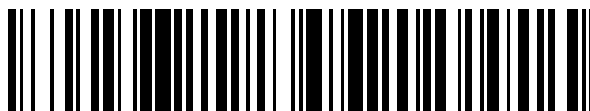


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 832**

51 Int. Cl.:

**C07D 215/26** (2006.01)  
**C07D 401/06** (2006.01)  
**C07D 401/12** (2006.01)  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 413/12** (2006.01)  
**A61K 31/4709** (2006.01)  
**A61K 31/47** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2011 PCT/HU2011/000043**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11148208**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2011 E 11752335 (7)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2566849**

54 Título: **Derivados de la 8-hidroxiquinolina**

30 Prioridad:

**06.05.2010 HU P1000243**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.05.2020**

73 Titular/es:

**"AVIDIN" KUTATÓ, FEJLESZTŐ ÉS  
KERESKEDELMI KORLÁTOLT FELELŐSSÉGÜ  
TÁRSASÁG (50.0%)  
Alsó kikötő sor 11  
6726 Szeged, HU y  
SONEAS KUTATÓ KORLÁTOLT FELELŐSSÉGÜ  
TÁRSASÁG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PUSKÁS, LÁSZLÓ;  
SZABÓ, CSABA;  
KANIZSAI, IVÁN;  
GYURIS, MÁRIÓ;  
MADÁCSI, RAMÓNA;  
ÓZSVÁRI, BÉLA;  
FEHÉR, LILIÁNA y  
TAMÁS, GÁBOR**

74 Agente/Representante:

**LÓPEZ CAMBA, María Emilia**

ES 2 761 832 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de la 8-hidroxiquinolina

5 Nuestra invención se refiere al uso de derivados de la 8-hidroxiquinolina novedosos según la invención en el tratamiento y la prevención de diferentes enfermedades, principalmente aquellas enfermedades que están asociadas al estrés neurológico y/u oxidativo.

10 Nuestra invención describe agentes citoprotectores y formadores de quelatos metálicos y su uso médico. Asimismo, el objeto de nuestra invención son los compuestos para uso en el tratamiento de isquemia, lesión por reperfusión, trastornos cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos (que incluyen la enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington) y traumatismos. Asimismo, el objeto de nuestra invención son los compuestos para uso en el tratamiento de la depresión y otros trastornos neuropsiquiátricos, que incluyen los trastornos por ansiedad. Otro objeto de nuestra invención es el tratamiento de lesiones del hígado, riñón o pulmón. Los compuestos según la invención se  
15 pueden usar como agentes neuroprotectores y cardioprotectores, y para el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos.

Las diversas etiologías de las lesiones celulares y muertes celulares son las características principales de muchos trastornos cardiovasculares, neurológicos e inflamatorios. Las lesiones celulares se pueden producir como resultado de la hipoxia o isquemia celular, formación de diversas clases de oxidantes o radicales libres y/o sobreproducción de diversos mediadores bioquímicos (citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos). Estos procesos con frecuencia son independientes; así que se producen como partes de ciclos de autoamplificación intracelular ("suicidas") y constituyen la base determinante de muchas enfermedades humanas. Aunque la muerte celular habitualmente se califica como apoptosis o necrosis, estas dos formas solo representan los dos extremos del espectro de formas de las lesiones  
20 celulares. Los mecanismos intracelulares que participan en los procesos de muerte celular anteriores son complejos, pero con frecuencia activan la familia de efectores de muerte celular denominada caspasas y la disfunción mitocondrial, despolarización mitocondrial, generación de especies reactivas del oxígeno y liberación de componentes mitocondriales al citosol (bibliografía completa: Szabó, 2005; Duprez y col., 2009; Degterev es Yuan, 2008; Wang y col., 2009). La ruta de la muerte celular incluye la activación de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Esta última enzima se expresa en los núcleos (bibliografía completa: Jagtap y Szabó, 2005).

Los compuestos que previenen la lesión celular y muerte celular normalmente se denominan compuestos "citoprotectores". La citoprotección se puede conseguir mediante muchos métodos farmacológicos y bioquímicos. Los ejemplos siguientes de los mismos se mencionan aquí: depredadores de oxidantes y radicales libres, inhibidores de  
35 ciertas "rutas de efectores de muerte", estabilización de membranas celulares, etc. En el curso de la isquemia o varios procesos de enfermedad relacionados, se liberan desde los tejidos cationes de hierro y cobre que catalizan la formación de radicales exentos de hidroxilo en la ruta de Haber-Weiss de una forma conocida que provoca lesiones celulares. La inactivación o formación de quelatos de estos cationes metálicos puede dar como resultado un efecto citoprotector. Por tanto, se realizaron experimentos para mitigar la eficacia catalítica de los cationes de hierro y cobre de tal forma que se administraron sideróforos formadores de quelatos de hierro (p. ej., deferoxamina) (Lewen col.,  
40 2000; Britton y col., 2002).

Se sabe que se libera glutamato junto con cationes de zinc desde los sinaptosomas de las células del sistema nervioso que usan el glutamato como mensajero químico. Normalmente, el zinc liberado en las sinapsis nerviosas se vuelve a  
45 fabricar rápidamente en los sinaptosomas. Como resultado de la isquemia, los ataques persistentes y la lesión cerebral, el zinc liberado desde los sinaptosomas se acumula en el líquido extracelular que circunda las neuronas. Cuando entra una cantidad excesiva de zinc al cuerpo de la célula, el zinc puede desencadenar la muerte celular mediante apoptosis y necrosis. La formación de quelatos de zinc a través de ese mecanismo puede dar como resultado la neuroprotección e influir en la evolución de diversas enfermedades neuropsiquiátricas. (Regland y col., 2001; Koh  
50 y col., 1996).

Por lo tanto, los agentes quelantes de zinc también pueden ser útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer uniendo el zinc que se produce en las placas, debilitando así la estructura de las placas (Frederickson y col., 2005; Schafer y col., 2007). Los agentes quelantes de zinc también pueden ser útiles en el tratamiento de la enfermedad de  
55 Huntington (Nguyen y col., 2005).

Según otra forma de citoprotección, se inducen las rutas intracelulares que median efectos protectores. Un prototipo de esta estrategia es el denominado "preacondicionamiento isquémico" donde las células u órganos se someten a isquemia durante un tiempo corto con el fin de inducir la sobrerregulación de los genes citoprotectores (p. ej., genes de enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico y otros). La expresión de la enzima hemo oxigenasa (HO-1) ha demostrado citoprotección en varios sistemas experimentales (p. ej., Li y col., 2007; Idris y col., 2008).

Las solicitudes de patente anteriores relativas a la estrategia citoprotectora se refieren a lo siguiente: inhibidores de diversas rutas o efectores apoptóticos (p. ej., US 6,949,516; US 6,737,511; US 6,544,972; US 6,521,617; US  
65 6,495,522; US 7,604,989; US 7,601,846; US 7,533,852); mantenimiento de la función mitocondrial durante la lesión celular (p. ej., US 6,552,076; US 6,511,966; US 7,550,439; US 7,528,174); inhibición directa de la actividad catalítica

de la enzima PARP (p. ej., US 6,476,048; US 6,531,464; US 7,601,719; US 7,595,406; US 7,550,603; US 7,449,464; US 7,217,709; US 6,956,053; US 6,534,651); sobreexpresión de genes citoprotectores (que incluyen hemo oxigenasa) (p. ej., US 7,524,819; US 7,364,757).

5 El documento WO 2008/014602 A1 describe compuestos de quinolina que son útiles para el tratamiento de trastornos provocados por el estrés oxidativo y de trastornos neurodegenerativos que incluyen la lesión por isquemia/reperfusión y la enfermedad de Alzheimer.

10 Los compuestos usados para la inhibición del estrés del retículo endoplasmático se han descrito en la solicitud de patente americana con n.º de publicación 2008/293699.

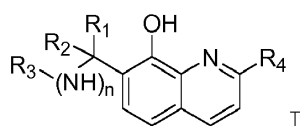
15 Recientemente, se han realizado ensayos de cribado basados en células para la identificación sistemática de compuestos citoprotectores. En este ensayo, se simuló una cierta forma de lesión celular y se cribó una biblioteca química con el fin de identificar compuestos que previenen o retardan la lesión celular. (p. ej., Gero y col., 2007). Los ensayos de cribado no identifican el mecanismo del efecto, sin embargo, este se puede identificar por medio de ensayos secundarios.

20 Por medio del método de cribado basado en células, hemos encontrado e identificado derivados de la hidroxiquinolina novedosos. Estos compuestos protegen las células de lesiones inducidas por el estrés oxidativo, por lo tanto, estos se pueden usar potencialmente en el tratamiento de muchas enfermedades. Los compuestos según la invención ejercen diversos efectos celulares, p. ej., quelación de hierro, inhibición de la activación de la PARP, inhibición de la disfunción mitocondrial, activación de la hemo oxigenasa y formación de quelatos con iones de hierro. En el curso de la implementación de nuestra invención, los quelantes se añaden en forma libre de cationes de hierro, zinc y cobre, por lo tanto, estos compuestos forman complejos con los cationes anteriores cuando están en contacto con el sistema fisiológico.

Las composiciones farmacéuticas según nuestra invención contienen quelantes como agente activo, que no están en un enlace complejo con cationes de hierro, cobre o zinc.

30 El objeto adicional de nuestra invención es un procedimiento neuroprotector y/o cardioprotector para pacientes que padecen afecciones asociadas con la muerte celular. La neuroprotección y/o cardioprotección se consigue según nuestra invención de tal forma que un compuesto según nuestra invención, capaz de proteger las células de ataques citotóxicos, se administra al paciente con necesidad de tratamiento.

35 El objeto de nuestra invención, por una parte, son los compuestos con la fórmula general (I) y sus sales terapéuticamente aceptables,



40 en cuya fórmula R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y n se definen como en la reivindicación 1, para uso en la profilaxis o el tratamiento de isquemia, lesión por reperfusión, trastornos cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos (que incluyen especialmente la enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington), traumatismos, enfermedades neuropsiquiátricas (que incluyen especialmente la depresión y los trastornos por ansiedad) y lesiones del hígado, riñón y pulmón.

