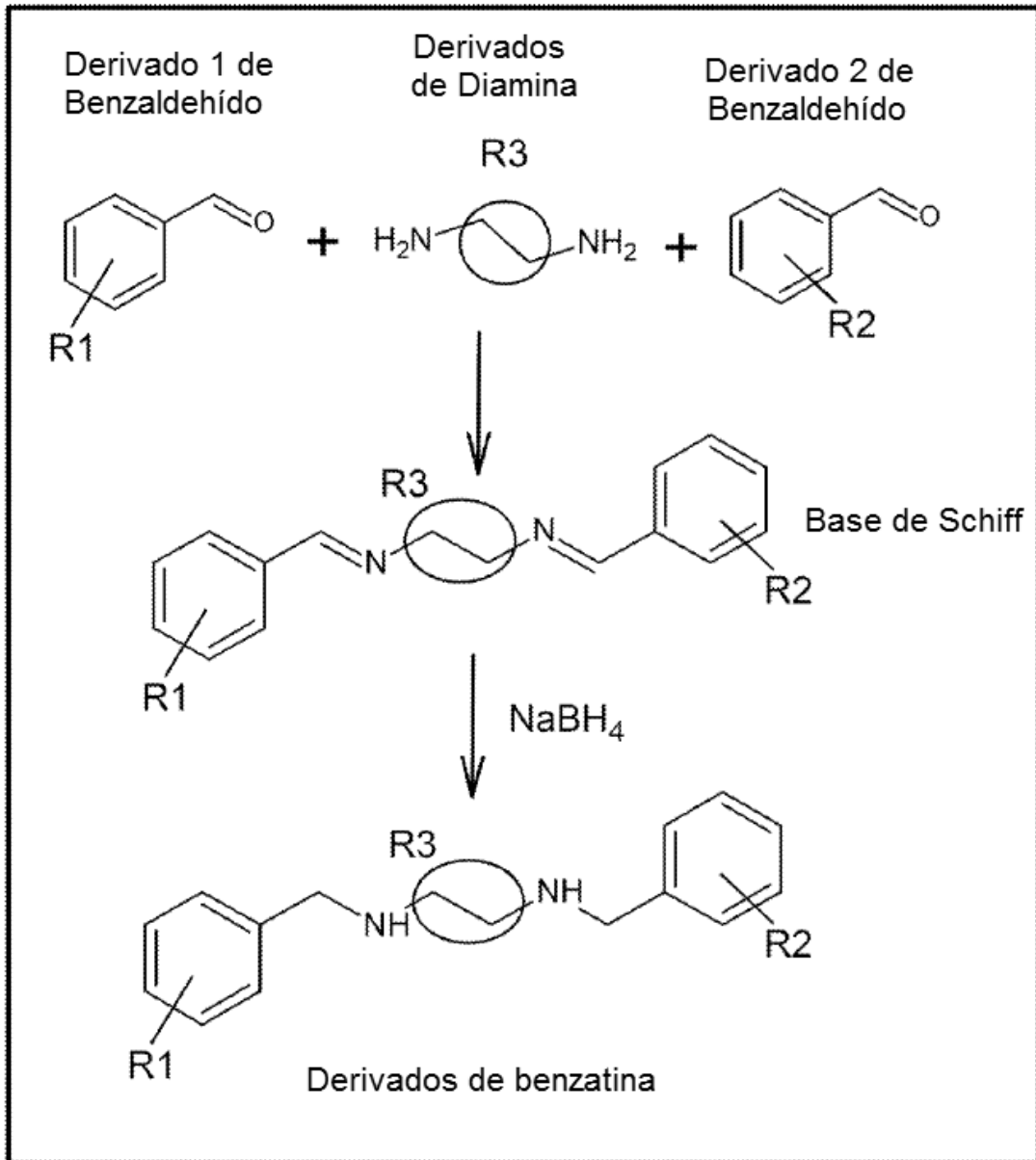


FIG. 8A



BC-1215 **FIG. 8B**

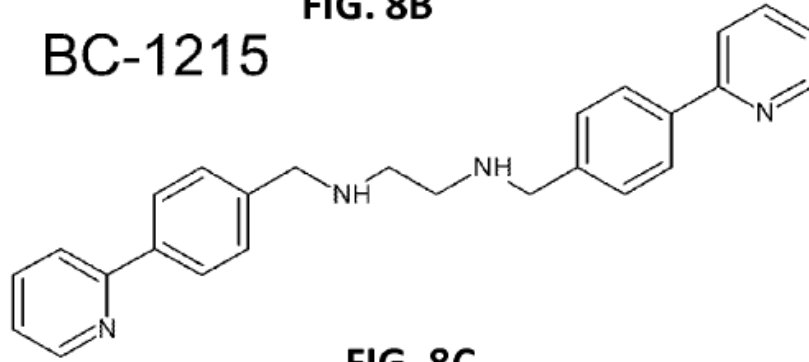


FIG. 8C

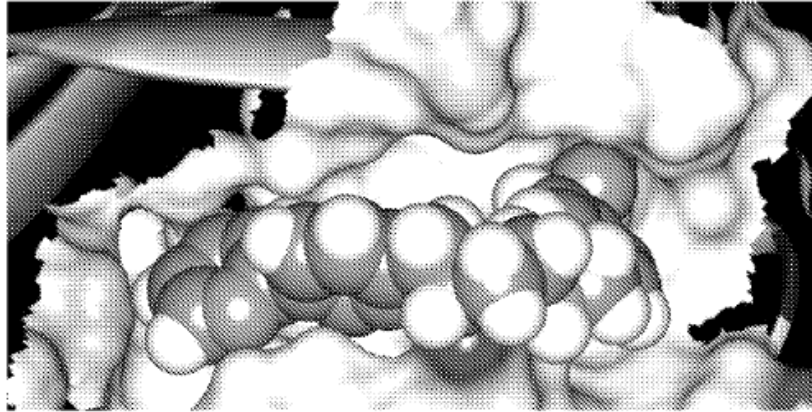
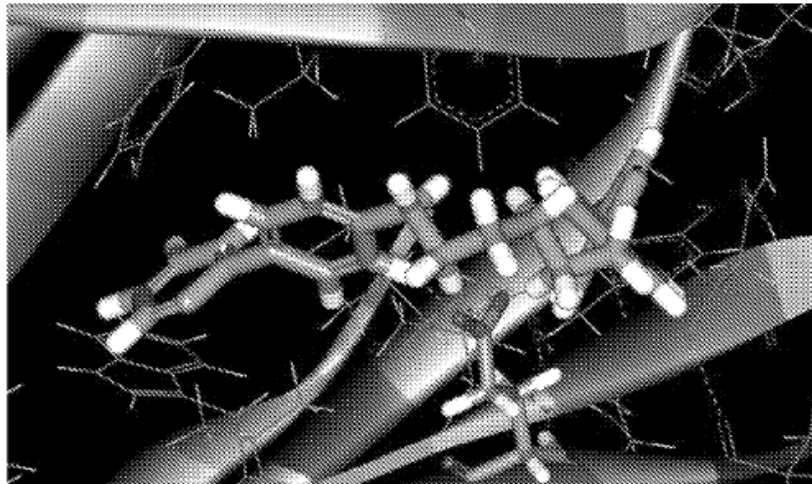


FIG. 8D



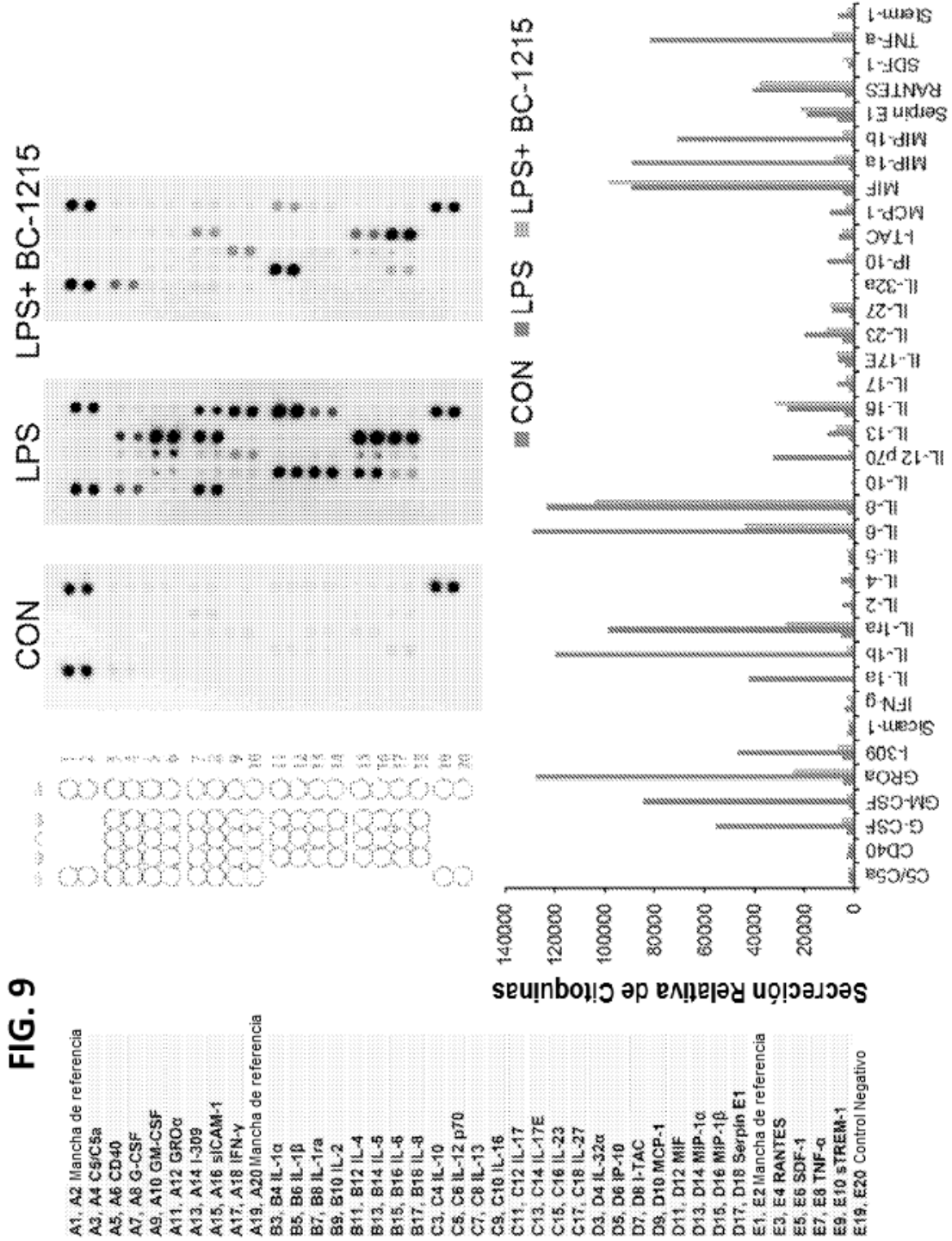


FIG. 10A

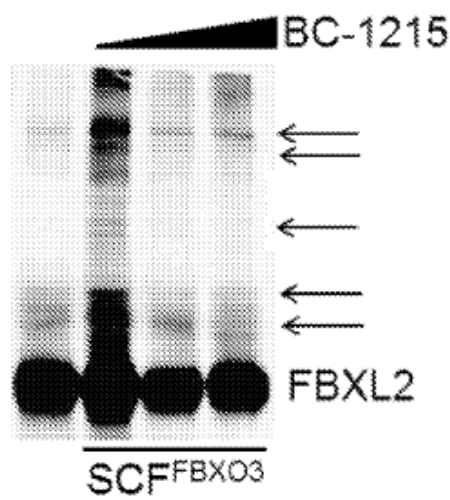
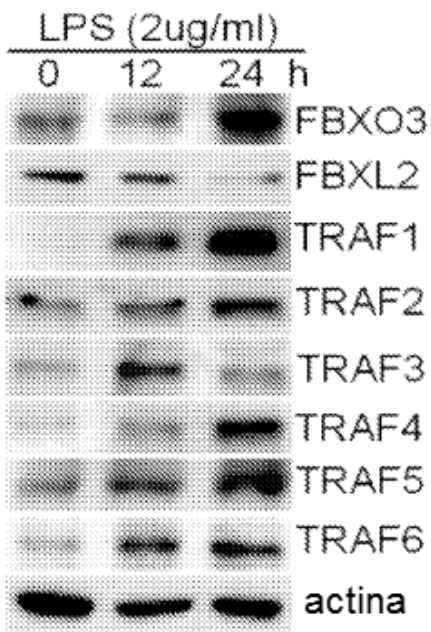


FIG. 10B

FIG. 10C

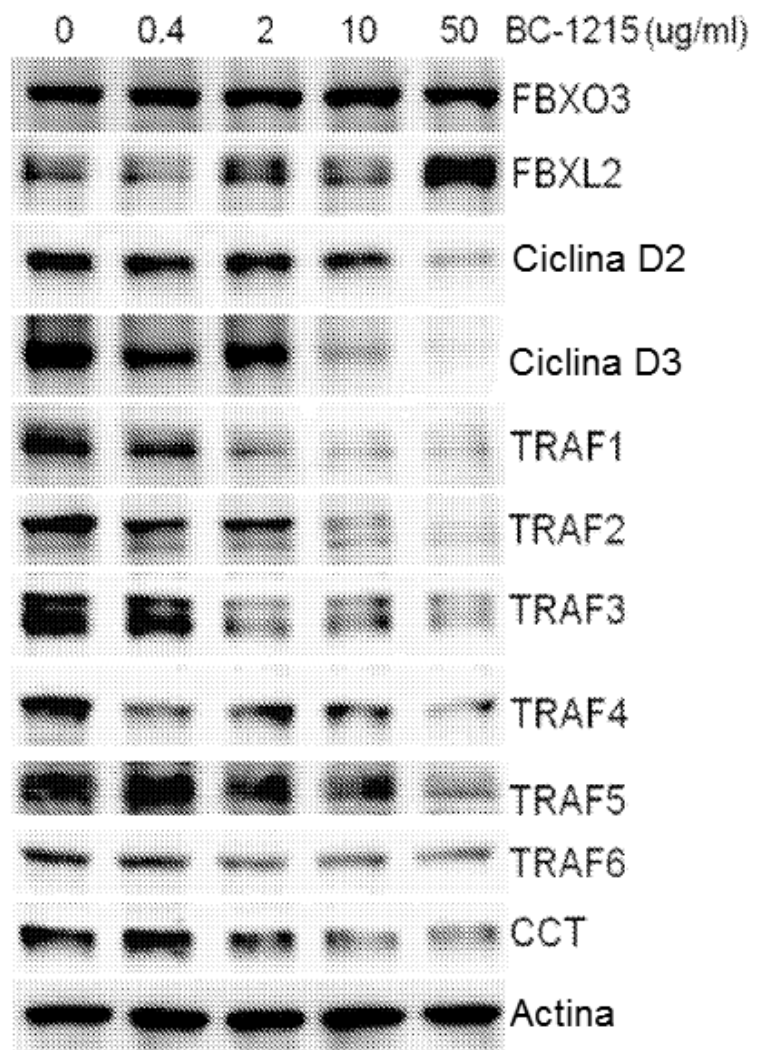


FIG. 10D

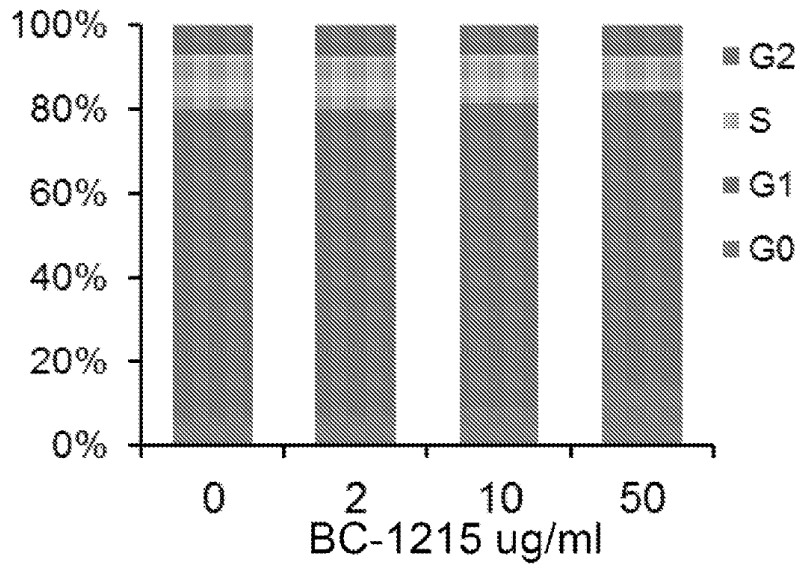


FIG. 10E

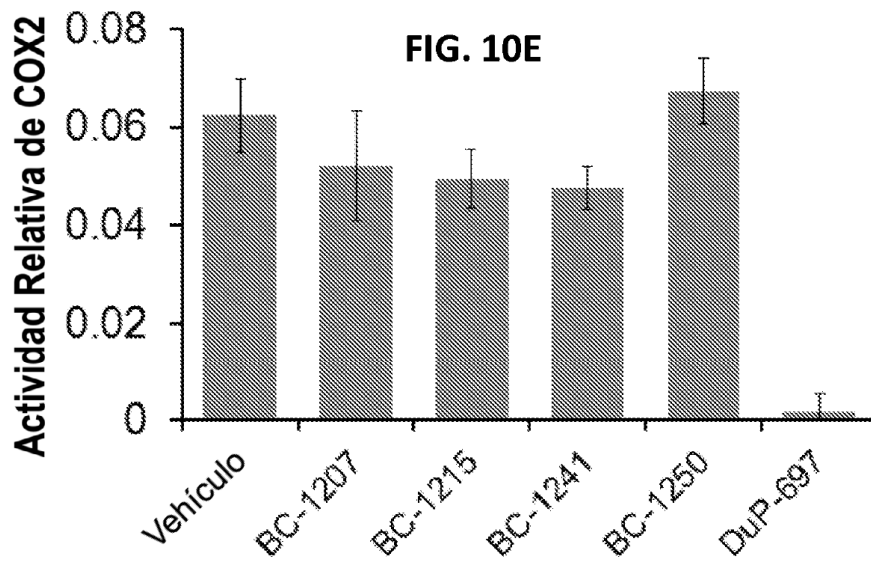
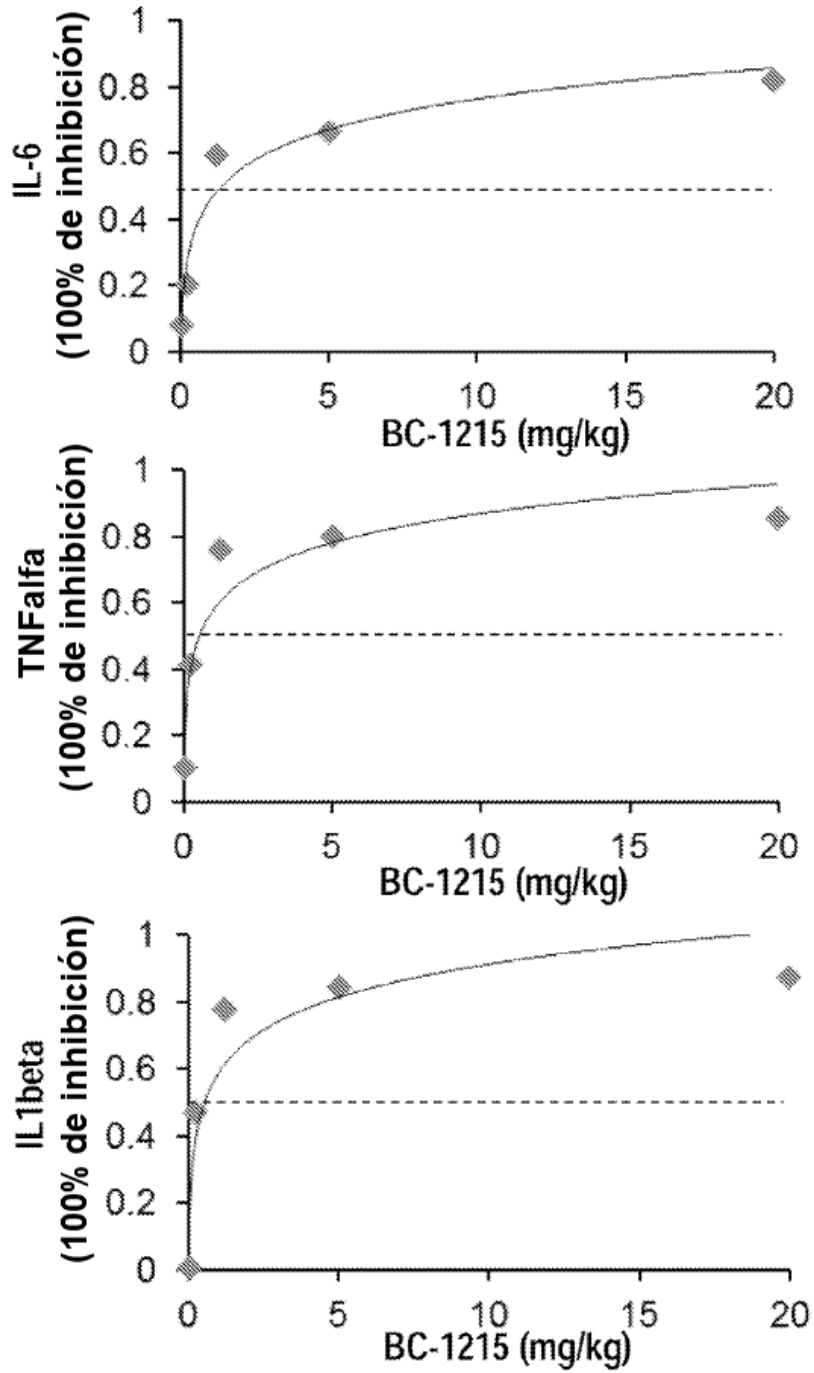


