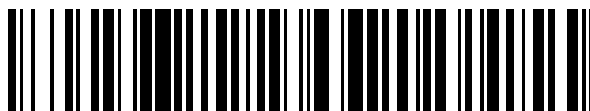


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 922**

51 Int. Cl.:

A61K 31/18 (2006.01)

C07D 307/64 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

C07C 317/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2014** **E 17195759 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019** **EP 3284463**

54 Título: **Donadores de nitroxilo con índice terapéutico mejorado**

30 Prioridad:

18.01.2013 US 201361754237 P

14.03.2013 US 201361782781 P

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

02.04.2020

73 Titular/es:

CARDIOXYL PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1450 Raleigh Rd., Suite 212
Chapel Hill, NC 27517, US

72 Inventor/es:

KALISH, VINCENT JACOB;
BROOKFIELD, FREDERICK ARTHUR;
COURTNEY, STEPHEN MARTIN;
FROST, LISA MARIE y
TOSCANO, JOHN, P.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 751 922 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

Donadores de nitroxilo con índice terapéutico mejorado

5 1. Antecedentes

El nitroxilo (HNO) ha demostrado tener efectos cardiovasculares positivos en modelos *in vitro* e *in vivo* de corazones con insuficiencias. Sin embargo, a pH fisiológico, el nitroxilo dimeriza a ácido hiponitroso, el cual se deshidrata posteriormente en óxido nitroso; debido a esta metaestabilidad, el nitroxilo de uso terapéutico debe generarse *in situ* a partir de compuestos de donadores. Se han descrito y propuesto varios compuestos capaces de donar nitroxilo para su uso en el tratamiento de trastornos conocidos o que supuestamente son sensibles al nitroxilo. Véase, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.936.639; 7.696.373; 8.030.356; 8.268.890; 8.227.639; y 8.318.705 y publicaciones antes de la concesión de los Estados Unidos n.º 2009/0281067; 2009/0298795; 2011/0136827; y 2011/0144067. Aunque todos estos compuestos son capaces de donar nitroxilo, difieren en diversas propiedades fisicoquímicas y permanece una necesidad de identificar donadores de nitroxilo que tengan propiedades fisicoquímicas que mejor se adapten para el tratamiento de afecciones clínicas específicas a través de vías específicas de administración.

La patente de los Estados Unidos n.º 8.030.356 describe la síntesis de derivados de compuestos del tipo de ácido de Piloty que son capaces de donar nitroxilo en condiciones fisiológicas y son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardíaca y lesión por isquemia/reperfusión. El donador de nitroxilo CXL-1020 (*N*-hidroxi-2-metanosulfonilbenzeno-1-sulfonamida) ha sido evaluado en un estudio de seguridad de fase I en voluntarios sanos y en un estudio de escala de dosis, de doble ciego, controlado por placebo de fase IIa realizado en múltiples hospitales. Sabbah y col., "Nitroxyl (HNO) a novel approach for the acute treatment of heart failure", *Circ Heart Fail.*, publicado online el 9 de octubre de 2013 (Online ISSN: 1941-3297, ISSN impreso: 1941-3289). Los estudios demostraron que en pacientes con insuficiencia cardíaca sistólica, CXL-1020, cuando se administró por vía intravenosa como una solución acuosa a pH = 4, redujo las presiones de llenado del corazón tanto derecha como izquierda y la resistencia vascular sistémica, mientras que aumentaba el índice de volumen cardíaco y de ictus. Por tanto, los estudios demostraron que el CXL-1020 potencia la función miocárdica en pacientes humanos que padecen insuficiencia cardíaca. Sin embargo, en dosis umbral de CXL-1020 se necesitaba producir efectos hemodinámicos, se encontró que el compuesto inducía efectos secundarios que incluían niveles inaceptables de irritación inflamatoria en y distal a el lugar de inserción intravenosa y los autores informan que debido a tales efectos secundarios, este compuesto no sería un candidato viable para una terapia humana.

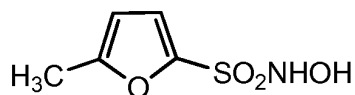
Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar nuevos compuestos y composiciones donadores de nitroxilo que sean útiles para el tratamiento de insuficiencia cardíaca y que tengan un perfil toxicológico adecuado. El desarrollo de tales compuestos requiere una comprensión del perfil farmacocinético, asociado a la donación de nitroxilo y los factores que influyen el perfil toxicológico. La incompreensión de estos factores ha obstaculizado el desarrollo de compuestos donadores de nitroxilo para su uso clínico.

Además, la formulación de compuestos donadores de nitroxilo ha probado ser un reto considerable. Muchos de los actuales donadores de nitroxilo son insolubles en soluciones acuosas y/o no son lo suficientemente estables. Los problemas de solubilidad y estabilidad a menudo impiden el uso de tales compuestos en composiciones farmacéuticas para la administración parenteral y/o oral. Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar composiciones que contengan compuestos donadores de nitroxilo para la administración parenteral y/o oral que sean suficientemente estables y tengan perfiles farmacológicos y toxicológicos favorables.

2. Sumario de la divulgación

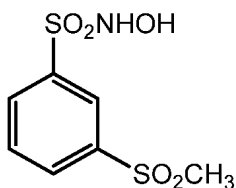
La presente divulgación se refiere al descubrimiento de compuestos donadores de nitroxilo que son altamente eficaces en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, insuficiencia cardíaca) y tienen un perfil toxicológico adecuado.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en (a) un método para modular los niveles de nitroxilo *in vivo* o (b) un método para tratar una enfermedad o una afección que responden a terapia de nitroxilo, en el que la composición farmacéutica comprende un compuesto de fórmula (1) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Con respecto a esto, el compuesto para su uso en la invención es un compuesto donador de nitroxilo de fórmula (1):



(1).

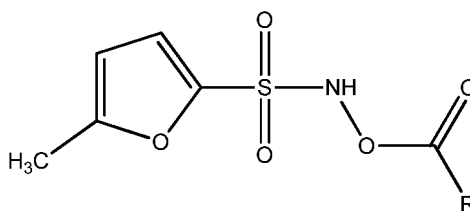
También se divulga en el presente documento, con fines de referencia, un compuesto de fórmula (2):



(2).

5

También se divulga en el presente documento, con fines de referencia, son compuestos de fórmula (3):

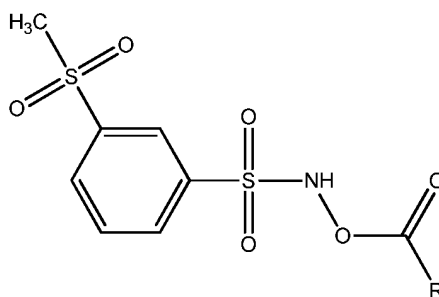


(3).

- 10 en la que R es hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), -alqueno (C₂-C₄), fenilo, bencilo, ciclopentilo, ciclohexilo, -(C₅-C₇) heterocicloalquilo, benciloxi, -O-alquilo (C₁-C₆), -NH₂, -NH-alquilo (C₁-C₄) o -N(alquilo (C₁-C₄))₂, en la que dicho -alquilo (C₁-C₆), -alqueno (C₂-C₄), fenilo, bencilo, ciclopentilo, ciclohexilo, -(C₅-C₇) heterocicloalquilo, benciloxi, -O-alquilo (C₁-C₆), -NH-alquilo (C₁-C₄) o -N(alquilo (C₁-C₄))₂ pueden sustituirse o no sustituirse con uno o más sustituyentes seleccionados a partir de halo, alquilo (C₁-C₆), -alqueno (C₂-C₄), -alquino (C₂-C₃), -heteroarilo (de 5 o 6 miembros),
 15 -O-alquilo (C₁-C₆), -S-alquilo (C₁-C₆), -C(halo)₃, -CH(halo)₂, -CH₂(halo), -CN, -NO₂, -NH₂, -NH-alquilo (C₁-C₄), -N(alquilo (C₁-C₄))₂, -C(=O)alquilo (C₁-C₄), -C(=O)O alquilo (C₁-C₄), -OC(=O)alquilo (C₁-C₄), -OC(=O)NH₂, -S(=O)alquilo (C₁-C₄) o -S(=O)₂ alquilo (C₁-C₄). En realizaciones particulares, R es metilo, etilo, bencilo o fenilo. En realizaciones particulares, R es metilo o etilo. En realizaciones particulares, R es metilo. En realizaciones particulares, R es etilo. En realizaciones particulares, R es bencilo o fenilo. En realizaciones particulares, R es bencilo. En realizaciones particulares, R es fenilo.

20

También se divulga en el presente documento, con fines de referencia, son compuestos de fórmula (4):



(4).

25

en la que R y sus realizaciones son tal como se han definido anteriormente con respecto al compuesto de fórmula (3).

- Los compuestos de la divulgación tienen o se cree que tienen un índice terapéutico altamente favorable. En particular, los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) tienen ambos perfiles hemodinámicos y perfiles toxicológicos favorables. El perfil toxicológico de los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) mejora significativamente en relación con el candidato clínico CXL-1020. Se ha descubierto que el perfil toxicológico favorables de los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) procede en parte de las semividas de los compuestos y el descubrimiento de un intervalo óptimo de semividas para tales donadores de nitroxilo. El compuesto de fórmula (1) tiene una semivida de aproximadamente 68 minutos cuando se mide en una solución aireada de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a un pH de 7,4 y
 30 aproximadamente 65 minutos cuando se mide en plasma humano a un pH de 7,4 en la presencia de anticoagulante

35

(por ejemplo, heparina o citrato de sodio), cada una medida en condiciones especificadas en el ejemplo 4. El compuesto de fórmula (2) tiene una semivida de aproximadamente 50 minutos cuando se mide en una solución aireada de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a un pH de 7,4 y aproximadamente 37 minutos cuando se mide en plasma humano a un pH de 7,4 en la presencia de anticoagulante (por ejemplo, heparina o citrato de sodio), cada una medida en condiciones especificadas en el ejemplo 4.

Además, los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) son estables en soluciones acuosas y son altamente solubles en agua; son, de este modo, apto para tanto la administración parenteral como oral. El compuesto de fórmula (1) tiene una solubilidad en equilibrio en agua superior a 100 mg/ml mientras que el compuesto de fórmula (2) tiene una solubilidad en equilibrio en agua de aproximadamente 10 mg/ml (por ejemplo, en condiciones especificadas en el ejemplo 5).

Los compuestos de la divulgación pueden usarse para tratar varias afecciones que son sensibles a la terapia con nitroxilo. Por ejemplo, un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede usarse para tratar o prevenir la aparición de enfermedades cardiovasculares. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede usarse para tratar una enfermedad cardiovascular, una lesión por isquemia/reperfusión, una hipertensión pulmonar u otra afección sensible a la terapia con nitroxilo. En otras realizaciones, un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede usarse para tratar una insuficiencia cardíaca. En una realización particular, un compuesto de la divulgación puede usarse para tratar una insuficiencia cardíaca descompensada (p. ej., insuficiencia cardíaca descompensada aguda). En determinadas realizaciones, los compuestos de la divulgación pueden usarse para tratar insuficiencia cardíaca sistólica. En realizaciones particulares, los compuestos de la divulgación pueden usarse para tratar insuficiencia cardíaca diastólica.

En un aspecto, los compuestos de la divulgación pueden administrarse mediante administración parenteral (p. ej., subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Los compuestos de la divulgación no inducen efectos secundarios locales (p. ej., irritación y/o inflamación) durante o después de la administración parenteral en dosis capaces de proporcionar un nivel deseado de eficacia.

En realizaciones en las que se administra parenteralmente un compuesto de la divulgación, se administra generalmente como una solución acuosa o suspensión. La solución acuosa o suspensión puede tener un pH de 4 a aproximadamente 6,5. En realizaciones particulares, un compuesto de la divulgación puede formularse para la inyección parenteral a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5. En otras realizaciones, un compuesto de la divulgación puede formularse para la inyección parenteral a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6. En algunas realizaciones, la formulación para la administración parenteral puede incluir un agente potenciador de la estabilidad.

Cuando se administra parenteralmente (p. ej., por vía intravenosa) a un sujeto humano, puede dosificarse un compuesto de la divulgación a una velocidad de aproximadamente 5 µg/kg/min a aproximadamente 100 µg/kg/min. En determinadas realizaciones, un compuesto de la divulgación puede dosificarse a un sujeto humano a una velocidad de aproximadamente 10 µg/kg/min a aproximadamente 70 µg/kg/min. En determinadas realizaciones, un compuesto de la divulgación puede dosificarse a un sujeto humano a una velocidad de aproximadamente 15 µg/kg/min a aproximadamente 50 µg/kg/min. En determinadas realizaciones, un compuesto de la divulgación puede dosificarse a un sujeto humano a una velocidad de aproximadamente 20 µg/kg/min a aproximadamente 40 µg/kg/min.

En otra realización, los compuestos de la divulgación pueden formularse para administración oral. Los compuestos para la administración oral pueden formularse como formas de dosificación líquida o sólida. En realizaciones particulares en las que el compuesto donador de nitroxilo se formula como una forma de dosificación líquida oral, el polietilenglicol 300 (PEG300) puede servir como excipiente ilustrativo.

3. Breve descripción de las figuras

La **FIG. 1** muestra el perfil hemodinámico de CXL-1020 y dos compuestos de la divulgación (compuestos de fórmula (1) y fórmula (2)) usando un modelo de ritmo de taquicardia de insuficiencia cardíaca (véase ejemplo 6). Cada componente se administró por vía intravenosa a una velocidad de 100 µg/kg/min. Se obtuvieron parámetros hemodinámicos 180 minutos después de la administración del respectivo compuesto.

La **FIG. 2** muestra el perfil hemodinámico del compuesto de fórmula (1) en diversas dosificaciones usando un modelo de ritmo de taquicardia de insuficiencia cardíaca para animales conscientes (véase ejemplo 6).

La **FIG. 3** muestra el perfil hemodinámico del compuesto de fórmula (1) después de la inducción de insuficiencia cardíaca en perros. La hemodinámica se evaluó usando un modelo de insuficiencia cardíaca de microembolización canina (véase ejemplo 7). Los datos se muestran para el punto de tiempo final durante la infusión (180 minutos) en dos velocidades de infusión.

La **FIG. 4** muestra la evaluación del perfil toxicológico de CXL-1020 y dos compuestos donadores de nitroxilo de la divulgación (compuestos de fórmula (1) y fórmula (2)) después de 24 horas de infusión a distintas dosis usando

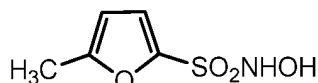
un modelo de vena periférica canina (véase ejemplo 9). Los marcados inflamatorios clave medidos incluyen glóbulos blancos de la sangre (WBC), fibrinógeno y proteína C reactiva (CRP).

La **FIG. 5** muestra medidas de inflamación observada usando un modelo de catéter central canino implantado 72 horas usando distintas dosis de CXL-1020 y los compuestos de fórmula (1) y (2) (véase ejemplo 9).

4. Descripción detallada

La invención incluye lo siguiente:

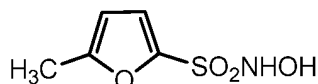
(1.) Una composición farmacéutica para su uso en un método para modular los niveles de nitroxilo *in vivo*, en la que la composición farmacéutica comprende un compuesto de fórmula (1):



(1)

y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

(2.) Una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar una enfermedad o una afección que responden a terapia de nitroxilo, en la que la composición farmacéutica comprende un compuesto de fórmula (1):



(1)

y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

(3.) La composición farmacéutica del anterior (2.), en la que la enfermedad o la afección es hipertensión pulmonar.

(4.) La composición farmacéutica de uno cualquiera de los anteriores (1.) a (3.), en la que la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente.

(5.) La composición farmacéutica de uno cualquiera de los anteriores (1.) a (4.), en la que la composición farmacéutica tiene un pH de 4 a 6.

(6.) La composición farmacéutica de uno cualquiera de los anteriores (1.) a (5.), en la que la composición farmacéutica tiene un pH de 4 a 5.

(7.) La composición farmacéutica de uno cualquiera de los anteriores (1.) a (6.), en la que la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 4.

(8.) La composición farmacéutica de uno cualquiera de los anteriores (1.) a (7.), en la que la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente en una cantidad que varía de 1 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto a 100 µg de compuesto de fórmula (1)/minuto.

(9.) La composición farmacéutica de uno cualquiera de los anteriores (1.) a (7.), en la que la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente en una cantidad que varía de 10 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto a 50 µg de compuesto de fórmula (1)/minuto.

(10.) La composición farmacéutica de uno cualquiera de los anteriores (1.) a (7.), en la que la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente en una cantidad de no más de 30 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto.

(11.) La composición farmacéutica de uno cualquiera de los anteriores (1.) a (7.), en la que la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente en una cantidad de

(a) al menos 2,5 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto;

(b) al menos 5 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto;

(c) al menos 7,5 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto;

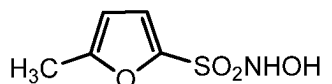
(d) al menos 12 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto;

5 (e) al menos 15 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto.

La presente divulgación incluye lo siguiente.

(1.) Un compuesto de fórmula (1):

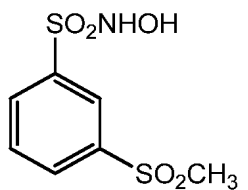
10



(1)

(2.) Un compuesto de fórmula (2):

15



(2)

(3.) Una composición farmacéutica que comprende un compuesto del anterior (1.) o del anterior (2.) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20

(4.) La composición farmacéutica del anterior (3.), en la que la composición farmacéutica es adecuada para administración intravenosa.

(5.) La composición farmacéutica del anterior (3.) o del anterior (4.), en la que la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

25

(6.) La composición farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(5.), en la que la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5.

(7.) La composición farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(6.), en la que la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 4.

30

(8.) Un método para tratar una enfermedad cardiovascular, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto del anterior (1.) o del anterior (2.) o de la composición farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(7.) a un paciente que la necesite.

35

(9.) El método del anterior (8.), en la que la enfermedad cardiovascular es insuficiencia cardíaca.

(10.) El método del anterior (8.) o del anterior (9.), en la que la enfermedad cardiovascular es insuficiencia cardíaca descompensada aguda.

40

(11.) El método de uno cualquiera de los anteriores (8.)-(10.), en el que el compuesto o la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa.

(12.) El método de uno cualquiera de los anteriores (8.)-(11.), en el que el compuesto o la composición farmacéutica se administra a una dosis de aproximadamente 20 µg del compuesto de fórmula (1) o (2)/kg/minuto a aproximadamente 40 µg de fórmula (1) o (2)/kg/minuto.

45

(13.) El método de uno cualquiera de los anteriores (8.)-(10.), en el que el compuesto o la composición farmacéutica se administra por vía oral.

50

(14.) Un kit que comprende un compuesto del anterior (1.) o del anterior (2.) en forma seca o la composición

farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(7.) en forma seca; y un diluyente líquido farmacéuticamente aceptable.

(15.) Uso del compuesto del anterior (1.) o del anterior (2.) o uso de la composición farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(7.) para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

(16.) Uso del compuesto del anterior (1.) o del anterior (2.) o uso de la composición farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(7.) para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de una insuficiencia cardíaca.

(17.) Uso del compuesto del anterior (1.) o del anterior (2.) o uso de la composición farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(7.) para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de una insuficiencia cardíaca descompensada aguda.

(18.) El compuesto del anterior (1.) o del anterior (2.) o de la composición farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(7.) para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

(19.) El compuesto del anterior (1.) o del anterior (2.) o de la composición farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(7.) para su uso en el tratamiento de una insuficiencia cardíaca.

(20.) El compuesto del anterior (1.) o del anterior (2.) o de la composición farmacéutica de una cualquiera de las anteriores (3.)-(7.) para su uso en el tratamiento de una insuficiencia cardíaca descompensada agua.