45 En esta invención se describe, pero no es parte de la invención, el grupo de los compuestos con la fórmula general (I) en la que

- 50 R<sub>1</sub> representa un grupo sustituido con un grupo aceptor de electrones en posición para, o un grupo sustituido con un grupo aceptor de electrones en posición meta, o el grupo anterior sustituido con un grupo donador de electrones en posición orto, meta o para; o R<sub>1</sub> representa un grupo doblemente sustituido con grupos aceptores de electrones en las posiciones meta y para; o R<sub>1</sub> representa un grupo doblemente sustituido con grupos aceptores de electrones en posición orto y para; o R<sub>1</sub> representa un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido;
- 55 R<sub>3</sub> representa un grupo aromático sustituido con un grupo aceptor de electrones en posición para; o R<sub>3</sub> representa un grupo heteroaromático o alicíclico no sustituido o sustituido con un grupo alquilo y/o grupos aceptores de electrones en posición orto, meta o para;
- R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> representan un átomo de hidrógeno; y
- 60 N es 1. En esta invención se describe, pero no es parte de la invención, el grupo de los compuestos con la fórmula general (I) en la que

R<sub>1</sub> representa un grupo fenilo opcionalmente única o doblemente sustituido con un grupo nitro, grupo

trifluorometilo, grupo hidroxilo, átomo de flúor o grupo isopropoxi, o grupo piridilo;  
 R<sub>2</sub> representa un átomo de hidrógeno;  
 R<sub>3</sub> representa un grupo fenilo opcionalmente única o doblemente sustituido con un grupo trifluorometilo o grupo metoxicarbonilo o un grupo piridilo opcionalmente única o doblemente sustituido con un grupo metilo, átomo de flúor, grupo nitro o un pirimidilo, pirrolidinilo, grupo oxazolidinilo o grupo pirazolilo;  
 R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno; y  
 n es 1.

Los compuestos derivados de la 8-hidroxiquinolina mencionados como compuestos del título de los ejemplos son especialmente preferidos.

### Breve descripción de las figuras

Las Fig. 1a, 1b y 1c ilustran el efector reductor de la lesión por reperusión del compuesto según el Ejemplo 1 después del trasplante de corazón;  
 la Fig. 2 ilustra el efecto de varios compuestos según la invención sobre la muerte celular provocada por peróxido de hidrógeno *in vitro* sobre células del hígado;  
 la Fig. 3 ilustra el efecto de varios compuestos según la invención sobre la muerte celular provocada por peróxido de hidrógeno *in vitro* sobre neuronas y astrocitos combinados;  
 la Fig. 4 ilustra el efecto del compuesto según la invención según el Ejemplo 1 en ensayos de laberinto elevado en cruz; y  
 la Fig. 5 ilustra el efecto del compuesto según el Ejemplo 1 en ensayos de natación forzada.

Los términos usados en la descripción se deben interpretar como se indica a continuación:

Un "grupo alquilo inferior" significa un grupo alquilo ramificado o no ramificado con 1-4 átomos de carbono (p. ej., grupo metilo, etilo, isopropilo, etc.).

El término "grupo alqueno inferior" significa un grupo alqueno ramificado o no ramificado con 2-4 átomos de carbono (p. ej., grupo alquilo o propenilo).

El término "grupo cicloalquilo" significa grupos cíclicos que contienen 3-8 átomos de carbono (p. ej., grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, etc.).

El término "grupo arilo" significa grupos hidrocarbonados aromáticos monocíclicos o bicíclicos (p. ej., grupo fenilo, naftilo, etc.).

El término "grupo aralquilo" significa grupos alquilo única o doblemente sustituidos con los grupos arilo anteriores que cumplen la definición anterior (p. ej., grupo bencilo, beta-feniletilo, etc.).

El término "grupo heterocíclico" significa grupos aromáticos con 3 a 7, preferentemente 5 o 6, miembros que contienen uno o más átomos de oxígeno, nitrógeno y/o azufre (p. ej., grupo piridilo, pirimidilo, pirrolilo, oxazolilo, etc.).

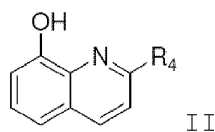
El término "átomo de halógeno" significa átomo de bromo, flúor, cloro o yodo; los átomos de flúor y cloro son preferidos. Los sustituyentes del "grupo aceptor de electrones" son preferentemente átomos de halógeno, grupos trifluorometilo o nitro.

De los sustituyentes del "donador de electrones", se mencionan los grupos alquilo inferior (p. ej., grupo metilo).

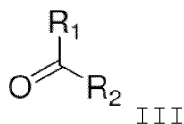
El "grupo funcional ácido" puede ser cualquier grupo éster (grupo alcoxicarbonilo inferior, preferentemente grupo metoxicarbonilo) o nitrilo o grupo amida ácida.

Los compuestos que tienen la fórmula general (I) forman sales con bases sobre los grupos hidroxilo o con ácidos sobre el átomo de nitrógeno. Para la formación de sales, se pueden usar bases farmacéuticamente aceptables (p. ej., hidróxidos de metales alcalinos como, p. ej., hidróxido de sodio o potasio) o ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables (p. ej., ácido clorhídrico, bromuro de hidrógeno, ácido acético, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, etc.).

El procedimiento para la preparación de compuestos con la fórmula general (I) y de sus sales farmacéuticamente aceptables está caracterizado por que un derivado de la 8-hidroxiquinolina con la fórmula general (II)



se hace reaccionar con un oxocompuesto con la fórmula general (III)

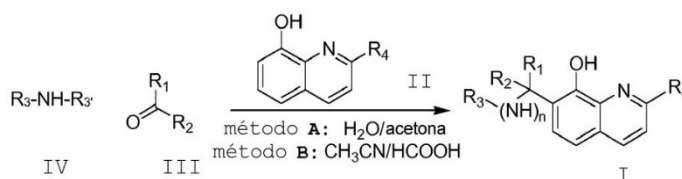


5

y una amina con la fórmula general (IV)



10



15

(en cuyas fórmulas los sustituyentes son como se definieron anteriormente y  $R_3'$  se puede seleccionar independientemente entre los significados posibles de  $R_3$ , y  $R_3'$  puede ser también un átomo de hidrógeno; y  $R_3$  y  $R_3'$  pueden estar conectados entre sí formando una amina secundaria cíclica) y a continuación el compuesto con la fórmula (I) obtenido se transforma opcionalmente en su sal farmacéuticamente aceptable o se libera de su sal.

20

La reacción se lleva a cabo usando la reacción de Betti modificada, que es un método conocido (Betti, 1900; Betti, 1903; Phillips y col., 1954; Phillips y col., 1956; Phillips, 1956).

La reacción se lleva a cabo en un disolvente. Se puede usar agua o disolventes orgánicos (p. ej., acetonitrilo) como medio de reacción. Opcionalmente, la reacción se realiza en presencia de un catalizador ácido (p. ej., ácido fórmico).

25

Para la preparación de los compuestos según la invención, en función de los materiales de partida, se usaron el método A o B siguientes:

#### Método A:

30

Suspender o disolver 1 mmol de aldehído en 2x el volumen de agua y añadir 1,1 equivalentes de amina primaria a la mezcla de reacción. Mantener a 60 °C durante 1 hora y añadir gota a gota, a la mezcla caliente, una solución de 0,6 equivalentes de 8-hidroxiquinolina disuelta en un volumen de acetonitrilo o acetona que es el doble del volumen de agua. Posteriormente, enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y agitar hasta que se produzca precipitación o desaparezca la mancha de quinolina de partida. Procesar la mezcla mediante filtrado, lavado con acetonitrilo, realizar la cromatografía con una mezcla de hexano (mezcla de isómeros)/acetato de etilo y recristalizar de alcohol o acetonitrilo.

35

#### Método B:

40

Disolver 1 mmol de aldehído en 3x el volumen de acetonitrilo y añadir 1 equivalente de amina, 0,6 equivalentes de 8-hidroxiquinolina y 1 % (v/v) de ácido fórmico a la mezcla de reacción. Agitar la mezcla hasta que se produzca precipitación o desaparezca la mancha de quinolina de partida. Procesar la mezcla mediante filtrado, lavado con acetonitrilo, realizar la cromatografía con una mezcla de hexano (mezcla de isómeros)/acetato de etilo y recristalizar de alcohol o acetonitrilo.

45

Una vez finalizada la reacción, aislar el producto deseado de la mezcla de reacción usando los métodos habituales (p. ej., filtración o centrifugación) y purificar mediante métodos conocidos (recristalización o cromatografía) si procede.

También se describe en esta invención una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la fórmula general (I) o su sal farmacéuticamente aceptable como agente activo y un vehículo y/o excipiente farmacéutico sólido o líquido inerte.

50

Las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención pueden ser preparaciones sólidas (p. ej., comprimido, cápsula), semisólidas (p. ej., supositorio) o líquidas (p. ej., solución inyectable). Las preparaciones se pueden administrar oral, rectal o parenteralmente. Las composiciones descritas en esta invención pueden contener vehículos

y/o excipientes terapéuticamente adecuados habituales (p. ej., almidón, celulosa o derivados de la celulosa, lactosa, manitol, cloruro de sodio, carbonato de sodio, sacarosa, maltosa, carbonato de calcio, etc.).

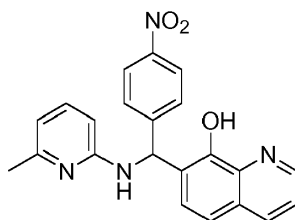
5 Las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención se pueden usar para el tratamiento de enfermedades neurológicas y/o relacionadas con el estrés oxidativo durante el que una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto con la fórmula general (I) o su sal farmacéuticamente aceptable se administra a un paciente con necesidad de tratamiento. Las enfermedades neurológicas o relacionadas con el estrés oxidativo se seleccionan entre las enfermedades siguientes: isquemia, lesión por reperfusión, trastornos cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos (que incluyen especialmente enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington),  
10 traumatismos, enfermedades neuropsiquiátricas (que incluyen especialmente depresión y trastornos por ansiedad) y lesiones del hígado, riñón y pulmón.

Según lo anterior, las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención se pueden usar como agentes neuroprotectores y cardioprotectores, en el caso de lesiones del hígado, riñón y pulmón, y para el tratamiento o la prevención de la depresión, trastornos por ansiedad, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington.

