

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 899 730**

(51) Int. Cl.:

C07D 401/12	(2006.01)	A61K 31/497	(2006.01)
C07D 401/14	(2006.01)	A61K 31/506	(2006.01)
C07D 403/12	(2006.01)	A61K 31/53	(2006.01)
C07D 403/14	(2006.01)	A61K 31/5377	(2006.01)
C07D 413/14	(2006.01)	A61P 25/28	(2006.01)
C07D 417/14	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
A61K 31/4709	(2006.01)	A61P 31/00	(2006.01)
A61K 31/4155	(2006.01)	A61K 31/5355	(2006.01)
A61K 31/451	(2006.01)	C12N 5/0793	(2010.01)
A61K 31/473	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2013 PCT/US2013/028329**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13134047**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013 E 13758678 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021 EP 2822936**

(54) Título: **Derivados de la aminoquinolina y sus usos**

(30) Prioridad:

07.03.2012 IN 661DE2012

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2022

(73) Titular/es:

THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION (50.0%)
115 Mill Street
Belmont, MA 02478, US y
UNIVERSITY OF DELHI (50.0%)

(72) Inventor/es:

RAWAT, DIWAN S;
MANOHAR, SUNNY;
RAJESH, UMMADISETTY CHINNA;
KUMAR, DEEPAK;
THAKUR, ANUJ;
TRIPATHI, MOHIT;
REDDY, PANYALA LINGA;
KANDI, SHAMSEER KULANGARA;
VARDHINENI, SATYAPAVAN;
KIM, KWANG-SOO y
KIM, CHUN-HYUNG

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 899 730 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 aminoquinolina y sus usos

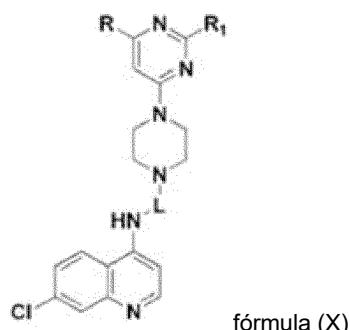
Campo técnico

- 5 La presente divulgación se refiere en general a híbridos basados en aminoquinolina y aminoacridina, y
composiciones farmacéuticas y medicamentos que incluyen estos híbridos basados en aminoquinolina y aminoacridina, y
al uso de estos compuestos en el diagnóstico y/o tratamiento de infecciones, enfermedades o trastornos
neurodegenerativos, inflamación, y/o enfermedades y trastornos asociados a la inflamación.
- 10 Antecedentes
- La enfermedad de Parkinson (EP), causada principalmente por la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (mDA), es el trastorno del movimiento más prevalente y que afecta a un 1-2% de la población mundial mayor de 65 años¹⁻³. Los tratamientos farmacológicos actualmente disponibles (por ejemplo, L-DOPA) son fundamentalmente sintomáticos y pierden su eficacia con el paso del tiempo, con efectos secundarios graves asociados
15 como la disquinesia. Por consiguiente, existe una necesidad clínica no cubierta de desarrollar tratamientos basados en mecanismos y/o modificadores de la enfermedad^{2,3}. El receptor nuclear huérfano Nurrl (también conocido como NR4A2) es esencial no solo para el desarrollo y mantenimiento de neuronas mDA⁴⁻⁷, sino también para su protección de la muerte inducida por inflamación⁸. Por otra parte, estudios previos demostraron una expresión reducida de Nurrl en cerebros *post mortem* de pacientes con EP y formas mutantes funcionales en casos raros de EP familiar¹⁰, lo que sugiere claramente que el Nurrl es un objetivo prometedor para el desarrollo de nuevos fármacos modificadores de la enfermedad por lo que respecta a la EP¹¹. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de agonistas de Nurrl.
- 20

Síntesis

- Como continuación a los esfuerzos de los inventores por desarrollar nuevos andamios moleculares estructuralmente diversos para el tratamiento de la malaria [Rawat, D. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 1446; Rawat, D. S. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17, 5632; Rawat, D. S. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 2816; Manohar, S., Khan, S. I., Rawat, D. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 322; Manohar, S., Khan, S. I., Rawat, D. S. *Chem. Biol. Drug Des.* 2011, 78, 124; Manohar, S., Rajesh, U. C. Khan, S. I., Tekwani, B. L., Rawat, D. S. *ACS Med. Chem. Lett.* 2012, 3, 555; and Manohar, S., Khan, S.I., Rawat, D. S. *Chem. Biol. DrugDes.*, Aceptado, 2013 (DOI: 10.1111/cbdd.12108)], se han puesto en marcha iniciativas para unir entidades de 4-aminoquinolina y pirimidina a través de un enlazador flexible para que la molécula disponga de suficiente flexibilidad para encajar en el sitio de unión de la diana y, como resultado, este tipo de moléculas híbridas pueden mostrar una mejor actividad antimalaria.
- 25
- 30

[0004] En un aspecto, la divulgación proporciona un compuesto de la fórmula (X):

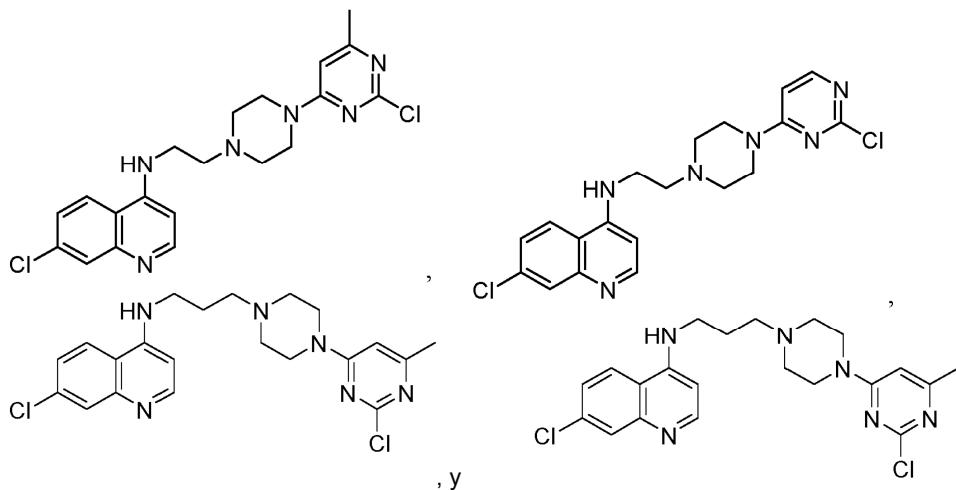


- 35 donde:

R es hidrógeno, CH₃, C1, CF₃ o CN;

R₁ es amina cíclica o acíclica; y

L es opcionalmente alquilo C₂-C₃₀ sustituido, o anillo cíclico saturado; o un compuesto seleccionado entre cualquiera de los compuestos siguientes:



Los compuestos divulgados en el presente incluyen sales, hidratos, solvatos, mezclas esteroisoméricas y enantiómeros de los mismos farmacéuticamente aceptables.

5 La divulgación proporciona asimismo una composición farmacéutica que comprende un compuesto divulgado en el presente documento y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la divulgación proporciona un compuesto divulgado en el presente documento para el uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un sujeto, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto divulgado en el presente documento a un sujeto que presenta esa necesidad.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un compuesto divulgado en el presente documento para el uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un sujeto, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto divulgado en el presente documento a un sujeto que presenta esa necesidad.

15 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un compuesto divulgado en el presente documento para el uso en un método de tratamiento de la inflamación o un trastorno asociado con la inflamación en un sujeto que presenta esa necesidad, donde el método comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en el presente documento.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona un kit que incluye un compuesto divulgado aquí junto con instrucciones para la administración del compuesto al sujeto que presenta esa necesidad.

20 La divulgación proporciona asimismo un método ex vivo para provocar la diferenciación de una célula, por ejemplo una célula madre, una neurona dopaminérgica, poniendo en contacto la célula con un compuesto divulgado en el presente documento.

25 La divulgación presenta asimismo un compuesto divulgado aquí para el uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un sujeto, que comprende la administración conjunta de: i) una composición que contiene células madre al sujeto, y ii) un compuesto divulgado en el presente documento en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de las células madre.

En algunos aspectos de la presente invención, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson (EP).

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las estructuras de amodiaquina (AQ) y cloroquina (CQ).

30 La Figura 2 muestra la estructura de algunos ejemplos de análogos de aminoquinolina-pirimidina con arreglo a realizaciones de los compuestos divulgados en el presente documento.

Las Figuras 3-12 muestran compuestos de la presente divulgación.

35 Las Figuras 13A-13I muestran la identificación de amodiaquina (AQ) y cloroquina (CQ) como activadores de Nurrl. (Fig. 13A) Estructuras químicas de tres compuestos principales que activan la función de transcripción de Nurrl. En particular, todos los compuestos contienen un andamio idéntico, 4-amino-7-cloroquinolina (resaltado en color rojo), lo que sugiere

claramente una relación estructura-actividad con respecto a la activación de Nurrl. (Fig. 13B) AQ y CQ aumentan la actividad de transcripción de construcciones informadoras (*reporter*) basadas en Nurrl: actividades de transcripción completas dependientes de Nurrl (fNurr; panel izquierdo) y dependientes del dominio de unión al ligando de Nurrl (Nurrl LBD; panel derecho). El nivel basal de la actividad de transcripción se normalizó a 1. Las barras representan medias \pm desviaciones estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes. (Fig. 13C) Efecto de siARN específico de Nurrl sobre la actividad de transactivación de Nurrl LBD. La reducción de la expresión de Nurrl mediante tratamiento con siRNA específico de Nurrl limitó la actividad del gen informador de la construcción Nurrl LBD, lo que sugiere que esta actividad está mediada por Nurrl. (Fig. 13D) Se transfecaron células SK-N-BE(2)C de neuroblastoma humano con el SRC1 o SRC3 marcado (flag) N-terminal y el Nurrl de longitud completa marcado myc C-terminal. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con 30 μ M de AQ o 100 μ M de CQ durante 16 horas. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron (IP) utilizando anticuerpos anti-flag y se analizaron mediante inmnoblot (IB) utilizando anticuerpos anti-myc. (Fig. 13E) Efecto de las proteínas de SRC sobre la transactivación de Nurrl inducida por AQ y CQ. Las células SK-N-BE(2)C se transfecaron con VP 16-SRC1 o VP16-SRC3, un plásmido efector (pSV GAL_(DBD)-N_(LBD)), y un plásmido informador (p8xUAS-Luc), y se trataron con 30 μ M AQ o 100 μ M CQ durante 16 horas. La multiplicación de la inducción se obtuvo comparando cada actividad de luciferasa con el nivel basal obtenido por transfección no SRC. (Fig. 13F) AQ demostró una interacción altamente específica con Nurrl LBD evaluada mediante análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Los sensogramas se obtuvieron a partir de la inyección de una serie de concentraciones de AQ sobre Nurrl-LBD y RXR-LBD inmovilizados. Las concentraciones (μ M) se muestran junto a las flechas. (Fig. 13G) Espectros de fluorescencia de Nurrl-LBD y RXR-LBD en presencia de concentraciones crecientes de AQ tras excitación a 280nm en PBS (pH 7.2). Las flechas indican cambios de señal a medida que aumenta la concentración de AQ (0, 0,1nM, 1nM, 10nM, 100nM y 1 μ M). (Fig. 13H) Unión por saturación de la proteína de Nurrl-LBD recombinante utilizando [³H]-CQ. La proteína de Nurrl-LBD se incubó toda la noche a 4°C con concentraciones crecientes (3,9, 7,8, 15,5, 31, 62,5, 125, 250, 500, 1000 nM) de [³H]-CQ. La unión no específica se determinó en presencia de un exceso molar de 1000 veces de CQ sin marcar. La unión no específica se calculó como la diferencia entre la unión total y la no específica. El gráfico muestra el análisis de Scatchard de la unión específica. (Fig. 13I) Competencia de AQ, CQ y primaquina (PQ) con [³H]-CQ para la unión al Nurrl-LBD. Se incubaron concentraciones crecientes de AQ, CQ o PQ no marcadas con 500nM [³H]-CQ y Nurrl-LBD. Los datos representan la media de triplicados de tres experimentos independientes. Los valores K_d, K_i y B_{max} de todos los gráficos se generaron utilizando el programa de regresión no lineal Prism versión 5.02.

Las Figuras 14A-14G muestran efectos funcionales de AQ y CQ. (Fig. 14A y 14B) La AQ estimuló la generación y la expresión genética de neuronas DA de progenitores neurales aisladas de córtex de rata E14.5 de manera dependiente de la dosis. Los precursores corticales se sometieron a transducción con retrovirus con expresión de Nurrl y las células TH+ se visualizaron mediante inmunotinción contra proteína de TH. La diferenciación se indujo mediante la retirada de bFGF un día después de la infección viral y se añadió AQ durante dos horas en el periodo de diferenciación. Los análisis inmunocitoquímicos para TH (Fig. 14A) y los productos de las células de TH+/DAPI (Fig. 14B) para cada grupo de tratamiento se obtuvieron tras la diferenciación *in vitro* para 3d y 9d. Diferencia significativa del control en tres cultivos independientes. (Fig. 14C) Representación esquemática de la ubicación de los cebadores utilizados en el promotor de TH de rata (panel superior). Las secuencias de los cebadores se muestran en materiales y métodos. El ensayo ChIP muestra captación de Nurrl dependiente de AQ o CQ para los promotores de TH NL1 y NL3. Las células PC12 de rata se trataron con 20 μ M de AQ o 70 μ M de CQ durante 15 horas. El ensayo ChIP se realizó con IgG o anticuerpos alfa-Nurrl (E-20). *p<0,05 y **p<0,005 versus no tratado. Los resultados se expresan como la media de tres experimentos independientes. Las barras de error representan desviaciones estándar. (Figs. 14D-14F) Cultivos primarios de neuronas DA mesencefálicas de rata se trataron con 20 μ M de 6-OHDA durante 24 horas en presencia o ausencia de 5 μ M de AQ y 20 μ M de CQ. (Fig. 14D) Se midieron el número de neuronas Th-positivas y (Fig. 14E) el índice de absorción de [³H]DA. (Fig. 14F) La supervivencia de las células se midió con el ensayo de reducción del MTT en células DA tratadas con 6-OHDA solo o en combinación con AQ. Los valores de cada tratamiento se expresaron como un porcentaje del control no tratado para el ensayo del MTT. (Fig. 14G) La AQ suprime la expresión inducida por LPS de citoquinas proinflamatorias. Se trató microglía primaria de cerebros de rata PI con 1 ng/ml de LPS durante cuatro horas en presencia o ausencia de AQ (10 y 20 μ M). Los niveles de expresión de mRNA se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron con GAPDH. Cada barra representa las medias + SEM de n = 4-5. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, en comparación con el grupo tratado solo con LPS.

Las Figuras 15A-15E muestran los efectos de tratamientos con AQ en un modelo de EP en ratas lesionadas por 6-OHDA. (Fig. 15A) Representación esquemática de la administración de AQ a ratas lesionadas por 6-OHDA. Las ratas con lesiones unilaterales del estriado por 6-OHDA se trataron con AQ o solución salina durante dos semanas, comenzando un día antes de la lesión. La sombra gris indica tratamiento con L-DOPA durante dos semanas como control del test AIMS. (Fig. 15B) El test rotacional inducido por anfetamina se realizó cuatro y seis semanas (panel derecho) tras la lesión por 6-OHDA. Se observaron diferencias significativas en el número de comportamientos rotacionales inducidos por anfetaminas entre los dos grupos a las cuatro y a las seis semanas. (Fig. 15C) Las fibras y neuronas TH+ eran abundantes en el ST y la SN del lado normal, mientras que se observó un marcado descenso en el ST y la SN del lado derecho de las ratas lesionadas por 6-OHDA. En contraste, se salvaron abundantes células TH-inmunopositivas no solo en el cuerpo estriado, sino también

- en la SN del grupo tratado con AQ, como se comprobó en el examen realizado seis semanas después de la lesión. Barra de escala: negro = 200, blanco = 100, rojo = 20 μ m. (Fig. 15D) El recuento esterológico en ratas tratadas con AQ muestra que se salvan aproximadamente el 60% de neuronas TH⁺ en el lado de la lesión, frente a aproximadamente el 10% en los animales tratados con solución salina. (Fig. 15E) La activación microglial de Iba1⁺ producida por la lesión por 6-OHDA se redujo drásticamente con el tratamiento con AQ. Barra de escala: blanco = 50, rojo = 10 μ m. (Fig. 15F) El tratamiento de ratas lesionadas por 6-OHDA con L-DOPA, pero no con AQ, demostró graves efectos secundarios, medidos por puntuaciones AIM. Se realizó un seguimiento de cuatro tipos de AIM (axial, extremidades anteriores, orolingual y locomotor) en las ratas a las dos y a las seis semanas de la lesión. El comportamiento de cada AIM se controló y se puntuó en una escala de 0-4 y se sumaron las puntuaciones. Las barras representan la media + SEM ($^{\#}p < 0,06$, $^{\ast}p < 0,01$, $^{\ast\ast}p < 0,0003$, $< 0,0001$).
- Las Figuras 16A-16D muestran que la AQ y la CQ activan la actividad de transcripción de Nurrl de longitud completa (Figuras 16A y 16B) y de Nurrl LBD (Figuras 16C y 16D) de manera dependiente de la dosis.
- La Figura 17 muestra el efecto de siRNA específico de Nurrl sobre la actividad de transcripción de Nurrl de longitud completa.
- La Figura 18 muestra que el análisis de la relación entre estructura y actividad (SAR) indica que la 4-amino-7-cloroquina puede ser una característica esencial para la función de transactivación de Nurrl. Los inventores examinaron la función de los compuestos de quinolina relacionados para comprobar la potencial activación de Nurrl. Ninguno de los compuestos de quinolina (sin 4-amino-7-cloroquinolina) aquí testados mostraron ninguna transactivación detectable de Nurrl LBD en un amplio intervalo de concentraciones. Las barras representan medias + SEM de tres experimentos independientes.
- La Figura 19 muestra la selectividad del objetivo de la AQ para los LBD de diversos NR. 30uM de AQ activan claramente la función del LBD de Nurrl, pero no otros NR aquí testados, lo que indica una elevada especificidad. La reactividad positiva de estas construcciones de NR se confirmó mediante los activadores conocidos (2nM dexametasona, 20nM, ácido retinoico, 2 μ M GW3965, 50nM GW7647, y 5nM GW1929 para GR, RXR, LXR, PPAR α , y PPAR γ , respectivamente). El nivel basal de la actividad de transcripción se normalizó en 1. Las barras representan medias \pm SEM de tres experimentos independientes. (Nur77; NR4A1; subfamilia del receptor nuclear 4 grupo A miembro 1, GR; receptor de glucocorticoide, LXR; receptor hepático X alfa, RXR; receptor X retinoide alfa, PPAR α ; receptor alfa del proliferador activado de peroxisoma, PPAR γ ; receptor gamma del proliferador activado de peroxisoma)
- Las Figuras 20A-20C muestran que la AQ no interactúa con Nur77-LBD. (Fig. 20A) La AQ no demostró ninguna interacción con Nur77-LBD en la evaluación por análisis SPR. Se obtuvieron sensogramas de la inyección de una serie de concentraciones de AQ sobre proteínas inmovilizadas de Nur77-LBD. (Fig. 20B y 20C) Espectros de fluorescencia de Nur77-LBD en presencia de concentraciones crecientes de AQ (0, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) (Fig. 20B), o de RXR-LBD en presencia de concentraciones crecientes de ácido 9-cis-retinoico (0, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) como control positivo (Fig. 20C) tras la excitación a 280nm en PBS (pH 7.2).
- La Figura 21 muestra los resultados del análisis por PCR en tiempo real que demuestran que el tratamiento con AQ mejora la expresión de los genes específicos de mDA (por ejemplo, tirosina hidroxilasa (TH), transportador de dopamina (DAT), transportador de monoamina vesicular (VMAT) y descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC)) durante la diferenciación *in vitro* de células madres neurales. Los mRNA de cada grupo de tratamiento se obtuvieron tras la diferenciación *in vitro* para 9d.
- Las Figuras 22A y 22B muestran el efecto de AQ y CQ sobre la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias. (Fig. 22A) La AQ suprime la expresión inducida por LPS de citoquinas proinflamatorias en la célula BV-2 microglial murina tratada con 10 ng/ml de LPS durante cuatro horas en presencia o ausencia de AQ (10 y 15 μ M). (Fig. 22B) La CQ suprime la expresión inducida por LPS de citoquinas proinflamatorias. Se trató microglía primaria de cerebros de rata PI con 10 ng/ml de LPS durante cuatro horas en presencia o ausencia de 10 μ M de CQ). Los niveles de expresión de mRNA se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real y se normalizaron con GAPDH. Cada barra representa \pm SEM de $n = 6$. $^{\ast}p < 0,05$, $^{\ast\ast}p < 0,01$, $^{\ast\ast\ast}p < 0,001$, en comparación con el grupo tratado solo con LPS.
- La Figura 23 muestra que las células TH⁺ salvadas en el hemisferio lesionado de las ratas lesionadas por 6-OHDA tras los tratamientos con AQ coexpresaron marcadores neuronales DA maduros como FoxA2 y AADC. Barra de escala = 100 μ m.
- Las Figuras 24A-24H muestran que la AQ reduce la activación microglial en cerebros de rata inyectados con 6-OHDA. A las ratas se les administró solución salina (Figuras 24A, 24B, 24E y 24F) o AQ (Figuras 24C, 24D, 24G y 24H) durante dos semanas; a continuación fueron sacrificadas y se seccionaron los cerebros. Las secciones del cerebro incluyendo regiones SN (Figuras 24A-24D) y STR (Figuras 24E-H) se sometieron a inmunotinción con anticuerpos anti-Iba-1 y se contaron las células Iba-1⁺ tanto en el lado lesionado con en el lado intacto. Los datos representan la media \pm SEM. ($^{\ast\ast} p < 0,01$, $^{\ast\ast\ast} p < 0,001$). Barra de escala = 200 μ m.

Las Figuras 25A-25D muestran que el tratamiento con AQ de ratones ak/ak provocó mejoras funcionales en pruebas de comportamiento motor nigroestriatal específico, como el Pole test (Fig. 25A), el Test de barra transversal (Fig. 25B), el Test del cilindro (Fig. 25C), y el Test de Rotarod (Fig. 25D). El tratamiento con L-Dopa se utilizó como control positivo. Las barras representan la media \pm SEM (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

- 5 La Fig. 26 muestra que la AQ reduce la inflamación en la SN de ratón ak/ak; a los ratones ak/ak se les administró solución salina o AQ durante dos semanas. Los ratones fueron sacrificados y se seccionaron sus cerebros. Las secciones de regiones SN de ratones sin manipular y ak/ak se sometieron a inmunotinción con anticuerpos anti-CD 1 lb y anti-TH. El recuento estereológico de microglía CD1 lb⁺ se realizó en la región SN del ratón ak/ak y se presentó como porcentaje del número de células en el tipo salvaje. Los datos representan la media ± SEM (**p<0,01).

10 La Figura 27 muestra que algunos derivados de CQ que conservan la estructura de 4-amino-7-cloro quinolona, como los que se muestran en la Figura 2, presentan una eficacia notablemente superior que el compuesto de partida, la CQ. A pesar de que la EC₅₀ de la CQ es aproximadamente de 60 µM (véase la Figura 16), la EC₅₀ de estos cuatro derivados es inferior a una décima parte de CQ.

Descripción detallada

- 15 Un objeto de la invención es desarrollar un método para la preparación de híbridos basados en aminoquinolina en los que se une covalentemente 4-aminoquinolina, 8-aminoquinolina, mefloquina, amidoquina a pirimidina, pirazina, triazina C7/C5 curcuminoídes heteroaromáticos, aromáticos, aminoácidos, péptidos, azúcar, esteroides y cualesquiera otros farmacóforos antimalaria y todas las combinaciones posibles relacionadas. Otro objeto de la invención es sintetizar híbridos basados en aminoquinolina en los que la aminoquinolina está unida a varios farmacóforos conocidos por su actividad antimalaria. Un objeto adicional de esta invención es el uso de estos híbridos basados en aminoquinolina para el tratamiento de la malaria utilizando cualquier agente de transmisión. Otro objeto más de la invención es el uso de estos híbridos basados en aminoquinolina para el tratamiento de la enfermedad cuando la reducción de la actividad de Nurr1 contribuye a la patología o sintomatología de la enfermedad. Otro objeto adicional más de la invención es el uso de estos híbridos basados en aminoquinolina para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo. Otro objeto adicional de la invención es el uso de estos híbridos basados en aminoquinolina para el tratamiento de la inflamación o un trastorno asociado a la inflamación. Otro objeto más de la invención es la unión de estos híbridos basados en aminoquinolina con polímeros, dendrímeros y nanomateriales biocompatibles para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Otro objeto de la invención es el uso de estos compuestos para el tratamiento antimalaria, en monoterapia o en combinación con cualesquiera otros fármacos antimalaria. Estos objetos anteriormente mencionados describen algunos de los objetivos relevantes de la invención. Se entenderá que estos objetivos se ofrecen únicamente para ilustrar algunas de las características y aplicaciones más destacadas de la invención propuesta.

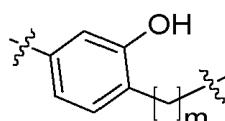
A los efectos del presente documento, el término "enlazador" se refiere a una fracción orgánica que conecta dos partes de un compuesto. Los enlazadores comprenden típicamente un enlace directo o un átomo como oxígeno o azufre, una unidad como NR^N , $\text{C}(\text{O})$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}$, SO_2 , SO_2NH o una cadena de átomos, como alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquinilo, heterocicliclalquilo, heterocicliclalquenilo, heterocicliclalquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclico, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilarilalquilo, alquilarilalquenilo, alquilarilalquinilo, alquenilarilalquilo, alquenilarilalquenilo, alquenilarilalquinilo, alquinilarilalquilo, alquinilarilalquenilo, alquinilarilalquinilo, alquiheteroarilalquilo, alquiheteroarilalquenilo, alquiheteroarilalquinilo, alqueniheteroarilalquilo, alqueniheteroarilalquenilo, alqueniheteroarilalquinilo, alquiniheteroarilalquilo, alquiniheteroarilalquenilo, alquiniheteroarilalquinilo, alquiheterocicliclalquilo, alquiheterocicliclalquenilo, alquiheterocicliclalquinilo, alqueniheterocicliclalquilo, alqueniheterocicliclalquenilo, alqueniheterocicliclalquinilo, alquiniheterocicliclalquilo, alquiniheterocicliclalquenilo, alquiniheterocicliclalquinilo, alquiniheterocicliclalquilo, alquilarilo, alquenilarilo, alquinilarilo, alquiheteroarilo, alqueniheteroarilo, alquiniheteroarilo, donde uno o más metilenos pueden ser interrumpidos o terminados por O, S, $\text{S}(\text{O})$, SO_2 , $\text{N}(\text{R}^N)_2$, $\text{C}(\text{O})$, grupo de enlace escindible, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocíclico sustituido o no sustituido; donde RN es hidrógeno, acilo, alifático o alifático sustituido.

La estructura y el tamaño exactos del enlazador puede variar de forma considerable y dentro del alcance de los aspectos de la presente divulgación podemos encontrar numerosas variaciones del enlazador. Tal como se usa aquí, el "enlazador" puede comprender una amplia variedad de estructuras. En muchos aspectos de la presente divulgación es deseable que el enlazador tenga un tamaño y carácter suficientes para proporcionar cierto espacio y/o flexibilidad en la conexión entre las dos partes de la molécula que conectan el enlazador, pero sin alcanzar un peso molecular tan elevado que impida la solubilidad en agua o la absorbilidad transmembrana de los compuestos resultantes.

Por consiguiente, en algunos aspectos de la presente divulgación, el enlazador se selecciona del grupo compuesto por alquíleno ramificado o lineal, alqueníleno ramificado o lineal, alquiníleno ramificado o lineal, ciclico, heterociclico, arilo, heteroarilo, O, NH, S, S, SS, SO₂, O-alquíleno, NH-alquíleno, S-alquíleno, aminoácido, carbohidrato y cualesquiera combinaciones de estos.

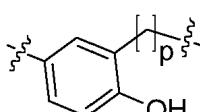
En algunos aspectos de la presente divulgación, el enlazador es $-(CH_2)_n-$ o $-CH(CH_3)-(CH_2)_n-$, donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20. En algunas realizaciones, n es 1. En algunos aspectos de la presente divulgación, n es 2. En algunos otros aspectos de la presente divulgación, n es 3. En algunos otros aspectos más de la presente divulgación, n es 4. En algunos otros aspectos más de la presente divulgación, n es 5. En algunos otros aspectos de la presente divulgación, n es 6. En algunos otros aspectos más de la presente divulgación, n es 7. En un aspecto de la presente divulgación, n es 8.

5



10

En algunos aspectos de la presente divulgación, el enlazador es, donde m es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20. En algunos aspectos de la presente divulgación, m es 0. En algunos otros aspectos de la presente divulgación, m es 1. En algunos otros aspectos más de la presente divulgación, m es 2. En algunos otros aspectos más de la presente divulgación, m es 3.



15

En algunos aspectos de la presente divulgación, el enlazador es, donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20. En algunos aspectos de la presente divulgación, p es 0. En algunos otros aspectos de la presente divulgación, p es 1. En algunos otros aspectos más de la presente divulgación, p es 2. En algunos otros aspectos más de la presente divulgación, p es 3.

Otros ejemplos de enlazadores que se pueden usar se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos de agentes reticulantes heterobifuncionales.

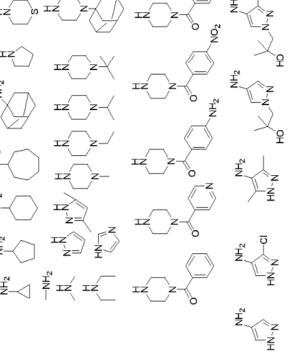
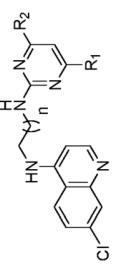
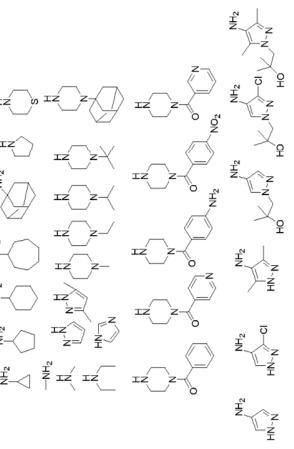
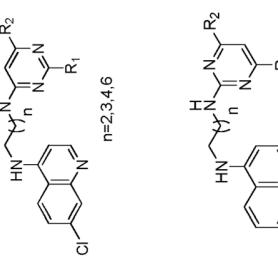
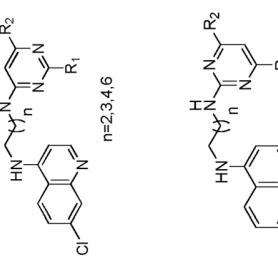
Agentes reticulantes heterobifuncionales			
Enlazador	Reactivos respecto a	Ventajas y aplicaciones	Longitud del brazo espaciador tras reticulación (angstroms)
SMPT	Aminas primarias Sulfhidrilos	Mayor estabilidad	11,2
SPDP	Aminas primarias Sulfhidrilos	Tiolación Reticulación escindible	6,8
LC-SPDP	Aminas primarias Sulfhidrilos	Brazo espaciador ampliado	15,6
Sulfo-LC-SPDP	Aminas primarias Sulfhidrilos	Brazo espaciador ampliado Soluble en agua	15,6
SMCC	Aminas primarias Sulfhidrilos	Grupo reactivo maleimida estable Conjugación enzima-anticuerpo Conjugación proteína hapteno-portador	11,6

(continuación)

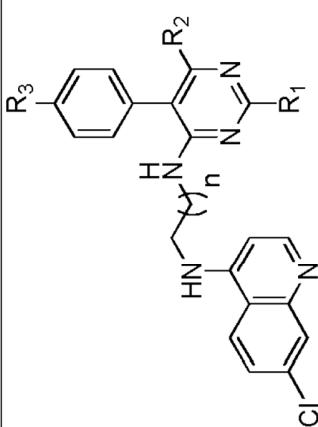
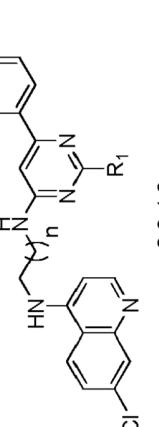
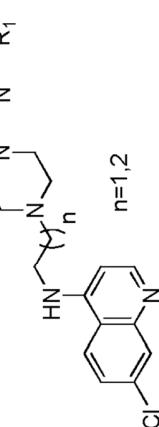
Agentes reticulantes heterobifuncionales			
Enlazador	Reactivos respecto a	Ventajas y aplicaciones	Longitud del brazo espaciador tras reticulación (angstroms)
Sulfo-SMCC	Aminas primarias Sulfhidrilos	Grupo reactivo maleimida estable Conjugación enzima-anticuerpo	11,6
MBS	Aminas primarias Sulfhidrilos	Conjugación enzima-anticuerpo Conjugación proteína hapteno-portador	9,9
Sulfo-MBS	Aminas primarias Sulfhidrilos	Soluble en agua	9,9
SIAB	Aminas primarias Sulfhidrilos	Conjugación enzima-anticuerpo	10,6
Sulfo-SIAB	Aminas primarias Sulfhidrilos	Soluble en agua	10,6
SMPB	Aminas primarias Sulfhidrilos	Brazo espaciador ampliado Conjugación enzima-anticuerpo	14,5
Sulfo-SMPB	Aminas primarias Sulfhidrilos	Brazo espaciador ampliado - Soluble en agua	14,5
EDC/Sulfo-NHS	Aminas primarias Grupos carboxilo	Conjugación hapteno-portador	0
ABH	Carbohidratos No selectivo	Reacciona con fracciones de azúcar	11.9

En algunos aspectos de la presente divulgación, un compuesto de la presente divulgación es como se muestra en la Tabla 2. Cualesquier compuestos que no entren en el alcance de las reivindicaciones de la presente divulgación se proporcionan a modo de ejemplos comparativos.

Tabla 2: Realizaciones de los compuestos de la invención y ejemplos comparativos.

S. N. ^o	Estructura del prototipo	Grupos variables	
		R ₁	R ₂
1.	 <p>$n=2,3,4,6$</p>  <p>$n=2,3,4,6$</p>		H, Me, Cl, CN, CF ₃
2.	 <p>$n=2,3,4,6$</p>	R ₁ puede ser igual	H, F, Cl, OMe, Et
3.	 <p>$n=2,3,4,6$</p>	R ₁ puede ser igual	H, Me, Cl, CN, CF ₃

(continuación)

S. N. ^o	Estructura del prototipo	Grupos variables		
		R ₁	R ₂	R ₃
4.	 <p>n=2,3,4,6</p>	R ₁ puede ser igual	H, Me	H, F, Cl, OMe, Et
2.	 <p>n=2,3,4,6</p>	R ₁ puede ser igual	H, Me	
5.	 <p>n=1,2</p>	R ₁ puede ser igual	H, Me, Cl	

(continuación)

S. N. ^o	Estructura del prototipo	Grupos variables	
		R ₁	R ₂
7.		R ₁ puede ser igual	H, Me, Cl
8.		R ₁ puede ser igual	H, Me, Cl
9.		R ₁ puede ser igual	No R ₂

En algunos aspectos de la presente divulgación, el compuesto de la invención o el ejemplo comparativo es un compuesto mostrado en la Tabla 3.

Tabla 3: Algunos ejemplos de compuestos de la invención y algunos ejemplos comparativos.

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
1.	SM 484A		C ₁₇ H ₁₇ C ₁₂ N ₅	362,26	5,7	DMSO	AQ-pirimidina
2.	SM 484B		C ₁₇ H ₁₇ C ₁₂ N ₅	362,26	5,9	DMSO	AQ-pirimidina
3.	SM 485		C ₂₂ H ₂₇ C ₁₂ N ₆	410,94	4,5	DMSO	AQ-pirimidina
4.	SM 488A		C ₁₆ H ₁₅ C ₁₂ N ₅	348,23	1,6	DMSO	AQ-pirimidina
5.	SM 488B		C ₁₆ H ₁₅ C ₁₂ N ₅	348,23	3,5	DMSO	AQ-pirimidina
6.	SM 489		C ₂₀ H ₂₃ C ₁₂ N ₆ O	398,89	1,5	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUUESTO
7.	SM 490		C ₂₁ H ₂₅ C ₁ N ₆	396,92	3,8	DMSO	AQ-pirimidina
8.	SM 491		C ₂₁ H ₂₆ C ₁ N ₇	411,93	4,2	DMSO	AQ-pirimidina
9.	SM 493		C ₂₁ H ₂₅ C ₁ N ₆ ₀	412,92	3,7	DMSO	AQ-pirimidina
10.	SM 494		C ₂₂ H ₂₈ C ₁ N ₇	425,96	2,3	DMSO	AQ-pirimidina
11.	SM 497		C ₂₃ H ₃₀ C ₁ N ₇	439,98	1,7	DMSO	AQ-pirimidina
12.	SM 498A		C ₁₈ H ₁₉ C ₁ ₂ N ₅	376,28	6,2	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N.º	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
13.	SM 498B		C ₁₈ H ₁₉ C ₁₂ N ₅	376,28	8,7	DMSO	AQ-pirimidina
14.	SM 499		C ₂₃ H ₂₉ C ₁₂ N ₆	424,97	4,5	DMSO	AQ-pirimidina
15.	SM 500		C ₂₂ H ₂₇ C ₁₂ N ₆ O	426,94	4,6	DMSO	AQ-pirimidina
16.	SM 501		C ₂₃ H ₃₀ C ₁₂ N ₇	439,98	3,1	DMSO	AQ-pirimidina
17.	SM 502		C ₂₄ H ₃₂ C ₁₂ N ₇	454,01	3,8	DMSO	AQ-pirimidina
18.	SM 504A		C ₂₀ H ₂₃ C ₁₂ N ₅	404,34	3,5	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
19.	SM 504B		C ₂₀ H ₂₃ C ₁₂ N ₅	404,34	2,5	DMSO	AQ-pirimidina
20.	SM 505		C ₂₅ H ₃₃ C ₁₁ N ₆	453,02	7,2	DMSO	AQ-pirimidina
21.	SM 506		C ₂₄ H ₃₁ C ₁₁ N ₆ O	455,00	3,1	DMSO	AQ-pirimidina
22.	SM 507		C ₂₅ H ₃₄ C ₁₁ N ₇	468,04	2,0	DMSO	AQ-pirimidina
23.	SM 695A		C ₁₅ H ₁₂ C ₁₃ N ₅	368,65	7,6	DMSO	AQ-pirimidina
24.	SM 695B		C ₁₅ H ₁₂ C ₁₃ N ₅	368,65	5,4	DMSO	AQ-pirimidina
25.	SM 696		C ₁₉ H ₂₀ Q ₂ N ₆ O	419,31	5,2	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
26.	SM 697		C ₂₀ H ₂₂ C ₁₂ N ₆	417,33	6,4	DMSO	AQ-pirimidina
27.	SM 699		C ₂₀ H ₂₂ C ₁₂ N ₆	417,33	6,7	DMSO	AQ-pirimidina
28.	SM 700		C ₁₉ H ₂₀ C ₁₂ N ₆ 0	419,31	7,9	DMSO	AQ-pirimidina
29.	SM 701		C ₂₀ H ₂₃ C ₁₂ N ₇	432,35	5,8	DMSO	AQ-pirimidina
30.	SM 702		C ₂₁ H ₂₅ C ₁₂ N ₇	446,38	3,8	DMSO	AQ-pirimidina
31.	SM 703		C ₂₀ H ₂₃ C ₁₂ N ₇	432,35	7,2	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
32.	SM704		C ₂₁ H ₂₅ C ₁₂ N ₇	446,38	4,0	DMSO	AQ-pirimidina
33.	SM710A		C ₁₆ H ₁₄ C ₁₃ N ₅	382,67	6,7	DMSO	AQ-pirimidina
34.	SM710B		C ₁₆ H ₁₄ C ₁₃ N ₅	382,67	6,1	DMSO	AQ-pirimidina
35.	SM711		C ₂₁ H ₂₄ C ₁₂ N ₆	431,36	4,4	DMSO	AQ-pirimidina
36.	SM712		C ₂₀ H ₂₂ C ₁₂ N ₆ O	433,33	6,2	DMSO	AQ-pirimidina
37.	SM713		C ₂₁ H ₂₅ C ₁₂ N ₇	446,38	4,3	DMSO	AQ-pirimidina

(continuacion)

S. N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
38.	SM714		C ₂₂ H ₂₇ C ₁₂ N ₇	460,40	5,6	DMSO	AQ-pirimidina
39.	SM715		C ₂₁ H ₂₄ C ₁₂ N ₆	431,36	6,8	DMSO	AQ-pirimidina
40.	SM716		C ₂₀ H ₂₂ C ₁₂ N ₆ O	433,33	6,1	DMSO	AQ-pirimidina
41.	SM717		C ₂₁ H ₂₅ C ₁₂ N ₇	446,38	2,5	DMSO	AQ-pirimidina
42.	SM718		C ₂₂ H ₂₇ C ₁₂ N ₇	460,40	3,5	DMSO	AQ-pirimidina
43.	SM 719A		C ₁₆ H ₁₅ C ₁₂ N ₅	348,23	5,6	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
44.	SM 719B		C ₁₆ H ₁₅ C ₁₂ N ₅	348,23	8,0	DMSO	AQ-pirimidina
45.	SM 720		C ₂₁ H ₂₅ C ₁₂ N ₆	396,92	5,2	DMSO	AQ-pirimidina
46.	SM 721		C ₂₀ H ₂₃ C ₁₂ N ₆ O	398,89	5,8	DMSO	AQ-pirimidina
47.	SM 722		C ₂₁ H ₂₆ C ₁₂ N ₇	411,93	1,3	DMSO	AQ-pirimidina
48.	SM 723		C ₂₂ H ₂₈ C ₁₂ N ₇	425,96	4,1	DMSO	AQ-pirimidina
49.	SM 724		C ₂₁ H ₂₅ C ₁₂ N ₆	396,92	5,0	DMSO	AQ-pirimidina

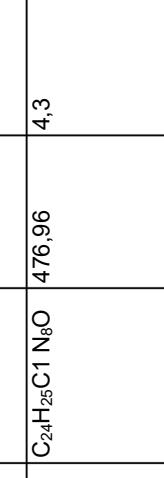
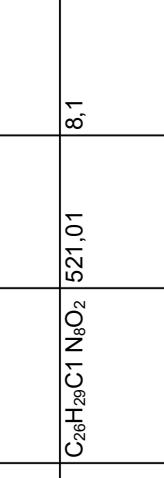
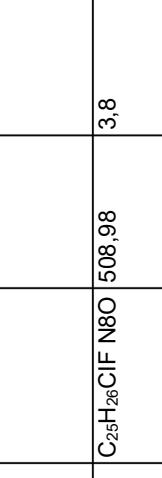
(continuación)

S. N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
50.	SM 725		C ₂₀ H ₂₃ C1 N ₆ O	398,89	6,7	DMSO	AQ-pirimidina
51.	SM 726		C ₂₁ H ₂₆ C1 N ₇	411,93	5,7	DMSO	AQ-pirimidina
52.	SM 727		C ₂₂ H ₂₈ C1 N ₇	425,96	7,7	DMSO	AQ-pirimidina
53.	SM 728A		C ₁₅ H ₁₃ C1 ₂ N ₅	334,20	7,2	DMSO	AQ-pirimidina
54.	SM 728B		C ₁₅ H ₁₃ C1 ₂ N ₅	334,20	5,8	DMSO	AQ-pirimidina
55.	SM 730		C ₂₀ H ₂₃ C1 N ₆	382,89	6,6	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
56.	SM 731		C ₁₉ H ₂₁ C ₁ N ₆ 0	384,86	4,4	DMSO	AQ-pirimidina
57.	SM 732		C ₂₀ H ₂₃ C ₁ N ₆ 0	382,89	4,1	DMSO	AQ-pirimidina
58.	SM 733		C ₁₉ H ₂₁ C ₁ N ₆ 0	384,86	1,0	DMSO	AQ-pirimidina
59.	SM 734		C ₂₀ H ₂₄ C ₁ N ₇	397,90	3,2	DMSO	AQ-pirimidina
60.	SM332		C ₂₅ H ₂₇ C ₁ N ₈ O ₂	506,99	1,5	DMSO	AQ-triazina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
61.	SM334		C ₂₄ H ₂₄ ClF N ₈ O	494,95	1,5	DMSO	AQ-triazina
62.	SM335		C ₂₆ H ₂₉ C1 N ₈ O	505,01	3,2	DMSO	AQ-triazina
63.	SM336		C ₂₄ H ₂₅ C1 N ₈ O	476,96	4,3	DMSO	AQ-triazina
64.	SM337		C ₂₆ H ₂₉ C1 N ₈ O ₂	521,01	8,1	DMSO	AQ-triazina
65.	SM339		C ₂₅ H ₂₆ ClF N ₈ O	508,98	3,8	DMSO	AQ-triazina

(continuación)

S. N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
66.	SM340		C ₂₇ H ₃₁ C ₁ N ₈ O	519,04	3,3	DMSO	AQ-triazina
67.	SM341		C ₂₅ H ₂₇ C ₁ N ₈ O	490,99	3,3	DMSO	AQ-triazina
68.	SM345		C ₂₂ H ₂₉ C ₁ N ₈ O ₂	472,97	1,7	DMSO	AQ-triazina
69.	SM349		C ₂₃ H ₃₁ C ₁ N ₈ O ₂	487,00	3,7	DMSO	AQ-triazina
70.	SM350		C ₂₁ H ₂₇ C ₁ N ₈ O ₂	458,94	5,7	DMSO	AQ-triazina
71.	SM351		C ₂₂ H ₂₉ C ₁ N ₈ O ₂	472,97	3,2	DMSO	AQ-triazina