4.1 Definiciones

A menos que se indique claramente lo contrario, los siguientes términos como se usan en el presente documento tienen los significados indicados a continuación.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de cualquier agente terapéutico desvelado en el presente documento, cuya sal puede incluir cualquiera de varios contraiones orgánicos e inorgánicos conocidos en la técnica y cuya sal es farmacéuticamente aceptable. Cuando el agente terapéutico contiene una funcionalidad ácida, diversas realizaciones ilustrativas de contraiones son sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares. Cuando el agente terapéutico contiene una funcionalidad básica, una sal farmacéuticamente aceptable puede incluir como contraión, a modo de ejemplo, un ácido orgánico o inorgánico, tal como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, derivados de acetato, maleato, oxalato y similares. Las sales ilustrativas incluyen, pero sin limitación, sulfato, citrato, derivados de acetato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, besilato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato y sales de p-toluensulfonato. Por consiguiente, una sal puede prepararse a partir de un compuesto de una cualquiera de las fórmulas desveladas en el presente documento que tienen un grupo funcional ácido, tal como un grupo funcional de ácido carboxílico y una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable. Las bases adecuadas incluyen, pero sin limitación, hidróxidos de metales alcalinos, tales como sodio, potasio y litio; hidróxidos de metal alcalinotérreo, tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y cinc; amoniaco y aminas orgánicas, tales como mono-, di- o trialquilaminas hidroxi-sustituídas; diciclohexilamina; tributilamina; piridina; *N*-metil-*N*-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono-, bis- o tris-(2-hidroxi-alquilo-inferior aminas), tales como mono-, bis- o tris-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxi-*tert*-butilamina, o tris-(hidroximetil)metilamina, *N,N*-di-alquilo-inferior-*N*-(hidroxi-alquilo-inferior)-aminas, tales como *N,N*-dimetil-*N*-(2-hidroxietil) amina o tri-(2-hidroxietil)amina; *N*-metil-D-glucamina; y aminoácidos, tales como arginina, lisina, y similares. Una sal también puede prepararse a partir de un compuesto de una cualquiera de las fórmulas desveladas en el presente documento que tienen un grupo funcional básico, tal como un grupo funcional amino y una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable. Los ácidos adecuados incluyen sulfato de hidrógeno, ácido cítrico, ácido acético, ácido clorhídrico (HCl), bromuro de hidrógeno (HBr), yoduro de hidrógeno (HI), ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido succínico, ácido maleico, ácido besílico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido glucarónico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido glutámico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sustancia, no en sí un agente terapéutico, usado como transportador, diluyente, adyuvante, aglutinante y/o vehículo para el suministro de un agente terapéutico a un paciente, o añadido a una composición farmacéutica para mejorar sus propiedades de manipulación o almacenamiento o para permitir o facilitar la formación de un compuesto o composición farmacéutica en una forma de dosificación unitaria para su administración. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Gennaro, Ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed. (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000) y Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., (por ejemplo, 1ª, 2ª y 3ª Ed., 1986, 1994 y 2000, respectivamente). Como sabrán los expertos en la materia, los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden

proporcionar varias funciones y pueden describirse como agentes humectantes, agentes tamponadores, agentes de suspensión, agentes lubricantes, emulsionantes, disgregantes, Absorbentes, conservantes, tensioactivos, colorantes, aromatizantes y edulcorantes. Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa e hidroxipropilcelulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido alginico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

"Forma de dosis unitaria" se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como dosificación unitaria para un ser humano o un animal. Cada forma de dosificación unitaria puede contener una cantidad predeterminada de un agente terapéutico calculado para producir un efecto deseado.

A menos que se indique claramente lo contrario, un "paciente" se refiere a un animal, tal como un mamífero, que incluye, pero sin limitación, un ser humano. Por tanto, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en terapia humana y aplicaciones veterinarias. En realizaciones particulares, el paciente es un mamífero. En determinadas realizaciones, el paciente es un ser humano.

"Cantidad eficaz" se refiere a una cantidad tal de un agente terapéutico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que en combinación con sus parámetros de eficacia y potencial toxicidad, así como basándose en el cocimiento del especialista practicante, debe ser eficaz en una forma terapéutica dada. Como se entiende en la técnica, una cantidad eficaz puede administrarse en una o más dosificaciones.

"Tratamiento", "tratar" y similar es un enfoque para obtener un resultado beneficioso o deseado, incluyendo resultados clínicos. Para los fines de esta divulgación, los resultados beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, inhibir y/o suprimir la aparición y/o el desarrollo de una afección o reducir la gravedad de dicha afección, tal como reducir el número y/o la gravedad de los síntomas asociados a la afección, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la afección, reducir la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la afección, potenciar el efecto de otra medicación que un paciente está tomando para la afección y/o prolongar la supervivencia de pacientes que tienen la afección.

"Prevención", "prevenir" y similares se refiere a reducir la probabilidad de desarrollar una afección en un paciente que no tiene, pero que se encuentra en riesgo de desarrollar una afección. Un paciente "que se encuentra en riesgo" puede o no puede tener una afección detectable y, puede o puede no mostrar una afección detectable antes de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. "En riesgo" indica que un paciente tiene uno o más de los denominados factores de riesgo, que son parámetros medibles que se correlacionan con el desarrollo de una afección y que se conocen en la técnica. Un paciente que tiene uno o más de estos factores de riesgo tiene una mayor probabilidad de desarrollar la afección que un paciente sin tal(es) factor(es) de riesgo.

"Inotropo positivo" se refiere a un agente que causa un aumento en la función contráctil de miocardio. Los inotropos positivos ilustrativos son antagonista del receptor *beta*-adrenérgico, un inhibidor de la actividad de la fosfodiesterasa y sensibilizadores de calcio. Los antagonistas del receptor *beta*-adrenérgico incluyen, entre otros, dopamina, dobutamina, terbutalina e isoproterenol. Los análogos y derivados de tales compuestos también se conciben. Por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 4.663.351 desvela un profármaco de dobutamina que puede administrarse por vía oral.

Una afección que es "sensible a la terapia con nitroxilo" incluye cualquier afección en cuya administración de un compuesto que dona una cantidad eficaz de nitroxilo en condiciones fisiológicas trata y/o previene la afección, tal como se definen esos términos en el presente documento. Una afección cuyos síntomas se suprimen o disminuyen al administrar un donador de nitroxilo es una afección sensible a la terapia con nitroxilo.

"Hipertensión pulmonar" o "HP" se refiere a una afección en la que la presión arterial pulmonar está elevada. La definición hemodinámica actual de HP es la presión arterial pulmonar media (MPAP) en reposo mayor que o igual a 25 mmHg. Badesch y col., J. Amer. Coll. Cardiol., 54(Suppl.):S55-S66 (2009).

"N/E" significa no evaluado.

"Alquilo (C₁-C₆)" se refiere a estructuras de hidrocarburo ramificadas lineales saturadas que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono. Cuando se nombra un resto alquilo que tiene un número especificado de carbonos, se pretende abarcar todos los isómeros geométricos que tienen ese número de carbonos; de este modo, por ejemplo,

"propilo" incluye *n*-propilo e *iso*-propilo y "butilo" incluye *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo y *terc*-butilo. Los ejemplos de grupos alquilo (C₁-C₆) incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *n*-hexilo, y similares.

"Alquilo (C₁-C₄)" se refiere a estructuras de hidrocarburo ramificadas lineales saturadas que tienen 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo (C₁-C₄) incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo y *terc*-butilo.

"Alquilo (C₃-C₅)" se refiere a estructuras de hidrocarburo ramificadas lineales saturadas que tienen 3, 4 o 5 átomos de carbono. Cuando se nombra un resto alquilo que tiene un número especificado de carbonos, se pretende abarcar todos los isómeros geométricos que tienen ese número de carbonos; de este modo, por ejemplo, "propilo" incluye *n*-propilo e *iso*-propilo y "butilo" incluye *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo y *terc*-butilo. Los ejemplos de grupos alquilo (C₃-C₅) incluyen *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, y similares.

"Alquenilo (C₂-C₄)" se refiere a un radical de hidrocarburo insaturado ramificado o de cadena lineal que tiene 2, 3 o 4 átomos de carbono y un doble enlace en cualquier posición, *por ejemplo*, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-metiletlenilo, 1-metil-1-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-metil-2-propenilo y similares.

"Alquinilo (C₂-C₃)" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal no cíclico que tiene 2 o 3 átomos de carbono y que incluye al menos un enlace doble carbono-carbono. Los ejemplos de alquilenos (C₂-C₃) incluyen -vinilo, -alilo y 1-prop-1-enilo.

"Heterocicloalquilo (C₅-C₇)" se refiere a un heterociclo mono- o bicíclico de 5-, 6- o 7 miembros, saturado o insaturado, puenteado, que contiene 1, 2, 3 o 4 heteroátomos de anillo cada uno independientemente seleccionado a partir de nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo (C₅-C₇) incluyen pirazolilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tetrahidro-oxazinilo, tetrahidrofurano, tiolano, ditiolano, pirrolina, pirrolidina, pirazolina, pirazolidina, imidazolina, imidazolidina, tetrazol, piperidina, piridazina, pirimidina, pirazina, tetrahidrofuranona, γ -butirolactona, α -pirano, γ -pirano, dioxolano, tetrahidropirano, dioxano, dihidrotiofeno, piperazina, triazina, tetrazina, morfolina, tiomorfolina, diazepan, oxazina, tetrahidro-oxazinilo, isotiazol, pirazolidina y similares.

"Heteroarilo (de 5 o 6 miembros)" se refiere a un anillo heterociclo aromático monocíclico de 5 o 6 miembros, es decir, un anillo aromático monocíclico que comprende al menos un heteroátomo del anillo, *por ejemplo*, 1, 2, 3 o 4 heteroátomos de anillo, cada uno seleccionado independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Ejemplos de heteroarilos de 5 o 6 miembros incluyen piridilo, pirrolilo, furilo, imidazolilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,2,3-triazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidilo, pirazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,5-triazinilo y tiofenilo.

"Halo" se refiere a -F, -Cl, -Br o -I.

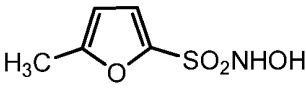
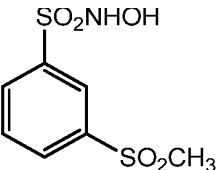
"Derivado de sulfo-*n*-butil éter de β -ciclodextrina" se refiere a β -ciclodextrina que tiene al menos un grupo -OH que se derivatiza reemplazando el átomo de hidrógeno del mismo con $-(CH_2)_4-S(O)_2-OH$ o $-(CH_2)_4-S(O)_2-O-Z^+$ para proporcionar un grupo $-O-(CH_2)_4-S(O)_2-OH$ o $-O-(CH_2)_4-S(O)_2-O-Z^+$, respectivamente, en el que Z^+ es un catión tal como sodio, potasio, amonio, tetrametilamonio y similares. En una realización, cada Z es sodio.

4.2 Compuestos donadores de nitroxilo con índice terapéutico mejorado

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para modular los niveles de nitroxilo *in vivo* o un método para tratar una enfermedad o una afección que responden a terapia de nitroxilo, en la que la composición farmacéutica comprende un cierto compuesto de la presente divulgación, es decir un compuesto de fórmula (1).

En un aspecto, la divulgación proporciona nuevos compuestos adecuados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (p. ej., insuficiencia cardíaca). En particular, la divulgación proporciona compuestos donadores de nitroxilo que tienen una combinación de propiedades que los hace adecuados para su uso como una terapia humana. En particular, los compuestos donadores de nitroxilo de la divulgación tienen semividas adecuadas, un índice terapéutico favorable, son altamente soluble en agua y tienen una estabilidad de estado sólido suficiente. La Tabla 1 proporciona dos compuestos donadores de nitroxilo de *N*-hidroxisulfonamida específicos de la divulgación que poseen tales propiedades deseables y, por lo tanto, son adecuados para la administración terapéutica a seres humanos. El compuesto de fórmula (1) es para su uso en la presente invención. El compuesto de fórmula (2) se desvela para fines de referencia.

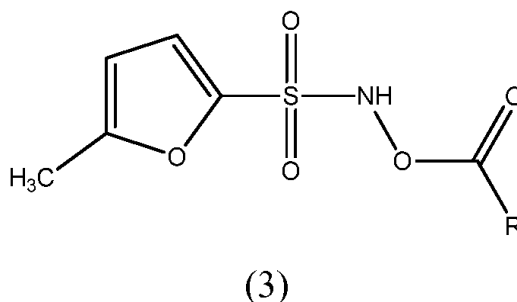
Tabla 1: Compuestos donadores de nitroxilo de la divulgación

 (1) <i>N</i>-Hidroxi-5-metilfurano-2-sulfonamida	 (2) <i>N</i>-Hidroxi-3-metanosulfonylbenceno-1-sulfonamida
--	---

En realizaciones particulares, los compuestos donadores de nitroxilo en la Tabla 1 pueden utilizarse como una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otras realizaciones, el grupo *N*-hidroxi de los compuestos enumerados en la Tabla 1 puede esterificarse para proporcionar profármacos de los compuestos.

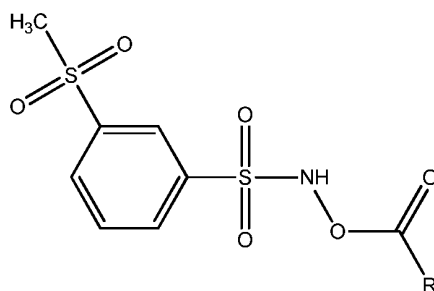
Por ejemplo, la divulgación proporciona, para fines de referencia, compuestos de la fórmula (3):



en la que R es hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), -alqueno (C₂-C₄), fenilo, bencilo, ciclopentilo, ciclohexilo, -(C₅-C₇) heterocicloalquilo, benciloxi, -O-alquilo (C₁-C₆), -NH₂, -NH-alquilo (C₁-C₄) o -N(alquilo(C₁-C₄))₂, en la que dicho -alquilo (C₁-C₆), -alqueno (C₂-C₄), fenilo, bencilo, ciclopentilo, ciclohexilo, -(C₅-C₇) heterocicloalquilo, benciloxi, -O-alquilo (C₁-C₆), -NH-alquilo (C₁-C₄) o -N(alquilo(C₁-C₄))₂ pueden sustituirse o no sustituirse con uno o más sustituyentes seleccionados a partir de halo, alquilo (C₁-C₆), -alqueno (C₂-C₄), -alquino (C₂-C₃), -heteroarilo (de 5 o 6 miembros), -O-alquilo (C₁-C₆), -S-alquilo (C₁-C₆), -C(halo)₃, -CH(halo)₂, -CH₂(halo), -CN, -NO₂, -NH₂, -NH-alquilo (C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄))₂, -C(=O)alquilo (C₁-C₄), -C(=O)O alquilo (C₁-C₄), -OC(=O)alquilo (C₁-C₄), -OC(=O)NH₂, -S(=O)alquilo (C₁-C₄) o -S(=O)₂ alquilo (C₁-C₄). En realizaciones particulares, R es metilo, etilo, bencilo o fenilo.

En realizaciones particulares en el que el compuesto de la divulgación es un compuesto de fórmula (3), R es metilo. En otras realizaciones en el que el compuesto tiene la fórmula (3), R es etilo. En determinadas realizaciones en el que el compuesto de la divulgación es un compuesto de fórmula (3), R es metilo o etilo. En otras realizaciones en el que el compuesto tiene la fórmula (3), R es fenilo. En otras realizaciones en el que el compuesto tiene la fórmula (3), R es bencilo. En realizaciones particulares en el que el compuesto de la divulgación es un compuesto de fórmula (3), R es bencilo o fenilo. En otras realizaciones en el que el compuesto tiene la fórmula (3), R es -NH₂. En cada una de las anteriores realizaciones en este párrafo, R no se sustituye en una realización, se mono-sustituye en otra realización, se di-sustituye con dos sustituyentes independientemente seleccionados en una realización adicional o se tri-sustituye con tres sustituyentes independientemente seleccionados en una realización adicional. En diversas realizaciones de cada una de las anteriores realizaciones en este párrafo, es sustituyente es -halo, -NH₂, -NHCH₃, -CF₃, o -OCH₃ o los sustituyentes se seleccionan independientemente de -halo, -NH₂, -NHCH₃, -CF₃, y -OCH₃.

Por ejemplo, la divulgación proporciona, para fines de referencia, compuestos de la fórmula (4):



(4)

en la que R y su(s) sustituyente(s) opcional(es) es/son tal como se han definido anteriormente con respecto al compuesto de fórmula (3).

En realizaciones particulares en el que el compuesto de la divulgación es un compuesto de fórmula (4), R es metilo. En otras realizaciones en el que el compuesto tiene la fórmula (4), R es etilo. En determinadas realizaciones en el que el compuesto de la divulgación es un compuesto de fórmula (4), R es metilo o etilo. En otras realizaciones en el que el compuesto tiene la fórmula (4), R es fenilo. En otras realizaciones en el que el compuesto tiene la fórmula (4), R es bencilo. En realizaciones particulares en el que el compuesto de la divulgación es un compuesto de fórmula (4), R es bencilo o fenilo. En otras realizaciones en el que el compuesto tiene la fórmula (4), R es -NH₂. En cada una de las anteriores realizaciones en este párrafo, R no se sustituye en una realización, se mono-sustituye en otra realización, se di-sustituye con dos sustituyentes independientemente seleccionados en una realización adicional o se tri-sustituye con tres sustituyentes independientemente seleccionados en una realización adicional. En diversas realizaciones de cada una de las anteriores realizaciones en este párrafo, es sustituyente es -halo, -NH₂, -NHCH₃, -CF₃, o -OCH₃ o los sustituyentes se seleccionan independientemente de -halo, -NH₂, -NHCH₃, -CF₃, y -OCH₃.

Inesperadamente, se ha descubierto que los compuestos donadores de nitroxilo de la divulgación proporcionan niveles de eficacia similares a los de CXL-1020 cuando se administran a pacientes humanos, pero con efectos secundarios significativamente reducidos, a saber, efectos secundarios locales (p. ej., irritación y/o inflamación) (véase ejemplos 8 y 9). Además, los compuestos donadores de nitroxilo de la divulgación proporcionan una aparición de efectos hemodinámicos en 1 hora o menos, lo que es deseable desde una perspectiva clínica.

Sin pretender quedar vinculado a teoría alguna, los experimentos que se informan en los ejemplos de la presente divulgación sugieren que donadores de nitroxilo con semividas sustancialmente más costas de 15 minutos cuando se midieron en PBS o plasma humano (véase ejemplo 4) tal como CXL-1020, producen elevadas concentraciones locales de nitroxilo al administrarlo y que la elevada concentración local de nitroxilo es una causa de los efectos secundarios indeseados observados. El nitroxilo a una elevada concentración se sabe que dimeriza, resultando en la formación de ácido hiponitroso, que es capaz de producir radicales de hidroxilo. Como alternativa o de manera adicional, peróxido que emana de glóbulos blancos de la sangre puede reaccionar con nitroxilo para formar radicales de hidroxilo. Los radicales de hidroxilo pueden ser tóxicos para las células endoteliales, resultando en una inflamación y/o intolerancia. Mientras que los compuestos de nitroxilo con semividas más largas podrían, en teoría, producir radicales de hidroxilo a través de mecanismos similares, la formación de tales radicales se esperaría que fuera reducida en virtud de las bajas concentraciones de nitroxilo, reduciendo, de este modo, la capacidad del nitroxilo en dimerizar o reaccionar con peróxido. Los compuestos con semividas muy largas (p. ej., superiores a 95 minutos cuando se miden en plasma humano de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 4) se esperaría, por lo tanto, que tuvieran un perfil toxicológico favorable; sin embargo, debido a que se esperaría que estos compuestos se eliminaran de la circulación y/o diluyeran antes de la formación sustancial de nitroxilo, tales compuestos se esperan que tengan una baja eficacia.

Como se describe en el Ejemplo 4, Los compuestos de fórmulas (1) y (2) tienen semividas superiores a aproximadamente 10 minutos e inferiores a 95 minutos cuando se miden en una solución aireada de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a un pH de 7,4 y cuando se miden en plasma humano a un pH de 7,4 en la presencia de anticoagulante (por ejemplo, heparina o citrato de sodio), cada una medida en condiciones especificadas en el ejemplo 4. En particular, el compuesto de fórmula (1) tiene una semivida de aproximadamente 68 minutos cuando se mide en una solución aireada de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a un pH de 7,4 y aproximadamente 65 minutos cuando se mide en plasma humano a un pH de 7,4 en la presencia de anticoagulante (por ejemplo, heparina o citrato de sodio), cada una medida en condiciones especificadas en el ejemplo 4. El compuesto de fórmula (2) tiene una semivida de aproximadamente 50 minutos cuando se mide en una solución aireada de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a un pH de 7,4 y aproximadamente 37 minutos cuando se mide en plasma humano a un pH de 7,4 en la presencia de anticoagulante (por ejemplo, heparina o citrato de sodio), cada una medida en condiciones especificadas en el ejemplo 4.

Además, como se describe en el Ejemplo 5, cada uno de los compuestos de fórmulas (1) y (2) es altamente soluble

en agua y, por lo tanto, apto para la administración parenteral u oral. Los compuestos pueden formularse sin la adición de un agente solubilizante. Además, tal como se ha demostrado en los ejemplos 10 -12, los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) tienen una estabilidad excelente en composiciones farmacéuticas para la administración parenteral (p. ej., intravenosa).

5

4.3 Medición de la capacidad donadora de nitroxilo

La donación de nitroxilo de los compuestos se ensaya fácilmente con experimentos de rutina. Aunque normalmente es poco práctico medir directamente si el nitroxilo se dona, se aceptan varios enfoques analíticos como adecuados para determinar si un compuesto dona hidroxilo. Por ejemplo, el compuesto de interés puede ponerse en solución, por ejemplo, en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) o en una solución tamponada con fosfato a un pH de aproximadamente 7,4, En un recipiente cerrado herméticamente. Después de que haya pasado un tiempo suficiente para la disociación, tal como de varios minutos a varias horas, se retira el gas de la cámara de aire y se analiza para determinar su composición, tal como por cromatografía de gases y/o espectrometría de masas. Si se forma gas N_2O (lo que sucede por dimerización de HNO), el ensayo es positivo para donación de nitroxilo y el compuesto está concebido para ser un donador de nitroxilo.

El nivel de capacidad de donación de nitroxilo puede expresarse como un porcentaje de un máximo estequiométrico teórico del compuesto. Un compuesto que dona un "nivel significativo de nitroxilo" significa, en diversas realizaciones, un compuesto que dona aproximadamente el 40 % o más, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más o aproximadamente el 95 % o más de su cantidad máxima teórica de nitroxilo. En realizaciones particulares, un donador de nitroxilo del compuesto de la divulgación en el presente documento dona de aproximadamente el 70 % al aproximadamente 90 % de su cantidad máxima teórica de nitroxilo. En realizaciones particulares, un donador de nitroxilo del compuesto de la divulgación en el presente documento dona de aproximadamente el 85 % al aproximadamente 95 % de su cantidad máxima teórica de nitroxilo. En realizaciones particulares, un donador de nitroxilo del compuesto de la divulgación en el presente documento dona de aproximadamente el 90 % al aproximadamente 95 % de su cantidad máxima teórica de nitroxilo. Los compuestos que donan menos del aproximadamente 40 % o menos del aproximadamente 50 %, de su cantidad máxima teórica de nitroxilo aún son donadores y pueden usarse en los métodos descritos. Un compuesto que dona menos del aproximadamente 50 % de su cantidad teórica de nitroxilo puede usarse en los métodos descritos, pero puede requerir niveles de dosificación más altos en comparación con un compuesto que dona un mayor nivel de nitroxilo.