Los detalles adicionales de nuestra invención se describen en los ejemplos que se presentan a continuación sin que se limite el alcance de la protección a los ejemplos.

## 20 EJEMPLOS QUÍMICOS

### Ejemplo 1: 7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(4-nitrofenil)metil)quinolin-8-ol

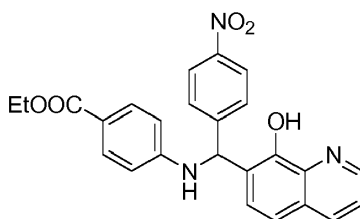


25 **Método A:**  
A 10,1 g (18,5 mmol, Sigma) de 4-nitrobenzaldehído, se añadió gota a gota agua (20 ml), a continuación se añadió 2-amino-6-picolina (7,95 g, 1,1 equivalentes, Aldrich) a la suspensión amarillo limón con agitación intensiva. Después de un cambio de color (de amarillo limón a amarillo naranja), se añadió una solución de 5,82 g de 8-hidroxiquinolina (0,6 equivalentes, Sigma) con 20 mL de acetona (Molar) a la suspensión, el recipiente de reacción se calentó a 60 °C durante 4 horas y a continuación la solución se enfrió a temperatura ambiente. El polvo amarillo precipitado se filtró (7,87 g, 50,8 %), se lavó con una cantidad pequeña de acetona; su pureza se comprobó mediante CLAR ( $\geq 99,5$  %).

35 **Método B:**  
Se disolvió 4-nitrobenzaldehído (2,8 g, 18,5 mmol, Sigma) en acetonitrilo absoluto (15 ml, Molar) y se añadió 2-amino-6-picolina (2 g, 1 equivalente, Aldrich) a la solución amarillo limón con agitación. Se añadieron 1,61 g de 8-hidroxiquinolina (0,6 equivalentes, Sigma) a la mezcla y se agitó a temperatura ambiente durante cuatro días. El producto precipitado (4,2 g, 27,1 %) se filtró, el peso molecular del producto se verificó mediante espectroscopía de masas, su estructura se demostró mediante RMN (PM: 386,1), y la pureza se comprobó mediante CLAR ( $\geq 99,6$  %).

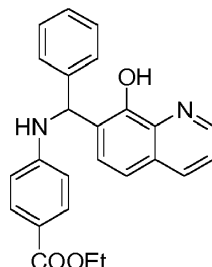
45  $C_{22}H_{18}N_4O_3$  (PM: 386,1); p.f.: 157-160 °C; CLAR (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 70:30 Phenomenex C18 282 nm):  $T_r = 7,14$  min RMN <sup>1</sup>H **1** (DMSO)  $\delta$  2,2 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 6,37 (1H, d, J = 7,0 Hz), 6,49 (1H, d, J = 7,9 Hz), 6,98 (1H, d, J = 8,8 Hz, NHCH), 7,28 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,40 (2H, t, J = 7,9 y 8,8 Hz), 7,50-7,55 (1H, m), 7,59-7,66 (3H, m), 8,16 (2H, d, J = 8,8 Hz), 8,28 (1H, d, J = 7,9 Hz), 10,1 (1H, s amplio, OH) RMN <sup>13</sup>C **1** (DMSO)  $\delta$  24,2 (CH<sub>3</sub>), 51,5 (CH), 105,6 (CH), 111,6 (CH), 117,7 (CH), 121,9 (CH), 123,5 (2xCH), 124,5 (Cq), 126,7 (CH), 127,7 (Cq), 128,2 (2xCH), 136,1 (CH), 137,3 (CH), 138,2 (Cq), 146,2 (Cq), 148,4 (CH), 149,8 (Cq), 152,0, 155,7 y 157,3 (Cq).

### 50 Ejemplo 2 (no según la invención): 4-((8-hidroxiquinolin-7-il)(4-nitrofenil)metilamino)benzoato de etilo



El compuesto del título se preparó mediante el método A y el método B presentados para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se usaron benzocaína (Sigma), 4-nitrobenzaldehído (sigma) y 8-hidroxiquinolina como materiales de partida. Producto purificado mediante cromatografía en columna: C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>; (PM: 443,2); rendimiento: 50 mg (30,9 %, Método A). CLAR (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 70:30 Phenomenex C-18 254 nm): T<sub>r</sub> = 8,82 min.

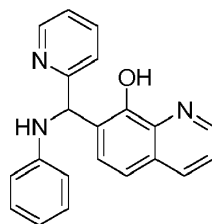
**Ejemplo 3 (no según la invención): Éster etílico del ácido 4-[(8-hidroxiquinolin-7-il)fenilmetil]amino}benzoico**



10 C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; (PM: 398,1)

Se preparó mediante el método A del Ejemplo 1.

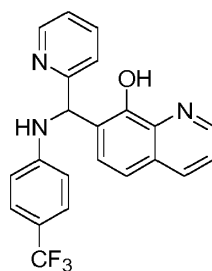
15 **Ejemplo 4: 7-(fenilaminopiridin-2-il-metil)quinolin-8-ol**



20 C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O; (PM: 327,1)

Se preparó mediante el método A del Ejemplo 1.

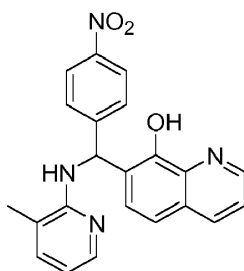
**Ejemplo 5: 7-[piridin-2-il-(4-trifluorometilfenilamino)metil]quinolin-8-ol**



25 El compuesto del título según el Ejemplo 5 se preparó mediante el método A y el método B presentados para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se usó piridina-2-carboxialdehído (Molar) como aldehído de partida y se usó 4-trifluorometilanilina (Sigma) como amina primaria. Producto purificado mediante cromatografía en columna: C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O (PM: 395,1); rendimiento: 151 mg, (42,1 %, método B); p.f.: 158-161 °C; CLAR (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 70:30 Phenomenex C18 254 nm): T<sub>r</sub> = 10,39 min.

30 RMN <sup>1</sup>H 5 (DMSO) δ 6,31 (1H, d, J = 7,1 Hz), 6,79 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,27 (1H, t, J = 5,1 Hz), 7,29-7,37 (4H, m), 7,47-7,54 (3H, m), 7,75 (1H, t, J = 7,2 Hz), 7,74 (1H, d, J = 8,5 Hz), 8,24 (1H, d, J = 8,3 Hz), 8,55 (1H, d, J = 4,1 Hz), 8,85 (1H, d, J = 3,2 Hz), 10,24 (1H, s amplio).

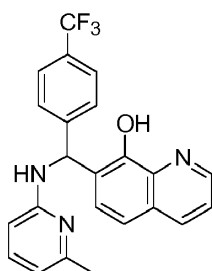
**Ejemplo 6: 7-[(3-metilpiridin-2-ilamino)-(4-nitrofenil)metil]quinolin-8-ol**



$C_{22}H_{18}N_4O_3$ ; (PM+1: 386, 1)

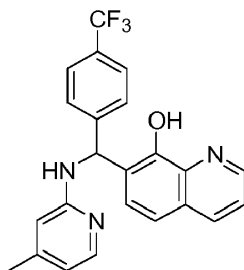
5 Se preparó usando el método A del Ejemplo 1.

**Ejemplo 7: 7-[(6-metilpiridin-2-ilamino)-(4-trifluorometilfenil)metil]quinolin-8-ol**



10 El compuesto del título se preparó mediante el método A y el método B presentados para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se usaron 4-trifluorometilbenzaldehído (Sigma), 2-amino-6-picolina (Sigma) y 8-hidroxiquinolina como materiales de partida. Producto obtenido (método B):  $C_{23}H_{18}F_3N_3O$  (PM: 409,1); (229 mg, 32,5 %); p.f.: 136-138 °C; CLAR ( $CH_3CN/H_2O$  70:30 Phenomenex C18 254 nm):  $T_r = 10,18$  min.

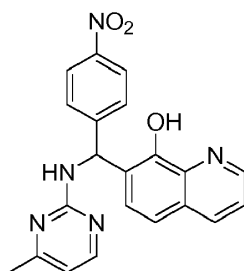
15 **Ejemplo 8: 7-[(4-metilpiridin-2-ilamino)-(4-trifluorometilfenil)metil]quinolin-8-ol**



20 El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se usaron 2-amino-4-metilpiridina (Molar), 4-trifluorometilbenzaldehído (Sigma) y 8-hidroxiquinolina (Sigma) como materiales de partida. Producto obtenido:  $C_{23}H_{18}F_3N_3O$ ; (PM: 409,1); rendimiento: 230 mg, (29,6 %) p.f.: 104-107 °C; CLAR ( $CH_3CN/H_2O$  70:30 Phenomenex C18 282 nm):  $T_r = 7,61$  min. RMN  $^1H$  **8** (DMSO)  $\delta$  2,18 (3H, s,  $CH_3$ ), 6,41 (1H, d, J = 5,1 Hz), 6,44 (1H, s, NH), 6,49 (1H, d, J = 4,9 Hz), 7,07 (1H, d, J = 9,2 Hz), 7,39 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,49-7,54 (1H, m), 7,58 (2H, d, J = 7,9 Hz), 7,63 (2H, d, J = 8,3 Hz), 7,73 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,85 (2H, d, J = 7,9 Hz), 8,03-8,08 (1H, m), 8,12 (2H, d, J = 8,5 Hz), 8,27 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,81-8,86 (1H, m); RMN  $^{13}C$  **8** (DMSO)  $\delta$  23,5 (CH<sub>3</sub>), 51,8 (NHCH), 109,5 (CH), 117,6 (CH), 121,8 (CH), 124,5 (Cq), 125,1 (CH), 125,6 (2xCH), 126,8 (CH), 127,7 (2xCH), 127,8 (Cq), 130,1 (CH), 134,7 (Cq), 136,1 (CH), 138,1 (Cq), 148,2 (Cq), 148,5 (CH), 149,6 (Cq), 157,7 (CH), 161,6 (Cq), 166,3 (Cq).