FIG. 11
Modelo de sepsis inducido por LPS in vivo



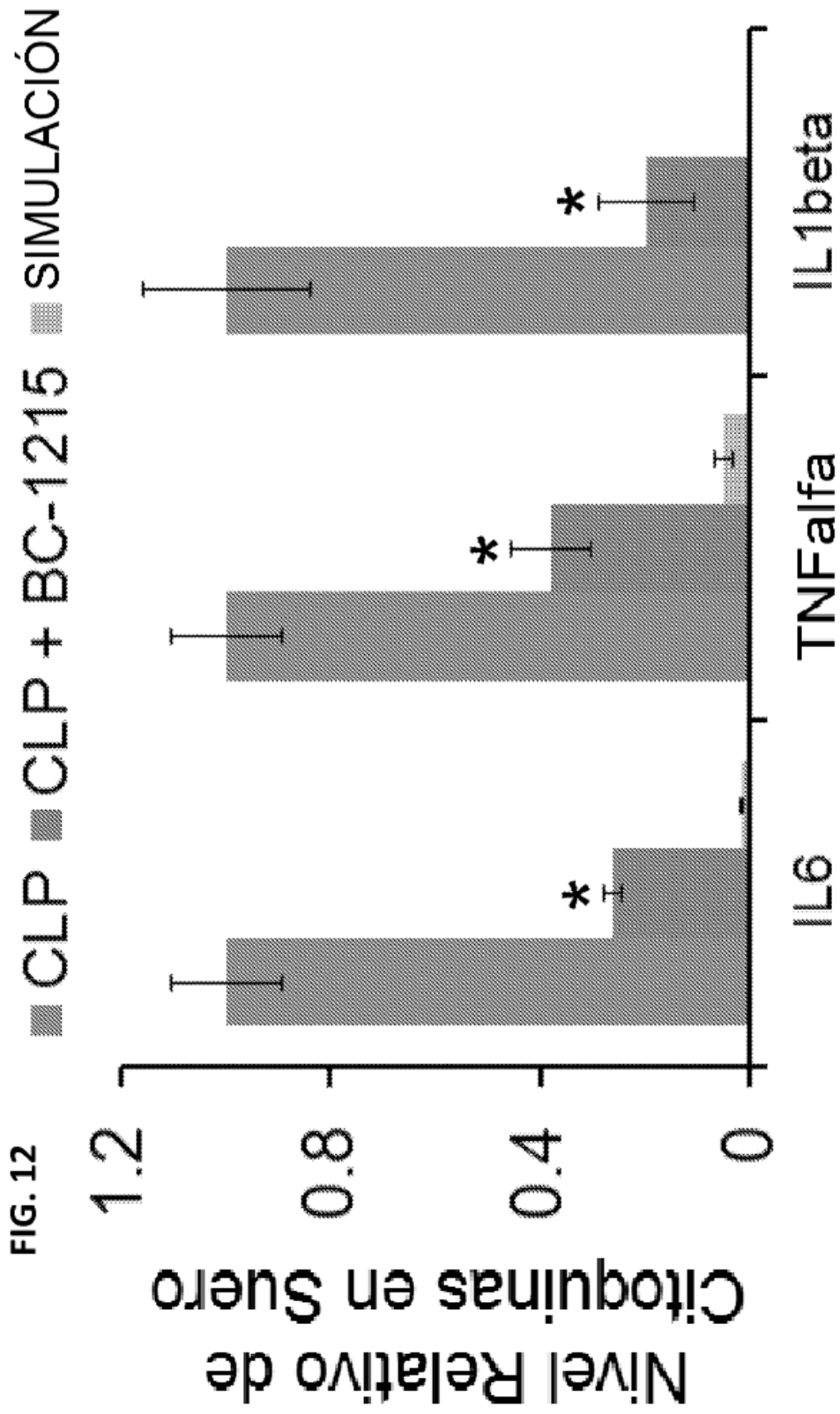


FIG. 13A

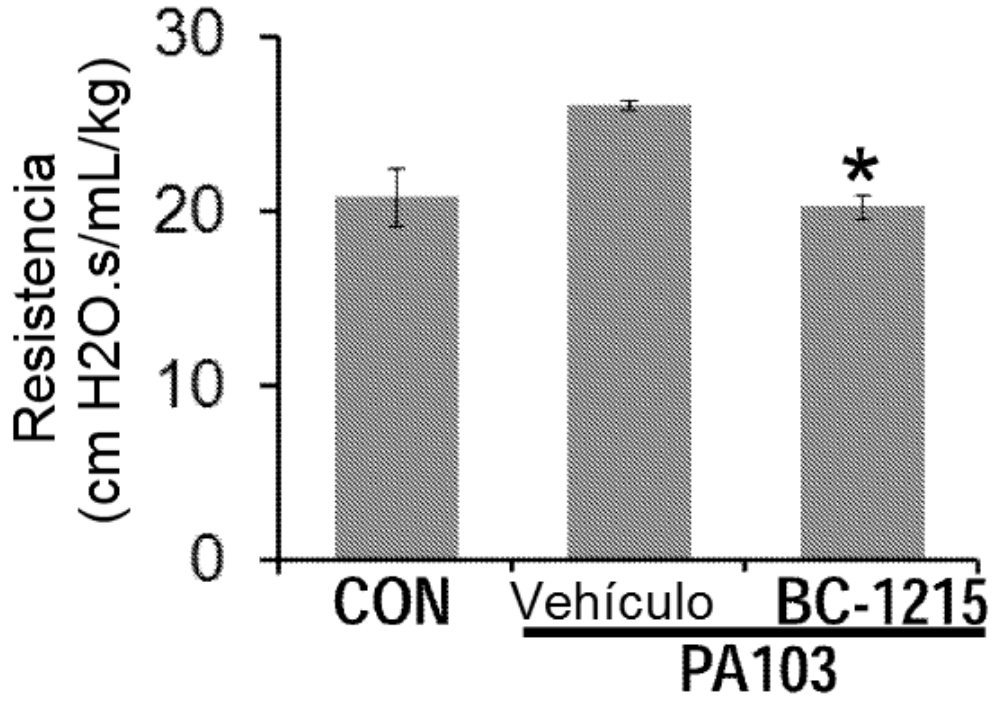
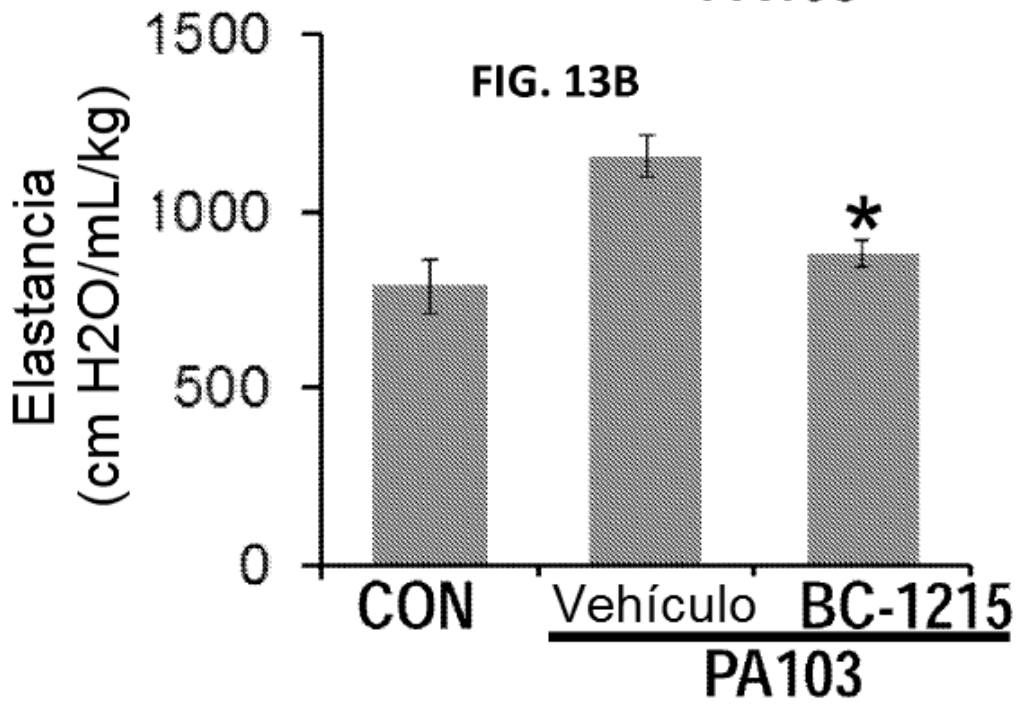
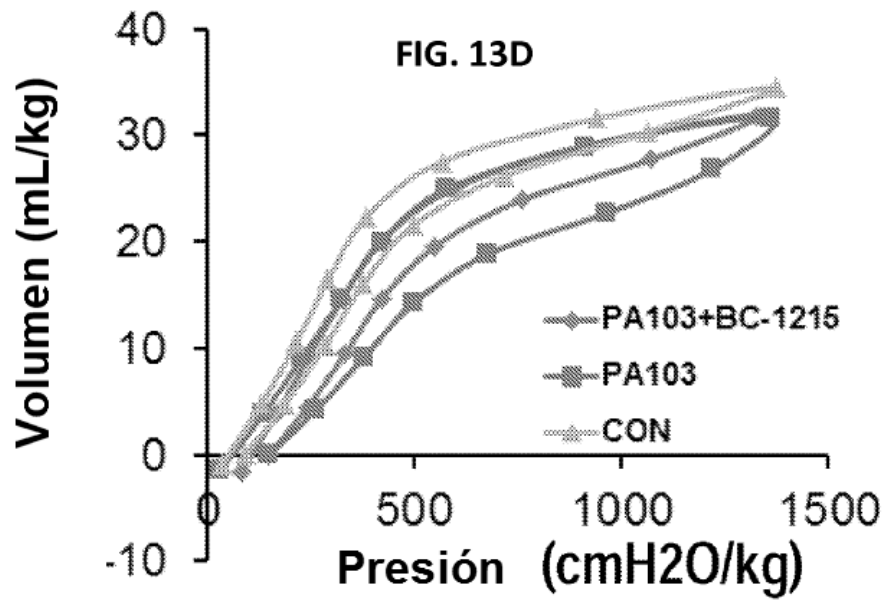
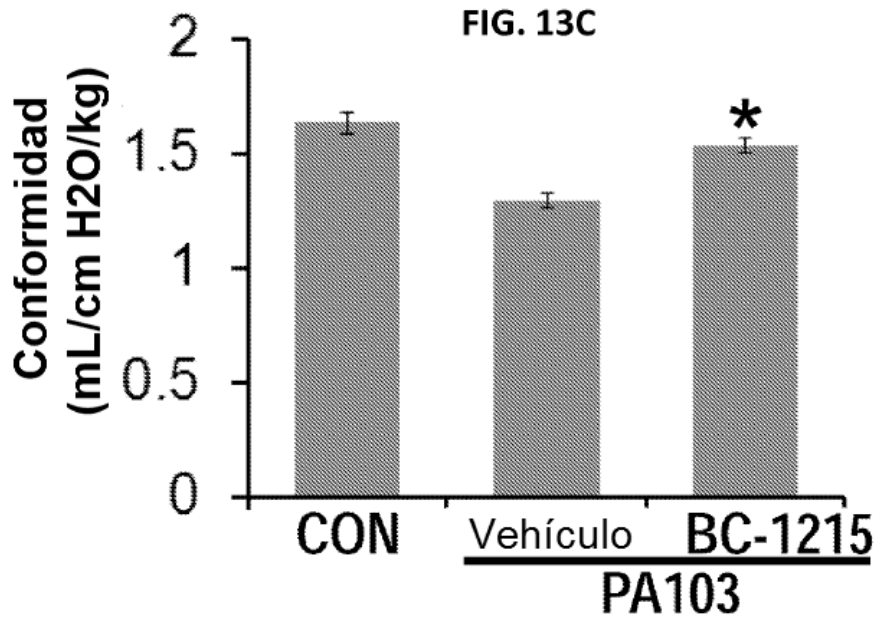


FIG. 13B





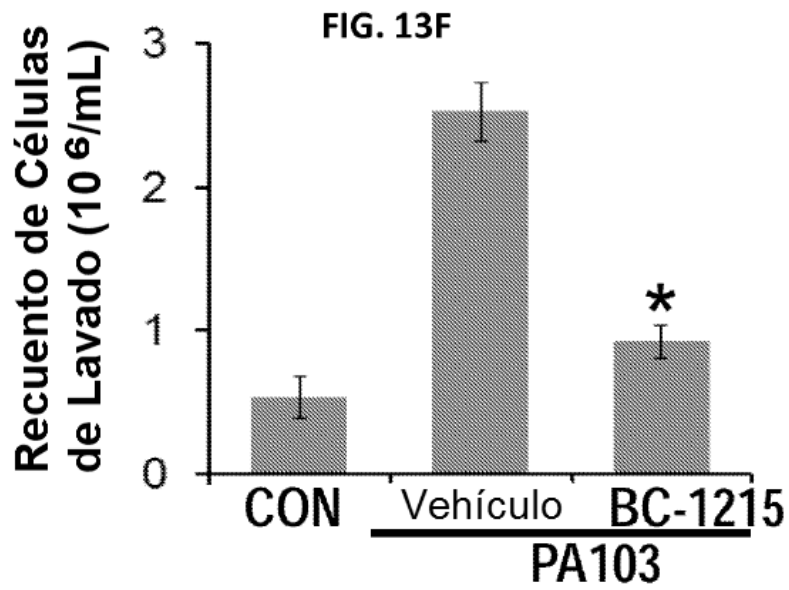
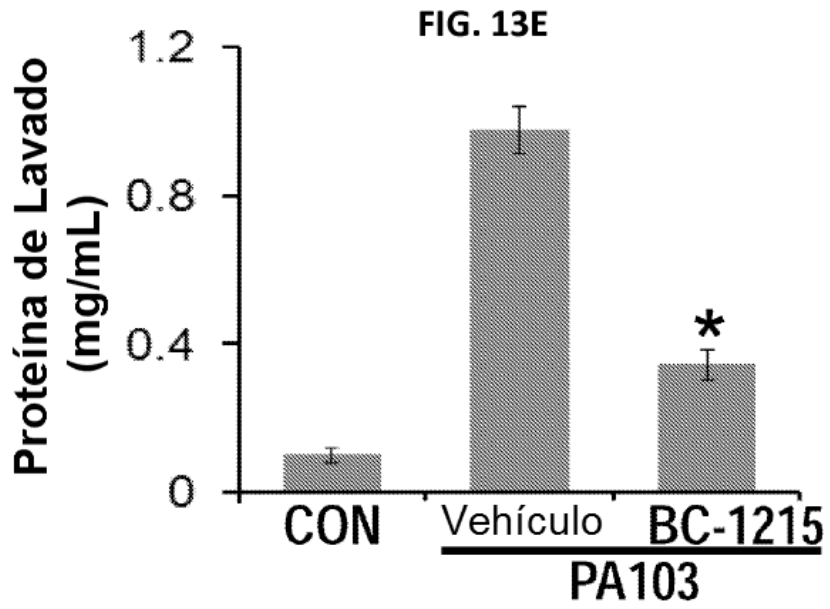