Si se desea, la donación de nitroxilo también puede detectarse exponiendo el compuesto de ensayo a metmioglobina (Mb^{3+}). Véase Bazylinski y col., J. Amer. Chem. Soc. 107(26):7982-7986 (1985). El nitroxilo reacciona con Mb^{3+} para formar un complejo de $Mb^{2+}-NO$, que puede detectarse por cambios en el espectro ultravioleta/visible o por resonancia paramagnética electrónica (RPE). El complejo de $Mb^{2+}-NO$ tiene una señal de RPE centrada en torno a un valor g de aproximadamente 2. El óxido nítrico, por otro lado, reacciona con Mb^{3+} para formar un complejo de $Mb^{3+}-NO$ que tiene una señal RPE, en caso de haberla, poco significativa. Por consiguiente, si un compuesto reacciona con Mb^{3+} para formar un complejo detectable por métodos comunes, tales como ultravioleta/visible o RPE, entonces el ensayo es positivo para donación de nitroxilo.

El ensayo para donación de nitroxilo puede realizarse a un pH fisiológicamente relevante. Los compuestos donadores de nitroxilo de la divulgación son capaces de donar nitroxilo a un pH fisiológico (es decir, a un pH de aproximadamente 7,4) y una temperatura fisiológica (es decir, una temperatura de aproximadamente 37 °C) (juntos, "condiciones fisiológicas"). En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede donar aproximadamente el 40 % o más de su cantidad máxima teórica (es decir, 100 %) en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede donar aproximadamente el 50 % o más de su cantidad máxima teórica en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede donar aproximadamente el 60 % o más de su cantidad máxima teórica en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede donar aproximadamente el 70 % o más de su cantidad máxima teórica en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede donar aproximadamente el 80 % o más de su cantidad máxima teórica en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede donar aproximadamente el 90 % o más de su cantidad máxima teórica en condiciones fisiológicas.

Se entenderá que un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación podría donar también una cantidad limitada de óxido nítrico, siempre y cuando la cantidad de donación de nitroxilo exceda la cantidad de donación de óxido nítrico. En determinadas realizaciones, un compuesto donador de nitroxilo puede donar aproximadamente un 25 % en moles o menos de óxido nítrico en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo puede donar aproximadamente un 20 % en moles o menos de óxido nítrico en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo puede donar aproximadamente un 15 % en moles o menos de óxido nítrico en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo puede donar aproximadamente un 10 % en moles o menos de óxido nítrico en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo puede donar aproximadamente un 5 % en moles o

menos de óxido nítrico en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo puede donar aproximadamente un 2 % en moles o menos de óxido nítrico en condiciones fisiológicas. En realizaciones particulares, un compuesto donador de nitroxilo puede donar una cantidad insignificante (p. ej., aproximadamente un 1 % en moles o menos) de óxido nítrico en condiciones fisiológicas.

4.4 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención comprenden un compuesto de fórmula (1) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, la presente divulgación también abarca composiciones farmacéuticas que comprende un compuesto donador de nitroxilo de las fórmulas (2), (3) o (4) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen los descritos anteriormente, tales como transportadores, agentes tensioactivos, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, solubilizantes, colorantes, agentes saborizantes, recubrimientos, agentes disgregantes, lubricantes, edulcorantes, conservantes, agentes isotónicos y cualquier combinación de los mismos. La selección y uso de excipientes farmacéuticamente aceptable se enseña en, *por ejemplo*, Troy, Ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Ed. (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2005).

En diversas realizaciones, el al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable comprende al menos una especie de ciclodextrina. En una realización particular, la ciclodextrina es una estructura cíclica que tiene unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4). En otra realización, la ciclodextrina es una β -ciclodextrina, es decir, una estructura cíclica que tiene siete unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4). En otra realización, la ciclodextrina está modificada químicamente mediante derivatización de cualquier combinación de los tres grupos hidroxilo disponibles sobre cada unidad de glucopiranososa de la misma.

En algunas realizaciones en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende al menos una especie de ciclodextrina, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-alquilo(C_1 - C_6) éter de β -ciclodextrina. En algunas de estas realizaciones, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-alquilo(C_1 - C_6) éter de β -ciclodextrina que tiene aproximadamente de seis a siete grupos sulfo-alquilo(C_1 - C_6) éter por molécula de ciclodextrina. En diversas realizaciones, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-alquilo(C_1 - C_6) éter de β -ciclodextrina que tiene un promedio de seis a siete grupos sulfo-alquilo(C_1 - C_6) éter por molécula de ciclodextrina. En otra realización de este tipo, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-alquilo(C_1 - C_6) éter de β -ciclodextrina que tiene seis o siete grupos sulfo-alquilo(C_1 - C_6) éter por molécula de ciclodextrina.

En una serie en particular de realizaciones en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende al menos una especie de ciclodextrina, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-alquilo(C_3 - C_5) éter de β -ciclodextrina. En una realización de este tipo, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-alquilo(C_3 - C_5) éter de β -ciclodextrina que tiene aproximadamente de seis a siete grupos sulfo-alquilo(C_3 - C_5) éter por molécula de ciclodextrina. En diversas tales realizaciones, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-alquilo(C_3 - C_5) éter de β -ciclodextrina que tiene un promedio de seis a siete grupos sulfo-alquilo(C_3 - C_5) éter por molécula de ciclodextrina. En otra realización de este tipo, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-alquilo(C_3 - C_5) éter de β -ciclodextrina que tiene seis o siete grupos sulfo-alquilo(C_3 - C_5) éter por molécula de ciclodextrina.

En realizaciones particulares en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende al menos una especie de ciclodextrina, la ciclodextrina es un derivado de sulfobutil éter de β -ciclodextrina. En algunas de estas realizaciones, la ciclodextrina es un derivado de sulfobutil éter de β -ciclodextrina que tiene aproximadamente de seis a aproximadamente siete grupos sulfobutil éter por molécula de ciclodextrina. En otra realización de este tipo, la ciclodextrina es un derivado de sulfobutil éter de β -ciclodextrina que tiene un promedio de seis a aproximadamente siete grupos sulfobutil éter por molécula de ciclodextrina. En otra realización de este tipo, la ciclodextrina es un derivado de sulfobutil éter de β -ciclodextrina que tiene seis o siete grupos sulfobutil éter por molécula de ciclodextrina.

En determinadas realizaciones en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende al menos una especie de ciclodextrina, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-*n*-butil éter de β -ciclodextrina. En una realización de este tipo, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-*n*-butil éter de β -ciclodextrina que tiene aproximadamente de seis a aproximadamente siete grupos sulfo-*n*-butil éter por molécula de ciclodextrina. En otra realización de este tipo, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-*n*-butil éter de β -ciclodextrina que tiene un promedio de seis a aproximadamente siete grupos sulfo-*n*-butil éter por molécula de ciclodextrina. En otra realización de este tipo, la ciclodextrina es un derivado de sulfo-*n*-butil éter de β -ciclodextrina que tiene seis o siete grupos sulfo-*n*-butil éter por molécula de ciclodextrina.

En diversas realizaciones particulares en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende al menos una especie de ciclodextrina, la ciclodextrina comprende una pluralidad de cargas negativas en valores pH fisiológicamente compatibles, *por ejemplo*, a un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,8 en algunas realizaciones, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5 en algunas realizaciones, de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,3 en algunas realizaciones, de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2 en algunas realizaciones, de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,1 en algunas realizaciones y de aproximadamente 6,0 en realizaciones

particulares. En una realización de este tipo, el al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable comprende ciclodextrina de CAPTISOL® (Ligand Pharmaceuticals, La Jolla, CA).

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para su administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellas adaptadas para las siguientes: (1) administración oral, por ejemplo, como elixires (por ejemplo, soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos (por ejemplo, aquellos dirigidos a absorción bucal, sublingual y sistémica), cápsulas, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua, cápsulas de gelatina dura, cápsulas de gelatina blanda, pulverizadores bucales, trociscos, pastillas para chupar, gránulos, jarabes, suspensiones, elixires, líquidos, emulsiones y microemulsiones; o (2) administración parenteral, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural en forma de, por ejemplo, una solución o suspensión estéril. Las composiciones farmacéuticas pueden ser de liberación inmediata, sostenida o controlada.

En una realización particular, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa. En otra realización, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa mediante infusión continua.

En otra realización, la composición farmacéutica se formula para su administración oral. Los compuestos para la administración oral pueden formularse como formas de dosificación líquida o sólida. En realizaciones particulares en las que los compuestos donadores de nitroxilo se formulan como formas de dosificación líquida oral, el polietilenglicol 300 (PEG300) puede servir útilmente como un excipiente.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse como cualquier forma de dosificación unitaria apropiada, tales como cápsulas, sobrecitos, comprimidos, un polvo, gránulos, solución, suspensión en un líquido acuoso, suspensión en un líquido no acuoso, emulsión líquida de aceite en agua, emulsión líquida de agua en aceite, liposomas o bolos.

Los comprimidos pueden crearse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos prensados pueden prepararse prensando en una máquina adecuada el agente o agentes terapéuticos en una forma fluida tal como polvos o gránulos, mezclados de forma opcional con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos creados por moldeo pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse de forma que se proporcione una liberación lenta o controlada del principio activo de los mismos. Los métodos de formulación de tales composiciones de liberación lenta o controlada de principios farmacéuticamente activos, tales como los agentes terapéuticos en el presente documentos y otros compuestos conocidos en la técnica, se conocen en la técnica y se desvelan en las patentes de los EE.UU. presentadas, algunas de las cuales incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos números 4.369.174, 4.842.866 y las referencias citadas en los mismos. Los recubrimientos pueden usarse para el suministro de compuestos al intestino (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 6.638.534, 5.217.720, 6.569.457 y las referencias citadas en los mismos). Un experto en la técnica reconocerá que además de comprimidos, pueden formularse otras formas de dosificación para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo. Tales formas de dosificación incluyen, pero sin limitación, cápsulas, granulaciones y cápsulas de gel.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración tópica incluyen, sin limitación, pastillas para chupar que comprenden los ingredientes en una base con sabor, tales como sacarosa, goma arábiga y tragacanto; u pastillas que comprenden el principio activo en una base con sabor en una base inerte, tal como gelatina y glicerina.

Diversas realizaciones de composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral incluyen, sin limitación, o soluciones de inyección estéril acuosas o soluciones de inyección estéril no acuosas, conteniendo cada una, por ejemplo, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del destinatario previsto; y suspensiones estériles acuosas y suspensiones estériles no acuosas, conteniendo cada una, por ejemplo, agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas o viales, y pueden almacenarse en estado criodesecado (liofilizado) que requiere únicamente la adición de un transportador líquido estéril, tal como agua, inmediatamente antes de su uso.

Las composiciones farmacéuticas administradas de forma parenteral pueden administrarse en una solución ácida, neutra o básica. En una realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto donador de nitroxilo de la divulgación puede formularse en una solución ácida que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5, por ejemplo, un pH de aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,8, o aproximadamente 5, incluyendo valores entre estos. Mientras que un pH de aproximadamente 4 se ha considerado generalmente óptimo para la formulación de composiciones donadoras de nitroxilo para conseguir una estabilidad adecuada del compuesto, se ha descubierto que formular con tales condiciones ácidas puede causar o exacerbar potencialmente la irritación venosa después de la administración parenteral. La cantidad de irritación puede atenuarse mediante la formulación de los compuestos donadores de nitroxilo en soluciones menos ácidas o incluso soluciones neutras (véase **FIG. 4**). Por consiguiente, en realizaciones particulares, compuestos donadores de nitroxilo de la divulgación puede formularse para la inyección parenteral a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,2 (p.

ej., pH de aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6, o aproximadamente 6,2, incluyendo valores entre estos).

4.5 Métodos de uso de los compuestos y composiciones farmacéuticas de la divulgación

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en (a) un método para modular los niveles de nitroxilo *in vivo* o (b) un método para tratar una enfermedad o una afección que responde a terapia de nitroxilo, en la que la composición farmacéutica comprende un compuesto de fórmula (1) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. También se desvelan en el presente documento, para fines de referencia, métodos que usan los compuestos desvelados en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para aumentar *in vivo* los niveles de nitroxilo, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento. En diversas realizaciones, el paciente tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una afección que es sensible a la terapia con nitroxilo.

En realizaciones particulares, la divulgación proporciona un método para tratar, prevenir o retrasar la aparición y/o desarrollo de una afección, que comprende la administración a un paciente (incluyendo un paciente identificado como que necesita tal tratamiento, prevención o retraso) una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica tal como se divulga en el presente documento. La identificación de un paciente que necesita dicho tratamiento puede ser según el criterio de un médico, personal clínico, personas de emergencias y otros profesionales de la salud y puede ser subjetivo (por ejemplo, opinión) u objetivo (por ejemplo, medible por un ensayo o método diagnóstico).

Las afecciones particulares abarcadas por los métodos divulgados en el presente documento incluyen, sin limitación, enfermedades cardiovasculares, lesión por isquemia/reperfusión e hipertensión pulmonar (HP).

4.5.1 Enfermedades cardiovasculares

En una realización, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad cardiovascular, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica como se desvela en el presente documento a un paciente que lo necesita.

Ejemplos de enfermedades cardiovasculares y síntomas que pueden tratarse positivamente con los compuestos y composiciones desveladas en el presente documentos incluyen enfermedades cardiovasculares que son sensibles a la terapia con nitroxilo, obstrucciones coronarias, enfermedad de la arteria coronaria (EAC), angina, ataque cardíaco, infarto de miocardio, presión sanguínea elevada, cardiomiopatía isquémica e infarto, congestión pulmonar, edema pulmonar, fibrosis cardíaca, enfermedad coronaria valvular, enfermedad pericárdica, estados congestivos circulatorios, edema periférico, ascitis, enfermedad de Chagas, hipertrofia ventricular, enfermedad de las válvulas cardíacas, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca congestiva aguda, insuficiencia cardíaca descompensada aguda e hipertrofia cardíaca.

4.5.1.1 Insuficiencia cardíaca

Los compuestos y composiciones donadores de nitroxilo de la divulgación pueden usarse para tratar pacientes que padecen insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca puede ser de cualquier tipo o forma, incluyendo cualquiera de las insuficiencias cardíacas desveladas en el presente documento. Ejemplos no limitativos de insuficiencia cardíaca incluyen insuficiencia cardíaca de fase temprana, insuficiencia cardíaca de clase I, II, III y IV, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca congestiva (CHF) e insuficiencia cardíaca congestiva aguda. En una realización, los compuestos y composiciones de la divulgación pueden usarse para tratar insuficiencia cardíaca descompensada aguda.

En realizaciones en las que los compuestos donadores de nitroxilo de la divulgación se usan para tratar pacientes que padecen insuficiencia cardíaca, también puede administrarse otro agente activo que trata la insuficiencia cardíaca. En una realización de este tipo, el donador de nitroxilo puede administrarse en conjunto con un inótropo positivo tal como un antagonista beta. Ejemplos de antagonistas beta incluyen, sin limitación, dopamina, dobutamina, isoproterenol, análogos de tales compuestos y derivados de tales compuestos. En otra realización, el donador de nitroxilo puede administrarse en conjunta con un antagonista del receptor beta adrenérgico (también denominado en el presente documento como antagonista beta o bloqueador beta). Ejemplos de antagonistas beta incluyen, sin limitación, propranolol, metoprolol, bisoprolol, bucindolol y carvedilol.

Tal como se describe en los Ejemplos 6 y 7, se usaron diversos modelos de insuficiencia cardíaca para evaluar los perfiles hemodinámicos de varios de los compuestos donadores de nitroxilo de la divulgación. Tal como se muestra en las **FIGS. 1-3**, que se describen en los Ejemplos 6 y 7, los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) produjeron, por ejemplo, una mejora significativa de inotropismo y lusitropismo así como reducciones modestas en la presión sanguínea sin taquicardia. Además, la aparición de efecto hemodinámicos significativos fue rápida (por ejemplo, en 1

hora) y para un efecto casi máximo se logró en 2 horas.

Mientras que la actividad hemodinámica de los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) son similares a las composiciones que comprenden el CXL-1020 donador de nitroxilo cuando se administra por vía intravenosa, el perfil toxicológico de los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) mejora que tienen semividas más largas que CXL-1020, mejora significativamente en comparación con composiciones que comprenden CXL-1020 (véase ejemplo 9 y **FIGS. 4 y 5**). Por ejemplo, los "Niveles sin efectos adversos observables" (NOAEL) de los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) fueron sustancialmente superiores que los NOAEL para CXL-1020 (véase ejemplo 9 para la descripción de la determinación de NOAEL). En particular, el compuesto de fórmula (1) tiene el perfil toxicológico más favorable de todos los donadores de nitroxilo de tipo *N*-hidroxisulfonamida sometidos a ensayo hasta la fecha y no muestra efectos adversos sobre los marcadores clínicos de inflamación cuando se administra vía intravenosa a concentraciones al menos tan altas como 30 µg/kg/min (**FIG. 4**). Por el contrario, el CXL-1020 empieza a mostrar efectos secundarios no deseados a concentraciones tan bajas como 0,3 µg/kg/min.

4.5.1.2 Lesión por isquemia/reperfusión

En otra realización, la materia objeto desvelada proporciona un método para tratar, prevenir o retrasar la aparición y/o desarrollo de una lesión por isquemia/reperfusión, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica como se desvela en el presente documento un sujeto que lo necesita.

En una realización particular, el método es para prevenir una lesión por isquemia/reperfusión. En una realización particular, un compuesto o composición farmacéutica de la divulgación se administra antes de la aparición de isquemia. En una realización particular, una composición farmacéutica de la divulgación se administra antes de procedimientos en los que puede aparecer isquemia miocárdica, por ejemplo, una angioplastia o cirugía, tal como una cirugía de injerto de derivación de la arteria coronaria. En una realización particular, una composición farmacéutica de la divulgación se administra después de la isquemia pero después de la reperfusión. En una realización particular, una composición farmacéutica de la divulgación se administra después de la isquemia y después de la reperfusión.

En otra realización, una composición farmacéutica de la divulgación puede administrarse a un paciente que está en riesgo de padecer un evento isquémico. En una realización particular, una composición farmacéutica de la divulgación se administra a un paciente que está en riesgo de padecer un evento isquémico en el futuro, pero que no manifiesta indicios de isquemia. La determinación de si un paciente se encuentra en riesgo de padecer un evento isquémico puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como mediante la examinación del paciente o el historial médico del paciente. En una realización particular, el paciente había tenido un evento isquémico previo. Por lo tanto, el paciente puede estar en riesgo de padecer un primer o posterior evento isquémico. Ejemplos de pacientes en riesgo de un evento isquémico incluyen pacientes con hipercolesterolemia conocida, cambios ECG asociados a isquemia (por ejemplo, ondas T en su máximo o invertidas o elevaciones o depresión de segmentos ST en un contexto clínico apropiado), ECG anormal no asociado a isquemia activa, CKMB elevado, indicios clínicos de isquemia (por ejemplo, dolor torácico del sub-esternón intenso o dolor en el brazo, dificultad para respirar y/o diaforesis), historial previo de infarto de miocardio, elevado suero de colesterol, estilo de vida sedentario, indicios angiográficos de obstrucción parcial de arteria coronaria, indicios ecocardiográficos de daño de miocardio y cualquier otro indicios de riesgo de padecer un evento isquémico en el futuro. Ejemplos de eventos isquémicos incluyen, sin limitación, infarto de miocardio (IM) e isquemia neurovascular, tal como un accidente cerebrovascular (CVA).

En otra realización, el sujeto de tratamiento es un órgano que va a trasplantarse. En una realización particular, una composición farmacéutica de la divulgación puede administrarse antes de la reperfusión del órgano en un receptor trasplantado. En una realización particular, una composición farmacéutica de la divulgación puede administrarse antes de la retirada del órgano del donador, por ejemplo, a través de cánulas de perfusión usadas en el proceso de retirada del órgano. Si el donador del órgano es un donador vivo, por ejemplo un donador de riñón, los compuestos o composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse al donador del órgano. En una realización particular, los compuestos o composiciones farmacéuticas de la divulgación se administran almacenando el órgano en una solución que comprende el compuesto o la composición farmacéutica. Por ejemplo, un compuesto o composición farmacéutica de la divulgación pueden incluirse en la solución de conservación del órgano, tal como la solución de la Universidad de Wisconsin "UW", que es una solución que comprende hidroxietilalmidón sustancialmente libre de etilenglicol, etilenclorhidrina y acetona (véase Pat. de los EE.UU. n.º 4.798.824). En una realización particular, una composición farmacéutica de la divulgación que se administra es de tal modo que la lesión por isquemia/reperfusión a los tejidos del órgano se ve reducida después de la reperfusión en el receptor del órgano trasplantado. En una realización particular, el método reduce la necrosis de tejidos (el tamaño de infarto) en los tejidos en riesgo.