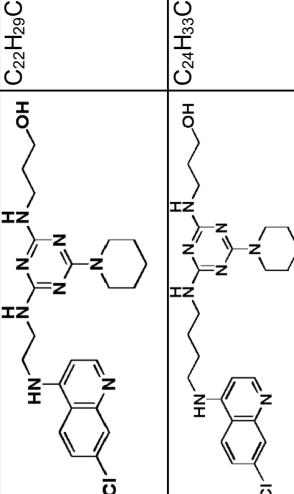
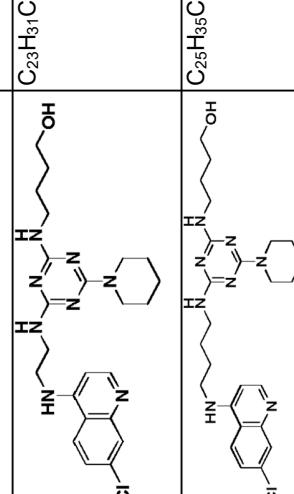
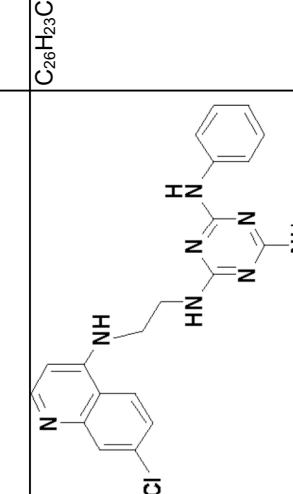
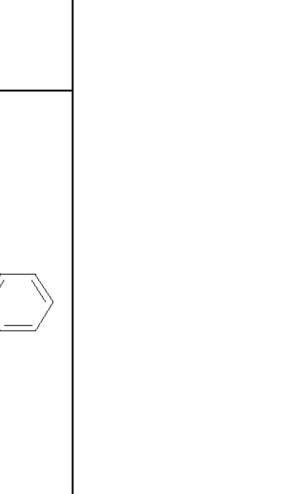
(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUUESTO
72.	SM352		C ₂₀ H ₂₅ C ₁ N ₈ O ₂	444,92	3,7	DMSO	AQ-triazina
73.	SM353		C ₂₁ H ₂₇ C ₁ N ₈ O ₂	458,94	3,2	DMSO	AQ-triazina
74.	SM356		C ₂₂ H ₃₁ C ₁ N ₈ O ₂	535,04	3,7	DMSO	AQ-triazina
75.	SM357		C ₂₆ H ₂₈ C ₁ F N ₈ O	523,00	3,1	DMSO	AQ-triazina
76.	SM358		C ₂₈ H ₃₃ C ₁ N ₈ O	533,07	3,5	DMSO	AQ-triazina

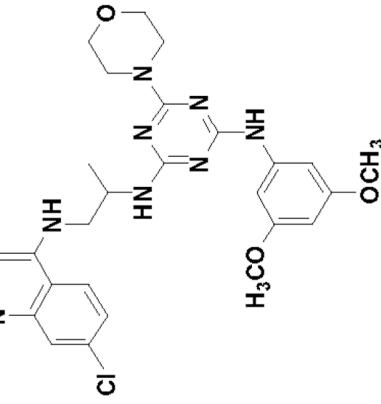
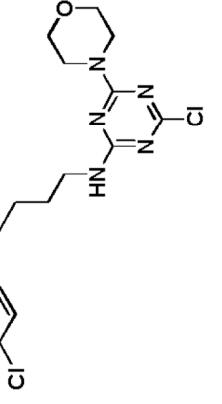
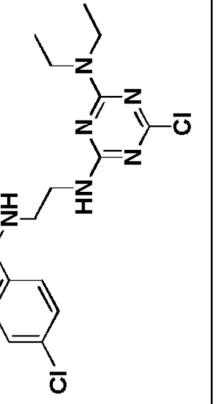
(continuación)

S. N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
77.	SM359		C ₂₆ H ₂₉ C ₁ N ₈ O	505,01	4,0	DMSO	AQ-triazina
78.	SM360		C ₂₂ H ₂₉ C ₁ N ₈ O ₂	472,97	5,3	DMSO	AQ-triazina
79.	SM361		C ₂₃ H ₃₁ C ₁ N ₈ O ₂	487,00	5,3	DMSO	AQ-triazina
80.	SM362		C ₂₄ H ₃₃ C ₁ N ₈ O ₂	501,02	4,0	DMSO	AQ-triazina
81.	SM365		C ₂₁ H ₂₇ C ₁ N ₈ O	442,95	4,8	DMSO	AQ-triazina
82.	SM367		C ₂₃ H ₃₁ C ₁ N ₈ O	471,00	3,0	DMSO	AQ-triazina

(continuación)

S. N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
83.	SM370		C ₂₂ H ₂₉ C ₁ N ₈ O	456,97	5,7	DMSO	AQ-triazina
84.	SM372		C ₂₄ H ₃₃ C ₁ N ₈ O	485,02	1,5	DMSO	AQ-triazina
85.	SM373		C ₂₃ H ₃₁ C ₁ N ₈ O	471,00	3,8	DMSO	AQ-triazina
86.	SM375		C ₂₅ H ₃₅ C ₁ N ₈ O	499,05	4,5	DMSO	AQ-triazina
87.	SM 129		C ₂₆ H ₃₃ C ₁ N ₈	482,97	1,7	DMSO	AQ-triazina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
88.	SM 130		C ₂₇ H ₃₁ C ₁ N ₈ O ₃	551,04	11,0	DMSO	AQ-triazina
89.	SM 132		C ₂₈ H ₃₃ C ₁ N ₈ O ₃	567,07	12,1	DMSO	AQ-triazina
90.	SM 133		C ₂₅ H ₂₂ C ₁ N ₈	554,86	2,7	DMSO	AQ-triazina
91.	SM 135		C ₂₀ H ₂₃ C ₁ N ₇ O	448,35	3,1	DMSO	AQ-triazina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
92.	SM 136		C ₂₀ H ₁₇ Cl ₂ N ₇	426,30	2,0	DMSO	AQ-triazina
93.	SM 137		C ₁₈ H ₂₁ Cl ₂ N ₇	406,31	2,2	DMSO	AQ-triazina
94.	SM 140		C ₃₂ H ₄₁ Cl ₁ N ₈ O ₃	622,17	5,5	DMSO	AQ-triazina
95.	SM 142		C ₂₂ H ₂₇ Cl ₁ N ₈ O ₂	470,96	2,5	DMSO	AQ-triazina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
96.	SM 143		C ₂₃ H ₂₉ C ₁ N ₈ O ₂	484,98	2,3	DMSO	AQ-triazina
97.	SM 144		C ₂₈ H ₂₇ C ₁	511,02	4,4	DMSO	AQ-triazina
98.	SM 146		C ₂₉ H ₂₉ C ₁ N ₈	525,05	3,5	DMSO	AQ-triazina
99.	SM 148		C ₃₂ H ₃₅ C ₁ N ₈	567,13	4,1	DMSO	AQ-triazina

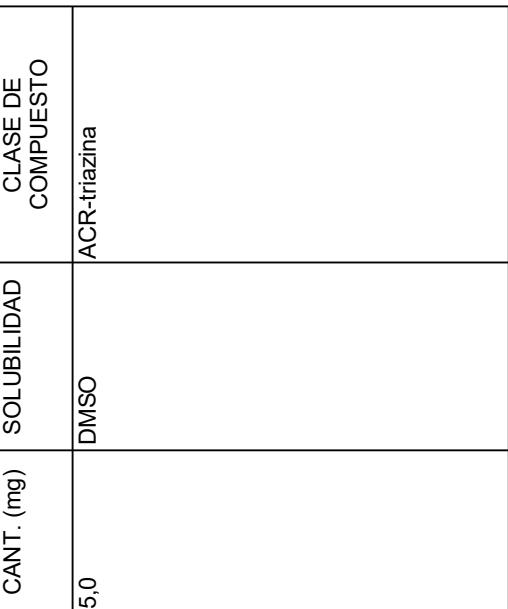
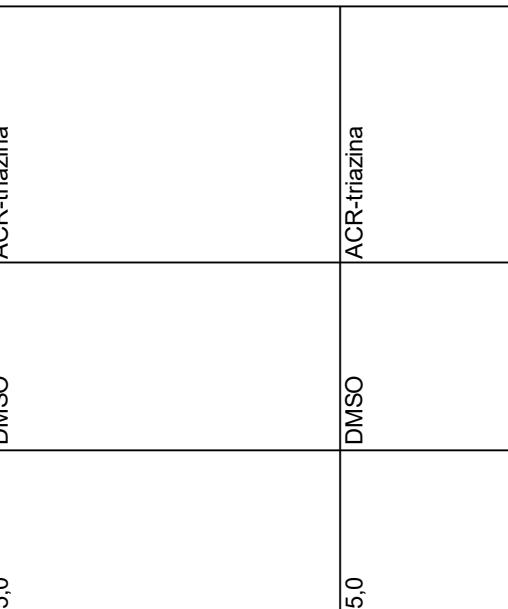
(continuación)

S. N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
100.	SM 151		C ₂₉ H ₂₂ N ₈	525,05	7,4	DMSO	AQ-triazina
101.	SM 189		C ₂₆ H ₃₅ C ₁	495,06	2,1	DMSO	AQ-
102.	SM 190		C ₂₇ H ₃₇ C ₁ N ₈	509,09	8,0	DMSO	AQ-triazina
103.	ATH 158		C ₃₂ H ₄₅ C ₁ N ₈ O ₃	615,13	5,0	DMSO	ACR-triazina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
104.	ATH 159		C ₃₃ H ₃₇ C ₁ N ₆ O ₃	629,15	5,0	DMSO	ACR-triazina
105.	ATH 164		C ₃₆ H ₃₆ C ₁ N ₉ O ₂	662,18	5,0	DMSO	ACR-triazina
106.	ATH 165		C ₂₈ H ₂₉ C ₁ N ₈ O ₂	545,04	5,0	DMSO	ACR-triazina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
107.	ATH 166		C ₂₉ H ₃₁ C ₁ N ₈ O ₂	559,06	5,0	DMSO	ACR-triazina
108.	ATH 170		C ₃₇ H ₃₈ C ₁ N ₉ O ₃	692,21	5,0	DMSO	ACR-triazina
109.	ATH 171		C ₃₈ H ₄₀ C ₁ N ₉ O ₃	706,24	5,0	DMSO	ACR-triazina

(continuación)

(continuación)

S N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
113.	ATH 184		C ₃₁ H ₃₃ C ₁ N ₈ O ₃	601,10	5,0	DMSO	ACR-triazina
114.	ATH 189		C ₃₁ H ₃₃ C ₁ N ₈ O ₂	585,10	5,0	DMSO	ACR-triazina

(continuación)

S. N.º	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
115.	ATH 191		C ₃₂ H ₃₅ C1 N ₈ O ₂	599,13	5,0	DMSO	ACR-triazina
116.	ATH 192		C ₃₃ H ₃₇ C1 N ₈ O ₃	629,15	5,0	DMSO	ACR-triazina
117.	ATH 194		C ₃₄ H ₃₉ C1 N ₈ O ₃	643,18	5,0	DMSO	ACR-triazina

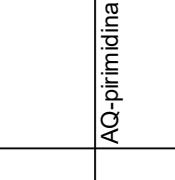
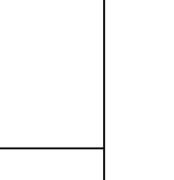
(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
118.	ATH 195		C ₂₈ H ₂₉ C ₁ N ₈ O ₂	545,04	5,0	DMSO	ACR-triazina
119.	ATH 196		C ₂₉ H ₃₁ C ₁ N ₈ O ₂	559,06	5,0	DMSO	ACR-triazina
120.	ATH 198		C ₃₇ H ₃₈ C ₁	676,21	5,0	DMSO	ACR-triazina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
121.	ATH 200		C ₃₂ H ₃₅ C ₁ N ₈ O ₂	599,13	5,0	DMSO	ACR-triazina
122.	ATH 201		C ₃₃ H ₃₇ C ₁ N ₈ O ₂	613,15	5,0	DMSO	ACR-triazina
123.	ATH 214		C ₂₅ H ₂₅ C ₁ N ₆ O ₂	476,96	8,7	DMSO	AQ-pririmidina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUUESTO
124.	ATH 218		C ₁₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₅	360,24	7,0	DMSO	AQ-pirimidina
125.	ATH 220		C ₂₄ H ₂₃ C1N ₆ O	446,93	8,2	DMSO	AQ-pirimidina
126.	ATH 223		C ₂₃ H ₂₀ ClF N ₆	434,90	11,9	DMSO	AQ-pirimidina
127.	ATH 226		C ₂₃ H ₂₀ Br C1N ₆	495,80	7,2	DMSO	AQ-pirimidina
128.	ATH 227		C ₂₃ H ₂₀ Cl ₂ N ₆	451,35	7,1	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
129.	ATH 228		C ₂₁ H ₂₃ C1 N ₆ O	410,90	7,5	DMSO	AQ-pirimidina
130.	ATH 231		C ₂₂ H ₂₅ C1 N ₆	408,93	7,9	DMSO	AQ-pirimidina
131.	ATH 232		C ₂₃ H ₂₁ C1 N ₆	416,91	9,0	DMSO	AQ-pirimidina
132.	ATH 236		C ₂₃ H ₂₇ C1 N ₆	422,95	7,8	DMSO	AQ-pirimidina
133.	ATH 237		C ₁₈ H ₁₇ C1 ₂ N ₅	374,27	8,5	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N°	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUUESTO
134.	ATH 239		C ₂₂ H ₂₅ C1 N ₆ O	424,93	6,1	DMSO	AQ-pirimidina
135.	ATH 240		C ₂₃ H ₂₇ C1 N ₆	422,95	7,9	DMSO	AQ-pirimidina
136.	ATH 241		C ₂₄ H ₂₉ C1 N ₆	436,98	7,4	DMSO	AQ-pirimidina
137.	ATH 244		C ₂₆ H ₂₇ C1 N ₆ O ₂	490,98	7,2	DMSO	AQ-pirimidina
138.	ATH 245		C ₂₅ H ₂₅ C1 N ₆ O	460,96	7,1	DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

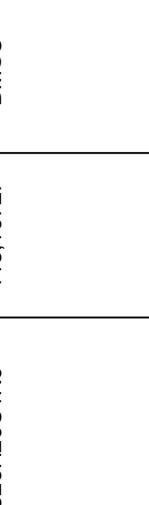
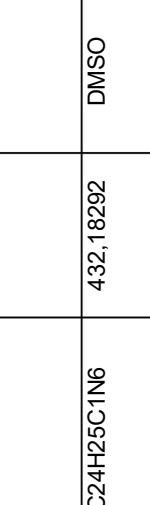
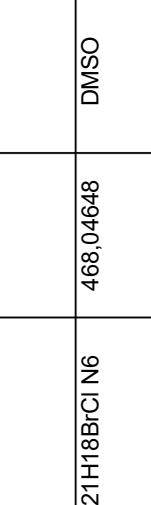
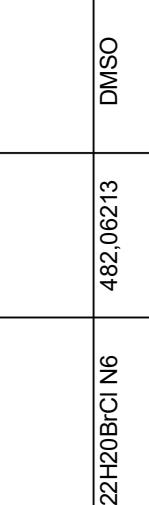
S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
139.	ATH 247		C ₂₄ H ₂₂ ClF N ₆	448,92	6,2	DMSO	AQ-pirimidina
140.	ATH 252		C ₂₁ H ₂₃ Cl N ₆	394,90	9,0	DMSO	AQ-pirimidina
141.	ATH 254		C ₁₉ H ₂₁ C1 N ₆ O	384,86	7,3	DMSO	AQ-pirimidina
142.	ATH 255		C ₂₀ H ₂₃ C1 N ₆ O	393,89		DMSO	AQ-pirimidina
143.	ATH 256		C ₂₂ H ₂₅ C1 N ₆	403,93		DMSO	AQ-pirimidina

(continuación)

S. N. ^o	CÓDIGO	ESTRUCTURA	FÓRM. MOL.	PESO MOL.	CANT. (mg)	SOLUBILIDAD	CLASE DE COMPUESTO
144.	ATH 257		C ₁₉ H ₂₁ C ₁ N ₆ O	384,86	7,0	DMSO	AQ-pririmidina

En algunos aspectos de la presente divulgación, el compuesto de la invención o el ejemplo comparativo es un compuesto mostrado en la Tabla 4.

Tabla 4: Algunos ejemplos de compuestos de la invención y algunos ejemplos comparativos.

S. N. ^o	Código	Estructura	Fórmula mol.	Peso mol.	Solubilidad	Cantidad
1	DKG805		C22H21C1N6	404,15162	DMSO	11,0 mg
2	DKG806		C23H23C1N6	418,16727	DMSO	11,2 mg
3	DKG807		C24H25C1N6	432,18292	DMSO	11,1 mg
4	DKG809		C21H18BrClN6	468,04648	DMSO	11,8 mg
5	DKG810		C22H20BrClN6	482,06213	DMSO	16,0 mg

(continuación)

S. N.º	Código	Estructura	Fórmula mol.	Peso mol.	Solubilidad	Cantidad
6	DKG811		C23H22BrCl N 6	496,07778	DMSO	10,8 mg
7	DKG813		C21H18C12N 6	424,09700	DMSO	11,0 mg
8	DKG814		C22H20C12N 6	438,11265	DMSO	16,2 mg
9	DKG815		C23H22C12N 6	452,12830	DMSO	16,8 mg
10	DKG817		C21H18C1FN 6	408,12655	DMSO	14,5 mg

(continuación)

S. N. ^o	Código	Estructura	Fórmula mol.	Peso mol.	Solubilidad	Cantidad
11	DKG818		C22H20C1FN6	422,14220	DMSO	16,0 mg
12	DKG819		C23H22C1FN6	436,15785	DMSO	15,6 mg
13	DKG821		C21H19C1N6	390,13597	DMSO	11,8 mg
14	DKG822		C22H21C1N6	404,15162	DMSO	11,0 mg
15	DKG823		C23H23C1N6	418,16727	DMSO	17,8 mg

(continuación)

S. N. ^o	Código	Estructura	Fórmula mol.	Peso mol.	Solubilidad	Cantidad
16	DKG825		C22H21C1N6 0	420,14654	DMSO	14,4 mg
17	DKG826		C23H23C1N6 0	434,16219	DMSO	13,5 mg
18	DKG827		C24H25C1N6 0	448,17784	DMSO	15,6 mg
19	DKG829		C23H23C1N6 02	450,15710	DMSO	20,8 mg
20	DKG830		C24H25C1N6 02	464,17275	DMSO	16,5 mg

(continuación)

S. N. ^o	Código	Estructura	Fórmula mol.	Peso mol.	Solubilidad	Cantidad
21	DKG831		C25H27C1N6 O2	478,18840	DMSO	19,2 mg
22	DKG833		C22H21C1N6	404,15162	DMSO	12,8 mg
23	DKG834		C23H23C1N6	418,16727	DMSO	15,2 mg
24	DKG835		C24H25C1N6	432,18292		13,5 mg
25	DKG837		C23H23C1N6 O	434,16219	DMSO	17,6 mg

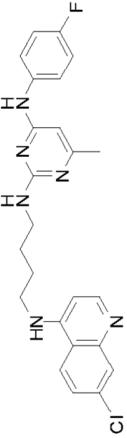
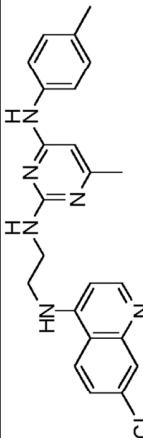
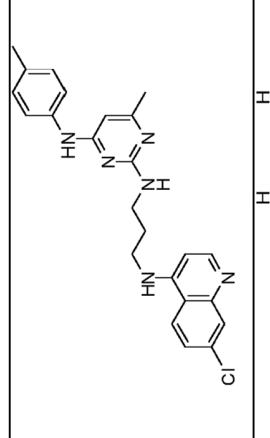
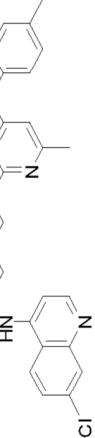
(continuación)

S. N. ^o	Código	Estructura	Fórmula mol.	Peso mol.	Solubilidad	Cantidad
26	DKG838		C24H25C1N6O	448,17784	DMSO	12,5 mg
27	DKG839		C25H27C1N6O	462,19349	DMSO	12,1 mg
28	DKG845		C21H18C12N6	424,09700	DMSO	18,8 mg
29	DKG846		C23H22C12N6	452,12830	DMSO	17,6 mg
30	DKG847		C24H24C12N6	466,14395	DMSO	15,2 mg

(continuación)

S. N.º	Código	Estructura	Fórmula mol.	Peso mol.	Solubilidad	Cantidad
31	DKG849		C22H20BrCl N6	482,06213	DMSO	15,4 mg
32	DKG850		C23H22BrCl N6	496,07778	DMSO	16,6 mg
33	DKG851		C24H24BrCl N6	510,09343	DMSO	16,5 mg
34	DKG853		C22H20C1FN 6	422,14220	DMSO	13,8 mg
35	DKG854		C23H22C1FN 6	436,15785	DMSO	15,1 mg

(continuación)

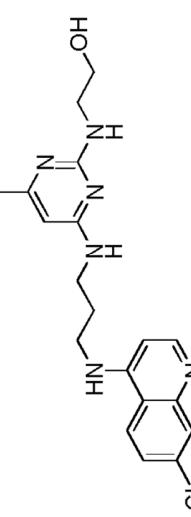
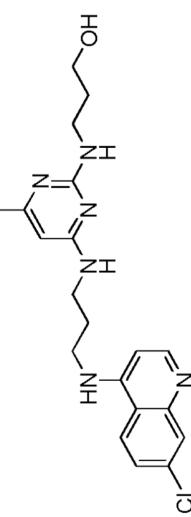
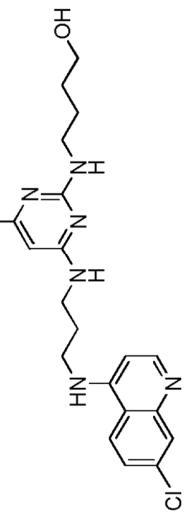
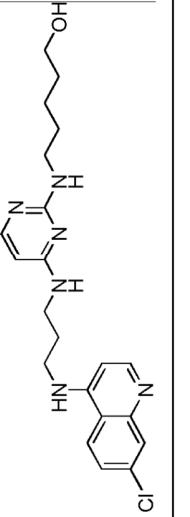
S. N. ^o	Código	Estructura	Fórmula mol.	Peso mol.	Solubilidad	Cantidad
36	DKG855		C24H24C1FN 6	450,17350	DMSO	13,8 mg
37	DKG857		C23H23C1N6	418,16727	DMSO	13,1 mg
38	DKG858		C24H25C1N6	432,18292	DMSO	15,6 mg
39	DKG859		C25H27C1N6	446,19857	DMSO	14,5 mg

En algunos aspectos de la presente divulgación, el compuesto de la invención o el compuesto del ejemplo comparativo es un compuesto mostrado en la Tabla 5.

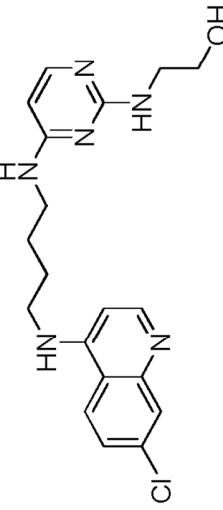
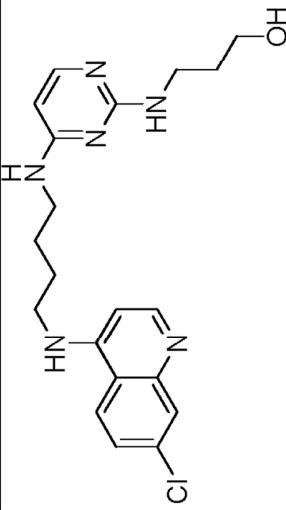
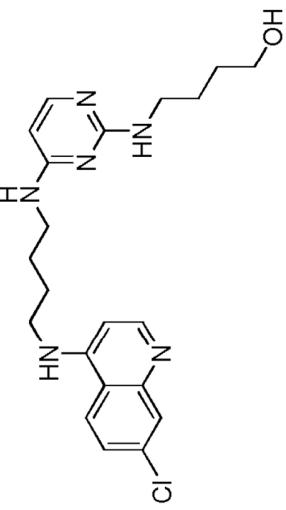
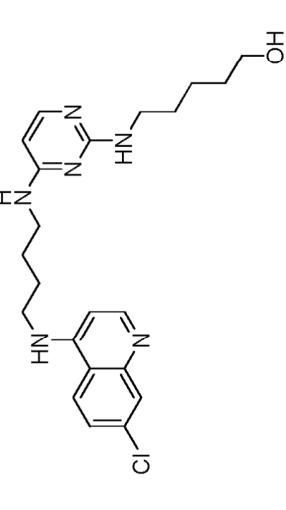
Tabla 5: Algunos ejemplos de compuestos de la invención y algunos ejemplos comparativos.

S. N. ^o	ID del compuesto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Mol., PM	Solubilidad	Cantidad (mg)
40.	MT1-121		C19H23C1N6O, 386,88	MeOH, DMSO	10,4
41.	MT1-122		C20H25C1N6O, 400,91	MeOH, DMSO	12,0
42.	MT1-127		C18H21C1N6O, 372,85	MeOH, DMSO	12,9
43.	MT1-128		C21H27C1N6O, 414,93	MeOH, DMSO	13,8
44.	MT1-132		C22H29C1N6O, 428,96	MeOH, DMSO	10,7

(continuación)

S. N.º	ID del compuesto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Mol., PM	Solubilidad	Cantidad (mg)
45.	MT1-145		C19H23C1N6O, 386,88	MeOH, DMSO	10,7
46.	MT1-146		C20H25C1N6O, 400,91	MeOH, DMSO	10,5
47.	MT1-147		C21H27C1N6O, 414,93	MeOH, DMSO	13,0
48.	MT1-148		C22H29C1N6O, 428,96	MeOH, DMSO	10,3

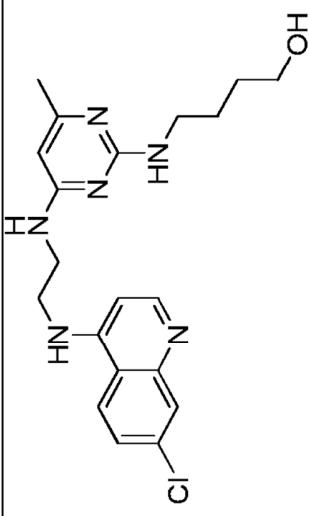
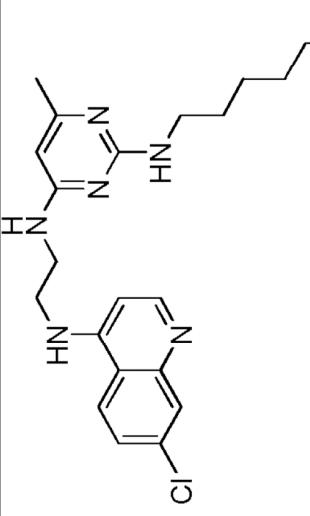
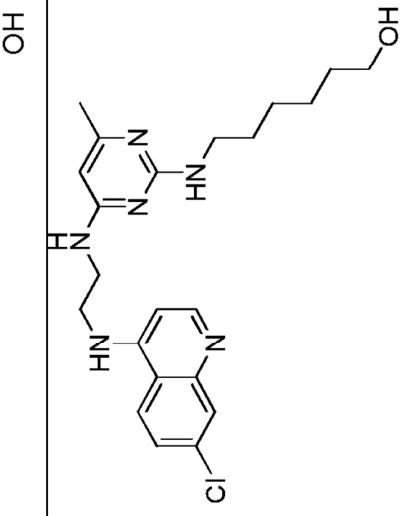
(continuación)

S. N. ^o	ID del compuesto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Mol., FM	Solubilidad	Cantidad (mg)
49.	MT1-156		C19H23C1N6O, 386,88	MeOH, DMSO	12,4
50.	MT1-157		C20H25C1N6O, 400,91	MeOH, DMSO	11,0
51	MT1-158		C21H27C1N6O, 414,93	MeOH, DMSO	10,9
52.	MT1-162		C22H29C1N6O, 428,96	MeOH, DMSO	14,0

(continuación)

S. N. ^o	ID del compuesto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Mol., PM	Solubilidad	Cantidad (mg)
53.	MT1).163		C23H31C1N60, 442,98	MeOH, DMSO	14,1
54.	MT1-185		C18H21C1N60, 372,85	MeOH, DMSO	12,1
55.	MT1-186		C19H23C1N60, 386,88	MeOH, DMSO	12,3

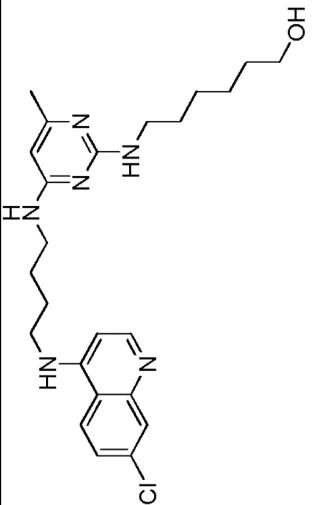
(continuación)

S. N. ^o	ID del compuesto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Mol., PM	Solubilidad	Cantidad (mg)
56.	MT1-189		C20H25C1N6O, 400,91	MeOH, DMSO	11,3
57.	MT1-190		C21H27C1N6O, 414,93	MeOH, DMSO	10,6
58.	MT1-191		C22H29C1N6O, 428,96	MeOH, DMSO	10,3

(continuación)

S. N.º	ID del compuesto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Mol., PM	Solubilidad	Cantidad (mg)
59.	MT1-192		C20H25C1N6O, 400,91	MeOH, DMSO	10,2
60.	MT1-193		C21H27C1N6O, 414,93	MeOH, DMSO	11,7
61.	MT1-194		C22H29C1N6O, 428,96	MeOH, DMSO	10,9
62.	MT1-195		C23H31C1N6O, 442,98	MeOH, DMSO	11,3

(continuación)

S. N. ^o	ID del compuesto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Mol., PM	Solubilidad	Cantidad (mg)
63.	MT1-196		C ₂₄ H ₃₃ C ₁ N ₆ O ₄ 57,01	MeOH, DMSO	11,0

Debe reconocerse que los compuestos aquí descritos pueden estar presentes y opcionalmente administrarse en forma de sales, hidratos y profármacos que se convierten *in vivo* en los compuestos aquí descritos. Por ejemplo, en el alcance de la presente invención se incluye la conversión de los compuestos aquí descritos y el uso en forma de sales farmacéuticamente aceptables obtenidas de diversos ácidos y bases orgánicos e inorgánicos de acuerdo con algunos procedimientos bien conocidos en la técnica.

5 Cuando los compuestos aquí descritos poseen una forma de base libre, los compuestos se pueden preparar como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable haciendo reaccionar la forma de base libre del compuesto con un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, hidrohaluros como hidrocloruro, hidrobromuro, hidroyoduro; otros minerales ácidos y sus correspondientes sales, como sulfato, nitrato, fosfato; un alquilo y monoarilsulfonatos como etanosulfonato, toluenosulfonato y bencenosulfonato; y otros ácidos orgánicos y sus correspondientes sales, como acetato, tartrato, maleato, succinato, citrato, benzoato, salicilato y ascorbato). Entre otras sales de adición de ácido admisibles para los compuestos divulgados se incluyen adipato, alginato, arginato, aspartato, bisulfato, bisulfito, bromuro, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, caprilato, cloruro, clorobenzoato, ciclopentanopropionato, digluconato, dihidrogenofosfato, dinitrobenzoato, dodecilsulfato, fumarato, galacterato (ácido mónico), galacturonato, glucoheptonato, gluconato, glutamato, glicerofosfato, hemisuccinato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hipurato, hidrocloruro, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, yoduro, isetionato, isobutirato, lactato, lactobionato, malato, malonato, mandelato, metafosfato, metanosulfonato, metilbenzoato, monohidrogenofosfato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oxalato, aleato, pamoato, pectinato, persulfato, fenilacetato, 3-fenilpropionato, fosfato, fosfonato y ftalato. Es necesario reconocer que las formas de base libre difieren típicamente de sus respectivas formas de sal en cierta medida por lo que respecta a propiedades físicas como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a sus respectivas formas de base libre a los efectos de la presente invención.

10 Cuando los compuestos aquí descritos poseen una forma de ácido libre, se puede preparar una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable haciendo reaccionar la forma de ácido libre del compuesto con una base inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable. Entre los ejemplos de estas bases se encuentran los hidróxidos de metales alcalinos como los hidróxidos de potasio, sodio y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos como los hidróxidos de bario y calcio; alcóxidos de metales alcalinos como etanolato de potasio y propanolato de sodio; y diversas bases orgánicas como hidróxido de amonio, piperidina, detanolamina y N-metilglutamina. También se incluyen las sales de aluminio de los compuestos de la presente invención. Las sales básicas admisibles para los compuestos divulgados incluyen, entre otras, sales de cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, mangánicas, manganosas, de potasio, de sodio y de zinc. Las sales básicas orgánicas incluyen, entre otras, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas producidas naturalmente, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, como arginina, betaína, cafeína, cloroprocaina, colina, N,N'-dibenciletilenodiamina (benzatina), dícciclohexilamina, dietanolamina, 2-diethylaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilenodiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, iso-propilamina, lidocaína, lisina, meglamina, N-metil-D-glucamina, morfolina, 35 piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietanolamina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina y tris-(hidroximetil)-metilamina (trometamina). Es necesario reconocer que las formas de ácido libre difieren típicamente de sus respectivas formas de sal en cierta medida por lo que respecta a propiedades físicas como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a sus respectivas formas de ácido libre a los efectos de la presente invención.

40 Los compuestos de la presente invención que comprenden grupos básicos que contienen nitrógeno pueden ser cuaternizados con agentes como Ci-C₄alquil haluros, por ejemplo cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, isopropilo y tertbutilo; di(C₁-C₄alquil) sulfatos, por ejemplo sulfatos de dimetilo, dietilo y diamilo; C₁₀-C₁₈alquil haluros, por ejemplo cloruros, bromuros y yoduros de decilo, dodecilo, laurilo, miristilo y estearilo; y aril(Ci-C₄alquil) haluros, por ejemplo cloruro de bencilo y bromuro de fenetilo. Estas sales permiten la preparación de los compuestos aquí descritos solubles tanto en agua como en aceite.

45 Se pueden preparar derivados profármacos de compuestos descritos en el presente documento modificando sustituyentes de los compuestos aquí descritos que posteriormente se convierten *in vivo* en un sustituyente diferente. Se hace constar que en muchos casos los propios profármacos también se incluyen en el alcance del rango de los compuestos aquí descritos. Por ejemplo, se pueden preparar profármacos haciendo reaccionar un compuesto con un agente carbamilante (por ejemplo, 1,1-aciloxialquilcarbonocloridrato, paranitrofenil carbonato, o similares) o un agente acilante. Otros ejemplos de métodos para producir profármacos se describen en Saulnier et al., 1994, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, p. 1985.

50 También se pueden producir derivados protegidos de compuestos descritos en el presente documento. Se pueden encontrar ejemplos de técnicas aplicables para la creación de grupos de protección y su eliminación en P. G. M. Wuts and T. W. Greene, *Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis*, 4^a edición, John Wiley & Sons, Inc. 2006.

55 Los compuestos aquí descritos también se pueden preparar convenientemente o formar durante el proceso de la invención en forma de solvatos (por ejemplo, hidratos). Los hidratos de los compuestos aquí descritos se pueden preparar

convenientemente mediante recristalización de una mezcla acuosa/disolvente orgánico, utilizando disolventes orgánicos como dioxina, tetrahidrofurano o metanol.

En algunos aspectos de la presente divulgación, los compuestos de la presente divulgación se pueden utilizar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. A los efectos del presente documento, se entenderá que una "sal farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier compuesto aquí descrito que se utiliza en forma de sal, especialmente cuando la sal confiere al compuesto propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con la forma libre del compuesto o con una forma de sal diferente del compuesto. La forma de sal farmacéuticamente aceptable también puede conferir inicialmente al compuesto propiedades farmacocinéticas deseables que anteriormente no presentaba y puede incluso incidir de forma positiva en la farmacodinámica del compuesto por lo que respecta a su actividad terapéutica en el organismo. Un ejemplo de propiedad farmacocinética que se puede ver favorablemente afectada es la manera en la que el compuesto se transporta a través de las membranas celulares, lo que a su vez puede incidir de forma directa y positiva en la absorción, distribución, biotransformación y excreción del compuesto. Aunque la vía de administración de la composición farmacéutica es importante, y de que varios factores anatómicos, fisiológicos y patológicos pueden afectar de forma crítica a la biodisponibilidad, normalmente la solubilidad del compuesto depende del carácter de la forma de sal concreta del mismo que se utilice. Un experto en la técnica apreciará que una solución acuosa del compuesto ofrecerá la absorción más rápida del compuesto en el organismo de un sujeto a tratar, mientras que las soluciones lipídicas o suspensiones, así como las formas de administración sólidas, conllevarán una absorción menos rápida del compuesto.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas obtenidas de ácidos inorgánicos como el sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos como el acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, mágico, tartárico, cítrico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isotónico. Véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19 (1977). Entre los ejemplos de sales también se incluyen sales de hidrobromuro, hidrocloruro, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, succinato, valerato, oleato, palmitato, esteárate, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato. Entre los ácidos adecuados que son capaces de formar sales con los compuestos de la divulgación se incluyen ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tioclánico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico; y ácidos orgánicos como ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido 4-metilbiciclo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido 4,4'-metilenobis(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido acético, ácido antranílico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido canforsulfónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido etanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucoheptonico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido heptanoico, ácido hidroxinaftoico, ácido láctico, ácido lauril sulfúrico, ácido maleico, ácido mágico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido mucónico, ácido naftaleno sulfónico, ácido o-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido oxálico, ácido p-clorobencenosulfónico, ácido propiónico, ácido, p-toluenosulfónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfanílico, ácido tartárico, ácido butilacético terciario, ácido trifluoroacético, ácido trimetilacético. Entre las bases adecuadas capaces de formar sales con los compuestos de la divulgación se incluyen bases inorgánicas como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, carbonato de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio; y bases orgánicas como mono-, di- y tri-alquil y aril aminas (por ejemplo trietilamina, diisopropil amina, metil amina, dimetil amina, N-metilglucamina, piridina, picolina, diciclohexilamina, N,N'-dibeciletilenodiamina), y opcionalmente etanol-aminas sustituidas (por ejemplo etanolamina, dietanolamina, trietanolamina).

Los compuestos de acuerdo con la divulgación se pueden preparar mediante procesos sintéticos conocidos por los expertos en la técnica, en particular a la luz del estado de la técnica y de los ejemplos preparatorios concretos que se exponen más adelante. También se puede aplicar una modificación adecuada a los materiales de partida mediante métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, cabe señalar que los compuestos aquí descritos también se pueden sintetizar a través de otras vías sintéticas que otros terceros puedan idear.

Se reconocerá directamente que determinados compuestos aquí descritos tienen átomos con enlaces con otros átomos que confieren una estereoquímica particular al compuesto (por ejemplo, centros quirales). Se reconoce que la síntesis de compuestos según la presente divulgación puede dar lugar a la creación de mezclas de diferentes estereoisómeros (enantiómeros, diastereómeros). Salvo que se especifique una estereoquímica en particular, se entenderá que la recitación de un compuesto abarca todos los diferentes estereoisómeros posibles.

En la técnica se conocen diversos métodos para separar mezclas de diferentes estereoisómeros. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar una mezcla racémica de un compuesto con un agente de resolución ópticamente activo para formar un par de compuestos diastereoisómicos. A continuación se pueden separar los diastereómeros para recuperar enantiómeros ópticamente puros. Se pueden utilizar asimismo complejos disociables para resolver enantiómeros (por ejemplo, sales diastereoisoméricas cristalinas). Los diastereómeros tienen típicamente propiedades físicas suficientemente distintas (por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidades, reactividad) como para que

- se puedan separar directamente aprovechando estas disimilitudes. Por ejemplo, los diastereómeros se pueden separar típicamente por cromatografía o mediante técnicas de separación/resolución basadas en diferencias de solubilidad. Se puede encontrar una descripción más detallada de las técnicas que se pueden emplear para resolver estereoisómeros de compuestos a partir de su mezcla racémica en Jean Jacques Andre Collet, Samuel H. Wilen, Enantiomers, Racemates and Resolutions, John Wiley & Sons, Inc. (1981).
- 5 Los compuestos aquí descritos muestran una actividad *in vitro/in vivo* significativa contra *Plasmodium falciparum*, sin ninguna toxicidad. Por consiguiente, en un aspecto, los compuestos aquí descritos resultan útiles para el tratamiento de enfermedades infecciosas como la malaria o cualquier otra enfermedad en cuestión.
- 10 Los inventores han descubierto que los compuestos aquí descritos son también, imprevisible y sorprendentemente, agonistas del receptor nuclear huérfano Nurrl. Así pues, los compuestos aquí descritos se pueden administrar a un sujeto como parte de una aplicación terapéutica. Por lo general, el método se puede caracterizar por incluir un paso de administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto a un sujeto que presenta esa necesidad.
- 15 En un aspecto de la presente divulgación, los compuestos y el método aquí divulgados se pueden utilizar en el tratamiento de un sujeto para un estado patológico en el que una actividad de Nurrl reducida contribuye a la patología o sintomatología de la enfermedad. Entre los estados patológicos en los que la actividad de Nurrl es reducida se incluyen las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades o trastornos inflamatorios y el síndrome de las piernas inquietas. Los compuestos y métodos aquí divulgados también se pueden utilizar para tratar a un sujeto con una enfermedad para la que un agonista de la dopamina resulta un tratamiento útil, como por ejemplo el síndrome de las piernas inquietas.
- 20 La divulgación proporciona asimismo un método para provocar la diferenciación de una célula madre, por ejemplo una célula madre embrionaria humana, en una neurona dopamínérgica, poniendo en contacto la célula madre con un compuesto aquí descrito que se encuentra presente en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de la célula madre. Sin limitación, la célula madre se puede poner en contacto con los compuestos aquí descritos, en un cultivo celular, por ejemplo *in vivo* o *ex vivo*, o administrándola a un sujeto, por ejemplo *in vivo*. En algunos aspectos de la presente divulgación, un compuesto aquí descrito se puede administrar a un sujeto para tratar, prevenir y/o diagnosticar trastornos neurodegenerativos, incluyendo los aquí descritos.
- 25 A los efectos del presente documento, el término "poner en contacto" o "contactar", cuando se refiere a poner en contacto una célula madre, incluye someter la célula a un medio de cultivo apropiado que contiene el compuesto indicado. Cuando se utiliza la célula madre *in vivo*, "poner en contacto" o "contactar" incluye la administración del compuesto en una composición farmacéutica a un sujeto a través de una vía de administración adecuada, de forma que el compuesto contacte con la célula madre *in vivo*.
- 30 Por "una cantidad suficiente para inducir la diferenciación" de una célula madre se entiende la cantidad de un compuesto de la divulgación necesaria para provocar que una célula madre no diferenciada se diferencie en un tipo de célula deseado, por ejemplo una neurona.
- 35 Por "diferenciación" se entiende el proceso por el que una célula madre no especializada adquiere las características de una célula especializada, por ejemplo una célula nerviosa. La diferenciación también se puede referir a la limitación del potencial de una célula para autorregenerarse y está generalmente asociada con un cambio en la capacidad funcional de la célula. La diferenciación de una célula madre se puede determinar mediante métodos muy conocidos en la técnica, incluyendo el análisis de marcadores celulares o características morfológicas asociadas a las células de un estado diferenciado definido. Entre los ejemplos de estos marcadores y características se incluye la medición de glicoproteína, 40 fosfatasa alcalina y la expresión del antígeno carcinoembrionario, de forma que un aumento de cualquiera de estas proteínas es indicativo de una diferenciación.
- 45 Por "célula madre" se entiende cualquier célula con potencial para autorregenerarse y, en las condiciones apropiadas, diferenciarse en una célula progenitora especializada o una célula o tejido especificado. Las células madre pueden ser pluripotentes o multipotentes. Las células madre incluyen, entre otras, células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre adultas y células sanguíneas del cordón umbilical.
- 50 Las células madre son poblaciones de células únicas que tienen la capacidad de dividirse (autorregenerarse) durante períodos indefinidos de tiempo y, bajo las condiciones o señales correctas, de diferenciarse en los múltiples tipos de células que componen un organismo. Las células madre derivadas de la masa celular interna del blastocito se conocen como células madre embrionarias (ES). Las células madre derivadas de células germinales primordiales, y que normalmente evolucionan a gametos maduros (ovocitos y espermatozoides) se conocen como células germinales embrionarias. Estos dos tipos de células madre se conocen como células pluripotentes debido a su capacidad única para diferenciarse en derivados de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).
- 55 Las células madre pluripotentes se pueden especializar también en otro tipo de célula madre multipotente derivada a menudo de tejidos adultos. Las células madre multipotentes también son capaces de autorregenerarse y diferenciarse, pero, a diferencia de las células madre embrionarias, su cometido es dar lugar a células que tienen una función concreta.