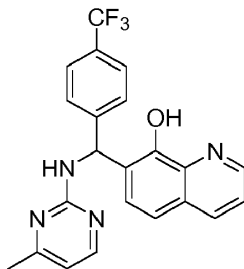
30 **Ejemplo 9: 2-[(4-metilpirimidin-2-ilamino)(4-nitrofenil)metil]fenol**





El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se usaron 2-amino-4-metilpirimidina (Sigma), 4-nitrobenzaldeído y 8-hidroxiquinolina como materiales de partida. Producto obtenido:  $C_{21}H_{17}N_5O_3$ , (PM: 387,1); rendimiento: 344 mg, (49,6 %); p.f.: 136-145 °C; CLAR ( $CH_3CN/H_2O$  70:30 Phenomenex C18 282 nm):  $T_r = 5,21$  min. RMN  $^1H$  **9** (DMSO)  $\delta$  2,14 (3H, s,  $CH_3$ ), 6,35 (1H, d, J = 5,8 Hz), 6,55 (1H, s), 7,00 (1H, d, J = 8,0 Hz), 7,36-7,43 (2H, m), 7,50-7,55 (1H, m), 7,56 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,60 (1H, d, J = 8,5 Hz), 7,79 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,15 (2H, d, J = 8,5 Hz), 8,28 (1H, d, J = 8,5 Hz), 8,84 (s, 1H), 10,1 (s, 1H); RMN  $^{13}C$  **9** (DMSO)  $\delta$  20,6 ( $CH_3$ ), 51,6 (NHCH), 109,0 (CH), 114,2 (CH), 117,7 (CH), 121,9 (CH), 123,5 (2xCH), 124,6 (Cq), 126,7 (CH), 127,7 (Cq), 128,2 (2xCH), 136,1 (CH), 138,2 (Cq), 146,2 (Cq), 147,1 (Cq), 147,2 (CH), 148,5 (CH), 149,8, 152,0 y 157,9 (3 Cq).

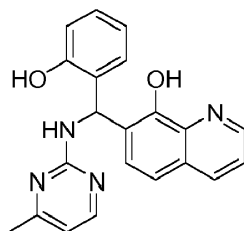
#### Ejemplo 10: 7-[(4-trifluorometilfenil)(2-metilpirimidin-2-ilamino)metil]quinolin-8-ol



El compuesto del título se preparó mediante el método A y el método B presentados para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se usaron 4-trifluorometilbenzaldeído y 2-amino-4-metilpirimidina como aldeído y fuente de amina (Molar). Producto obtenido (método B), rendimiento: 1,7 g, (34,8 %);  $C_{22}H_{17}F_3N_4O$ ; (PM: 410,1), p.f.: 144-147 °C; CLAR ( $CH_3CN/H_2O$  70:30 Phenomenex C18 254 nm):  $T_r = 7,75$  min. RMN  $^1H$  **10** (DMSO)  $\delta$  2,24 (3H, s,  $CH_3$ ), 6,49 (1H, d, J = 5,1 Hz), 7,07 (1H, d, J = 9,0 Hz, NHCH), 7,39 (1H, d, J = 8,5 Hz), 7,49-7,55 (1H, m), 7,58 (2H, d, J = 7,7 Hz), 7,64 (2H, d, J = 7,9 Hz), 7,74 (1H, d, J = 8,5 Hz), 8,07 (1H, d, J = 8,9 Hz), 8,14 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,28 (1H, d, J = 7,7 Hz), 8,83 (1H, s), 10,08 (1H, s amplio).

RMN  $^{13}C$  **10** (DMSO)  $\delta$  23,6 ( $CH_3$ ), 51,7 (NHCH), 110,4 (CH), 117,6 (CH), 121,8 (CH), 124,6 (Cq), 125,2 (2xCH), 126,8 (CH), 127,2 (Cq), 127,4 (Cq), 127,7 (Cq), 127,8 (2xCH), 136,1 (CH), 138,1 (Cq), 148,2 (Cq), 148,4 (CH), 149,8, 149,6, 161,6 y 167,6 (4 Cq).

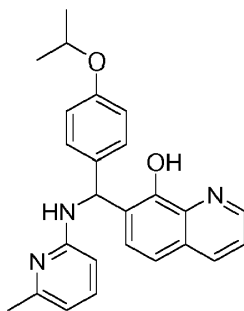
#### Ejemplo 11 (no según la invención): 7-[(2-hidroxifenil)-(4-metilpirimidin-2-ilamino)metil]quinolin-8-ol



El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se usaron 2-hidroxibenzaldeído (Molar), y 2-amino-4-metilpirimidina (Sigma) como materiales de partida. El producto precipitó, rendimiento: 45 mg;  $C_{21}H_{18}N_4O_2$ ; (PM: 358,1).

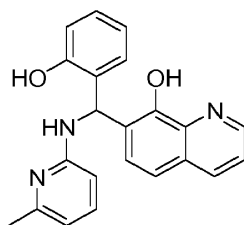
RMN  $^1H$  **11** (DMSO)  $\delta$  2,21 (3H, s,  $CH_3$ ), 6,39-6,46 (2H, m), 6,69 (1H, t, J = 6,4 Hz), 6,75 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,23 (1H, d, J = 7,0 Hz), 7,32 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,44-7,51 (2H, m), 7,57 (2H, d, J = 8,0 Hz), 8,09 (1H, d, J = 5,4 Hz), 8,25 (1H, d, J = 8,0 Hz), 8,79 (1H, s amplio), 9,47 (1H, s amplio, OH), 9,80 (1H, s amplio, OH).

#### Ejemplo 12 (no según la invención): 7-[(4-isopropoxifenil)-(6-metilpiridin-2-ilamino)metil]quinolin-8-ol



5 El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se usó 4-isopropiloxibenzaldehído (Molar) como componente de aldehído. Producto purificado mediante cromatografía en columna, C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>; (PM+1: 399,2), rendimiento 135 mg, (63,1 %), p.f.: 132-134 °C; CLAR (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 70:30 Phenomenex C18 282 nm): T<sub>r</sub> = 9,23 min.

10 **Ejemplo 13 (no según la invención): 7-[(2-hidroxifenil)(6-metilpiridin-2-ilamino)metil]quinolin-8-ol**

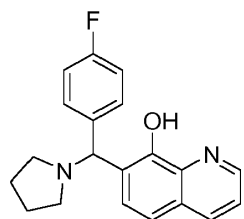


15 El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que la reacción se realizó con salicilaldehído (Molar), 2-amino-6-picolina (1 equivalente) y 8-hidroxiquinolina (0,6 equivalentes) como materiales de partida. Precipitación del producto; C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>; (PM: 357,1), rendimiento 1,6 g, (50,9 %); p.f.: 189-191 °C; CLAR (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 70:30 Phenomenex C18 282 nm): T<sub>r</sub> = 5,05 min.

20 RMN <sup>1</sup>H **13** (DMSO) δ 2,23 (3H, s), 6,34 (1H, d, J = 6,0 Hz), 6,38 (1H, d, J = 7,1 Hz), 6,69 (1H, t, J = 7,2 Hz), 6,80 (2H, m), 7,02 (2H, m), 7,18 (1H, d, J = 6,2 Hz), 7,25 (1H, d, J = 6,8 Hz), 7,36 (1H, d, J = 7,4 Hz), 7,42-7,54 (1H, m), 7,64 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,25 (1H, d, J = 7,1 Hz), 8,80 (1H, s), 9,85 (1H, s)

25 RMN <sup>13</sup>C **13** (DMSO) δ 23,9 (CH<sub>3</sub>), 47,8 (CHNH), 111,1 (CH), 115,7 (CH), 116,7 (CH), 118,7 (CH), 121,5 (CH), 125,3 (Cq), 127,2 (CH), 127,4 (Cq), 127,8 (CH), 128,3 (CH), 129,2 (Cq), 135,9 (CH), 137,5 (CH), 138,2 (Cq), 148,1 (CH), 149,7, 155,1, 155,6 y 157,6 (4 x Cq).

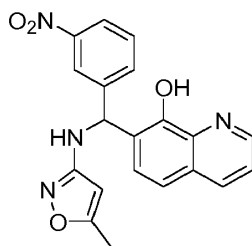
**Ejemplo 14 (no según la invención): 7-[(4-fluorofenil)(pirrolidin-1-il)metil]quinolin-8-ol**



30 C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O; (PM: 322,2)

El compuesto del título se preparó mediante el método A del Ejemplo 1.

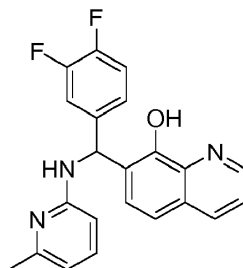
35 **Ejemplo 15: 7-[(5-metil-1,2-oxazol-3-il)amino](3-nitrofenil)metil]quinolin-8-ol**



$C_{20}H_{16}N_4O_4$ ; (PM: 376,1)

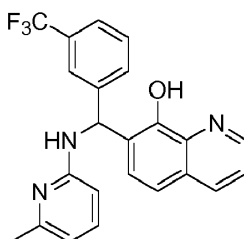
5 El compuesto del título se preparó mediante el método A del Ejemplo 1.

**Ejemplo 16: 7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(3,4-difluorofenil)metil)quinolin-8-ol**



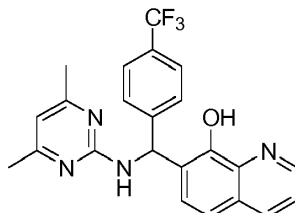
10 El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se hizo reaccionar 3,4-difluorobenzaldehído con 2-amino-6-picolina y 8-hidroxiquinolina. Precipitó un polvo blanco,  $C_{22}H_{17}F_2N_3O$ , (PM: 377,1); rendimiento: 275 mg, (53,3 %). p.f.: 162-165 °C; CLAR ( $CH_3CN/H_2O$  70:30 Phenomenex C18 282 nm): 7,97 min.

15 **Ejemplo 17: 7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(3-trifluorometilfenil)metil)quinolin-8-ol**



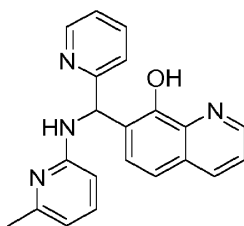
20 El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con un rendimiento superior. Precipitó un polvo blanco,  $C_{23}H_{18}F_3N_3O$ , (PM: 409,1); rendimiento: 356 mg, (57,3 %). p.f.: 140-143 °C, CLAR ( $MeOH/H_2O$  80:20 Phenomenex C18 254 nm): 10,21 min.