La lesión por isquemia/reperfusión puede dañar tejidos distintos de los del miocardio y la materia objeto desvelada abarca métodos de tratamiento o prevención de tal daño. En diversas realizaciones, la lesión por isquemia/reperfusión no es miocárdica. En realizaciones particulares, el método reduce la lesión de isquemia/reperfusión en el tejido del cerebro, hígado, intestino, riñón, intestino grueso o cualquier parte del cuerpo distinta al miocardio. En otra realización, el paciente está en riesgo de padecer tal lesión. La selección de una persona en riesgo de una isquemia no miocárdica podría incluir la determinación de los indicadores usados para evaluar el riesgo de isquemia miocárdica. Sin embargo,

otros factores pueden indicar un riesgo de isquemia/reperfusión en otros tejidos. Por ejemplo, los pacientes de cirugía a menudo experimentan isquemia relacionada con la cirugía. Por lo tanto, los pacientes que tienen programada una cirugía podrían estar considerados en estar en riesgo de padecer un evento isquémico. Los siguientes factores de riesgo para un ictus (o un subconjunto de estos factores de riesgo) podrían demostrar el riesgo de un paciente de padecer isquemia del tejido del cerebro: hipertensión, tabaquismo, estenosis de la arteria carótida, inactividad física, diabetes mellitus, hiperlipidemia, ataque isquémico transitorio, fibrilación auricular, enfermedad de la arteria coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio pasado, disfunción ventricular izquierda con trombo mural y estenosis mitral. Ingall, Postgrad. Med. 107(6):34-50 (2000). Además, las complicaciones de diarrea infecciosa no tratada en personas mayores pueden incluir isquemia miocárdica, renal, cerebrovascular e intestinal. Slotwimer-Nie y col., Gastroenterol. Clin. N. Amer. 30(3):625-635 (2001). Como alternativa, los pacientes podrían seleccionarse basándose en los factores de riesgo de intestino isquémico, enfermedad renal y/o hepática. Por ejemplo, el tratamiento podría iniciarse en pacientes mayores que estén en riesgo de padecer episodios hipotensivos (tales como pérdida de sangre en la cirugía). Por lo tanto, los pacientes que presentan tal indicación podrían estar considerados en estar en riesgo de padecer un evento isquémico. En otra realización, el paciente tiene una cualquiera o más de las afecciones enumeradas en el presente documento, tal como diabetes mellitus e hipertensión. Otras afecciones que pueden resultar en isquemia, tal como una malformación arteriovenosa cerebral, podría demostrar el riesgo de un paciente en padecer un evento isquémico.

4.5.2 Hipertensión pulmonar

En otra realización, un compuesto o composición farmacéutica de la divulgación puede usarse para prevenir o retrasar la aparición y/o desarrollo de hipertensión pulmonar. En una realización de este tipo, un compuesto o composición farmacéutica de la divulgación puede usarse para prevenir o retrasar la aparición y/o desarrollo de hipertensión arterial pulmonar (HAP).

En otra realización, la materia objeto desvelada proporciona un método de reducir la presión arterial pulmonar media (MPAP), que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica que se desvela en el presente documento a un paciente que lo necesita. En otra realización, la MPAP se reduce en hasta aproximadamente un 50 %. En otra realización, la MPAP se reduce en hasta aproximadamente un 25 %. En otra realización, la MPAP se reduce en hasta aproximadamente un 20 %. En otra realización, la MPAP se reduce en hasta aproximadamente un 15 %. En otra realización, la MPAP se reduce en hasta un 10 %. En otra realización, la MPAP se reduce en hasta aproximadamente un 5 %. En otra realización, la MPAP se reduce desde aproximadamente 12 mmHg a aproximadamente 16 mmHg. En otra realización, la MPAP se reduce hasta aproximadamente 15 mmHg.

4.6 Modos de administración, regímenes y niveles de dosificación

Los compuestos o composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse vía administración parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). En determinadas realizaciones, el compuesto o la composición farmacéutica se administra por infusión intravenosa. En otras realizaciones, los compuestos o composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse mediante administración oral.

Cuando una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente divulgación se administra, las dosificaciones se expresan basándose en la cantidad de ingrediente farmacéutico activo, *es decir*, la cantidad de compuesto(s) donador(es) de nitroxilo de la divulgación presente(s) en la composición farmacéutica.

Para la administración intravenosa, la dosis puede expresarse positivamente por unidad de tiempo, bien como una cantidad fija por tiempo de unidad o como una cantidad basada en peso por unidad de tiempo.

En diversas realizaciones, un compuesto o composición farmacéutica de la divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de al menos aproximadamente 0,1 µg/kg/min, al menos aproximadamente 0,2 µg/kg/min, al menos aproximadamente 0,3 µg/kg/min, al menos aproximadamente 0,4 µg/kg/min, al menos aproximadamente 0,5 µg/kg/min, al menos aproximadamente 1 µg/kg/min, al menos aproximadamente 2,5 µg/kg/min, al menos aproximadamente 5 µg/kg/min, al menos aproximadamente 7,5 µg/kg/min, al menos aproximadamente 10 µg/kg/min, al menos aproximadamente 11 µg/kg/min, al menos aproximadamente 12 µg/kg/min, al menos aproximadamente 13 µg/kg/min, al menos aproximadamente 14 µg/kg/min, al menos aproximadamente 15 µg/kg/min, al menos aproximadamente 16 µg/kg/min, al menos aproximadamente 17 µg/kg/min, al menos aproximadamente 18 µg/kg/min, al menos aproximadamente 19 µg/kg/min, al menos aproximadamente 20 µg/kg/min, al menos aproximadamente 21 µg/kg/min, al menos aproximadamente 22 µg/kg/min, al menos aproximadamente 23 µg/kg/min, al menos aproximadamente 24 µg/kg/min, al menos aproximadamente 25 µg/kg/min, al menos aproximadamente 26 µg/kg/min, al menos aproximadamente 27 µg/kg/min, al menos aproximadamente 28 µg/kg/min, al menos aproximadamente 29 µg/kg/min, al menos aproximadamente 30 µg/kg/min, al menos aproximadamente 31 µg/kg/min, al menos aproximadamente 32 µg/kg/min, al menos aproximadamente 33 µg/kg/min, al menos aproximadamente 34 µg/kg/min, al menos aproximadamente 35 µg/kg/min, al menos aproximadamente 36 µg/kg/min, al menos aproximadamente 37 µg/kg/min, al menos aproximadamente 38 µg/kg/min, al menos aproximadamente 39 µg/kg/min o al menos aproximadamente 40 µg/kg/min.

En diversas realizaciones, el compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de no más de aproximadamente 100 µg/kg/min, no más de aproximadamente 90 µg/kg/min, no más de aproximadamente 80 µg/kg/min, no más de aproximadamente 70 µg/kg/min, no más de aproximadamente 60 µg/kg/min, no más de aproximadamente 50 µg/kg/min, no más de aproximadamente 49 µg/kg/min, no más de aproximadamente 48 µg/kg/min, no más de aproximadamente 47 µg/kg/min, no más de aproximadamente 46 µg/kg/min, no más de aproximadamente 45 µg/kg/min, no más de aproximadamente 44 µg/kg/min, no más de aproximadamente 43 µg/kg/min, no más de aproximadamente 42 µg/kg/min, no más de aproximadamente 41 µg/kg/min, no más de aproximadamente 40 µg/kg/min, no más de aproximadamente 39 µg/kg/min, no más de aproximadamente 38 µg/kg/min, no más de aproximadamente 37 µg/kg/min, no más de aproximadamente 36 µg/kg/min, no más de aproximadamente 35 µg/kg/min, no más de aproximadamente 34 µg/kg/min, no más de aproximadamente 33 µg/kg/min, no más de aproximadamente 32 µg/kg/min, no más de aproximadamente 31 µg/kg/min o no más de aproximadamente 30 µg/kg/min.

En algunas realizaciones, el compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 µg/kg/min a aproximadamente 100 µg/kg/min, aproximadamente 1 µg/kg/min a aproximadamente 100 µg/kg/min, aproximadamente 2,5 µg/kg/min a aproximadamente 100 µg/kg/min, aproximadamente 5 µg/kg/min a aproximadamente 100 µg/kg/min, aproximadamente 10 µg/kg/min a aproximadamente 100 µg/kg/min, aproximadamente 1,0 µg/kg/min a aproximadamente 80 µg/kg/min, de aproximadamente 10,0 µg/kg/min a aproximadamente 70 µg/kg/min, de aproximadamente 20 µg/kg/min a aproximadamente 60 µg/kg/min, de aproximadamente 15 µg/kg/min a aproximadamente 50 µg/kg/min, de aproximadamente 0,01 µg/kg/min a aproximadamente 1,0 µg/kg/min, de aproximadamente 0,01 µg/kg/min a aproximadamente 10 µg/kg/min, de aproximadamente 0,1 µg/kg/min a aproximadamente 1,0 µg/kg/min, de aproximadamente 0,1 µg/kg/min a aproximadamente 10 µg/kg/min, de aproximadamente 1,0 µg/kg/min a aproximadamente 5 µg/kg/min, de aproximadamente 70 µg/kg/min a aproximadamente 100 µg/kg/min o de aproximadamente 80 µg/kg/min a aproximadamente 90 µg/kg/min.

En realizaciones particulares, el compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad que varía de aproximadamente 10 µg/kg/min a aproximadamente 50 µg/kg/min, aproximadamente 20 µg/kg/min a aproximadamente 40 µg/kg/min, aproximadamente 25 µg/kg/min a aproximadamente 35 µg/kg/min o aproximadamente 30 µg/kg/min a aproximadamente 40 µg/kg/min. En realizaciones particulares, un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de aproximadamente 20 µg/kg/min a aproximadamente 30 µg/kg/min.

En varias realizaciones, incluyendo diversas realizaciones de administración oral, los compuestos o composiciones farmacéuticas de la divulgación se administran de acuerdo con un régimen de dosificación diario basado en peso, bien como una única dosis diaria (QD) o en múltiples dosis divididas administradas, *por ejemplo*, dos al día (BID), tres veces al día (TID) o cuatro veces al día (QID).

En determinadas realizaciones, el compuesto donador de nitroxilo o composición farmacéutica de la divulgación se administra en una dosis de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg/d, al menos aproximadamente 0,75 mg/kg/d, al menos aproximadamente 1,0 mg/kg/d, al menos aproximadamente 1,5 mg/kg/d, al menos aproximadamente 2 mg/kg/d, al menos aproximadamente 2,5 mg/kg/d, al menos aproximadamente 3 mg/kg/d, al menos aproximadamente 4 mg/kg/d, al menos aproximadamente 5 mg/kg/d, al menos aproximadamente 7,5 mg/kg/d, al menos aproximadamente 10 mg/kg/d, al menos aproximadamente 12,5 mg/kg/d, al menos aproximadamente 15 mg/kg/d, al menos aproximadamente 17,5 mg/kg/d, al menos aproximadamente 20 mg/kg/d, al menos aproximadamente 25 mg/kg/d, al menos aproximadamente 30 mg/kg/d, al menos aproximadamente 35 mg/kg/d, al menos aproximadamente 40 mg/kg/d, al menos aproximadamente 45 mg/kg/d, al menos aproximadamente 50 mg/kg/d, al menos aproximadamente 60 mg/kg/d, al menos aproximadamente 70 mg/kg/d, al menos aproximadamente 80 mg/kg/d, al menos aproximadamente 90 mg/kg/día o al menos aproximadamente 100 mg/kg/d.

En determinadas realizaciones, el compuesto donador de nitroxilo o composición farmacéutica de la divulgación se administra en una dosis de no más de aproximadamente 100 mg/kg/d, no más de aproximadamente 100 mg/kg/d, no más de aproximadamente 90 mg/kg/d, no más de aproximadamente 80 mg/kg/d, no más de aproximadamente 80 mg/kg/d, no más de aproximadamente 75 mg/kg/d, no más de aproximadamente 70 mg/kg/d, no más de aproximadamente 60 mg/kg/d, no más de aproximadamente 50 mg/kg/d, no más de aproximadamente 45 mg/kg/d, no más de aproximadamente 40 mg/kg/d, no más de aproximadamente 35 mg/kg/d, no más de aproximadamente 30 mg/kg/d.

En varias realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,001 mg/kg/d a aproximadamente 10.000 mg/kg/d. En determinadas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg/d a aproximadamente 1.000 mg/kg/d. En determinadas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg/d a aproximadamente 100 mg/kg/d. En determinadas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg/d a aproximadamente 10 mg/kg/d. En determinadas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,1 mg/kg/d a aproximadamente 1 mg/kg/d. En determinadas realizaciones, la dosis es inferior a aproximadamente 1 g/kg/d.

En determinadas realizaciones, un compuesto o composición farmacéutica de la divulgación se administra en un

intervalo de dosificación en el que el extremo inferior del intervalo es cualquier cantidad de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 90 mg/kg/día y el extremo superior del intervalo es cualquier cantidad de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día (p. ej., de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día en una serie de realizaciones y de aproximadamente 5 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día en otra serie de realizaciones).

En realizaciones particulares, el compuesto o composición farmacéutica de la divulgación se administra en un intervalo de dosis de aproximadamente 3 a aproximadamente 30 mg/kg, administrado de una vez al día (QD) a tres veces al día (TID).

En determinadas realizaciones, los compuestos o composiciones farmacéuticas de la divulgación se administran de acuerdo con un régimen de dosificación sin cambios (es decir, no basado en peso), bien como una única dosis diaria (QD) o en múltiples dosis divididas administradas, *por ejemplo*, dos al día (BID), tres veces al día (TID) o cuatro veces al día (QID).

En diversas realizaciones, el compuesto o composición farmacéutica de la divulgación se administra en una dosis de al menos aproximadamente 0,01 gramos/día (g/d), al menos aproximadamente 0,05 g/d, al menos aproximadamente 0,1 g/d, al menos aproximadamente 0,5 g/d, al menos aproximadamente 1 g/d, al menos aproximadamente 1,5 g/d, al menos aproximadamente 2,0 g/d, al menos aproximadamente 2,5 g/d, al menos aproximadamente 3,0 g/d o al menos aproximadamente 3,5 g/d.

En diversas realizaciones, el compuesto o composición farmacéutica de la divulgación se administra en una dosis de no más de aproximadamente 5 g/d, no más de aproximadamente 4,5 g/d, no más de aproximadamente 4 g/d, no más de aproximadamente 3,5 g/d, no más de aproximadamente 3 g/d, no más de aproximadamente 2,5 g/d o no más de aproximadamente 2 g/d.

En determinadas realizaciones, el compuesto o composición farmacéutica de la divulgación se administra en una dosis de aproximadamente 0,01 gramos al día a aproximadamente 4,0 gramos al día. En determinadas realizaciones, un compuesto o composición farmacéutica de la divulgación puede administrarse a una dosis en la que el extremo inferior del intervalo es cualquier cantidad de aproximadamente 0,1 mg/día a aproximadamente 400 mg/día y el extremo superior del intervalo es cualquier cantidad de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 4000 mg/día. En determinadas realizaciones, el compuesto o composición farmacéutica se administra en una dosis de aproximadamente 5 mg/día a aproximadamente 100 mg/día. En diversas realizaciones, el compuesto o composición farmacéutica se administra en una dosis de aproximadamente 150 mg/día a aproximadamente 500 mg/día.

El intervalo de dosificación para la administración parenteral y oral puede ajustarse de acuerdo con las necesidades del paciente. Para intervalos más largos entre las administraciones, pueden usarse formulaciones de depósito o de liberación prolongada.

Un compuesto o composición farmacéutica tal como se divulga en el presente documento puede administrarse antes de, sustancialmente al mismo tiempo con o después de la administración de un agente terapéutico adicional. El régimen de administración puede incluir el pretratamiento y/o la co-administración con el agente terapéutico adicional. En tal caso, el compuesto o composición farmacéutica y el agente terapéutico adicional puede administrarse de forma simultánea, separada o secuencialmente.

Los ejemplos de regímenes de administración incluyen, sin limitación: la administración de cada compuesto, composición o agente terapéutico de manera secuencial; y la co-administración de cada compuesto, composición farmacéutica o agente terapéutico de manera sustancialmente secuencial (p. ej., como en una forma de dosificación unitaria única) o en formas de dosificación unitaria múltiples, separadas para cada compuesto, composición farmacéutica o agente terapéutico.

Los expertos en la materia apreciarán que la "cantidad eficaz" o "dosis" ("nivel de dosificación") dependerá de varios factores, tales como el modo de administración particular, el régimen de administración, compuesto y composición farmacéutica seleccionada, así como la afección particular del paciente que se esté tratando. Por ejemplo, el nivel de dosificación adecuado puede variar dependiendo de la actividad, velocidad de excreción y la posible toxicidad del compuesto específico o la composición farmacéutica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el género y la dieta del paciente que se esté tratando; la frecuencia de administración; el/los otro(s) agente(s) terapéutico(s) que se administre(n) conjuntamente; y del tipo y la gravedad de la afección.

4.7 Kits que comprenden los compuestos o composiciones farmacéuticas

La divulgación proporciona kits que comprenden un compuesto o composición farmacéutica que se desvela en el presente documento. En una realización particular, el kit comprende un compuesto o composición farmacéutica que se desvela en el presente documento, cada uno en forma seca y un diluyente líquido farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones particulares, o bien un compuesto en forma seca o bien una composición farmacéutica en forma seca

contiene aproximadamente un 2,0 % o menos de agua en peso, aproximadamente un 1,5 % o menos de agua en peso, aproximadamente un 1,0 % o menos de agua en peso, aproximadamente un 0,5 % o menos de agua en peso, aproximadamente un 0,3 % o menos de agua en peso, aproximadamente un 0,2 % o menos de agua en peso, aproximadamente un 0,1 % o menos de agua en peso, aproximadamente un 0,05 % o menos de agua en peso, aproximadamente un 0,03 % o menos de agua en peso o aproximadamente un 0,01 % o menos de agua en peso.

Diluyentes líquidos farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación agua estéril, soluciones salinas, dextrosa acuosa, glicerol, soluciones de glicerol y similares. Otros ejemplos de diluyentes líquidos adecuados se desvelan por Nairn, "Solutions, Emulsions, Suspensions and Extracts," págs. 721-752 in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed. (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000).

En una realización, el kit comprende adicionalmente instrucciones para usar el compuesto o composición farmacéutica. Las instrucciones pueden estar en cualquier formato adecuado, tal como en formato escrito o electrónico. En otra realización, las instrucciones pueden ser instrucciones escritas. En otra realización, las instrucciones están contenidas en un medio de almacenamiento electrónico (p. ej., disquete magnético o disco óptico). En otra realización, las instrucciones incluyen información en relación al compuesto o composición farmacéutica y la forma de administración del compuesto o composición farmacéutica a un paciente. En otra realización, las instrucciones se refieren a un método de uso que se desvela en el presente documento (p. ej., el tratamiento, prevención y/o retraso de la aparición y/o desarrollo de una afección seleccionada de enfermedades cardiovasculares, una lesión por isquemia/reperfusión, hipertensión pulmonar y otras afecciones sensibles a la terapia con nitroxilo).

En otra realización, El kit comprende además un envase adecuado. En el que el kit comprende más de un compuesto o composición farmacéutica, los compuestos o composiciones farmacéuticas pueden envasarse pacientemente en recipientes separados o combinarse en un recipiente cuando la reactividad cruzada y vida útil lo permitan.

5. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan con fines ilustrativos y no deben servir para limitar el ámbito de la materia objeto desvelada.

5.1 Síntesis de Compuestos

Los compuestos desvelados en el presente documento pueden fabricarse de acuerdo con los métodos desvelados a continuación o mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los materiales de partida para las reacciones pueden estar disponibles en el mercado o pueden prepararse mediante procedimientos conocidos o modificaciones obvias de los mismos. Por ejemplo, algunos de los materiales de partida están disponibles a partir de suministradores comerciales tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Otros pueden prepararse mediante procedimientos o modificaciones obvias de los mismos desvelados en los textos de referencia estándar tal como March's Advanced Organic Chemistry (John Wiley and Sons) y Larock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers).

Ejemplo 1: Preparación de *N*-Hidroxi-5-metilfurano-2-sulfonamida (1)

A una solución de hidroxilamina (0,92 ml de un 50 % de solución acuosa; 13,8 mmol) en THF (6 ml) y agua (2 ml) enfriada a 0°C se añadió cloruro de 5-metilfurano-2-sulfonilo (1 g, 5,5 mmol) como una solución en THF (6 ml) gota a gota para mantener la temperatura por debajo de 10 °C. La reacción se agitó durante 5 minutos, después de cual tiempo el TLC (1:1 hexano: acetato de etilo (H:EA)) mostró un consumo sustancialmente completo del cloruro de sulfonilo. La reacción se diluyó dos veces con 50 ml de diclorometano (DCM) y la parte orgánica se separó y lavó con agua (10 ml). La parte orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto se sometió a cromatografía mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con heptano:EtOAc seguido por trituración con heptano para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo (0,59 g, rendimiento 61 %). LC-MS t_R = 0,91 min; RMN 1H (DMSO, 500 MHz) δ ppm 9,82 (1 H, d, J = 3,1 Hz), 9,64 (1 H, d, J = 3,2 Hz), 7,10 (1 H, d, J = 3,4 Hz), 6,36 (1 H, d, J = 3,4 Hz), 2,36 (3 H, s).