- Entre los ejemplos de células madre adultas se incluyen células madre hematopoyéticas (HSC), que pueden proliferar y diferenciarse para producir tipos de células linfoides y mieloídes; células madre de médula ósea (BMSC), que se pueden diferenciar en adipocitos, condrocitos, osteocitos, hepatocitos, cardiomiositos y neuronas; células madre neurales (NSC), que se pueden diferenciar en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos; y células madre sanguíneas periféricas. También se han obtenido células madre multipotentes de tejidos epiteliales y adiposos y de sangre del cordón umbilical (UCB).
- 5 Las células ES, obtenidas de la masa celular interna de embriones antes de la implantación, han sido reconocidas como la población de células madre más pluripotente y, por consiguiente, son la célula preferida para los métodos de la invención. Estas células son capaces de una proliferación ilimitada *ex vivo*, al tiempo que mantienen la capacidad de diferenciación en una amplia variedad de tejidos somáticos y extraembriónicos. Las células ES pueden ser masculinas Q(Y) o femeninas 10 (XX); se prefieren células ES femeninas.
- También se pueden emplear células madre adultas multipotentes en los métodos de la invención. Entre las células madre adultas preferidas se incluyen células madre hematopoyéticas (HSC), que pueden proliferar y diferenciarse durante toda la vida para producir tipos de células linfoides y mieloídes; células madre de médula ósea (BMSC), que se pueden diferenciar en diversos tipos de células incluyendo adipocitos, condrocitos, osteocitos, hepatocitos, cardiomiositos y 15 neuronas; y células madre neurales (NSC), que se pueden diferenciar en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos. Las células madre multipotentes obtenidas de tejidos epiteliales y adiposos y las células sanguíneas del cordón umbilical también se pueden utilizar en los métodos de la divulgación.
- Las células madre se pueden obtener de una fuente, por ejemplo cualquier mamífero, incluyendo, entre otros, ratones, 20 seres humanos y primates. Tras la adquisición de células madre, estas células se pueden utilizar directamente en los métodos aquí divulgados. Por ejemplo, se pueden adquirir células sanguíneas del cordón umbilical en cantidad suficiente para utilizarlas directamente con fines terapéuticos. Alternativamente, las células madre se pueden expandir primero para aumentar el número de células disponibles. Véase, por ejemplo, la Patente USA Nº 6.338.942. Entre los ejemplos de cepas de ratón para la preparación de células madre se incluyen 129, C57BL/ 6, y una cepa híbrida (Brook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 94:5709-5712 (1997), Baharvand et al., *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 40:76-81 (2004)). Los métodos 25 para preparar células madre de ratón, humanas o de primate son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Nagy et al., *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002); Thomson et al., *Science* 282:1145-1147 (1998), Marshall et al., *Methods Mol. Biol.* 158: 1 1-18 (2001); Thomson et al., *Trends Biotechnol.* 18:5357 (2000); Jones et al., *Semin. Reprod. Med.* 18:219-223 (2000); Voss et al., *Exp. Cell Res.* 230:45-49 (1997); y Odonco et al., *Stem Cells* 19:193-204 (2001).
- 30 Las células ES se pueden obtener directamente del blastocito o de cualquier otra fase de desarrollo temprana o puede ser una línea de células madre "clonadas" obtenida por transferencia nuclear somática y otros procedimientos similares. Los métodos generales para el cultivo de células ES de ratón, humanas o de primate a partir de un blastocito se pueden encontrar en el Apéndice C del informe de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) estadounidenses sobre células madre titulado "*Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*" (junio de 2001). (Para cultivos de células ES 35 humanas, los blastocitos se generan mediante fertilización *in vitro* y se donan para la investigación). Las pequeñas placas de cultivo de plástico utilizadas para cultivar las células contienen un medio de crecimiento suplementado con suero fetal bovino y en ocasiones recubiertas con una capa "alimentadora" de células no divisibles. Las células alimentadoras suelen ser células de fibroblasto embrionario de ratón (MEF) que han sido inactivadas químicamente para que no se dividan. También se pueden añadir otros reactivos, como la citoquina factor inhibidor de leucemia (LIF) al medio de cultivo para 40 células ES de ratón. En segundo lugar, una vez transcurrido un periodo de varios días a una semana, las colonias de células proliferantes se retiran y se dispersan en nuevas placas de cultivo, donde cada una de ellas puede contener o no una capa alimentadora de MEF. Si las células se van a utilizar con fines terapéuticos humanos, es preferible no incluir la capa alimentadora de MEF. En estas condiciones *ex vivo*, las células ES se agregan para formar colonias. En el tercer paso principal necesario para generar líneas de células ES, las colonias individuales que no se diferencian son disociadas 45 y colocadas en placas nuevas, un paso denominado pasaje. Este proceso de cambio de placa establece una "línea" de células ES. La línea de células se denomina "clonal" si la genera una única célula ES. Se pueden utilizar métodos de dilución limitante para generar una línea de células ES clonal. Los reactivos necesarios para el cultivo de células madre se pueden adquirir en el mercado, por ejemplo, de Invitrogen, Stem Cell Technologies, R&D Systems, y Sigma Aldrich, y se describen, por ejemplo, en las Publicaciones de Patentes USA Nº 2004/0235159 y 2005/0037492, en el Apéndice C del informe de los NIH, *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*, anteriormente mencionado.
- 50 Para métodos *in vivo*, que no forman parte de la invención reivindicada, se puede administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto aquí descrito. Los métodos de administración de compuestos a un sujeto son conocidos en la técnica y resultan fáciles de aplicar para un experto en la materia.
- Tal y como sabe un experto en la técnica, la promoción de la diferenciación de células madre en un sujeto puede permitir 55 el tratamiento, la prevención y la mejora de una serie de trastornos neurodegenerativos. Por "trastorno neurodegenerativo" se entiende cualquier enfermedad o trastorno causado por o asociado al deterioro de células o tejidos del sistema nervioso. Entre los ejemplos de trastornos neurodegenerativos se encuentran los trastornos por expansión de poliglutaminas (por

ejemplo, HD, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, enfermedad de Kennedy (también denominada atrofia muscular espinobulbar) y la ataxia espinocerebelosa (por ejemplo, tipo 1, tipo 2, tipo 3 (también denominada enfermedad de Machado-Joseph), tipo 6, tipo 7 y tipo 17)), otros trastornos por expansión repetida de trinucleótidos (por ejemplo, síndrome X frágil, retraso mental X frágil, ataxia de Friedreich, distrofia miotónica, ataxia espinocerebelosa tipo 8 y ataxia espinocerebelosa tipo 12), enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten (también denominada enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten), enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, accidente isquémico, enfermedad de Krabbe, demencia con cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, atrofia de sistemas múltiples, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, lesión en la médula espinal, atrofia muscular espinal (SMA), enfermedad de SteeleRichardson-Olszewski, y tabes dorsal.

En algunos aspectos de la presente divulgación, la enfermedad o el trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Parkinson.

Los métodos para el diagnóstico de sujetos que padecen o corren el riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia de uno o más de los síntomas siguientes se puede utilizar como parte del diagnóstico de la EP: temblor, por ejemplo un tremor involuntario y rítmico del brazo o la pierna; rigidez, agarrotamiento o molestia muscular; lentitud general en cualquiera de las actividades de la vida diaria, como aquinesia o bradiquinesia; dificultades para caminar, de equilibrio o posturales; alteración de la escritura; cambios emocionales; pérdida de memoria; trastornos del habla; y dificultad para dormir. La revisión de los síntomas, la actividad, la medicación, los problemas médicos concurrentes o posibles exposiciones tóxicas de un sujeto pueden resultar útiles para el diagnóstico de la EP. Por otra parte, se puede analizar la presencia o ausencia en un sujeto de mutaciones genéticas que puedan dar lugar a una mayor probabilidad de padecer la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, la presencia de una o más mutaciones o polimorfismos concretos en NURR1, alfa-sinucleína, parkina, MAPT, DJ-1, PINK1, SNCA, NAT2, o genes LRRK2 se puede utilizar para el diagnóstico de un sujeto que padece o corre el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitudes de Patentes USA Nº 2003-0119026 y 2005-0186591; Bonifati, Minerva Med. 96:175-186, 2005; y Cookson et al., Curr. Opin. Neurol. 18:706-711, 2005

Entre otros, los métodos de uso de células madre aquí descritos (métodos que no forman parte de la invención reivindicada) se pueden emplear para el tratamiento de enfermedades tratables mediante el trasplante de células diferenciadas obtenidas de células ES. Las células madre de la divulgación o producidas utilizando los métodos aquí descritos se pueden emplear para tratar enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, o lesiones traumáticas en el cerebro o la médula espinal de cualquier sujeto, por ejemplo un ser humano.

Los inventores han descubierto también que los compuestos aquí divulgados inhiben o reducen asimismo la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias en la microglía primaria obtenida de cerebros de rata con EP. Por consiguiente, los compuestos aquí divulgados se pueden utilizar asimismo para tratar enfermedades o trastornos que se caracterizan por unos niveles elevados de mediadores proinflamatorios y/o unos niveles elevados de la expresión del gen mediador proinflamatorio. Por consiguiente, en otro aspecto la divulgación se proporciona un método (método que no forma parte de la invención reivindicada) para el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad o trastorno que se caracterizada por unos niveles elevados de mediadores proinflamatorios y/o unos niveles elevados de la expresión del gen mediador proinflamatorio, donde el método comprende la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de un compuesto aquí divulgado. Los ejemplos de mediadores proinflamatorios incluyen, entre otros, citoquinas proinflamatorias, leucocitos, leucotrienos, prostaglandinas y otros mediadores implicados en el inicio y el mantenimiento de la inflamación. Las citoquinas proinflamatorias y los mediadores de la inflamación incluyen, entre otros, IL-1-alfa, IL-1-beta, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, TNF-alfa, factor inhibidor de leucocitos (LIF), IFN-gamma, oncostatina M (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF), TGF-beta, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), iNOS, y quimioquinas que quimioatraen células inflamatorias. En la técnica se conocen diversos ensayos para determinar *in vivo* el estado de la inflamación que se pueden utilizar para medir los niveles del mediador proinflamatorio. Véanse, por ejemplo, las Patentes USA Nº 5.108.899 y 5.550.139.

En algunos aspectos de la presente divulgación, la enfermedad, el trastorno o la condición patológica que se caracteriza por unos niveles elevados de citoquinas proinflamatorias y/o niveles elevados de la expresión del gen de citoquinas proinflamatorias es una enfermedad autoinmune, una enfermedad neurodegenerativa, inflamación, un trastorno asociado con la inflamación, una enfermedad que se caracteriza por la inflamación, o una infección por patógenos o no patógenos.

A los efectos del presente documento, el término "enfermedad autoinmune" se refiere a una enfermedad o trastornos en los que el sistema inmunitario de un sujeto, por ejemplo un mamífero, presenta una respuesta inmune humoral o celular al propio tejido del sujeto o a agentes antigenicos que no son intrínsecamente dañinos para el sujeto y, por consiguiente, produce un daño en el tejido del sujeto. Los ejemplos de estos trastornos incluyen, entre otros, lupus sistémico eritematoso (SLE), enfermedad de tejido conectivo mixto, esclerodermia, síndrome de Sjogren, artritis reumatoide y diabetes tipo 1.

- A los efectos del presente documento, el término "enfermedad o trastorno neurodegenerativo" incluye cualquier enfermedad, trastorno o condición que afecta a la homeostasis neuronal, por ejemplo que provoca la degeneración o pérdida de células neuronales. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen condiciones en las que el desarrollo de las neuronas, es decir neuronas motoras o cerebrales, es anómalo, así como condiciones que provocan la pérdida de una función neuronal normal. Entre los ejemplos de estos trastornos neurodegenerativos se incluyen la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías como la demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo, demencia lobar frontotemporal, degeneración palido-ponto-nigral, parálisis supranuclear progresiva, tauopatía de múltiples sistemas con demencia presenil, enfermedad de Wilhelmsen-Lynch, complejo desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia, enfermedad de Pick, o demencia similar a la enfermedad de Pick, degeneración corticobasal, demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, ataxia de Friedreich, enfermedad de Lewybody, atrofia muscular espinal y parkinsonismo asociado al cromosoma 17.
- Tal como se usa aquí, el término "inflamación" se refiere a cualesquier procesos celulares que dan lugar a la activación de caspasa-1, o caspasa-5, la producción de citoquinas IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa, iNOS, y/o los eventos celulares posteriores relacionados que resultan de las acciones de las citoquinas así producidas, por ejemplo, fiebre, acumulación de líquidos, edema, formación de abcesos y muerte celular. Tal como se usa aquí, el término "inflamación" se refiere tanto a respuestas agudas (es decir, respuestas en las que los procesos inflamatorios están activos) como a respuestas crónicas (es decir, respuestas marcadas por una lenta progresión y formación de nuevo tejido conectivo). La inflamación aguda se puede diferenciar de la crónica por el tipo de células implicadas. En la inflamación aguda a menudo participan neutrófilos polimorfonucleares; mientras que la inflamación crónica se caracteriza normalmente por una respuesta linfohistiocítica y/o granulomatosa.
- Tal como se usa aquí, el término "inflamación" incluye reacciones de sistemas de defensa tanto específicas como no específicas. La reacción de un sistema de defensa específica es una respuesta específica del sistema inmunitario a un antígeno (que incluye posiblemente un autoantígeno). La reacción de un sistema de defensa no específica es una respuesta inflamatoria mediada por leucocitos sin memoria inmunológica. Estas células incluyen granulocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. Los ejemplos de tipos concretos de inflamación incluyen, entre otros, inflamación difusa, inflamación localizada, inflamación cruposa, inflamación intersticial, inflamación obliterativa, inflamación parenquimatosa, inflamación reactiva, inflamación específica, inflamación tóxica e inflamación traumática.
- Tal como se usa aquí "infección por patógenos" se refiere a la infección por un patógeno. Tal como se usa aquí, el término "patógeno" se refiere a un organismo, incluyendo un microorganismo, que causa una enfermedad en otro organismo (por ejemplo, animales y plantas), infectando directamente al otro organismo o produciendo agentes que causan una enfermedad en otro organismo (por ejemplo, bacterias que producen toxinas patógenas). Tal como se usa aquí, los patógenos incluyen, entre otros, bacterias, protozoos, hongos, nemátodos, viroides y virus, así como cualquier combinación de estos, donde cada patógeno es capaz, por sí solo o conjuntamente con otro patógeno, de desencadenar una enfermedad en vertebrados, incluyendo, entre otros, mamíferos, e incluyendo, entre otros, seres humanos. Tal como se usa aquí, el término "patógeno" también abarca microorganismos que normalmente pueden no ser patógenos en un huésped no inmunocomprometido. Algunos ejemplos concretos de patógenos virales incluyen, entre otros, el virus del herpes simple (HSV)1, HSV2, virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano (HHV) 6, HHV7, HHV8, virus de la varicela-zóster (VZV), virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, HIV, adenovirus, virus de la encefalitis equina del oeste (EEEV), virus del Nilo Occidental (WNE), virus JC (JCV) y virus BK (BKV).
- Tal como se usa aquí, el término "microorganismo" incluye especies microbianas procariotas y eucariotas de los dominios Archaea, Bacteria y Eucarya, incluyendo este último levaduras y hongos filamentosos, protozoos, algas o protistas superiores. Los términos "células microbianas" y "microbios" se utilizan de forma intercambiable con el término microorganismo.
- Tal como se usa aquí, el término "bacteria," o "eubacteria" se refiere a un dominio de organismos procariotas. Las bacterias incluyen al menos los 11 grupos diferentes siguientes: (1) Bacterias grampositivas (gram+), que se subdividen en dos grupos principales: (i) grupo G+C alto (*Actinomycetes*, *Mycobacteria*, *Micrococcus*, otras) (ii) grupo G+C bajo (*Bacillus*, *Clostridia*, *Lactobacillus*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Mycoplasmas*); (2) proteobacterias, como bacterias gramnegativas púrpuras fotosintéticas+no fotosintéticas (incluyen la mayoría de las bacterias gramnegativas "comunes"); (3) cianobacterias, como fotótrofos oxigénicos; (4) espiroquetas y especies relacionadas; (5) planctomicetos; (6) bacteroides, flavobacteriales; (7) *Chlamydia*; (8) bacterias verdes del azufre; (9) bacterias verdes no del azufre (también fotótrofos anaeróbicos); (10) *Micrococcus radiodurans* y especies relacionadas, (11) termófilos *Thermotoga* y *Thermosiphon*.
- "Las bacterias gramnegativas" incluyen cocos, bacilos no entéricos y bacilos entéricos. Los géneros de bacterias gramnegativas incluyen, por ejemplo, *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Treponema*, y *Fusobacterium*.

"Las bacterias grampositivas" incluyen cocos, bacilos no esporulados y bacilos esporulados. Los géneros de bacterias grampositivas incluyen, por ejemplo, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Nocardia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*.

5 Tal como se usa aquí, el término "sistema de defensa específica" se refiere al componente del sistema inmunitario que reacciona a la presencia de antígenos específicos. Se dice que la inflamación se produce por una respuesta del sistema de defensa específico si la inflamación está provocada por, mediada por o asociada con una reacción del sistema de defensa específico. Entre los ejemplos de inflamación resultante de una respuesta del sistema de defensa específico se incluye la respuesta a antígenos como el virus de la rubéola, enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso, la artritis reumatoide, el síndrome de Reynaud, la esclerosis múltiple, la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado 10 mediada por células T. Las enfermedades inflamatorias crónicas y el rechazo de tejidos y órganos trasplantados son otros ejemplos de reacciones inflamatorias del sistema de defensa específico.

A los efectos del presente documento, una reacción del "sistema de defensa no específico" se refiere a una reacción mediada por leucocitos que no tienen memoria inmunológica. Entre estas células se incluyen granulocitos y macrófagos. 15 Tal como se usa aquí, se dice que la inflamación se produce por una respuesta del sistema de defensa no específico si la inflamación está provocada por, mediada por o asociada con una reacción del sistema de defensa no específico. Entre los ejemplos de inflamación que resulta, al menos en parte, de una reacción del sistema de defensa no específico se incluye la inflamación asociada a condiciones como: el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) o síndromes de disfunción multiorgánica secundarios a una septicemia o un traumatismo; daño por reperfusión del tejido miocárdico u otros tejidos; 20 glomerulonefritis aguda; artritis reactiva; dermatosis con componentes inflamatorios agudos; meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central; lesión térmica; hemodiálisis; leucoférasis; colitis ulcerativa; enfermedad de Crohn; enterocolitis necrotizante; síndromes asociados a la transfusión de granulocitos; y toxicidad inducida por citoquinas. El término "mediado por el sistema inmunitario" se refiere a un proceso de naturaleza autoinmune o inflamatoria.

25 En algunos aspectos de la presente divulgación, la enfermedad asociada a la inflamación o el trastorno que se caracteriza por una inflamación se selecciona del grupo compuesto por asma, enfermedades autoinmunes, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pélvica, daño por reperfusión, artritis, silicosis, vasculitis, miopatías inflamatorias, hipersensibilidades, migraña, psoriasis, gota, aterosclerosis y cualesquiera combinaciones de estos.

30 Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen, entre otros, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pélvica, colitis ulcerativa, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple, psoriasis, vasculitis e inflamación alérgica como asma alérgico, dermatitis atópica e hipersensibilidad por contacto. Los ejemplos de enfermedades o trastornos de tipo autoinmune incluyen, entre otros, artritis 35 reumatoide, esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves (hipertiroidismo), tiroiditis de Hashimoto (hipotiroidismo), diabetes mellitus tipo 1, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, síndrome de Guillain-Barre, colangitis esclerosante primaria/cirrosis, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmune, fenómeno de Raynaud, escleroderma, síndrome de Sjogren, síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, polimialgia reumática, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, síndrome de fatiga crónica (CFS), psoriasis, enfermedad autoinmune de Addison, espondilitis anquilosante, encefalomielitis aguda diseminada, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, anemia aplásica, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia grave, síndrome de opsoclono-mioclono, neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, anemia perniciosa, poliartritis en perros, síndrome de Reiter, arteritis de Takayasu, anemia hemolítica autoinmune por anticuerpo caliente, granulomatosis de Wegener, fibromialgia (FM), síndrome autoinflamatorio PAPA, fiebre mediterránea familiar, síndrome autoinflamatorio familiar inducido por frío, 40 síndrome de Muckle-Wells y enfermedad inflamatoria multisistémica pediátrica.

45 Tal como se usa aquí, un tratamiento antiinflamatorio trata de prevenir o ralentizar (moderar) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, como el desarrollo o la progresión de la inflamación. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, el alivio de síntomas, la disminución del alcance de la enfermedad, un estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, el aplazamiento o la ralentización de la progresión de la enfermedad inflamatoria, la mejoría o paliación del estado patológico y la remisión (sea parcial o total), detectable o indetectable. Un tratamiento contra la inflamación también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la 50 supervivencia esperada sin tratamiento. Un tratamiento contra la inflamación también puede suprimir por completo la respuesta inflamatoria.

55 Un objetivo del tratamiento contra la inflamación es rebajar los niveles del mediador proinflamatorio hasta una cota tan próxima a la normal como resulte posible de forma segura. Por consiguiente, en un aspecto de la presente divulgación, el nivel de al menos un mediador proinflamatorio en el sujeto que se somete a tratamiento se rebaja al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, o al menos un 50% en comparación con un nivel de referencia. Un nivel de referencia puede ser el nivel del mediador proinflamatorio en el sujeto antes del comienzo del régimen de tratamiento.

5 Los compuestos, las composiciones y los métodos aquí divulgados también se pueden utilizar con fines de investigación para el estudio de la diferenciación o el desarrollo y para la generación de animales transgénicos con la excepción de animales transgénicos humanos, útiles con fines de investigación. Las células madre y los métodos de su uso aquí descritos se pueden emplear, por ejemplo, para crear y someter a ensayo modelos animales de la enfermedad de Parkinson u otros trastornos neurológicos. Las células madre y los métodos de la invención también se pueden emplear para estudiar los efectos de un compuesto concreto sobre la diferenciación o el desarrollo de células madre, y sobre la generación o regeneración de tejidos.

10 Para la administración a un sujeto, los compuestos aquí descritos se pueden suministrar en composiciones farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, estériles). Por consiguiente, otro aspecto aquí descrito es una composición farmacéutica que comprende un compuesto aquí divulgado y un portador farmacéuticamente aceptable. Estas 15 composiciones farmacéuticamente aceptables comprenden una cantidad efectiva de uno o más compuestos aquí descritos, formulados junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Tal y como se describe detalladamente más abajo, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden formular específicamente para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellas adaptadas para lo siguiente: (1) 20 administración oral, por ejemplo soluciones orales (soluciones acuosas y no acuosas o suspensiones), pastillas masticables, grageas, cápsulas, píldoras, tabletas (por ejemplo, aquellas diseñadas para absorción bucal, sublingual y/o sistémica), bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación bajo la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa (como bolo o infusión) o epidural, por ejemplo una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo una crema, una pomada o un parche de liberación controlada o una pulverización aplicada sobre la piel; (4) intravaginal o intrarrectal, por ejemplo en forma de pesario, crema o espuma; (5) sublingual; (6) ocular; (7) transdérmica; (8) transmucosa; o (9) nasal. Adicionalmente, los compuestos se pueden implantar en un paciente o inyectar utilizando un sistema de administración de fármacos. Véase, por ejemplo, Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981); Patente USA Nº 3.773.919; y Patente USA 25 Nº 353.270.960.

30 Tal como se usa aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance de un juicio médico sensato, adecuados para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesiva, en proporción a una relación riesgo/beneficio razonable. Por otra parte, para la administración a animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las composiciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza exigidos por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA estadounidense.

35 A los efectos del presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, como un relleno sólido o líquido, diluyente, excipiente o aditivo de fabricación (por ejemplo, lubricante, magnesio en talco, estearato de calcio o zinc, o ácido esteárico), o material de encapsulado disolvente, implicado en transmitir o transportar el compuesto del sujeto de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, u otra parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás 40 ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares como la lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, como carboximetilcelulosa de sodio, meticelulosa, eticelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco; (8) excipientes tales como mantecas de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles como propilenglicol; (11) polioles como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG); (12) ésteres como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tampón 45 como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes de carga, como polipéptidos y aminoácidos; (23) componentes séricos, como albúmina sérica, HDL y LDL; (22) alcoholes C₂-C₁₂, como etanol; y (23) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. También puede haber presentes en la formulación agentes humectantes, agentes 50 colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes desintegradores, aglutinantes, agentes edulcorante, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, inhibidores de proteasa, plastificantes, emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes de incremento de la viscosidad, agentes formadores de película, agentes solubilizantes, surfactantes, conservantes y antioxidantes. A los efectos del presente documento, los términos "excipiente", "portador", "portador farmacéuticamente aceptable" o similares se utilizan de forma indistinta.

55 Para las formulaciones líquidas, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Entre los ejemplos de disolventes no acuosos se encuentran el propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo soluciones salinas y tampón. Entre los

- ejemplos de aceites se encuentran aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol y aceite de hígado de pescado. Las soluciones o suspensiones también pueden incluir uno más de los componentes siguientes: un diluyente estéril, incluyendo agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol y otros disolventes sintéticos; agentes 5 antibacterianos, incluyendo alcohol benílico y metilparabenos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbido o bisulfito de sodio; agentes quelantes, incluyendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); tampones, incluyendo acetatos, citratos y fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, incluyendo cloruro de sodio y dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, incluyendo ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.
- 10 También se pueden utilizar liposomas y otros vehículos no acuosos como aceites fijos. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Salvo en la medida en que algún agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, su uso en las composiciones está contemplado. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios a las composiciones.
- 15 Como se ha indicado anteriormente, las composiciones también pueden comprender aglutinantes (por ejemplo, acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, ,etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, povidona), agentes desintegradores (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sólida, crospovidona, goma guar, glicolato de almidón de sodio, primogel), soluciones tamponadas (por ejemplo, tris-HC1, acetato, fosfato) de diversos pH y potencias iónicas, aditivos como albúmina o gelatina para evitar la absorción en superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), inhibidores de proteasa, 20 surfactantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol), lubricantes (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa), agentes potenciadores de la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, sacarosa, aspartamo, ácido cítrico), agentes aromatizantes (por ejemplo, menta, salicilato de 25 metilo, o aromatizante de naranja), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol de bencilo, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, laurilsulfato de sodio), fluidificantes (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, dietiltalato, trietilcitrato), emulsionantes (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.
- 30 Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones orales e intravenosas en dosis unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de las dosis. La forma de dosis unitarias a los efectos del presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosis unitarias de la divulgación viene dictada y depende 35 directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto a conseguir, y las limitaciones inherentes a la técnica de elaboración de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos. Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador, junto con instrucciones para su administración.
- 40 La cantidad de un compuesto aquí descrito que se puede combinar con un material portador para producir una forma de monodosis generalmente será una cantidad efectiva del compuesto. Una composición farmacéutica contiene típicamente una cantidad de al menos 0,01% en peso de ingrediente activo, es decir de un compuesto de esta divulgación, por peso de la composición farmacéutica total. Generalmente de un cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente un 0,01% a un 99% del compuesto, preferiblemente de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 70%, y más preferiblemente de un 10% a aproximadamente un 30%. Un porcentaje en peso es una ratio de peso de ingrediente activo respecto de la composición total. Así, por ejemplo, un 0,1% en peso es 0,1 gramos del compuesto por 100 gramos de 45 composición total.
- 50 La preparación de composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo es muy conocida en la técnica, por ejemplo, mediante procesos de mezcla, granulación o formación de tabletas. A menudo el ingrediente terapéutico activo se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Para la administración oral, los agentes activos se mezclan con aditivos habituales para este fin, tales como vehículos, estabilizantes o diluyentes inertes, y se convierten mediante métodos habituales en formas adecuadas para la administración, tales como tabletas, tabletas recubiertas, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones acuosas, alcohólicas u oleaginosas, tal y como se ha detallado anteriormente.
- 55 Para la administración intravenosa, se puede utilizar como solución tamponada ácido glucurónico, ácido L-láctico, ácido acético, ácido cítrico o cualquier ácido/base conjugada con capacidad tampón suficiente en el rango de pH aceptable para la administración intravenosa. También se puede emplear una solución de cloruro de sodio en la que el pH se haya ajustado en el rango deseado de ácido o base, como por ejemplo ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Normalmente un rango de pH para la formulación intravenosa puede oscilar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 12.

- Las formulaciones subcutáneas se pueden preparar con arreglo a procedimientos muy conocidos en la técnica a un rango de pH entre aproximadamente 5 y aproximadamente 12, que incluyan tampones y agentes de isotonicidad adecuados. Estos se pueden formular para proporcionar una dosis diaria del agente activo en una o más administraciones subcutáneas diarias. La elección del tampón y del pH adecuados para una formulación, dependiendo de la solubilidad de uno o más componentes a administrar, resulta sencilla para una persona con los conocimientos habituales en la técnica. También se puede emplear en la formulación subcutánea una solución de cloruro de sodio en la que el pH se haya ajustado en el rango deseado de ácido o base, como por ejemplo ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Normalmente un rango de pH para la formulación subcutánea puede oscilar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 12.
- 5 Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden ser en forma de sólido, gel o líquido. Por ejemplo, la formulación puede ser en forma de cápsulas, obleas, píldoras, tabletas, pastillas para chupar (utilizando una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o en forma de solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o en forma de elixir o jarabe, o en forma de pastillas (utilizando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o en forma de enjuague bucal. Ejemplos más concretos de tabletas orales incluyen comprimidos y tabletas masticables que pueden tener una cubierta entérica, estar recubiertas de azúcar o por una película. Entre los ejemplos de cápsulas se incluyen cápsulas de gelatina dura o blanda. Los gránulos y polvos se pueden suministrar en formas no efervescentes o efervescentes. Cada uno se puede combinar con otros ingredientes conocidos por los expertos en la técnica.
- 10 En determinados aspectos, el compuesto aquí descrito se puede proporcionar en forma farmacéutica sólida, preferiblemente cápsulas o tabletas. Las tabletas, píldoras, cápsulas, comprimidos pueden contener opcionalmente uno o más de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante; un diluyente; un agente desintegrador; un lubricante; un agente edulcorante; y un agente aromatizante.
- 15 Los ejemplos de aglutinantes que se pueden emplear incluyen, entre otros, celulosa microcristalina, goma tragacanto, solución de glucosa, mucílago de acacia, solución de gelatina, sacarosa y pasta de almidón.
- 20 Los ejemplos de lubricantes que se pueden emplear incluyen, entre otros, talco, almidón, magnesio o estearato de calcio, licopodio y ácido esteárico.
- 25 Los ejemplos de diluyentes que se pueden emplear incluyen, entre otros, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato dicálcico.
- 30 Los ejemplos de fluidificantes que se pueden emplear incluyen, entre otros, dióxido de silicio coloidal.
- 35 Los ejemplos de agentes desintegradores que se pueden utilizar incluyen, entre otros, croscarmelosa sódica, glicolato de almidón de sodio, ácido algínico, almidón de maíz, almidón de patata, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa.
- 40 Los ejemplos de agentes colorantes que se pueden utilizar incluyen, entre otros, cualquiera de los tintes permitidos para uso en alimentos, medicamentos y cosméticos (C y FD) certificados por la FDA solubles en agua, mezclas de estos; y tintes C y FD insolubles en agua suspendidos en hidrato de aluminio.
- 45 Los ejemplos de agentes edulcorantes que se pueden utilizar incluyen, entre otros, sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales como ciclamato sódico y sacarina, y cualquier número de aromatizantes secos en aerosol.
- 50 Los ejemplos de agentes aromatizantes que se pueden utilizar incluyen, entre otros, aromas naturales extraídos de plantas como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable como, entre otros, la menta y el salicilato de metilo.
- 55 Los ejemplos de agentes humectantes que se pueden utilizar incluyen, entre otros, monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y éter laurílico de polioxietileno.
- 60 Los ejemplos de recubrimiento antiemético que se pueden utilizar incluyen, entre otros, ácidos grasos, grasas, ceras, goma laca, goma laca con amoníaco y ftalatos de acetato de celulosa.
- 65 Los ejemplos de recubrimientos de película que se pueden utilizar incluyen, entre otros, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polietilenglicol 4000 (PEG 4000) y ftalato de acetato de celulosa.
- 70 Si se desea una administración oral, la sal del compuesto se puede proporcionar opcionalmente en una composición que la protege del entorno ácido del estómago. Por ejemplo, la composición se puede formular en un recubrimiento entérico que mantiene su integridad en el estómago y libera el compuesto activo en el intestino. La composición también se puede formular en combinación con un antiácido u otro ingrediente similar.
- 75 Cuando la forma farmacéutica es una cápsula, puede comprender también adicionalmente un portador líquido como un aceite graso. Por otra parte, las formas farmacéuticas también pueden comprender adicionalmente otros materiales que modifican su forma física, como recubrimientos de azúcar y otros agentes entéricos.

Los compuestos con arreglo a la presente invención también se pueden administrar en forma de un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, gránulos, goma para mascar o similares. Un jarabe puede opcionalmente comprender, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y determinados conservantes, colorantes y aromatizantes.

5 Los compuestos aquí descritos también se pueden mezclar con otros materiales activos que no afecten a la acción deseada o con materiales que suplementen la acción deseada. Por ejemplo, si un compuesto se utiliza para tratar el cáncer, puede usarse con otros agentes anticancerosos.

10 Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden incluir en tabletas que comprenden los compuestos aquí descritos incluyen, entre otros, aglutinantes, lubricantes, diluyentes, agentes desintegradores, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes humectantes. Las tabletas con cubierta entérica resisten la acción de los ácidos del estómago y se disuelven y desintegran en los intestinos de forma neutra o alcalina gracias a esta cubierta. Las tabletas recubiertas de azúcar pueden ser comprimidos a los que se aplican diferentes capas de sustancias farmacéuticamente aceptables. Las tabletas recubiertas de una película pueden ser comprimidos recubiertos con polímeros u otra capa adecuada. Las tabletas de compresión múltiple se producen aplicando más de un ciclo de compresión y utilizando las sustancias farmacéuticamente aceptables que se han mencionado anteriormente. También se pueden utilizar agentes colorantes en las tabletas. Se pueden utilizar agentes aromatizantes y edulcorantes en tabletas, y resultan particularmente útiles en la elaboración de tabletas y pastillas masticables.

15 Los ejemplos de formas farmacéuticas líquidas que se pueden utilizar incluyen, entre otros, soluciones acuosas, emulsiones, suspensiones, soluciones y/o suspensiones reconstituidas a partir de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas a partir de gránulos efervescentes.

20 Los ejemplos de soluciones acuosas que se pueden emplear incluyen, entre otros, elixires y jarabes. Tal como se usa aquí, por elixires se entiende preparaciones hidroalcohólicas transparentes edulcoradas. Entre los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en elixires se incluyen, por ejemplo, disolventes. Entre los ejemplos concretos de disolventes que se pueden utilizar se incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y almíbar. Tal como se usa aquí, por almíbar se entiende soluciones acuosas concentradas de un azúcar como, por ejemplo, sacarosa. Los almibares también pueden comprender opcionalmente un conservante.

25 Por emulsiones se entiende sistemas de dos fases en las que un líquido se dispersa en forma de pequeños glóbulos en otro líquido. Las emulsiones pueden ser opcionalmente emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite. Entre los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en emulsiones se incluyen, por ejemplo, líquidos no acuosos, agentes emulsionantes y conservantes.

30 Entre los ejemplos de sustancias farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en gránulos no efervescentes, para su reconstitución en forma de dosificación oral líquida, se incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes.

Entre los ejemplos de sustancias farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en gránulos efervescentes, para su reconstitución en forma de dosificación oral líquida, se incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono.

35 Opcionalmente se pueden utilizar agentes colorantes y aromatizantes en todas las formas de dosificación.

Entre los ejemplos concretos de conservantes que se pueden utilizar se incluyen glicerina, metilo y propilparabeno, ácido benzoico, benzoato de sodio y alcohol.

Entre los ejemplos concretos de líquidos no acuosos que se pueden utilizar en emulsiones se incluyen aceites minerales y aceites de semillas de algodón.

40 Entre los ejemplos concretos de agentes emulsionantes que se pueden utilizar se incluyen gelatina, acacia, tragacanto, bentonita y surfactantes como monooleato de sorbitán polioxietileno.

Entre los ejemplos concretos de agentes de suspensión que se pueden utilizar se incluyen carboximetilcelulosa de sodio, pectina, tragacanto, Veegum y acacia. Los diluyentes incluyen lactosa y sacarosa. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, almibares, glicerina y agentes edulcorantes artificiales como cilamato de sodio y sacarina.

45 Los ejemplos concretos de agentes humectantes que se pueden utilizar incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y éter laurílico de polioxietileno.

Entre los ejemplos concretos de ácidos orgánicos que se pueden utilizar se incluyen el ácido cítrico y el ácido tartárico.

50 Entre las fuentes de dióxido de carbono que se pueden utilizar en composiciones efervescentes se incluyen bicarbonato de sodio y carbonato de sodio. Entre los agentes colorantes se incluyen cualesquiera de los tintes C y FD permitidos certificados por la FDA solubles en agua y mezclas de estos.

- Entre los ejemplos concretos de agentes aromatizantes que se pueden utilizar se incluyen aromas naturales extraídos de plantas como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable al gusto.
- Para una forma de dosificación sólida, la solución o suspensión en, por ejemplo, carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos se puede encapsular preferiblemente en una cápsula de gelatina. Estas soluciones, así como su preparación y encapsulación, se divultan en las Patentes USA Nº 4 328 245; Nº 4 409 239; y Nº 4 410 545. Para una forma de dosificación líquida, la solución, por ejemplo, en un polietilenglicol, se puede diluir con una cantidad suficiente de un portador líquido farmacéuticamente aceptable, como agua, de forma que se pueda medir fácilmente para su administración.
- Alternativamente se pueden preparar formulaciones orales líquidas o semisólidas mediante la disolución o dispersión de la sal o el compuesto activo en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (por ejemplo, carbonato de propileno) y otros portadores similares, y encapsular estas soluciones o suspensiones en cápsulas de gelatina dura o blanda. Otras formulaciones útiles incluyen las expuestas en las Patentes USA Nº Re 28 819 y Nº 4 358 603.
- La presente invención también se refiere a composiciones diseñadas para administrar los compuestos aquí descritos aquí mediante la administración parenteral, que generalmente se caracteriza por la inyección, sea subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los inyectables se pueden preparar de cualquier forma convencional, por ejemplo en forma de suspensiones o soluciones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en líquidos antes de la inyección, o como emulsiones.
- Los ejemplos de excipientes que se pueden utilizar conjuntamente con inyectables según la presente divulgación incluyen, entre otros, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las composiciones inyectables también pueden comprender opcionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes humectantes o emulsionantes, soluciones tamponadas de pH, estabilizantes, solubilizantes y otros agentes como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. Aquí también se contempla la implantación de un sistema de liberación lenta o sostenida, de forma que se mantenga un nivel de administración constante. El porcentaje de compuesto activo contenido en estas composiciones parenterales depende en gran medida de su naturaleza específica, así como de la actividad del compuesto y de las necesidades del sujeto.
- La administración parenteral de las formulaciones incluye administraciones intravenosas, subcutáneas e intramusculares. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para la inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados aquí descritos, listos para combinarse con un disolvente justo antes del uso, incluyendo tabletas hipodérmicas, suspensiones estériles preparadas para la inyección, productos insolubles secos estériles preparados para combinar con un vehículo justo antes del uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas y no acuosas.
- Cuando se administran por vía intravenosa, los ejemplos de portadores adecuados incluyen, entre otros, suero fisiológico o solución salina tamponada de fosfato (PBS) y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de estos.
- Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar opcionalmente en preparaciones parenterales incluyen, entre otros, vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, soluciones tamponadas, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes, y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.
- Entre los ejemplos de vehículos acuosos que se pueden utilizar opcionalmente se incluyen inyección de cloruro sódico, inyección de solución de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de dextrosa y de Ringer lactato.
- Entre los ejemplos de vehículos parenterales no acuosos que se pueden utilizar opcionalmente se incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semillas de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuate.
- Se pueden añadir agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a las preparaciones parenterales, en particular cuando las preparaciones están envasadas en recipientes de múltiples dosis y, por consiguiente, diseñadas para ser almacenadas y retiradas en múltiples partes alícuotas. Entre los ejemplos de agentes antimicrobianos que se pueden utilizar se incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol de bencilo, clorobutanol, metil y propil ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio.
- Entre los ejemplos de agentes isotónicos que se pueden utilizar se incluyen cloruro sódico y dextrosa. Entre los ejemplos de tampones que se pueden utilizar se incluyen fosfato y citrato. Entre los ejemplos de antioxidantes que se pueden utilizar se incluye bisulfato de sodio. Entre los ejemplos de anestésicos locales que se pueden utilizar se incluye hidrocloruro de procaína. Entre los ejemplos de agentes de suspensión y dispersión que se pueden utilizar se incluyen carboximetilcelulosa

de sodio, hidroxipropilmecitolcelulosa y polivinilpirrolidona. Entre los ejemplos de agentes emulsionantes que se pueden utilizar se incluyen Polisorbato 80 (TWEEN 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA.

Los portadores farmacéuticos también pueden incluir opcionalmente alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste del pH.

- 5 La concentración del compuesto en la formulación parenteral se puede ajustar de forma que una inyección administre una cantidad farmacéuticamente efectiva suficiente para producir el efecto farmacológico deseado.

Se pueden diseñar inyectables para la administración local y sistémica.

Las preparaciones parenterales en dosis unitarias se pueden envasar en una ampolla, un vial o una jeringa con una aguja. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, tal y como se conoce y se practica en la técnica.

- 10 15 Los compuestos aquí descritos se pueden suspender opcionalmente en forma micronizada u otra forma adecuada o se pueden derivatizar para producir un producto activo más soluble o para producir un profármaco. La forma de la mezcla resultante depende de una serie de factores, entre los que se incluyen el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionado. La concentración efectiva es suficiente para mejorar los síntomas del estado patológico y se puede determinar empíricamente.

Los compuestos aquí descritos también se pueden preparar en forma de polvos liofilizados, que pueden ser reconstituidos para la administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. Los polvos liofilizados también se pueden formular en forma de sólidos o geles.

- 20 25 Se puede preparar polvo liofilizado estéril disolviendo el compuesto en una solución tamponada de fosfato de sodio con dextrosa u otro excipiente adecuado. La filtración estéril de la solución y la posterior liofilización en condiciones estándar conocidas por los expertos en la técnica proporcionan la formulación deseada. En resumen, el polvo liofilizado se puede preparar opcionalmente disolviendo dextrosa, sorbitol, fructosa, sirope de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, más o menos en una proporción del 1-20%, preferiblemente del 5-20%, en una solución tamponada adecuada, como citrato, fosfato de sodio o potasio u otra solución tamponada conocida por los expertos en la técnica, típicamente con pH neutro. Despues se añade el compuesto aquí descrito a la mezcla resultante, preferiblemente por encima de la temperatura ambiente, más preferiblemente a unos 30-35 °C, y se agita hasta que se disuelve. La mezcla resultante se diluye añadiendo más solución tamponada hasta la concentración deseada. La mezcla resultante se filtra o trata en condiciones estériles para eliminar partículas y garantizar la esterilidad, y se distribuye en viales para su liofilización. Cada vial puede contener una sola dosis o múltiples dosis del compuesto aquí descrito.

- 30 Los compuestos aquí descritos también se pueden administrar como mezclas tópicas. Las mezclas tópicas se pueden utilizar para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión o similares y se formula en forma de cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, apósticos, parches dérmicos o cualesquiera otras formulaciones adecuadas para la administración tópica.

- 35 40 Los compuestos aquí descritos se pueden formular en forma de aerosoles para aplicación tópica, como por inhalación (véanse las Patentes USA Nº 4 044 126, 4 414 209, y 4 364,923, que describen aerosoles para la administración de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para la administración en el tracto respiratorio pueden ser en forma de un aerosol o una solución para un nebulizador, o en forma de un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un portador inerte como lactosa. En este caso, las partículas de la formulación tendrán típicamente diámetros de menos de 50 micras, preferiblemente menos de 10 micras.

- 45 Los compuestos aquí descritos también se pueden formular para la aplicación local o tópica, como para aplicación tópica en la piel y las membranas mucosas, por ejemplo en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para la aplicación en el ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se contempla para aplicación transdérmica y también para la administración en ojos o mucosas, o para terapias de inhalación. También se pueden administrar soluciones nasales del compuesto, solo o combinado con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 50 Dependiendo del estado patológico a tratar, también se pueden utilizar otras vías de administración, como aplicación tópica, parches transdérmicos y administración rectal. Por ejemplo, las formas farmacéuticas para administración rectal son tabletas, cápsulas y supositorios rectales para lograr un efecto sistémico. A los efectos del presente documento, por supositorios rectales se entiende cuerpos sólidos para la inserción en el recto que se funden o disuelven a la temperatura corporal, liberando uno o más ingredientes farmacológicos o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Entre los ejemplos de bases se incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, carbowax (polietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. También se pueden utilizar combinaciones de varias bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales

se pueden preparar por el método de compresión o por moldeo. El peso típico de un supositorio rectal es de unos 2-3 gramos. Las tabletas y cápsulas para administración rectal se pueden fabricar utilizando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y los mismos métodos que en el caso de las formulaciones para administración oral.

5 La invención también se refiere a kits y otros artículos producidos para el tratamiento de enfermedades infecciosas o de enfermedades o trastornos neurodegenerativos. En una realización se proporciona un kit que comprende una composición que incluye al menos un compuesto aquí divulgado junto con instrucciones. Las instrucciones pueden indicar el estado patológico para el que se administrará la composición, recomendaciones de almacenamiento, información sobre la posología y/o instrucciones relativas a la forma de administración del compuesto. El kit también puede comprender materiales de envasado. El material de envasado puede comprender un recipiente para almacenar la composición. El kit 10 también puede comprender opcionalmente otros componentes, tales como jeringas para la administración de la composición. El kit puede comprender la composición en forma de una sola dosis o de varias dosis.

15 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un artículo producido que comprende una composición que incluye al menos un compuesto aquí divulgado junto con materiales de envasado. El material de envasado puede comprender un recipiente para almacenar la composición. El recipiente puede contener opcionalmente una etiqueta que indica el estado patológico para el que se administrará la composición, recomendaciones de almacenamiento, información sobre la posología y/o instrucciones relativas a la forma de administración del compuesto. El kit también puede comprender opcionalmente otros componentes, tales como jeringas para la administración de la composición. El kit puede comprender la composición en forma de una sola dosis o de varias dosis.

20 Cabe señalar que el material de envasado utilizado en los kits y artículos producidos con arreglo a la presente invención pueden formar una pluralidad de recipientes divididos como una botella dividida o un paquete de aluminio dividido. El recipiente puede tener cualquier forma convencional o conocida en la técnica que esté fabricada en un material farmacéuticamente aceptable, por ejemplo una caja de papel o cartón, una botella o una jarra de cristal o de plástico, una bolsa resellable (por ejemplo para almacenar una reserva de tabletas hasta su colocación en un recipiente diferente), o un blíster con dosis individuales para extraerlas presionando el envase de acuerdo con una pauta terapéutica. El recipiente 25 empleado dependerá de la forma farmacéutica concreta utilizada; por ejemplo generalmente no se utilizará una caja de cartón convencional para almacenar una suspensión líquida. Se puede utilizar más de un recipiente en un único paquete para comercializar una única forma farmacéutica. Por ejemplo, las tabletas se pueden guardar en una botella que a su vez se guarda en una caja. Típicamente el kit incluye instrucciones para la administración de los componentes separados. La forma de kit resulta particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferiblemente en 30 formas farmacéuticas diferentes (por ejemplo, oral, tópica, transdérmica y parenteral), cuando se administran a intervalos diferentes o cuando el médico que los prescribe desea la titulación de los componentes individuales de la combinación.