25 **Ejemplo 18: 7-[(4,6-dimetilpirimidin-2-ilamino)-(4-trifluorometilfenil)metil]quinolin-8-ol**



30 El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con un rendimiento superior. Precipitó un polvo blanco,  $C_{23}H_{19}F_3N_4O$ ; (PM: 424,2); rendimiento: 255 mg, (54,6 %).

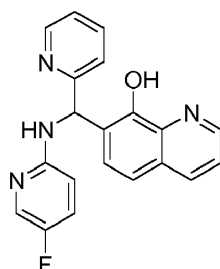
**Ejemplo 19: 7-[(6-metilpiridin-2-ilamino)piridin-2-il-metil]quinolin-8-ol**



El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1. Precipitó un polvo blanco amarillento,  $C_{21}H_{18}N_4O$  (PM: 342,2); rendimiento: 1,2 g, (70,5 %). p.f.: 155-157 °C.

5

**Ejemplo 20: 7-[(5-fluoropiridin-2-ilamino)piridin-2-il-metil]quinolin-8-ol**

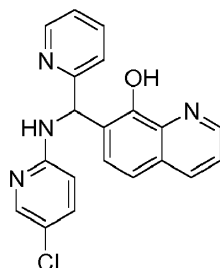


El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1. Polvo de color hueso, purificado mediante cromatografía en columna.  $C_{20}H_{15}FN_4O$ ; (PM: 346,1), rendimiento 45 mg, (18,4 %). p.f.: 165-168 °C, CLAR ( $CH_3CN/H_2O$  70:30 Phenomenex C18 282 nm): 4,44 min.

10

**Ejemplo 21: 7-[(5-cloropiridin-2-ilamino)piridin-2-il-metil]quinolin-8-ol**

15

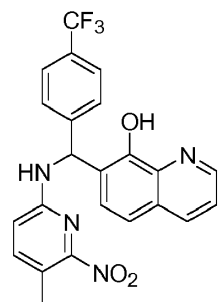


El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1; se usaron en la reacción 2-amino-5-cloropiridina, 2-piridinacarboxialdehído y 8-hidroxiquinolina; la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 3 días. Polvo blanco grisáceo, producto purificado mediante cromatografía en columna.  $C_{20}H_{15}ClN_4O$ ; (PM: 362,1); rendimiento: 55 mg, (23,7 %). p.f.: 160-162 °C, CLAR ( $CH_3CN/H_2O$  70:30 Phenomenex C18 282 nm): 5,69 min.

20

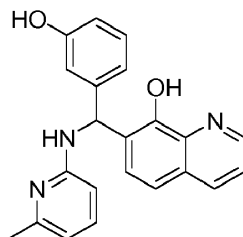
**Ejemplo 22: 7-[(5-metil-6-nitropiridin-2-ilamino)-(4-trifluorometilfenil)metil]quinolin-8-ol**

25



El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se usaron 2-amino-5-metil-6-nitropiridina, 4-trifluorometilbenzaldehído y 8-hidroxiquinolina y la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 7 días. Polvo blanco amarillento.  $C_{23}H_{17}F_3N_4O_3$ ; (PM: 454,1), rendimiento: 26 mg, (10 %). p.f.:  $\geq 300$  °C, CLAR ( $CH_3CN/H_2O$  70:30 Phenomenex C18 282 nm):  $T_r = 5,60$  min.

30

**Ejemplo 23 (no según la invención): 7-[(3-hidroxifenil)(6-metilpiridin-2-ilamino)metil]quinolin-8-ol**

5 El compuesto del título se preparó mediante el método B presentado para el compuesto del Ejemplo 1 con el cambio de que se hizo reaccionar 3-hidroxibenzaldehído con 2-metil-6-picolina y 8-hidroxiquinolina. Polvo blanco, producto purificado mediante cromatografía en columna.  $C_{22}H_{19}N_3O_2$ ; (PM: 357,2), rendimiento: 211 mg, (80,2 %). p.f.: 187-189 °C, CLAR (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 70:30 Phenomenex C18 282 nm):  $T_r = 3,97$  min.

**10 EJEMPLOS BIOLÓGICOS****Ejemplo 24: Inhibición de las actividades de la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2, gelatinasa de 72 kDa) y la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9, gelatinasa de 92 kDa) mediante 7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(4-nitrofenil)metil)quinolin-8-ol**

15 Se hicieron crecer células de miocardio embrionario de ratas H9c2 (de ATCC, Rockville, MD, EE. UU.) en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía 10 % de suero bovino, L-glutamina 4 mM (Sigma-Aldrich, Hungría), 100 UI/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin. A la muestra de sobrenadante de H9c2, se añadió 30 uM del compuesto según el Ejemplo 1 (7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(4-nitrofenil)metil)quinolin-8-ol) de una solución madre que contenía 30 mM de DMSO (dilución de 1000 veces) antes de la electroforesis. Al control, se añadió DMSO que no contenía el compuesto según el Ejemplo 1. Después de la electroforesis, el gel se cortó en dos mitades seguido de renaturalización; una mitad se incubó de tal forma que 30 uM del compuesto según el Ejemplo 1 se añadió al mismo a la concentración final, mientras que la segunda mitad (control) se incubó sin él. El compuesto según el Ejemplo 1 inhibía completamente la gelatinasa de 72 kDa (MMP-2) si la sustancia estaba presente durante la incubación. También inhibió la gelatinasa de 92 kDa (MMP-9), pero en menor medida que la gelatinasa de 72 kDa.

La MMP-9 y MMP-2 contribuyen a la muerte de las células endoteliales mediada por caspasa, después de la reoxigenación de la hipoxia mediante destrucción de las interacciones célula-matriz y la señal hemostática de las integrinas. Los inhibidores de la MMP-2 y MMP-9 reducen significativamente la actividad de la caspasa-3 y reducen la muerte de las células endoteliales (Lee y col, 2004).

**Ejemplo 25: el compuesto según el Ejemplo 1 (7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(4-nitrofenil)metil)quinolin-8-ol) reduce la lesión por reperfusión después del trasplante de corazón.**

35 Se realizó un modelo de experimento de trasplante cardíaco heterotrópico de la forma descrita anteriormente (poli(ADP-Ribosa); la inhibición de la polimerasa reduce la lesión por reperfusión que se produce después del trasplante de corazón (Szabó y col. 2002). Brevemente: los corazones del donante se trasplantaron de ratas de Lewis. Después de la protección isquémica realizada a 4 °C durante 1 hora, los corazones se implantaron intraabdominalmente mediante anastomización de la aorta y la arteria pulmonar del corazón del donante con la aorta abdominal o la vena cava de la rata receptora. El cuidado de los animales fue realizado por personas de conformidad con los requisitos de los "Principios de Cuidado de Animales de Laboratorio"; la Sociedad Nacional de Investigación Médica y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio preparada por la Academia Nacional de las Ciencias; editorial: Institutos Nacionales de la Salud (Publicación NIH n.º No. 86-23, revisada en 1996).

45 Las mediciones funcionales del trasplante se llevaron a cabo como se indica a continuación: la presión sistólica del ventrículo izquierdo (PSVI), la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI), la velocidad de cambio de la presión sanguínea (dP/dt) y la constante del tiempo de relajación (TE) se midieron por medio de un micromanómetro Millar (Millar Instruments, Inc.), con diferentes VI, usando un balón intraventricular. El flujo sanguíneo coronario (FSC) total se midió sobre la aorta del donante con una muestra del flujo ultrasónico perivascular. Después de la determinación del valor de referencia, la acetilcolina vasodilatadora dependiente del endotelio (ACH, 1 nmol/l, 0,2 ml), la bradiquinina (BK 0,1 nmol/l, 0,2 ml), y el nitroprusido de sodio vasodilatador independiente del endotelio (SNP, 10 nmol/l, 0,2 ml) se añadieron directamente a las arterias coronarias del trasplante a través de la aorta del donante. Entre las infusiones, se permitió que el FSC volviera al valor de referencia. La respuesta vasodilatadora se expresó como el cambio máximo porcentual del FSC desde el valor de referencia.

55 Se estudiaron dos grupos de trasplantes (n = 6/en cada grupo). Justo antes de liberar la pinza de la aorta, se inició la inyección lenta de solución salina común (grupo de control) o del compuesto según el Ejemplo 1 (3 mg/kg) y esta continuó durante los 5 primeros minutos del periodo de reperfusión.

La medición de la función sistólica y diastólica y el FSC en el grupo A (control) y grupo B (compuesto según el Ejemplo 1) se realizó 1 hora después de la reperfusión.

5 Los parámetros hemodinámicos y el flujo sanguíneo miocárdico se determinaron después de la reperfusión durante 60 minutos. La frecuencia cardíaca y la presión aórtica del receptor fueron las mismas en cada grupo. La recuperación de la función sistólica fue significativamente mejor en el grupo tratado con el compuesto según el Ejemplo 1 que en los valores del control. La PSVI y dP/dt positiva máxima fueron significativamente ( $P = 0,05$ ) superiores en el grupo tratado con el compuesto según el Ejemplo 1.

10 Las curvas de la función cardíaca sistólica en el grupo tratado con el compuesto según el Ejemplo 1 presentaron una desviación significativa a la izquierda en comparación con el grupo tratado con el vehículo (Fig. 1A y Fig. 1b). La PDFVI no presentó valores variables entre los grupos. Las curvas de cooperación diastólica (relación presión diastólica final-volumen) fueron similares en todos los grupos (Fig. 1c).

15 **Ejemplo 26: el tratamiento con compuestos que tienen la fórmula general (I) impidió la muerte celular provocada por peróxido de hidrógeno *in vitro* en células del corazón, neuronales y del hígado**

20 Se hicieron crecer células de miocardio embrionario de ratas H9c2 (ATCC, Rockville, MD, EE. UU.) en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía 10 % de suero bovino, L-glutamina 4 mM (Sigma-Aldrich, Hungría), 100 UI/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin. Las células se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos (10 000 células/pocillo) y, después de 24 horas, se trataron con 1 % de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) (concentración final 0,2 mM). 30 minutos después del tratamiento, se colocaron diversos compuestos con la fórmula general (I) en diversas concentraciones en ellas y, después de 3 y 24 horas, se determinó la viabilidad de las células por medio del ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio).