Ejemplo 2: Preparación de *N*-Hidroxi-3-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida (2) (Ejemplo de Referencia)

Cloruro de 3-Metanosulfonilbenceno-1-sulfonilo

El intermediario de cloruro de 3-metanosulfonilbenceno-1-sulfonilo se sintetizó de acuerdo con los métodos descritos en Park y col., J Med. Chem. 51(21):6902-6915 (2008). Específicamente, se calentó metil sulfonil benceno (110 g, 0,7 mol) durante 18 horas a 90 °C en ácido clorosulfónico (450 ml, 6,7 mol) después del tiempo cual la mezcla de reacción se dejó enfriar a una temperatura de aproximadamente 21 °C antes de verterse lentamente sobre hielo picado. La suspensión resultante se extrajo dos veces en EtOAc (2 L para cada extracción). Las partes orgánicas se combinaron y lavaron con salmuera (50 ml) antes de ser secada sobre sulfato de sodio, filtradas y concentradas a presión reducida para proporcionar el intermediario de cloruro de sulfonilo como un sólido blanquecino (125 g, rendimiento 75 %). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 8,61 (1 h, t, J = 1,7 Hz), 8,35-8,31 (2 H, m), 7,90 (1 H, t, J = 7,9 Hz), 3,15 (3 H, s).

N-Hidroxi-3-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida

A una solución de hidroxilamina acuosa (16 ml de un 50 % de solución acuosa, 245 mmol) en THF (150 ml) y agua (25 ml) enfriada a -5 °C se añadió lentamente cloruro de 3-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida (25 g, 98 mmol) mientras que se mantenía una temperatura de reacción inferior a 10 °C. La reacción se mantuvo a esta temperatura hasta que se observó el consumo sustancialmente completo del cloruro de sulfonilo (aproximadamente 5 min), después del tiempo cual se diluyó con DCM (250 ml) la parte orgánica se separó y lavó dos veces con 50 ml de agua. Los extractos acuosos se combinaron y volvieron a lavar dos veces con DCM (250 ml para cada lavado). Todas las partes orgánicas se combinaron, secaron sobre sulfato de sodio, filtraron y concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido beige. Se llevó a cabo la trituración usando heptanos:EtOAc (1:1; v:v) para proporcionar el compuesto del título como un sólido beige (14 g, rendimiento 56 %). LC-MS t_R = 0,90 min; Espectroscopía de masas de alta resolución (EMAR): teoría ($C_7H_9NO_5S_2$) = 249.9844, medición = 249.9833; RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9.85 (2 H, q, J = 3,3 Hz), 8,31 (1 H, t, J = 1,6 Hz), 8,28 (1 H, dt, J = 7,8, 1,3 Hz), 8,14-8,19 (1 H, m), 7,93 (1 H, t, J = 7,9 Hz), 3,32 (3 H, s).

5.2 Ejemplo 3: Producción de nitroxilo según determinado a través de cuantificación de N₂O

Óxido nitroso (N₂O) se produce a través de dimerización y deshidratación de HNO y es el marcado más común para la producción de nitroxilo (Fukuto y col., Chem. Res. Toxicol 18:790-801 (2005)). El nitroxilo, sin embargo, también puede ser parcialmente inactivado por oxígeno para proporcionar un producto que no produzca N₂O (véase Mincione y col., J. Enzyme Inhibition 13:267-284 (1998); y Scozzafava y col., J. Med. Chem. 43:3677-3687 (2000)). Usando o gas de óxido nitroso o sal de Angeli (SA) como estándar, las cantidades relativas de N₂O a partir de compuestos de la divulgación se examinó a través de análisis de espacio de cabecera de cromatografía por gas (CG).

Un procedimiento para determinar las cantidades relativas de N₂O liberado a partir de compuestos de la divulgación es tal como sigue. Se realizó una CG sobre un cromatógrafo de gas de Agilent equipado con un inyector fraccionado (fraccionamiento 10:1), un detector de captura de microelectrones y una columna capilar de tamiz molecular HP-MOLSIV 30 m x 0,32 mm x 25 μ m. Se usó helio como el transportador (4 ml/min) y se usó gas y nitrógeno como el formador de gas (20 ml/min). El horno inyector y el horno detector se mantuvieron a 200 °C y 325 °C, respectivamente. Todos los análisis de óxido nitroso se realizaron con el horno de columna mantenido a una temperatura constante de 200 °C.

Todos los inyectores de casa se realizaron usando un analizador de espacio de cabecera automático. La presurización vial fue de 15 psi. El horno de muestra del analizador, la válvula de muestra y la línea de transferencia se mantuvieron a 40 °C, 45 °C y 50 °C, respectivamente. La estabilización del horno, presurización vial, carga de bucle, equilibrio de bucle y tiempos de inyección de muestra fueron 1,00 min., 0,20 min, 0,20 min, 0,05 min. y 1,00 min., respectivamente.

Todas las determinaciones usaron un lote de viales de espacio de cabecera nominal de 20 ml con volúmenes medidos previamente para la uniformidad de la muestra (volumen vial real variado por 2,0 % en relación con la desviación estándar relativa ($n=6$)). El volumen vial promedio para el lote se determinó a partir de seis viales seleccionados de forma aleatoria calculando la diferencia de peso entre el vial protegido y sellado vacío (es decir, cargado con aire) y el vial cargado con agua desionizada protegido y sellado usando la densidad conocida de agua desionizada, a continuación haciendo el promedio. Los primordios se prepararon sellando y protegiendo dos viales y a continuación purgando cada uno durante 20 segundos con un chorro suave de argón. Los estándares de nitroxilo se prepararon sellando y protegiendo cuatro viales y a continuación purgando cada uno durante 1 minuto con un chorro suave, a partir de un cilindro de gas, de un estándar de nitroxilo de 3000 ppm.

Los "estándares" de CXL-1020 (*N*-hidroxi-2-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida) se prepararon, por duplicado, pesando de forma precisa 10 $\pm$ 0,5 mg de CXL-1020 y añadiéndolo a cada vial de 4 ml. Usando una auto pipeta, se añadió 1 ml de DMF de anhidro purgado con argón (Sigma-Aldrich) a cada vial de 4 ml para formar una solución madre de CXL-1020 para cada muestra y los viales se protegieron y agitaron y/o sonicaron para asegurar la completa disolución al observarlos visualmente. Usando una auto pipeta, se cargaron viales de 20 ml con 5 ml de PBS (purgado durante al menos 30 min. con argón antes de su uso), se purgaron con argón durante al menos 20 seg y se sellaron con un tabique de goma. Usando una jeringa de 50 μ L, 50 μ L de la solución madre de CXL-1020 se inyectó a cada vial de 20 ml que contenía la PBS.

Las muestras se prepararon tal como sigue. Por duplicado, se pesó de forma precisa 18 $\pm$ 1 mg de cada muestra en cada vial de 4 ml. Usando una auto pipeta, se añadió 1 ml de DMF de anhidro purgado con argón a cada vial de 4 ml para formar una solución madre de muestra para cada muestra y los viales se protegieron y agitaron y/o sonicaron para asegurar la completa disolución al observarlos visualmente. Usando una auto pipeta, se cargaron viales de 20 ml con 5 ml de PBS (purgado durante al menos 30 min. con argón antes de su uso), se purgaron con argón durante al menos 20 seg y se sellaron con un tabique de goma. Los viales se equilibraron durante al menos 10 min. a 37 °C en un calentador en bloque seco. A continuación, usando una jeringa de 50 μ L, 50 μ L de una solución madre de muestra se inyectó a cada vial de 20 ml que contenía la PBS. Los viales se mantuvieron a continuación a 37 °C en el calentador en bloque seco durante un período de tiempo tal que la suma del tiempo gastado en el calentador en bloque seco más el tiempo gastado en el horno analizador del espacio de cabecera automático antes de la inyección de la muestra

igualó el tiempo de incubación deseado.

La secuencia para la auto-inyección fue como sigue: Réplica blanca 1, Réplica blanca 2, Réplica estándar de N₂O 1, Réplica estándar de N₂O 2, Réplica estándar de CXL-1020 1, Réplica estándar de CXL-1020 2, Réplica 1 de muestra 1, Réplica 2 de muestra 1, Réplica 1 de muestra 2, Réplica 2 de muestra 2, *etc.*, concluyendo con réplica estándar de N₂O 3 y réplica estándar de N₂O 4. Se usa una hoja de cálculo ECEL para introducir los datos determinados de este modo y calculando, para cada muestra, el rendimiento de N₂O relativo en porcentaje para cada tiempo de incubación. Los resultados obtenidos se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de análisis de espacio de cabecera de N₂O

Compuesto	Rendimiento de N ₂ O relativo (incubación de 90 minutos)	Rendimiento de N ₂ O relativo (incubación de 360 minutos)
N-Hidroxi-5-metilfurano-2-sulfonamida (1)	52 %	N/E
N-Hidroxi-3-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida (2)	82 %	94 %
*Ejemplo de referencia		

Para los compuestos de fórmulas (3) y (4) las determinaciones son tal como se describen anteriormente excepto las muestras activadas de enzima que se preparan también como sigue: (i) pesar de forma precisa 50 mg de esterasa de hígado porcino (EHC, E3019-20KU, en bruto, Sigma-Aldrich) en un vial de espacio de cabecera de 20 ml; (ii) usar una auto pipeta, se añaden 5 ml de PBS de anhidro purgado con argón para formar una solución madre de PLE; (iii) el vial se protege y agita para asegurar la disolución completa al observarlo visualmente; (iv) las muestras de donadores de nitroxilo se preparan tal como se desvela anteriormente excepto 4,75 ml de PBS que se añade en lugar de 5 ml; y (v) usar una auto pipeta, los viales de 20 ml se cargan a continuación con 250 µL de solución madre de PLE antes de la adición de la muestra. La secuencia para la auto-inyección es como sigue: Réplica blanca 1, Réplica blanca 2, Réplica estándar de N₂O 1, Réplica estándar de N₂O 2, Réplica estándar de CXL-1020 1, Réplica estándar de CXL-1020 2, Réplica 1 de muestra 1 (sin PLE), Réplica 2 de muestra 1 (sin PLE), Réplica 1 de muestra 1 (con PLE), Réplica 2 de muestra 1 (con PLE), Réplica 1 de muestra 2 (sin PLE), Réplica 2 de muestra 2 (sin PLE), Réplica 1 de muestra 2 (con PLE), Réplica 2 de muestra 2 (con PLE), *etc.*, concluyendo con réplica estándar de N₂O 3 y réplica estándar de N₂O 4.

Otro procedimiento para determinar las cantidades relativas de N₂O liberado a partir de compuestos de la divulgación es tal como sigue. La CG se realiza sobre un instrumento CP-3800 de Varian equipado con un inyector manual 1041, un detector de captura de electrodos y una columna capilar de tamiz molecular de 25 m 5Å. Se usa nitrógeno de grado 5,0 tanto como el transportador (8 ml/min) y el gas formador (22 ml/min). El horno inyector y el horno detector se mantienen a 200 °C y 300 °C, respectivamente. Todos los análisis de óxido nítrico se realizan con el horno de columna mantenido a una temperatura constante de 150 °C. Todos los inyectores de gas se realizan usando una jeringa de estanca al gas de 100 µL con un bloqueo de muestra. Las muestras se preparan en viales de espacio de cabecera ámbar de 15 ml con volúmenes medidos previamente para la uniformidad de las muestras (el volumen del vial real varía de 15,19 a 15,20 ml). Los viales se cargan con 5 ml de PBS que contiene dietilentriamina penta ácido anhídrido (DTPA), purgado con argón y sellado con un tabique de goma. Los viales se equilibran durante al menos 10 minutos a 37 °C en un calentador en bloque seco. Una solución madre de 10 mM de Sa se prepara en hidróxido de sodio de 10 mM y las soluciones de donadores de nitroxilo se preparan en bien acetonitrilo o bien metanol y se usan inmediatamente después de la preparación. A partir de estas soluciones madre, se introducen 50 µL dentro viales de espacio de cabecera térmicamente equilibrados individuales usando una jeringa estanca al gas de 100 µL con un bloqueo de muestra para proporcionar concentraciones de sustrato finales de 0,1 mM. Los sustratos se incuban a continuación durante 90 minutos o 360 minutos. El espacio de cabecera (60 µL) se muestrea e inyecta cinco veces sucesivas en el aparato de CG usando una jeringa estanca al gas con un bloqueo de muestra. Este procedimiento se repite para dos o más viales por donador.

5.3. Ejemplo 4: Estabilidad *in vitro* de donadores de nitroxilo en plasma

Se sometieron a ensayo el compuesto (1), compuesto (2) y CXL-1020 para su estabilidad en plasma. El sistema de ensayo comprendía (i) PBS o plasma de rata, perro o humano (al menos 3 donadores, macho, agrupados) a un pH 7,4 y (ii) para ensayos realizados en plasma, un anticoagulante (heparina de sodio o citrato de sodio). Cada compuesto de ensayo (5 µM) se incubó en PBS o plasma a 37 °C sobre una THERMOMIXER® con agitación. Las tres muestras (n=3) se tomaron a cada uno de los siete puntos de tiempo de muestreo: 0, 10, 30, 60, 90, 180 y 360 minutos. Las muestras se combinaron inmediatamente con 3 volúmenes (es decir, 3 veces el volumen de PBS o plasma) de acetonitrilo que contenía un 1 % de ácido fórmico y un estándar interno para finalizar la reacción. Se realizó el análisis AB SCIEX API 3000 LC-MS/MS de los compuestos de ensayo sin una curva estándar. Las semividas (T_{1/2}) de los compuestos se determinaron a partir de gráficos del porcentaje de los valores restantes usando la relación de respuesta del área del pico. Los resultados determinados se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Semividas ($T_{1/2}$) de donadores de nitroxilo

Compuesto	$T_{1/2}$ (minutos) PBS	$T_{1/2}$ (minutos) Rata	$T_{1/2}$ (minutos) Perro	$T_{1/2}$ (minutos) Ser humano
CXL-1020	2	N/E	N/E	2
<i>N</i> -Hidroxi-5-metilfurano-2-sulfonamida (1)	68	40	25	65
<i>N</i> -Hidroxi-3-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida (2)	50	20	33	37
*Ejemplo de referencia				

Para medir las semividas de compuestos de fórmula (3) o fórmula (4) se añade una solución madre de esterasa de hígado de cerdo (EHC) a la PBS o plasma antes de la adición de dicho compuesto.

5.4. Ejemplo 5: Solubilidad de donadores de nitroxilo

Inicialmente, las solubilidades de los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) se midieron mediante evaluación visual a 100 µg/ml y 1000 µg/ml en un tampón a pH 4. El tampón se preparó mezclando 660 ml de la Solución A (10,5023 g de ácido cítrico disuelto en 1 l de agua) y 450 ml de la Solución B (14,7010 g de dihidrato tribásico de citrato de sodio disuelto en 1 l de agua). El pH del tampón fue de 3,98 según medido por el medido de PH.

Cada compuesto se agitó durante 5 minutos en la solución de tampón de pH 4 preparada anteriormente en dos puntos de concentración (100 µg/ml y 1000 µg/ml) y la solubilidad se observó visualmente. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Solubilidad en tampón a pH 4 a 100 µg/ml y 1000 µg/ml

Compuesto	Solubilidad (100 µg/ml)	Solubilidad (1000 µg/ml)
<i>N</i> -Hidroxi-5-metilfurano-2-sulfonamida (1)	Y	Y
<i>N</i> -Hidroxi-3-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida (2)	Y	Y
N = No soluble después de agitar durante 5 minutos en tampón a pH = 4		
Y = Soluble después de agitar durante 5 minutos en tampón a pH = 4		
*Ejemplo de referencia		

Además, una muestra del compuesto de fórmula (1) se preparó en agua para determinar la solubilidad adecuada del compuesto en ausencia de excipientes (p. ej., CAPTISOL®). Se consiguió una concentración de aproximadamente 300 mg/ml, sin contabilizar la contribución de volumen del compuesto. El pH de la muestra se determinó que era 2,8, el cual se ajustó al previsto de 4,0 usando 0,1 N de NaOH. Al ajustar el pH, se observó la precipitación de una pequeña cantidad de sólido. La solución transparente se diluyó en acetonitrilo y analizó mediante HPLC, resultando en una concentración de solución observada de 268 mg/ml. Se realizó un análisis similar para el compuesto de fórmula (2). El compuesto de fórmula (2) tiene una solubilidad de aproximadamente 10 mg/ml.

5.5 Ejemplo 6: Eficacia hemodinámica de donadores de nitroxilo en caninas normales y con insuficiencia cardíaca (modelo de ritmo de taquicardia)

5.5.1. Materiales y métodos

Se examinaron los efectos cardiovasculares de donadores de nitroxilo por medio de análisis de curvas (bucles) de presión-volumen (PV) en perros beagle conscientes, sujetos con una eslinga. Los animales tenían acceso libre a agua potable y a una dieta canina comercial en condiciones de laboratorio estándar. Se proporcionó luz fluorescente a través de un temporizador automático durante aproximadamente 12 hora al día. En ocasiones, el ciclo oscuro se interrumpía de forma intermitente debido a actividades relacionadas con el estudio. La temperatura y humedad se controlaron y registraron diariamente y se mantuvieron hasta el máximo posible entre 64 °F y 84 °F y del 30 % al 70 %, respectivamente. Los perros se aclimataron durante un período de al menos 1 semana antes de la cirugía. Después de la cirugía y recuperación, los animales se aclimataron a la sujeción con eslinga durante un período de hasta 4,5 horas. Los animales se dejaron en ayunas antes de la cirugía.

Procedimiento quirúrgico

Anestesia

Se colocó un catéter venoso permanente en una vena periférica (por ejemplo, cefálica) durante la administración de la anestesia. Se indujo anestesia general por vía intravenosa (bolo) con buprenorfina aproximadamente 0,015 mg/kg) seguido por un bolo intravenoso de propofol (aproximadamente 6 mg/kg). Además, un antibiótico profiláctico (cefazolina de 20 a 50 mg/kg vía i.v) se proporcionó en la inducción. Se colocó un tubo traqueal tunelizado y se usó para ventilar mecánicamente los pulmones con 100 % de O₂ a través de un ventilador animal con ciclo de volumen (aproximadamente 12 respiraciones/minuto) con un volumen de ventilación pulmonar de aproximadamente 12,5 ml/kg) para mantener los valores de PaCO₂ dentro del intervalo fisiológico. La anestesia se mantuvo con isoflurano inhalado (1 % a 3 %).

10 *Instrumentación cardiovascular*

Una vez se ha establecido un plano estable (quirúrgico) de anestesia, se realizó una toracotomía izquierda (en condiciones asépticas estrictas) y cada animal se instrumentó crónicamente con cristales sono-micrométricos que proporcionaban las dimensiones/volumen ventricular izquierdo (VI). Además, se colocaron un catéter cargado con fluido y un monómetro de estado sólido en el ventrículo izquierdo para controlar la presión. Se colocó un catéter cargado con fluido en el ventrículo derecho (VD) y la aorta (Ao) para el control de la presión/administración del artículo de ensayo. Un ocluidor hidráulico (métricas in-vivo) se colocó/aseguró alrededor de la vena cava inferior (VCI), para permitir su constricción controlada para la generación de curvas presión-volumen del VI durante la autorregulación heterométrica. Los catéteres/cables se tunelizaron asépticamente y externalizaron entre las escápulas. Durante el curso de estudio, los catéteres cargados con fluido se purgaron regularmente (al menos una vez a la semana) con una solución de retención para evitar tanto la coagulación como el crecimiento bacteriano (2-3 ml de solución de Taurolidina-Citrato, TCS-04; Access Technologies).

25 *Implantación del marcapasos*

Después de la instrumentación cardiovascular, la vena yugular derecha se expuso cuidadosamente y se canuló con un cable/catéter de ritmo bipolar (CAPSUREFIX® Novus; Medtronic). Con una guía fluoroscópica, este cable de ritmo se avanzó normogrado hacia el ventrículo derecho y se fijó de forma activa (atornilló) al endocardio apical. El extremo próximo del cable se aseguró al dispositivo marcapasos (Kappa 900; Medtronic). Posteriormente, el marcapasos se colocó/aseguró en un bolsillo subcutáneo en el cuello.

Considerando que el corazón se expuso a través de una toracotomía, un cable marcapasos bipolar se aseguró en el medio-miocardio ventricular derecho. Este cable de ritmo se tunelizó/externalizó entre las escápulas y se usó junto con un generador/marcapasos de impulso externo. El marcapasos endocárdico implantado se usó como un respaldo al marcapasos externo/epicárdico.

35 *Recuperación*

Antes de cerrar el pecho de la toracotomía, se colocó un tubo en el pecho para el drenaje de cualquier fluido y/o gas que se acumule por el procedimiento quirúrgico. El tubo se aspiró dos veces diariamente hasta que la cantidad de fluido retirado fuera inferior a 35 ml por aspiración en un período aproximado de 24 horas. El tubo pectoral se retiró a continuación.

Todos los animales fueron administrados con antibiótico profiláctico (cefazolina de 20 a 50 mg/kg por vía i.v.) y medicación contra el dolor (meloxicam a aproximadamente 0,2 mg/kg por vía i.v.). Si es necesario, también se administró un analgésico adicional que incluía un parche de fentanilo (de 25 a 50 mcg/hora). Todas las incisiones se cerraron a capas; la musculatura subyacente se cerró con puntos absorbibles y la piel se cerró con grapas.

Después de la cirugía, los animales se dejaron recuperar durante al menos 14 días. Se administró cefalexina (de 20 a 50 mg/kg) oralmente BID durante al menos 7 días y se administró meloxicam (0,1 mg/kg) oralmente SID o subcutáneamente durante al menos 2 días después de la cirugía. En toda la fase de recuperación, los animales se observaron diariamente para los signos rutinarios de recuperación y las zonas de las heridas se observaron por cualquier signo de posibles infecciones. Los animales que padecían dolor, estrés y/o infecciones se llevaron a la atención de un veterinario y el director del estudio. Las grapas de incisión de la piel no se retiraron durante al menos 7 días después de la cirugía.