35 Un ejemplo concreto de un kit según la presente divulgación es lo que se denomina un blíster. Los blísteres son muy conocidos en el sector de los envasados y se utilizan generalmente para el envasado de formas farmacéuticas unitarias (tabletas, cápsulas). Por lo general, los blíster consisten en una lámina de material relativamente rígido recubierto por una cubierta preferiblemente de un material plástico transparente. Durante el proceso de envasado se forman huecos en la cubierta de plástico. Los huecos tienen el tamaño y la forma de las tabletas o cápsulas individuales que se van a envasar o pueden tener el tamaño y la forma necesarios para alojar múltiples tabletas y/o cápsulas a envasar. A continuación, las tabletas o cápsulas se colocan en los huecos convenientemente y la lámina de material relativamente rígido se sella contra la cubierta de plástico en la cara de la lámina opuesta a la dirección en la que se forman los huecos. Como resultado, las 40 tabletas o cápsulas se sellan individual o colectivamente, según se deseé, en los huecos creados entre la cubierta de plástico y la lámina. Preferiblemente la solidez de la lámina es tal que las tabletas o cápsulas se pueden retirar del blíster manualmente, aplicando presión sobre los huecos de forma que se crea una abertura en la lámina frente a los huecos. La tableta o cápsula se puede extraer entonces a través de dicha abertura.

45 Otro aspecto concreto de un kit es un dispensador diseñado para dispensar las dosis diarias de una en una en el orden de su uso previsto. Preferiblemente el dispensador está equipado con un sistema de recordatorio, con el fin de facilitar el cumplimiento de la pauta de tratamiento. Un ejemplo de dicho sistema de recordatorio es un contador mecánico que indica el número de dosis diarias que se han dispensado. Otro ejemplo de este sistema de recordatorio es una memoria de microchip alimentada por una batería y conectado a una pantalla de cristal líquido, o bien una señal audible de recordatorio que, por ejemplo, indica la fecha de la última dosis diaria tomada y/o recuerda cuándo se ha de tomar la siguiente.

50 Los compuestos aquí descritos se pueden utilizar o administrar a un sujeto en combinación con otro compuesto, por ejemplo una modalidad de tratamiento o un agente farmacéuticamente activo para una indicación concreta. Los ejemplos de compuestos farmacéuticamente activos incluyen, entre otros, los que se recogen en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13^a edición, Eds. T.R. Harrison *et al.* McGraw-Hill N.Y., NY; *Physicians' Desk Reference*, 50^a edición, 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co.; *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8^a edición, Goodman y Gilman, 1990; 55 *United States Pharmacopeia*, *The National Formulary*, USP XIINF XVII, 1990; edición actual *The Pharmacological Basis of Therapeutics* de Goodman y Gilman; y edición actual de *The Merck Index*.

Una amplia variedad de compuestos, por ejemplo agentes terapéuticos, pueden tener un efecto aditivo o sinérgico con los compuestos aquí descritos. Estos compuestos se pueden combinar de forma aditiva o sinérgica con los compuestos aquí descritos en los métodos aquí divulgados, por ejemplo para diferenciar células madre y/o tratar una enfermedad o un trastorno neurodegenerativo en un sujeto.

5 Los inventores han descubierto que la combinación de compuestos aquí divulgados, por ejemplo compuestos de 7-cloro-4-aminoquinolina con forskolina, muestran, inesperada y sorprendentemente, un efecto sinérgico sobre la estimulación de la actividad de transcripción a través del dominio de unión al ligando de Nurrl y sobre la potenciación de la función dual opuesta de Nurrl.

10 A los efectos del presente documento, el término "sinergismo" se refiere a una combinación de componentes en la que la actividad de la combinación es mayor que la suma de las actividades individuales de cada componente de la combinación. En algunas realizaciones, la actividad de la combinación es al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos una vez, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces mayor que la suma de las actividades individuales de cada componente de la combinación.

15 En algunos aspectos de la presente divulgación, un compuesto aquí divulgado se puede utilizar en combinación con un agonista de la dopamina. Sin ánimo de ceñirse a una teoría, se cree que la combinación de un compuesto aquí divulgado con un agonista de la dopamina muestra un efecto sinérgico sobre la estimulación de la actividad de transcripción a través del dominio de unión al ligando de Nurrl y potencia la función dual opuesta de Nurrl.

20 Tal como se usa aquí, el término "agonista de dopamina" se refiere a compuestos que activan y/o estimulan uno o más receptores de dopamina y/o aumentan los niveles de dopamina (como L-dopa o fármacos que inhiben el metabolismo de dopamina) y/o estimulan una vía de señalización de dopamina y/o reducir los niveles de norepinefrina y/o inhiben una vía de señalización de la norepinefrina. El término "agonista de la dopamina" también incluye análogos de moléculas de dopamina que presentan al menos alguna actividad biológica en común con los receptores de dopamina humanos nativos.

25 Por consiguiente, el término "agonista de la dopamina" abarca agentes dopaminérgicos. Tal como se usa aquí, el término "agente dopaminérgico" se refiere a compuestos que imitan la acción de la dopamina. Por consiguiente, se entenderá que el término agente dopaminérgico abarca la dopamina, derivados de la dopamina y compuestos que ejercen acciones similares a la dopamina sobre los receptores de dopamina. Entre los ejemplos de análogos de la dopamina se incluyen las ergolinas y las aporfinas, como la apomorfina, la pergolida, la bromocriptina y la lisurida). Los agonistas de la dopamina se utilizan principalmente para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson debido a sus efectos neuroprotectores sobre las neuronas dopaminérgicas.

30 Sin ánimo de ceñirse a una teoría, un agonista de la dopamina puede actuar a través de una de varias vías. Por ejemplo, un agonista de la dopamina puede activar o potenciar receptores de dopamina D1 y/o receptores similares a D_j, como receptores de la dopamina D1 y D5 y/o receptores de la dopamina D2 (por ejemplo, receptores D2, D2 corto y D2 largo, D4, y D4) y/o receptores de la dopamina D3 y/o D4. Un agonista de la dopamina puede actuar inhibiendo una o más enzimas que participan en la biosíntesis y/o transformación y/o descomposición de la dopamina.

35 Los ejemplos de agonistas de la dopamina incluyen, entre otros, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa); (-)-7-{{2-(4-fenilpiperazin-1-il)etil}propilamino}-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol; (+)-4-propil-9-hidroxinaftoxazina ((+)-PHNO); (E)-1-ariil-3-(4-piridinapiperazin-1-il)propanona oximas; (R)-3-(4-propilmorfolin-2-il)fenol (PF-219,061); (R,R)-S32504; 2-(N-feniletil-N-propilamino)-5-hidroxitetralina; 2-bromo-a-ergocriptina (bromocriptina); 5,6,7,8-tetrahidro-6-(2-propen-1-il)-4H-tiazolo[4,5-d]acepin-2-amina (BHT-920); inhibidor de absorción 5-HT; agonistas 5-HT-1A (como roxindola); 6-Br-APB; 6-metil-8-a-(N-acil)amino-9-ergolina; 6-metil-8-a-(N-fenil-acetil)amino-9-ergolina; 6-metil-8-β-carbobenciloxy-aminoetil-10-a-ergolina; 7,8-dihidroxi-5-fenil-octahidrobenzo[h]isoquinolina; 8-acilaminoergolina; 9,10-dihidroergocomina; antagonista a2-adrenérgico (como tergurida); A-412,997; A-68,930; A-77,636; A-86,929; ABT-670; ABT-724; AF-14; alaptida; amisulprida; cualquier ergolina D-2-halo-6-alquil-8-sustituida; aplindore; apomorfina; aripiprazol (Abilify en EE.UU.); análogos de benzazepina; BP-897; bromocriptina; bromocriptina mesilato; cabergolina; cis-8-hidroxi-3-(n-propil)-1,2,3a,4,5,9b-hexahidro-IH- y trans-N-{{4-[4-(2,3-diclorofenil)-l-piperazinil]ciclohexil}-3-metoxibenzamida; clozapina; inhibidores de COMT (como CGP-28014, entacapona y tolcapona); CP-226,269; CP-96,345; CY-208,243; D-2-bromo-6-metil-8-cianometilergolina; dihidrexidina; dihidro-alfa-ergocriptina; dihidro-alfa-ergotoxina; dihidroergocriptina; dihidroergocriptina; dihidroergotoxina (hidergina); dinapsolina; dinoxilina; domperidona; dopamina; agonistas del receptor D1 de dopamina; agonistas del receptor D2 de dopamina; agonistas del receptor D3 de dopamina; agonistas del receptor D4 de dopamina; agonistas del receptor D5 de dopamina; inhibidores de la absorción de dopamina (como GBR-12909, GBR-13069, GYKI-52895 y NS-2141); doprexina; doxantrina; ER-230; erfotoxina; ergocornina; derivados de ergolina; derivados de ergot alcaloides; eticloprida; etisulergina; FAUC 299; FAUC 316; fenoldopam; flibanserina; haloperidol; iloperidona; levodopa; lisurida; LSD; LU111995; mazapertina; 50 metilfenidato; inhibidores de monoamina oxidasa-B (como selegilina, N-(2butil)-N-metilpropargilamina, N-metil-N-(2-pentil)propargilamina, AGN-1133, derivados de ergot, lazabemida, LU-53439, MD-280040 y mofegilina); N-0434; naxagolida; olanzapina; agonistas del receptor de opioides (como NIH-10494); PD-118,440; PD-168,077; pergolida (como A-68939, A-

- 77636, dihidrexina y SKF-38393); PIP3EA; piribedil; pramipexol; quinagolida; quinelorano; quinpirola; trans-10,11-dihidroxí 5,6,6a, 7,8,12b-hexahidro racémico y análogos de benzazepina relacionados; racloprida; remoxiprida; risperidona; RoLO- 5824; ropinirol; rotigotina; salvinorina A; SDZ-HDC-912; sertindol; SKF-38,393; SKF-75,670; SKF-81,297; SKF-82,526 5 (fenoldopam); SKF-82,598; SKF-82,957; SKF-82,958; SKF-38,393; SKF-77,434; SKF-81,297; SKF-82,958; SKF-89,145; SKF-89,626; espiperona; espiroperidol; sulpirida; sumanirol; talipexol; tergurida; tropaprida; WAY-100635; YM 09151-2; zetidolina; agonistas del receptor β -adrenérgico; cabergolina; bromocriptina; pergolida; talipexol; ropinirole; pramipexol; y 10 análogos, derivados, enantiómeros, metabolitos, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de estos.
- Los ejemplos de agonistas del receptor beta-3 adrenérgico incluyen, entre otros, DPDMS; dopexamina; AJ-9677; AZ- 40140; BMS187413; BMS-194449; BMS-210285; BRL-26830A; BRL-28410; BRL-35135; BRL-37344; CGP 12177; CL- 10 316243; CP-114271; CP-331648; CP-331679; D-7114; FR-149175; GW-2696; GW-427353; ICI-198157; L-750355; L- 796568; LY-377604; N-5984; SB-226552; SR-58611A; SR-59062A; SWR0342SA; ZD-2079; y análogos, derivados, 15 enantiómeros, metabolitos, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de estos.
- En algunos aspectos, el agonista de dopamina inhibe la dopamina beta-hidroxilasa. La dopamina beta-hidroxilasa convierte 20 la dopamina en norepinefrina. De este modo, al inhibir la dopamina beta-hidroxilasa, la dopamina intracelular aumenta mientras que la norepinefrina desciende.
- Los ejemplos de inhibidores de DBH incluyen, entre otros, ácido fusárico; 1,1',1",1""-[disulfanodiilbis-(carbonotiooilnitrilo)]tetraetano (disulfiram); 2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona (tropolona, también denominada 25 2-hidroxitropona o purpurocatecol); 5-(aminometil)-1-[2(S)-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il]-1,3-dihidro-2i7-imidazol-2-tiona (nepicastat, INN, o SYN117); 1-(4-hidroxibenzoil)imidazol-2-tiol; FLA-63; dietilditiocarbamato; betaclorofenotilamina; 20 4-hidroxibencil cianida; 2-halo-3(p-hidroxifenil)-1-propeno; 1-fenil-1-propina; 2-fenilalilamina; 2-(2-tienil)alilamina; 4-hidro-2(2-tienil)alilamina; 3-fenilpropargilamina; 1-fenil-1-(aminoetil)etano; N-(trifluoroacetil)fenil(aminoetil) etano; ácido 5-picolínico sustituido con un grupo alquilo que contiene hasta seis átomos de carbono; ácido 5-picolínico sustituido con un 25 grupo haloalquilo que contiene hasta seis átomos de carbono; y análogos, derivados, enantiómeros, metabolitos, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de estos. Los inhibidores de la dopamina beta-hidroxilasa incluyen, entre otros, los que se recogen en las Patentes USA Nº 4 487 761; Nº 4 634 711; Nº 4 719 223; Nº 4 743 613; Nº 4 749 717; Nº 4 761 415; Nº 4 762 850; Nº 4 798 843; Nº 4 810 800; Nº 4 835 154; Nº 4 839 371; Nº 4 859 779; Nº 4 876 266; Nº 4 882 348; Nº 4 906 668; Nº 4 935 438; Nº 4 963 568; Nº 4 992 459; Nº 5 100 912; Nº 5 189 052; Nº 5 597 832; Nº 6 407 137; Nº 6 559 186; Nº 7 125 904; Nº 7 576 081.
- La cabergolina (Dostinex \circledR) es un agonista derivado de ergot de acción prolongada con una elevada afinidad por los 30 receptores D2. La bromocriptina (Parlodel \circledR) es un agonista del receptor de dopamina alcaloide de ergot. Es un potente agonista del receptor D2 y un débil antagonista del receptor de D1. Estimula los receptores tanto presinápticos como postsinápticos. La pergolida (Permax \circledR) es un agonista de la dopamina semisintético derivado del ergot del centeno. A diferencia de la bromocriptina, es un potente agonista del receptor D2 y un débil agonista del receptor de D1. El ropinirol (Requip \circledR) es un potente agonista de la dopamina no derivado de la ergolina. El pramipexol (Mirapex \circledR) es un derivado 35 sintético de aminobenzotiazol y un agonista de D2/D3 no derivado del ergot. La quinagolida (1-propilbenzo[g]quinolin-3-il)-Norprolac \circledR ; anteriormente CV 205-502) es otro agonista dopamínérigo de benzoquinolina no derivado del ergot ni de la ergolina, que bloquea la liberación de prolactina.
- Para métodos *in vivo*, el compuesto aquí divulgado se puede administrar conjuntamente con el agonista de dopamina. Por 40 ejemplo, para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, el compuesto aquí divulgado se puede administrar conjuntamente con el agonista de dopamina.
- Para el tratamiento de una inflamación o de trastornos asociados a la inflamación, el compuesto aquí divulgado se puede administrar conjuntamente con un agente conocido en la técnica para el tratamiento de una inflamación o de infecciones o trastornos asociados a la inflamación. Los ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen, entre otros, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE, como la aspirina, el ibuprofeno o el naproxeno), corticosteroides (como la 45 prednisona), medicación antimalaria (como hidrocloroquina), metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida, micofenolato, dexametasona, rosiglitazona, prenisolona, corticosterona, budesonida, estrógenos, estradiol, sulfasalazina, fenofibrato, pravastatina, simvastatina, proglitazona, ácido acetilsalicílico, ácido microfenólico, mesalamina y análogos, derivados, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de estos.
- El término "administración conjunta", "administrar conjuntamente" o "coadministrar" se refiere a la administración de un 50 compuesto aquí divulgado y de un segundo compuesto, por ejemplo un agonista de la dopamina, forskolina o colfósina, donde el compuesto aquí divulgado y el segundo compuesto se pueden administrar de forma simultánea, o en diferentes momentos, siempre que actúen de forma aditiva o sinérgica para aumentar la diferenciación de células madre.
- Sin limitaciones, el compuesto aquí divulgado y el segundo compuesto se pueden administrar en la misma formulación o 55 en formulaciones separadas. Cuando se administran en formulaciones separadas, el compuesto aquí divulgado y el segundo compuesto se pueden administrar con las horas de diferencia que se deseé. Por ejemplo, los compuestos se pueden administrar con un plazo de 24 horas, 12 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 45 minutos,

30 minutos, 25 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 5 minutos o menos de diferencia. Cuando se administran en formulaciones separadas, cualquiera de los compuestos se puede administrar primero.

Por otra parte, la administración conjunta no requiere que ambos compuestos se administren por la misma vía. Por consiguiente, cada uno de puede administrar independientemente o en una forma farmacéutica común. Por otra parte, los dos compuestos se pueden administrar en cualquier proporción de peso o moles entre sí. Por ejemplo, dos compuestos se pueden administrar en una proporción de aproximadamente 50:1, 40:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1,75, 1.5:1, o 1,25:1 a 1:1,25, 1:1,5, 1,75, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:20, 1:30, 1:40, o 1:50. Su proporción se puede basar en la cantidad efectiva de cada compuesto.

En algunos aspectos, un compuesto aquí divulgado se puede administrar conjuntamente con forskolina o colfosina.

10 En algunos aspectos, se puede administrar conjuntamente amodiaquina o cloroquina con forskolina o colfosina. En algunas otras realizaciones,

En algunos aspectos, el compuesto aquí divulgado es amodiaquina o cloroquina administrada conjuntamente con un agonista de la dopamina.

15 Sin limitación, los métodos que comprenden la coadministración del compuesto aquí divulgado pueden proporcionar una terapia neuroprotectora basada en un mecanismo novedoso que podría tener efectos modificadores de la enfermedad en enfermedades (neuro)inflamatorias como la EP y la EA, así como en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus. Además, habida cuenta de que los tratamientos farmacológicos actuales para la EP con agonistas de la dopamina como L-dopa provocan graves efectos secundarios, mientras que la AQ o la CQ no provocaron ninguno de estos efectos secundarios, su uso combinado reducirá o eliminará los efectos secundarios de los agonistas de la dopamina. La invención se define en las reivindicaciones.

Algunas definiciones seleccionadas

20 Salvo que se indique lo contrario o que el contexto implique lo contrario, los siguientes términos y frases incluyen los significados que se exponen a continuación. Salvo que se indique explícitamente lo contrario, o que sea evidente por el contexto, los términos y frases siguientes no excluyen el significado que el término o la frase haya adquirido en la técnica a la que pertenece. Las definiciones se aportan para ayudar a describir realizaciones concretas y no tienen por objeto limitar la invención reivindicada, dado que el alcance de la invención está limitado exclusivamente por las reivindicaciones. Por otra parte, salvo que el contexto exija lo contrario, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular.

30 Tal como se usa aquí, el término "comprende" se utiliza en referencia a composiciones, métodos y los respectivos componentes de estos, que son esenciales para la invención, aunque están abiertos a la inclusión de elementos no especificados, sean o no esenciales.

Los términos en singular "un/una" y "el/la" incluyen los plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. De forma similar, se entenderá que la palabra "o" incluye "y", salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

35 Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede utilizarse en la práctica o en el ensayo de esta divulgación, a continuación se describen los métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". La abreviatura "por ej." procede del latín (*exempli gratia*) y se utiliza en el presente para indicar que un ejemplo no tiene carácter limitador. Por consiguiente, la abreviatura "por ej." es sinónimo del término "por ejemplo".

40 Los términos "reducir", "reducido", "reducción", "descender" o "inhibir" se utilizan en el presente documento en general para referirse a una reducción en una cantidad estadísticamente significativa. Sin embargo, para que no quepa duda, "reducido", "reducción" o "descender" o "inhibir" significa un descenso de al menos el 10% en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo un descenso de al menos aproximadamente el 20%, o al menos aproximadamente el 30%, o al menos aproximadamente el 40%, o al menos aproximadamente el 50%, o al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 90% o hasta incluso un descenso del 100% (por ejemplo, ausencia de nivel en comparación con una muestra de referencia) o cualquier descenso entre 10-100% en comparación con un nivel de referencia.

45 Los términos "aumentado", "aumentar" o "potenciar" o "activar" se utilizan en el presente documento para referirse en general a un aumento en una cantidad estadísticamente significativa; para que no quepa duda, los términos "aumentado", "aumentar" o "potenciar" o "activar" significan un aumento de al menos un 10% en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo un aumento de al menos aproximadamente el 20%, o al menos aproximadamente el 30%, o al menos aproximadamente el 40%, o al menos aproximadamente el 50%, o al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 90% o hasta incluso un aumento del 100% o cualquier aumento entre 10-100% en comparación con un nivel de referencia, o de al menos 2 veces,

o al menos 3 veces, o al menos 4 veces, o al menos 5 veces o al menos 10 veces más, o cualquier aumento de entre 2 y 10 veces o más en comparación con un nivel de referencia.

El término "estadísticamente significativo" o "significativamente" se refiere a la importancia estadística y significa por lo general al menos dos desviaciones estándar (2SD) respecto de un nivel de referencia. El término se refiere a la evidencia estadística de que existe una diferencia. Se define como la probabilidad de tomar una decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es en realidad verdadera.

A los efectos del presente documento, el término "alifático" significa una fracción que se caracteriza por una disposición recta o ramificada de la cadena de átomos de carbono que la componen y puede ser saturada o parcialmente insaturada con uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más) enlaces dobles o triples.

10 Tal como se usa aquí, el término "alicíclico" significa una fracción que comprende una estructura de anillo no aromático. Las fracciones alicíclicas pueden ser saturadas o parcialmente insaturadas con uno o más enlaces dobles o triples. Las fracciones alicíclicas también pueden comprender opcionalmente heteroátomos como nitrógeno, oxígeno y azufre. Los átomos de nitrógeno pueden ser opcionalmente cuaternizados u oxidados y los átomos de azufre pueden ser opcionalmente oxidados. Los ejemplos de fracciones alicíclicas incluyen, entre otros, fracciones con anillos C₃-C₈ como ciclopropilo, ciclohexano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclopentadieno, ciclohexano, ciclohexeno, ciclohexadieno, cicloheptano, ciclohepteno, cicloheptadieno, ciclooctano, cicloocteno y ciclooctadieno.

15 Tal como se usa aquí, el término "aromático" significa una fracción donde los átomos constitutivos forman un sistema de anillo no saturado, todos los átomos del sistema de anillo son híbridos sp² y el número total de electrones pi es igual a 4n+2. Un anillo aromático puede ser tal que los átomos del anillo sean solo átomos de carbono (por ej., arilo) o puede incluir átomos de carbono y no carbono (por ej., heteroarilo).

20 Tal como se usa aquí, el término "alquilo" significa un radical alifático saturado, recto o ramificado, que tiene una cadena de átomos de carbono. Típicamente se utilizan C_x alquilo y C_x-C_y alquilo, donde X e Y indican el número de átomos de carbono de la cadena. Por ejemplo, C₁-C₆ alquilo incluye alquilos que tienen una cadena de entre 1 y 6 átomos de carbono (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, secbutilo, isobutilo, tertbutilo, pentilo, neopentilo, hexilo). El alquilo representado junto con otro radical (por ej., como en el arilalquilo) significa un radical divalente alquilo saturado, recto o ramificado, que tiene el número de átomos que se indica o cuando no se indica el número de átomos significa un enlace, por ejemplo (C₆-C₁₀)aril(C₀-C₃)alkil incluye fenil, bencil, fenetil, 1-feniletil 3-fenilpropil. El esqueleto del alquilo se puede insertar opcionalmente con uno o más heteroátomos, como N, O o S.

25 En determinados aspectos de la presente divulgación, un alquilo de cadena recta o cadena ramificada tiene 30 o menos átomos en su esqueleto (por ejemplo, C₁-C₃₀ para cadenas rectas, C₃-C₃₀ para cadenas ramificadas) y más preferiblemente 20 o menos. Asimismo, los cicloalquilos preferibles tienen 3-10 átomos de carbono en la estructura de anillo y más preferiblemente 5, 6 o 7 átomos de carbono en la estructura de anillo. El término "alquilo" (o "alquilo inferior") utilizado en la memoria, los ejemplos y las reivindicaciones pretende incluir tanto "alquilos no sustituidos" como "alquilos sustituidos", y este último se refiere a fracciones de alquilo que tienen uno o más sustituyentes que sustituyen a un hidrógeno en uno o más carbonos del esqueleto de hidrocarburo.

30 Salvo que se especifique de otro modo el número de carbonos, a los efectos del presente documento, por "alquilo inferior" se entiende un grupo alquilo, como el anteriormente definido, pero que tiene entre 1 y 10 carbonos, más preferiblemente entre 1 y 5 átomos de carbono en la estructura de su esqueleto. De forma similar, "alquenilo inferior" y "alquinilo inferior" tienen longitudes de cadena similares. Durante la aplicación, los grupos alquilo preferibles son alquilos inferiores. En realizaciones preferibles, un sustituyente aquí designado como alquilo es un alquilo inferior.

35 Los sustituyentes de un alquilo sustituido pueden incluir halógeno, hidroxi, nitro, tioles, amino, azido, imido, amido, fosforil (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonil (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoil y sulfonato), y grupos silil, así como éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos y ésteres), -CF₃, -CN.

40 Tal como se usa aquí, el término "alquenilo" se refiere a una cadena recta insaturada, una cadena ramificada o radicales hidrocarburos cílicos que tienen al menos un enlace doble carbono-carbono. Típicamente se utilizan C_x alquenilo y C_x-C_y alquenilo, donde X e Y indican el número de átomos de carbono de la cadena. Por ejemplo, C₂-C₆alquenil incluye alquenilos que tienen una cadena de entre 1 y 6 carbonos y al menos un enlace doble, como por ejemplo vinil, alil, 1-propenil, isopropenil, 1-butenil, 2-butenil, 3-butenil, 2-metilalil, 1-hexenil, 2-hexenil, 3-hexenil). El alquenilo representado junto con otro radical (por ej., como en el caso del arilalquenilo) significa un radical divalente de alquenilo, recto o ramificado, que tiene el número de átomos indicado. El esqueleto del alquenilo se puede insertar opcionalmente con uno o más heteroátomos, como N, O isopropanol S.

45 Tal como se usa aquí, el término "alquinilo" se refiere a radicales de hidrocarburos insaturados que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono. Típicamente se utilizan C_x alquinilo y C_x-C_y alquinilo, donde X e Y indican el número de átomos de carbono de la cadena. Por ejemplo, C₂-C₆alquinil incluye alquinilos que tienen una cadena de entre 1 y 6 carbonos y al menos un enlace triple, como por ejemplo etinil, 1-propinil, 2-pronil, 1-butinil, isopentinil, 1,3-hexa-diin-il, n-

hexinil, 3-pentinil, 1-hexen-3-inil. El alquinilo representado junto con otro radical (por ejemplo, como en el caso del arilalquinilo) significa un radical divalente de alquinilo, recto o ramificado, que tiene el número de átomos indicado. El esqueleto del alquinilo se puede insertar opcionalmente con uno o más heteroátomos, como N, O henil S.

5 Los términos "aqueleno," "alquenileno," y "alquinileno" se refieren a radicales divalentes de alquilo, alquenileno y alquinileno. Normalmente se utilizan los prefijos C_x y C_x-C_y, donde x e y indican el número de átomos de carbono de la cadena. Por ejemplo, C_i-C₆alqueleno incluye metileno, (—CH₂—), etileno (—CH₂CH₂—), trimetileno (—CH₂CH₂CH₂—), tetrametileno (—CH₂CH₂CH₂CH₂—), 2-metiltetrametileno (—CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂—), pentametileno (—CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—)).

10 10 Tal como se usa aquí, el término "alquilideno" significa un radical divalente alifático insaturado, recto o ramificado, que tiene una fórmula general =CR_aR_b. Típicamente se utilizan C_x alquilideno y C_x-C_y alquilideno, donde X e Y indican el número de átomos de carbono de la cadena. Por ejemplo, C₂-C₆alquilideno incluye metilideno (=CH₂), etilideno (=CHCH₃), isopropilideno (=C(CH₃)₂), propilideno (=CHCH₂CH₃), alilideno (=CH—CH=CH₂)).

15 15 Tal como se usa aquí, el término "heteroalquilo" se refiere a radicales que contienen carbono cíclico, de cadena recta o ramificada, o combinaciones de estos, que contienen al menos un heteroátomo. Los heteroátomos adecuados incluyen, entre otros, O, N, Si, P, Se, B, y S, donde los átomos de fósforo y azufre están opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno está opcionalmente cuaternizado. Los heteroalquilos pueden ser sustituidos como se ha definido anteriormente por grupos alquilo.

20 20 Tal como se usa aquí, el término "halógeno" o "halo" se refiere a un átomo seleccionado entre flúor, cloro, bromo y yodo. El término "radioisótopo de halógeno" o "isótopo halo" se refiere a un radionúclido de un átomo seleccionado entre flúor, cloro, bromo y yodo.

25 25 Una "fracción halógeno-sustituida" o "fracción halo-sustituida", como grupo aislado o como parte de un grupo mayor, significa una fracción alifática, acíclica o aromática, como las aquí descritas, sustituida por uno o más átomos "halo", conforme a la definición de estos términos en esta aplicación. Por ejemplo un alquilo halo-sustituido incluye haloalquilo, dihaloalquilo, trihaloalquilo, perhaloalquilo (por ejemplo, (C₁-C₃)alquil halo-sustituido incluye clorometil, diclorometil, difluorometil, trifluorometil, 2,2,2-trifluoroethyl, perfluoroethyl, 2,2,2-trifluoro-1,1-dicloroethyl).

30 30 El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático fusionado monocíclico, bicíclico o tricíclico. Típicamente se utilizan C_xaril y C_x-C_yaril, donde X e Y indican el número de átomos de carbono del sistema de anillo. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, entre otros, bencilo, fenilo, naftilo, antracenilo, azulenilo, fluorenilo, indanilo, indenilo, naftilo, fenilo, tetrahidronaftilo, benzimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, benzoxazolilo, benzisotiazolilo, benzimidazolinilo, carbazolilo, 4aH carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinnolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinil, dihidrofuro[2,3-b]tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizinilo, indolilo, 3H-indolilo, isatinoilo, isobenzofuranilo, isochromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metilenodioxifenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxindolilo, pirimidinilo, 35 35 fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotazinilo, fenoxatinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, piperidonilo, 4-piperidonilo, piperonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizinilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6H-1,2,5-tdiazinilo, 1,2,3-tdiazolilo, 1,2,4-tdiazolilo, 1,2,5-tdiazolilo, 1,3,4-tdiazolilo, 40 40 tian trenilo, tiazolilo, tienilo, tienothiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tienoeno y xantenilo. En algunas realizaciones, 1, 2, 3 o 4 átomos de hidrógeno de cada anillo pueden ser sustituidos por un sustituyente.

45 45 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5-8 miembros, fusionado bicíclico de 8-12 miembros o fusionado tricíclico de 11-14 miembros, que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico; dichos heteroátomos se seleccionan entre O, N, o S (por ej., átomos de carbono y 1-3, 1-6, o 1-9 heteroátomos de N, O, o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente). Típicamente se utilizan C_xheteroaril y C_x-C_yheteroaril, donde X e Y indican el número de átomos de carbono del sistema de anillo. Los heteroarilos incluyen, entre otros, aquellos derivados de benzo[b]furano, benzo[b] tiofeno, benzimidazol, imidazo[4,5-c]piridina, quinazolina, tieno[2,3-c]piridina, tieno[3,2-b]piridina, tieno[2, 3-b]piridina, indolizina, imidazo[1,2-a]piridina, quinolina, isoquinolina, ftalazina, quinoxalina, naftiridina, quinolizina, indol, isoindol, indazol, indolina, benzoxazol, benzopirazol, benzotiazol, imidazo[1,5-a]piridina, pirazolo[1,5-a]piridina, imidazo[1,2-a]pirimidina, imidazo[1,2-c]pirimidina, imidazo[1,5-a]pirimidina, imidazo[1,5-c]pirimidina, pirrolo[2,3-b]piridina, pirrolo[2,3-c]piridina, pirrolo[3,2-c]piridina, pirrolo[3,2-b]piridina, pirrolo[2,3-d]pirimidina, pirrolo[3,2-d]pirimidina, pirrolo [2,3-b]pirazina, pirazolo[1,5-a]piridina, pirrolo[1,2-b]piridazina, pirrolo[1,2-c]pirimidina, pirrolo[1,2-a]pirimidina, pirrolo[1,2-a]pirazina, triazo[1,5-a]piridina, pteridina, purina, carbazol, acridina, fenazina, fenotiazeno, fenoxazina, 1,2-dihidropirrolo[3,2,1-h]indol, indolizina, pirido[1,2-a]indol, 2(IH)-piridinona, benzimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, benzisoxazolilo, benzisotiazolilo, benzimidazolinilo, carbazolilo, 4aH-

carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinnolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-b]tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizinilo, indolilo, 3H-indolilo, isatinoilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metilenodioxifenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxepanilo, oxetanilo, oxindolilo, piperazinilo, piperidinilo, piperidonilo, 4-piperidonilo, piperonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo; pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizinilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo y xantenilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, entre otros, piridilo, furilo o furanilo, imidazolilo, benzimidazolilo, pirimidinilo, trifenilo o trienilo, piridazinilo, pirazinilo, quinilinilo, indolilo, tiazolilo, naftiridinilo, 2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-ilo, tetrahidroisoquinolinilo. En algunas realizaciones, 1, 2, 3 o 4 átomos de hidrógeno de cada anillo pueden ser sustituidos por un sustituyente.

El término "cicli" o "cicloalquil" se refiere a grupos de hidrocarburo cíclicos saturados y parcialmente insaturados que tienen entre 3 y 12 carbonos, por ejemplo entre 3 y 8 carbonos y, por ejemplo, entre 3 y 6 carbonos. Típicamente se utilizan C_x cicli y C_x-C_y cicli, donde X e Y indican el número de átomos de carbono del sistema de anillo. El grupo cicloalquilo también puede ser opcionalmente sustituido, por ejemplo, por 1, 2, 3, o 4 sustituyentes. C_3-C_{10} cicli incluye ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil, ciclohexenil, 2,5-ciclohexadienil, cicloheptil, ciclooctil, biciclo[2.2.2]octil, adamantan-1-il, decahidronaftil, oxociclohexil, dioxociclohexil, thiociclohexil, 2-oxobiciclo [2.2.1]hept-1-il.

Los arilos y heteroarilos pueden ser opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes en una o más posiciones, por ej. halógeno, alquil, aralquil, alquenil, alquinil, cicloalquil, hidroxil, amino, nitrógeno, sulfidril, imino, amido, fosfato, fosfonato, fosfinato, carbonil, carboxil, sili, éter, alquilitio, sulfonil, cetona, aldehido, éster, un herocíclico, una fracción aromática o heteroaromática, -CF₃, -CN o similares.

El término "heterociclico" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros, que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico; dichos heteroátomos se seleccionan entre O, N, o S (por ej., átomos de carbono y 1-3, 1-6, o 1-9 heteroátomos de N, O, o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente). Típicamente se utilizan C_x heterociclico y C_x-C_y heterociclico, donde X e Y indican el número de átomos de carbono del sistema de anillo. En algunas realizaciones, 1, 2 o 3 átomos de hidrógeno de cada anillo pueden ser sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de grupos heterociclico incluyen, entre otros, piperazinil, pyrrolidinil, dioxanil, morfolinil, tetrahidrofuranil, piperidil, 4-morfolil, 4-piperazinil, pirrolidinil, perhidropirrolizinil, 1,4-diazaperhidroepinil, 1,3-dioxanil, 1,4-dioxanil.

Los términos "bicíclico" y "tricíclico" se refieren a conjuntos de anillos policíclicos fusionados, conectados o unidos por un único enlace.

El término "ciclolalquieno" significa un arilo divalente, heteroarilo, ciclico o heterociclico.

Tal como se usa aquí, el término "anillo fusionado" se refiere a un anillo que está unido a otro anillo para formar un compuesto que tiene una estructura bicíclica cuando los átomos del anillo que son comunes a ambos anillos están directamente unidos entre sí. Los ejemplos de anillos fusionados comunes incluyen, entre otros, decalina, naftaleno, antraceno, fenantreno, indol, furano, benzofuran, quinolina. Los compuestos que tienen sistemas de anillos fusionados pueden ser saturados, parcialmente saturados, ciclico, heterociclico, aromáticos, heteroaromáticos.

Tal como se usa aquí, el término "carbonilo" significa el radical —C(O)–. Cabe señalar que el radical de carbonilo puede ser también sustituido por una variedad de sustituyentes para formar diferentes grupos carbonilo entre los que se incluyen, ácidos, haluros de ácido, amidas, ésteres, cetonas.

El término "carboxi" significa el radical —C(0)O—. Cabe señalar que los compuestos aquí descritos que contienen fracciones carboxi pueden incluir derivados protegidos de los mismos, es decir en los que el oxígeno es sustituido por un grupo de protección. Los grupos de protección adecuados para fracciones carboxi incluyen bencilo, turtbutilo.

El término "ciano" significa el radical —CN.

El término "heteroátomo" se refiere a un átomo que no es un átomo de carbono. Los ejemplos específicos de heteroátomos incluyen, entre otros, nitrógeno, oxígeno, azufre y halógenos. Una "fracción de heteroátomo" incluye una fracción en la que el átomo al que la fracción está unida no es un carbono. Entre los ejemplos de fracciones de heteroátomos se incluyen —N=—NR^N—, —N⁺⁽⁰⁾—, —O—, —S— o —S(0)₂—, —OS(0)₂—, y —SS—, donde R^N es H u otro sustituyente. El término "hidroxi" significa el radical —OH.

El término "derivado de imina" significa un derivado que comprende la fracción —C(NR)—, donde R comprende un átomo de hidrógeno o carbono alfa en el nitrógeno.

El término "nitro" significa el radical —NO₂.

5 Un "oxaalifático," "oxaalicíclico" u "oxaaromático" significa un alifático, alicíclico o aromático, tal y como se definen en el presente, salvo cuando uno o más átomos de oxígeno (—O—) están posicionados entre átomos de carbono del alifático, alicíclico o aromático, respectivamente.

Un "oxoalifático," "oxaalicíclico" u "oxoaromático" significa un alifático, alicíclico o aromático, tal y como se definen en el presente, sustituido por un grupo carbonilo. El grupo carbonilo puede ser un aldehído, cetona, éster, amida, ácido o haluro de ácido.

10 Tal como se usa aquí, el término "aromático" significa una fracción donde los átomos constitutivos forman un sistema de anillo no saturado, todos los átomos del sistema de anillo son híbridos sp² y el número total de electrones pi es igual a 4n+2. Un anillo aromático puede ser tal que los átomos del anillo sean solo átomos de carbono (por ej., arilo) o puede incluir átomos de carbono y no carbono (por ej., heteroarilo).

15 A los efectos del presente documento, el término "sustituido" se refiere a la sustitución independiente de uno o más (típicamente 1, 2, 3, 4 o 5) de los átomos de hidrógeno de la fracción sustituida por sustituyentes independientemente seleccionados del grupo de sustituyentes que se enumeran a continuación en la definición de "sustituyentes" o especificados de otro modo. En general, un sustituyente distinto de hidrógeno puede ser cualquier sustituyente que se puede unir a un átomo de la fracción dada que se especifica que va a ser sustituida. Los ejemplos de sustituyentes incluyen, entre otros, acil, acilamino, aciloxi, aldehído, alicíclico, alifático, alcanosulfonamida, alcanosulfonil, alcaril, alquenil, alcoxi, 20 alcoxicarbonil, alquil, alquilamino, alquilcarbanoil, alquileno, alquilideno, alquiltios, alquinil, amida, amido, amino, amino, aminoalquil, aralquil, aralquilamino, aralquilsulfonamida, arenesulfonamido, arenesulfonil, aromático, aril, arilamino, arilcarbanoil, ariloxi, azido, carbamoil, carbonil, carbonilos (incluyendo cetonas, carboxi, carboxilatos, CF₃, ciano (CN), cicloalquil, cicloalquilenos, éster, éter, haloalquil, halógeno, halógeno, heteroaril, heterociclo, hidroxi, hidroxialquil, imino, iminocetona, cetona, mercapto, nitro, oxaalquil, oxo, oxoalquil, fosforil (incluyendo fosfonato y fosfinato), grupos sili, sulfonamido, sulfonil 25 (incluyendo sulfato, sulfamoil y sulfonato), tioles, y fracciones ureido, cada uno de los cuales también puede ser opcionalmente sustituidos o no sustituidos. En algunos casos, dos sustituyentes, junto con el carbono o los carbonos a los que se unen, pueden formar un anillo.

30 A los efectos del presente documento, los términos "alcoxil" o "alcoxi" se refieren a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que tiene un radical de oxígeno unido. Los grupos alcoxi representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, terbutoxi. Un "éter" son dos hidrocarburos unidos covalentemente por un oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un alquilo que convierte ese alquilo en un éter es o se asemeja a un alcoxi, por lo que puede ser representado por -O-alquil u -O-alquenil u -O-alquinil. Aroxi puede ser representado por -O-aryl u O-heteroaril, donde aril y heteroaril son como se define más abajo. Los grupos alcoxi y aroxi pueden ser sustituidos como se ha descrito anteriormente por alquilo.

35 El término "aralquilo", a los efectos del presente documento, se refiere a un grupo alquilo sustituido por un grupo arilo (por ej., un grupo aromático o heteroaromático).

El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que tiene un radical de azufre unido. En realizaciones preferibles, la fracción "alquiltio" está representada por -S-alquil o -S-alquenil o -S-alquinil. Entre los grupos alquiltio representativos se incluyen metiltio y etiltio. El término "alquiltio" comprende también grupos cicloalquilo, grupos alqueno y cicloalqueno, y grupos alquino. "Arlitio" se refiere a grupos arilo o heteroarilo.

40 El término "sulfinilo" significa el radical —SO—. Cabe señalar que el radical de sulfinilo puede ser también sustituido por una variedad de sustituyentes para formar diferentes grupos sulfinilo entre los que se incluyen ácidos sulfónicos, sulfinamidas, sulfinilésteres, sulfóxidos.

45 El término "sulfonilo" significa el radical —SO₂—. Cabe señalar que el radical de sulfonilo puede ser también sustituido por una variedad de sustituyentes para formar diferentes grupos sulfonilo entre los que se incluyen ácidos sulfónicos, sulfonamidas, ésteres de sulfonato, sulfonas.

El término "tiocarbonilo" significa el radical —C(S)—. Cabe señalar que el radical de tiocarbonilo puede ser también sustituido por una variedad de sustituyentes para formar diferentes grupos tiocarbonilo entre los que se incluyen tioácidos, tioamidas, tioésteres, tiocetonas.

50 A los efectos del presente documento, el término "amino" significa -NH₂. El término "alquilamino" significa una fracción de nitrógeno que tiene al menos un radical heterocíclico, cíclico o alifático insaturado, recto o ramificado, unido al nitrógeno. Por ejemplo, entre los grupos amino representativos se incluyen —NH₂, —NHCH₃, —N(CH₃)₂, —NH(C₁-C₁₀alkyl), —N(C₁-C₁₀alkyl)₂. El término "alquilamino" incluye "alquenilamino," "alquinilamino," "ciclilamino," y "heterocicilamino." El término "arilamino" significa una fracción de nitrógeno que tiene al menos un radical arilo unido al nitrógeno. Por ejemplo —NHAril,

5 y —N(aril)₂. El término "heteroarilamino" significa una fracción de nitrógeno que tiene al menos un radical heteroarilo unido al nitrógeno. Por ejemplo —NHheteroaril, y —N(heteroaril)₂. Opcionalmente, dos sustituyentes juntos con el nitrógeno también pueden formar un anillo. Salvo que se indique lo contrario, los compuestos aquí descritos que contienen fracciones amino pueden incluir derivados protegidos de los mismos. Entre los grupos de protección adecuados para las fracciones amino se incluyen acetilo, terbutoxicarbonilo, benciloxicarbonilo.

10 El término "aminoalquilo" significa un alquilo, alquenilo y alquinilo anteriormente descrito, excepto cuando uno o más de los átomos de nitrógeno sustituidos o no sustituidos (—N—) están posicionados entre los átomos de carbono del alquilo, alquenilo o alquinilo. Por ejemplo, un aminoalquilo (C₂-C₆) se refiere a una cadena que comprende entre dos y seis átomos de carbono y uno o más átomos de nitrógeno posicionados entre los átomos de carbono.

15 10 Cabe señalar con respecto a todas las definiciones aquí proporcionadas que se deberán interpretar como definiciones abiertas, en el sentido de que pueden incluir más sustituyentes de los especificados. Por consiguiente, un alquilo C₁ indica que hay un átomo de carbono, pero no indica cuáles son los sustituyentes en el átomo de carbono. Por consiguiente, un alquilo C₁ comprende metilo (es decir, —CH₃), así como —CR_aR_bR_c; donde R_a, R_b, y R_c pueden, cada uno de ellos independientemente, ser hidrógeno o cualquier otro sustituyente donde el átomo alfa para el carbono es un heteroátomo o ciano. Por tanto, CF₃, CH₂OH y CH₂CN son todos alquilos C₁.

15 20 Tal como se usa aquí, el término "derivado" se refiere a una sustancia química estructuralmente relacionada con otra, es decir una sustancia "original", que se puede denominar compuesto "base". Un "derivado" se puede producir a partir del compuesto base estructuralmente relacionado en uno o más pasos. En algunas realizaciones, las propiedades generales físicas y químicas de un derivado pueden ser similares o diferentes a las del compuesto base.

20 25 30 35 Tal como se usa aquí, el término "poliamina" se refiere a moléculas que comprenden dos o más aminas. Las poliaminas pueden aminas alifáticas de cadena recta obtenidas biosintéticamente de aminoácidos. Varias poliaminas se revisaron en Marton et al. (1995) *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.* 35:55-91. Las poliaminas cadaverina y putrescina son diaminas producidas por descarboxilación de lisina u ornitina, respectivamente. La putrescina se convierte en espermidina, y la espermidina en espermina, por la adición de un grupo aminopropilo. Este grupo se proporciona mediante S-adenosilmetionina descarboxilada. "Análogo de poliamina" se define como un catión orgánico estructuralmente similar pero no idéntico a poliaminas como la espermina y/o espermidina y su precursor, diamina putrescina. Los análogos de poliamina, que pueden ser ramificados o no, incluyen, entre otros, BE-4444 [1,19bis(etilamino)-5,10,15-triazanonadecano]; BE-333 [NI, NI 1-dietilnorespermina; DENSPM; 1,11-bis(efilamino)4,8-diazaundecana; termina; Warner-Parke-Davis]; BE-33 [NI,N7-bis (etil) norespermidina]; BE-34 [NI,N8-bis (etil) espermidina]; BE-44 [NI,N9-bis (etil) homoespermidina]; BE-343 [NI,N12-bis (etil) espermina; dietilespermina-NI-N12; DESPM]; BE-373 [N,N'-bis(3-etylamino) propil]-1,7-heptano diamina, Merrell-Dow]; BE-444 [NI, N14-bis (etil) homoespermina; diefilhomoespermina-NIN14]; BE-3443 [1,17-bis (etilamino)-4,9,14-triazaheptadecano]; BE-4334 [1,17-bis (etilamino)-5,9,13triazaheptadecano]; 1,1 2-Me2-SPM [1,12dimetilespermina]; y los diversos análogos de poliamina que se divultan en WO 98/17624; la Patente USA Nº 5 889 061; WO 00/66175 y hemospermia WO 00/66587; y OSullivan et al. (1997) *Bioorg. Med. Chem.* 5:2145-2155 y Mukhopadhyaya et al. (1995) *Exp. Parasit.* 81:39-46; y la Patente USA Nº 4 935 449. Compuestos de poliamina cíclica y análogos de poliamina cíclica se divultan en la Solicitud de Patente Internacional WO 02/10142. En algunos de estos compuestos de poliamina cíclica, uno o más de los nitrógenos alifáticos forman parte de un grupo amida.