FIG. 13H

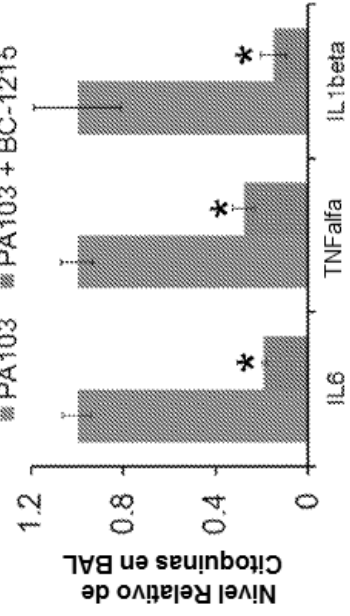


FIG. 13G

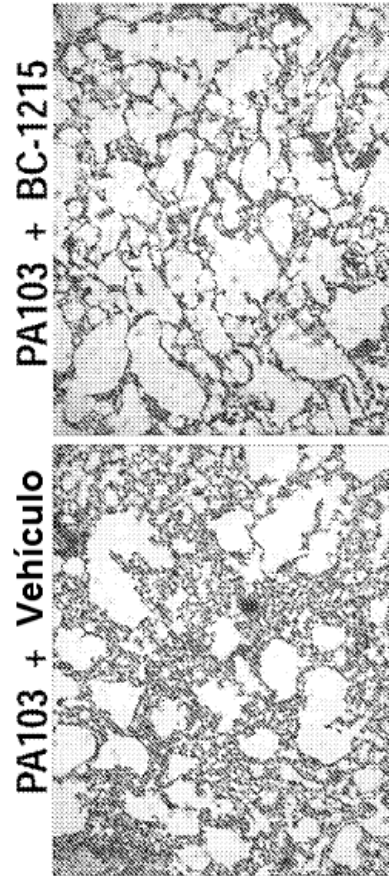


FIG. 14A

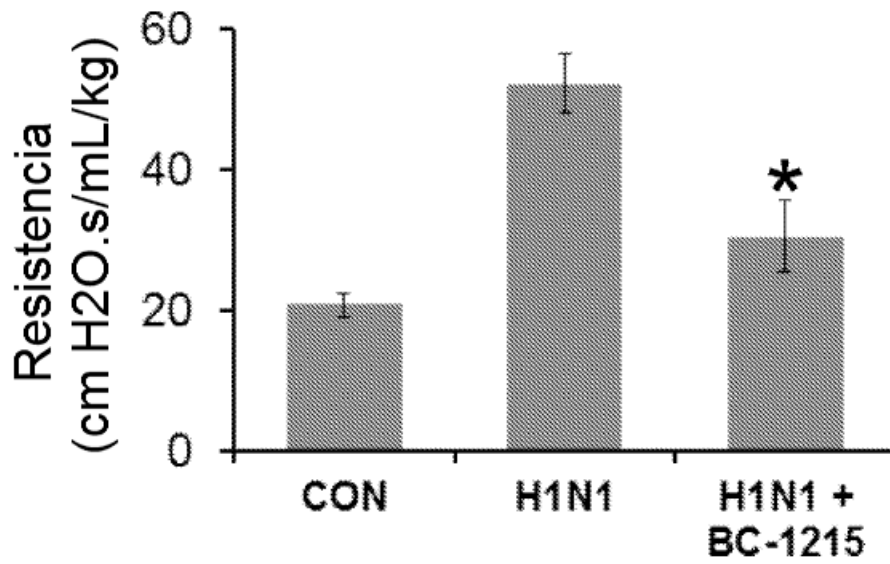


FIG. 14B

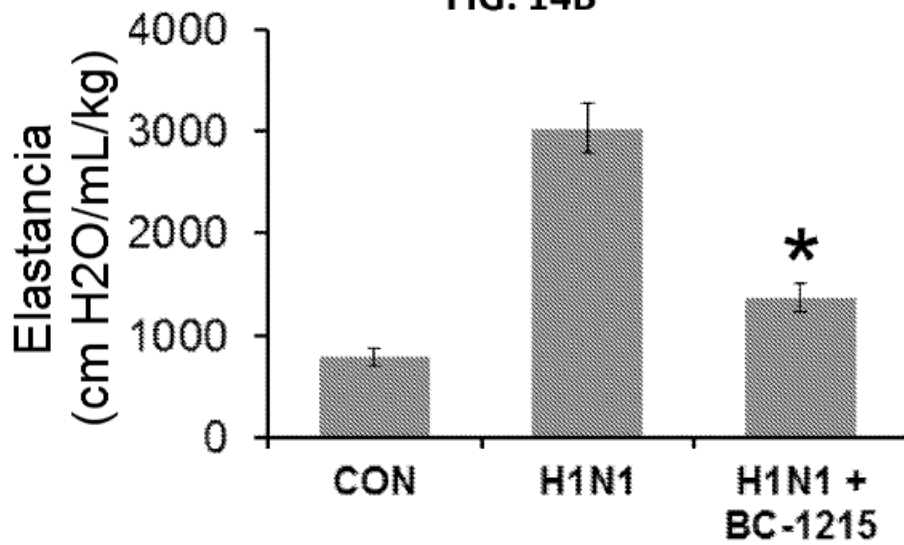


FIG. 14C

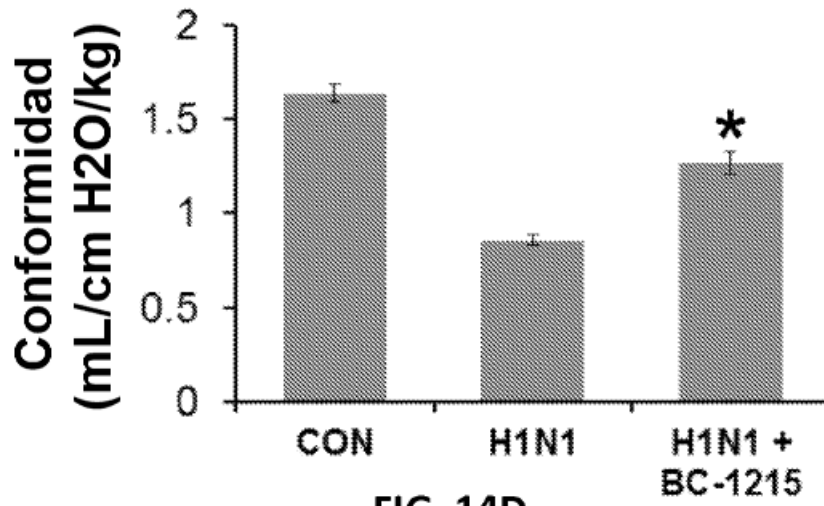
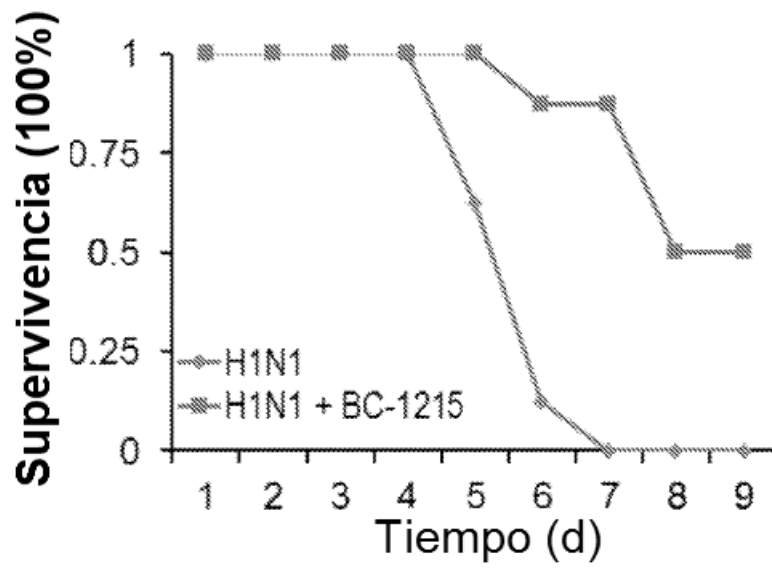
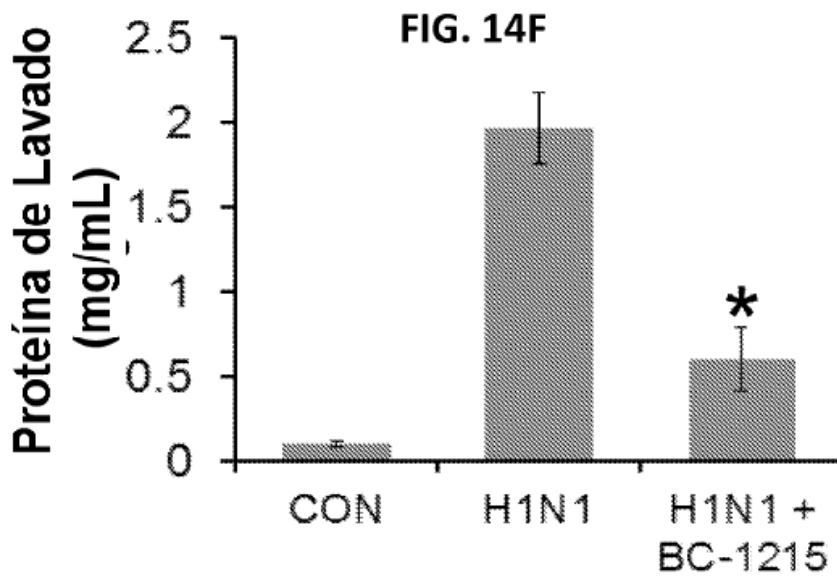
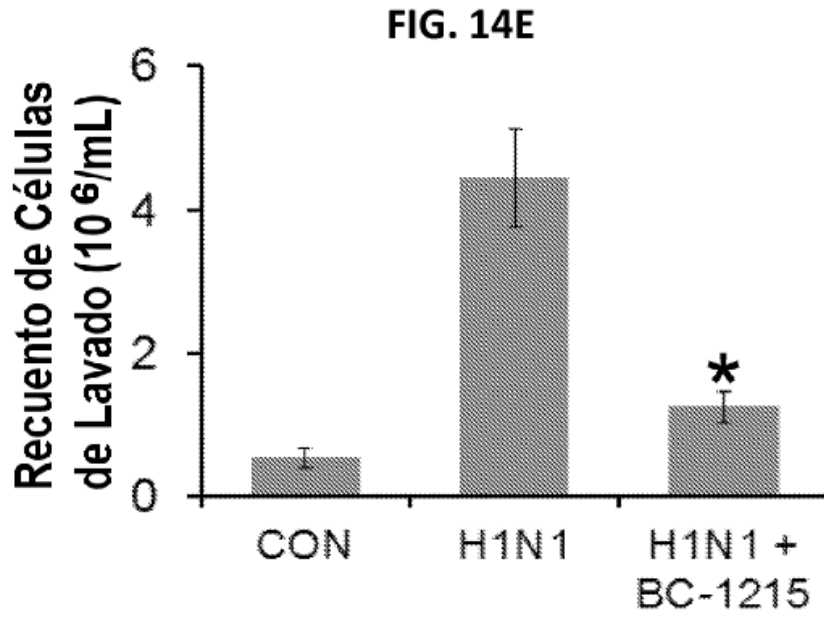


FIG. 14D





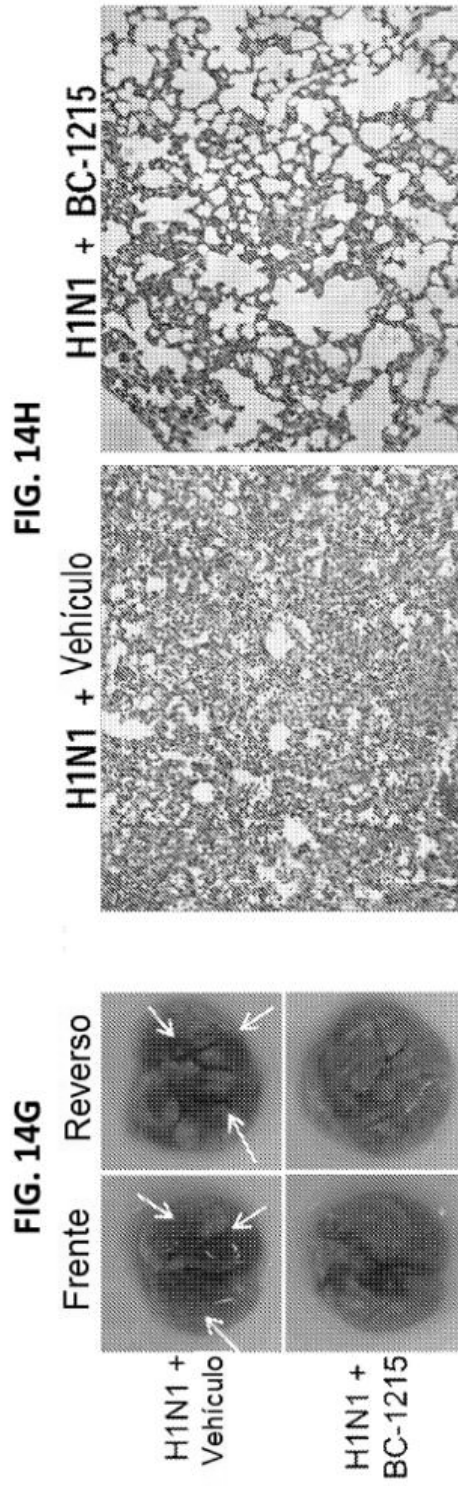


FIG. 15A Edema de la oreja inducido por TPA in vivo

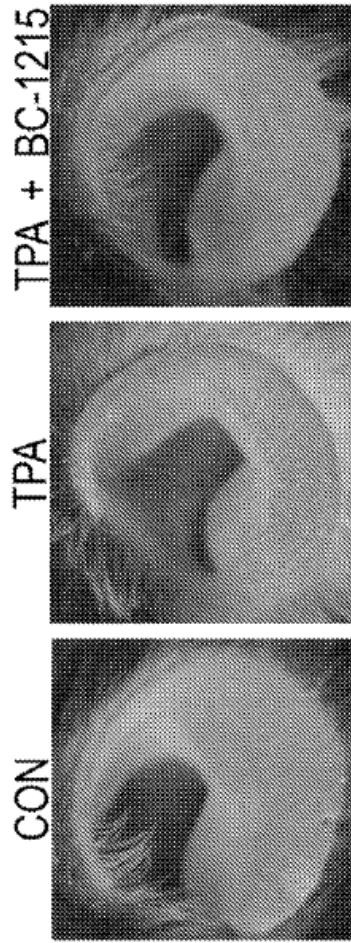


FIG. 15B

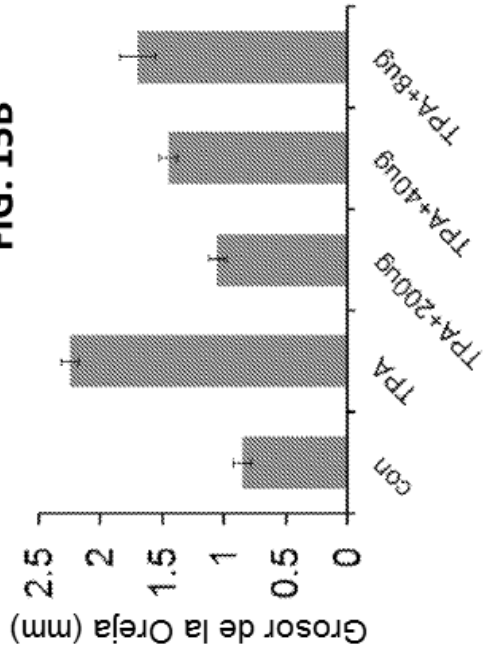


FIG. 15C

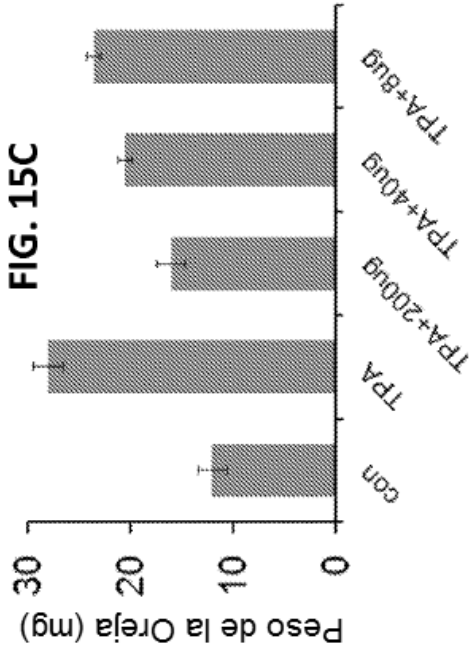
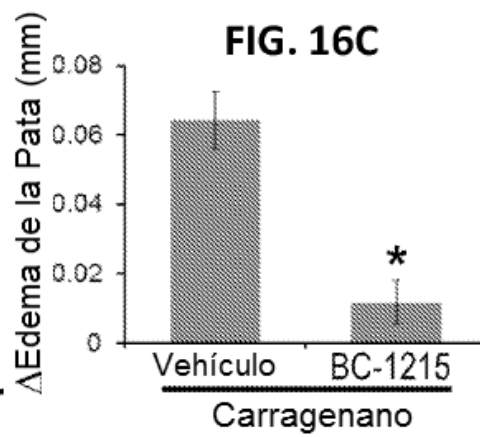
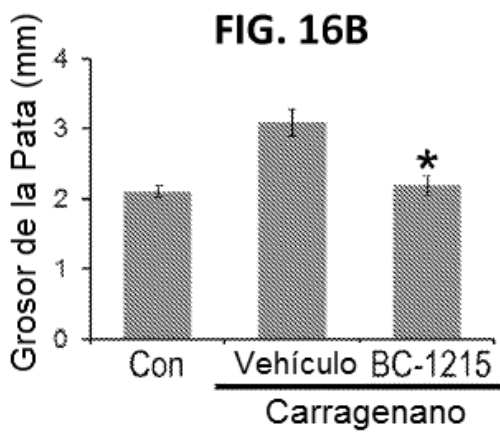
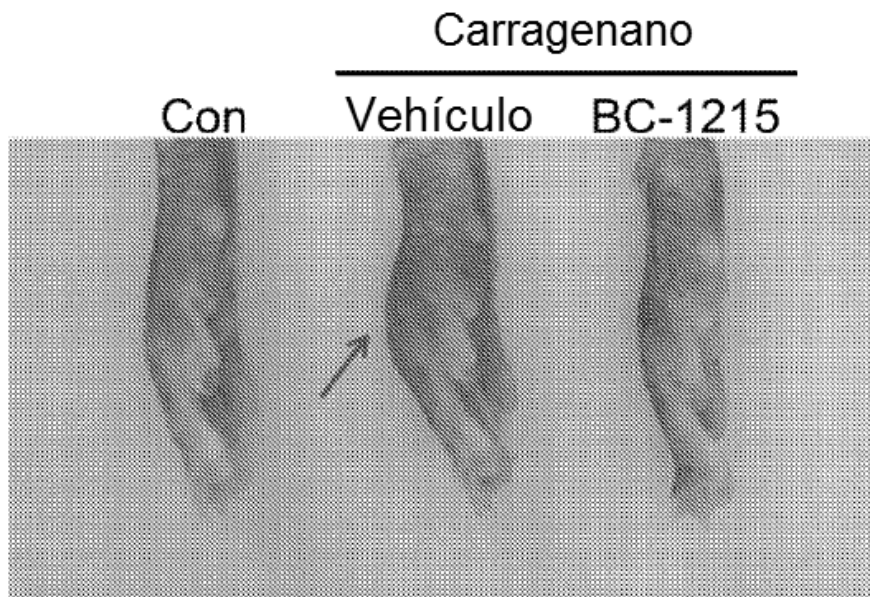