60 *Inducción de insuficiencia cardíaca*

Después de una recuperación de la cirugía y/o suficiente período de lavado de dosificación con un donador de nitroxilo, los animales fueron sometidos a un protocolo de ritmo multiplicador (210 ppm) de 3 semanas previsto para desencadenar el remodelado/disfunción ventricular izquierda consistente con el síndrome de insuficiencia cardíaca. En resumen, a través del marcapasos/cable ventricular derecho implantado, el/los ventrículo(s) tenían un ritmo asincrónico y continua de 210 latidos por minuto (lpm). El remodelado ventricular izquierdo (y la inducción de insuficiencia cardíaca) se confirmaron tanto por la disminución ecocardiográfica (por ejemplo, fracción de eyección (FE)) de aproximadamente el 60 % al previsto de aproximadamente el 35 %, dilatación ventricular izquierda (VI) y neuro-humoral (por ejemplo, elevación terminal N de péptido natriurético pro-cerebral (NT proBNP) superior a 1800

pM/L de un valor inicial de aproximadamente 300 pM/L) cambia después de 3 semanas de regulación del ritmo. Se recogieron los ecocardiográficos y muestras sanguíneas en la ausencia de regulación de ritmo (durante al menos 15 min).

5 5.5.2. Resultados

Evaluaciones de eficacia hemodinámica

- Se estudiaron animales (normales o con insuficiencia cardíaca) durante el tratamiento con tanto vehículo (control) como un donador de nitroxilo (bien CXL-1020, un compuesto de fórmula (1) o un compuesto de fórmula (2)). En cada período de dosificación, se controlaron continuamente los animales conscientes sujetados con una eslinga durante hasta dos a tres horas. Después de la estabilización hemodinámica, se inició la infusión del vehículo. Poco después, se redujo de forma aguda la pre-carga ventricular izquierda por media de oclusiones de la vena cava cortas (a través de una inflamación pasajera del ocluidor de la vena) para generar una familia de curvas/bucles presión.volumen; se realizaron hasta tres oclusioniones, permitiendo la recuperación hemodinámica entre los ensayos. La infusión del vehículo se continuó y después de 30 min. Se recogió otro (valor inicial) conjunto de datos hemodinámicos. Después de la recolección de datos hemodinámicos de valor inicial, se inició la infusión del compuesto donador de nitroxilo que sometido a ensayo y se obtuvieron/realizaron los parámetros hemodinámicos/funcionales derivados hasta cuatro (4) puntos de tiempo seleccionados a partir de los siguientes: 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la aparición de la infusión del compuesto del vehículo/ensayo. Para el grupo placebo o de tratamiento controlado por tiempo, se le administró a cada animal una infusión de placebo apropiado durante hasta 180 minutos. En todos los casos, el compuesto de ensayo se suministró a una tasa de infusión intravenosa constante de 1 ml/kg/hr y se comparó a una tasa de dosificación molar equivalente.
- La presión ventricular izquierda resultante y los datos de volumen se analizaron para generar relaciones que representaran el estado contráctil y energético del miocardio. Se recogió la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD) y la presión arterial media (PAM). Se obtuvieron los índices mecánicos y/o geométricas ventriculares izquierdos a partir del índice de presión de PSF, PDF, dP/dt max/min, constante de tiempo de relajación tau [basándose en la decadencia mono-exponencial con asíntota no-cero] y volumen (volumen sistólico final (VSF), volumen diastólico final (VDF), volumen de ictus (VI)). Además, las siguientes mediciones se derivaron a partir de datos de presión-volumen ventricular izquierdo (bucles PV) generados durante periodos breves de reducción de precarga: área de volumen de presión (AVP) y trabajo de ictus (TI), relaciones de volumen de presión sistólica final (RVPSF) y diastólica final (RVPDF) y presión sistólica final y relación de volumen de ictus (elastancia arterial (Ea)). Los datos representativos obtenidos a partir de estudios en perros normales y perros con insuficiencia cardíaca se muestran en la Tabla 5 y Tabla 6, respectivamente. Una disminución de la RVS (resistencia vascular sistémica) se correlaciona con una vasodilatación.

Tabla 5. Parámetros hemodinámicos para donadores de nitroxilo en caninos normales (% de cambio a partir del valor inicial)

	Compuesto			
	Control	CXL-1020	(1)	(2)
Tasa de dosificación (μmol/kg/mm)	0	100	50	100
Número de animales	3	6	8	4
FC	-2,21 ± 1,51	6,71 ± 4,72	-4 ± 2	-6,17 ± 5,58
PSF	-1,8 ± 0,58	-17,79 ± 3,09	-18 ± 2	-15,22 ± 2,39
EDV	2,62 ± 0,42	-20,51 ± 7,63	-6 ± 2	-17,41 ± 1,58
Tau	H.14±1.15	-6,58 ± 4,53	-6 ± 1	-6,40 ± 7,11
TI	-2,80 ± 1,26	-13,96 ± 5,51	-11 ± 4	-17,56 ± 2,66
RVPSF	-3,20 ± 1,15	28,25 ± 8,69	19 ± 1	25,87 ± 5,04
TIRP	-0,78 ± 0,38	12,60 ± 2,96	12 ± 1	12,88 ± 1,12
Abreviaturas: FC: Frecuencia cardíaca. FC aumentada, bien debido a la respuesta refleja a la baja presión sanguínea o debido al efecto del fármaco primario sobre el corazón, es malo. PSF: Presión sistólica final - similar a PAM a continuación. PDF o VIPDF: Presión diastólica final (ventricular izquierda). Se correlaciona con las presiones pulmonares. Una disminución indica una reducción de la congestión pulmonar (un objeto clave de la terapia de insuficiencia cardíaca aguda). Tau: Un índice de lusitropismo o relajación del corazón durante la diástole. La disminución es positiva e indica un rendimiento diastólico mejorado. TI: Trabajo de ictus. Medición de cuando trabajo ejerce el corazón para crear una cantidad dada de flujo de avance.				

(continuación)

	Compuesto			
	Control	CXL-1020	(1)	(2)
RVPSF: Relación de volumen de presión sistólica final. Una medición de intropismo/contractilidad (un objeto clave de la terapia de insuficiencia cardíaca aguda). Un aumento indica un rendimiento y eficacia cardíaco mejorado. TIRP: Trabajo de ictus reclutable de precarga - similar a RVPSF anterior. VI: Volumen de ictus. La cantidad de sangre expulsada a partir del ventrículo izquierdo con cada latido del corazón. Un inotropo debe aumentar esto, debido a las condiciones de carga idénticas. PAM o PSM: La presión arterial media o presión sanguínea media. Pequeñas gotas son positivas y prueba de la vasodilatación. VDF o VDFVI: Volumen diastólico final (ventricular izquierda). Índice del grado de carga en diástole. Un aumento indica una reducción en la sobrecarga de volumen.				
*Ejemplo de referencia				

Tabla 6. Parámetros hemodinámicos para donadores de nitroxilo en caninos con insuficiencia cardíaca (% de cambio a partir del valor inicial)

	Compuesto			
	Control	CXL-1020	(1)	(2)
Tasa de dosificación (µmol/kg/min)	0	100	75	100
Número de animales	3	6	6	4
FC	-5,08 ± 5,83	-0,23 ± 2,25	-6 ± 2	-1,36 ± 2,06
PSF	3,89 ± 2,11	-14,78 ± 3,24	-17 ± 1	-13,83 ± 3,30
EDV	0,86 ± 0,86	-12,03 ± 3,72	-9 ± 2	-3,26 ± 1,05
Tau	4,05 ± 4,72	-17,27 ± 1,39	-16 ± 4	-12,51 ± 2,72
TI	1,83 ± 1,87	-12,01 ± 4,24	-9 ± 2	-9,41 ± 2,84
RVPSF	-3,14 ± 0,87	45,42 ± 16,48	29 ± 1	22,84 ± 5,69
TIRP	-0,88 ± 0,68	21,97 ± 3,79	22 ± 1	17,91 ± 1,47
Abreviaturas: FC, frecuencia cardíaca; PSF, presión sistólica final; VDF, volumen diastólico final; Tau, constante de tiempo para la relajación; TI, trabajo de ictus; RVPSF, relación de volumen de presión sistólica final; TIRP, trabajo de ictus reclutable de precarga.				
*Ejemplo de referencia				

La **FIG. 1** muestra el perfil hemodinámico 180 minutos después de la administración de CXL-1020 y dos compuestos de la divulgación (compuestos de fórmula (1) y fórmula (2)) usando un modelo de ritmo de taquicardia de insuficiencia cardíaca. Cada componente se administró por vía intravenosa a una velocidad de 100 µg/kg/min. La **FIG. 2** muestra el perfil hemodinámico del compuesto de fórmula (1) en diversas dosificaciones usando un modelo de ritmo de taquicardia de insuficiencia cardíaca. Los resultados demuestran que los compuestos de fórmula (1) y (2) tienen una actividad hemodinámica comparable a CXL-1020 en tanto modelos caninos normales y con insuficiencia. En particular, los compuestos de fórmula (1) y (2) produce una mejora significativa en el inotropismo y lusitropismo y modestas reducciones en la presión sanguínea.

5.6 Ejemplo 7: Eficacia hemodinámica de donadores de nitroxilo en caninos con insuficiencia cardíaca (Modelo de insuficiencia cardíaca de microembolización canina)

5.6.1. Materiales y métodos

Se produjo una insuficiencia cardíaca usando perros bastardos sanos, en condiciones, criados específicamente (20-26 kg) usando un modelo de microembolización secuencial. Se realizó una microembolización coronaria hasta la fracción de eyección de VI (angiográficamente determinado con anestesia) fue aproximadamente del 30 % o inferior. Se proporcionaron dos semanas a continuación después de la última microembolización para asegurar la estabilización de cada animal antes de iniciar los experimentos.

Se realizó un estudio de dosis inicial (2-100 µg/kg/min durante 40 min) en 3 perros para identificar dosis terapéuticamente relevantes de un compuesto de fórmula (1). Basándose en estos datos, se estudió un grupo primario de seis animales, que recibían 3 o 10 µg/kg/min de un compuesto de fórmula (1) durante un período de 4 horas, seguido por una hora de lavado. Solo se estudió una dosis en un día dado, los otros al menos una semana después y el orden de forma alterna. Las mediciones hemodinámicas, ventriculográficas y ecocardiográficas se realizaron durante las cateterizaciones cardíacas izquierda y derecha en perros anestesiados (inducción: hidromorfona (0,22

mg/kg i.v.) y diazepam (0,17 mg/kg i.v.), mantenimiento: 1-2 % isoflurano).

El volumen sistólico final VI (VSF) y el volumen diastólico final (VDF) se calcularon a partir de ventriculogramas usando el método de longitud de área. Se obtuvo la velocidad sanguínea aórtica máxima en la aorta ascendente usando el flujo Doppler para mediciones del índice de potencia máxima (IPP). El área fraccional de IV de acortamiento (AFA) se midió a partir de la vista del eje corto del VI al nivel de los músculos papilares obtenido a partir de ecocardiogramas de bidimensionales. Los índices medidos de la función diastólica del VI incluían el tiempo de deceleración de la velocidad de entrada de flujo mitral (TD), relación de la integral de la velocidad de entrada de flujo temprana (Ei) en relación con la velocidad durante la contracción atrial (Ai) (Ei/Ai) y estrés de pared circunferencial diastólico final de VI (EPDF).

Las mediciones del consumo de oxígeno miocárdico se realizaron a un valor inicial y 4 horas después de la infusión de 10µg/kg/min. Específicamente, se extrajeron muestras sanguíneas sinusales arteriales y coronarias simultáneamente a un valor inicial y al final de cada punto de tiempo del estudio. En contenido de oxígeno se determinó con un hemoxímetro. La velocidad sanguínea de la arteria coronaria se midió con un cable de velocidad del flujo Doppler colocado en la arteria coronaria circunfleja izquierda próxima a la primera ramificación marginal o la arteria coronaria descendente anterior izquierda justo próxima a la primera ramificación diagonal. El flujo sanguíneo se estimó calculando el área de sección transversal de la arteria coronaria en el lugar de la medición de la velocidad a partir de la angiografía coronaria. Se asumió que el flujo sanguíneo coronario total era el doble que la medición de flujo en la arteria coronaria descendente anterior izquierda o circunfleja. El consumo de oxígeno del ventrículo izquierdo (MVO2) se calculó como el producto de flujo sanguíneo coronario total y la diferencia de contenido de oxígeno entre la sangre sinusal coronaria y arterial.

5.6.2. Resultados

Evaluaciones de eficacia hemodinámica

Los animales se estudiaron durante el tratamiento tanto con vehículo como un donador de nitroxilo. La **FIG. 3** muestra el perfil hemodinámico del compuesto de fórmula (1) después de la inducción de insuficiencia cardíaca en perros evaluados usando un modelo de insuficiencia cardíaca de microembolización canina. Los datos se muestran para el punto de tiempo final durante la infusión en dos velocidades de infusión. Los resultados demostraron que el compuesto de fórmula (1) tenía una actividad hemodinámica comparable a CXL-1020.

5.7 Estudios toxicológicos con donadores de nitroxilo

5.7.1 Ejemplo 8: Ensayos *In Vivo* con CXL-1020

Durante los ensayos *in vivo* del donador de nitroxilo, CXL-1020 (*N*-Hidroxi-2-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida), se llevó a cabo un estudio de 14 días para evaluar la tolerancia en perros tratados con infusiones continuas con CXL-1020 a tasas de dosificación de hasta 90 µg/kg/min. Este primer estudio encontró que CXL-1020 era tolerado cuando se administró a una tasa de dosificación de 60 µg/kg/min. Inesperadamente, sin embargo, se observaron cambios patológicos clínicos consistentes con un proceso de inflamación, como se refleja en los cambios en los marcadores patológicos clínicos de inflamación, en la tasa de dosificación de 60 µg/kg/min. Para investigar adicionalmente este efecto secundario indeseado, se inició un estudio de seguimiento de 14 días en perros. El estudio de seguimiento necesitaba terminarse después de solo 4 días debido a la aparición de otros efectos secundarios indeseados: la aparición inesperada de hinchazón e inflamación significativa en los miembros posteriores de los perros en los que se implantaron quirúrgicamente los catéteres, que ocasionalmente interfirieron con la función del miembro normal; decoloración cutánea en la región inguinal; actividad disminuida; inapetencia; y en el grupos de mayor dosificación, piel fría al tacto.

Para determinar la causa de la inflamación e hinchazón del miembro trasero, se llevaron a cabo una serie de estudios de infusión continua de 72 horas durante los siguientes 6 meses. Los resultados de esos estudios mostraron que CXL-1020, cuando se administra en una formulación de pH 4 de una relación molar 1:1 de CXL-1020:CAPTISOL® diluido en una solución de 5 % de dextrosa en agua, causó cambios patológicos clínicos consistente con un proceso inflamatorio en tasas de dosificación superiores que o igual a 0,03 µg/kg/min en perros. La inflamación vascular se observó alrededor del sitio de inserción del catéter dentro de la vena femoral (15 cm aguas arriba de la punta del catéter), en la punta del catéter y aguas abajo de la punta del catéter. El primer sitio de inflamación, el sitio de inserción del catéter, causó la hinchazón del miembro trasero del perro y se observó la inflamación en el estudio de seguimiento terminado de forma temprana. El aumento de infusión de pH de 4 a 6 disminuyó la inflamación, mejoró el perfil inflamatorio por aproximadamente 3 veces. Sin embargo, aún se demostraron efectos secundarios indeseables considerables cuando se administró CXL-1020 a unas tasas de dosificación superiores a o igual a 3 µg/kg/min en los perros.

Para evitar los efectos secundarios asociados a el sitio de inserción del catéter y para evaluar si la inflamación vascular se debía al diseño del catéter implantado, se llevó a cabo un estudio de infusión continua de 24 horas en perros usando un catéter percutáneo colocado en una vena periférica (cefálica). Después de 6 horas de infusión, se observó un

edema significativo en el miembro superior delantero, aguas abajo de la punta del catéter. Después de 24 horas de infusión, se detectaron cambios patológicos clínicos similares a aquellos observados en estudios previos usando un catéter central implantado. También se detectó patología microscópica que demostraba una tromboflebitis grave en la punta del catéter y que progresaba con un gradiente de severidad atenuada aguas abajo de la punta del catéter.

Para determinar si la flebitis local aparecería en humanos en una dosificación de duración más larga, se llevó a cabo un estudio de duración más largo en voluntarios sanos. El estudio de duración más largo incluía un estudio de dosis-escalada en el que cohortes de 10 voluntarios se administraron secuencialmente con una infusión continua de 24 horas de CXL-1020 en tasas de dosificación de 10, 20 y 30 $\mu\text{g/kg/min}$ con una evaluación de seguridad entre cada cohorte. Cada cohorte consistía en tratamiento de 2 placebos y 8 activos con un parte centinela de 1 activo y 1 placebo seguido por el grupo principal de tratamiento de 1 placebo y 7 activos. La infusión fue a través de un catéter percutáneo insertado en una vena del antebrazo. El catéter se cambió al arma contralateral después de 12 horas de infusión. Se encontró que la tasa de dosificación de 10 $\mu\text{g/kg/min}$ durante 24 horas está bien tolerada. En el segundo cohorte, administrado con una dosis de 20 $\mu\text{g/kg/min}$ durante 24 horas, no se encontraron hallazgos adversos en los voluntarios tratados con 2 placebos pero se encontraron leves hallazgos (bien signos clínicos y/o cambios en la patología clínica) en todos los 8 sujetos consistente con la flebitis del sitio de infusión. Basándose en estos resultados, se detuvo el estudio de seguridad de duración más largo.

Se continuó con estudios exploratorios para determinar la causa de los efectos secundarios indeseados de CXL-1020 en las dosis más altas, pero aún clínicamente deseables. Los estudios llevados a cabo con el subproducto de CXL-1020, el resto que permanece después de la donación de nitroxilo, fue negativo, indicando que los efectos secundarios de CXL-1020 eran atribuibles a bien el compuesto de origen, CXL-1020 o al HNO producido a partir de este. Los estudios se llevaron a cabo con donadores de nitroxilo alternativo que no están relacionados estructuralmente con CXL-1020 pero tenían semividas similares para la donación de nitroxilo (semividas de aproximadamente 2 minutos). Para estos donadores, el nitroxilo se encontraba a su concentración intravascular mayor en la punta del catéter e inmediatamente aguas abajo en la vena en la que el catéter tenía que insertarse. En todos los casos, se observaron efectos secundarios vasculares locales en la punta del catéter. Estos resultados sugirieron que la inflamación fue causada por nitroxilo que se liberó rápidamente de la corta semivida de los donadores de nitroxilo.

5.7.2 Ejemplo 9: Compuestos de la divulgación que poseen un perfil toxicológico mejorado en relación con CXL-1020

Se llevaron a cabo estudios en machos y hembras de perro beagle. Los animales tenían acceso libre a agua potable y a una dieta canina comercial en condiciones de laboratorio estándar. Los animales se dejaron en ayunas antes de la recogida de muestras sanguíneas cuando se indicaba por el protocolo de estudio. Se proporcionó luz fluorescente a través de un temporizador automático durante aproximadamente 12 hora al día. En ocasiones, el ciclo oscuro se interrumpía de forma intermitente debido a actividades relacionadas con el estudio. La temperatura y humedad se controlaron y registraron diariamente y se mantuvieron hasta el máximo posible entre 64 °F a 84 °F y del 30 % al 70 %, respectivamente. Los perros se aclimataron durante un período de al menos 1 semana. Durante este periodo, los animales se pesaron semanalmente y se observaron con respecto a la salud general y cualquier signo de enfermedad. Los animales se aclimataron a llevar una chaqueta durante al menos tres días antes de la administración de dosis. Además, los animales también se aclimataron a llevar un collar isabelino (collarín) durante la aclimatación a la chaqueta.

Procedimiento quirúrgico y procedimiento de dosificación

Los animales fueron caterizados el día antes de la administración de la dosis. Se colocó un catéter percutáneo (usando una técnica aséptica y un vendaje estéril) en la vena cefálica distal al hombro. Los animales tenían movimiento libre en sus jaulas durante la administración de dosis de infusión continua. Para facilitar la administración de dosis de infusión continua, el catéter periférico se unió a un conjunto de extensión conducido por debajo de una chaqueta canina y a continuación unido a un sistema de infusión de anclaje. Para evitar que los animales accedan/retiren el catéter percutáneo colocado periféricamente, el sitio de caterización se vendó usando una venda veterinaria y se colocó un collarín sobre los animales durante la duración del tratamiento (es decir, el período caterizado). Durante el período de pretratamiento, el catéter venoso se infundió continuamente a una velocidad de aproximadamente 2-4 ml/h con un 0,9 % de cloruro de sodio para la inyección, USP (salino) para mantener la permeabilidad del catéter. Antes de la dosificación, el sistema de infusión se cargó previamente (infusión de bolo lenta) con la solución de dosificación respectiva para asegurar que la dosificación empieza tan pronto como cuando se inicia la bomba de infusión. La línea de infusión se conectó a un tanque que contenía el compuesto de control o de ensayo y se inició la infusión. Las composiciones de ensayo se infundieron continuamente, a una tasa de infusión constante predeterminada (1 o 2 ml/kg/h), durante 24 horas y se compararon a tasas de dosificación molar equivalentes.