40 45 50 55 En algunos aspectos de la presente divulgación, los compuestos aquí descritos pueden tener la forma de un profármaco. Tal como se usa aquí, el término "profármaco" se refiere a compuestos que se pueden convertir, a través de algún proceso químico o fisiológico (por ej., procesos enzimáticos e hidrólisis metabólica), en un compuesto aquí descrito. Por consiguiente, el término "profármaco" se refiere asimismo a un precursor de un compuesto biológicamente activo que resulta farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede estar inactivo cuando se administra a un sujeto (por ejemplo, un éster), pero se convierte *in vivo* en un compuesto activo, por ejemplo, mediante hidrólisis del ácido carboxílico libre o del hidroxilo libre. El compuesto del profármaco suele ofrecer ventajas de solubilidad, compatibilidad con los tejidos o liberación retardada en un organismo. El término "profármaco" también incluirá cualesquiera portadores unidos covalentemente que liberan el compuesto activo *in vivo* cuando se administra dicho profármaco a un sujeto. Los profármacos de un compuesto activo como los aquí descritos se pueden preparar modificando grupos funcionales presentes en el compuesto activo, de forma que las modificaciones se escinden, mediante manipulación rutinaria o *in vivo*, en el compuesto activo original. Los profármacos incluyen compuestos en los que un grupo hidroxi, amino o mercapto está unido cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto activo se administra a un sujeto, se escinde para formar un grupo hidroxi libre, amino libre o mercapto libre, respectivamente. Por ejemplo, un compuesto que comprende un grupo hidroxi se puede administrar como un éster que se convierte mediante hidrólisis *in vivo* en el compuesto hidroxi. Entre los ésteres adecuados que se pueden convertir *in vivo* en compuestos hidroxi se incluyen acetatos, citratos, lactatos, tartratos, malonatos, oxalatos, salicilatos, propionatos, succinatos, fumaratos, formatos, benzoatos, maleatos, metileno-bis-b-hidroxinaftoatos, gentisatos, isetonatos, di-p-toluolitartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos, quinatos, ésteres de aminoácidos. Asimismo, un compuesto que comprende un grupo amino se puede administrar como una amida, por ejemplo acetamida, formamida y benzamida, que se convierte

mediante hidrólisis *in vivo* en el compuesto amino. Véase Harper, "Drug Latentiation" en Jucker, ed. *Progress in Drug Research* 4:221-294 (1962); Morozowich et al, "Application of Physical Organic Principles to Prodrug Design" en E. B. Roche ed. *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs*, APHA Acad. Pharm. Sci. 40 (1977); *Bioreversible Carriers in Drug in Drug Design, Theory and Application*, E. B. Roche, ed., APHA Acad. Pharm. Sci. (1987); 5 *Design of Prodrugs*, H. Bundgaard, Elsevier (1985); Wang et al. "Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drug" en *Curr. Pharm. Design.* 5(4):265-287 (1999); Pauletti et al. (1997) Improvement in peptide bioavailability: Peptidomimetics and Prodrug Strategies, *Adv. Drug. Delivery Rev.* 27:235-256; Mizen et al. (1998) "The Use of Esters as Prodrugs for Oral Delivery of (3-Lactam antibiotics," *Pharm. Biotech.* II,:345-365; Gaignault et al. (1996) "Designing Prodrugs and Bioprecursors I. Carrier Prodrugs," *Pract. Med. Chem.* 671-696; Asgharnejad, "Improving Oral Drug 10 Transport", en *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*, G. L. Amidon, P. I. Lee y E. M. Topp, Eds., Marcell Dekker, pp. 185-218 (2000); Balant et al., "Prodrugs for the improvement of drug absorption via different routes of administration", *Eur. J. DrugMetab. Pharmacokinet.*, 15(2): 143-53 (1990); Balimane y Sinko, "Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues", *Adv. Drug Delivery Rev.*, 39(1-3): 183-209 (1999); Browne, "Fosphenytoin (Cerebyx)", *Clin. Neuropharmacol.* 20(1): 1-12 (1997); Bundgaard, "Bioreversible derivatization of drugs— principle and 15 applicability to improve the therapeutic effects of drugs", *Arch. Pharm. Chemi* 86(1): 1-39 (1979); Bundgaard H. "Improved drug delivery by the prodrug approach", *Controlled Drug Delivery* 17: 179-96 (1987); Bundgaard H. "Prodrugs as a means to improve the delivery of peptide drugs", *Arfv. Drug Delivery Rev.* 8(1): 1-38 (1992); Fleisher et al. "Improved oral drug delivery: solubility limitations overcome by the use of prodrugs", *Arfv. Drug Delivery Rev.* 19(2): 115-130 (1996); Fleisher et al. "Design of prodrugs for improved gastrointestinal absorption by intestinal enzyme targeting", *Methods Enzymol.* 112 20 (Drug Enzyme Targeting, Pt. A): 360-81, (1985); Farquhar D, et al., "Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups", *Pharm. Sci.*, 72(3): 324-325 (1983); Freeman S, et al., "Bioreversible Protection for the Phospho Group: Chemical Stability and Bioactivation of Di(4-acetoxy-benzyl) Methylphosphonate with Carboxyesterase," *Chem. Soc. Chem. Commun.*, 875-877 (1991); Friis y Bundgaard, "Prodrugs of phosphates and phosphonates: Novel lipophilic alphaacyloxyalkyl ester 25 derivatives of phosphate- or phosphonate containing drugs masking the negative charges of these groups", *Eur. J. Pharm. Sci.* 4: 49-59 (1996); Gangwar et al., "Pro-drug, molecular structure and percutaneous delivery", *Des. Biopharm. Prop. Prodrugs Analogs, [Simp.]* Fecha de celebración: 1976, 409-21. (1977); Nathwani y Wood, "Penicillins: a current review of their clinical pharmacology and therapeutic use", *Drugs* 45(6): 866-94 (1993); Sinhababu y Thakker, "Prodrugs of anticancer agents", *Adv. Drug Delivery Rev.* 19(2): 241-273 (1996); Stella et al., "Prodrugs. Do they have advantages in clinical 30 practice?", *Drugs* 29(5): 455-73 (1985); Tan et al. "Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics", *Adv. Drug Delivery Rev.* 39(1-3): 117-151 (1999); Taylor, "Improved passive oral drug delivery via prodrugs", *Adv. Drug Delivery Rev.*, 19(2): 131-148 (1996); Valentino y Borchardt, "Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides", *Drug Discovery Today* 2(4): 148-155 (1997); Wiebe y Knaus, "Concepts for the design of anti-HIV nucleoside prodrugs for treating 35 cephalic HIV infection", *Adv. Drug Delivery Rev.*: 39(I-3):63-80 (1999); Waller et al., "Prodrugs", *Br. J. Clin. Pharmac.* 28: 497-507 (1989).

El término "derivados protegidos" significa derivados de compuestos aquí descritos en los que un sitio o sitios reactivos se bloquean con grupos de protección. Los derivados protegidos resultan útiles en la preparación de compuestos o pueden ser activos por sí solos. Se puede encontrar una lista completa de grupos de protección adecuados en T. W. Greene, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3^a edición, John Wiley & Sons, Inc. 1999.

40 "Isómeros" significa cualesquiera compuestos que tienen fórmulas moleculares idénticas, pero difieren en la naturaleza o secuencia de unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio. Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan "diastereómeros" y los estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles se denominan "enantiómeros" o, en ocasiones, "isómeros ópticos". Un átomo de carbono unido a cuatro 45 sustituyentes no idénticos se denomina "centro quiral". Un compuesto con un centro quiral tiene dos formas enantioméricas de quiralidad opuesta. Una mezcla de las dos formas enantioméricas se denomina una "mezcla racémica". Un compuesto que tiene más de un centro quiral tiene 2^{n-1} pares enantioméricos, donde n es el número de centros quirales. Los compuestos con más de un centro quiral pueden existir bien como diastómeros individuales o bien como una mezcla de diastómeros, lo que se denomina "mezcla diastereomérica". Cuando hay un centro quiral presente, un estereoisómero se 50 puede caracterizar por la configuración absoluta de ese centro quiral. Por configuración absoluta se entiende la disposición en el espacio de los sustituyentes unidos al centro quiral. Los enantiómeros se caracterizan por la configuración absoluta de sus centros quirales y se describen por las reglas de secuenciación R y S de Cahn, Ingold y Prelog. Las convenciones para la nomenclatura esteroquímica, los métodos para la determinación de la esteroquímica y la separación de estereoisómeros son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, véase "Advanced Organic Chemistry", 4^a edición, March, Jerry, John Wiley & Sons, New York, 1992).

55 El término "enantiómero" se utiliza para describir uno de un par de isómeros moleculares que son imágenes especulares entre sí y no superponibles. Otros términos utilizados para designar o referirse a enantiómeros incluyen "estereoisómeros" (debido a la diferente disposición o esteroquímico alrededor del centro quiral; aunque todos los enantiómeros son estereoisómeros, no todos los estereoisómeros son enantiómeros) o "isómeros ópticos" (debido a la actividad óptica de

los enantiómeros puros, que es la capacidad de diferentes enantiómeros puros de rotar la luz planopolarizada en diferentes direcciones). Por lo general, los enantiómeros tienen propiedades físicas idénticas, como los puntos de fusión y de ebullición, y también tienen propiedades espectroscópicas idénticas. Los enantiómeros pueden diferir entre sí por lo que respecta a su interacción con la luz planopolarizada y a su actividad biológica.

5 Las designaciones "R" y "S" se utilizan para denotar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su(s) centro(s) quiral(es). Las designaciones pueden aparecer en forma de prefijo o sufijo; pueden estar separadas o no del isómeros por un guion; pueden o no estar separadas por guiones; y pueden o no estar rodeadas por paréntesis.

10 Las designaciones o prefijos "+" y "-" se emplean para designar el signo de rotación de la luz planopolarizada por el compuesto, donde (-) significa que el compuesto es levorrotatorio (rotación hacia la izquierda). Un compuesto con el prefijo (+) es dextrorrotatorio (rotación hacia la derecha).

El término "mezcla racémica", "compuesto racémico" o "racemato" se refiere a una mezcla de los dos enantiómeros de un compuesto. Una mezcla racémica ideal es aquella en la que hay una mezcla 50:50 de los dos enantiómeros de un compuesto, de forma que la rotación óptima del enantiómero (+) cancela la rotación óptica del enantiómero (-).

15 El término "resolver" o "resolución", cuando se utiliza por referencia a una mezcla racémica, se refiere a la separación de un racemato en sus dos formas enantiomórficas (es decir, (+) y (-); formas 65 (R) y (S)). El término también se puede referir a la conversión enantioselectiva de un isómero de un racemato en un producto.

20 El término "exceso enantiomérico" o "ee" se refiere a un producto de reacción en el que un enantiómero se produce en exceso respecto del otro, y se define para una mezcla de enantiómeros (+) y (-), con la composición dada como la fracción en moles o peso o volumen $F(+)$ y $F(-)$ (donde la suma de $F(+)$ y $F(-) = 1$). El exceso enantiomérico se define como $* F(+) - F(-)^*$ y el exceso enantiomérico porcentual por $100x^* F(+) - F(-)^*$. La "pureza" de un enantiómero se describe por su ee o por el valor porcentual de ee (% ee).

25 Con independencia de que se expresen como un "enantiómero purificado" o un "enantiómero puro" o un "enantiómero resuelto" o un "compuesto en exceso enantiomérico", los términos pretenden indicar que la cantidad de un enantiómero supera a la cantidad del otro. Por consiguiente, a la hora de referirse a la preparación de un enantiómero, se puede utilizar tanto el porcentaje del enantiómero principal (por ejemplo, por moles o peso o volumen) como el exceso enantiomérico porcentual (o cualquiera de ellos) para determinar si la preparación representa una preparación de enantiómero purificado.

30 El término "pureza enantiomérica" o "pureza del enantiómero" de un isómero se refiere a una medida cualitativa o cuantitativa del enantiómero purificado; típicamente, la medición se expresa sobre la base del ee o exceso enantiomérico.

35 Los términos "enantiómero sustancialmente purificado", "enantiómero sustancialmente resuelto" o "preparación de enantiómero sustancialmente purificado" pretenden indicar una preparación (por ejemplo, obtenida de un material, sustrato o intermedio de partida no activo ópticamente) en la que un enantiómero ha sido enriquecido respecto del otro y, más preferiblemente, en la que el otro enantiómero representa menos del 20%, más preferiblemente menos del 10%, más preferiblemente menos del 5% y todavía más preferiblemente menos del 2% del enantiómero o de la preparación de enantiómero.

40 45 Los términos "enantiómero purificado", "enantiómero resuelto" y "preparación de enantiómero purificado" pretenden indicar una preparación (por ejemplo, obtenida de un material, sustrato o intermedio de partida no activo ópticamente) en la que un enantiómero (por ejemplo, el enantiómero R) ha sido enriquecido respecto del otro y, más preferiblemente, en la que el otro enantiómero (por ejemplo, el enantiómero S) representa menos del 30%, más preferiblemente menos del 20%, más preferiblemente menos del 10% (por ejemplo, en este caso concreto, el enantiómero R está sustancialmente libre de enantiómero S), más preferiblemente menos del 5% y todavía más preferiblemente menos del 2% de la preparación. Un enantiómero purificado se puede sintetizar sustancialmente libre del otro enantiómero o un enantiómero purificado se puede sintetizar en un procedimiento estéreo preferible, seguido de pasos de separación, o un enantiómero purificado se puede obtener de una mezcla racémica.

50 El término "enantioselectividad", también denominado ratio enantiomérico representado por el símbolo "E", se refiere a la capacidad selectiva de una enzima para generar a partir de un sustrato racémico un enantiómero respecto del otro en la mezcla racémica de un producto; en otras palabras, es una medida de la capacidad de la enzima para distinguir entre enantiómeros. Una reacción no selectiva tiene un E de 1, mientras que las soluciones con un valor E superior a 20 se consideran generalmente útiles para la síntesis o resolución. La enantioselectividad reside en una diferencia en los índices de conversión entre los enantiómeros en cuestión. Se obtienen productos de reacción enriquecidos en uno de los enantiómeros; por el contrario, los sustratos restantes están enriquecidos en el otro enantiómero. Con fines prácticos resulta generalmente deseable que uno de los enantiómeros se obtenga en claro exceso. Esto se consigue terminando el proceso de conversión en un determinado grado de conversión.

A los efectos del presente documento, los términos "efectivo" y "efectividad" incluyen tanto la efectividad farmacológica como la seguridad fisiológica. La efectividad farmacológica se refiere a la capacidad del tratamiento de producir un efecto

- biológico deseado en un paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad, u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de un órgano y/u organismo (lo que se suele denominar efectos secundarios) resultantes de la administración del tratamiento. "Menos efectivo" significa que el tratamiento produce un nivel terapéuticamente inferior de efectividad farmacológica y/o un nivel terapéuticamente superior de efectos fisiológicos adversos. Los compuestos aquí descritos son efectivos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- 5 Los términos "reducir", "reducido", "reducción", "descender" o "inhibir" se utilizan en el presente documento en general para referirse a una reducción en una cantidad estadísticamente significativa. Sin embargo, para que no quiera duda, "reducido", "reducción" o "descender" o "inhibir" significa un descenso de al menos el 10% en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo un descenso de al menos aproximadamente el 20%, o al menos aproximadamente el 30%, o al menos aproximadamente el 40%, o al menos aproximadamente el 50%, o al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 90% o hasta e incluyendo un descenso del 100% (por ejemplo, ausencia de nivel en comparación con una muestra de referencia) o cualquier descenso entre 10-100% en comparación con un nivel de referencia.
- 10 Los términos "aumentado", "aumentar" o "potenciar" o "activar" se utilizan en el presente documento para referirse en general a un aumento en una cantidad estadísticamente significativa; para que no quiera duda, los términos "aumentado", "aumentar" o "potenciar" o "activar" significan un aumento de al menos un 10% en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo un aumento de al menos aproximadamente el 20%, o al menos aproximadamente el 30%, o al menos aproximadamente el 40%, o al menos aproximadamente el 50%, o al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 90% o hasta incluso un aumento del 100% o cualquier aumento entre 10-100% en comparación con un nivel de referencia, o de al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 4 veces, o al menos 5 veces o al menos unas 10 veces más, o cualquier aumento de entre 2 y 10 veces o más en comparación con un nivel de referencia.
- 15 Los términos "estadísticamente significativo" o "significativamente" se refiere a la importancia estadística y significa por lo general al menos dos desviaciones estándar (2SD) respecto de un nivel de referencia. El término se refiere a la evidencia estadística de que existe una diferencia. Se define como la probabilidad de tomar una decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es en realidad verdadera.
- 20 Tal como se usa aquí, un "sujeto" significa un ser humano o animal. Por lo general, el animal es un vertebrado, como un primate, un roedor, un animal doméstico o un animal salvaje. Los primates incluyen chimpancés, monos cinomólogos, monos araña y macacos, por ejemplo rhesus. Los roedores incluyen ratones, ratas, marmotas canadienses, hurones, conejos y hámsters. Los animales domésticos y salvajes incluyen vacas; caballos; cerdos; ciervos; bisontes; búfalos; especies felinas como el gato doméstico; especies caninas como el perro, el zorro, el lobo; especies aviares como la gallina, el emú, el aveSTRUZ; y peces como la trucha, el bagre y el salmón. El paciente o sujeto incluye cualquier subconjunto de los anteriores, es decir todos los anteriores, pero excluyendo uno o más grupos o especies como seres humanos, primates o roedores. En determinados aspectos del presente documento, el sujeto es un mamífero, por ejemplo un primate, por ejemplo un ser humano. Tal como se usa aquí, los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan de forma intercambiable. Tal como se usa aquí, los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan de forma intercambiable. Un sujeto puede ser de género masculino o femenino.
- 25 Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo o una vaca, entre otros. Se pueden utilizar ventajosamente mamíferos distintos de seres humanos como sujetos que representan modelos animales de enfermedades y trastornos humanos. Por otra parte, los compuestos, las composiciones y los métodos aquí descritos se pueden utilizar para tratar animales domésticos y/o mascotas.
- 30 En jurisdicciones que prohíben patentar métodos que se practican en el cuerpo humano, el significado de "administración" de una composición a un sujeto humano se limitará a la prescripción de una sustancia controlada que un sujeto humano se autoadministraría mediante cualquier técnica (por ejemplo, oralmente, inhalación, aplicación tópica, inyección, inserción). Se pretende la interpretación más amplia razonable que sea coherente con las leyes o los reglamentos que definen el objeto patentable. En jurisdicciones que no prohíben patentar métodos que se practican en el cuerpo humano, la "administración" de composiciones incluye tanto métodos practicados en el cuerpo humano como las actividades anteriores.
- 35 40 45 Tal como se usa aquí, el término "administrar" se refiere a la colocación de una composición en un sujeto por un método o una vía que produce una localización al menos parcial del compuesto en el lugar deseado, de forma que se produce el efecto deseado. Una composición o compuesto aquí descrito se puede administrar por cualquier vía apropiada conocida en la técnica como, entre otras, vías orales o parenterales, incluyendo la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, aérea (aerosol), pulmonar, nasal, rectal y tópica (incluyendo bucal y sublingual).
- 50 55 Los ejemplos de modos de administración incluyen, entre otros, la inyección, infusión, instilación, inhalación o ingestión. "Inyección" incluye, entre otras, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular,

intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal e intraesternal. En realizaciones preferibles, las composiciones se administran por inyección o infusión intravenosa.

- 5 La administración también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se pueden utilizar penetrantes apropiados para la barrera a penetrar en la formulación. Por lo general, estos penetrantes son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo para la administración transmucosa, detergentes, sal biliar y derivados de ácido fóscico. La administración transmucosa se puede realizar utilizando pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como generalmente se conoce en la técnica.
- 10 Tal como se usa aquí, la frase "cantidad terapéuticamente efectiva" significa aquella cantidad de un compuesto, material o composición que comprende un compuesto aquí descrito que resulta efectiva para producir algún efecto terapéutico deseado en al menos una subpoblación de células de un sujeto con un ratio de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Por consiguiente, "cantidad terapéuticamente efectiva" significa aquella cantidad que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, resulta suficiente para que tenga efecto dicho tratamiento para la enfermedad.
- 15 La determinación de una cantidad efectiva entra claramente en las capacidades de los expertos en la técnica. Por lo general, la cantidad efectiva real puede variar en función del compuesto específico, el uso o la técnica de aplicación, el efecto deseado, la duración del efecto y los efectos secundarios, el historial del sujeto, su edad, condición, género, así como la gravedad y el tipo de condición médica que padece, y la administración de otros agentes farmacéuticamente activos. Por consiguiente, una dosis efectiva de un compuesto aquí descrito es una cantidad suficiente para producir al menos algún efecto terapéutico deseado en un sujeto.
- 20 Los datos obtenidos de ensayos en cultivos de células y estudios con animales se pueden utilizar para formular un rango de dosis para el uso en seres humanos. La dosis de estos compuestos se encuentra preferiblemente en un rango de concentraciones de circulación que incluyen la dosis efectiva ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma farmacéutica y de la vía de uso o administración utilizadas.
- 25 La dosis efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos en cultivos de células. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un rango de concentración plasmática en circulación que incluye la IC₅₀ (es decir, la concentración del terapéutico que logra la inhibición de los síntomas en un 50%) determinada en un cultivo de células. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los efectos de cualquier dosis concreta se pueden controlar a través de un bioensayo adecuado. La concentración plasmática efectiva de un compuesto aquí divulgado puede ser de aproximadamente 0,01 μM a aproximadamente 10 μM, de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 5 μM, o de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 3 μM en un sujeto, como una rata, un perro o un ser humano.
- 30 En general, las composiciones se administran de forma que un compuesto de la presente divulgación se utilice o administre a una dosis de 1 μg/kg a 1000 mg/kg; 1 μg/kg a 500 mg/kg; 1 μg/kg a 150 mg/kg, 1 μg/kg a 100 mg/kg, 1 μg/kg a 50 mg/kg, 1 μg/kg a 20 mg/kg, 1 μg/kg a 10 mg/kg, 1 μg/kg a 1 mg/kg, 100 μg/kg a 100 mg/kg, 100 μg/kg a 50 mg/kg, 100 μg/kg a 20 mg/kg, 100 μg/kg a 10 mg/kg, 100 μg/kg a 1 mg/kg, 1 mg/kg a 100 mg/kg, 1 mg/kg a 50 mg/kg, 1 mg/kg a 20 mg/kg, 1 mg/kg a 10 mg/kg, 10 mg/kg a 100 mg/kg, 10 mg/kg a 50 mg/kg, o 10 mg/kg a 20 mg/kg. Se entenderá que los rangos aquí proporcionados incluyen todos los rangos intermedios, por ejemplo el rango de 1 mg/kg a 10 mg/kg incluye 1 mg/kg a 2 mg/kg, 1 mg/kg a 3 mg/kg, 1 mg/kg a 4 mg/kg, 1 mg/kg a 5 mg/kg, 1 mg/kg a 6 mg/kg, 1 mg/kg a 7 mg/kg, 1 mg/kg a 8 mg/kg, 1 mg/kg a 9 mg/kg, 2 mg/kg a 10 mg/kg, 3 mg/kg a 10 mg/kg, 4 mg/kg a 10 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg, 6 mg/kg a 10 mg/kg, 7 mg/kg a 10 mg/kg, 8 mg/kg a 10 mg/kg, 9 mg/kg a 10 mg/kg. También se contempla una dosis (sea en forma de bolo o de infusión continua) de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, o de 0,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg. Se entenderá asimismo que los rangos intermedios a los anteriormente indicados también entran dentro del alcance de esta divulgación, por ejemplo, en el rango de 1 mg/kg a 10 mg/kg, rangos de uso o dosis por ejemplo de 2 mg/kg a 8 mg/kg, 3 mg/kg a 7 mg/kg, 4 mg/kg a 6 mg/kg.
- 35 Los compuestos aquí descritos se pueden administrar de una sola vez o se pueden dividir en un número de dosis más pequeñas para su administración a intervalos de tiempo. Se entenderá que la dosis y la duración precisas del tratamiento serán una función de la ubicación donde se administra la composición parenteralmente, el portador y otras variables que se pueden determinar de forma empírica utilizando protocolos de ensayo conocidos o por extrapolación de datos de ensayos *in vivo* o *in vitro*. Cabe señalar que los valores de las concentraciones y las dosis también pueden variar con la edad del individuo tratado. Se entenderá asimismo que para cualquier sujeto concreto, es posible que las pautas posológicas específicas se tengan que ajustar con el paso del tiempo en función de las necesidades del individuo y del criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones. Por consiguiente, los rangos de concentración expuestos en el presente documento se ofrecen a título ilustrativo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de las formulaciones reivindicadas.
- 40
- 45
- 50
- 55

- El compuesto se puede administrar en forma de un único bolo o de múltiples bolos, como infusión continua o mediante una combinación de ambos métodos. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar en forma de un único bolo inicialmente y, a continuación, administrarse en forma de infusión continua después del bolo. La tasa de infusión puede ser cualquiera suficiente para mantener una concentración plasmática efectiva. Algunas tasas de infusión contempladas incluyen de 1 µg/kg/min a 100 mg/kg/min, o de 1 µg/kg/hr a 1000 mg/kg/hr. Las tasas de infusión pueden incluir de 0,2 a 1,5 mg/kg/min, o más concretamente de 0,25 a 1 mg/kg/min, o todavía más concretamente de 0,25 a 0,5 mg/kg/min. Se apreciará que la tasa de infusión se puede determinar basándose en la dosis necesaria para mantener una concentración plasmática efectiva y en la tasa de eliminación del compuesto, de forma que el compuesto se administre mediante infusión a una velocidad suficiente para mantener de forma segura una concentración plasmática efectiva suficiente del compuesto en el torrente sanguíneo.
- Los términos "administración conjunta" o similares utilizados en el presente documento pretenden incluir la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un único paciente y se pretende que incluyan pautas de tratamiento en las que los agentes se administren por una misma vía o por otra vía de administración diferente, o al mismo tiempo o en un momento diferente.
- Por lo general, el término "tratamiento" o "tratar" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a una línea de células o tejido aislado de un paciente, donde dicho paciente padece una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición a padecer una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, paliar, mejorar o influir en la enfermedad, los síntomas de enfermedad o la predisposición a padecer una enfermedad. Por consiguiente, el tratamiento puede incluir la supresión, la inhibición, la prevención, el tratamiento o una combinación de estos. Por tratar se entiende, entre otras cosas, aumentar el tiempo hasta la progresión sostenida, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de terapéuticos alternativos o reducir la resistencia a estos, o una combinación de lo anterior. "Suprimir" o "inhibir", se refiere, entre otras cosas, a retrasar la aparición de síntomas, prevenir la recidiva de una enfermedad, reducir el número o la frecuencia de episodios de recidiva, aumentar la latencia entre episodios sintomáticos, reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir el número de síntomas, reducir la incidencia de síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la latencia de los síntomas, mejorar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o una combinación de estos. En una realización los síntomas son primarios, mientras que en otra realización los síntomas son secundarios. "Primario" se refiere a un síntoma que es resultado de un trastorno, por ejemplo diabetes; mientras que secundario se refiere a un síntoma que se deriva o es consecuencia de una causa primaria. Los síntomas pueden ser cualquier manifestación de una enfermedad o condición patológica.
- Por consiguiente, a los efectos del presente documento, el término "tratamiento" o "tratar" comprende cualquier administración de un compuesto aquí descrito e incluye: i) evitar que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a sufrir la enfermedad pero que todavía no padece ni presenta la patología o sintomatología de la enfermedad; ii) inhibir la enfermedad en un sujeto que padece o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad (es decir, impedir que la patología y/o sintomatología continúe evolucionando); o iii) mejorar la enfermedad en un sujeto que padece o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad (es decir, invertir la patología y/o sintomatología).
- Por "tratamiento", "prevención" o "mejora" de una enfermedad o trastorno se entiende el aplazamiento o la prevención de la aparición de dicha enfermedad o trastorno, la reversión, mitigación, mejoría, inhibición, ralentización o detención de la progresión, del agravamiento o el deterioro de la progresión o de la gravedad de una condición asociada con dicha enfermedad o trastorno. En una realización, los síntomas de una enfermedad o trastorno se alivian al menos en un 5%, al menos en un 10%, al menos en un 20%, al menos en un 30%, al menos en un 40% o al menos en un 50%.
- Concretamente, por "tratamiento, prevención o mejora de un trastorno neurodegenerativo" se entiende el aplazamiento o la prevención de la aparición de dicho trastorno (por ejemplo, muerte de neuronas motoras), revirtiendo, aliviando, mejorando, inhibiendo, ralentizando o deteniendo la progresión, el agravamiento o el deterioro de la progresión o de la gravedad de dicha condición. En una realización, el síntoma de un trastorno neurodegenerativo se alivia al menos en un 20%, al menos en un 30%, al menos en un 40% o al menos en un 50%. En una realización, el síntoma de una enfermedad neurodegenerativa se alivia más de un 50%. En una realización, el síntoma de un trastorno neurodegenerativo se alivia en un 80%, un 90% o más.
- La eficacia del tratamiento se determina por asociación con cualquier método conocido para el diagnóstico del trastorno. El alivio de uno o más síntomas del trastorno indica que el compuesto proporciona un beneficio clínico. Cualquiera de los métodos terapéuticos anteriormente descritos se puede aplicar a cualquier sujeto adecuado, incluyendo, por ejemplo, mamíferos como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y, más preferiblemente, seres humanos.
- Por "célula madre embrionaria humana" se entiende una célula, obtenida de un embrión en la etapa de blastocito, o con anterioridad a una diferenciación sustancial de la célula en las tres capas germinales, que puede autorregenerarse y presenta características morfológicas de células no diferenciadas, diferenciándose así de las células diferenciadas de

origen embrionario o adulto. Entre los ejemplos de características morfológicas se incluyen ratios nucleares/citoplasmicas elevadas y nucleolos prominentes bajo un microscopio. En condiciones adecuadas conocidas por los expertos en la técnica, las células madre embrionarias se pueden diferenciar en células o tejidos de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Los ensayos para la identificación de una célula madre embrionaria incluyen la capacidad de formar un teratoma en un huésped adecuado o de teñirse para detectar marcadores de una célula no diferenciada como Oct-4.

Por "una cantidad suficiente para tratar" se entiende la cantidad de un compuesto necesaria para mejorar, inhibir o paliar una condición en un sujeto, o un síntoma de una enfermedad, de manera clínicamente relevante. Cualquier mejora en el sujeto se considera suficiente para lograr el tratamiento.

- 10 Por "actividad biológica de Nurrl" se entiende cualquier actividad que se sabe que está causada *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* por un polipéptido de Nurrl. Por ejemplo, esta actividad puede incluir la activación de la transcripción de tirosina hidroxilasa.
- 15 "Ácido nucleico de Nurrl" y "gen de Nurrl" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a un ácido nucleico que codifica la totalidad o una parte de un polipéptido de Nurrl o que es sustancialmente idéntico a la totalidad o una parte de la secuencia de ácido nucleico con número de acceso Genbank ABO1 7586 (Ichinose et al., Gene 230:233-239, 1999), o análogos de esta. Por "polipéptido de Nurrl" se entiende un polipéptido sustancialmente idéntico a la totalidad o una parte de la secuencia de polipéptido con número de acceso Genbank BAA75666, o análogos de esta, y que presenta la actividad biológica de Nurrl.

Ejemplos

- 20 En estos ejemplos, cualesquiera compuestos sometidos a ensayo que no entran en el alcance de aplicación de las reivindicaciones se ofrecen a modo de ejemplos comparativos.

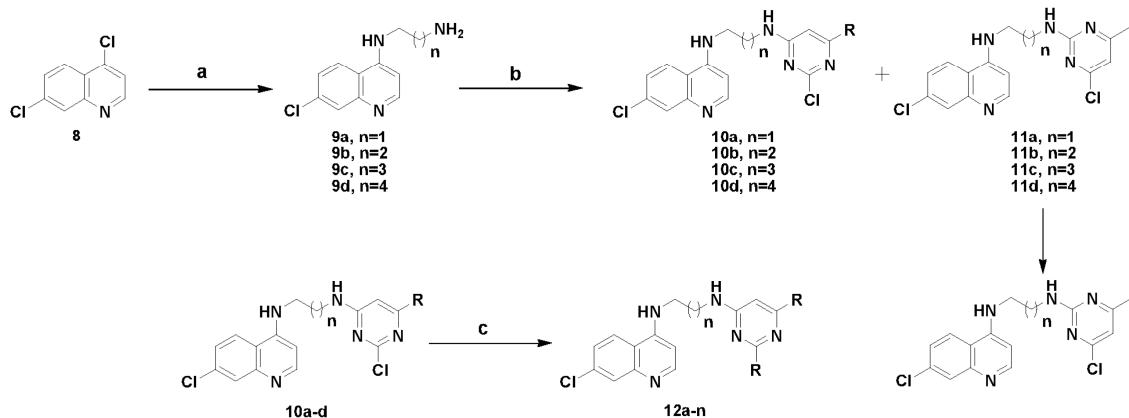
Ejemplo

1:

Protocolo sintético (ejemplos representativos):

- 25 Entre los prototipos de estructuras de la Figura 1, aquí se describe la síntesis de híbridos de 4-aminoquinolina-pirimidina. De forma similar, también se sintetizaron otros compuestos como los ilustrados en la Figura 1. Los conjugados de 4-aminoquinolina-pirimidina se sintetizaron utilizando el procedimiento de tres pasos que se describe en el Esquema 1. El material de partida disponible en el mercado 4,7-dicloroquinolina (8) se hizo reaccionar con un exceso de diaminoalcanos de cadena lineal alifática a través de un tipo de reacción SNAr en condiciones puras tal y como se recoge en las publicaciones para proporcionar 4-aminoquinolinas sustituidas (9a-d) con grupo amino terminal libre con rendimiento bueno a excelente [Roepe, P. D. J. Med. Chem. 2008, 51, 3466]. Estos intermedios (9a-d) tras la reacción con 2,4-dicloro-6-metil-pirimidina disponible en el mercado produjeron dos regiosómeros 10a-d en mayor y 11a-d en menor rendimiento. Los regiosómeros mayores 10a-d se sometieron a sustitución nucleofílica con diferentes aminas secundarias cíclicas a una temperatura elevada en DMF como solvente, para producir conjugados de 4-aminoquinolina-pirimidina (12a-n) con rendimiento excelente.

35 Esquema 1



a) diaminoalcanos, puros, 120-130°C, 6-8 h, 80-90%; b) 2,4-dicloro-6-metil-pirimidina, TEA, EtOH, RT, toda la noche, (10a-d, 70-80 % y 11a-d, 15-25 %); c) R = aminas secundarias, DMF, 100-120°C, 10-12 h, 80-85%.

Se estudió la actividad antimalaria *in vitro* de todos los conjugados con cepas tanto CQ-sensibles (clon D6) como CQ-resistentes (clon W2) de *P. falciparum* al tiempo que se determinó la citotoxicidad de células de mamífero contra células Vero, LLC-PK-1, HepG2 (Tabla 6) utilizando un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente [Jain, R. Bioorg. Med. Chem. 2005, 13, 4458; Khan, I. A. Lipids 2004, 37, 169]. La mayoría de los compuestos han mostrado una actividad antimalaria muy prometedora. De ellos, 11 compuestos (12b-c, 12e-f, 12h-n) han mostrado una mejor actividad antimalaria (IC50 = 0,006 μ M a 0,041 μ M) frente a la cepa CQ-sensible, mientras que 13 compuestos (10a, 12b-f, 12h-n) han mostrado una mejor actividad antimalaria (IC50 = 0,016 μ M a 0,34 μ M) frente a cepas CQ-resistentes de *P. falciparum*. El índice de selectividad de actividad antimalaria (calculado como un ratio de IC50 para citotoxicología con células Vero e IC50 para actividad antimalaria) fue muy elevado para la mayoría de estos compuestos en comparación con el fármaco estándar de cloroquina (CQ). La actividad de (12i, 12j, 12l y 12m) fue 7-8 veces mayor que en la CQ y dos veces mayor que en la artemisinina en la cepa CQ-sensible, lo que revela su gran potencia. La comparación de actividad antimalaria de 10a-d con 12a-n demostró claramente que la sustitución de Cl de los compuestos 10a-d (IC50 = 0,15 μ M a 0,46 μ M para CQ-sensible y 0,34 μ M a 0,74 μ M para CQ-resistente) por aminas secundarias (12b-f y 12h-n, IC50 = 0,006 μ M a 0,066 μ M para CQ-sensible y 0,016 μ M a 0,211 μ M para CQ-resistente) mejora la actividad antimalaria de estos compuestos. La comparación de actividad antimalaria de dos grupos de regiosímeros 10a-d (IC50 = 0,15 μ M a 0,46 μ M para CQ-sensible y 0,34 μ M a 0,74 μ M para CQ-resistente) y 11a-d (IC50 = 0,16 μ M a 0,27 μ M para CQ-sensible y 0,56 μ M a 0,124 μ M para CQ-resistente) indica claramente que ambos regiosímeros mostraron una potencia más o menos similar contra ambas cepas de *P. falciparum*. Estos resultados indican que el punto de unión del espaciador al núcleo de pirimidina puede no tener un gran impacto sobre el perfil de actividad. Para unos híbridos concretos de 4-aminoquinolina-pirimidina amino sustituidos (12a-d o 12e-h o 12i-l), el estudio de la relación estructura-actividad (SAR) no demostró ninguna tendencia obvia de actividad con un espaciador de carbono creciente o decreciente de C2 a C6, pero el cambio de los grupos amino para un espaciador concreto C2 (12e, 12i), C3 (12b, 12f, 12j, 12m), C4 (12c, 12k, 12n) o C6 (12d, 12h, 12l) cambia la actividad de forma significativa en orden descendente de 4-etil piperazina > 4-metil piperazina > morfolina > piperidina.

Entre los compuestos más activos (12b-12f, 12h-12n), aunque 12d, 12h, y 12l demostraron toxicidad para las tres líneas de células (VERO, LLC-PK-1, y HepG2), su índice de selectividad de actividad antimalaria fue considerablemente elevado (Tabla 7). En general, la citotoxicidad de la mayoría de los conjugados se produjo a concentraciones muy superiores a las concentraciones responsables de su actividad antimalaria. Algunos de los híbridos no fueron citotóxicos en absoluto hasta la máxima concentración testada de 60 μ M, lo que indica su elevado índice de selectividad de actividad antimalaria en comparación con la citotoxicidad para células de mamífero.

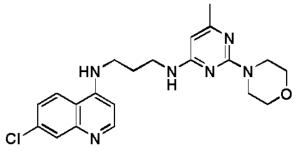
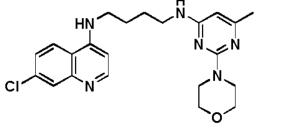
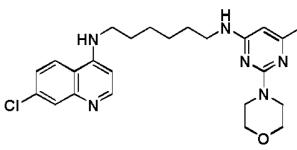
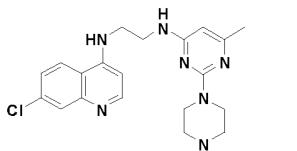
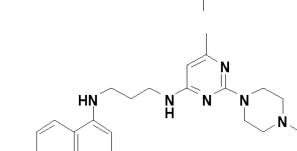
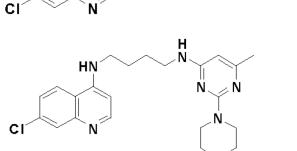
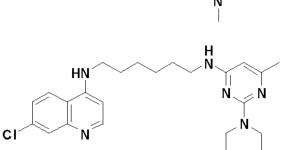
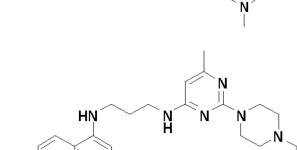
Tabla 6: Actividad antimalaria *in vitro* de híbridos de 4-aminoquinolina-pirimidina

Comp. N°	Estructura	<i>P. falciparum</i> (clon D6)		<i>P. falciparum</i> (clon W2)	
		IC50 (μ M)	S.I.	IC50 (μ M)	S.I.
10a		0,21	(>285)	0,34	(>176)
10b		0,35	(>170)	0,74	(>80)
10c		0,151	(>398)	0,690	(>87)
10d		0,469	73,7	0,544	27,2

(continuación)

Comp. N°	Estructura	P. falciparum (clon D6)		P. falciparum (clon W2)	
		IC50 (μM)	S.I.	IC50 (μM)	S.I.
11a		0,27	159	2 0,91	47,2
11b		0,27	(>222)	1,24	(>48)
11c		0,196	(>306)	0,664	(>90)
11d		0,165	336,9	0,568	97,8
12a		ND	ND	ND	ND
12b		0,026	(>2300)	0,211	(>284)
12c		0,021	(>2857)	0,082	(>730)
12d		0,066	142,4	0,128	73,4
12e		0,025	(>2400)	0,12	(>500)

(continuación)

Comp. N°	Estructura	P. falciparum (clon D6)		P. falciparum (clon W2)	
		IC50 (μM)	S.I.	IC50 (μM)	S.I.
12f		0,022	(>2727)	0,058	(>1034)
12g		ND	ND	ND	ND
12h		0,041	417,0	0,120	142,5
12i		0,006	(>10000)	0,046	(>1304)
12j		0,007	(>8571)	0,063	(>952)
12k		0,022	(>2727)	0,021	(>2857)
12l		0,007	(>1457)	0,016	(>637)
12m		0,006	(>10000)	0,061	(>983)
12n					

(continuación)

Comp. N°	Estructura	P. falciparum (clon D6)		P. falciparum (clon W2)	
		IC50 (μM)	S.I.	IC50 (μM)	S.I.
		0,019	1678,9	0,018	1772,2
Cloroquina		0,048	1250	0,43	140
Artemisina		0,012	5000	0,012	5000

Tabla 7: Citotoxicidad *in vitro* de híbridos de 4-aminoquinolina-pirimidina en células de mamífero.

Comp. N°	IC50 (μM)		
	VERO	LLC-PK-1	HepG2
10a	NC	NC	NC
10b	NC	NC	NC
10c	NC	NC	NC
10d	34,6	14,8	9,3
11a	43,0	41,6	43,0
11b	NC	NC	NC
11c	NC	NC	39,8
11d	55,6	23,4	8,1
12a	ND	ND	ND
12b	NC	NC	NC
12c	NC	NC	>60
12d	9,4	<6,7	<6,7
12e	NC	NC	NC
12f	NC	35,1	26,1
12g	ND	ND	ND
12h	17,1	9,8	<6,7
12i	NC	NC	NC
12j	NC	35,2	25,8
12k	NC	34,0	27,2
12l	10,2	7,4	<6,7
12m	NC	NC	NC
12n	31,9	10,5	14,9
Doxorrubicina	8,2	1,0	<1,0

5 Considerando la excelente actividad *in vitro* de estos compuestos, dos de los híbridos 12i y 12m (Tabla 8) se sometieron a una evaluación de la actividad antimalaria *in vivo*. Los resultados mostraron un 100% de supresión de la parasitemia el día 5 para ambos compuestos (12i y 12m) con una tasa de supervivencia de 5/5 y 4/5, respectivamente, el día 28, cuando a los ratones se les administró una dosis de 30 mg/kg durante tres días tras la infección. Tampoco se observó ninguna toxicidad evidente para estos compuestos. Se descubrió que estos resultados son mejores que en el fármaco estándar (cloroquina), que consigue un 100% de supresión de la parasitemia el día 5, cuando se administró una dosis de 100 mg/kg durante tres días tras la infección.

Estos excelentes resultados en modelos de animales pusieron claramente de manifiesto la potencia de estos compuestos y sugieren la idea de considerarlos para futuros candidatos a fármacos.

Tabla 8: Actividad antimalaria *in vivo* de híbridos de 4-aminoquinolina-pririmidina 12i y 12m.

Jaula	Tratamiento	Dosis (mg/kg x número de días tras la infección)	% de supresión parasitemia Día 5	Día 7	Supervivencia ²	Día de la muerte	MST3	Cura ⁴	Observaciones
1	Vehículo PO NAX4	-	0/5	11/11/12/21/2 1	15,2				0/5
2	Cloroquina PO 100X3	100,0 0	100,00	5/5	28/28/28/28/2 8	28			0/5
3	12i PO 3,3X3	23,52	35,21	1/5	21/28/21/13/1 3	19,2	Sin toxicidad evidente	0/5	
4	12i PO 10X3	97,03	2,03	0/5	21/22/22/21/2 1	21,4	Sin toxicidad evidente	0/5	
5	12i PO 30X3	100,0 0	100,00	5/5	28/28/28/28/2 8	28	Sin toxicidad evidente	4/5	
6	12m PO 3,3X3	20,12	19,09	0/5	17/21/21/21/2 1	20,2	Sin toxicidad evidente	0/5	
7	12m PO 10X3	73,89	27,14	0/5	7/21/20/7/21	15,2	Sin toxicidad evidente	0/5	
8	12m PO 30X3	100,0 0	100,00	4/5	28/28/28/28/2 4	27,2	Sin toxicidad evidente	1/5	

¹1% de supresión de parasitemia se calcula considerando la marasitemia media en el control vertical como 100%. Una supresión de parasitemia <80% se considera no significativa. ²Número de animales que sobrevivieron el día 28/total de animales del grupo (el día de la muerte tras la infección). ³MST - tiempo de supervivencia medio (días). ⁴Número de ratones sin parasitemia (curados) hasta el día 28 tras la infección. *No incluido en el análisis.