25 Se añadió bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Serva) a las células en una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las células se lavaron con PBS y el colorante de formazán se disolvió en isopropanol. La cantidad del colorante de formazán transformado se midió por medio de un lector Powerwave (Biotek, Winooski, VT) a 570 nm; medición de la señal de fondo 690 nm. La curva de calibración se obtuvo de tal forma que se midió la capacidad de las diluciones en serie de las células para transformar el MTT y se calculó el recuento de células viables usando el software Gen5. Las mediciones se realizaron 3 horas y 24 horas después de la exposición de cada serie de experimentos al efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

35 **Ejemplo 27: el tratamiento con diversos compuestos que tienen la fórmula general (I) impidió la muerte celular provocada por peróxido de hidrógeno *in vitro* en células del hígado**

40 Se hicieron crecer células de hepatoma humano Hep3B (ATCC, Rockville, MD, EE. UU.) al 10 % en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía 10 % de suero bovino, L-glutamina 4 mM (Sigma-Aldrich, Hungría), 100 UI/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin. Las células se mantuvieron en placas de CT de 100 mm (Orange Scientific, Bélgica) en una incubadora en un espacio a 37 °C que contenía aire humidificado y 5 % de CO<sub>2</sub>.

45 Las células se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos E-plate (Roche) pretratadas con gelatina (10 000 células/pocillo) y se hicieron crecer durante 16 horas. 30 minutos después del tratamiento, se colocaron diversos compuestos con la fórmula general (I) en diversas concentraciones en ellas y se midió continuamente la viabilidad de las células con un instrumento Excelligence mediante el método RT-CES (Roche) determinando el índice celular medido cada 2 minutos. Los resultados se presentan en la Fig. 2. La curva "A" representa el control no tratado, la curva "I" representa el compuesto PJ34, un inhibidor de la PARP conocido, mientras que la curva "J" representa el control tratado con peróxido.

50 En este experimento, se ensayaron los compuestos según la fórmula general (I) siguientes (indicando qué curva de la Fig. 2 representa el efecto del compuesto dado sobre el índice celular normalizado):

55 7-((4-nitrofenilamino)(fenil)metil)quinolin-8-ol (curva "B"),  
éster etílico del ácido 4-[[8-hidroxiquinolin-7-il)fenilmetil]amino}benzoico (curva "C", Ejemplo 3),  
7-((4-fenilpiperazin-1-il)(tiofen-2-il)metil)quinolin-8-ol (curva "D"),  
7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(4-trifluorometil)fenil)metil)quinolin-8-ol (curva "E"),  
7-((4-fluorofenil)(tiazol-2-ilamino)metil)quinolin-8-ol (curva "F"),  
7-(fenilaminopiridin-2-il-metil)quinolin-8-ol (curva "G", Ejemplo 4) y  
60 7-[(4-fluorofenil)(pirrolidin-1-il)metil]quinolin-8-ol (curva "H", 14).

Los ensayos se realizaron con el fin de determinar el efecto citoprotector sobre células de hepatoma humano Hep3B 30 minutos después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se usó 250 uM de peróxido de hidrógeno en estas células. El crecimiento celular es lineal durante la aplicación de peróxido de hidrógeno. 30 minutos después del tratamiento con diversos compuestos con la fórmula general (I) según nuestra invención, las pendientes de las curvas del índice celular cambiaron significativamente en función de qué efectos citoprotectores de los compuestos según nuestra invención

se pueden determinar.

**Ejemplo 28: el tratamiento con diversos compuestos que tienen la fórmula general (I) impidió la muerte celular provocada por peróxido de hidrógeno *in vitro* en neuronas y astrocitos primarios combinados**

Las células se mantuvieron en placas de CT de 100 mm (Orange Scientific, Bélgica) en una incubadora en un espacio a 37 °C que contenía aire humidificado y 5 % de dióxido de carbono. Se preparó un cultivo combinado de neuronas y astrocitos cerebrales siguiendo el método de Griffin S y col. (Griffin y col., 2005). Los cultivos celulares se mantuvieron en un medio esencial mínimo de Eagle que contenía 10 % de suero fetal bovino y 1 % de solución de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich, Hungría). Los resultados se presentan en la Fig. 3. La curva "K" representa el control no tratado, la curva "P" representa el control tratado con PJ34 y la curva "Q" representa el control tratado con peróxido de hidrógeno.

Las células se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos E-plate (Roche) (10 000 células/pocillo) pretratadas con gelatina y se hicieron crecer durante 16 horas. 5 minutos antes del tratamiento, se colocaron los compuestos con la fórmula general (I) según nuestra invención siguientes en concentración 5 µM en ellas:

- 7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(4-nitrofenil)metil)quinolin-8-ol (curva "L", Ejemplo 1),
- 7-[(6-metilpiridin-2-ilamino)-(4-trifluorometilfenil)metil]quinolin-8-ol (curva "M", Ejemplo 7),
- 4-((8-hidroxiquinolin-7-il)(4-nitrofenil)metilamino)benzoato de etilo (curva "N", Ejemplo 2) y
- 7-((4-metilpirimidin-2-ilamino)(4-trifluorometil)fenil)metil)quinolin-8-ol (curva "O", Ejemplo 10).

A continuación se midió continuamente la viabilidad de las células con un instrumento Excelligence mediante el método RT-CES (Roche) determinando el índice celular medido cada 2 minutos. El tratamiento comenzó añadiendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM que provocó la destrucción de 90 % de las células totales en el pocillo de control que no contenía un compuesto con la fórmula general (I).

**Ejemplo 29: Efecto del compuesto según el Ejemplo 1**

**(7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(4-nitrofenil)metil)quinolin-8-ol) sobre el comportamiento de las ratas**

**Animales de ensayo**

Se usaron ratas Wistar recibidas de Charles River Laboratories (Budapest, Hungría) como animales de ensayo. Se usaron ratas de aprox. 2 meses (200-300 g de peso corporal). Los animales se acondicionaron durante aprox. 1 semana. Los animales recibieron alimento de laboratorio estándar (Charles River Laboratories, Budapest, Hungría) y agua del grifo a voluntad. La temperatura y humedad se mantuvieron a 22 ± 2 °C y 60 ± 10 %, respectivamente. Las ratas se mantuvieron en grupos de 5 en jaulas de Makrolon de 45 x 35 x 25 cm. Se usaron ciclos de día/noche de 12 horas; la luz se apagó a las 19:00. Los experimentos se realizaron en el periodo de luz diurna. Los experimentos se realizaron según la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas de 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE, según el control y la homologación del Comité de Bienestar Animal del Instituto de Medicina Experimental).

**Ejemplo 29.1: verificación del efecto inhibitor de la ansiedad del compuesto según el Ejemplo 1 mediante el ensayo de laberinto elevado en cruz**

**Ensayo de laberinto elevado en cruz**

Se usó una caja de metal negro para el ensayo de laberinto elevado en cruz. Los tamaños del equipo son los siguientes: longitud del brazo: 40 cm, anchura del brazo: 12 cm, altura de la pared: 30 cm y altura de la plataforma: 70 cm. Los brazos abiertos están circundados por salientes de 0,5 cm. El ensayo se realizó según la publicación siguiente: Pellow y col., 1985.

En las primeras horas de la fase de luz, las ratas se trataron con el vehículo, el compuesto según el Ejemplo 1 (2 mg/kg), el compuesto según el Ejemplo 1 (8 mg/kg) y clordiazepóxido (8 mg/kg) (n = 10 en cada grupo). Esta dosis de clordiazepóxido redujo fiablemente la ansiedad en este ensayo con anterioridad. 2 horas después del tratamiento, los animales se colocaron en el centro del equipo con sus cabezas dirigidas hacia el brazo cerrado. El tiempo de exposición fue 5 minutos. Las entradas a los brazos cerrados son indicadores de actividad locomotora, mientras que el uso de los brazos abiertos es el indicador del grado de ansiedad. El uso del brazo abierto estuvo caracterizado por dos variables: valor porcentual del tiempo pasado en brazos abiertos y frecuencia porcentual de entradas a brazos abiertos (100 x entradas a brazos abiertos/entradas totales a brazos) (Pellow y col., 1985; Hogg, 1996).

Los resultados se presentan en la Fig. 4. En la figura, "Ejemplo 1" se refiere al compuesto según el Ejemplo 1, CDP se refiere a clordiazepóxido.

**Ejemplo 29.2: efecto del compuesto según el Ejemplo 1 sobre la depresión**

**Ensayo de natación forzada**

Se forzó a las ratas a que nadaran dos veces como se describe en la publicación siguiente: Porsolt y col., 1978. En el primer día, cada rata se colocó en un cilindro de vidrio de 15 cm de ancho y 35 cm de alto relleno con agua hasta 30 cm. A esa profundidad de agua, las colas de las ratas no tocaban el fondo del cilindro. La temperatura del agua fue  $24 \pm 0,5$  °C. Al día siguiente, los animales se trataron con el vehículo, 2 mg/kg del compuesto según el Ejemplo 1, 8 mg/kg del compuesto según el Ejemplo 1 y 30 mg/kg de imipramina. Esta dosis de imipramina redujo fiablemente la flotación en experimentos anteriores; en este ensayo, es la característica principal de comportamiento similar a la depresión. Después de un periodo de descanso de 2 horas, se forzó a las ratas a que nadaran de nuevo durante 5 min. El comportamiento de los animales se registró mediante una cámara de vídeo situada a 2 metros de los cilindros. Se registraron los factores de comportamiento siguientes: lucha (el animal intenta salir del cilindro trepando por las paredes); natación (natación alrededor del cilindro) y flotación (el animal solo hace los movimientos necesarios para mantener su cabeza por encima del agua). El tiempo de flotación indica el grado de comportamiento similar a la depresión en este ensayo.

Los resultados se presentan en la Fig. 5. En la figura, "Fig. 1" se refiere al compuesto según el Ejemplo 1.

**Ejemplo 30: efecto citotóxico de los compuestos según la invención sobre diversas líneas celulares tumorales**

En nuestro experimento, se usaron cultivos celulares de HepG2 y Hep3B (carcinoma hepatocelular humano), SUM149PT (tumor de cáncer de mama humano), K562 (leucemia eritroblástica humana), U87 (glioma humano), CCRF-CEM (leucemia humana); estos se hicieron crecer en los medios siguientes: U87, CCRF-CEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) (alto contenido en glucosa) (Gibco BRL, Carlsbad, CA, EE. UU.), penicilina (50 UI/ml)-estreptomicina (50 mg/ml), 10 % de suero fetal bovino.