FIG. 16A

Modelo de edema de la pata de ratón in vivo



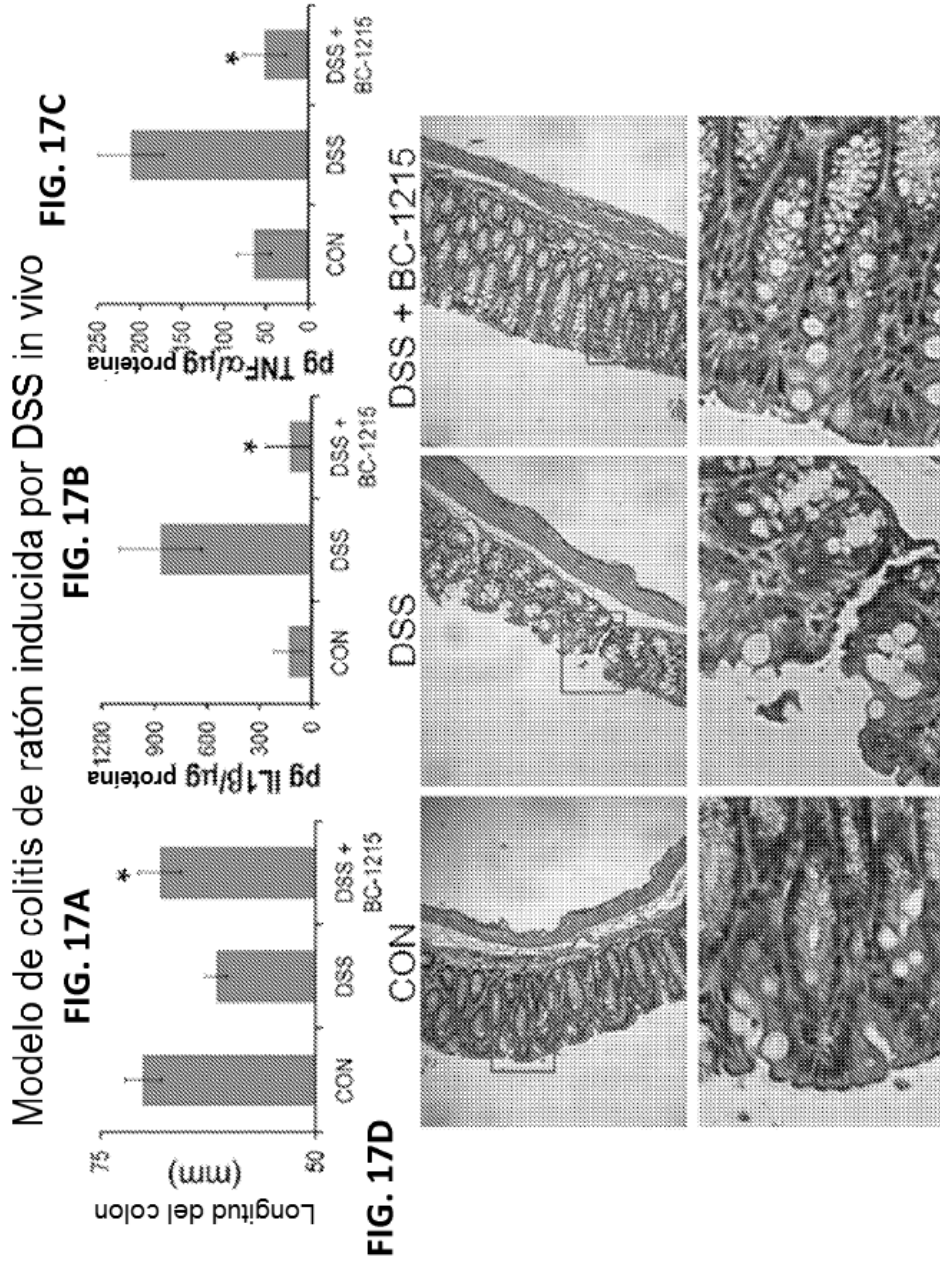
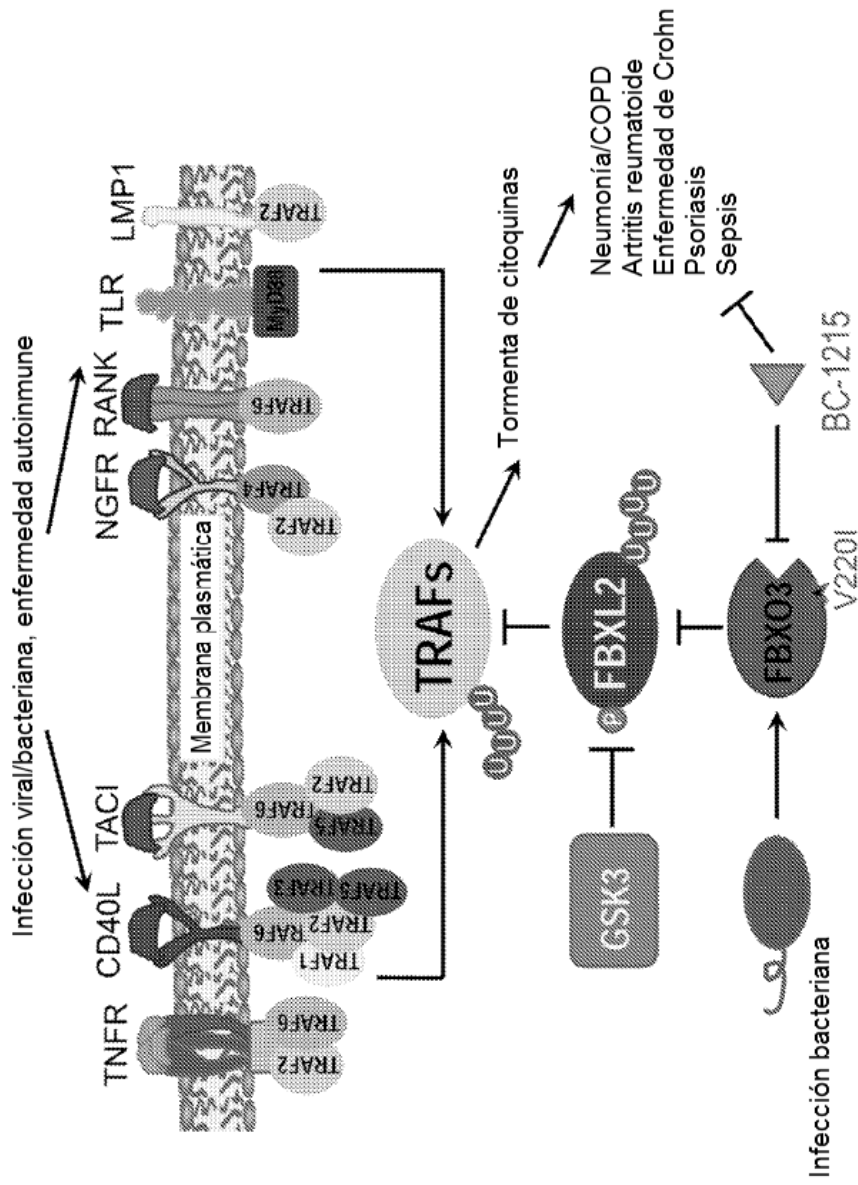
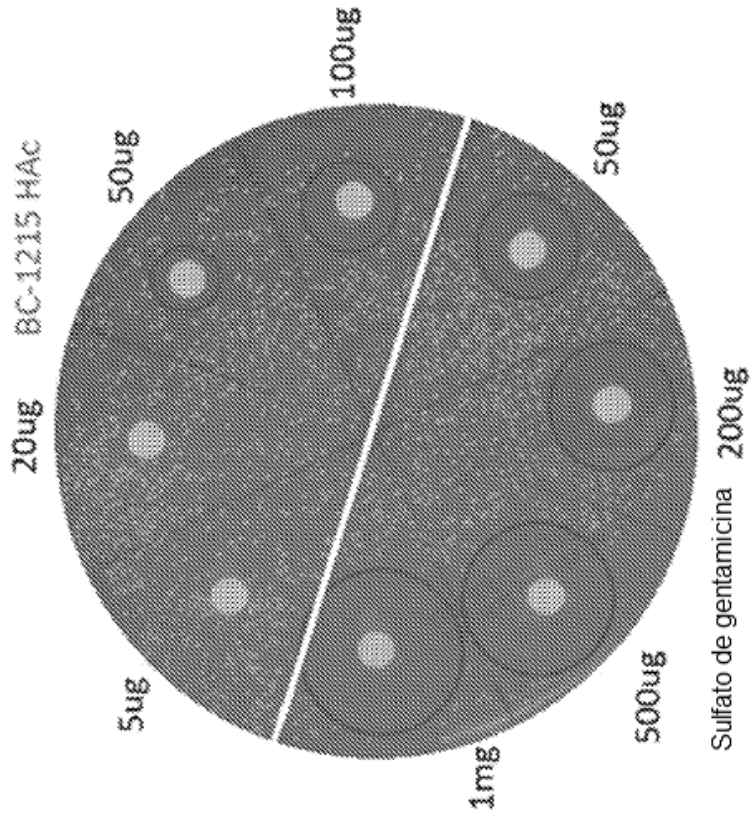


FIG. 18



Prueba antibiótica de Kirby-Bauer

FIG. 19



Se probó BC-1215 en un ensayo de sensibilidad a antibióticos usando agar de Mueller-Hinton. En resumen, se agregaron papeles de filtro de 6 mm que contenían diferentes cantidades de BC-1215 o Gentamicina (control positivo) en el agar de Mueller-Hinton previamente expuesto a *Staphylococcus aureus*. Las placas se incubaron a 37 grados durante 24 h. Se midieron los tamaños de las zonas y se marcaron mediante un círculo rojo para indicar los resultados positivos.

FIG. 20A

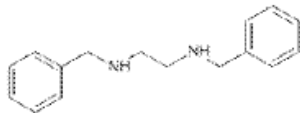
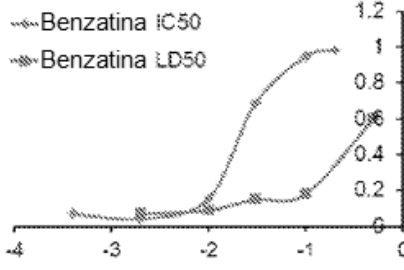
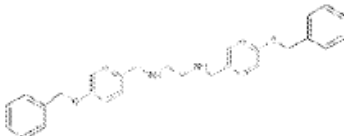
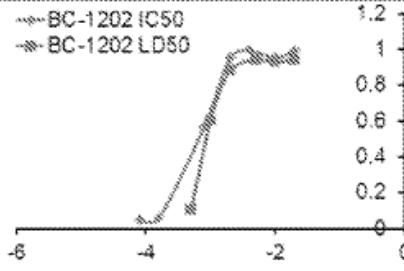
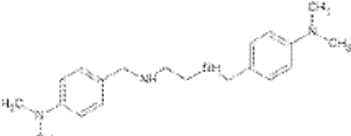
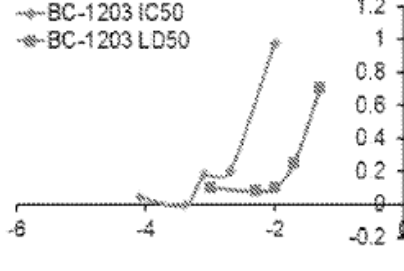
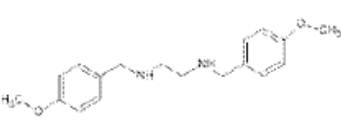
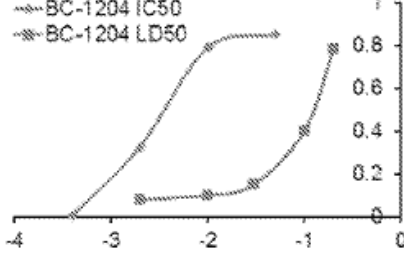
		Ensayo de IL1b, Apoptosis	IC50, LD50, TI
Benzatina		 <p> --○-- Benzatina IC50 --●-- Benzatina LD50 </p>	IC50 _{IL1β} =25ug/ml LD50 =400ug/ml TI=16
BC-1202		 <p> --○-- BC-1202 IC50 --●-- BC-1202 LD50 </p>	IC50 _{IL1β} =0.8ug/ml LD50 =0.9ug/ml TI=1.1
BC-1203		 <p> --○-- BC-1203 IC50 --●-- BC-1203 LD50 </p>	IC50 _{IL1β} =5ug/ml LD50 =34ug/ml TI=6.8
BC-1204		 <p> --○-- BC-1204 IC50 --●-- BC-1204 LD50 </p>	IC50 _{IL1β} =5ug/ml LD50 =120ug/ml TI=24