5 Procedimiento general para la síntesis de compuestos seleccionados (10a-d y 11a-d):

En una solución bien agitada de 2,4-dicloro-6-metil-primidina (2,0 g, 12,2 mmol) y trietilamina (2,48 g, 24,5 mmol) en etanol (50 ml) a temperatura ambiente se añadieron diaminas 9a-d (12,2 mmol). Se dejó agitar la mezcla de la reacción durante 10 toda la noche a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, lo que se evidenció mediante TLC, la mezcla de la reacción se vertió en agua fría (250 ml) y el precipitado así formado se filtró y lavó con exceso de agua en bomba de vacío. A continuación el precipitado bruto se secó, se disolvió en 100 ml de CHC13 y se extrajo con agua (2 x 500 ml) y finalmente con agua salada. El exceso de solvente se evaporó hasta secarse en condiciones de vacío y el producto bruto así obtenido se purificó mediante columna de SiO2 utilizando MeOH/CHC13 como eluyente para producir los respectivos compuestos 3a-d y 14a-d.

15 Procedimiento general para la síntesis de compuestos seleccionados (12a-n)

En un matraz de fondo redondo de 100 ml se tomó el compuesto 10a-d (1 eq.) y se disolvió en 10 ml de DMF. A esto se le añadió una solución de la respectiva amina (3 eq.) en DMF (5 ml) gota a gota. La mezcla de la reacción se dejó agitar a 100-120 °C durante 10 horas controlada por TLC. Una vez completada se añadió agua (50 ml) a la mezcla de la reacción y se extrajo con EtOAc (2 x 25 ml). A continuación se recogió la capa orgánica, se lavó con agua (2 x 100 ml) y agua salada, se secó con Na2S04 y por último se evaporó el exceso de disolvente en condiciones de vacío. El residuo bruto así obtenido se purificó por columna de SiO2 utilizando MeOH/CHC13 como eluyente para producir los respectivos compuestos 15a-n.

Datos espectrales de compuestos seleccionados:

25 N-(7-cloro-quinolin-4-il)-N'-(6-metil-2-piperidin-1-il-pirimidin-4-il)-etano-1,2-diamina (12a): Blanco sólido; Rendimiento: 85 %; mp 177-179 oC; IR(cm-1, KBr): 3385, 3344, 2941, 1580, 1447, 1331, 1237, 1141,790; 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6): 1,36-1,49 (m, 6H), 2,02 (s, 3H), 3,31-3,41 (m, 8H), 5,85 (s, 1H), 6,56-6,72 (m, 2H), 7,34 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,41 (brs, 1H), 7,68 (d, 1H, J = 2,3 Hz); 8,07 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 8,28 (d, 1H, J = 5,5 Hz); ESI-MS (m/z): 397,22 (M+H)+; Anal. calc. para C21H25C1N6: C, 63,55; H, 6,35; N, 21,17; Hallado: C, 63,53; H, 6,39; N, 21,26.

30 N-(7-cloro-quinolin-4-il)-N'-(6-metil-2-piperidin-1-il-pirimidin-4-il)-propano-1,3-diamina (12b): Amarillo claro sólido; Rendimiento: 82%; mp 194-196 oC; IR (cm-1, KBr): 3241, 3079, 1940, 1615, 1587, 1361, 1208, 1001,804; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 1,46-1,56 (m, 6H), 1,87 (quin, 2H), 2,16 (s, 3H), 3,36 (q, 2H), 4,45 (t, 4H), 3,49 (q, 2H), 4,86 (brs, 1H), 5,72 (s, 1H), 5,92 (brs, 1H), 6,32 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 7,22 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,66 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,85 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,41 (d, 1H, J = 5,5 Hz); 13C NMR (100 MHz, CDC13): 24,36, 24,67, 25,45, 29,06, 38,55, 40,34, 44,89, 92,36, 98,86, 117,43, 121,55, 124,83, 128,53, 134,63, 149,18, 149,91, 151,96, 162,42, 162,84, 165,62; ESI-MS (m/z): 411,23 (M+H)+; Anal. calc. para C22H27C1N6: C, 64,30; H, 6,62; N, 20,45; Hallado: C, 64,42; H, 6,68; N, 20,41.

35 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-(6-metil-2-piperidina-1-il-pirimidina-4-il)-butano-1,4-diamina (12c): Blanco sólido; Rendimiento: 88 %; mp 187-189 oC; IR (cm-1, KBr): 3247, 3067, 2935, 1581, 1364, 1210, 1079, 848; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 1,49-1,65 (m, 6H), 1,73-1,79 (m, 2H), 1,83-1,89 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 3,35 (q, 2H), 3,45-3,52 (m, 6H), 4,79 (brs, 1H), 5,25 (brs, 1H), 5,76 (s, 1H), 6,38 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 7,31 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,63 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,93 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,50 (d, 1H, J = 5,5 Hz); 13C NMR (100 MHz, CDC13): 24,09, 24,67, 25,43, 25,75, 27,64, 40,64, 43,02, 44,87, 91,91, 98,92, 117,14, 121,21, 125,04, 128,56, 134,66, 149,05, 149,76, 151,93, 162,17, 162,90, 165,67; ESI-MS (m/z): 425,28 (M+H)+; Anal. calc. para C23H29C1N6: C, 65,00; H, 6,88; N, 19,78; Hallado: C, 64,98; H, 6,90; N, 19,81.

40 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-(6-metil-2-piperidina-1-il-pirimidina-4-il)-hexano-1,6-diamina (12d): Marrón claro sólido; Rendimiento: 82 %; mp 97-99 oC; IR (cm-1, KBr): 3314, 2933, 1579, 1368, 1232, 1134, 983853, 789; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 1,47-1,64 (m, 12H), 1,72-1,79 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 3,29 (q, 2H), 3,39 (q, 2H), 3,54 (t, 4H), 4,76 (brs, 1H), 5,07 (brs, 1H), 5,74 (s, 1H), 6,39 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 7,34 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,67 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,95 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,51 (d, 1H, J = 5,5 Hz); ESI-MS (m/z): 453,12 (M+H)+; Anal. calc. para C25H33C1N6: C, 66,28; H, 7,34; N, 18,55; Hallado: C, 66,32; H, 7,35; N, 18,49.

45 N-(7-Cloro-quinolina4-il)-N'-(6-metil-2-morfoa-4-il-pirimidina-4-il)-etano-1,2-diamina (12e): Amarillo claro sólido; Rendimiento: 86 %; mp 165-167 oC; IR (cm-1, KBr): 3391, 3245, 2954, 1585, 1438, 1228, 1110, 993; 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6): 2,09 (s, 3H), 3,35-3,48 (m, 8H), 3,57 (t, 4H), 5,91 (s, 1H), 6,62-6,70 (m, 2H), 7,41 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,44 (brs, 1H), 7,74 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,14 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 8,35 (d, 1H, J = 5,5 Hz); ESI-MS (m/z): 399,20 (M+H)+; Anal. calc. para C20H23C1N6O: C, 60,22; H, 5,81; N, 21,07; Hallado: C, 60,34; H, 5,79; N, 21,09.

- 5 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-(6-metil-2-morfolina4-il-pirimidina-4-il)-propano-1,3-diamina (12f): Blanco sólido; Rendimiento: 82 %; mp 165-167 oC; IR (cm-1, KBr): 3233, 3063, 2954, 1576, 1366, 1247, 1123, 791; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 1,92 (quin, 2H), 2,20 (s, 3H), 3,39 (q, 2H), 3,47 (t, 4H), 3,52 (q, 2H), 3,66 (t, 4H), 5,22 (brs, 1H), 5,71 (s, 1H), 5,95 (brs, 1H), 6,34 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 7,25 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,2 Hz), 7,72 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,89 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,44 (d, 1H, J = 5,5 Hz); 13C NMR(100 MHz, CDC13): 24,10, 28,85,38,56, 40,34, 44,09, 66,46, 92,27, 98,85, 117,35, 121,52, 124,93, 128,46, 134,73, 149,06, 149,90, 151,83, 161,87, 163,27, 165,70; ESI-MS (m/z): 413,21 (M+H)+; Anal. calc. para C21H25C1N60: C, 61.08; H, 6.10; N, 20.35; Hallado: C, 61,12; H, 6,17; N, 20,40.
- 10 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-(6-metil-2-morfolina-4-il-pirimidina 4-il)-butano diamina (12g): Blanco sólido; Rendimiento: 80 %; mp 214-216 oC; IR (cm-1, KBr): 3256, 3066, 2964, 1583, 1367, 1245, 1122, 994, 790; 1HNMR(400 MHz, CDC13): 1,72-1,80 (m, 2H), 1,83-1,91 (m, 2H), 2,20 (s, 3H), 3,36 (q, 2H), 3,48 (q, 2H), 3,52 (t, 4H), 3,71 (t, 4H), 4,83 (brs, 1H), 5,19 (brs,1H), 5,75 (s, 1H), 6,40 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 7,32 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,63 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,95 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,51 (d, 1H, J = 5,5 Hz); 13C NMR (100 MHz, CDC13): 22,75, 24,18, 25,83, 41,39, 42,69, 64,93, 89,96, 97,19, 122,10, 122,28, 122,80, 126,34, 132,68, 147,77, 149,11, 150,43, 160,69, 161,99, 164,64; ESI-MS (m/z): 427,12 (M+H)+; Anal. calc. para C22H27C1N60: C, 61.89; H, 6.37; N, 19.68; Hallado: C, 61,99; H, 6,45; N, 19,70.
- 15 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-(6-metil-2-morfolina4-il-pirimidina-4-il)-hexano-1,6-diamina (12h): Amarillo claro sólido; Rendimiento: 90 %; mp 107-109 oC; IR (cm-1, KBr): 3245, 2935, 2855, 1579, 1366, 1220, 1123,994, 789; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 1,44-1,46 (m, 4H), 1,55-1,62 (m, 2H), 1,69-1,74 (m, 2H), 3,27 (q, 2H), 3,36 (q, 2H), 3,54 (t, 4H), 3,78 (t, 4H), 4,88 (brs, 1H), 5,26 (brs, 1H), 5,73 (s, 1H), 6,37 (d, 1H, J = 5,1 Hz), 7,31 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,70 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,93 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 8,50 (d, 1H, J = 5,1 Hz); 13C NMR (100 MHz, CDC13): 24,13, 26,62, 26,82, 28,66, 29,60, 41,04, 43,06, 44,09, 66,53, 91,58, 98,93, 117,07, 121,00, 125,08, 128,62, 134,67, 149,04, 149,68, 151,94, 162,00, 163,45, 166,31; ESI-MS (m/z): 456,21 (M+H)+; Anal. calc. para C24H31C1N60: C, 63.35; H, 6.87; N, 18.47; Hallado: C, 63,29; H, 6,91; N, 18,46.
- 20 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-[6-metil-2-(4-metil-piperazina-1-il)-pirimidina-4-il]-etano-1,2-diamina (12i): Blanco sólido 83%; Rendimiento: ; mp 134-136 oC; IR (cm-1, KBr): 3385, 3066, 2940, 1581, 1445, 1305, 1139, 997, 793; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 2,29 (s, 3H), 2,30 (s, 3H), 2,42 (t, 4H), 3,41 (q, 2H), 3,62 (t, 4H), 3,84 (q, 2H), 5,51 (brs, 1H), 5,87 (s, 1H), 6,30 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 6,90 (brs, 1H), 7,21 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,55 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,89 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,46 (d, 1H, J = 5,5 Hz); ESI-MS (m/z): 412,26 (M+H)+; Anal. calc. para C21H26C1N7: C, 61.23; H, 6.36; N, 23.80; Hallado: C, 61,18; H, 6,51; N, 23,85.
- 25 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-[6-metil-2-(4-metil-piperazina-1-il)-pirimidina-4-il]-propano-1,3-diamina (12j): Blanco roto sólido; Rendimiento: 80 %; mp 176-178 oC; IR (cm-1, KBr): 3257, 3065, 2938, 1580, 1369, 1236, 1142, 1001, 789; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 1,94 (quin, 2H), 2,21 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,36 (t, 4H), 3,42 (q, 2H), 3,52-3,56 (m, 6H), 5,32 (brs, 1H), 5,74 (s, 1H), 6,01 (brs, 1H), 6,37 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 7,27 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,75 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,91 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,46 (d, 1H, J = 5,5 Hz); ESI-MS (m/z): 426,32 (M+H)+; Anal. calc. para C22H28C1N7: C, 62.03; H, 6.63; N, 23.02; Hallado: C, 62,11; H, 6,68; N, 22,95.
- 30 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-[6-metil-2-(4-metil-piperazina-1-il)-pirimidina-4-il]-butano-1,4-diamina (12k): Blanco sólido; Rendimiento: 87 %; mp 183-185 oC; IR (cm-1, KBr): 3248, 3072, 2927, 1581, 1367, 1280, 1139, 997, 790; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 1,75-1,91 (m, 4H),2,19(s, 3H), 2,29 (s, 3H), 2,39 (t, 4H), 3,36 (q, 2H), 3,48 (q, 2H), 3,56 (t, 4H), 4,86 (brs, 1H), 5,23 (brs, 1H), 5,77 (s, 1H), 6,39 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 7,32 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,64 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,94 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,51 (d, 1H, J = 5,5 Hz); 13C NMR (100 MHz, CDC13): 24,15, 25,79, 27,65, 40,65, 43,04, 43,64, 46,10, 54,61, 92,00, 98,97, 117,12, 121,09, 125,09, 128,69, 134,67, 149,11, 149,68, 151,99, 162,13, 163,16, 166,16; ESI-MS (m/z): 440,19 (M+H)+; Anal. calc. para C23H30C1N7: C, 62.79; H, 6.87; N, 22.28; Hallado: C, 62,80; H, 6,85; N, 22,30.
- 35 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-[6-metil-2-(4-metil-piperazina-1-il)-pirimidina-4-il]-butano-1,6-diamina (12l): Marrón claro sólido; Rendimiento: 85 %; mp 152-154 oC; IR (cm-1, KBr): 3266, 3068, 2931, 1580, 1367, 1279, 1164, 993789; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 1,46-1,55 (m, 4H), 1,59-1,61 (m, 2H), 1,74-1,77 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,30 (s, 3H), 2,42-2,44 (m, 4H), 3,29 (q, 2H), 3,38 (q, 2H), 3,60 (t, 4H), 4,77 (brs, 1H), 5,02 (brs, 1H), 5,75 (s, 1H), 6,40 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 7,35 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,1 Hz), 7,66 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,95 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,51 (d, 1H, J = 5,5 Hz); 13C NMR (100 MHz, CDC13): 24,14, 26,62, 26,82, 28,70, 29,63, 41,05, 43,10, 43,64, 46,12, 54,67, 91,72, 98,98, 117,08, 120,96, 125,14, 128,70, 134,71, 149,07, 149,67, 151,98, 162,05, 163,21, 166,09; ESI-MS (m/z): 468,32 (M+H)+; Anal. calc. para C25H34C1N7: C, 64.15; H, 7.32; N, 20.95; Hallado: C, 64,09; H, 7,31; N, 20,98.
- 40 N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-[2-(4-etyl-piperazina-1-il)-6-metil-pirimidina-4-il]-propano-1,3-diamina (12m): Blanco sólido; Rendimiento: 82 %; mp 184-186 oC; IR (cm-1, KBr): 3233, 2967, 2812, 1579, 1366, 1250, 1132, 998; 1H NMR (400 MHz, CDC13): 1,10 (t, 3H), 1,95 (quin, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,40-2,44 (m, 6H), 3,43 (q, 2H), 3,55-3,59 (m, 6H), 4,94 (brs, 1H), 5,78 (s, 1H), 5,92 (brs, 1H), 6,40 (d, 1H, J = 5,4 Hz), 7,30 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,73 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,93 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,49 (d, 1H, J = 5,4 Hz); 13C NMR (100 MHz, CDC13): 11,86, 24,38, 29,05, 38,50, 40,31, 43,64, 52,26, 52,34, 92,35, 98,85, 117,38, 121,47, 124,84, 128,53, 134,61, 149,15, 149,84, 151,94, 162,34, 163,04, 166,03; ESI-MS (m/z): 440,16 (M+H)+; Anal. calc. para C23H30C1N7: C, 62.79; H, 6.87; N, 22.28; Hallado: C, 62,75; H, 6,89; N, 22,20.

N-(7-cloro-quinolina-4-il)-N'-[2-(4-etil-piperazina1-il)-6-metil-pirimidina-4-il]-butano-1,4-diamina (12n): Blanco sólido; Rendimiento: 86 %; mp 101-103 oC; IR (cm-1, KBr): 3255, 2939, 2813, 1583, 1372, 1249, 1127, 994, 791; 1H NMR (400 MHz, CDCl3): 1,09 (t, 3H), 1,73-1,80 (m, 2H), 1,84-1,91 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,38-2,43 (m, 6H), 3,35 (q, 2H), 3,48 (q, 2H), 3,57 (t, 4H), 4,83 (brs, 1H), 5,23 (brs, 1H), 5,77 (s, 1H), 6,39 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 7,31 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 2,0 Hz), 7,64 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,94 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,51 (d, 1H, J = 5,5 Hz); ESI-MS (m/z): 454,11 (M+H)+; Anal. calc. para C24H32C1N7: C, 63,49; H, 7,10; N, 21,60; Hallado: C, 63,59; H, 7,18; N, 21,63.

Ejemplo 2: Los agonistas para el receptor nuclear huérfano Nurrl ejercen efectos neuroprotectores y rescatan déficits de comportamiento en modelos animales de la enfermedad de Parkinson

Materiales y métodos

10 Biblioteca química. Se utilizaron los 960 compuestos de The Genesis Plus Collection (MicroSource Discovery Systems) para identificar el activador de Nurrl. Los compuestos de esta biblioteca son principalmente compuestos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense. También se sometieron a ensayo los 720 compuestos que contenían productos naturales puros y sus derivados (Microsource Discovery Sistems).

15 Construcciones de plásmidos La construcción informadora (*reporter*) TH2600LUC contiene 2,6 kb secuencias en sentido ascendente del gen de tirosina hidroxilasa de rata frente a un gen de luciferasa de luciérnaga en el vector pGL3-básico. Un plásmido de expresión de Nurrl fue amablemente facilitado por la Dra. Orla M. Conneely de Baylor College of Medicine (Houston, TX, USA). Se amplificó NurrlcDNA de ratón de longitud completa mediante RT-PCR a partir de pSV40Nurrl utilizando oligonucleótidos de secuencia directa 5'-GCTTCAAGCTTATGCCTTGTTCAGGCGCAGTATGG -3' (SEQ ID NO: 1) y secuencia inversa 5'- GTCAATCTCGAGGAAAGGTAAGGTGTCCAGGAAAAG -3' (SEQ ID NO: 2). El fragmento amplificado por PCR se cortó con Hind III y Xho I y, a continuación, se clonó en el plásmido pCDNA3.1/myc-His (Invitrogen), provocó la expresión de una proteína de fusión con etiqueta myc C-terminal y se designó pCMVNurrl-myc. El fragmento Nurrl LBD del aminoácido de la posición 328 al aminoácido de la posición 598 fue amplificado por PCR y subclonado en pZeoSV (Invitrogen) que contenía el dominio de unión a DNA GAL4. El Nur77 LBD (aa 354-598), el LBD del receptor de glucocorticoides alfa (GR α) (aa 522-777), el LBD del receptor hepático X alfa (LXR α) (aa 207-447), el LBD del receptor X retinoide (RXR) (aa 223-462), el LBD del receptor del proliferador activado de peroxisoma alfa (PPAR γ) (aa 201-467), el LBD del receptor del proliferador activado de peroxisoma gamma (PPAR γ) (aa 209-476) se amplificaron por PCR y se subclonaron en pZeoSV GAL que contenía el dominio de unión a DNA GAL4. El plásmido informador (*reporter*), p8xGAL-Luc, se construyó clonando oligonucleótidos sintéticos para generar ocho sitios de unión de GAL4 de repetición en tandem (5'-CTCGGAGGACAGTACTCCG-3' (SEQ ID NO: 3))¹ en sentido ascendente de la luciferasa en el plásmido pGV-B2 (Toyo Ink). Cuatro copias de NL3 (5'-GATCGAAAACAAAGGTCACTTAC-3' (SEQ ID NO: 4) (las letras en negrita indican un motivo NBRE de consenso)² se insertaron en sentido ascendente del promotor mínimo de TATA-luciferasa, dando como resultado p4x(NL3)-Luc. Se amplificaron cDNA de SRC-1 de ratón y SRC-3 humano por PCR utilizando pYX-mSRC1 (Open Biosystem, MMM1013-9498102) y pCR-TOPO hSRC3 (Open Biosystem, MHS4426-99625636) como plantilla, respectivamente. Los cDNA amplificados se subclonaron en pCMV 2B (Stratagene) y provocaron la expresión de una proteína de fusión marcada NH2-terminal. Los híbridos VP16/SRC1 y VP16/SRC3 se construyeron insertando el dominio de transactivación de la proteína VP16 anterior de SRC1 y SRC3, respectivamente. Nurrl-LBD, RXR-LBD, y Nur77-LBD se amplificaron por PCR utilizando 5'- AAA AAACATATGGTTAAAGAAGTGGTCG-3' (SEQ ID NO: 5) y 5'- GTCAATCTCGAGTTAGAAAGGTAAGGTGTCCAGGAAAAG- 3' (SEQ ID NO: 6) para Nurrl LBD, 5'- GAG GTG CAT ATG ACC AGC Estratagema GCC AAC GAG GAC ATG-3' (SEQ ID NO: 7) y 5'- AAA Estratagema CTC GAG CTA AGT CAT TTG GTG CGG CGC CTC -3' (SEQ ID NO: 8) para RXR LBD, y 5'- AAA CCC CAT ATG AAG CAG CAG CCC CCA GAT GCC- 3' (SEQ ID NO: 9) y 5'- AAA Estratagema CTC GAG TCA GAA GGG CAG CGT -3' (SEQ ID NO: 10) para Nur77 LBD (las letras en negrita indican el sitio de la enzima de restricción) y después se subclonaron en el vector pET15b para expresar la proteína de fusión marcada His. Las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía en columna de Ni-NTA (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad de todas las secuencias se verificó mediante análisis de la secuencia de DNA.

45 Transfección y examen del compuesto. Se mantuvieron células SK-N-BE(2)C de neuroblastoma humano en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de suero bovino fetal. Todos los medios de cultivo contenían 100 unidades/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina. Para la transfección, las células se colocaron en placas de 24 pocillos a 1,5x10⁵ células/pocillo en medios DMEM sin antibiótico, un día antes de la transfección. Las transfecciones se realizaron con Lipofectamine Plus (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad total de DNA fue 0,5 μ g por pocillo con 0,1 ug de pRSV- β -gal como control interno. Seis horas después de la transfección, los compuestos de los medios DMEM con 1% de suero fetal bovino tratado con carbón vegetal se añadieron y se incubaron durante toda la noche. Las células de cada pocillo se lisaron con 100 μ l de solución tamponada de lisis, que contenía 25 mM Tris-fosfato (pH 7,8), 2mM DTT, 2mM CDTA (ácido 1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético), 10% glicerol y 1% Triton X-100. A continuación se añadió el mismo volumen de sustrato de luciferasa de luciérnaga y se midió la actividad de la luciferasa utilizando un lector de placas luminómetro, y se normalizó para la actividad de beta-galactosidasa.

- 5 Ensayo Western blot. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada de fosfato (PBS) y se recogieron en una solución que contenía 1% Triton X-100, 20mM Tris (pH7.6), 150mM cloruro de sodio, 1mM fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF). La suspensión de las células se sometió a un baño de ultrasonidos y se llevó a ebullición en un volumen equivalente de solución tamponada de muestra SDS. Las muestras se sometieron electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham). Tras el bloqueo, la membrana se incubó con anticuerpos primarios diluidos en PBS que contenía 0,1% BSA. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: conejo anti-Nurrl (Santa Cruz; 1:3000), ratón anti-myc (Roche; 1:3000), ratón anti-flag (Roche 1:3000), conejo anti-caspasa-3 (Cell Signalling; 1:1000), y ratón anti-actina (Sigma 1:5000). La membrana se incubó con una dilución 1:3000 de anticuerpo inmunoglobulina G (IgG) anti-ratón o anti-conejo (Amersham) conjugado con peroxidasa de rábano. La detección se consiguió utilizando un sustrato de quimioluminiscencia mejorada (Amersham).
- 10 Análisis de inmunoprecipitación. Las células se alteraron en solución tamponada de lisis que contenía 20mM Tris (pH7.6), 100mM cloruro de sodio, 0,5% NP-40, 0,5mM EDTA, 0,5mM PMSF, cóctel inhibidor de proteasa IX (Roche). Se añadió 1 µg de anti-flag previamente empapado durante cuatro horas con proteína Agarosa (Upstate) a los medios y lisados de células, y se incubaron durante 16 horas a 4 °C. Se recogieron los gránulos por centrifugación durante cinco minutos y se lavaron tres veces con solución tamponada de lisis. Las proteínas inmunoprecipitadas se liberaron de la proteína-A por ebullición durante cinco minutos en una solución tamponada muestra SDS. Las muestras se analizaron con 10% SDS-PAGE y se sometieron a un ensayo Western blot utilizando anticuerpos de ratón anti-myc.
- 15 Análisis BIAcore. Se realizaron experimentos de unión con el instrumento biosensor basado en la resonancia de plasmón de superficie BIAcore 3000 (BIAcore AB, Uppsala). La inmovilización de las proteínas purificadas de la superficie del sensor se realizó siguiendo el procedimiento estándar de acoplamiento de aminas conforme a las instrucciones del fabricante. La respuesta de inmovilización final de cada proteína fue 6000 unidades de resonancia. Una superficie de referencia se generó simultáneamente en las mismas condiciones con BSA y se utilizó como blanco para corregir los artefactos del instrumento y de la solución tamponada. Se inyectaron AQ y kanamicina a concentraciones variables a una velocidad de flujo de 20µl/min y se supervisó la unión a la proteína inmovilizada en el chip en tiempo real. Cada sensograma se compone de una fase de asociación (60-160 seg), que refleja la unión de la AQ inyectada a la proteína, seguida de una fase de disociación (después de 160 seg) durante los que la solución tamponada se pasa sobre el chip y se lava la AQ unida retirándola de la superficie de proteína. Los datos de unión se analizaron utilizando el software BIAcore 3000 CONTROL® y el software BIAEVALUATIOND.
- 20 Análisis de atenuación de la fluorescencia (quenching). Los espectros de fluorescencia se midieron utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia SHIMADZU (modelo RF-5310PC, SHIMADZU). Las proteínas (15ng/µl) se incubaron con diferentes concentraciones de AQ o kanamicina (0,1nM, 1nM, 10nM, 100nM y 1 µM en solución tamponada de PBS, pH7.0). La atenuación de la proteína se controló a 25 °C utilizando 5 nm de excitación y 5 nm de ancho de ranura de emisión. La longitud de onda de excitación fue 280 nm y los espectros de emisión se midieron entre 290 y 430 nm.
- 25 Análisis de unión con filtro. Se incubaron partes alícuotas (100µl) de una mezcla de ensayo que contenía 0,32µM Nurr-LBD y 3,9-1000nM [³H]-CQ (Moravek Biochemicals, CA) en solución tamponada de unión (25mM tampón de acetato de sodio (pH 5.2)) a 4°C durante toda la noche. La unión no específica se determinó en paralelo en presencia de un exceso molar de 1000 veces de CQ sin marcar. Los filtros GF/C se humedecieron con una solución tamponada de unión y se colocaron en un sistema múltiple de filtrado de 48 puestos. Se aplicaron 100µl de mezcla de ensayo que contenía [³H]-CQ y Nurrl-LBD sobre la superficie del filtro. Los filtros se lavaron con 4 x 100 ml de solución tamponada de unión, se secaron y se mezclaron con 5 ml de Scintiverse BD (Fisher), y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS6000SC. Para el ensayo de competencia, se incubaron reacciones que contenían 0,32µM Nurr-LBD, 500nM [³H]-CQ y diversas concentraciones del competidor a 4 °C durante toda la noche. La mezcla se aplicó al filtro GF/C y el filtro se lavó y se sometió a un recuento tal y como se ha descrito anteriormente.
- 30 Ensayo de captación de dopamina Para medir la captación de [³H]dopamina tras el tratamiento con 6-OHDA en presencia o ausencia de AQ, las neuronas DA se enjuagaron con solución de Krebs Ringers, se incubaron en una solución de Krebs Ringers que contenía 1 mM ascorbato, 2 mM (β-alanina, 100 µM pargilina a 37°C durante cinco minutos en una atmósfera humidificada al 5% CO₂, y posteriormente se incubaron con 25 nM [³H]dopamina (45 Ci/mmol; Amersham Pharmacia) durante 15 minutos. Las neuronas DA de control se trataron con el medio anterior en presencia de un bloqueante de la captación de dopamina, 10 µM mazindol (Sigma). A continuación las células se lavaron con solución de Krebs Ringers helada y se lisaron con 0,5 M NaOH. La radioactividad se cuantificó con un contador de centelleo líquido (Beckman, Fullerton, CA).
- 35 Cultivo de células y tratamientos farmacológicos. Las células PC12 se incubaron inicialmente a una densidad de 2×10^5 células en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-D-lisina y posteriormente se cambiaron a un medio definido por N-2 libre de suero que contenía 6-OHDA con o sin AQ. Las viabilidades de las células se determinaron por el ensayo de reducción del MTT convencional. Tras incubar durante los tiempos indicados, las células se trataron con la solución de MTT (concentración final, 1 mg/ml, Sigma) durante una hora. Los gránulos formados en las células intactas se solubilizaron

con MTT Solubilization. Se colocaron en una solución que contenía 10% Triton X-100 plus 0,1 N HC1 en isopropanol anhídrico durante 24 horas y después se midió la absorbancia a 570 nm con un lector de microplacas (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

5 Para preparar cultivos primarios de neuronas DA, se extirpó el mesencéfalo ventral de un embrión de rata Sprague Dawley de 14 días de gestación (Charles River, Cambridge, MA). Los tejidos se incubaron con 0,01% trisina en MEM (MEM, Invitrogen) durante 10 minutos a 37°C y se trituraron utilizando una pipeta de Pasteur estrecha. Las neuronas DA se colocaron en placas a 1,0 x 10⁵ células por cubreobjetos de 9 mm de diámetro previamente recubierto con 100µg/ml de poli-D-lisina (Sigma, St. Louis, MO) y 4 µg/ml de laminina (Invitrogen). Las neuronas DA se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% CO₂ en un medio esencial mínimo suplementado con 10% FBS (Hyclone), 2 mM de glutamina y 6,0 g/l de glucosa. A los 5 o 6 días *in vitro*, las neuronas DA se lavaron con MEM y se trataron con diversos reactivos experimentales durante los períodos de tiempo indicados. Los reactivos utilizados fueron 6-OHDA (Sigma), N-acetil-cisteína, N-benciloxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilketona (Z-VAD-fmk; Enzyme Systems Products, Livermore, CA). Las células BV-2, una línea de células de ratón similares a las microgliales, se descongelaron y transfirieron hasta que se consiguió el crecimiento logarítmico. Los cultivos de células se mantuvieron en placas de cultivo de seis pocillos (Corning Costar, Corning, NY) a una concentración de 1,0 x 10⁵ células por pocillo, en el medio de crecimiento consistente en DMEM (Sigma, St. Louis, MO), suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS; Hyclone) inactivado por calor a 56 °C durante 30 minutos, 2 mM L-glutamina (Sigma) y IX Pen-Strep (Invitrogen). Para empezar el experimento, las células BV-2 se lavaron con DMEM y se trataron con LPS (Sigma) en presencia o ausencia de AQ (Sigma). Las placas estuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂/95% aire durante el periodo de tiempo indicado. Las células de cada pocillo individual se retiraron para la extracción de RNA.

10 Las células precursoras neurales (NPC) de la disección de córtex de embriones de rata de 14 días (E14) se proliferaron en medio N2 suplementado con 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.). Tras 3-4 días de expansión con bFGF, las NPC se disociaron en solución salina equilibrada de Hank libre de Ca²⁺/Mg²⁺(CMF-HBSS, Invitrogen, Carlsbad, CA) y se colocaron en cubreobjetos (12 mm de diámetro; 15 Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC) a 32.000 células/cubreobjetos previamente recubiertos con poli-L-ornitina (PLO; 15 mg/ml, Sigma, St Louis, MO) a 37°C durante toda la noche y posteriormente con fibronectina (FN; 1 mg/ml, Sigma) durante toda la noche. Antes del tratamiento farmacológico, las NPC se sometieron a transducción con retrovirus con expresión de Nurr1 de MOI 5 en presencia de polibrenero (1µg/ml, Sigma), se cultivaron toda la noche en N2 y después se diferenciaron Una vez comenzado el tratamiento químico (cada día durante dos horas) ya no se volvió a añadir bFGF³.

15 Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Las células se fijaron en 4% paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos, se lavaron y, a continuación, se incubaron con solución tamponada de bloqueo [PBS, 10% suero de cabra (Invitrogen), 0,3% Triton X-100 (Sigma)] durante una hora. A continuación, las células se incubaron durante toda la noche a 4 °C con anticuerpos primarios con el anticuerpo primario en PBS que contenía 1% suero de cabra normal y 0,1% Triton X-100. Un anticuerpo policlonal de conejo anti-TH (1: 500; Pel-Freez, Rogers, AR) se utilizó como anticuerpo primario. Tras los lavados con PBS, se utilizaron anticuerpos secundarios etiquetados con fluorescencia apropiados (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) para la visualización. Las muestras teñidas se montaron en VECTASHIELD con solución de montaje DAPI (Vector Laboratories INC., Burlingame, CA) y se fotografiaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leica). Se practicó la eutanasia a los animales mediante anestesia con pentobarbital (3 ml/kg) y a continuación se perfundieron por vía transcardíaca con 4% de PFA en 0,05 M solución tamponada de fosfato (PB). Se realizaron los ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente, en secciones flotantes libres cortadas con un criomicrótomo (40µm de grosor) que componían el cerebro completo. Tras su incubación con 3% H₂O₂ en 0.05 M PBS, seguido de 0,3% Triton X-100 y 3% albúmina de suero bovino (BSA) en 0,05 M PBS, las secciones se sometieron a tinción durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo primario. El kit ABC (Vector Laboratories., Burlingame, CA, USA) se utilizó como anticuerpo secundario. Después de lavar el tejido tres veces en 0,05 M PBS, seguido de 0,3% Triton X-100 y 1% BSA en 0,05 M PBS, las secciones se sometieron a tinción durante toda la noche a 4 °C con anticuerpos primarios. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti-Iba-1 (Abeam; 1:500), cabra anti-FoxA2 (SCBT; 1:200), oveja anti-tirosina hidroxilasa (TH) (Pel-Freez; 1:200), conejo anti-TH (Pel-Freez 1:200), cabra anti-FoxA2 (Millipore; 1:200), y oveja anti-AADC (Millipore; 1:500). Los tejidos se lavaron tres veces en PBS y se incubaron durante dos horas con el anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia de cabra anti-ratón y conejo (DAKO, Dinamarca, Cy3, FITC, ambas diluciones a 1:1,000) y los tejidos se lavaron y montaron en Vectorshield. Todas las muestras de tejido se sometieron adicionalmente a contratinación con DAPI. Los tejidos se visualizaron por microscopía de fluorescencia. Se analizó cada 6^a sección de los cerebros de rata para contar las células inmunoreactivas utilizando Image J (versión 1.42q, Institutos Nacionales de Salud, EE. UU.) y el software Stereo Investigator (Microbright Field, Williston, VT). El porcentaje de protección del total de células T⁺ en el hemisferio lesionado del cerebro de cada rata se calculó dividiendo el total de células TH⁺ en el hemisferio intacto del cerebro de cada rata y multiplicando por 100⁵.

20 Análisis semicuantitativo y cuantitativo por RT-PCR. El RNA total se extrajo mediante una preparación de un solo paso utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total de cada pocillo individual

se sometió a transcripción inversa para obtener cDNA utilizando SuperscriptII Reverse Transcriptase y el cebador oligo(dT)18 (Invitrogen). El análisis por PCR en tiempo real se realizó utilizando el sistema de detección de secuencias ABI-Prism7700 (Applied Biosystems). En resumen, se realizó en un tubo de 0,5 ml (Applied Biosystems) con cDNA equivalente a 50 ng de RNA digerido con Dnasa en un volumen de 25 μ l, que contenía 12,5 μ l SyBR Green Universal Master Mix, cebadores directos e inversos (IL-1 β ; directo 5'-GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T-3' (SEQ ID NO: 11), inverso 5'- ATC TTT TGG GGT CCG TCA ACT -3' (SEQ ID NO: 12), IL-6; directo 5'- TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC -3' (SEQ ID NO: 13), inverso 5'- TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC -3' (SEQ ID NO: 14) iNOS; directo 5'- ACA TCG ACC CGT CCA CAG TAT -3' (SEQ ID NO: 15), inverso 5'- CAG AGG GGT AGG CTT GTC TC -3' (SEQ ID NO: 16), TNF- α ; directo 5'- ATG TCG GCT CCA GGA CCT TA -3' (SEQ ID NO: 17), inverso 5'- GGT AGT AAC TGT TGA CAC CCA CT -3' (SEQ ID NO: 18), GAPDH de ratón; directo 5'- AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG -3' (SEQ ID NO: 19), inverso 5'- TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA -3' (SEQ ID NO: 20), TH; directo 5'-AGC CCC CAC CTG GAGTAT TTT G-3' (SEQ ID NO: 21), inverso 5'-AGC AAT CTC TTC CGC TGT GTA TTC-3' 22), AADC; directo 5'-GCC TTT ATC TGT CCT GAG TTC CG-3' (SEQ ID NO: 23), inverso 5'-TGA TGA GTC CTG AGT CCT GGT GAC-3' (SEQ ID NO: 24), DAT; directo 5'-GCT GGC ACA TCT ATC CTC TTT GG-3' (SEQ ID NO: 25), inverso 5'-CAA TGC TGA CCA CGA CCA CAT AC-3' (SEQ ID NO: 26), VMAT; directo 5'-GCA CAC AAA ATG GGA AGG TGG C-3' (SEQ ID NO: 27), inverso 5'-CAT TTT TTC CTC CTT AGC AGG TGG-3' (SEQ ID NO: 28), GAPDH de rata; directo 5'-TGA CAT CAA GAA GGT Mis GAA GC -3' (SEQ ID NO: 29), inverso 5'-GGA AGA ATG GGA GTT GCT GTT G -3' (SEQ ID NO: 30)) siguiendo el protocolo del fabricante. Los valores de expresión genética se normalizaron con los de GAPDH.

Inmunoprecipitación de cromatina. Se cultivaron células PC12 en placas de 150 mm en ausencia o presencia de 20 μ M AQ o 75 μ M CQ durante 15 horas. Las células se lavaron con PBS, se fijaron con formaldehído al 1%, se sometieron a lisis y a un baño de ultrasonidos de conformidad con las instrucciones del fabricante (Active Motif). Se coimmunoprecipitaron 25 μ g de DNA de cromatina soluble con 1 μ g de anticuerpo específico de Nurrl (E-20, Santa Cruz) o anticuerpo de control (IgG de conejo, Santa Cruz). 2 μ l de DNA ChIP se sometieron a PCR cuantitativa en tiempo real utilizando los siguientes pares de cebadores: NL1: 5-GCG TGG AGA GGA TGC GCAGG-3' (SEQ ID NO: 31) y 5'- AGT GCA AGC TGG Motil TCC CG-3' (SEQ ID NO: 32); NL3: 5'- TCC TTA GAG ATC CTG TTT CC-3' (SEQ ID NO: 33) y 5'- TCA GCT GGT CCC CAT GTA AG-3' (SEQ ID NO: 34). Los valores mostrados expresan las veces que se multiplicó la inducción en comparación con células de control tratadas con placebo.

Modelo de rata lesionada por 6-OHDA para la EP. Para valorar los potenciales efectos neuroprotectores de la AQ/CQ, generamos ratas con lesiones intraestriatales por 6-OHDA⁶⁻⁸ utilizando ratas Sprague-Dawley macho con un peso de 240-300g al comienzo de los experimentos. Las ratas fueron anestesiadas con ketamina [4,5 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)] mezclada con Rompun (1,5 mg/kg, i.p.) y se les administró una inyección estereotáctica unilateral de 6-OHDA (20 μ g/5 μ l con 0,2 mg/ml de ácido L-ascórbico; Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) o el mismo volumen del vehículo (ácido L-ascórbico) en el cuerpo estriado derecho utilizando coordenadas respecto del bregma y la duramadre (A/P, 0,7; L/M, -2,6; D/V, -4,5) de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson⁹ a una tasa de 1 μ l/min utilizando una microjerิงa de calibre 26. Tras la infusión, la cánula se mantuvo en el sitio durante cinco minutos para minimizar el flujo de retorno antes de comenzar a retirarla lentamente. El uso de animales se ajustó a las directrices del Institutional Animal Care and Use Committee de McLean y siguiendo las pautas de los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. En nuestros experimentos preliminares probamos diferentes dosis (1,5 y 20 mg/kg) tanto de AQ como de CQ y descubrimos que la AQ a 20 mg/kg presentaba los efectos más destacados. Por consiguiente, utilizamos esta condición para la realización de experimentos *in vivo* más sistemáticos.

Ensayo para determinar los efectos neuroprotectores de AQ en el modelo de rata lesionada por 6-OHDA. Un día antes de establecer los modelos de EP, las ratas fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos: grupo de solución salina (n = 6) y grupo de tratamiento con AQ (n = 8). El grupo de tratamiento con AQ recibió una inyección intraperitoneal de 20 mg/kg de AQ dos veces, un día antes de la inyección de 6-OHDA. Tras la inyección de 6-OHDA, a los animales se les administró AQ o solución salina dos veces al día durante 13 días (en total, dos semanas de inyección de AQ incluyendo un día de inyección de AQ antes del establecimiento del modelo de EP). Para el ensayo funcional conductual, el comportamiento de rotación se midió durante 90 minutos tras la inyección intraperitoneal de 5 mg/kg de anfetamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo), utilizando un sistema de rotámetro automatizado (Med Associate Inc., St. Albans, VT, EE. UU.)^{6,7}. Las rotaciones ipsilaterales se midieron 4 y 6 semanas después de la lesión por 6-OHDA.

Comportamiento de movimientos involuntarios anormales (AIM) en ratas lesionadas por 6-OHDA. Para testar comportamientos involuntarios similares a la disquinesia, se realizaron varios test AIMS en dos puntos temporales: inmediatamente después de que transcurrieran dos semanas desde la inyección del fármaco (dos semanas después de la lesión por 6-OHDA; n = 6) y un mes después de que transcurrieran dos semanas desde la inyección del fármaco (seis semanas después de la lesión por 6-OHDA; n = 6). El tratamiento con solución salina y L-DOPA (8 mg/kg durante dos semanas; n = 6) se utilizó como control negativo y positivo del comportamiento AIM, respectivamente. Las siguientes pruebas conductuales se grabaron en vídeo y fueron puntuadas en una fecha posterior por dos investigadores que desconocían el tratamiento de los animales. Se realizó un seguimiento de las ratas para cuatro tipos de AIM¹⁰: axiales

(afección distónica del cuello y torso girado hacia el lado del cuerpo contralateral a la lesión), de extremidades anteriores (movimientos contralaterales de las extremidades anteriores que son "rápidos" y "sin propósito aparente"), orolinguales (apertura repetitiva de la mandíbula y lengua saliente), y locomotores (caminar en un movimiento circular contralateral). Las ratas se observaron durante dos minutos cada 20 minutos durante un periodo de dos horas. Durante el primer minuto, 5 se controló el comportamiento de cada AIM y se puntuó en una escala de 0-4 (donde 0 significa ningún comportamiento anormal en absoluto; 1 significa presencia menos del 50% del tiempo de observación; 2 significa presencia durante más del 50% del tiempo de observación; 3 significa presencia durante todo el periodo de observación pero interrumpida por estímulos externos; y 4 significa presencia durante todo el periodo de observación y no interrumpida por estímulos 10 externos). Las puntuaciones AIM para el periodo de dos horas en cada categoría se sumaron (la puntuación máxima es 24).

Estudios de comportamiento en ratones ak/ak. Se inyectaron 20 mg/kg de AQ (grupo AQ) o de solución salina (grupo de solución salina) intraperitonealmente (LP) dos veces al día durante dos semanas. Se inyectaron 8 mg/ml de L-DOPA (grupo L-DOPA) en 0,5% DMSO (LP) una vez al día durante dos semanas. Al grupo L-DOPA se le administraron 12,5 mg/kg de benserazida, 20 minutos antes de la administración de L-DOPA.

15 *Grupos para los experimentos conductuales y diseño de las pruebas conductuales:* Cada ratón ak fue asignado de forma aleatoria a uno de tres grupos experimentales: (1) grupo de solución salina (control negativo; n = 8); grupo de L-DOPA (control positivo; n = 8); (3) grupo de AQ (n = 10). Cada ratón WT o *rdl* se asignó aleatoriamente a dos grupos: (1) grupo de solución salina (n = 8) y (2) grupo AQ (n = 10). Se realizaron el Pole test, el Test de la barra transversal y el Test del cilindro en dos momentos distintos: inmediatamente y un mes después de que transcurrieran dos semanas desde la 20 inyección de AQ o solución salina. Cada ratón realizó dos veces cada tarea. El test de Rota rod se realizó inmediatamente después de que transcurrieran dos semanas de la inyección del fármaco o de la solución salina. El proceso de aclimatación y registro de datos fue idéntico al del estudio con ratas anteriormente descrito. Todas las tareas se realizaron como se ha descrito anteriormente¹¹ y a continuación se recoge la descripción breve de cada una de ellas.

25 *Pole test:* Para el Pole test se utilizó un palo de madera de 50 cm de longitud y 1 cm de diámetro. Cada ratón se depositó suavemente con la cabeza hacia arriba en la parte superior de un palo que se colocó en la jaula en la que vivía cada uno de los animales. Cada ratón se sometió a tres ensayos por sesión durante dos sesiones de formación. El día de la prueba los ratones realizaron tres ensayos. Se utilizaron dos parámetros (el tiempo medio en orientarse hacia abajo y el tiempo medio total de desplazamiento) para los análisis estadísticos.

30 *Test de la barra transversal:* Para el Test de la barra transversal se utilizó una barra de plástico larga. La anchura de partida de la barra era de 3,5 cm y se iba estrechando gradualmente de centímetro en centímetro hasta alcanzar los 0,5 cm en el otro extremo de la barra. Los animales fueron entrenados para caminar desde el lado ancho hasta el otro extremo durante dos sesiones, a tres ensayos por sesión antes de realizar el test. Se retiró una rejilla de malla durante el periodo de formación. El día del test, se colocó una rejilla de malla (1 cm cuadrado) que cubría la superficie de la barra dejando un margen de un centímetro entre la rejilla y la superficie de la barra. El día de la prueba los ratones realizaron tres ensayos. 35 Se recopilaron y utilizaron dos parámetros (el número medio de pasos datos por cada animal y el tiempo medio en cruzar la barra en los tres ensayos) para los análisis estadísticos.