Observaciones clínicas, patología clínica y patología microscópica

Se realizó un examen clínico detallado de cada animal dos veces diariamente y se recogieron las mediciones de temperatura corporal y muestras sanguíneas para la patología clínica de todos los animales antes de la dosis y 6 horas, 12 horas, 24 horas y 72 horas después del inicio de la infusión de la composición. Al final del estudio, todos los

animales fueron sometidos a eutanasia en su necropsia programada y se realizaron exámenes necróticos completos. Se recogieron tejidos seleccionados, se fijaron y almacenaron para un posible examen microscópico en el futuro. La vena cefálica que contenía el catéter de infusión se diseccionó intacta junto con la vena bronquial y se examinó en su longitud completa. La ubicación de la punta del catéter se marcó sobre el espécimen no fijado. Después de la fijación, el espécimen se recortó y se procesó en láminas para proporcionar secciones histológicas transversales que representaban la punta del catéter y los tejidos del alrededor ambos próximos y distales a la punta del catéter (es decir, 1 cm distal a la punta del catéter, en la punta del catéter y 1, 5, 10, 15 y 20 cm próximos a la punta del catéter). En relación con la punta del catéter, "próximo" se define como más cerca del corazón y "distal" se define como más lejos del corazón.

Evaluación de seguridad

Se observaron cambios patológicos clínicos consistentes con un síndrome inflamatorio en algunas tasas de dosificación de los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) y CXL-1020. Cada compuesto se formuló con CAPTISOL® (7 % p/v) en agua estéril a un pH de 4. Los biomarcadores más sensibles de la inflamación fueron: (1) Recuento de glóbulos blancos (WBC, obtenido como (número de glóbulos blancos)/ μ L multiplicado por los valores en la parte del extremo derecho de la FIG. 4 por 103), (2) concentración de fibrógeno (proporcionado en mg/dL en la parte del extremo derecho de la FIG. 4), y (3) concentración de proteína C-reactiva (CRP) (proporcionada en mg/L en la parte del extremo derecho de la FIG. 4). La gravedad de los cambios dependía de la identidad del compuesto y la tasa de dosificación en la que se administraba el compuesto (FIG. 4). En la FIG. 4, una puntuación que variaba de 0 (baja gravedad) a 2 (alta gravedad) se asignó a cada uno de estos biomarcadores de inflamación de acuerdo con la parte del extremo derecho en esa figura. Se calculó una puntuación acumulativa a partir de la suma de estas puntuaciones de marcador. El NOAEL, determinado basándose en estos marcadores patológicos clínicos y expresado en tasas de dosificación molar equivalentes (μ g/kg/min) con respecto a CXL-1020, se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7. Niveles sin efectos adversos observables (NOAEL) de Donadores de Nitroxilo

Compuesto	NOAEL (mg/kg/min)
N-Hidroxi-2-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida (CXL-1020)	< 0,03
N-Hidroxi-5-metilfurano-2-sulfonamida (1)	> 20
N-Hidroxi-3-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida (2)	3
*Ejemplo de referencia	

Para CXL-1020, se observaron elevaciones significantes de WBC, fibrógeno y CRP, incluso a concentraciones tan bajas como 0,03 μ g/kg/min. El compuesto de fórmula (1) y el compuesto de fórmula (2) cada uno tiene un NOAEL a dosis significativamente superiores que de CXL-1020. El compuesto de fórmula (1) tiene el perfil toxicológico más favorable, sin mostrar efectos adversos a dosis al menos tan altas como 20 μ g/kg/min. Esto representa una mejora superior a 660 veces más con respecto a CXL-1020.

De manera colectiva, estos hallazgos sugirieron que la infusión de CXL-1020 causa un síndrome inflamatorio, que se reduce sustancialmente con el compuesto de fórmula (1) y el compuesto de fórmula (2).

Estos hallazgos sugieren que los efectos secundarios vasculares indeseados asociados a CXL-1020 en la punta del catéter, aguas abajo de la punta del catéter y en ciertas circunstancias, aguas arriba de la punta del catéter, se debían a la inflamación local causada por la liberación de nitroxilo. Además, se postuló que la inflamación puede mitigarse significativamente en estos sitios usando donadores de nitroxilo de semividas más largas. Se obtuvo la confirmación a través de la evaluación de los donadores de nitroxilo a través de una histopatología detallada de la vasculatura en el sitio de inserción en la vena femoral (15 cm distal a la punta del catéter), a lo largo de la vía del catéter a la punta del catéter y pasada la punta aguas abajo 20 cm. Se determinaron hallazgos patológicos microscópicos de edema, hemorragia, inflamación vascular e inflamación perivascular en tasas de dosificación particulares de los donadores de nitroxilo.

La FIG. 5 describe un "mapa térmico" que muestra una puntuación de laboratorio compuesta para los hallazgos patológicos microscópicos en los que la gravedad de la inflamación vascular, hemorragia, trombo y degeneración/regeneración vascular se puntuó en secciones de la vasculatura tal como se describe anteriormente. Se puntuaron los hallazgos de (1) edema, (2) inflamación vascular y perivascular y (3) hemorragia (cada uno asignado con un valor seleccionado de: 0 = dentro de los límites normales; 1 = mínimo 2 = leve; 3 = moderado; 4 = grave) en secciones del vaso sanguíneo empezando 1 cm distal (aguas arriba) de la punta del catéter y progresando 20 cm próximo (aguas abajo) de la punta del catéter. Se calculó una puntuación de laboratorio compuesta a partir de la suma de estas puntuaciones de hallazgos. En la FIG. 5, la puntuación de laboratorio compuesta de histología acumulativa varía de 0-2 (baja gravedad) a 11-12 (alta gravedad). La gravedad de los cambios microscópicos y la distancia desde la punta del catéter en la que se detectaron se observó que dependía de la identidad del donador de nitroxilo y la tasa de dosificación en la que se administraba el donador de nitroxilo. Los valores NOAEL determinados basándose en estos marcadores patológicos microscópicos para una serie de donadores de nitroxilo, expresados en tasas de dosificación molar equivalentes (μ g/kg/min) con respecto a CXL-1020, se proporcionan en la Tabla 8.

Tabla 8. Niveles sin efectos adversos observables (NOAEL) de Donadores de Nitroxilo

Compuesto	NOAEL (mg/kg/min)
<i>N</i> -Hidroxi-2-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida (CXL-1020))	< 3
<i>N</i> -Hidroxi-5-metilfurano-2-sulfonamida (1)	≥ 180
<i>N</i> -Hidroxi-3-metanosulfonilbenceno-1-sulfonamida (2)	≥ 180
*Ejemplo de referencia	

Los hallazgos presentados en la Tabla 8 proporcionan evidencias adicionales de que los compuestos de fórmula (1) y (2) tienen un perfil toxicológico sustancialmente mejorado en relación con CXL-1020. Los efectos secundarios vasculares a cualquier dosificación disminuyeron en gravedad como una función de la distancia desde la punta del catéter y la gravedad de tales efectos secundarios vasculares disminuyó al disminuir la dosificación. Estos hallazgos confirmaron un gran margen de seguridad para los compuestos de fórmula (1) y (2) que se traducen en un índice sustancialmente terapéutico en seres humanos y sustancialmente para la administración intravenosa a dosis terapéuticamente eficaces y tasas de dosificación.

5.8 Estabilidad de soluciones de dosificación intravenosa

5.8.1 Ejemplo 10: Compuesto de fórmula (1) - Solución de dosificación almacenada a 25 °C

La estabilidad de las soluciones de dosificación del compuesto de fórmula (1) preparadas a partir de concentrado de CAPTISOL® diluido en diluyentes comercialmente disponibles IV se evaluó a 25 °C durante 48 horas, con puntos de análisis a 0, 8, 12, 16, 24 y 48 horas después de la dilución. Debido a los puntos de análisis requeridos, se ejecutaron dos estudios con conjuntos separados de soluciones de dosificación. El primer (grupo A) abarcaba todos los puntos de tiempo excepto el de 16 horas. El segundo (grupo B) implicaba análisis a 0 y 16 horas solo. Los concentrados usados para preparar los dos conjuntos de soluciones de dosificación se prepararon a partir de dos viales separados del mismo lote de producto de fármaco liofilizado (24 mg/ml de compuesto de fórmula (1)/30 % de CAPTISOL®).

Preparación del concentrado

Un vial de producto de fármaco liofilizado (24 mg/ml del compuesto de fórmula (1) / 30 % de CAPTISOL®, pH 4) se reconstituyó con 10 ml de agua para inyección (WFI) de agua de calidad para preparar cada concentrado (para la solución de dosificación de los grupos A y B). Los valores de pH de las soluciones resultantes se midieron y se determinó que era aproximadamente de 3,9 para ambos viales. No se realizó un ajuste del pH. Los concentrados se diluyeron y analizaron mediante HPLC (XBridge Phenyl Column (Waters); detector de absorbencia UV a 272 nm; fase móvil de un gradiente de etapa de acetonitrilo acuoso que contenía un 0,1 % (p/p) de ácido fórmico) y se determinó que ambos contenían 20-21 mg/ml del compuesto de fórmula (1) en lugar del valor nominal de 24 mg/ml, ostensibilidad debido a la contribución del API disuelto y CAPTISOL® con respecto al volumen de solución total.

Preparación del diluyente

Se seleccionaron acetato de potasio y fosfato de potasio disponibles en el mercado para la evaluación. El acetato de potasio se obtuvo comercialmente y se preparó una solución de fosfato de potasio USP de acuerdo con el inserto de producto Hospira para el producto comercial. Cada solución se diluyó a 10 mM en un 5 % de dextrosa (D5W) y un 2,5 % de dextrosa (D2,5W). D5W disponible en el mercado se diluyó 2 veces con WFI de agua de calidad para producir la solución de D2,5W. El pH de cada concentrado y solución diluida se midió; los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la medición de pH de diluyentes seleccionados

Diluyente	Concentración	pH
Acetato	10 mM en D2,5W	6,2
	10 mM en D5W	6,0
	Inicial (2 M)	6,7
Fosfato	10 mM en D2,5W	6,8
	10 mM en D5W	6,7
	Inicial (3 M)	6,5

Preparación de solución de dosificación

El concentrado de compuesto de fórmula (1) se diluyó volumétricamente sobre una escala de 5 ml en las soluciones de diluyente de 10 mM para conseguir concentraciones de 8, 1 y 0,1 mg/ml del compuesto de fórmula (1), tal como se

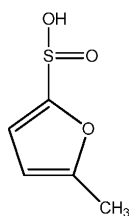
resume en la Tabla 10. Cada muestra se preparó por duplicado. El contenido de dextrosa en la solución de 10 % de CAPTISOL® se redujo para asegurar que las soluciones de dosificación eran sustancialmente isotónicas. Cada solución se almacenó a 25 °C.

5 **Tabla 10. Preparación de soluciones de dosificación para la evaluación de estabilidad**

Compuesto de fórmula (1) (mg/ml)	Diluyente	Factor de dilución	CAPTISOL® (% p/v)
8,0	10 mM de acetato o fosfato en D2,5W	3	10 %
1,0	10 mM de acetato o fosfato en D5W	24	1,3 %
0,1		240	0,1 %

Análisis de las muestras

10 Las muestras se analizaron tras su preparación después de 8, 12, 16, 24 y 48 horas de almacenamiento a 25 °C. Se anotó el aspecto visual de cada muestra, se midió el pH y cada muestra se analizó mediante HPLC para la concentración y la presencia del mayor degradante, el compuesto de fórmula (5), que se describe a continuación, formado después de la liberación del grupo HNO.



(5)

15

Resultados

20 Los resultados de la evaluación de estabilidad se presentan en la Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13. La presencia de un máximo que se corresponde con el degradante (compuesto de fórmula (5)) en una muestra se denota mediante una "X".

25 Los resultados fueron generalmente consistentes para cada duplicado dentro de un par y entre soluciones de dosificación correspondientes preparadas en los grupos A y B. Se observó una diferencia en la recuperación entre los duplicados en los puntos de tiempo de 24 horas y 48 horas para las muestras preparadas para contener 0,1 mg/ml del compuesto de fórmula (1) en fosfato.

30 Una recuperación completa (dentro de la precisión del método HPLC) y una ausencia de una cantidad detectable de un compuesto de fórmula (5) máximo se mantuvo durante 48 horas para las muestras preparadas para 8 mg/ml del compuesto de fórmula (1) en diluyentes a base de acetato -y fosfato. Estas muestras contenían realmente aproximadamente 7 mg/ml del compuesto de fórmula (1) consistente con la concentración de 20-21 mg/ml del compuesto de fórmula (1) en el concentrado. En ambos diluyentes, la estabilidad era superior en las muestras preparadas para 8 mg/ml del compuesto de fórmula (1) que en las muestras preparadas para concentraciones inferiores. Sin pretender quedar vinculado a teoría alguna, la mejor estabilidad de estas muestras en comparación con aquellas preparadas para concentraciones inferiores del compuesto de fórmula (1) puede atribuirse a la mayor
35 concentración de CAPTISOL® (10 % en las soluciones diluidas).

40 Todas las muestras permanecieron transparentes e incoloras durante las 48 horas de almacenamiento. El pH de todas las muestras disminuyó con el tiempo. El degradante conocido (compuesto de fórmula (5)) se observó en t0 (inmediatamente seguido de la preparación de la muestra) en todas las muestras preparadas para contener 0,1 mg/ml del compuesto de fórmula (1) y en todos los puntos de tiempo posteriores en todas las muestras preparadas para contener 0,1 mg/ml y 1 mg/ml del compuesto de fórmula (1).

45 En general, la estabilidad disminuyó al disminuir la concentración del compuesto de fórmula (1). Sin pretender quedar vinculado a teoría alguna, la estabilidad disminuida se debía probablemente al menor porcentaje de CAPTISOL® en las soluciones de dosificación. El punto inicial de degradación (a través de 16 horas) fue similar en las muestras preparadas para contener 0,1 mg/ml del compuesto de fórmula (1) en los diluyentes a base de acetato -y fosfato. Sin embargo, la estabilidad de las muestras preparadas para contener 1 mg/ml demostraron una estabilidad significativamente mejor en acetato que en fosfato.

Tabla 11. Resultados de la evaluación de estabilidad de la solución de dosificación a 25 °C, Porcentaje de recuperación

Solución de dosificación	Duplicado	Diluyente	Compuesto de fórmula (1) mg/ml	Compuesto de fórmula (1) mg/ml		Recuperación a partir de t0						
				t0 (grupo A)	t0 (grupo B)	8 h (A)	12 h (A)	16 h (B)	24 h (A)	48 h (A)		
1	a	10 mM de acetato en D2,5W	8,0	6,94	7,06	101%	102%	101%	102%	101%		
	b			6,95	7,06	101%	102%	101%	102%	101%		
2	a	10 mM de acetato en D5W	1,0	0,86	0,85	97%	97%	97%	94%	92%		
	b			0,87	0,84	98%	98%	98%	96%	95%		
3	a	10 mM de acetato en D5W	0,1	0,10	0,09	81%	78%	66%	67%	55%		
	b			0,10	0,09	80%	75%	68%	63%	51%		
4	a	10 mM de fosfato en D2,5W	8,0	6,98	6,79	98%	99%	102%	99%	100%		
	b			7,00	6,93	99%	94%	100%	100%	100%		
5	a	10 mM de fosfato en D5W	1,0	0,87	0,85	89%	86%	86%	78%	71%		
	b			0,88	0,85	90%	83%	82%	79%	72%		
6	a	10 mM de fosfato en D5W	0,1	0,10	0,10	83%	78%	72%	62%	41%		
	b			0,10	0,10	79%	72%	68%	50%	32%		

Tabla 12. Resultados de la evaluación de estabilidad de la solución de dosificación a 25 °C, pH

Solución de dosificación	Duplicado	Diluyente	Compuesto de fórmula (1) mg/ml	pH						
				t0 (grupo A)	t0 (grupo B)	8 h (A)	12 h (A)	16h (B)	24 h (A)	48 h (A)
1	a	10 mM de acetato en D2,5W	8,0	5,6	5,5	5,4	5,4	5,4	5,4	5,3
	b			5,6	5,5	5,5	5,4	5,4	5,3	5,3
2	a	10 mM de acetato en D5W	1,0	5,7	5,7	5,6	5,7	5,5	5,5	5,3
	b			5,9	5,7	5,7	5,8	5,5	5,5	5,4
3	a	10 mM de acetato en D5W	0,1	6,1	5,9	5,9	5,9	5,4	5,7	5,7
	b			5,8	5,9	5,9	5,9	5,3	5,7	5,5
4	a	10 mM de fosfato en D2,5W	8,0	6,3	6,1	5,9	5,9	5,6	5,5	5,0
	b			6,3	6,2	5,9	5,8	5,6	5,5	4,7
5	a	10 mM de fosfato en D5W	1,0	6,5	6,6	6,3	6,4	6,2	6,1	5,8
	b			6,6	6,5	6,3	6,4	6,1	6,3	6,0
6	a	10 mM de fosfato en D5W	0,1	6,8	6,7	6,6	6,6	6,3	6,5	6,4
	b			6,8	6,8	6,5	6,5	6,2	6,5	6,4

Tabla 13. Resultados de la evaluación de estabilidad de la solución de dosificación a 25 °C - Aparición de medición del compuesto de fórmula (5)

Solución de dosificación	Duplicado	Diluyente	Compuesto de fórmula (1) mg/ml	Compuesto de Fórmula (5)						
				t0 (grupo A)	t0 (grupo B)	8 h (A)	12 h (A)	16 h (B)	24 h (A)	48 h (A)
1	a	10 mM de acetato en D2,5W	8,0							
	b									
2	a	10 mM de acetato en D5W	1,0			X	X	X	X	X
	b					X	X	X	X	X
3	a	10 mM de acetato en D5W	0,1	X	X	X	X	X	X	X
	b			X	X	X	X	X	X	X
4	a	10 mM de fosfato en D2,5W	8,0							
	b									
5	a	10 mM de fosfato en D5W	1,0			X	X	X	X	X
	b					X	X	X	X	X
6	a	10 mM de fosfato en D5W	0,1	X	X	X	X	X	X	X
	b			X	X	X	X	X	X	X

5

5.8.2 Ejemplo 11: Compuesto de fórmula (1) - Solución de dosificación almacenada a 2 °C-8 °C Seguido por almacenamiento a 25 °C

La estabilidad de las soluciones de dosificación del compuesto de fórmula (1) preparadas a partir de concentrado de CAPTISOL® diluido en diluyentes comercialmente disponibles IV se preparó como se describe en el Ejemplo 10. Las soluciones se evaluaron a 2 °C-8 °C durante 24 horas seguido por un almacenamiento a 25 °C durante 48 horas. Como se muestra en la Tabla 14, las recuperaciones del compuesto de fórmula (1) fueron generalmente superiores que para las muestras correspondientes almacenadas a 25 °C para todas las soluciones de dosificación (véase Tabla 12 a partir del ejemplo previo), sugiriendo una estabilidad mejorada para las soluciones de dosificación preparadas y almacenadas a 2 °C-8 °C antes del almacenamiento a 25 °C.

10

15

Tabla 14. Resultados de la evaluación de estabilidad de la solución de dosificación a 2 °C-8 °C y 25 °C, Porcentaje de recuperación

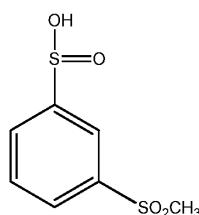
Muestra #	Diluyente	Compuesto de fórmula (1) mg/ml	Recuperación a partir de t0									
			Compuesto de fórmula (1) mg/ml									
			t0 (grupo A)	t0 (grupo B)	24 h (A)	24 h (B)	32 h (A)	36 h (A)	40 h (B)	48 h (A)	72 h (A)	
1	10 mM de acetato en D2.5W	8,0	2-8°C	2-8°C	2-8°C	2-8°C	8 h a 25°C	12 h a 25°C	16 h a 25°C	24 h a 25°C	48 h a 25°C	
2	10 mM de acetato en D5W	1,0	7,13	6,91	99%	103%	101%	99%	103%	97%	99%	
3	10 mM de acetato en D5W	0,1	0,89	0,89	99%	100%	98%	98%	93%	95%	92%	
4	10 mM de fosfato en D2.5W	8,0	0,10	0,10	97%	97%	92%	89%	67%	82%	73%	
5	10 mM de fosfato en D5W	1,0	7,18	7,08	100%	102%	99%	99%	100%	97%	97%	
6	10 mM de fosfato en D5W	0,1	0,89	0,88	99%	101%	95%	93%	90%	87%	81%	
			0,11	0,10	97%	97%	89%	86%	76%	76%	63%	

5.8.3 Ejemplo 12: Compuesto de fórmula (2) - Solución de dosificación almacenada a 25 °C (Ejemplo de Referencia)

Se evaluó una serie de soluciones de dosificación del compuesto de fórmula (2) para la administración IV. El concentrado seleccionado del compuesto de fórmula (2), preparado a 30 mg/ml en un vehículo de 30 % de CAPTISOL® a un pH 4,0, se evaluó a bajas, medias y altas concentraciones (0,1, 1 y 5 mg/ml, respectivamente) al diluirse en diversas soluciones de dosificación. Para la dilución del compuesto de fórmula (2) a 0,1 y 1 mg/ml, se evaluaron tres soluciones de dosificación: (1) D5W, (2) D5W con 5 mM de K-fosfato (pH = 6) y (3) d5W con 20 mM de K-fosfato (pH = 6). Para mantener la iso-osmolalidad para las diluciones del compuesto de fórmula (2) a 5 mg/ml, la concentración de dextrosa en las soluciones de dosificación se redujo a 2,5 % (p/v). Por lo tanto, las soluciones de dosificación evaluadas fueron: (1) D2.5W, (2) D2,5W con 5 mM de K-fosfato (pH = 6) y (3) D2,5W con 20 mM de K-fosfato (pH = 6).