FIG. 20B

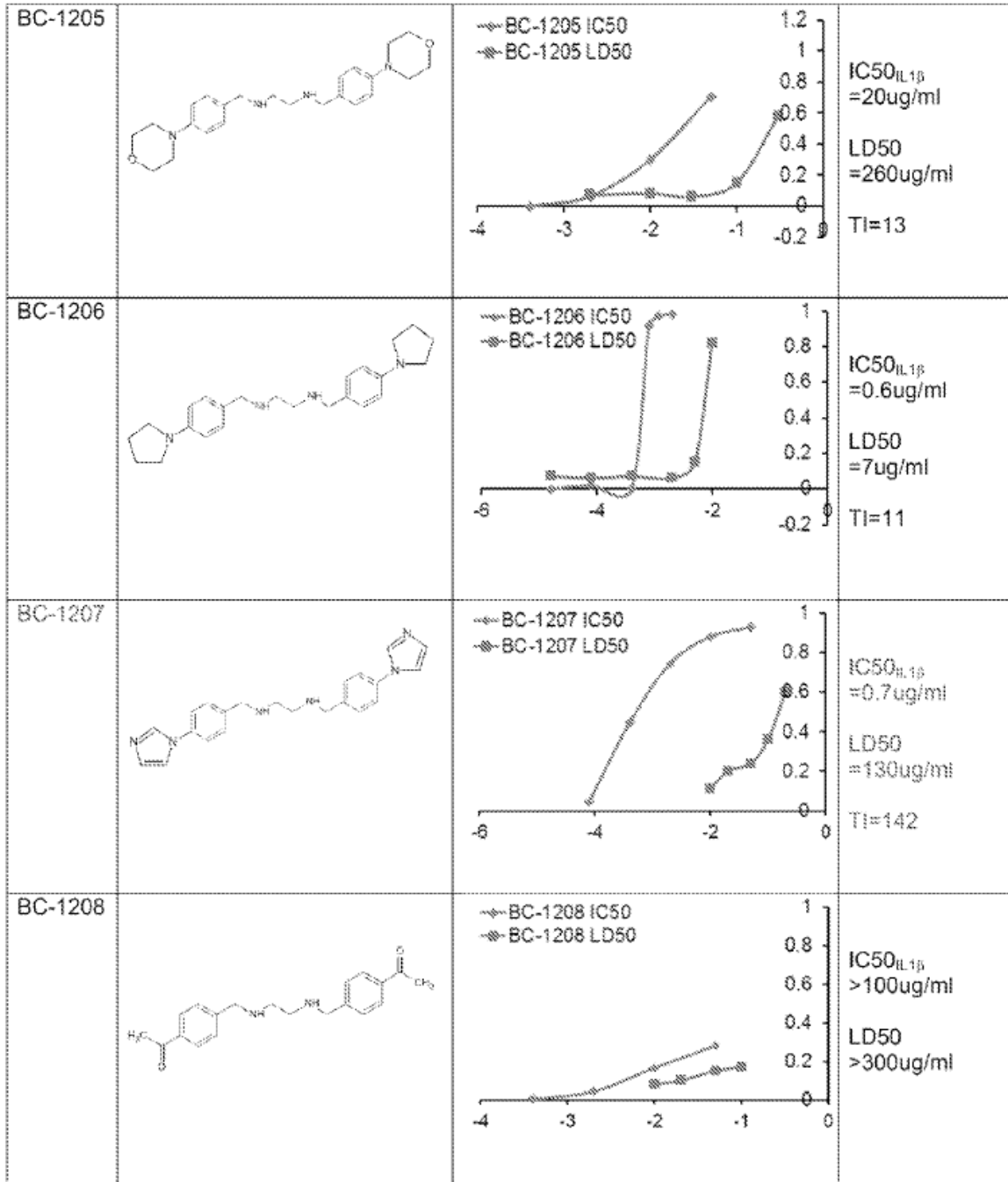


FIG. 20C

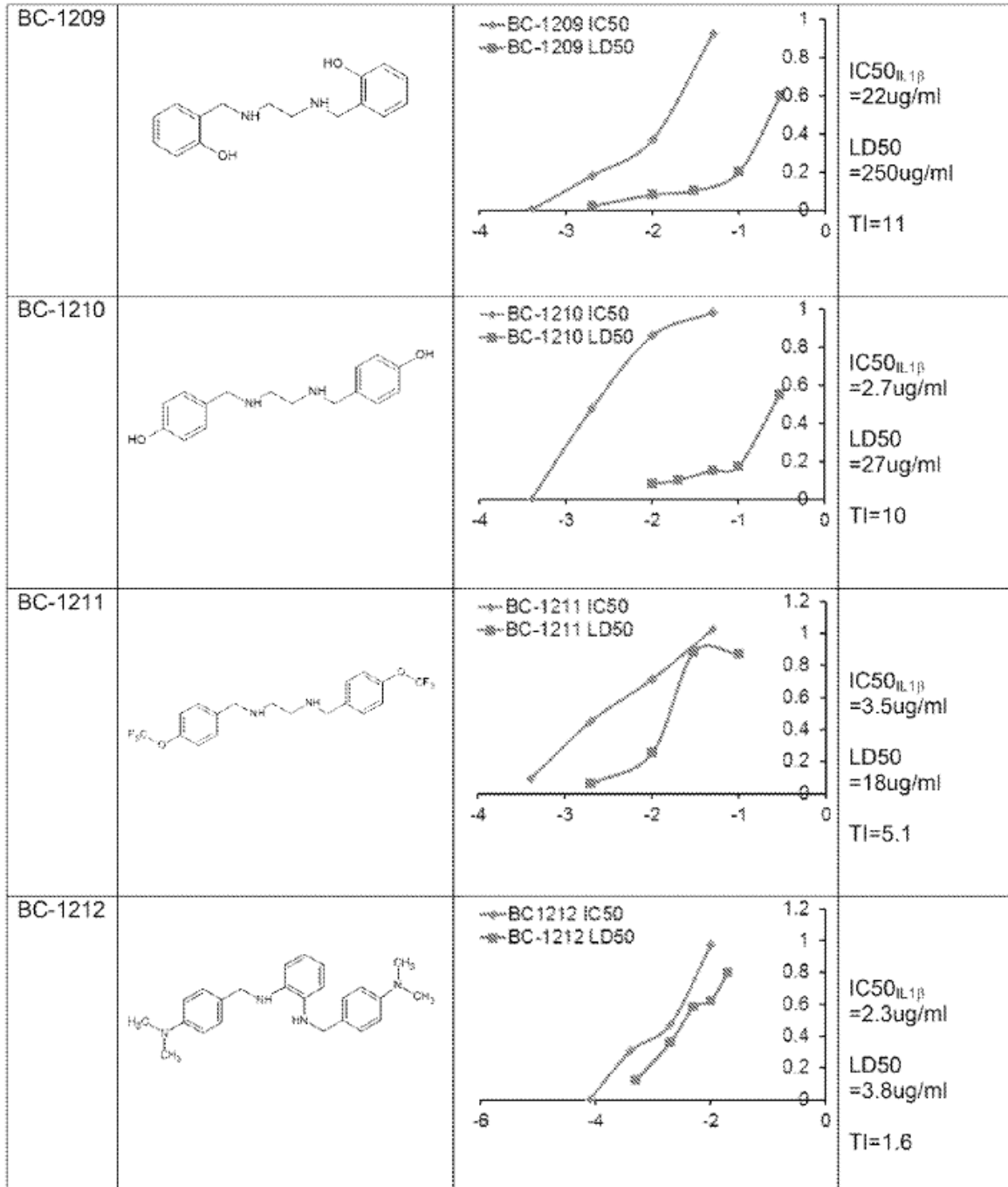


FIG. 20D

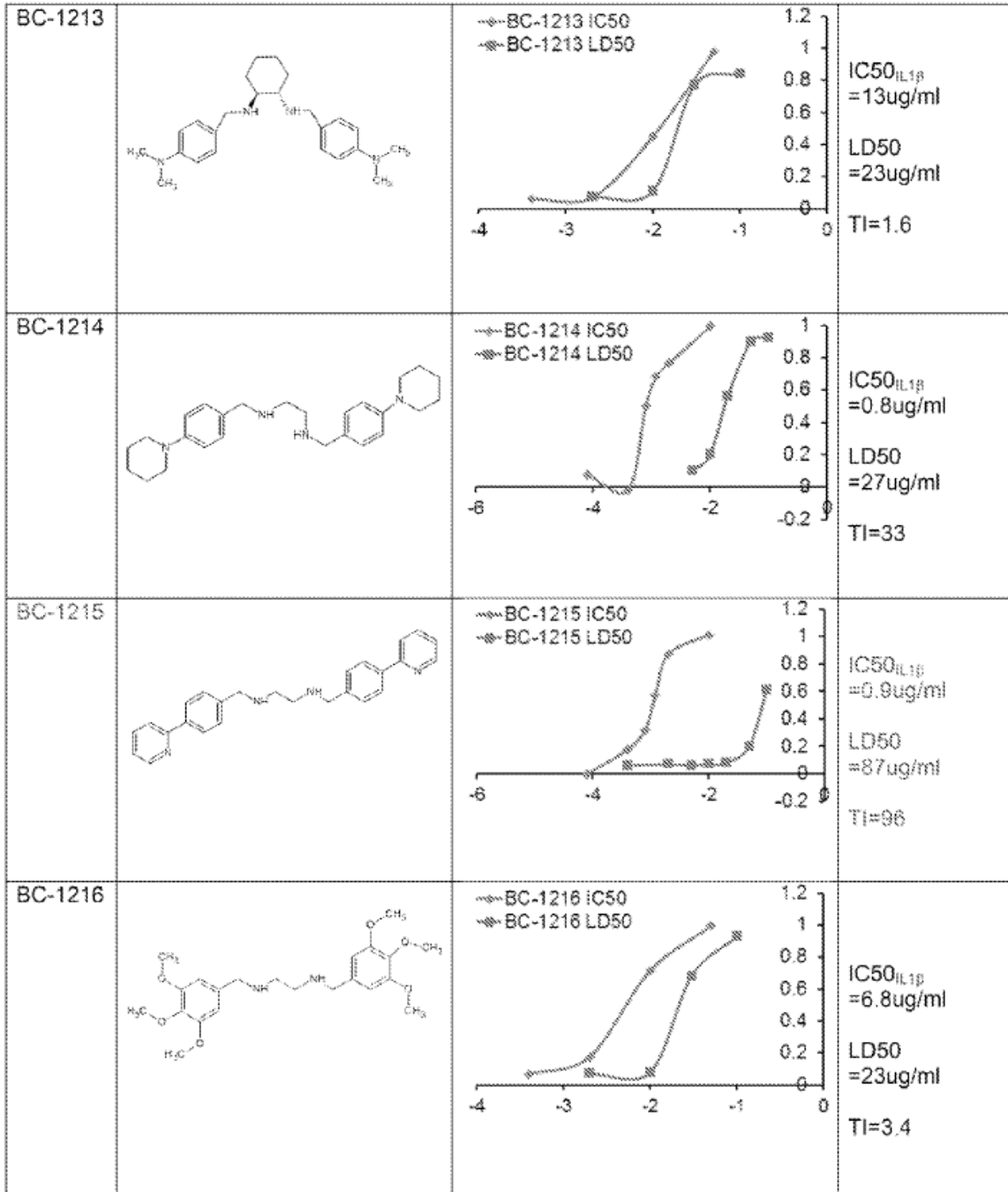


FIG. 20E

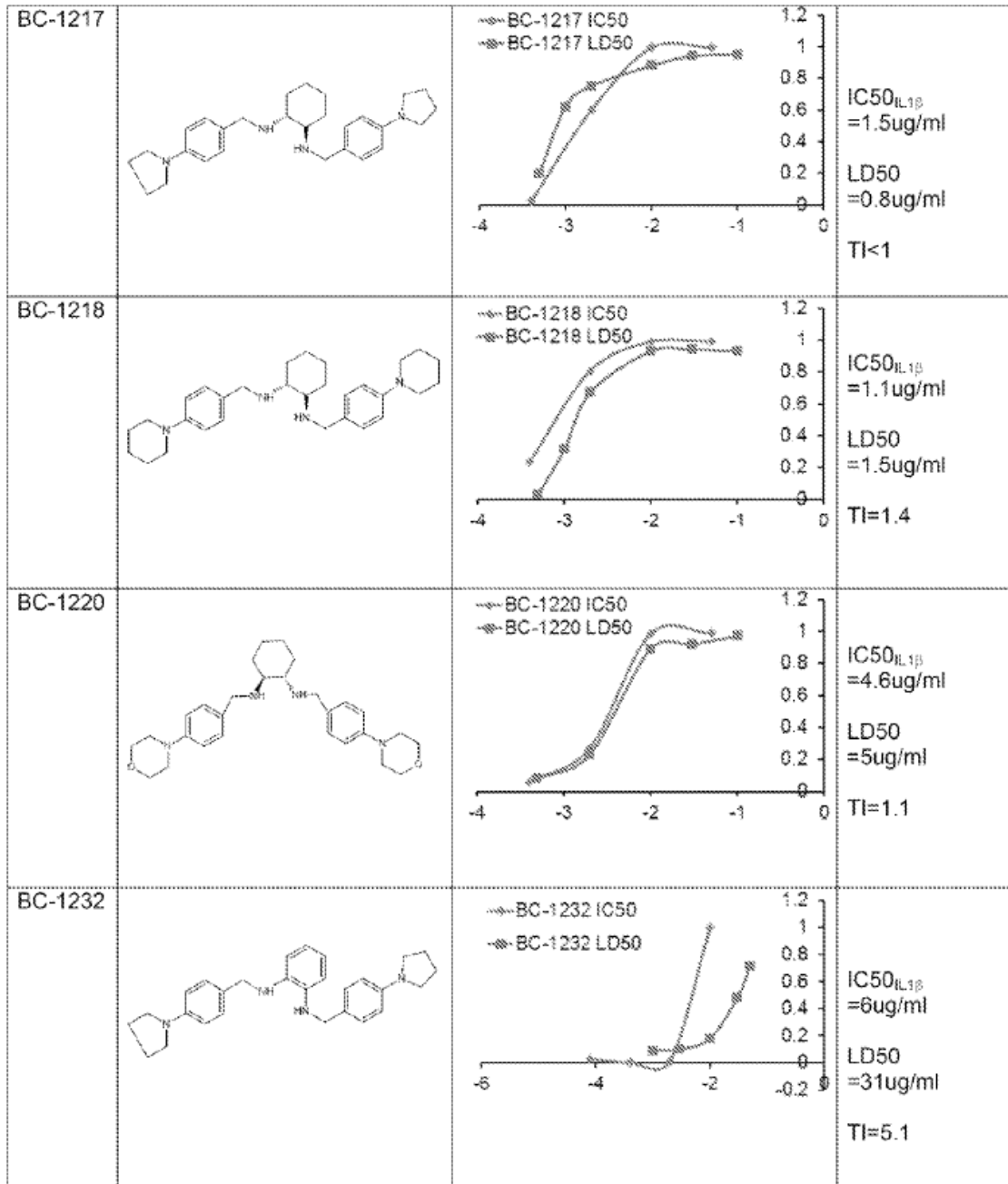


FIG. 20F

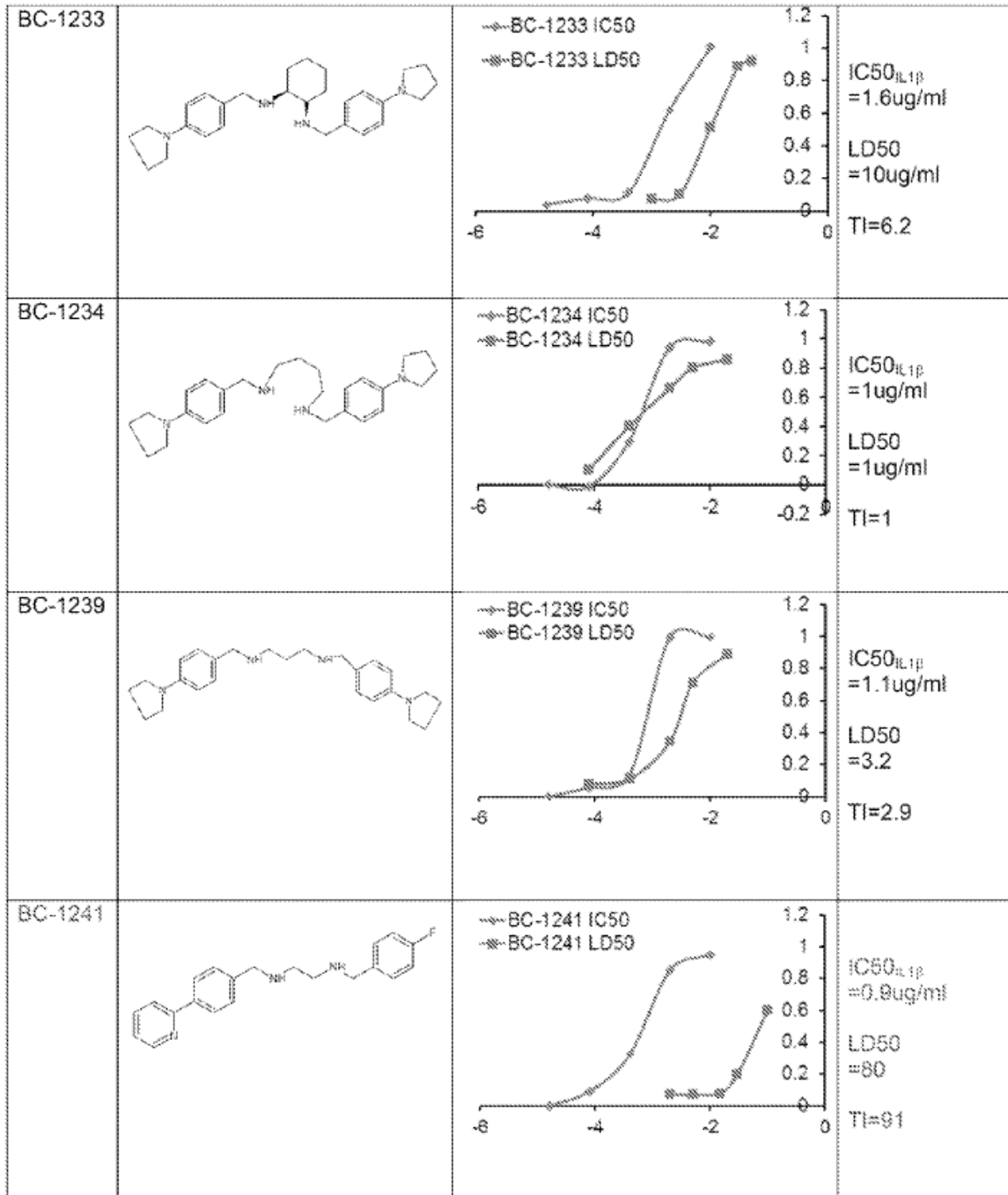


FIG. 20G

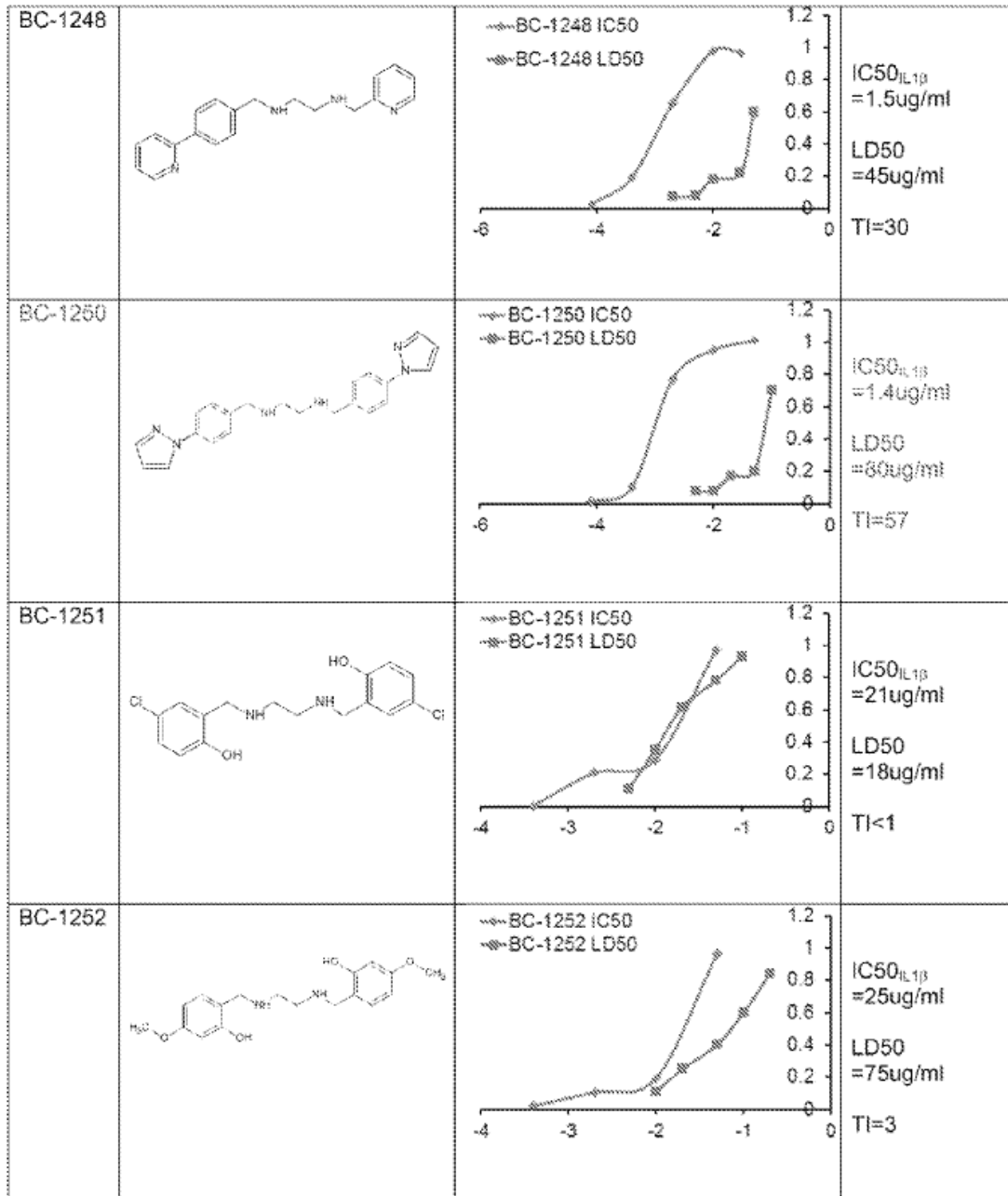


FIG. 20H

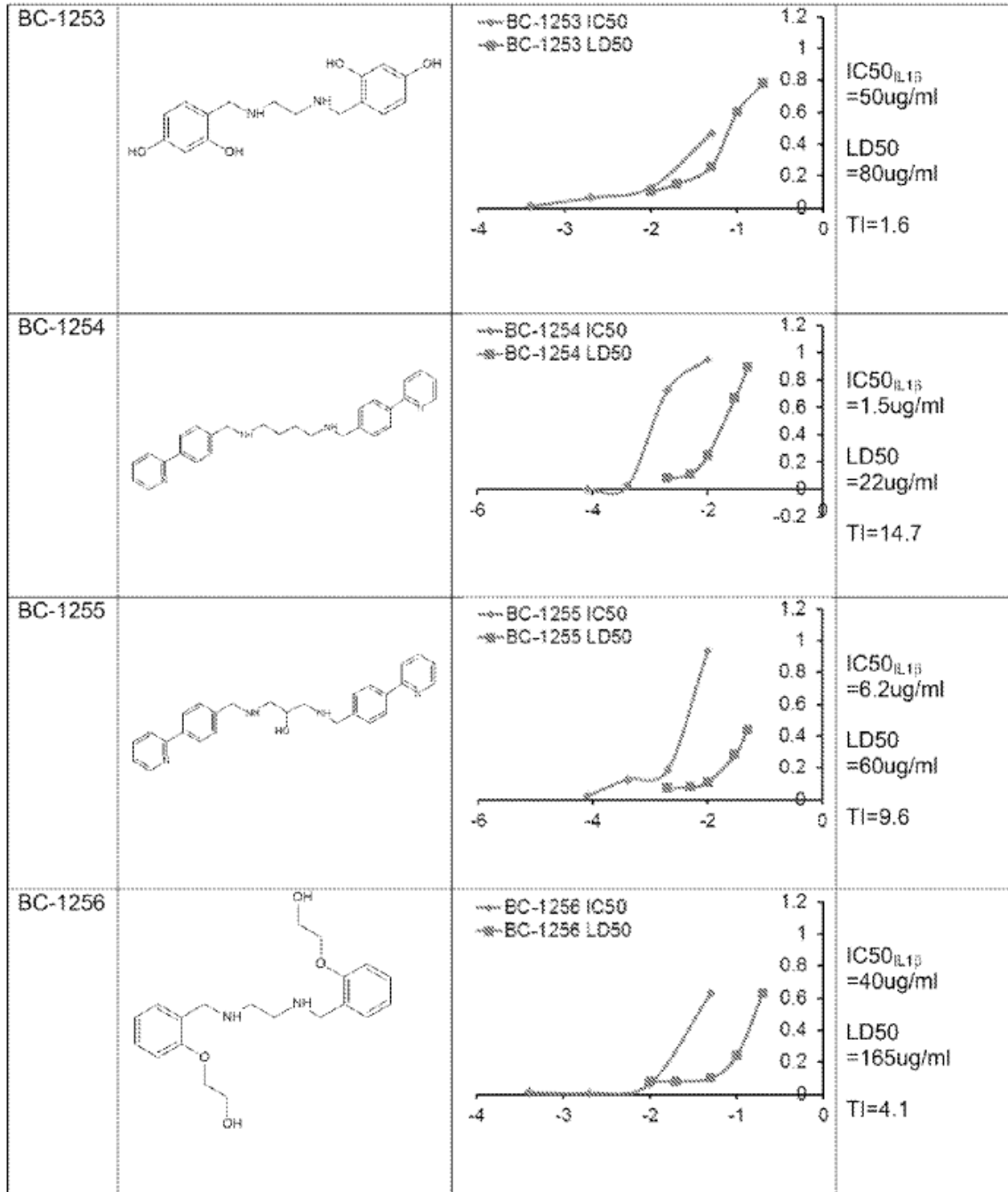


FIG. 20I

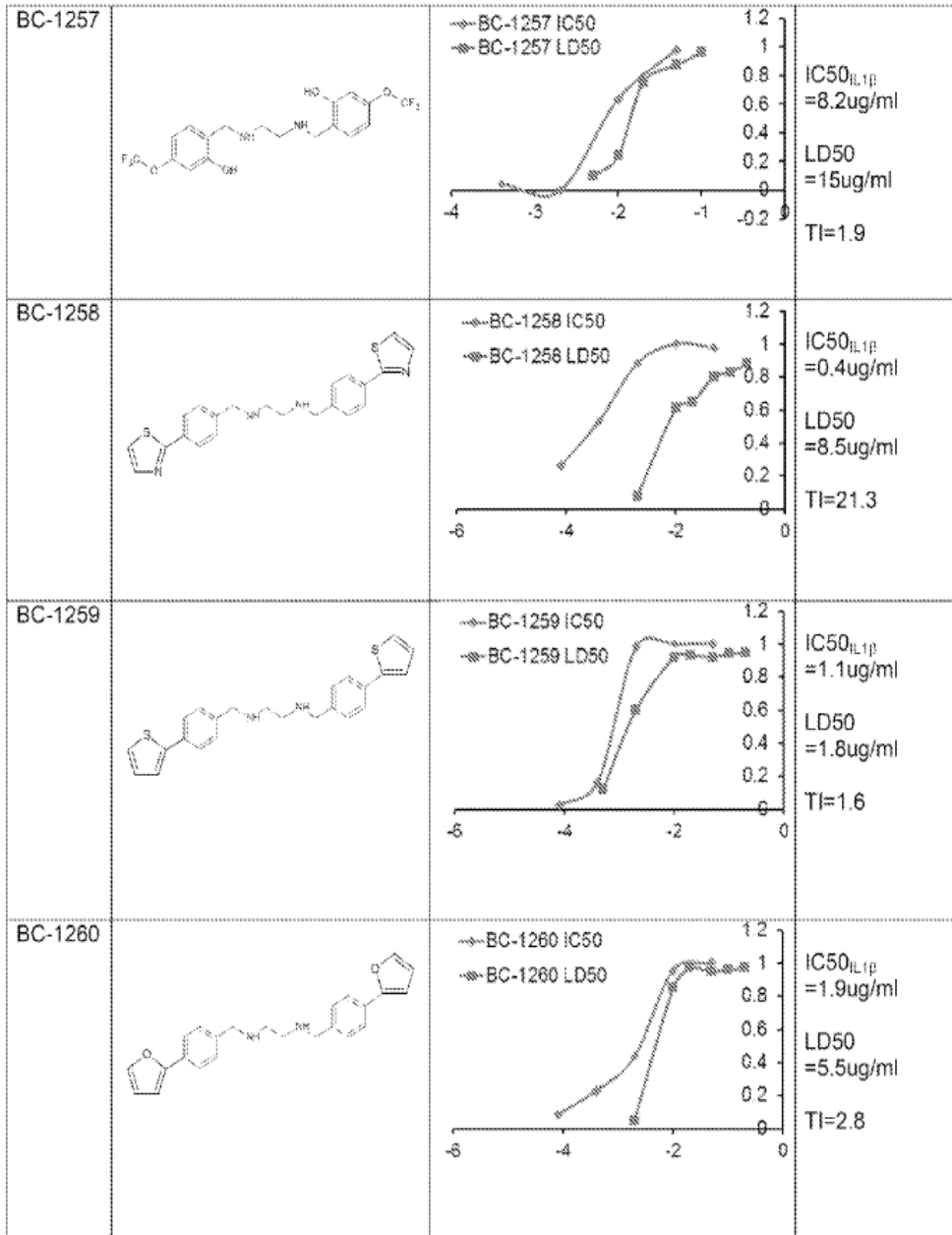


FIG. 20J

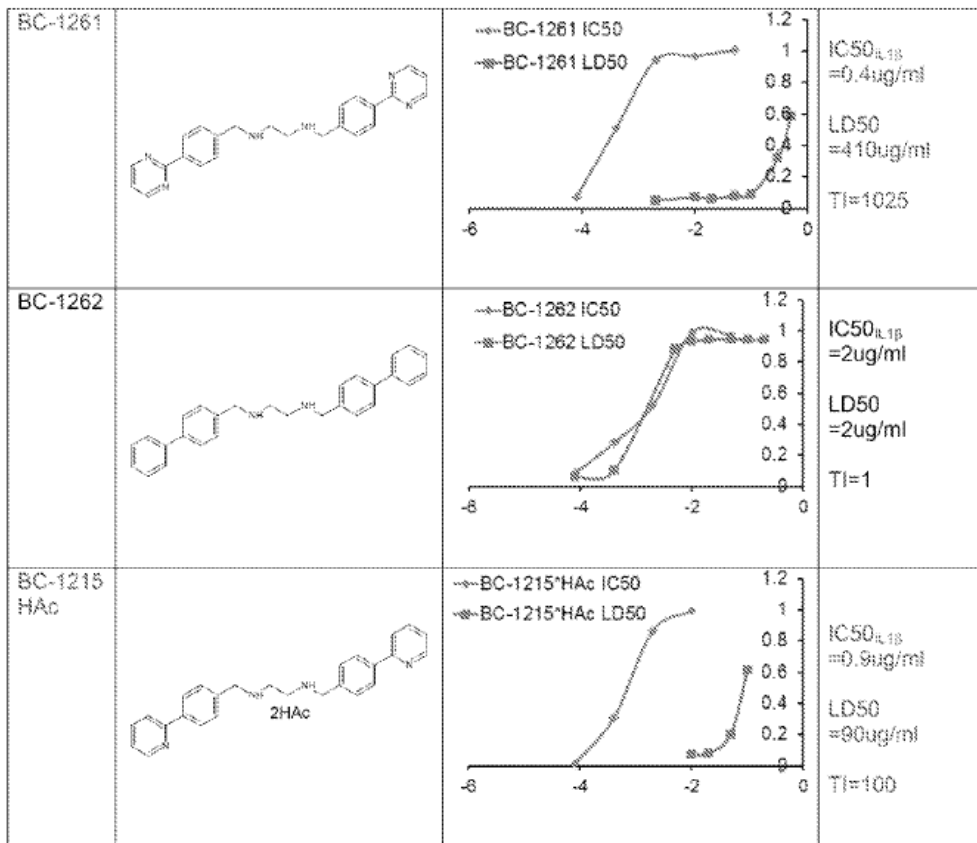


FIG. 21D