40 *Test del cilindro:* Se utilizó un pequeño cilindro transparente (de 15,5 cm de altura y 12,7 cm de diámetro) para evaluar la función motora somatosensorial. Los ratones se introdujeron en el cilindro y se contaron los apoyos traseros durante cinco minutos. Cuando la extremidad superior toca la pared de plexiglás (un movimiento vertical) se define como un apoyo trasero total. El número medio del uso de las patas delanteras se calculó para el análisis estadístico. Cada ratón se sometió al Test del cilindro durante una sesión y no fueron necesarias sesiones de entrenamiento.

45 *Test de la barra giratoria:* Se utilizó el equipo Rota rod (Med-Associates, Inc, Albans, VT, USA) para medir la coordinación motora. El Rota rod se aceleró de 4 a 40 revoluciones por minuto (rpm) durante cuatro minutos. El tiempo medio hasta la caída del Rota rod se midió para el análisis estadístico. Cada ratón se sometió a tres ensayos consecutivos con intervalos de 10 minutos entre ensayos durante tres sesiones consecutivas.

50 Métodos estadísticos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el sistema Statistical Analysis System (Versión 9.1; SAS Institute, Cary, NC). Las medidas del rendimiento de los resultados *in vitro*, el recuento de células y los resultados conductuales se analizaron utilizando el programa PROC TTEST, ANOVA, MIXED o GLIMMIX, un procedimiento de modelos mixtos lineales generalizados para la realización de análisis de mediciones repetidas seguido de tests LSD (*diferencia menos significativa de Fisher*) post-hoc (LSD es un test post-hoc por defecto del SAS). Las medias se calcularon para cada animal y para cada condición de ensayo, definidas por las variables siguientes (cuando procedía): Tratamiento (AQ, L-Dopa, o solución salina) y Tiempo (2, 4, o 6 semanas tras la lesión por 6-OHDA).

Referencias

- 55 1. Webster, N., Jin, J. R., Green, S., Hollis, M. & Chambon, P. The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human He La cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* 52, 169-78 (1988).

2. Kim, K. S. et al. Orphan nuclear receptor Nurrl directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. *JNeurochem* 85, 622-34 (2003).
3. Park, C. H. et al. Proneural bHLH neurogenin 2 differentially regulates Nurrl-induced dopamine neuron differentiation in rat and mouse neural precursor cells in vitro. *FEBSLett* 582, 537-42 (2008).
5. 4. Chung, S. et al. ES cell-derived renewable and functional midbrain dopaminergic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 9703-8 (2011).
5. 5. Park, H. J. et al. Acupuncture prevents 6-hydroxydopamine-induced neuronal death in the nigrostriatal dopaminergic system in the rat Parkinson's disease model. *Exp Neurol* 180, 93-8 (2003).
10. 6. Voutilainen, M. H. et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *JNeurosci* 29, 9651-9 (2009).
15. 7. Espino, A. et al. Chronic effects of single intrastriatal injections of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium studied by microdialysis in freely moving rats. *Brain Res* 695, 151-7 (1995).
15. 8. Blandini, F., Levandis, G., Bazzini, E., Nappi, G. y Armentero, M. T. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci* 25, 397-405 (2007).
20. 9. Paxinos, E. y Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: Academic Press (1997).
20. 10. Dekundy, A., Lundblad, M., Danysz, W. & Cenci, M. A. Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behav Brain Res* 179, 76-89 (2007).
20. 11. Hwang, D.Y., et al. 3,4-dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 25, 2132-2137 (2005).

Resultados y debate

En base a su función dual exclusiva para el desarrollo/mantenimiento de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio y la protección de estas frente a la muerte inducida por la inflamación, Nurrl es un potencial objetivo para la enfermedad de Parkinson (EP). Aquí mostramos la identificación satisfactoria de agonistas de Nurrl que comparten un andamio químico idéntico y estimulan la actividad de transcripción mediante la unión al dominio de unión al ligando. Cabe destacar que también mejoraron las funciones duales opuestas de Nurrl y mejoraron los déficits conductuales en modelos animales de la EP.

La EP, causada principalmente por la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (mDA), es el trastorno del movimiento más prevalente y afecta a un 1-2% de la población mundial mayor de 65 años¹⁻³. Los tratamientos farmacológicos actualmente disponibles (por ejemplo, L-DOPA) son fundamentalmente sintomáticos y pierden su eficacia con el paso del tiempo, con efectos secundarios graves asociados como la disquinesia. Por consiguiente, existe una necesidad clínica no cubierta de desarrollar tratamientos basados en mecanismos y/o modificadores de la enfermedad^{2,3}. El receptor nuclear huérfano Nurrl (también conocido como NR4A2) es esencial no solo para el desarrollo y mantenimiento de neuronas mDA⁴⁻⁷, sino también para su protección de la muerte inducida por inflamación⁸. Por otra parte, estudios previos demostraron una expresión reducida de Nurrl en cerebros *post mortem* de pacientes con EP y formas mutantes funcionales en casos raros de EP familiar¹⁰, lo que sugiere claramente que el Nurrl es un objetivo prometedor para el desarrollo de nuevos fármacos modificadores de la enfermedad por lo que respecta a la EP¹¹. Para abordar esta posibilidad, establecimos sistemas de ensayo de alto rendimiento eficientes basados en la capacidad de Nurrl para activar directamente la función del promotor de TH¹². Utilizando estos sistemas de ensayo basados en células, examinamos una biblioteca compuesta por 960 fármacos aprobados por la FDA e identificamos con éxito tres compuestos coincidentes, es decir dos fármacos antimalaria que son la amodiaquina (AQ) y la cloroquina (CQ) y el fármaco analgésico glafenina. Sorprendentemente, los tres compuestos comparten un andamio químico idéntico, 4-amino-7-cloroquinolina, lo que sugiere una relación entre estructura y actividad (SAR) (Fig. 13a).

En ensayos previamente documentados por los inventores utilizando la construcción de informador (*reporter*) p4xNL3-Luc, que contenía cuatro copias del motivo NL3 similar a NBRE situadas en el promotor de TH¹², AQ y CQ activaron la actividad del informador de luciferasa hasta aproximadamente tres veces más de manera dependiente de la dosis (Figuras 3B, 15A y 16B). En el presente estudio los inventores se centraron en la AQ y la CQ, dado que la glafenina mostró una actividad más débil (aproximadamente 1,6 veces). Para investigar si AQ y CQ activan la función de Nurrl a través de su dominio de unión al ligando (LBD) o dominio de unión a ácido desoxirribonucleico (DBD), los inventores a continuación generaron construcciones informadoras (*reporter*) adicionales en las que el DBD del factor de transcripción de levadura GAL4 se fusionó con el LBD o el DBD de Nurrl (pSVGAL_(LBD)-N_(LBD) y pSVGAL_(DBD)-N_(DBD)). Cabe señalar que la AQ y la CQ estimularon la actividad de transcripción de Nurrl a través de su LBD (Fig. 3B), mientras que no se observó ninguna respuesta cuando

se utilizó el DBD de GAL4-Nurrl o GAL4. La AQ y la CQ indujeron la actividad informadora basada en Nurrl LBD hasta 15 y 10 veces más con una EC50 de aproximadamente 20 y 50 μ M, respectivamente (Figuras 3B, 16C y 16D).

Para comprobar si la AQ y la CQ actúan a través de Nurrl, los inventores trataron células con siRNA específico de Nurrl.

5 El siRNA de Nurrl, pero no así los RNA desorganizados, redujeron la activación de luciferasa más de un 60%, lo que sugiere que la activación de la transcripción por AQ y CQ se produce de hecho a través de la modulación de la función de Nurrl (Figuras 3C y 17). A continuación los inventores comprobaron si varios compuestos de quinolina tienen una función de activación de Nurrl similar. Cabe destacar que ninguno de estos compuestos demostró ninguna función de transactivación detectable en un amplio intervalo de concentraciones (Fig. 18). Dado que solo la AQ y la CQ contienen la entidad 4-amino-7-cloroquinolina, estos resultados también respaldan su SAR. Por otra parte, la AQ y la CQ fueron incapaces de inducir la actividad de transcripción de otros receptores nucleares (NR), lo que demuestra una elevada selectividad (Fig.19).

Un mecanismo crucial de los NR es la captación de coactivadores transcripcionales como se observa con los coactivadores del receptor de esteroides (SRC)¹³. Para comprobar si la AQ y la CQ modulan la interacción de Nurrl con los SRC se realizó un ensayo de coinmunoprecipitación. Descubrimos que la AQ y la CQ mejoraban de forma significativa

15 las escasas interacciones de Nurrl con SRC-1 y SRC-3 (Fig. 13D). A continuación comprobamos los efectos de la AQ y la CQ sobre la función de transcripción de Nurrl tras la sobreexpresión de SRC-1 o SRC-3. A pesar de que la sobreexpresión de SRC-1/SRC-3 no tuvo una gran influencia por sí sola sobre la función de Nurrl, la AQ y la CQ mejoraron todavía más la función de transcripción de Nurrl en presencia de una sobreexpresión de SRC-1/SRC-3 (Fig. 13E), lo que sugiere que la

20 AQ y la CQ inducen la función de transactivación de Nurrl a través de su Nurrl LBD facilitando la captación de coactivadores como SRC-1/SRC-3.

Para investigar si la AQ y la CQ interactúan físicamente con Nurrl LBD, los inventores purificaron el polipéptido de Nurrl LBD (aminoácido 328-598) y analizaron su unión física utilizando el sensor Biacore S51 SPR, que tiene una sensibilidad mayor y una fluidica mejorada, lo que permite monitorizar pequeños cambios de señal producidos por la unión de compuestos a proteínas.

25 Tal y como se muestra en las Figuras 13F y 20A, la AQ se unió específicamente a Nurrl-LBD de manera dependiente de la dosis, pero no a los LBD de otros NR como Nur77 o RXR. A continuación realizamos el análisis de atenuación de fluorescencia (quenching). El Nurrl-LBD mostró máxima fluorescencia a 336 nm, mientras que la AQ por sí sola no mostró ninguna fluorescencia a esta longitud de onda. Cuando el Nurrl-LBD se incubó con cantidades crecientes de AQ, la intensidad de la fluorescencia descendió gradualmente (Fig. 3G). Por el contrario, la emisión de fluorescencia de Nur77-

30 LBD y RXR-LBD no se atenuó con AQ en un amplio intervalo de concentraciones (Figuras 3G y 20B). Los inventores realizaron asimismo un ensayo de unión a radioligando utilizando [³H]-CQ. La [³H]-CQ demostró una unión saturable a

35 Nurrl-LBD con una constante de disociación (K_d) de 0,27 μ M y una capacidad de unión máxima (B_{max}) de 13,9 μ M (Fig. 13H). Asimismo, el ensayo de unión competitiva demostró que la AQ/CQ marcada puede competir por la unión con [³H]-CQ con valores K_t de 246 y 88 nM en el caso de la AQ y la CQ, respectivamente (Fig. 13I). Tal y como se esperaba, la

primaria no marcada que no pudo mejorar la función de transcripción de Nurrl (Fig. 18) no pudo competir. En comunió, estos datos sugieren con rotundidad que la AQ/CQ activa la función de Nurrl a través de la unión directa y específica al LBD de Nurrl.

A continuación tratamos de analizar si estos compuestos presentan efectos biológicos sobre las neuronas mDA en contextos más fisiológicos. En primer lugar testamos si pueden aumentar la generación de neuronas TH⁺ y/o la expresión

40 de genes específicos de mDA durante la diferenciación *in vitro* de células madre neurales. Descubrimos que la AQ mejoró la función de Nurrl tanto en términos del número de neuronas TH⁺ generadas por las células madre neurales como de los niveles de expresión de mRNA de los genes de TH, del transportador de dopamina (DAT), del transportador de monoamina

45 vesicular (VMAT) y de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (Figuras 14A, 14B y 21). El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) *in vivo* demostró claramente que el Nurrl se captaba en los sitios NL1 y NL3 del promotor de TH en las células tratadas con AQ y CQ, lo que sugiere que Nurrl participa directamente en la inducción de la

50 expresión de TH mediada por AQ y CQ (Fig. 14C). En segundo lugar, descubrimos que AQ y CQ inhiben de forma significativa la muerte inducida por neurotoxinas (6-OHDA) en neuronas DA primarias, tal y como comprobamos por el

55 número de neuronas TH⁺ (Fig. 14D) y por la captación de DA (Fig. 14E). El efecto neuroprotector de la AQ y la CQ también se observó en células PC12 de rata (Fig. 14F). Puesto que Nurrl tiene actividad de transrepresión opuesta en microglía y

55 astrocitos⁸, los inventores analizaron también el efecto de la AQ sobre la expresión de genes de citoquina proinflamatoria en microglía primaria obtenida de cerebros de ratas PI. Cuando estas células se trataron con el liposacárido inductor de la inflamación (LPS; 10ng/ml) durante ocho horas, la expresión de todos los genes de citoquina testados (IL- β , IL-6, TNF- α and iNOS) se indujo drásticamente (Fig. 14G). A destacar, el tratamiento con AQ redujo de forma notable la expresión de todos estos genes de manera dependiente de la dosis (más de 10 veces). La AQ y la CQ demostraron efectos muy

55 similares en la represión de estos genes de citoquina tanto en microglía primaria como en la línea de células microgliales BV-2 (Fig. 22). En comunió, estos datos demuestran que la AQ y la CQ son capaces de mejorar las funciones duales

opuestas de Nurrl: (1) aumentan la transactivación de Nurrl de genes específicos de mDA en neuronas mDA, y (2) también aumentan la transrepresión de Nurrl de la expresión del gen de citoquina proinflamatoria en microglía.

Las anteriores conclusiones llevaron a los inventores a comprobar si estos compuestos pueden mejorar los déficits de comportamiento motor mediante mecanismos neuroprotectores en modelos animales de EP. Para este objetivo, 5 comprobamos los efectos de la administración de AQ en un modelo animal de EP (ratas lesionadas por 6-OHDA). A las ratas con lesión unilateral estriatal por 6-OHDA se les administró solución salina o AQ durante dos semanas, comenzando un día antes de la lesión por 6-OHDA intraestriatal (Fig. 15A). Tal y como se esperaba, la administración de anfetaminas produjo un comportamiento de rotación hacia el lado de la lesión en las ratas de control, medido cuatro y seis semanas 10 después de la lesión por 6-OHDA, lo que indica un daño unilateral en el cuerpo estriado derecho (Figuras 15A y 15B). Cabe señalar que la administración de AQ mejoró de forma significativa el comportamiento de rotación inducido por 6-OHDA a las cuatro y seis semanas de la lesión por 6-OHDA ($p < 0,06$ y $p < 0,0003$, respectivamente). La 15 inmunohistoquímica de la sustancia negra (SN) y del cuerpo estriado (STR) de estos animales demostró que las ratas tratadas con AQ retenían un número significativo de células TH⁺ en el lado de la lesión de la SN mientras que las ratas de control tratadas con solución salina perdieron la gran mayoría de células TH⁺ (Fig. 15C). De forma similar, se salvaron 20 abundantes fibras TH⁺ en el STR de cerebros tratados con STR, mientras que en su mayoría se perdieron en el STR de los cerebros de control. Para analizar cuantitativamente estos datos, las células TH⁺ de la SN se contaron estereológicamente a ciegas. Tal y como se muestra en la Fig. 15D, el número de neuronas TH⁺ en el lado de la lesión de las ratas tratadas con AQ fue aproximadamente del 60% de las detectadas en el lado intacto seis semanas después de la lesión por 6-OHDA ($p < 0,0003$), mientras que se mantuvo por debajo del 20% en los animales tratados con solución salina. 25 Es importante señalar que estas células TH⁺ salvadas coexpresaron otros marcadores de DA como FoxA2 y AADC (Fig. 23). Los inventores también examinaron la activación microglial por inmunohistoquímica del marcador microglial Iba-1. Tal y como se muestra en las Figuras 15E y 24, la activación microglial se observó sobre todo en las regiones ipsilaterales de la SN y el STR de las ratas lesionadas por 6-OHDA. Por el contrario, tras el tratamiento con AQ, las cifras de microglía 30 Iba-1⁺ en las regiones ipsilaterales de la SN y del STR descendieron hasta los niveles de las regiones contralaterales, lo que indica una sólida represión de la neuroinflamación por activación de Nurrl⁸. Sin ánimo de vincularse a una teoría, se cree que el mecanismo neuroprotector basado en Nurrl, a diferencia del tratamiento con L-dopa, puede no desencadenar 35 efectos secundarios similares a la disquinesia. Para abordar esta cuestión, los inventores comprobaron si el tratamiento con AQ desencadena movimientos involuntarios anormales (AIM), comportamientos similares a la disquinesia bien validados¹⁴. Para ello, los inventores midieron las puntuaciones AIM como disquinesias axiales, de extremidades, 40 locomotoras y orolingüales. En las ratas tratadas con L-DOPA (8 mg/kg durante dos semanas antes de la puntuación; Fig. 15A). Los animales demostraron un aumento drástico de las puntuaciones AIM ($F_{(2,71)} = 33, p < 0,0001$), clasificadas como disquinesias axiales, de extremidades, locomotoras y orolingüales (Fig. 15F). En contraste, las ratas lesionadas por 6-OHDA tratadas tanto con solución salina como con AQ no mostraron ningún comportamiento AIM detectable. 45 A continuación los inventores comprobaron si el tratamiento con AQ también puede mejorar la disfunción motora en el ratón de la cepa afaquia (ak/ak), que resultó ser un modelo de ratón válido de la EP^{22,23}. Dado que la gran mayoría de las neuronas dopamínergicas A9 (>80%) se degeneran selectivamente en la SN del ratón ak/ak a partir del nacimiento, se 50 puede considerar una situación de EP grave. Tras dos semanas de tratamiento con AQ, los inventores realizaron una batería de ensayos conductuales sensibles al deterioro nigroestriatal²². Cabe destacar que los inventores descubrieron que los déficits motores de ratones ak/ak mejoraron de forma significativa en todas estas pruebas (es decir, Pole test, Test de la barra transversal y Tests de Rota rod) gracias al tratamiento con AQ (Figs. 25A-25D). Se destacó asimismo que no se observaron diferencias por grupos entre los animales tratados con AQ y los tratados con L-DOPA, lo que indica que la AQ tuvo efectos similares al tratamiento con L-DOPA sobre la recuperación funcional en la mayoría de las pruebas, salvo en el Test del cilindro, en el que el tratamiento con L-DOPA indujo claramente la actividad de los apoyos posteriores, tal y como se ha comentado antes²². El número de neuronas TH⁺ no se vio alterado de forma detectable en los ratones ak/ak 55 tratados con AQ (datos no mostrados). Por el contrario, los inventores observaron una sólida activación microglial contrastada por el marcador microglial activado CD1 lb en la SN, que se redujo hasta el nivel del ratón no manipulado (Fig. 26). Por consiguiente, a pesar de la ausencia de incremento de las neuronas TH⁺ en la SN, la supresión de microglía activada parece mejorar los déficits motores en ratones ak/ak.

En resumen, utilizando el novedoso ensayo de alto rendimiento basado en células aquí descrito, los inventores identificaron 60 dos pequeñas moléculas, AQ y CQ, que pueden activar Nurrl mediante la interacción directa con su LBD. Por otra parte, la administración de AQ mejoró de forma notable los deterioros motores de los modelos de roedores lesionados por 6-OHDA sin efectos secundarios similares a la disquinesia. Los datos aquí presentados demuestran que estos compuestos mejoraron las funciones duales opuestas de Nurrl (activación de la función específica de la neurona mDA —por ejemplo, expresión de TH— y represión de la activación microglial y de la expresión del gen de citoquina neurotóxica), lo que da lugar a un importante efecto neuroprotector en un modelo de roedor de la EP. Estas conclusiones son sorprendentes porque Nurrl carece de un bolsillo de unión "clásico" debido a la presencia de residuos voluminosos de la cadena lateral hidrófoba y se cree que es un NR dependiente de ligando y constitutivamente activo^{15,16}. Sin embargo, determinados ligandos son capaces de adentrarse en el interior de las proteínas y colarse en el LBD enterrado induciendo o explotando cambios transitorios en la conformación, creando de este modo una cavidad^{17,18}, lo que sugiere la posibilidad de que Nurrl

pueda convertirse en un RN "adoptado"¹⁹. Cabe señalar que, basándose en la unión selectiva a neuromelanina de un metabolito de la MPTP²⁰, un estudio previo demostró que la administración de CQ a monos les protegió de anomalías motoras parkinsonianas inducidas por la MPTP²¹. Nuestras conclusiones coinciden con este estudio, lo que demuestra el efecto neuroprotector de la CQ en un modelo de roedor o de mono, y sugiere asimismo la participación de mecanismos adicionales y/o alternativos relacionados con la activación de Nurrl. En comisión, nuestros resultados ofrecen una "prueba de concepto" preclínica de que Nurrl podría actuar como objetivo válido para el posterior desarrollo de terapéuticos basados en mecanismos y modificadores de la enfermedad dirigidos a la EP.

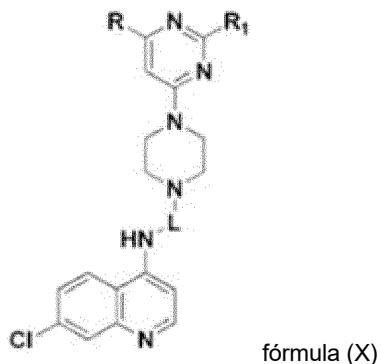
Referencias

5. 1. Dauer, W. y Przedborski, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909 (2003).
10. 2. Meissner, W.G. et al. Priorities in Parkinson's disease research. *Nat Rev Drug Discov* 10, 377-93 (2011).
3. Obeso, J.A. et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med* 16, 653-61 (2010).
4. Zetterstrom, R.H. et al. Dopamine neuron agenesis in Nurrl-deficient mice. *Science* 276, 248-50 (1997).
5. Kadkhodaei, B. et al. Nurrl is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 29, 15923-32 (2009).
15. 6. Castillo, S.O. et al. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurrl gene. *Mol Cell Neurosci* 11, 36-46 (1998).
7. Saucedo-Cardenas, O. et al. Nurrl is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4013-8 (1998).
20. 8. Saijo, K. et al. A Nurrl/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137, 47-59 (2009).
9. Chu, Y. et al. Nurrl in Parkinson's disease and related disorders. *J Comp Neurol* 494, 495-514 (2006).
10. Le, W.D. et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 33, 85-9 (2003).
11. Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C. y Gage, F.H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918-34 (2010).
25. 12. Kim, K.S. et al. Orphan nuclear receptor Nurrl directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. *J Neurochem* 85, 622-34 (2003).
13. Glass, C.K. y Rosenfeld, M.G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-41 (2000).
30. 14. Dekundy, A., Lundblad, M., Danysz, W. y Cenci, M.A. Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behav Brain Res* 179, 76-89 (2007).
15. Wang, Z. et al. Structure and function of Nurrl identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423, 555-60 (2003).
35. 16. McMorrow, J.P. y Murphy, E.P. Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? *Biochem Soc Trans* 39, 688-93 (2011).
17. Ringe, D., Petsko, G.A., Kerr, D.E. y Ortiz de Montellano, P.R. Reaction of myoglobin with phenylhydrazine: a molecular doorstop. *Biochemistry* 25, 2-4 (1984).
18. Schlichting, I. et al. The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science* 287, 1615-22 (2000).
40. 19. Hummasti, S. y Tontonoz, P. Adopting new orphans into the family of metabolic regulators. *Mol Endocrinol* 22, 1743-53 (2008).
20. D'Amato, R.J., Lipman, Z.P. y Snyder, S.H. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin. *Science* 231, 987-9 (1986).
21. D'Amato, R.J. et al. Evidence for neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity. *Nature* 327, 324-6 (1987).
45. 22. Hwang, D.Y., et al. 3,4-dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 25, 2132-2137 (2005).

23. Chung, S., et al. ES cell-derived renewable and functional midbrain dopaminergic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 9703-9708 (2011).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con la fórmula (X):

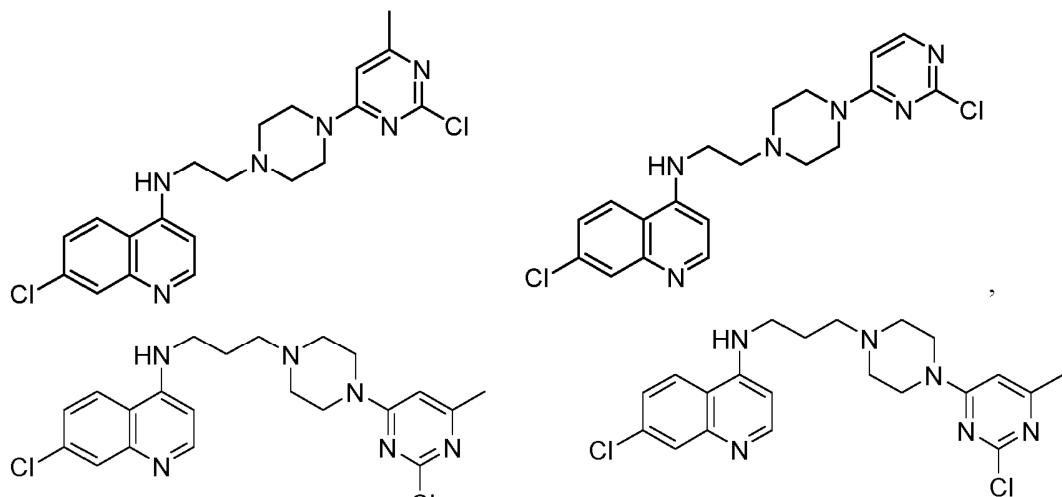


donde:

5 R es hidrógeno, CH₃, Cl, CF₃ o CN;

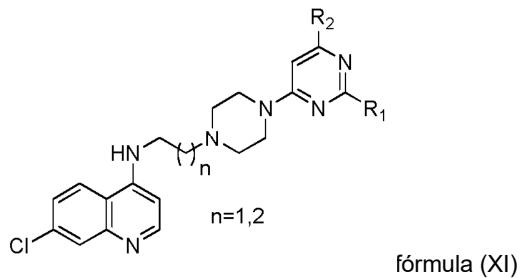
R₁ es amina cíclica o acíclica; y

L es opcionalmente alquilo C₂-C₃₀ sustituido, o anillo cíclico saturado; o un compuesto seleccionado entre cualquiera de los compuestos siguientes:



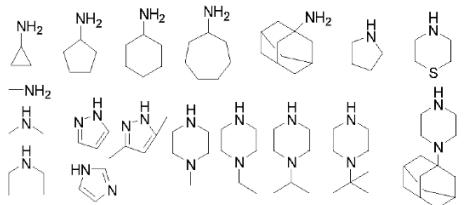
10 , y

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto tiene la fórmula (XI):



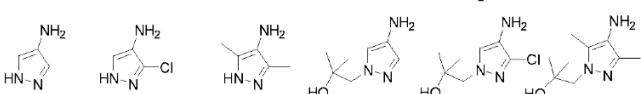
donde:

5



10

R_1 es cualquiera de

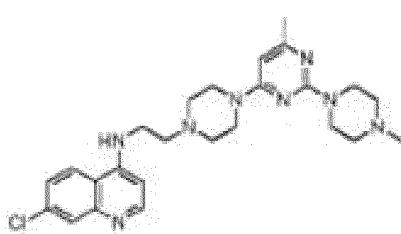


15

3 El com

15

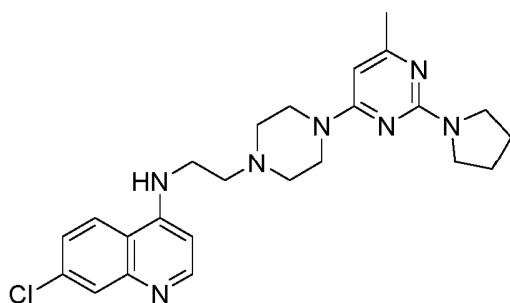
3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, donde el compuesto es:

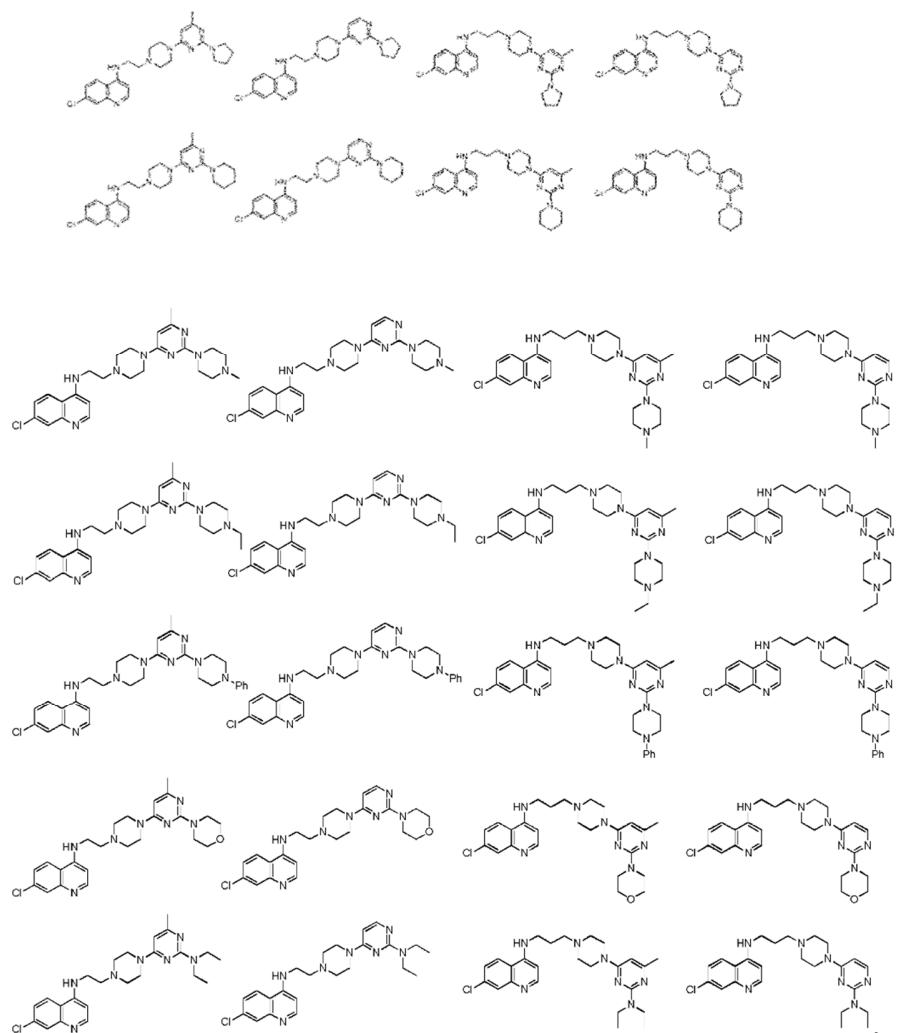


4. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, donde el compuesto es:

20 5.

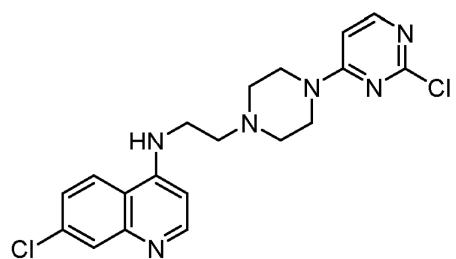
Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del grupo compuesto por





y cualesquiera combinaciones de estos.

6. El compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto es:



5 7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un portador farmacéuticamente aceptable.

8. La composición según la reivindicación 7, que comprende también células madre; opcionalmente, donde las células madre son células madre embrionarias humanas.

9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para el uso en una terapia.
10. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para el uso en el tratamiento de un estado patológico cuando una actividad de Nurrl reducida, o una hipoactividad de Nurrl, contribuye a la patología o sintomatología de la enfermedad; el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 a un sujeto que presenta necesidad, donde el estado patológico asociado a una actividad reducida de Nurrl, o una hipoactividad de Nurrl, que contribuye a la patología o sintomatología de la enfermedad se selecciona del grupo compuesto por enfermedades neurodegenerativas, enfermedades o trastornos inflamatorios y el síndrome de las piernas inquietas.
11. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para el uso en el tratamiento de una inflamación o de una enfermedad o trastorno asociado a la inflamación en un sujeto, donde el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 a un sujeto que presenta necesidad.
12. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para el uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un sujeto, donde el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 a un sujeto que presenta necesidad; opcionalmente, donde la enfermedad o el trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Parkinson; y/o que comprende también la coadministración de forskolina, colforsina o un agonista de la dopamina al sujeto; opcionalmente, donde el agonista de la dopamina es L-DOPA.
13. Un método *ex vivo* para inducir la diferenciación de una célula madre en una neurona dopamínérgica, donde el método comprende poner en contacto dicha célula con un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o con una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 en una cantidad suficiente para causar la diferenciación de dicha célula madre; opcionalmente, donde la célula madre es una célula madre embrionaria humana.
14. Un kit que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 e instrucciones para la administración de dicho compuesto a un sujeto al que se le ha diagnosticado o que presenta el riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno neurodegenerativo; opcionalmente, que comprende también una célula madre.
15. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para el uso en el tratamiento de un estado patológico para el que un agonista de la dopamina resulta un tratamiento útil, donde el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 a un sujeto que presenta necesidad; opcionalmente, donde el estado patológico es el síndrome de las piernas inquietas.

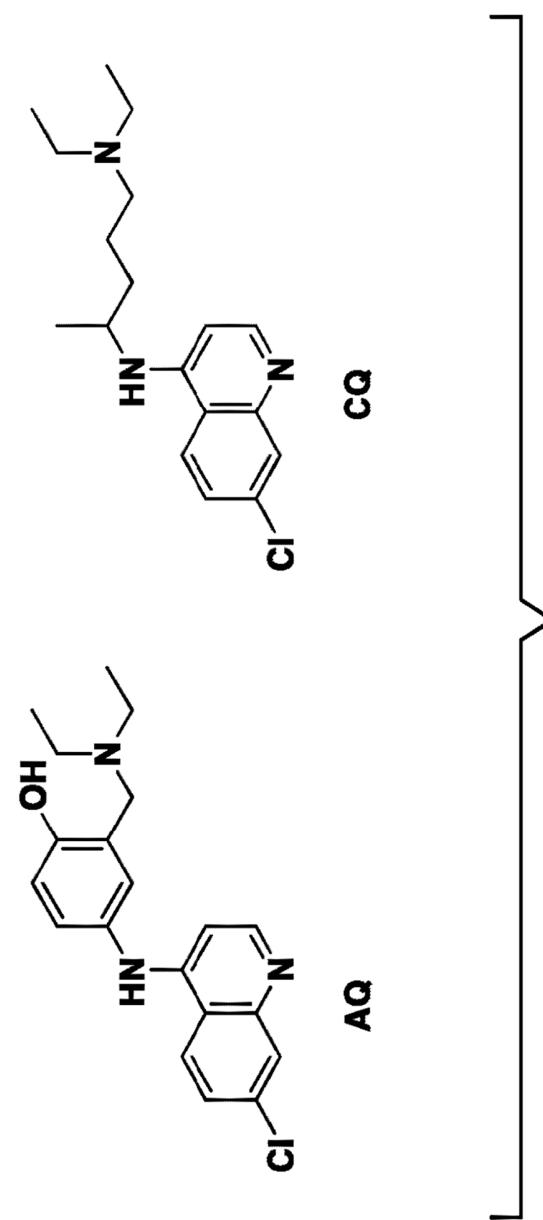


FIG. 1

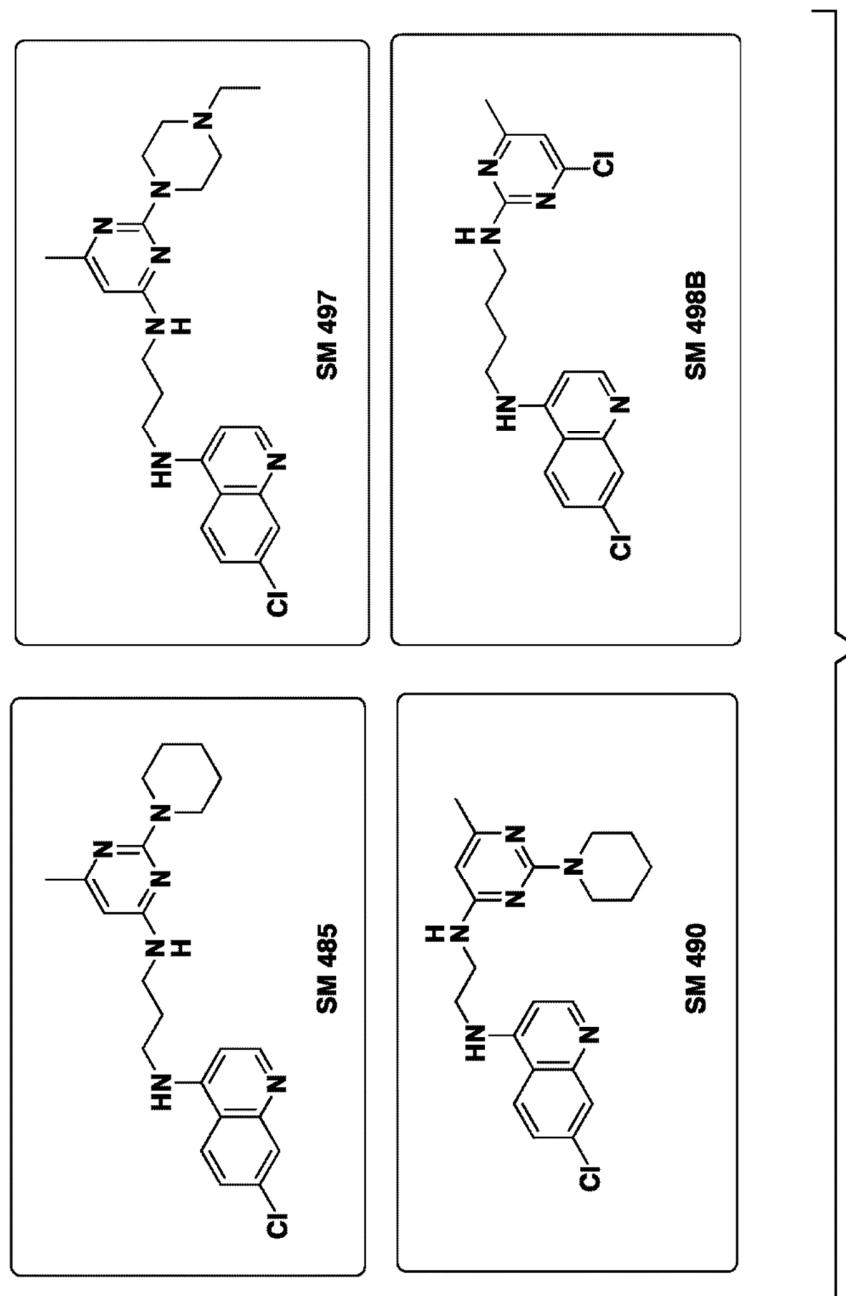
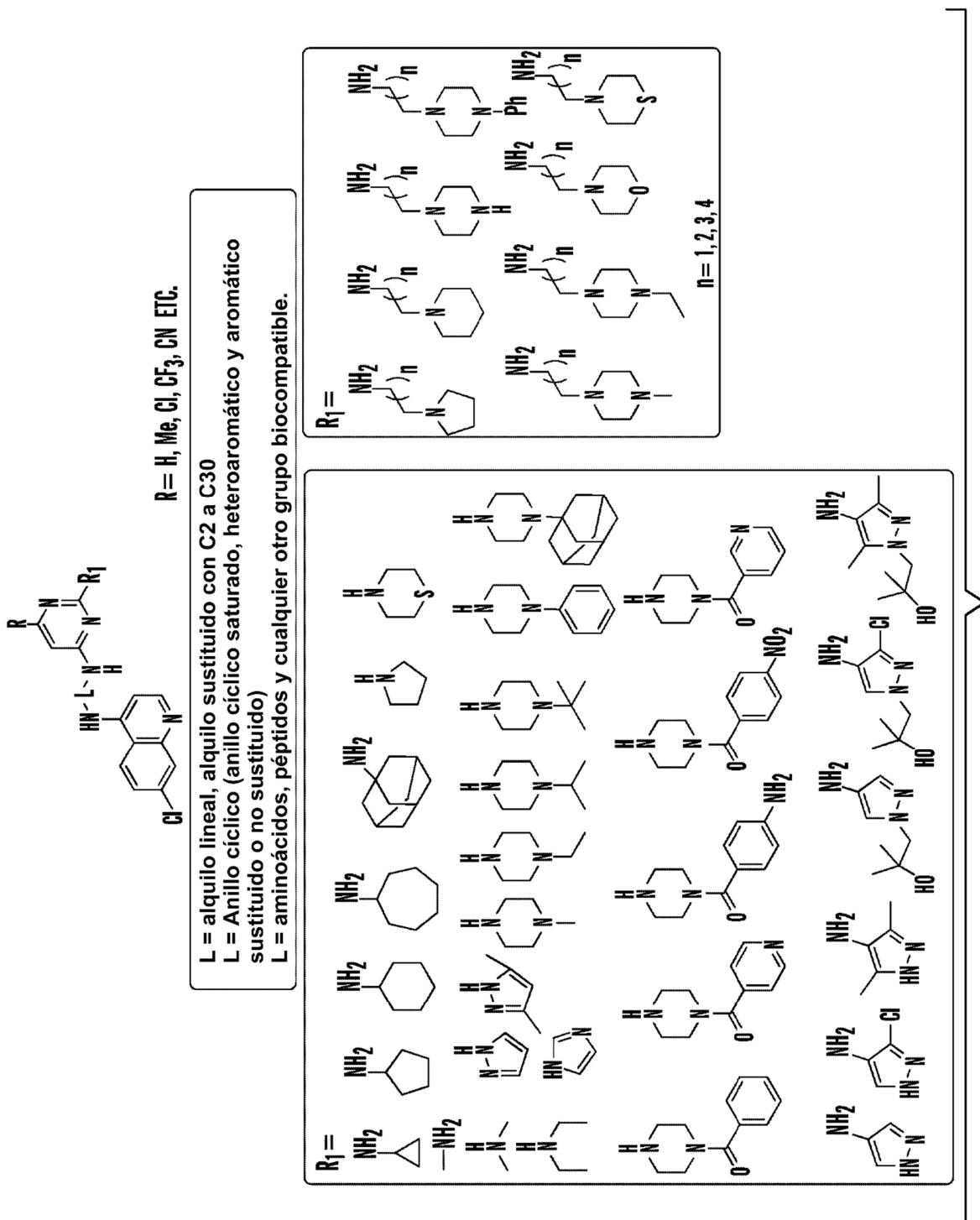