Mezcla 1:1 de HepG2, Hep3B, SUM149PT: medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) (alto contenido en glucosa) (Gibco BRL, Carlsbad, CA, EE. UU.) y mezcla de nutrientes F-12 de Ham (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), penicilina (50 UI/ml)-estreptomicina (50 mg/ml), 10 % de suero fetal bovino.

CCRF-CEM: medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Carlsbad, CA, EE. UU.), penicilina (50 UI/ml)-estreptomicina (50 mg/ml), 10 % de suero fetal bovino.

Las células se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos (10 000 células/pocillo) y, después de 24 horas, las células se incubaron con las diversas sustancias. Después de la incubación, se realizó el ensayo del MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio) (Promega, Madison, WI, EE. UU.) añadiéndolo en una concentración final de 0,5 mg/ml a las células, que a continuación se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las células se lavaron con PBS y el colorante de formazán se disolvió en isopropanol. La cantidad del colorante de formazán transformado se midió por medio de un lector Powerwave (Biotek, Winooski, VT) a 570 nm; medición de la señal de fondo 690 nm. La curva de calibración se obtuvo de tal forma que se midió la capacidad de las diluciones en serie de las células para transformar el MTS y se calculó el recuento de células viables usando el software Gen5.

Los resultados del experimento con las diversas células se presentan en la Tabla 1. En la tabla se presentan los valores de la CE50 de cada sustancia (la concentración a la que la mitad de las células murieron basada en los resultados del ensayo del MTS).

Se puede observar bien que los compuestos según la presente invención presentaron efecto citotóxico sobre las diversas líneas celulares tumorales.



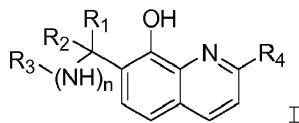
Tabla 1: Efecto citostático de diversos derivados de la quinolina sobre diversas líneas celulares tumorales humanas									
Nombre del compuesto (N.º de Ejemplo)	Línea celular (tipo)								
	CCRF-CEM (leucemia)	Hep3B (hígado)	HepG2 (hígado)	K562 (leucemia)	SUM149PT (mama)	U87 (glioma)			
7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(4-nitrofenil)metil)quinolin-8-ol (Ejemplo 1),	1,0		0,5	1,0	10,0	2,5			
7-[(6-metilpiridin-2-ilamino)(4-trifluorometilfenil)metil]quinolin-8-ol (Ejemplo 7),	0,3	5,0	0,5	15,0					
4-((8-hidroxiquinolin-7-il)(4-nitrofenil)metilamino)benzoato de etilo (Ejemplo 2)	1,0	5,0	2,5			4,0			
7-[piridin-2-il-(4-trifluorometilfenilamino)metil]quinolin-8-ol (Ejemplo 5)	0,1	2,0	2,0			3,5			
7-(((4-metilpirimidin-2-ilamino)(4-(trifluorometil)fenil)metil)quinolin-8-ol (Ejemplo 10).			1,0	7,0	5,0	5,0			
7-[(2-hidroxi)fenil(4-metilpirimidin-2-ilamino)metil]quinolin-8-ol (Ejemplo 11)			1,0	5,0					
7-[(4-metilpiridin-2-ilamino)(4-trifluorometilfenil)metil]quinolin-8-ol (Ejemplo 8),				8,0	10,0				
7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(3,4-difluorofenil)metil]quinolin-8-ol (Ejemplo 16),			5,0	1,5		2,5			
7-((6-metilpiridin-2-ilamino)(2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil)metil]quinolin-8-ol			1,0	1,5		2,5			

**Bibliografia:**

- 5 Betti, 1900: Betti, M. Gazz. Chim. Ital. 1900, 30 II, 301;  
 Betti, 1903: Betti, M. Gazz. Chim. Ital. 1903, 33 II, 2;  
 Britton et al., 2002: Britton RS, Leicester KL, Bacon BR. Iron toxicity and chelation therapy. *Int J Hematol.* 2002 Oct;76(3):219-228;  
 Duprez et al., 2009: Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 2009 Nov;11(13):1050-1062;  
 10 Degterev es Yuan, 2008: Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):378-390;  
 Frederickson et al., 2005: *Nature Reviews Neuroscience*, Vol.6, 449-462;  
 Gero et al., 2007: Gerö D, Módis K, Nagy N, Szoleczky P, Tóth ZD, Dormán G, Szabó C. Oxidant-induced cardiomyocyte injury: identification of the cytoprotective effect of a dopamine 1 receptor agonist using a cell-based high-throughput assay. *Int J Mol Med.* 2007 Nov;20(5):749-761;  
 15 Griffin et al., 2005: Griffin S, Clark JB es Canevari L: *J Neurochem* 95: 1015-1022, 2005,  
 Hogg, 1996: Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996 May;54(1):21-30;  
 Idris et al., 2008: Idriss NK, Blann AD, Lip GY. Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Sep 16;52(12):971-978.  
 20 Jagtap es Szabó, 2005: Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 May;4(5):421-440;  
 Koh et al., 1996: Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science.* 1996 May 17;272(5264):1013-1016;  
 25 Koh et al., 2001: *Science*, Vol.272, 1013-1016;  
 Lewen et al., 2000: Lewén A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma.* 2000 Oct; 17 (10) :871-890;  
 Lee et al., 2004: S.R. Lee, E.H. Lo: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004 Jul;24(7):720-727;  
 Li et al., 2007: Li C, Hossieny P, Wu BJ, Qawasmeh A, Beck K, Stocker R. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal.* 2007 Dec;9(12):2227-2239;  
 30 Nguyen et al., 2005: *PNAS*, Vol.102(33), 11840-11845; Pellow et al., 1985: Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. & Biley, M. (1985) *J. Neurosci. Methods*, Vol.14, 149-167;  
 Phillips et al., 1954: J. P. Phillips, R. W. Keown, Q. Fernando; *J. Org. Chem.*, 1954, 19 (6), 907;  
 Phillips et al., 1956: J. P. Phillips, E. M. Barrall; *J. Org. Chem.* 1956, 21, 692;  
 35 Phillips, 1956: J. P. Phillips, *Chem. Rev.* 1956, 56, 286;  
 Porsolt et al., 1978: Porsolt RD, Anton G, Deniel M, Jalfre M (1978): *Eur J Pharmacol*, Vol.47, 379-391;  
 Regland et al., 2001: Regland B, Lehmann W, Abedini I, Blennow K, Jonsson M, Karlsson I, Sjögren M, Wallin A, Xilinas M, Gottfries CG. Treatment of Alzheimer's disease with clioquinol. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2001 Nov-Dec;12(6):408-414;  
 40 Schafer et al., 2007: *J Mol Med*, Vol. 85, 405-413;  
 Szabó et al. 2002: Szabó G, Bährle S, Stumpf N, Sonnenberg K, Szabó E E, Pacher P, Csont T, Schulz R, Dengler TJ, Liaudet L, Jagtap PG, Southan GJ, Vahl CF, Hagl S, Szabó C.: *Circ. Res.* 2002 Jan 11;90(1):100-106;  
 Szabó, 2005: Szabó C. Mechanisms of cell necrosis. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl):S530-534;  
 45 Wang et al., 2009: Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol.* 2009 Aug;218(2):193-202;

## REIVINDICACIONES

1. Compuestos según la fórmula general (I)



5

en cuya fórmula

10 R<sub>1</sub> representa un átomo de hidrógeno, grupo alquilo inferior, que es un grupo alquilo ramificado o no ramificado con 1-4 átomos de carbono, grupo alqueno inferior, que es un grupo alqueno ramificado o no ramificado con 2-4 átomos de carbono, grupo arilo, grupo aralquilo, o grupo heterocíclico, donde los grupos arilo, aralquilo y heterocíclico anteriores están opcionalmente sustituidos en posición orto, meta y/o para con 1, 2, 3 o 4 grupos aceptores de electrones seleccionados entre átomos de halógeno, grupos trifluorometilo o nitro, o grupos donadores de electrones seleccionados entre grupos alquilo inferiores, que son grupos alquilo ramificados o no ramificados con 1-4 átomos de carbono;

15 R<sub>2</sub> representa un átomo de hidrógeno, grupo alquilo inferior, que es un grupo alquilo ramificado o no ramificado con 1-4 átomos de carbono, grupo arilo, grupo aralquilo, o grupo heterocíclico, donde los grupos anteriores están opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

20 R<sub>3</sub> representa un grupo arilo, grupo aralquilo, o grupo heterocíclico, donde los grupos anteriores están opcionalmente sustituidos en posición orto, meta o para con 1, 2, 3 o 4 grupos aceptores de electrones seleccionados entre átomos de halógeno, grupos trifluorometilo o nitro, o grupos donadores de electrones seleccionados entre grupos alquilo inferiores, que son grupos alquilo ramificados o no ramificados con 1-4 átomos de carbono;

25 R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno, grupo alquilo inferior, que es un grupo alquilo ramificado o no ramificado con 1-4 átomos de carbono, o un grupo funcional ácido seleccionado entre grupo metoxicarbonilo, nitrilo o grupo amida ácida;

30 n es 1 o 2; y su sal farmacéuticamente aceptable para uso en un método para la profilaxis o el tratamiento de isquemia, lesión por reperfusión, trastornos cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos (que incluyen especialmente enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington), traumatismos, enfermedades neuropsiquiátricas (que incluyen especialmente depresión y trastornos por ansiedad) y lesiones del hígado, riñón y pulmón.