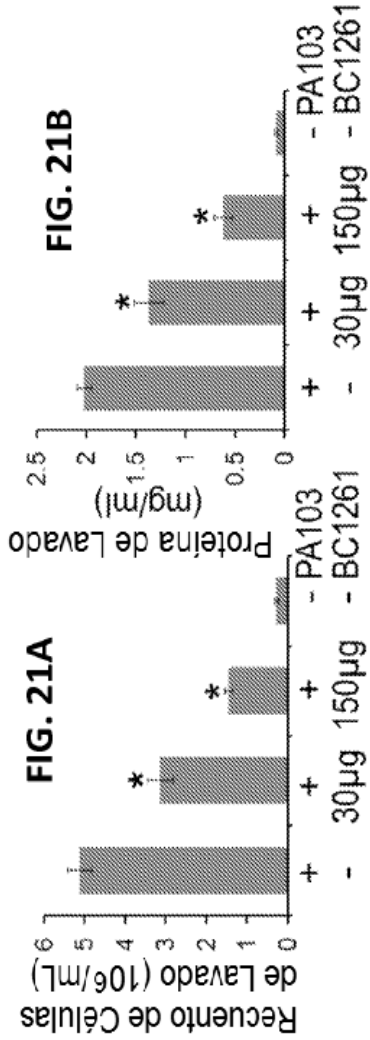
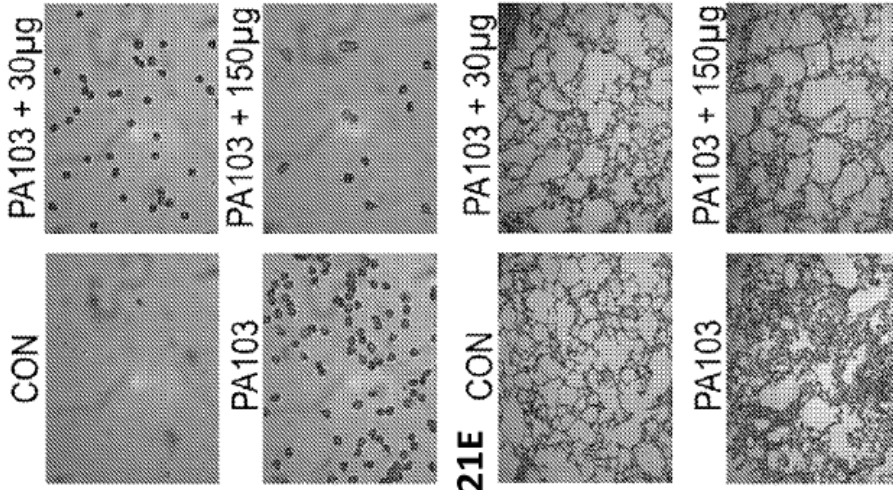
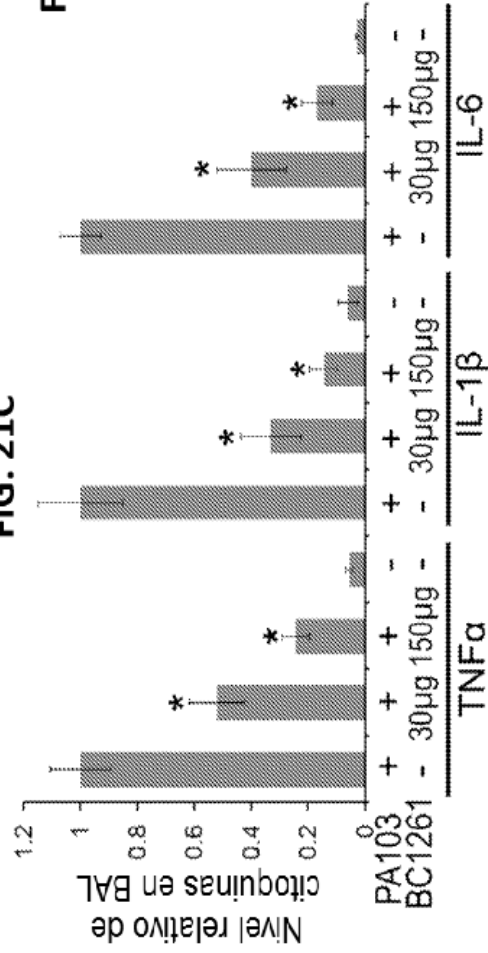


FIG. 21C



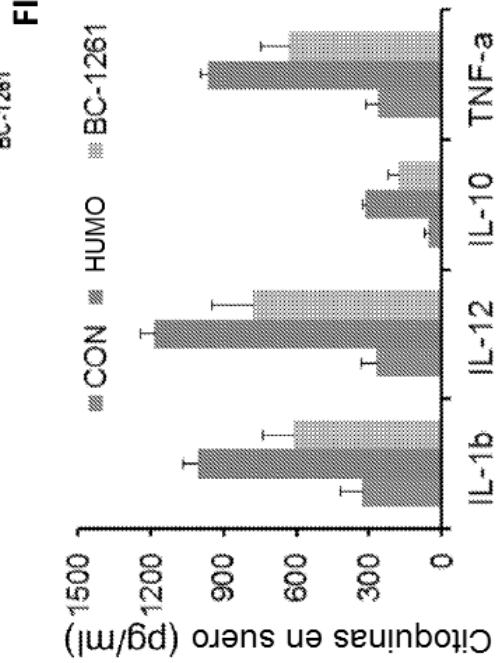
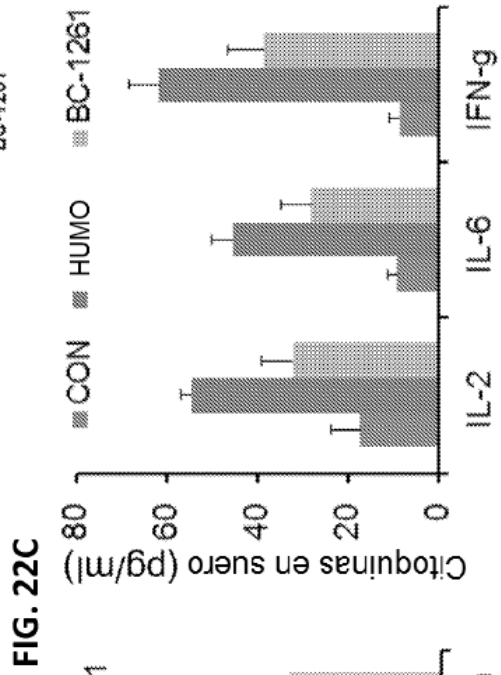
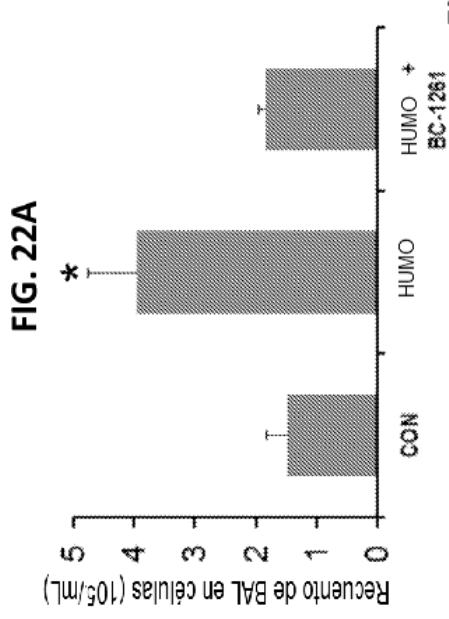
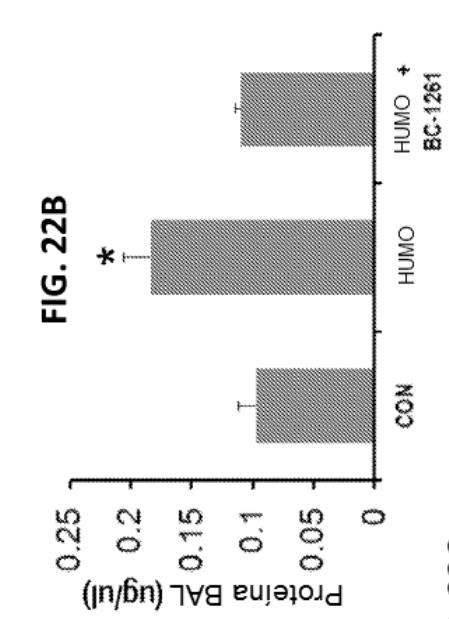


FIG. 23A

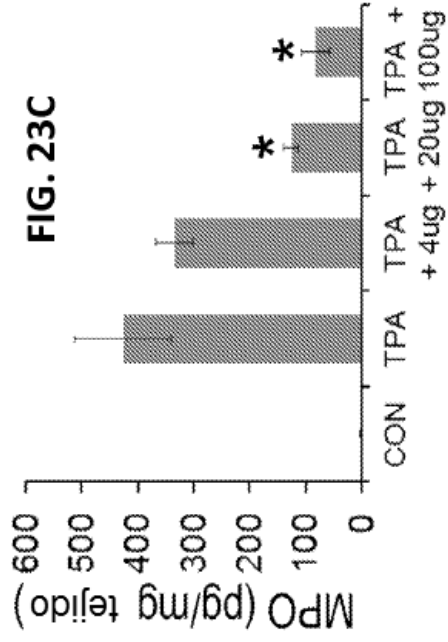
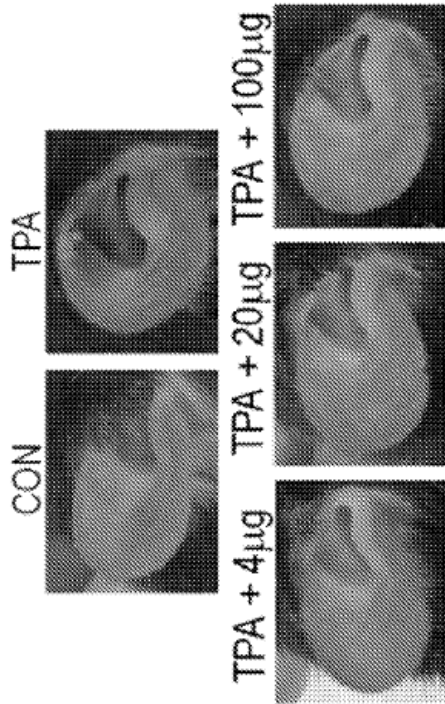
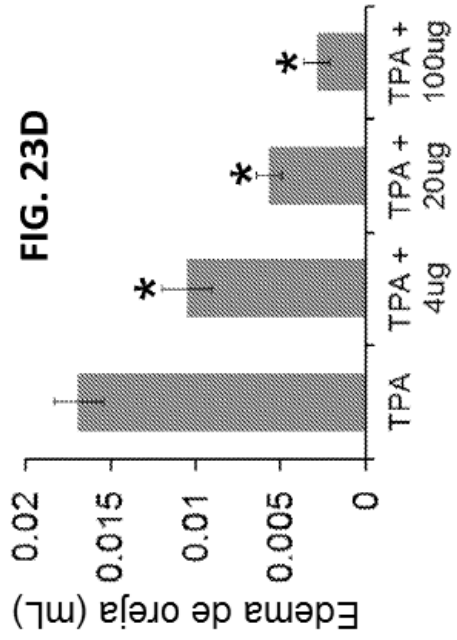
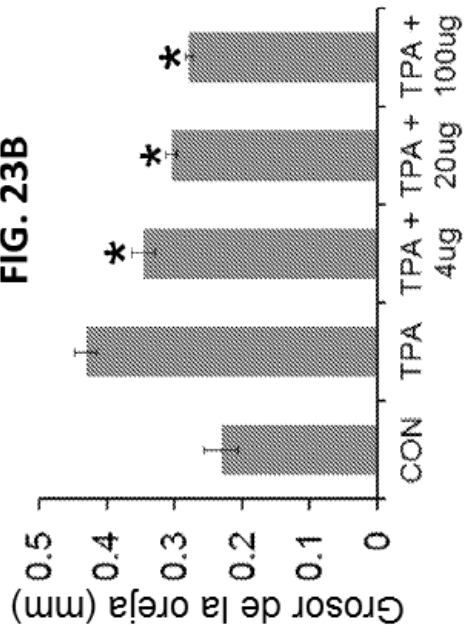
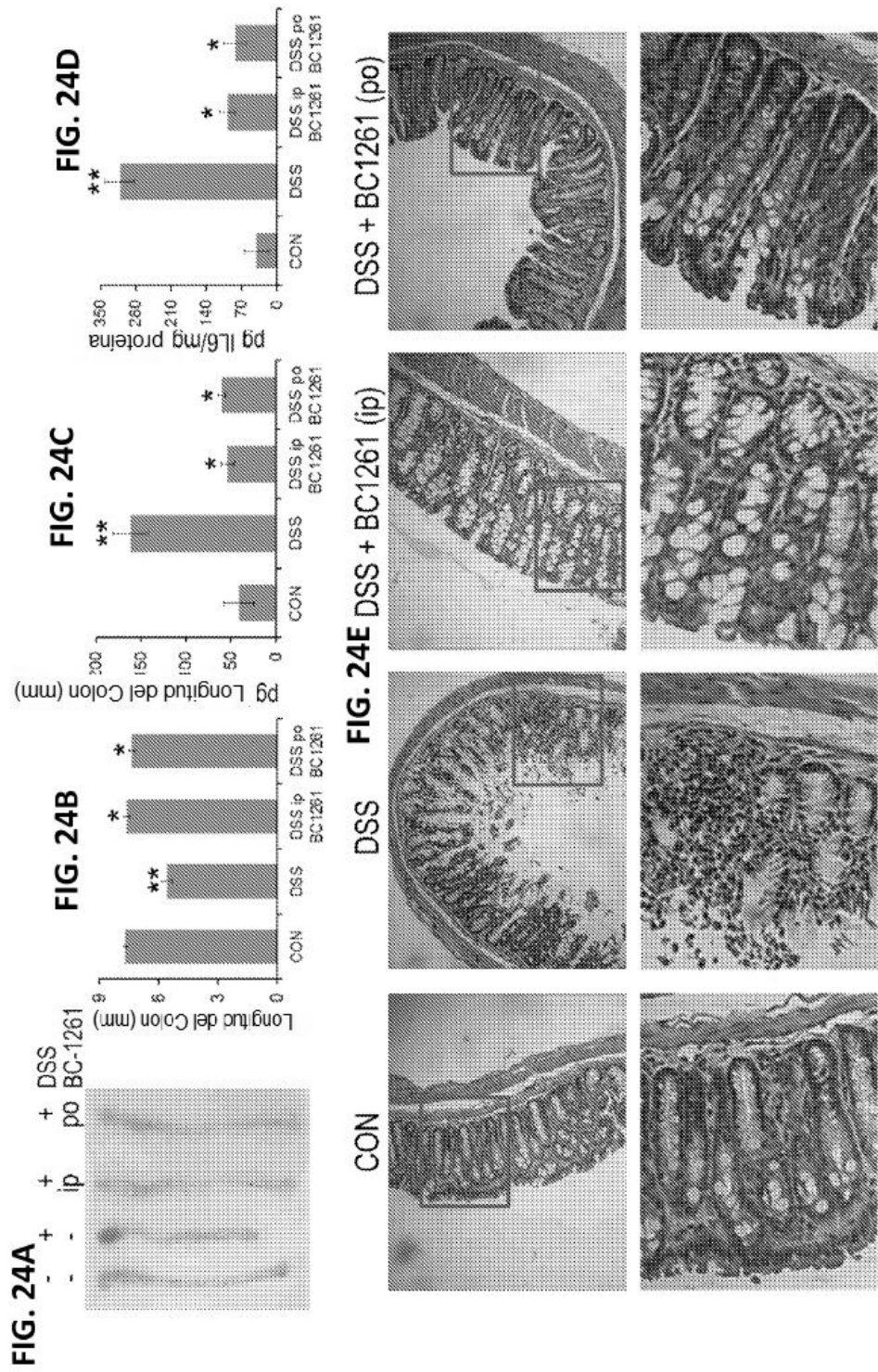