Las soluciones de dosificación potencial se evaluaron para su aspecto visual, pH, osmolalidad y concentración y pureza por HPLC (XBridge Phenyl Column (Waters); detector de absorbancia UV a 272 nm; fase móvil un gradiente de etapa de acetonitrilo acuoso que contenía un 0,1 % (p/p) de ácido fórmico) después de aproximadamente 0, 16, 24 y 48 horas de almacenamiento a 25 °C. Todas las muestras eran transparentes, soluciones incoloras - con la única excepción de 5 mg/ml del compuesto de fórmula (2) en D2.5W con 5 mM de fosfato que tenía un aspecto transparente, amarillo claro después de 48 horas a 25 °C. Todas las soluciones fueron isoosmóticas (290 +/- 50 mOsm/kg) - con la única excepción de 1 mg/ml del compuesto de fórmula (2) en D5W con 20 mM de fosfato que tenía una osmolalidad de aproximadamente 350 mOsm/kg. Además, con la única excepción de 5 mg/ml del compuesto de fórmula (2) en D2,5W con 5 mM de fosfato, todas las otras soluciones de dosificación sostenían el compuesto de fórmula (2) en las concentraciones previstas de 0,1, 1 y 5 mg/ml durante 48 horas.

Además, el degradante conocido, el compuesto de fórmula (6) que se describe a continuación, formado después de la liberación del grupo de nitroxilo activo, se observó después de 16 horas a 25 °C en pequeñas cantidades mediante HPLC en las soluciones de dosificación que contenían un tampón de fosfato.



(6)

La cantidad observada del compuesto de fórmula (6) se encontraba en el orden del límite de detección del método.

La estabilidad de 5 mg/ml del compuesto de fórmula (2) de las soluciones de dosificación se evaluó adicionalmente como una función de pH y tampón. Una solución concentrada del compuesto de fórmula (2) preparado a 30 mg/ml en un vehículo del 30 % de CAPTISOL® a un pH 4,0, se diluyó a 5 mg/ml en cuatro soluciones de dosificación potenciales. Se evaluaron las cuatro soluciones de dosificación: (1) D2.5W, 5 mM de K-fosfato (pH = 6,0), (2) D2,5W con 5 mM de K-citrato (pH = 6,0), (3) D2,5W, 5 mM de K-citrato (pH = 5,0) y (4) D2,5W, 5 mM de K-acetato (pH = 5,0). Todas las soluciones de dosificación del compuesto de fórmula (2) eran isoosmóticas (290 +/- 50 mOsm/kg). Después de aproximadamente 24 y 48 horas de almacenamiento a 25 °C, las soluciones de dosificación se evaluaron por su aspecto visual, pH y concentración y pureza mediante HPLC. Las soluciones de dosificación sin fosfato eran transparentes, incoloras y sostenían en compuesto de fórmula (2) en la concentración prevista de 5 mg/ml durante 48 horas; mientras que consistente con el reconocimiento de la solución de dosificación, el compuesto de fórmula (2) de 5 mg/ml en D2,5W con 5 mL de fosfato (pH 6,0) de solución de dosificación era transparente, amarillo claro en aspecto con solo un 60 % de recuperación del compuesto de fórmula (2) después de 48 horas. Además, el degradante conocido, el compuesto de fórmula (6) se observó en pequeñas cantidades mediante HPLC en todas las muestras excepto en los 5 mg/ml del compuesto de fórmula (2) en D2,5W, 5 mM de citrato (pH 5,0).

Después de 7 días de almacenamiento a 25 °C las soluciones de dosificación sin fosfato aún eran transparentes e incoloras en aspecto. El aumento más pequeño en acidez durante los 7 días se midió para los 5 mg/ml del compuesto de fórmula (2) en D2,5W, 5 mM de citrato pH 6,0 de solución de dosificación, mientras que el D2,5W, 5 mM de citrato pH 5,0 de solución de dosificación tenía el cambio más pequeño en el pH durante las iniciales 24-48 h. Además, después de 14 días de almacenamiento a 25 °C las muestras con solución de dosificación que contenía 5 mM de citrato pH 6,0 aún eran soluciones transparentes, incoloras, mientras que las soluciones de dosificación que contenían o bien 5 mM de citrato o 5 mM de acetato a un pH 5,0 eran soluciones transparentes, amarillas. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

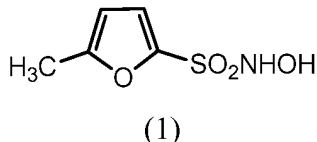
Tabla 15. Recuperación del compuesto de fórmula (2) a partir de soluciones de dosificación de 5 mg/mL

Solución de dosificación	Muestra	Punto de tiempo		
		0 h	24 h	48 h
(1). D2,5W, 5 mM de fosfato, pH 6,0,	1	101 %	100 %	60,7 %
	2	100 %	100 %	62,8 %
(2). D2,5W, 5 mM de citrato, pH 6,0,	1	101 %	98,6 %	96,7 %
	2	101 %	98,8 %	96,5 %
(3). D2,5W, 5 mM de citrato, pH 5,0,	1	101 %	100 %	99,1 %
	2	100 %	102 %	99,3 %
(4). D2,5W, 5 mM de acetato, pH 5,0	1	95,6 %	95,4 %	95,4 %
	2	96,0 %	96,8 %	94,8 %

Será evidente para los expertos en la materia que las realizaciones específicas de la materia objeto desvelada pueden estar dirigidas a una o más de las realizaciones anterior y posteriormente indicadas en cualquier combinación.

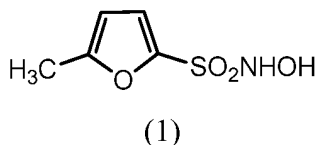
REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en un método para modular los niveles de nitroxilo *in vivo*, en donde la composición farmacéutica comprende un compuesto de fórmula (1):



y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar una enfermedad o una afección, que responden a terapia de nitroxilo, en donde la composición farmacéutica comprende un compuesto de fórmula (1):



15 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la enfermedad o la afección es hipertensión pulmonar.

4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente.

5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición farmacéutica tiene un pH de 4 a 6.

6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición farmacéutica tiene un pH de 4 a 5.

7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 4.

8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente en una cantidad que varía de 1 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto a 100 µg de compuesto de fórmula (1)/minuto.

9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente en una cantidad que varía de 10 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto a 50 µg de compuesto de fórmula (1)/minuto.

10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente en una cantidad de no más de 30 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto.

11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición farmacéutica ha de administrarse intravenosamente en una cantidad de:

- 45
- (a) al menos 2,5 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto;
 - (b) al menos 5 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto;
 - (c) al menos 7,5 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto;
 - (d) al menos 12 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto;
 - 50 (e) al menos 15 µg de compuesto de fórmula (1)/kg/minuto.

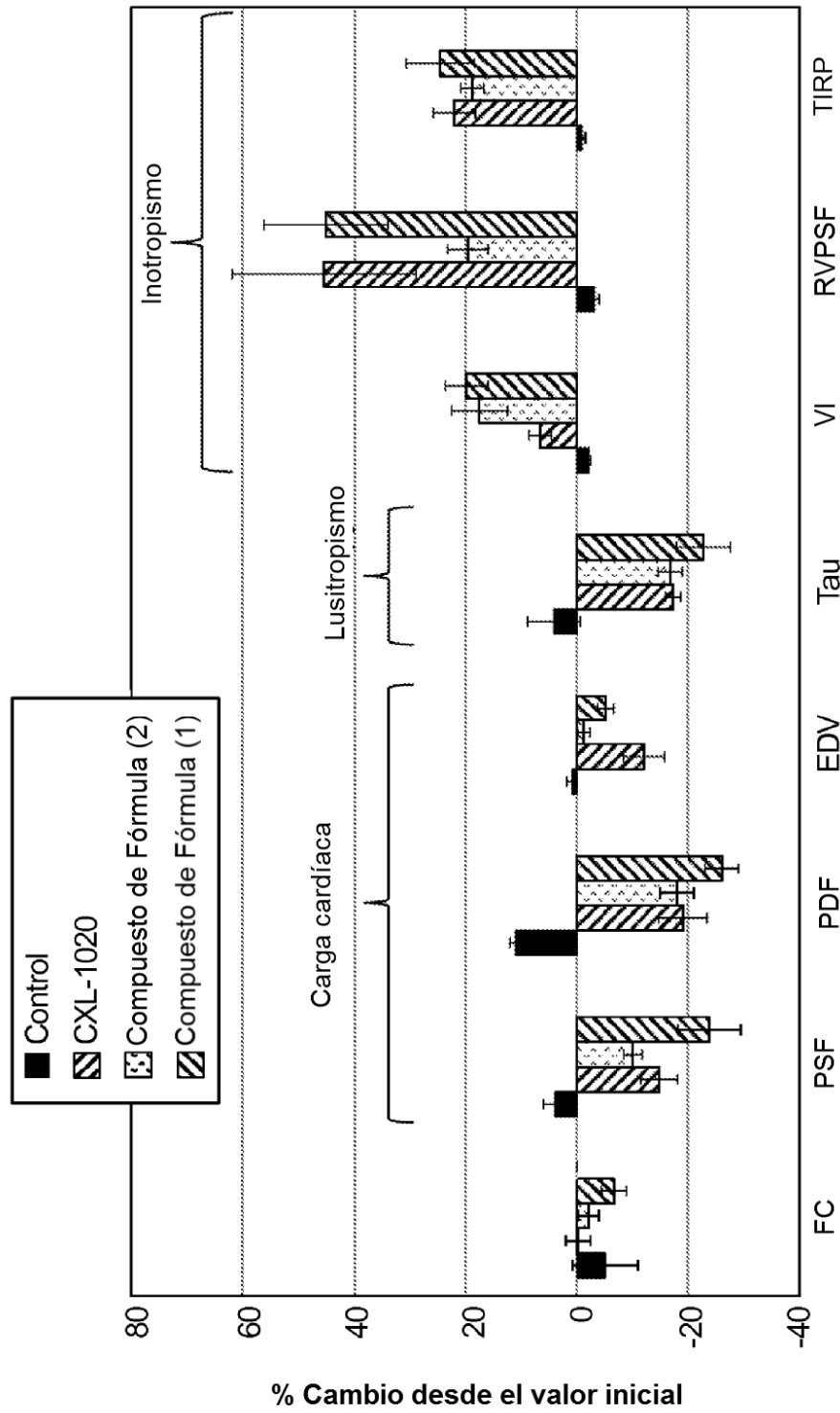
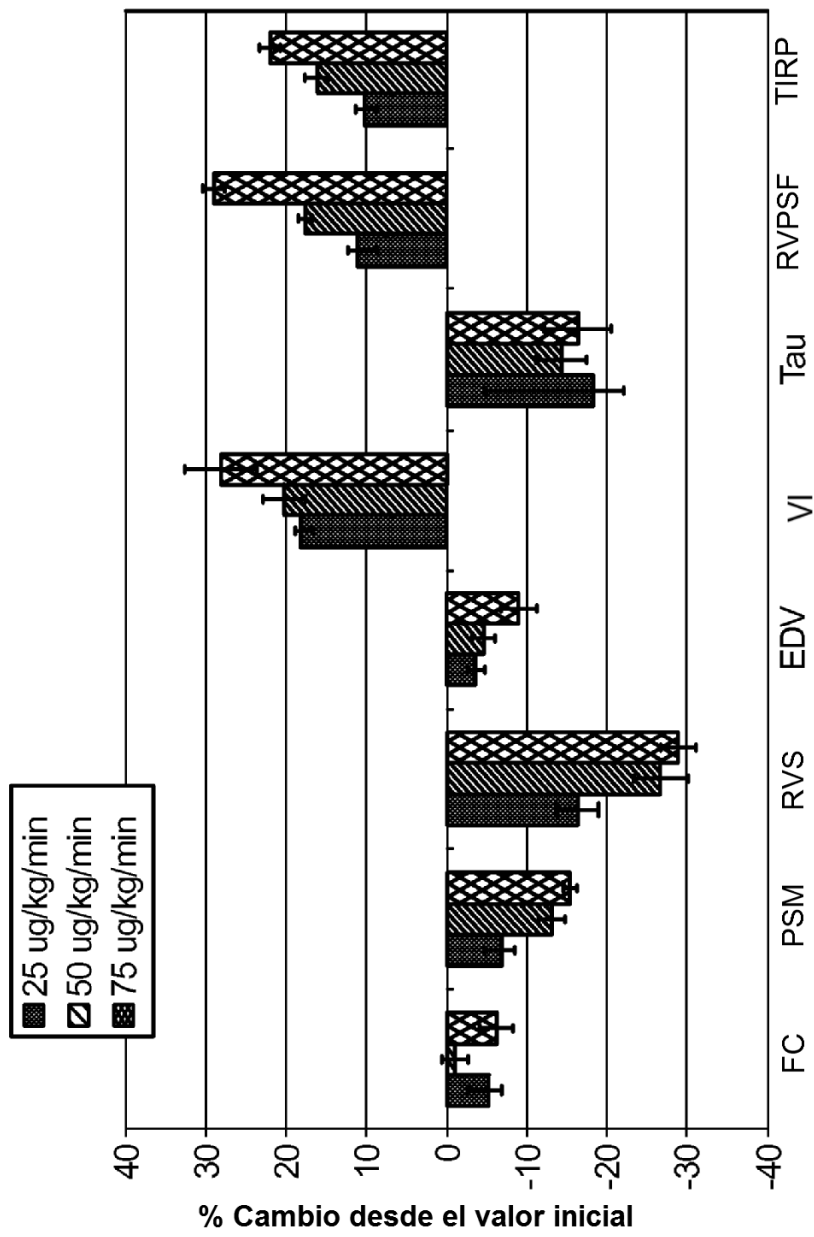


FIG. 1



Compuesto de Fórmula (1)

FIG. 2

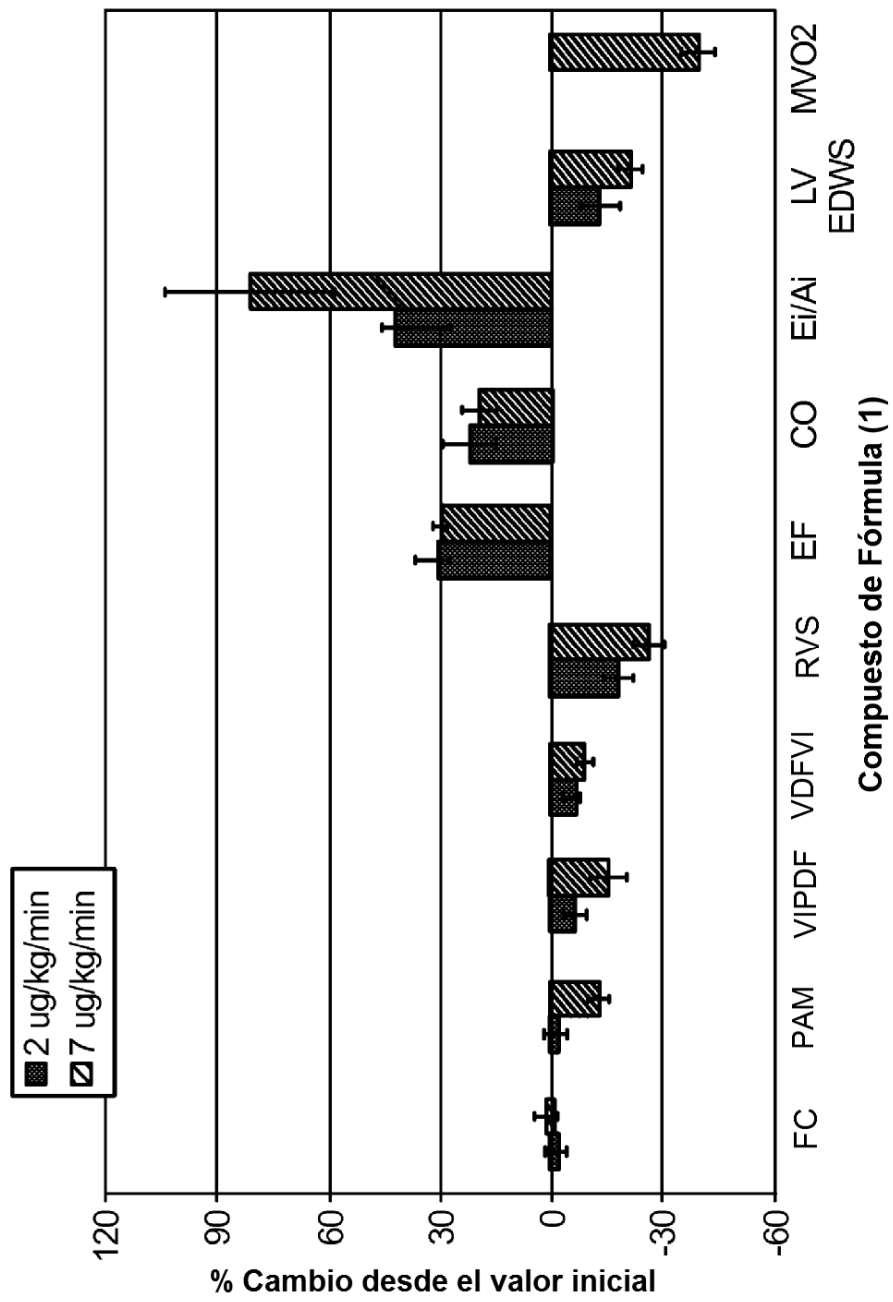


FIG. 3

		Analito (24 h)				Intervalo		Puntuación	
Dosis (µg/kg/min)	Compuesto	CXL-1020	CXL-1020	Compuesto de Fórmula (2)	Compuesto de Fórmula (2)	Compuesto de Fórmula (1)	WBC	<13	0
	pH de infusión	4	6	4	6	6		13-19	1
	0,03		N/E	N/E	N/E	N/E	Fibrinógeno	<300	0
	0,1		N/E	N/E	N/E	N/E		300-400	1
	0,3		N/E	N/E	N/E	N/E		>400	2
	1		N/E	N/E	N/E	N/E	CRP	0-70	0
	3							70-300	1
	10		N/E					>300	2
	30		N/E						

FIG. 4

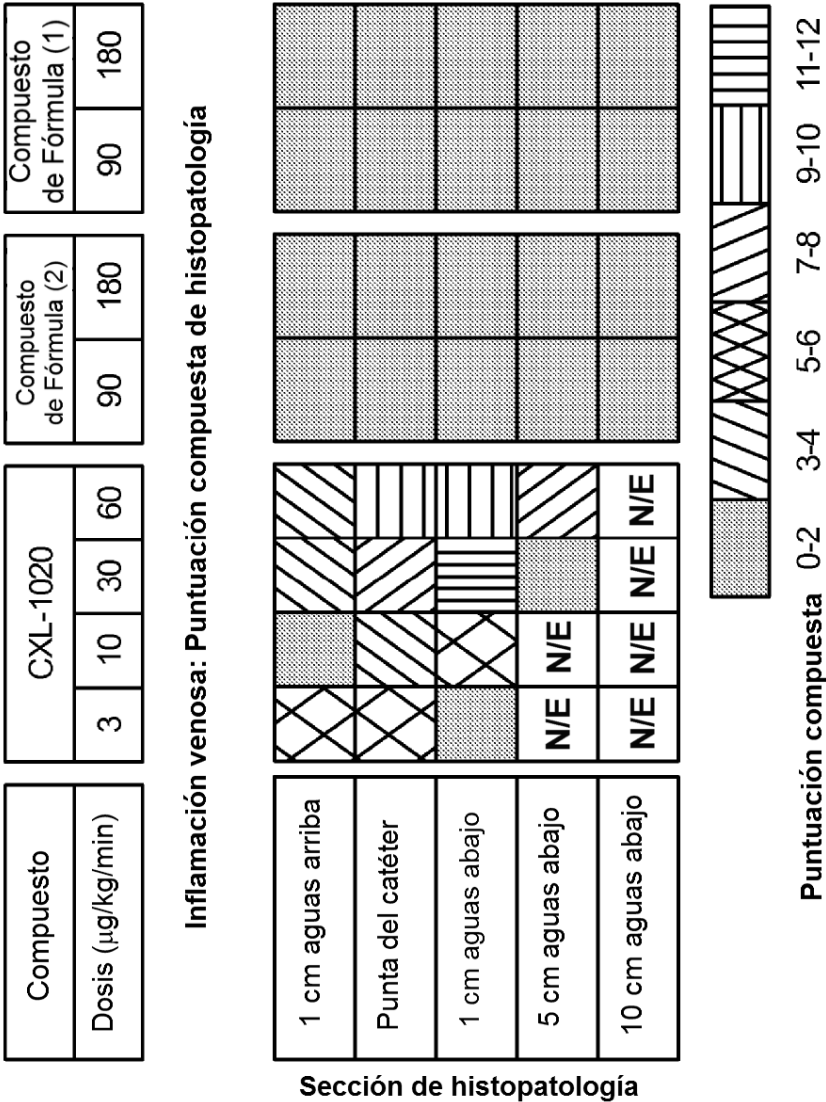


FIG. 5