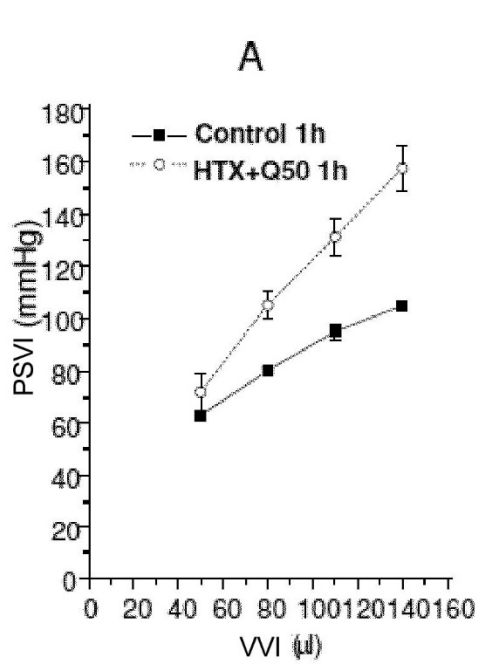


Fig. 1a

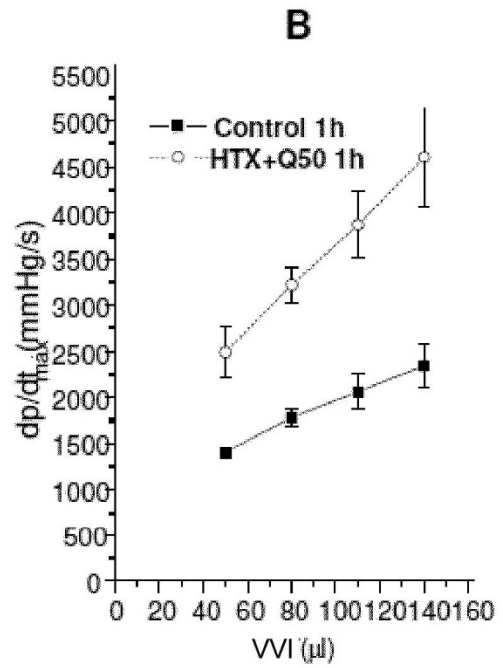


Fig. 1b

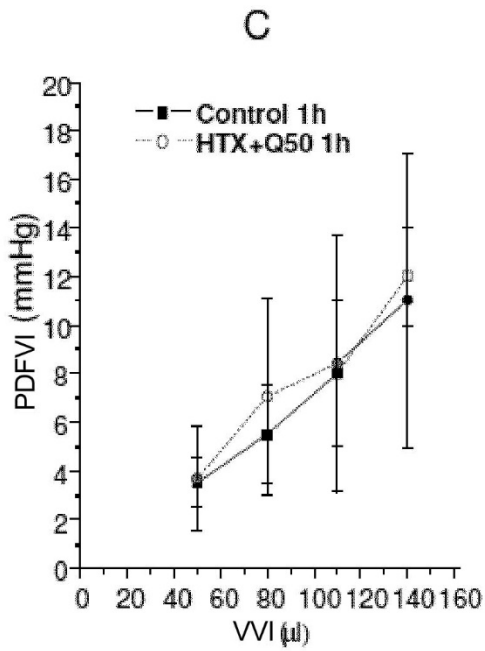


Fig. 1c

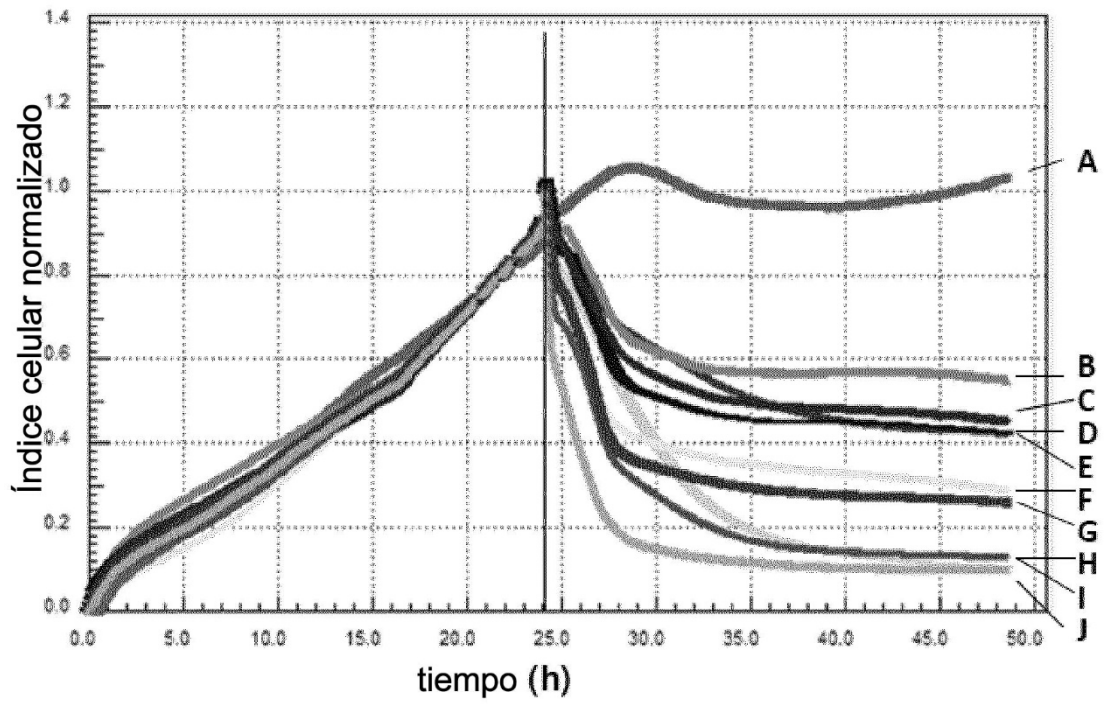


Fig. 2

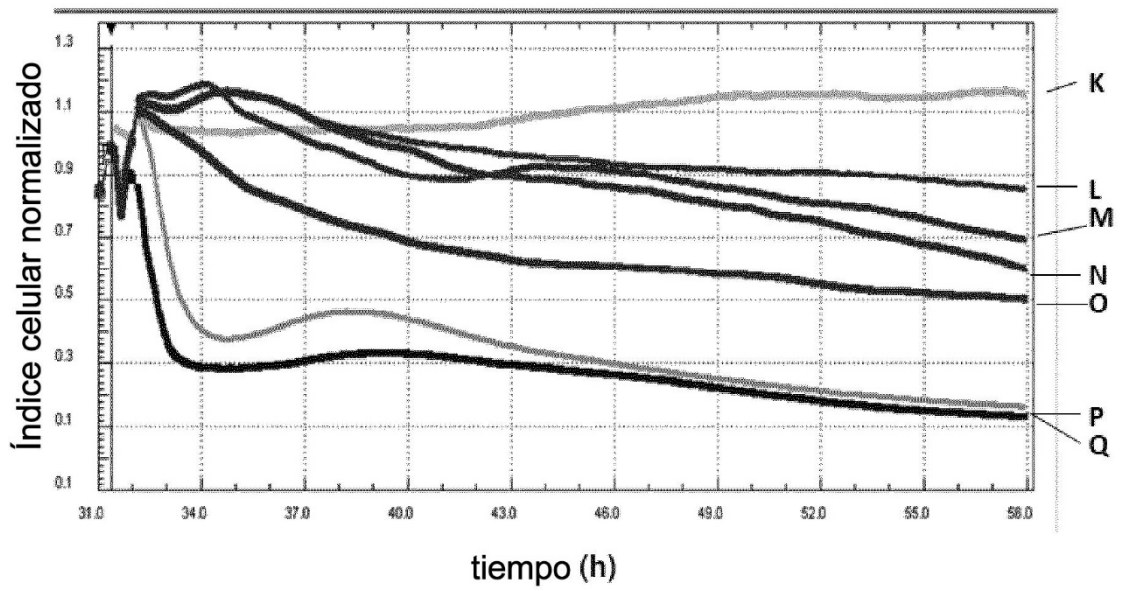


Fig. 3

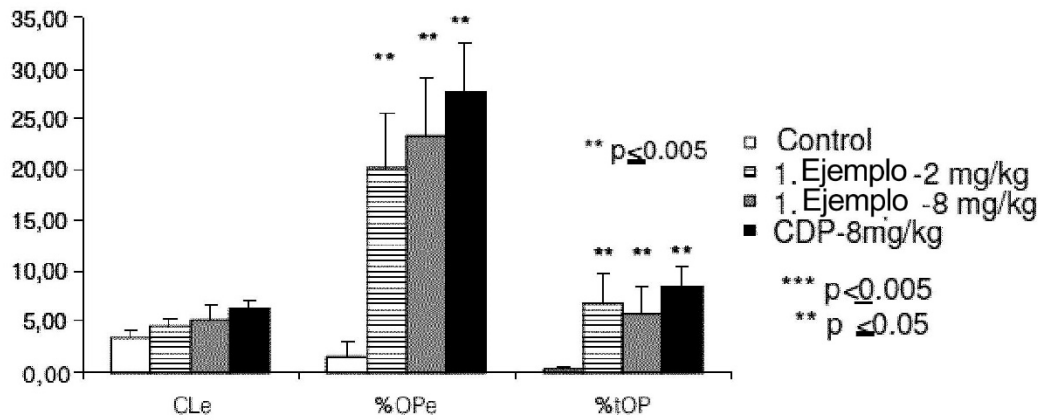


Fig. 4

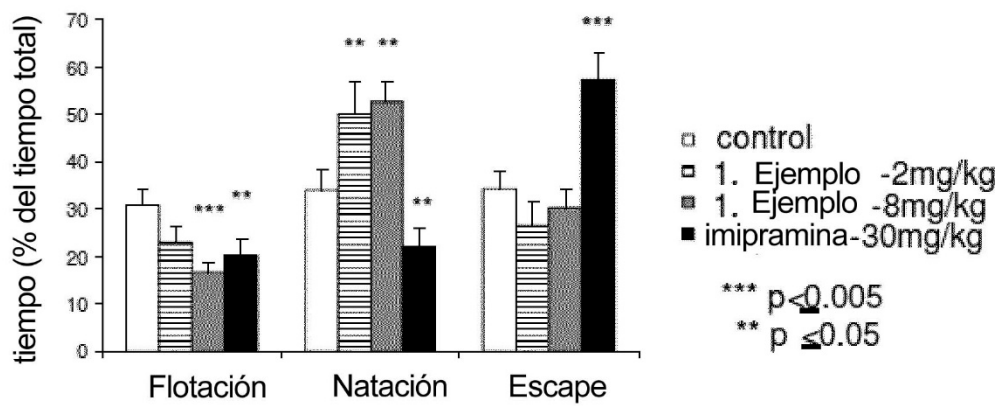


Fig. 5