FIG. 23B





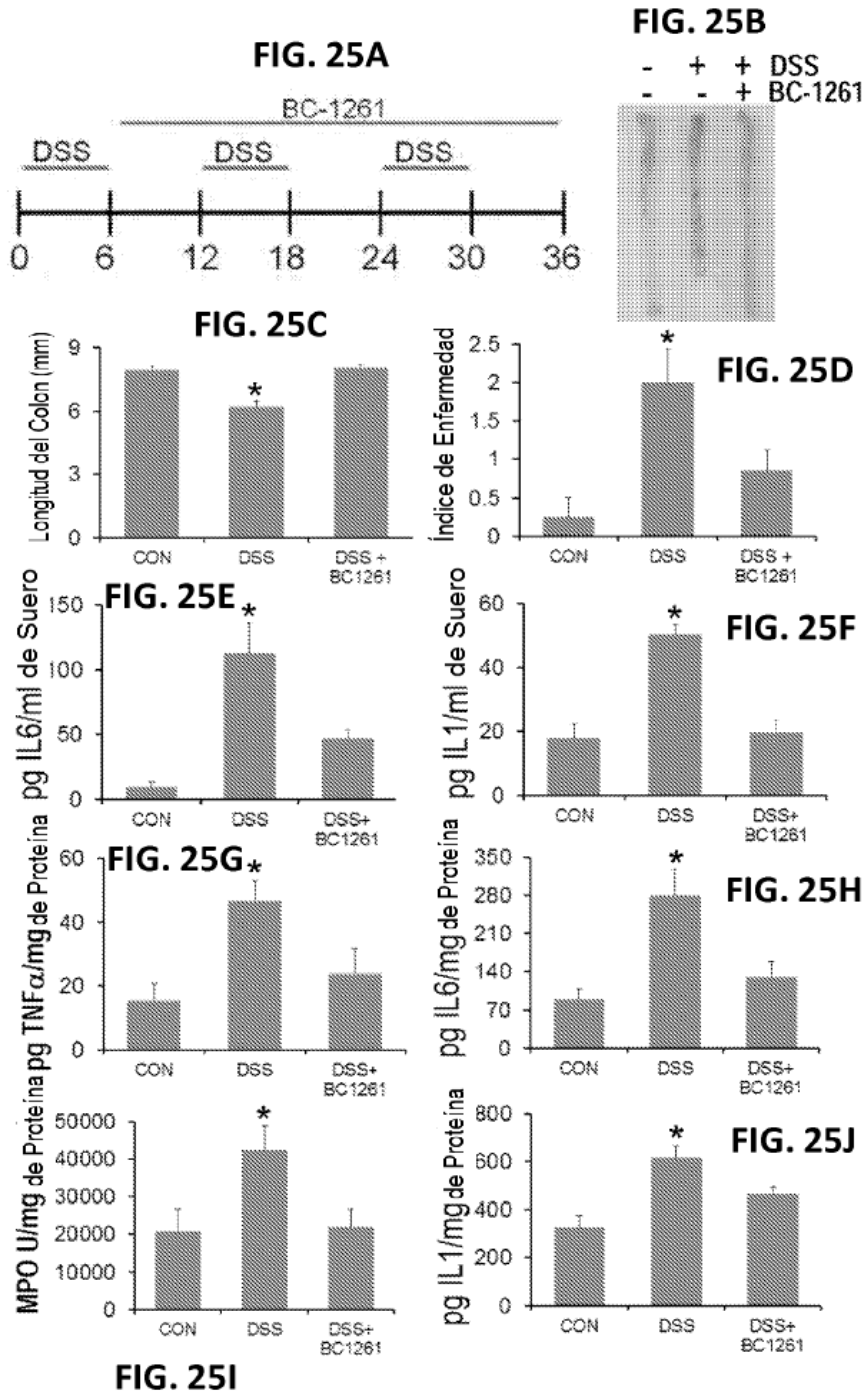


FIG. 27A

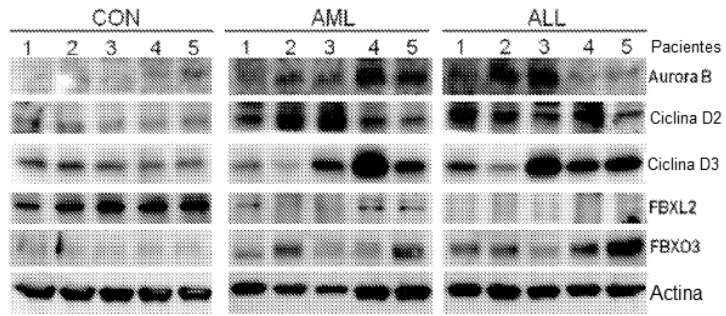


FIG. 27B

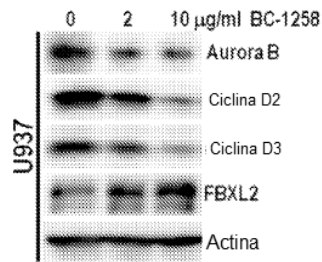


FIG. 27E

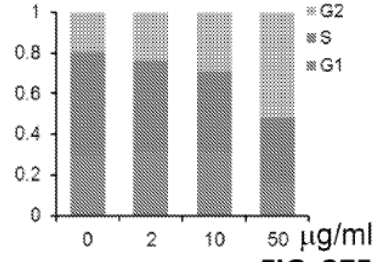


FIG. 27C

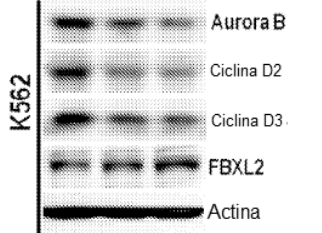


FIG. 27F

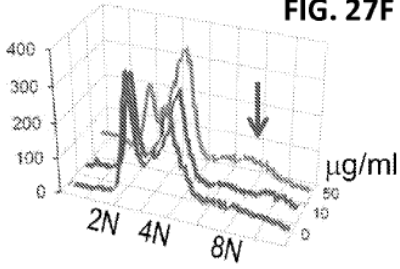
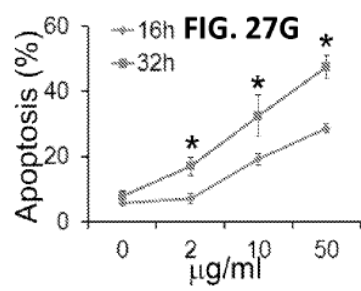
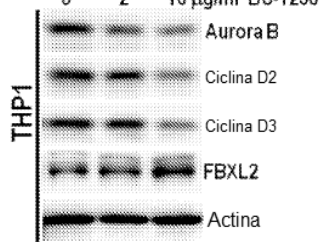
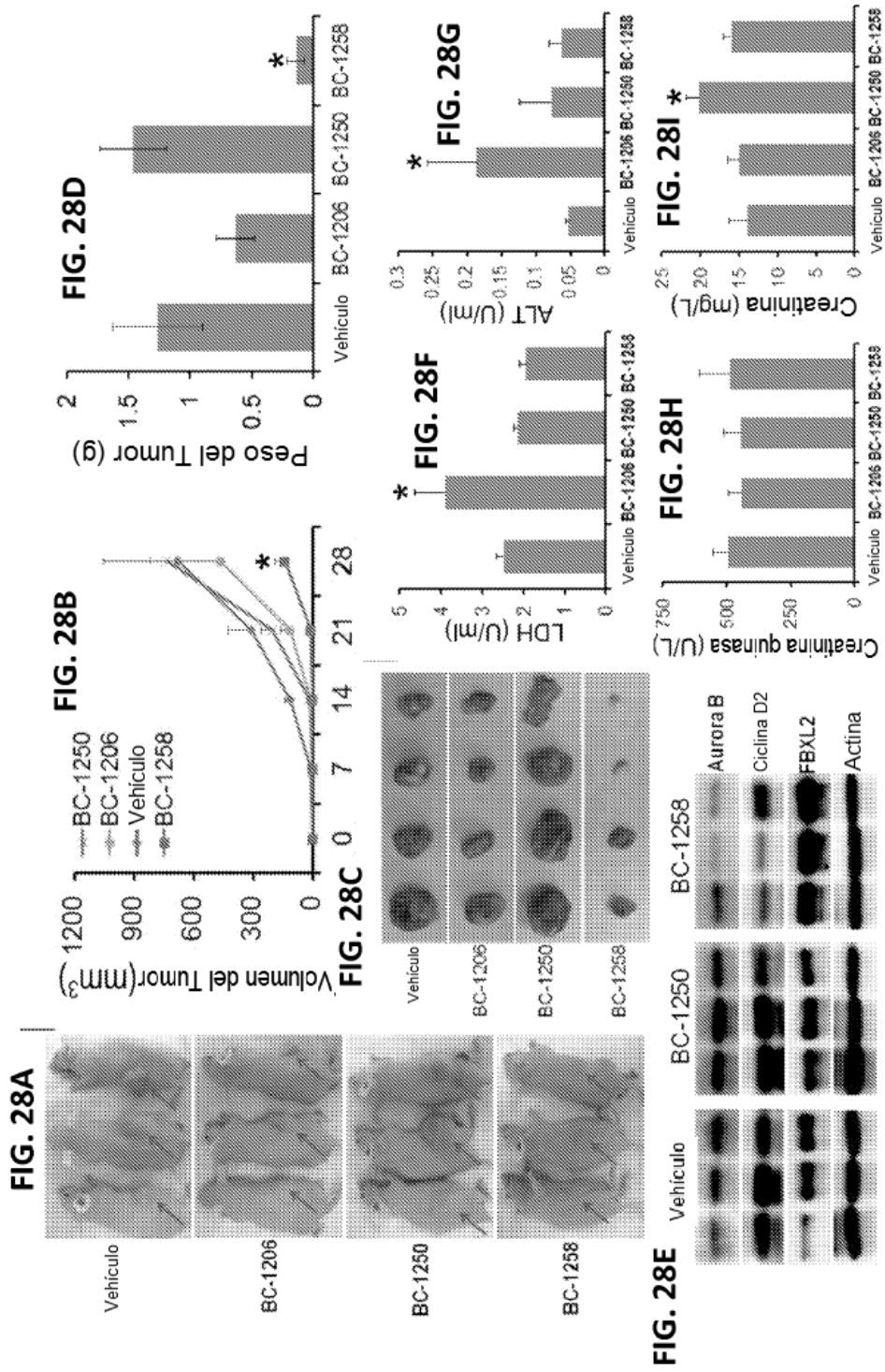


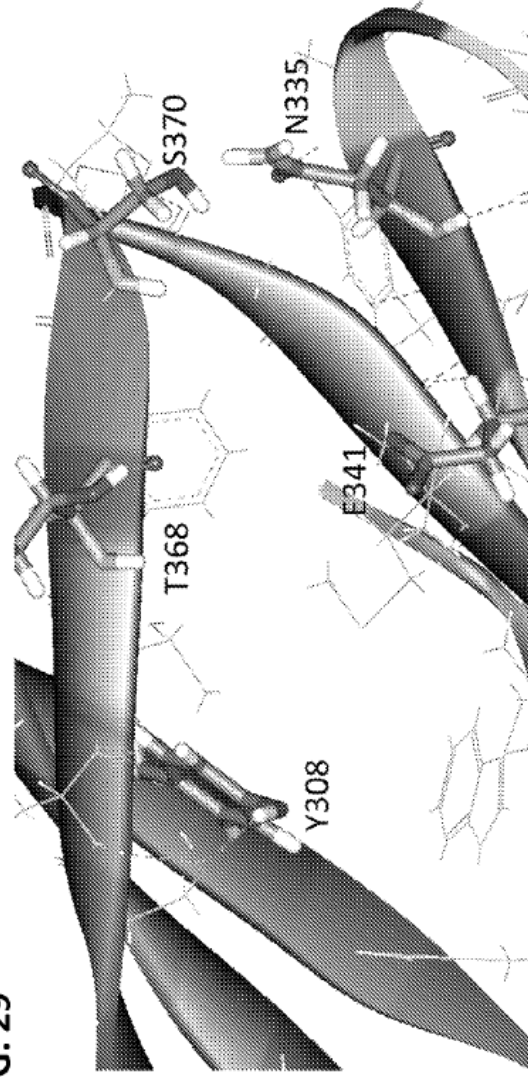
FIG. 27D





motivo de unión al fármaco ApaG

FIG. 29



Los aminoácidos de FBXO3 Y308, N335, E341, T368 y S370 forman un motivo de unión al fármaco

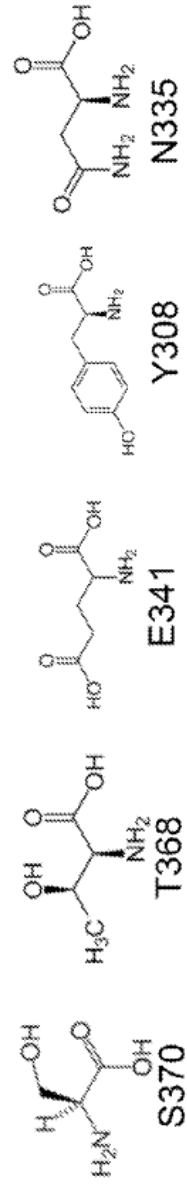
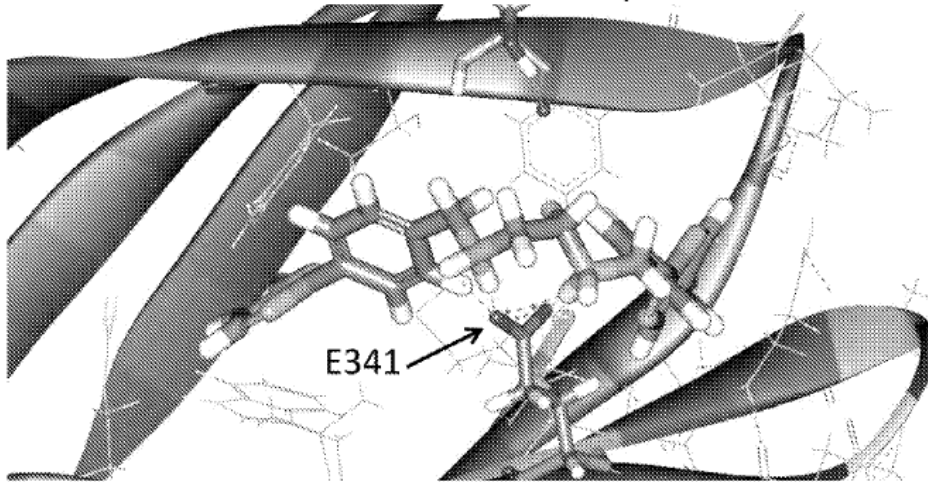
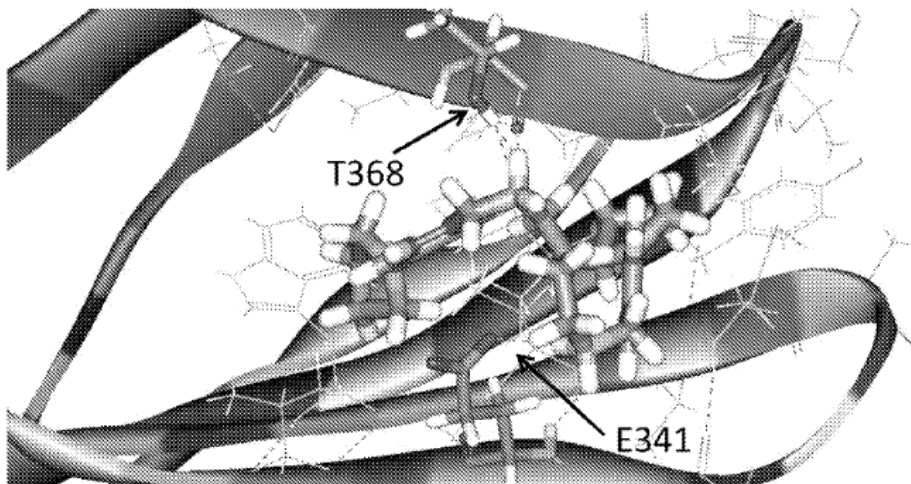


FIG. 30

Interacción del Residuo E341 de FBXO3-ApaG con BC-1261

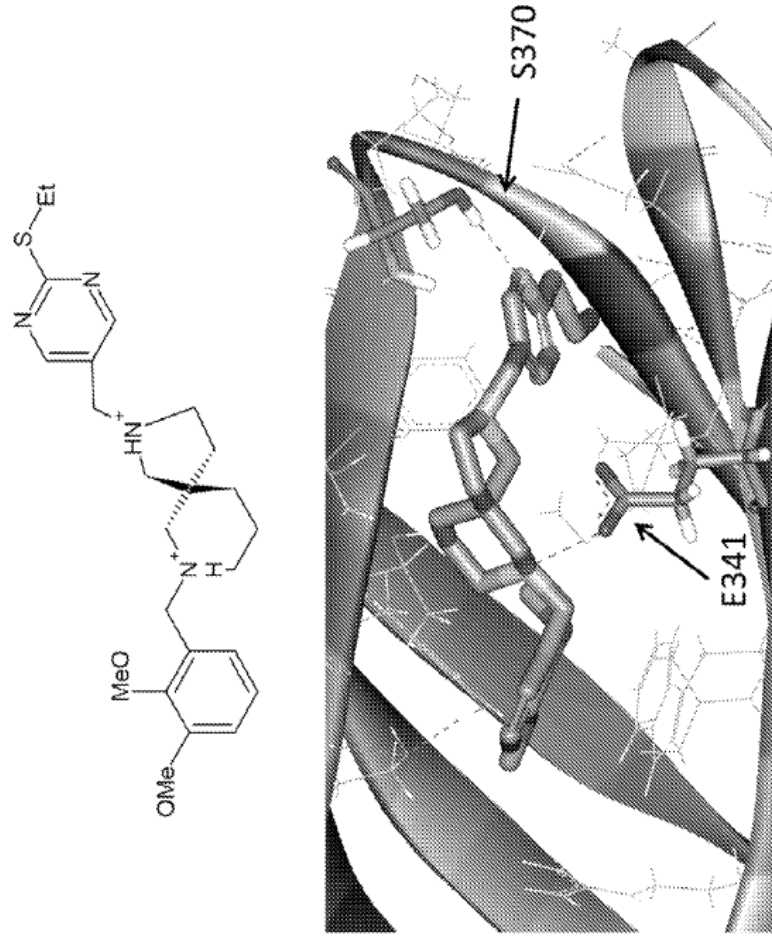


Interacción de los Residuos E341 y T368 de FBXO3-ApaG con BC-1234



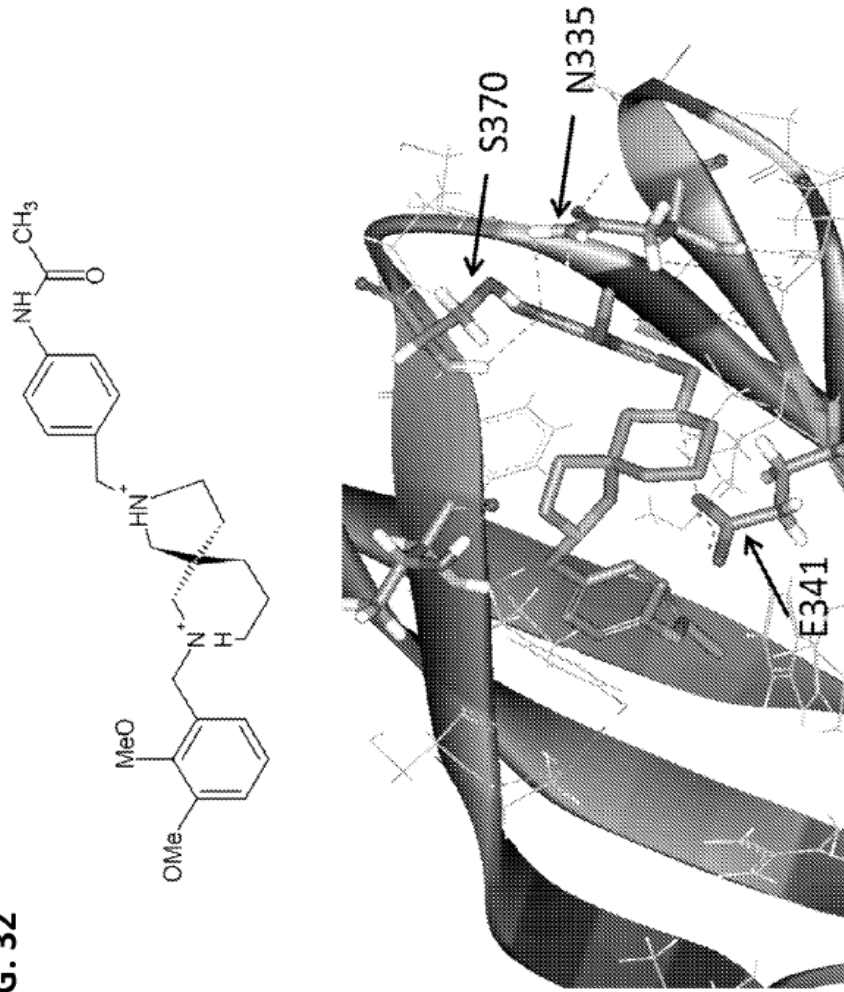
Interacción de los Residuos E341 y T368 de FBXO3-ApaG con BC-1304

FIG. 31



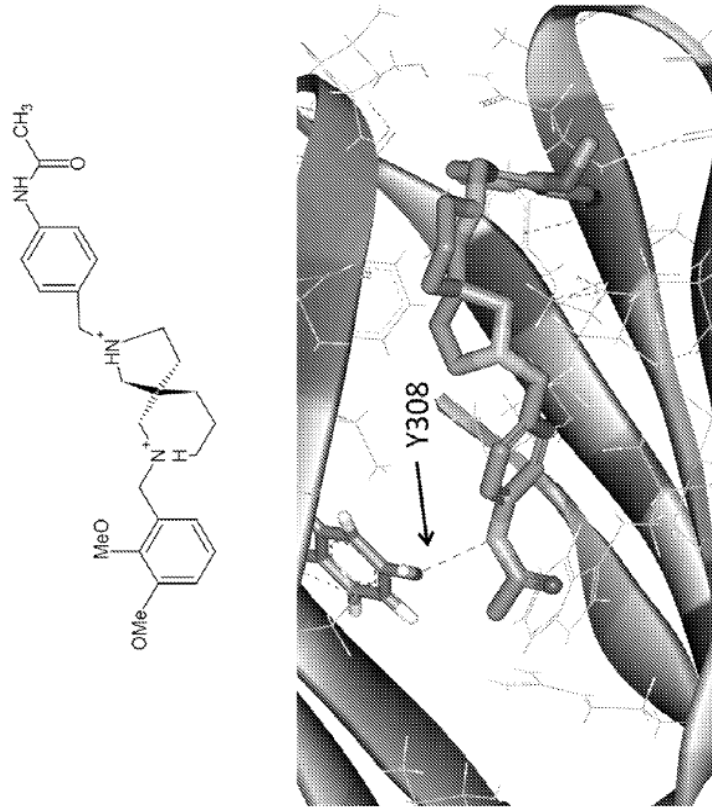
Residuos Y308 de FBXO3-ApaG con BC-1305

FIG. 32

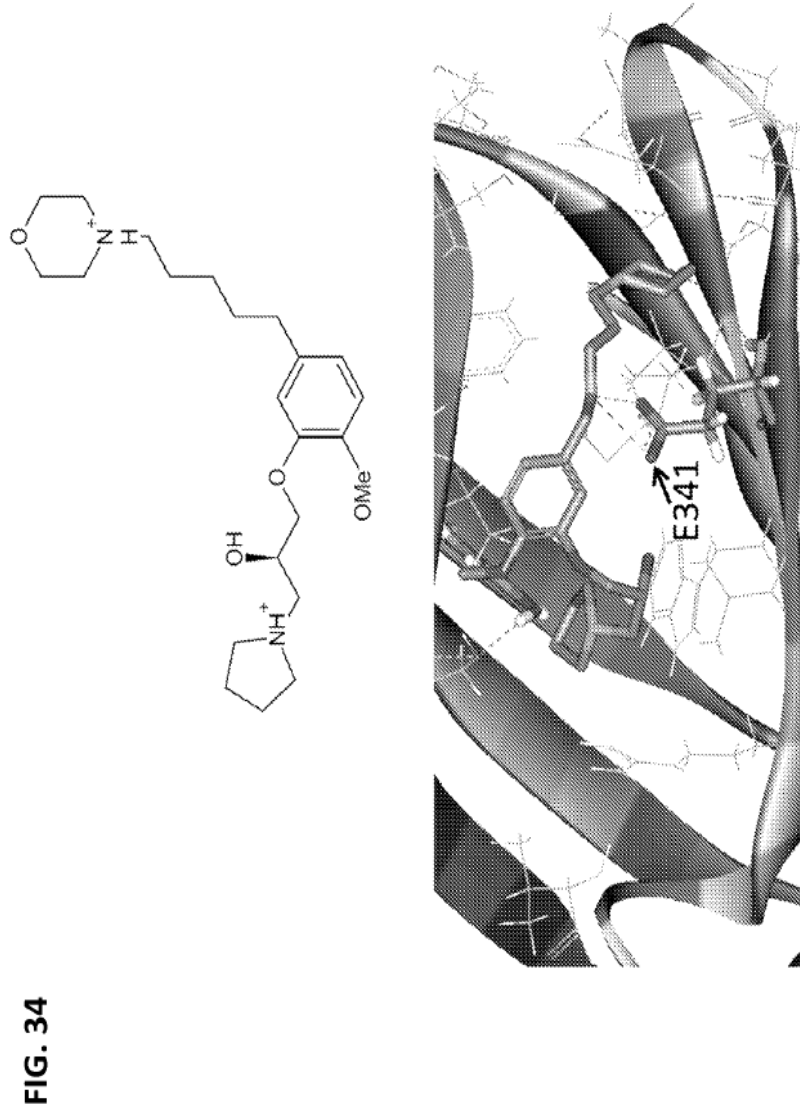


Residuos Y308 de FBXO3-ApaG con BC-305 (Posición secundaria)

FIG. 33

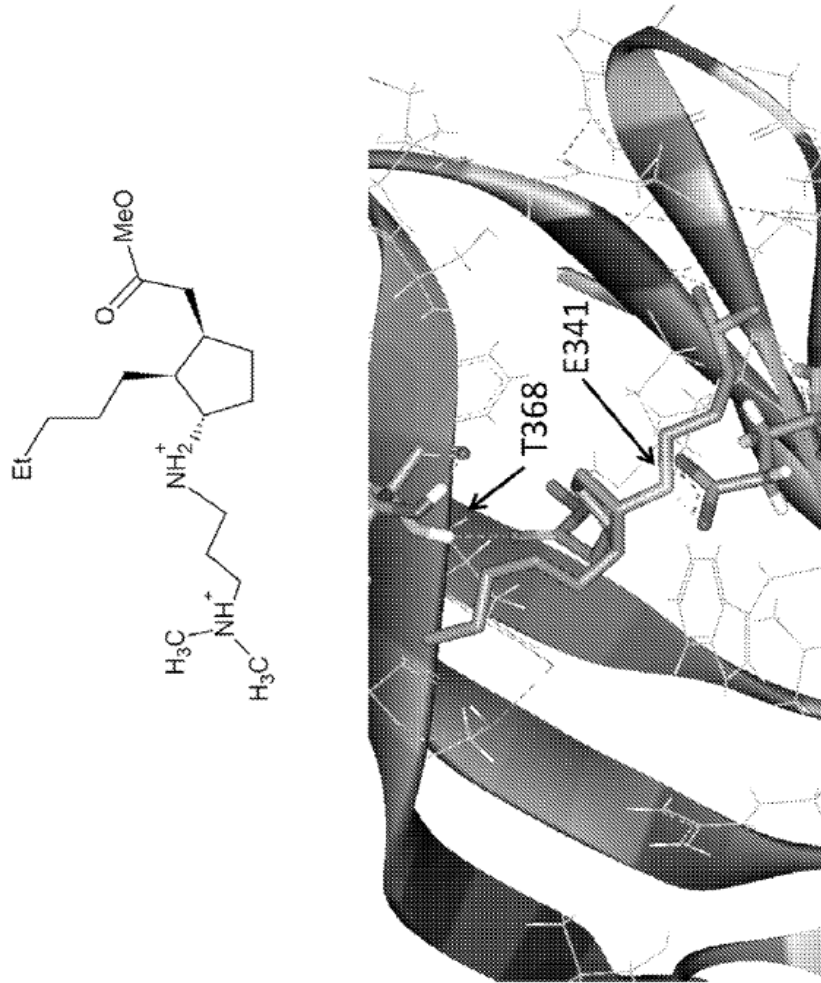


Interacción de los Residuos E341 de FBXO3-ApaG con BC-1306



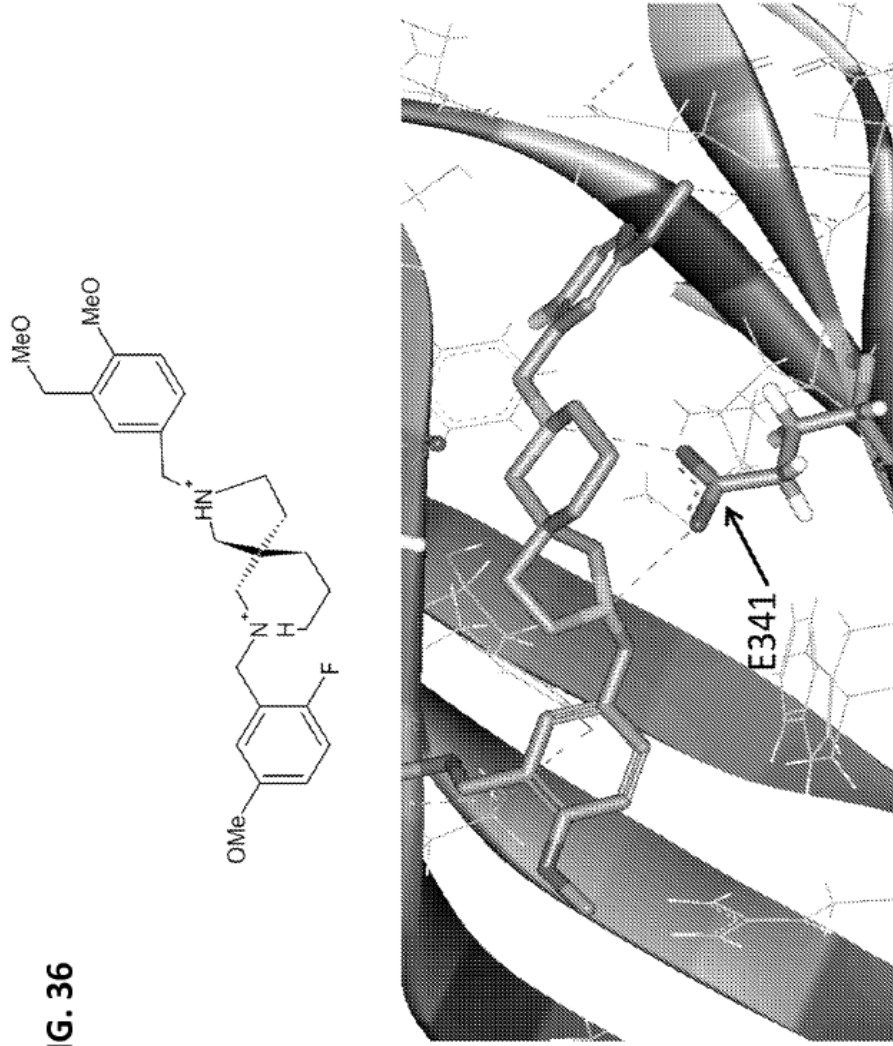
Interacción de los Residuos E341 y T368 de FBXO3-ApaG con BC-1307

FIG. 35



Interacción de los Residuos E341 de FBXO3-ApaG con BC-1308

FIG. 36



Interacción de los Residuos E341 de FBXO3-ApaG con BC-1309

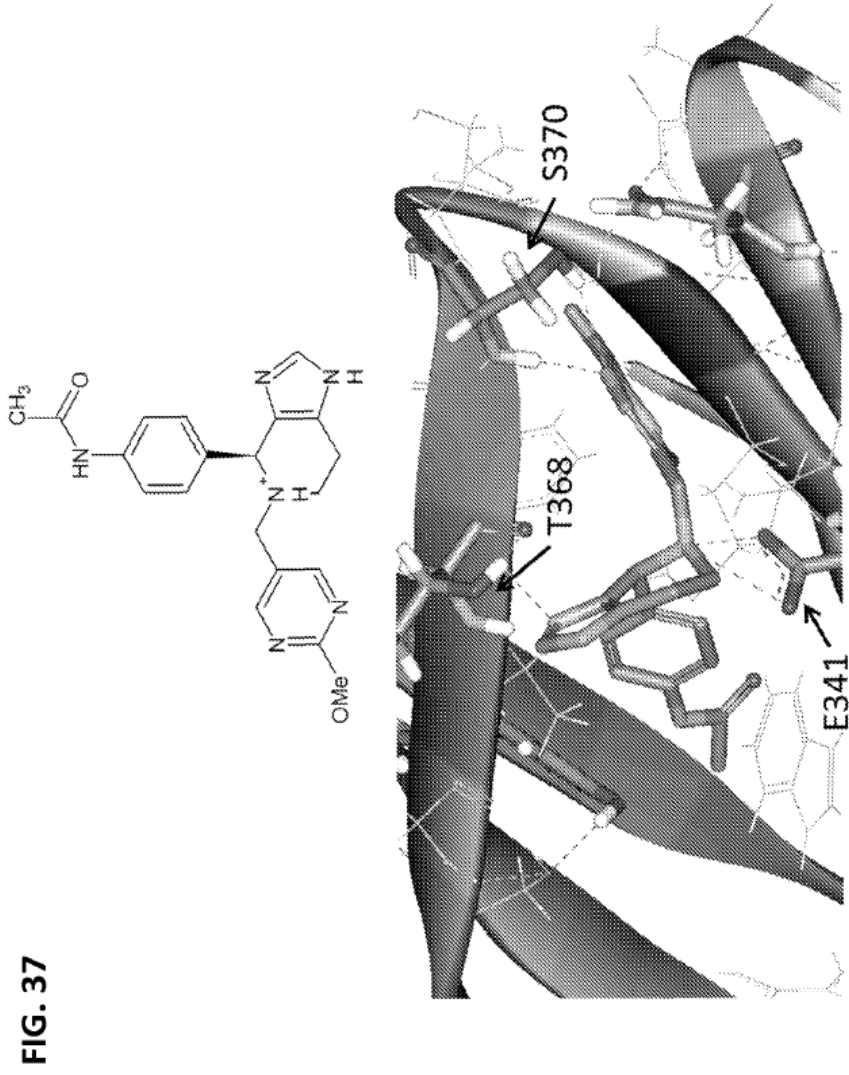


FIG. 38 Resumen de experimentos de toxicidad in vitro/afuera del objetivo

Ensayo	BC-1215 % Inh	BC-1261 % Inh
CYP450, 2D6	51	28
CYP450, 3A4	74	46
Óxido Nítrico Sintasa, Neuronal (nNOS)	83	32
Adrenérgico α 1, No selectivo	55	-4
Adrenérgico α 2, No selectivo	50	36
Canal de Calcio tipo L, Fenilalquilamina	72	-2
Opiato (μ OP3, MOP)	44	10
Canal de Potasio HERG	55	8
Serotonina (5-Hidroxitriptamina) 5-HT2	57	31
Serotonina (5-Hidroxitriptamina) 5-HT2B	84	20
Serotonina (5-Hidroxitriptamina) 5-HT2C	61	37
Serotonina (5-Hidroxitriptamina) 5-HT4	49	19
Canal de Sodio, Sitio 2	103	43
Transportador, Dopamina (DAT)	81	25
Transportador, Norepinefrina (NET)	86	51
Transportador, Serotonina (5-Hidroxitriptamina)(SERT)	58	6
Histamina H2	84	85
	15/109	2/109

Aparte de los 109 ensayos realizados, BC1215 genera 15 aciertos (>50% de inhibición de la actividad), mientras que BC-1261 solo genera 2 aciertos