FIG. 2



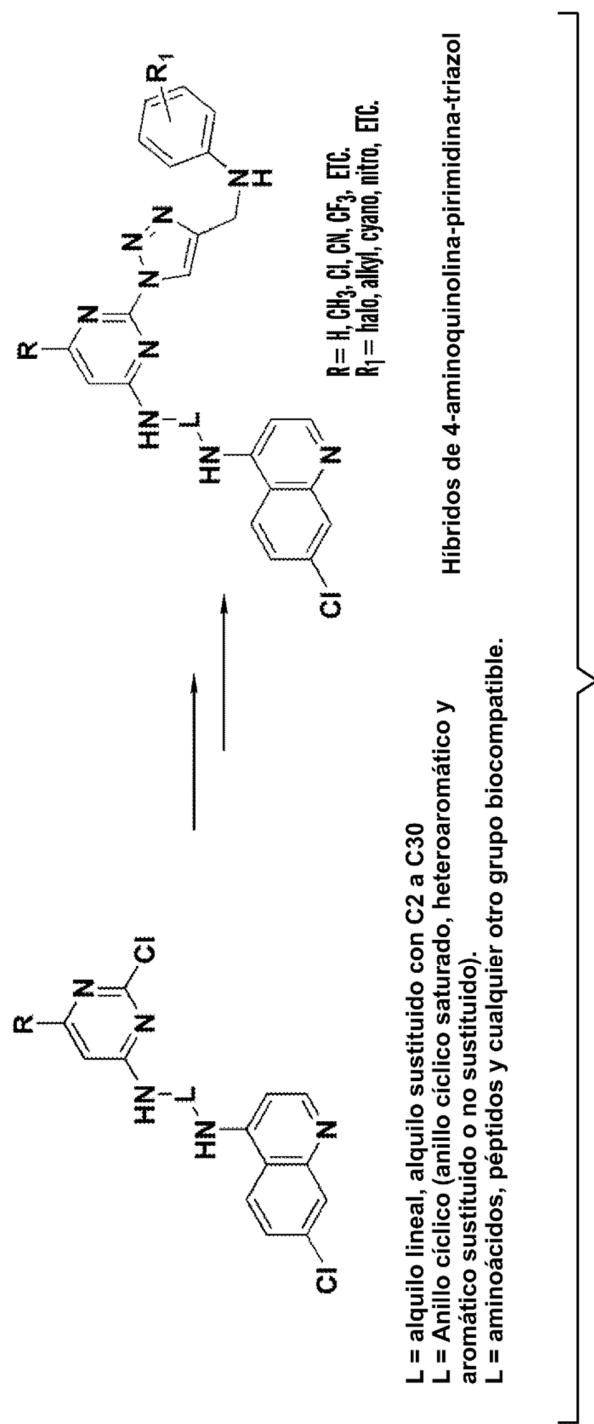


FIG. 4

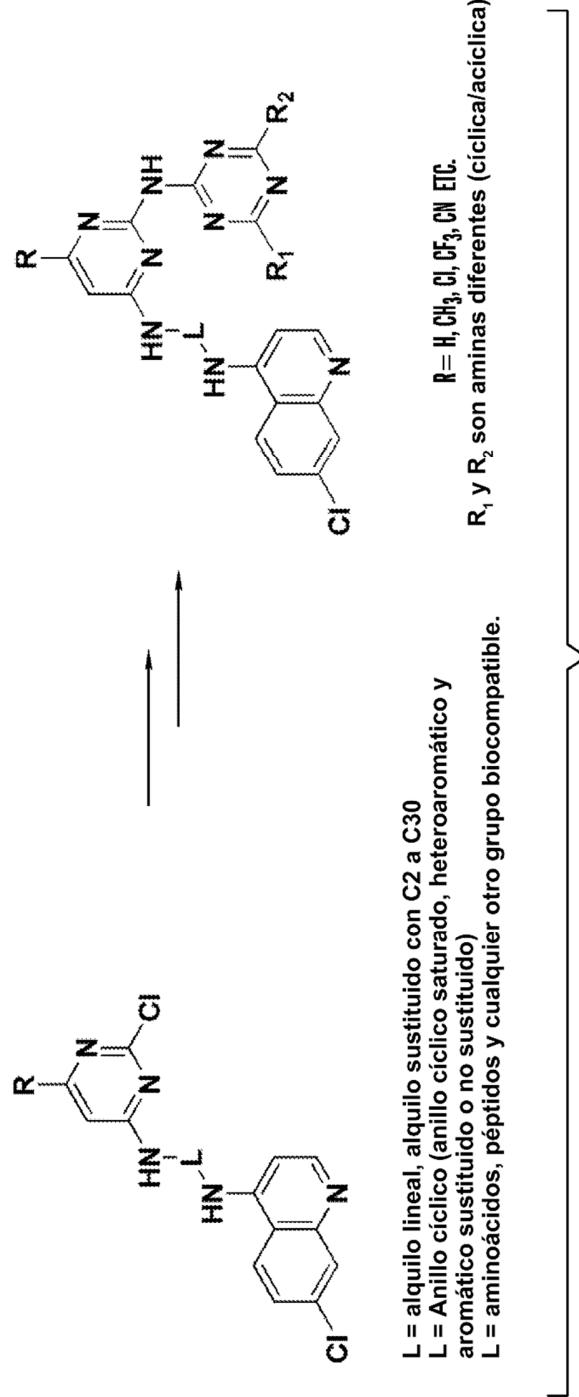


FIG. 5

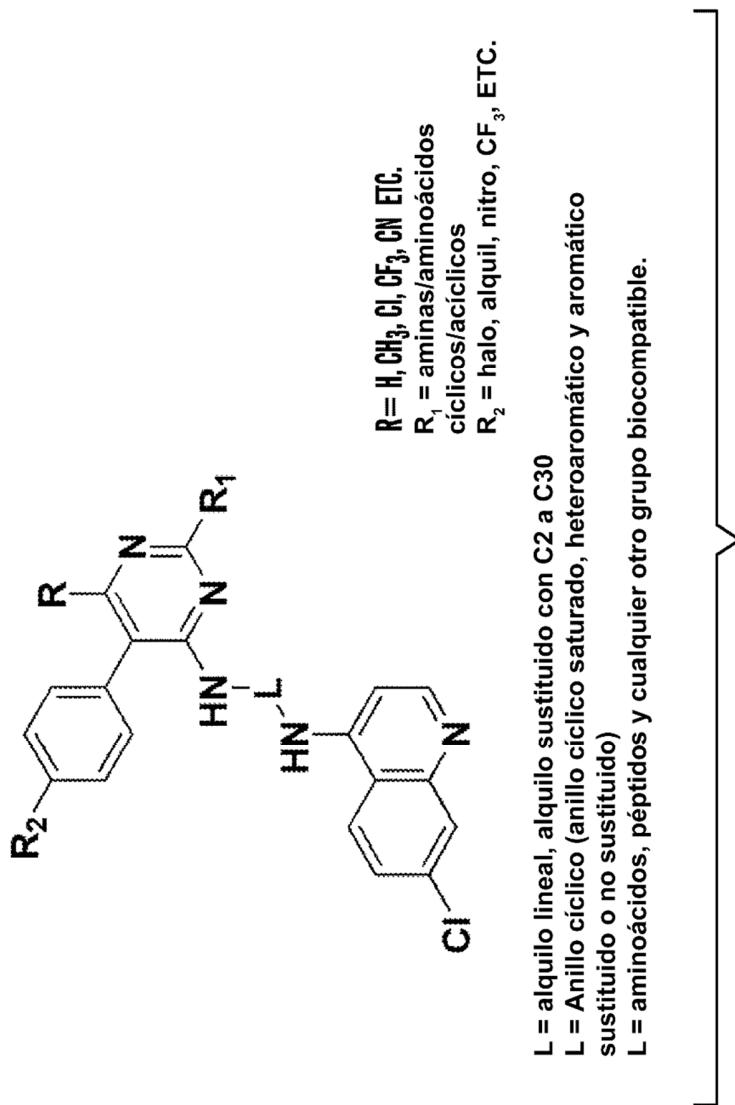
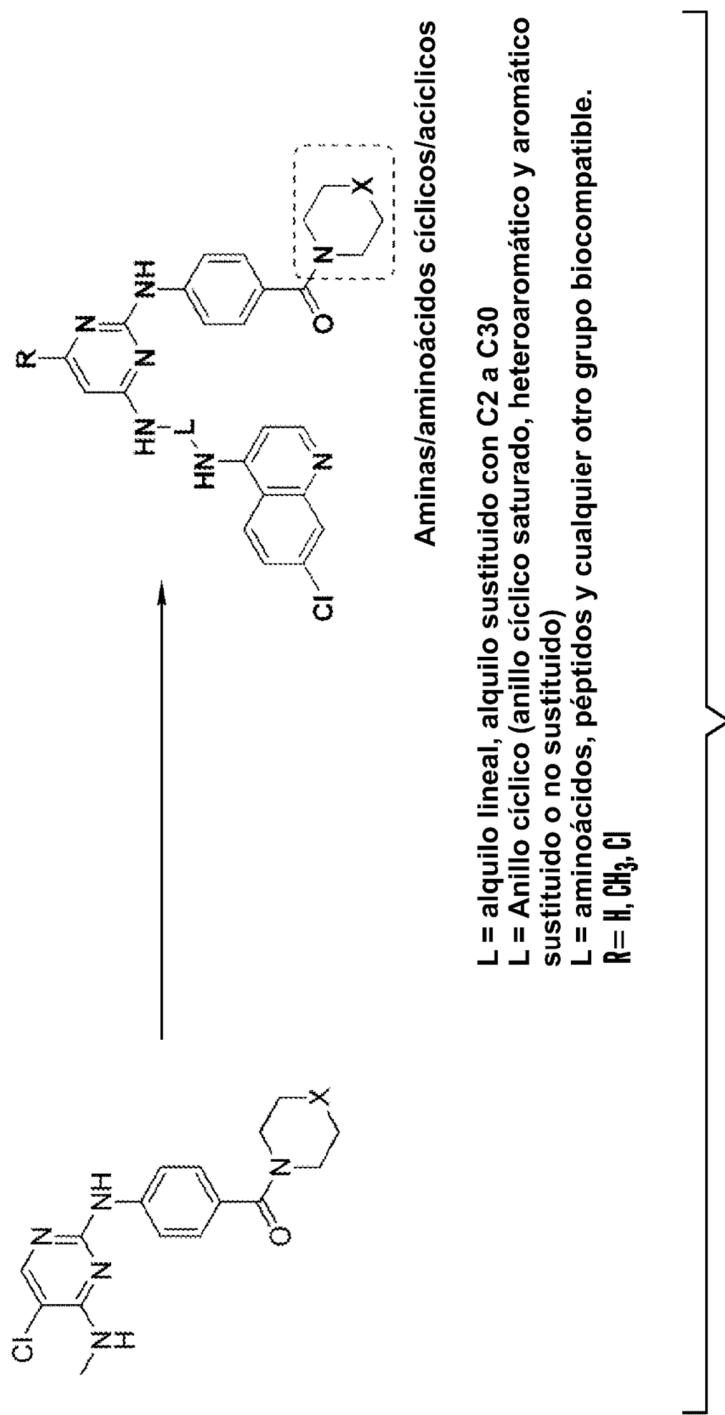


FIG. 6



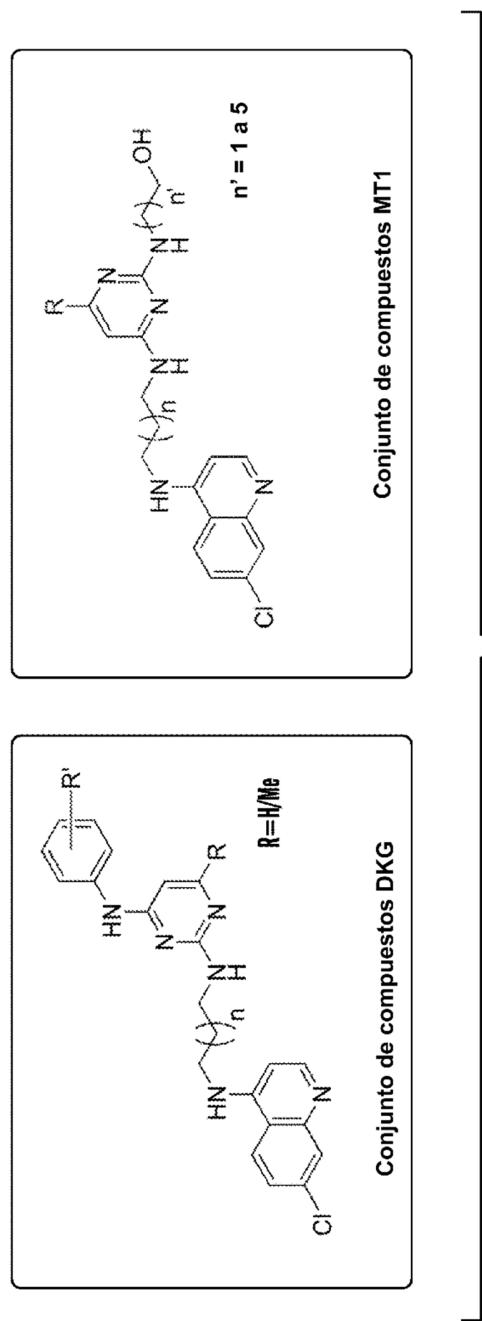


FIG. 8

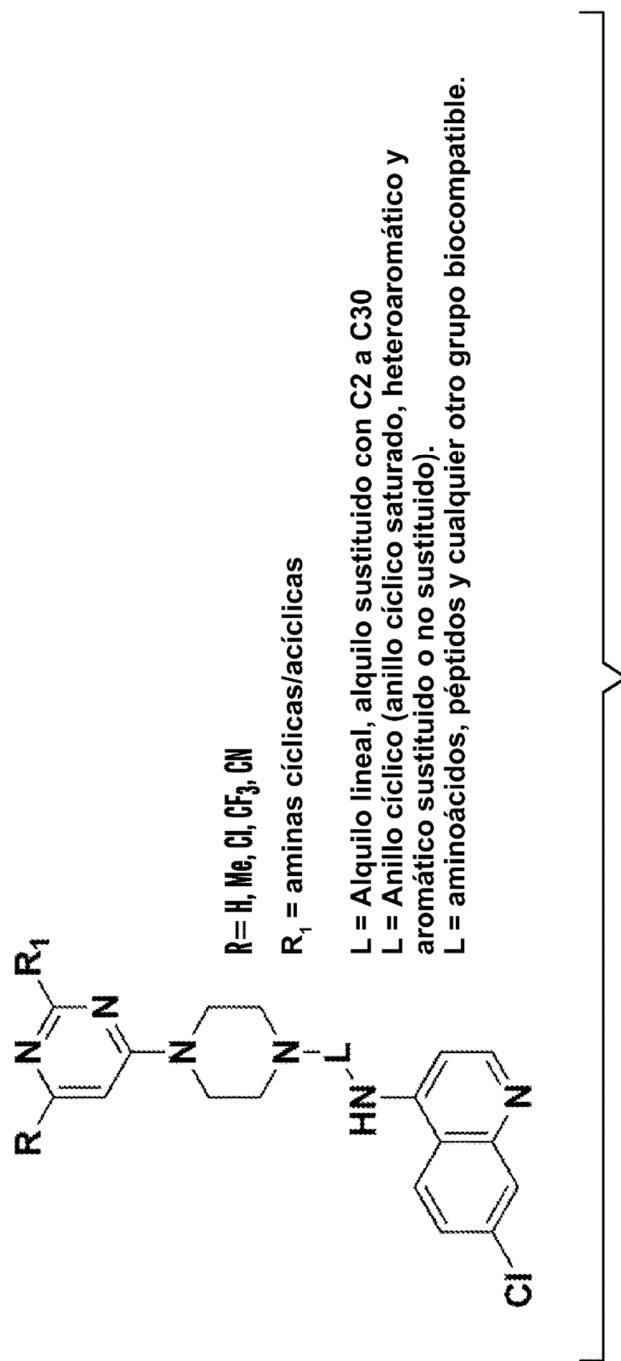


FIG. 9

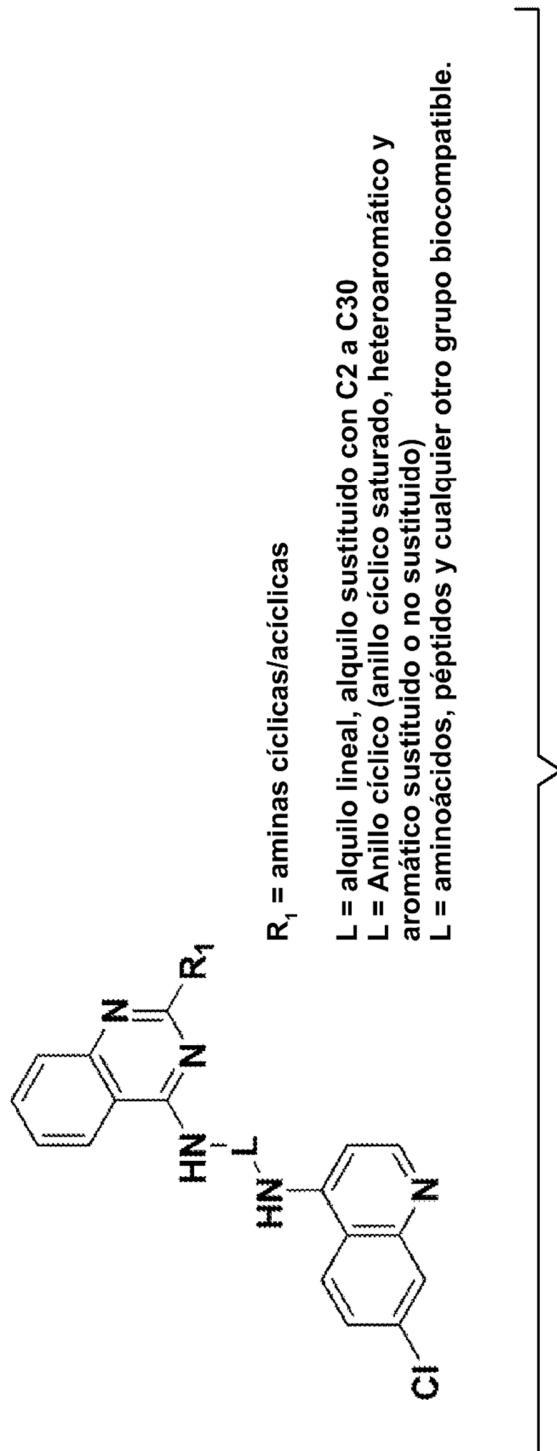


FIG. 10

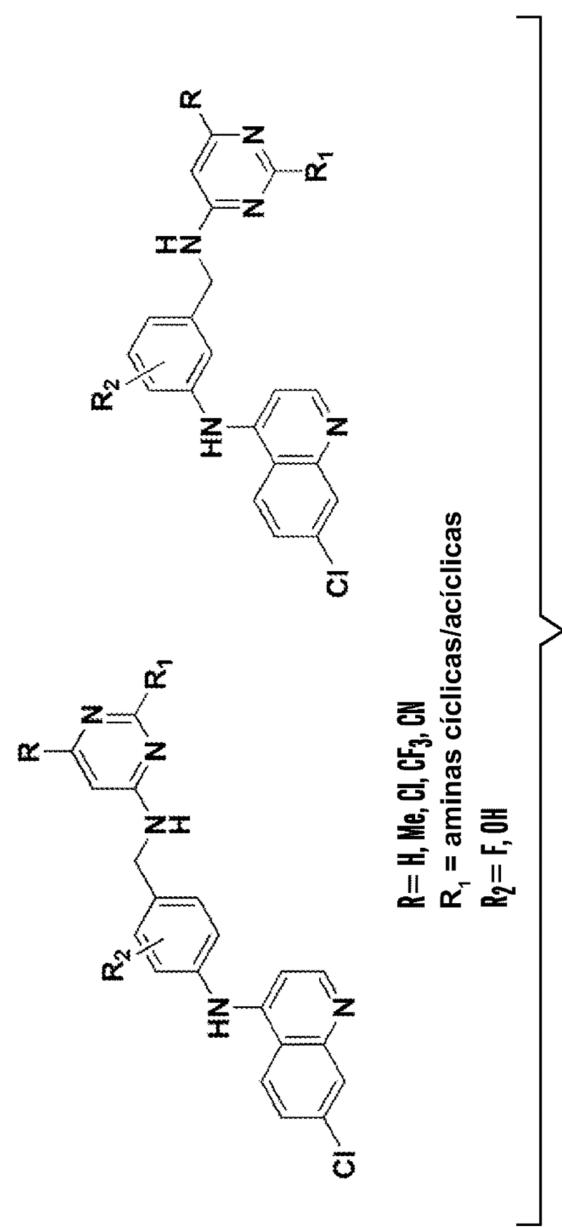


FIG. 11

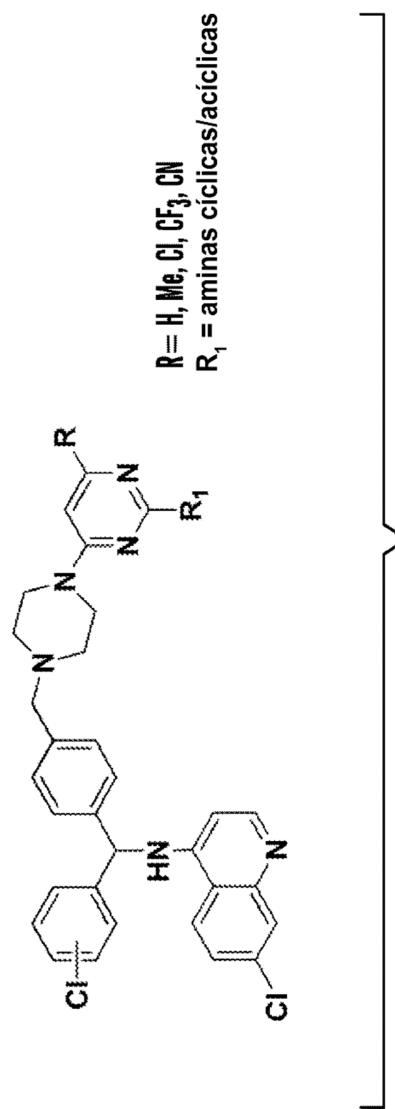


FIG. 12

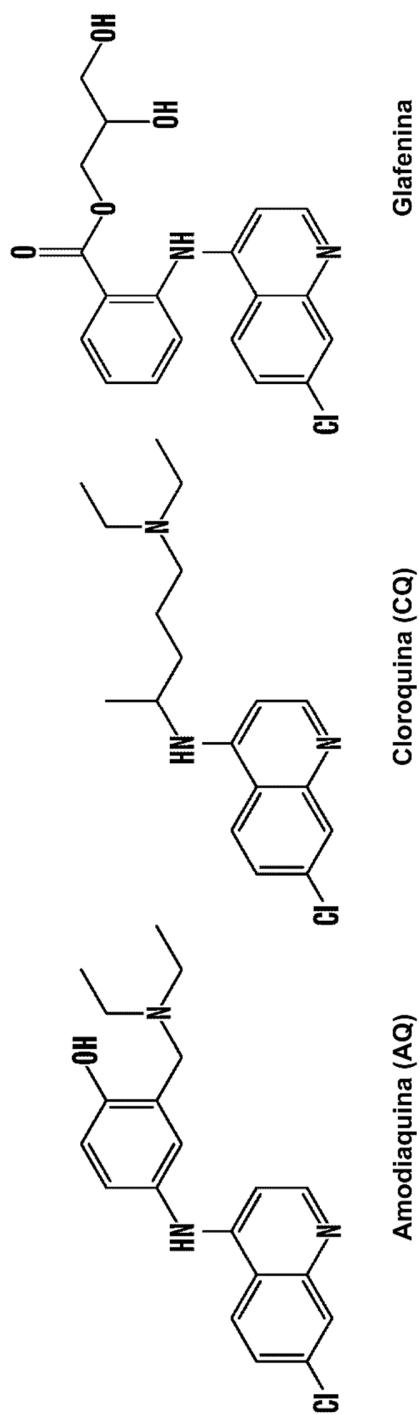


FIG. 13A

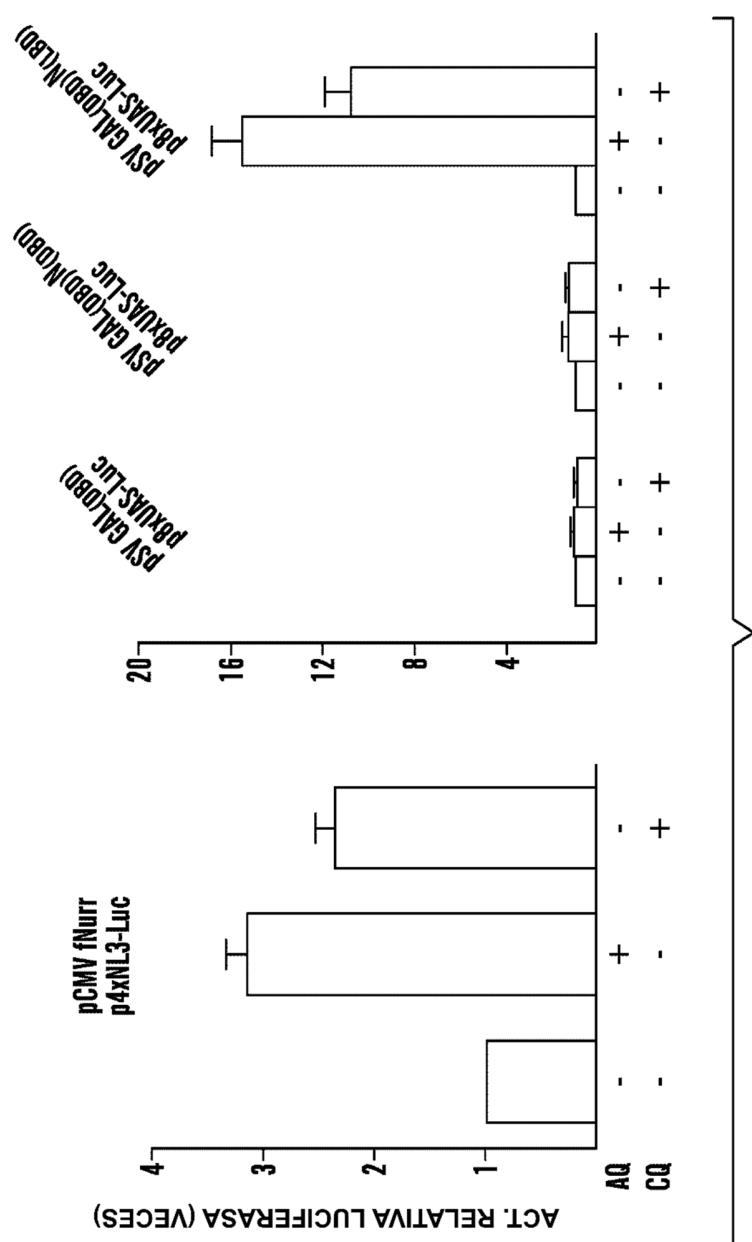
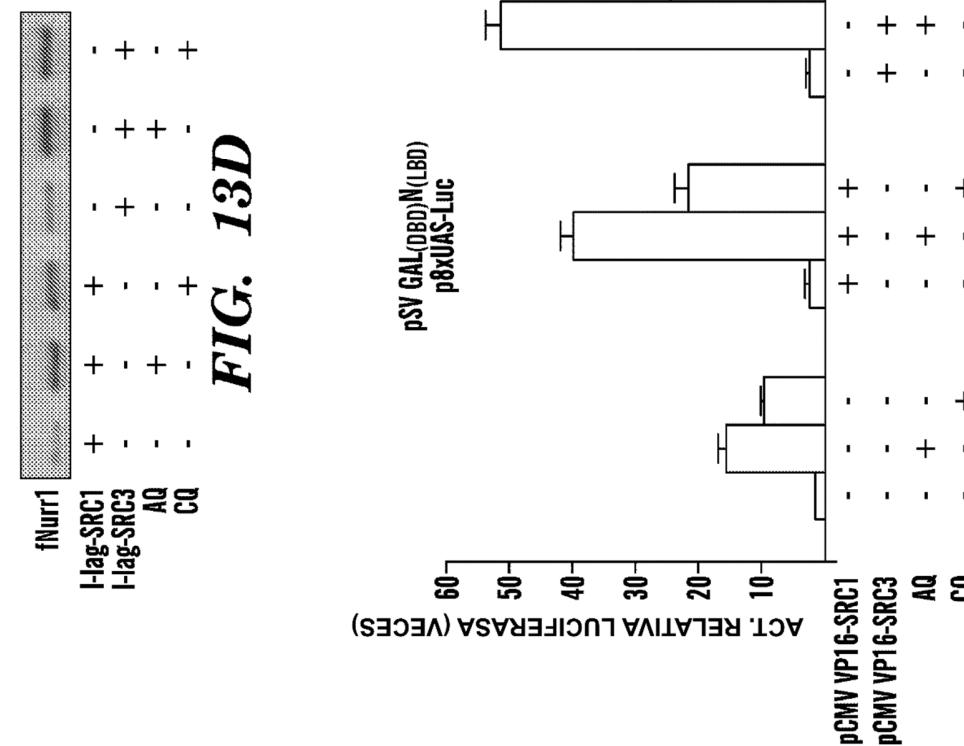
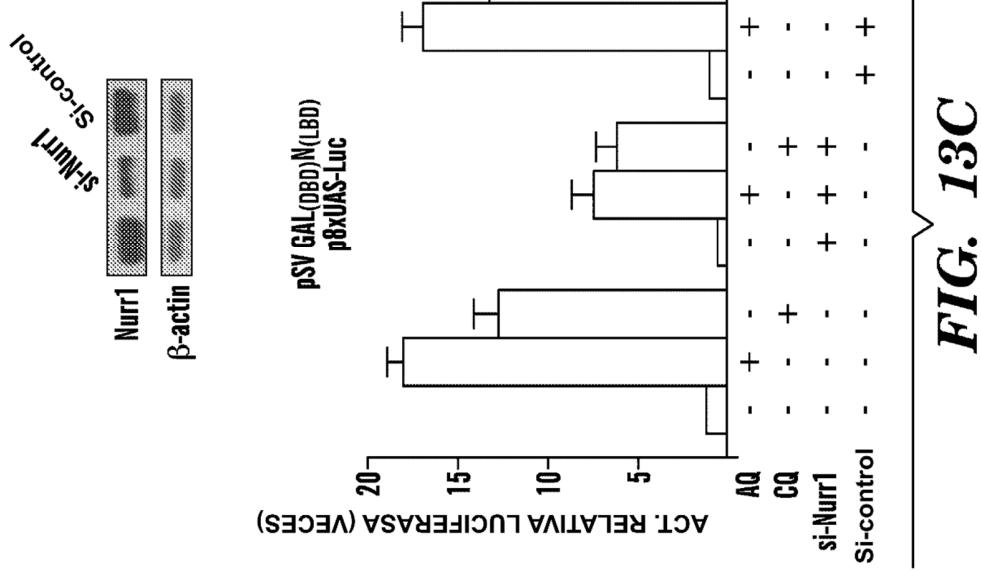
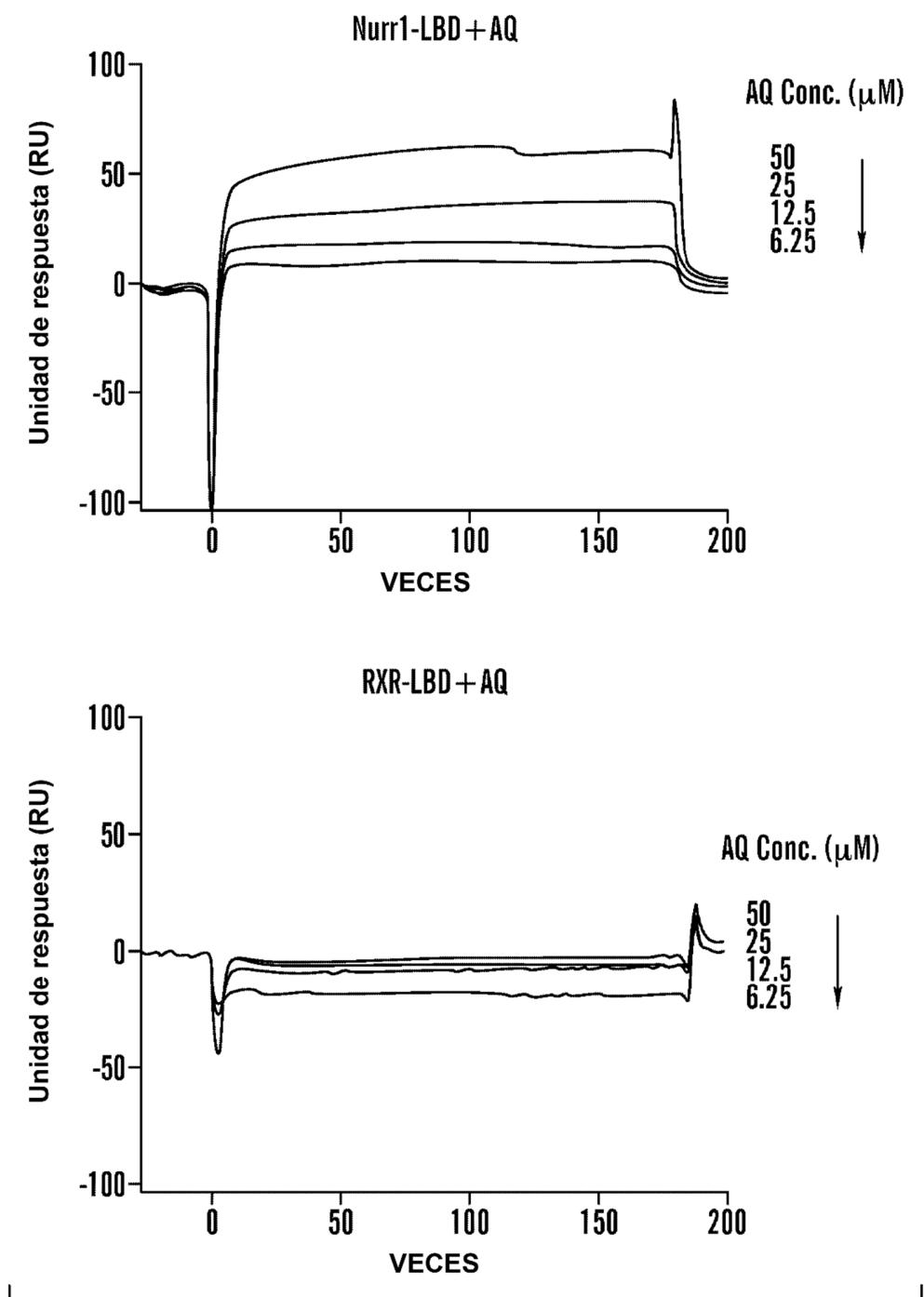


FIG. 13B





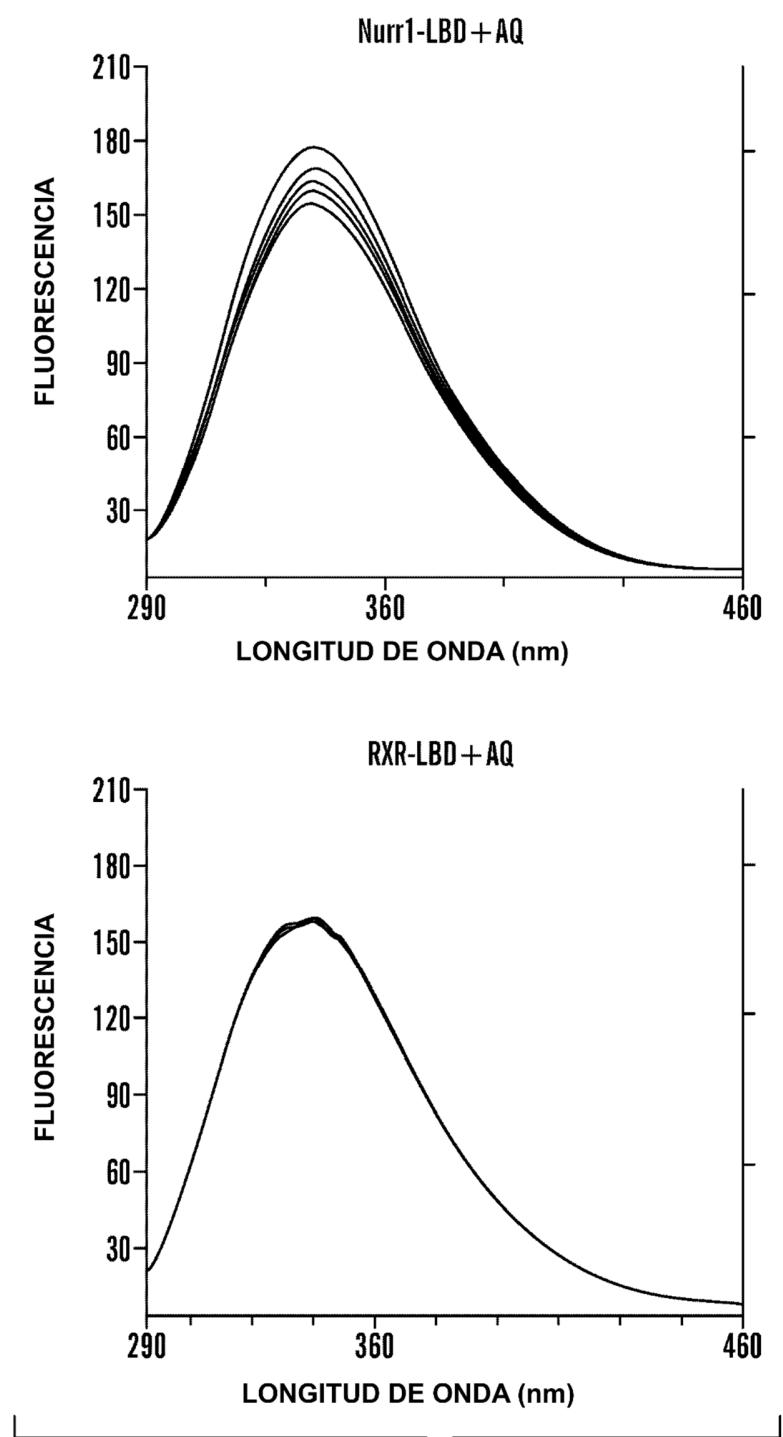


FIG. 13G

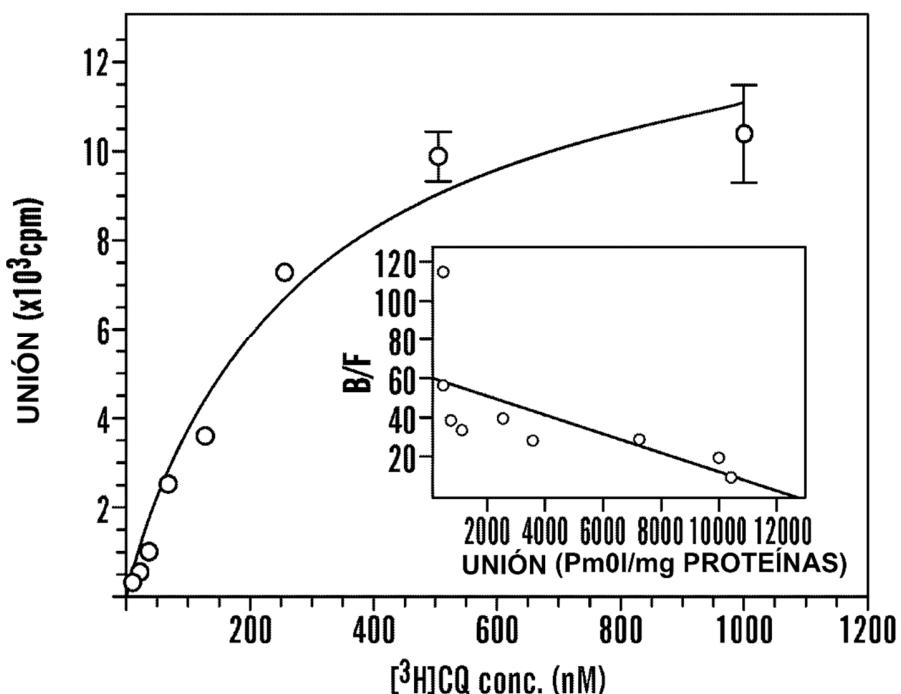


FIG. 13H

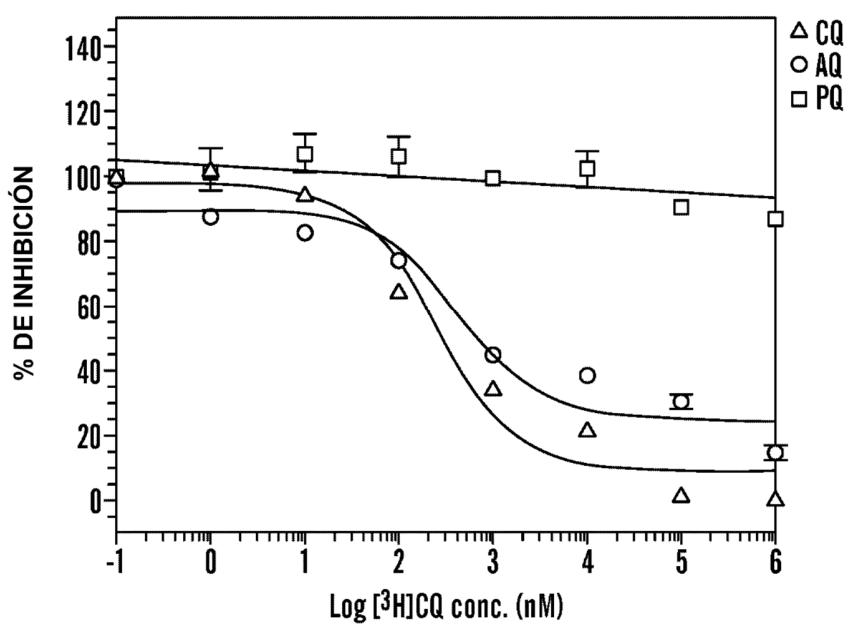


FIG. 13I

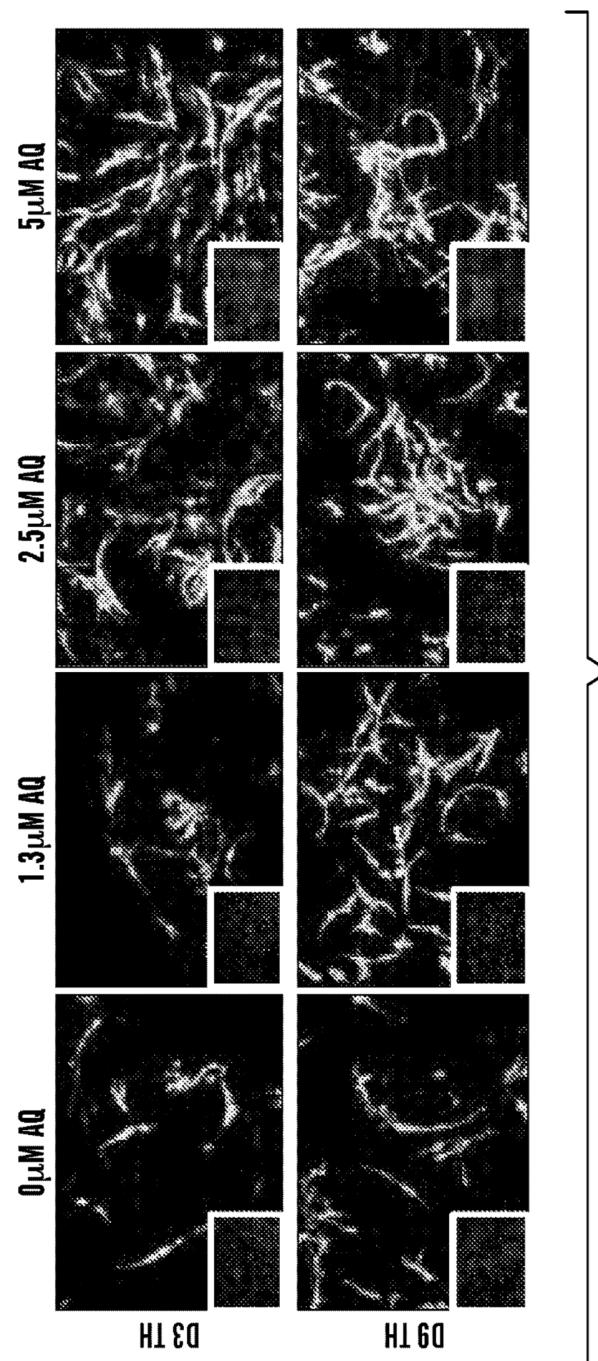


FIG. 14A

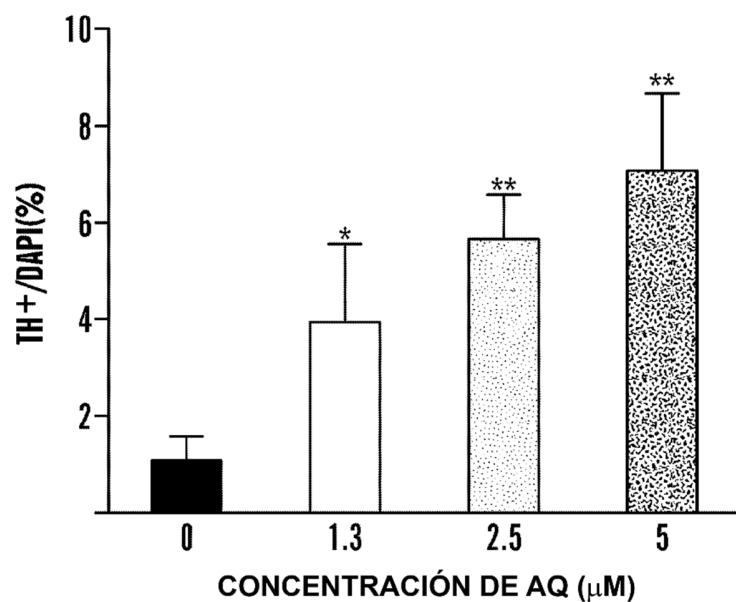


FIG. 14B

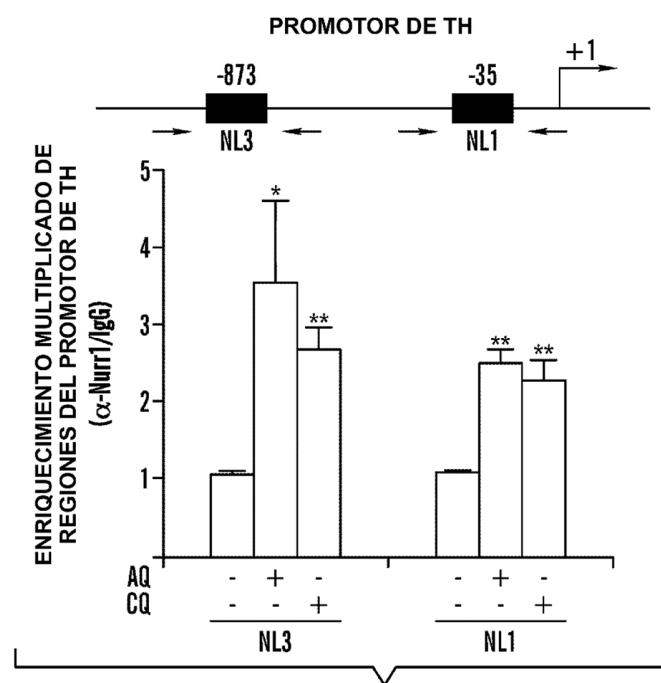
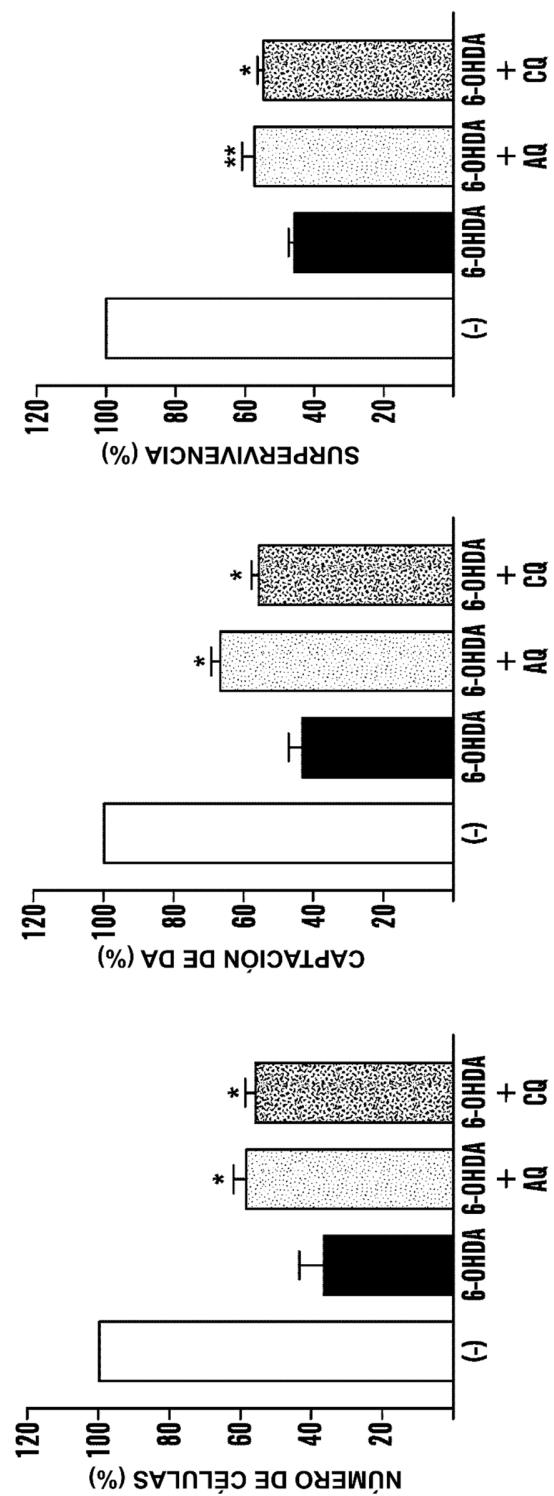


FIG. 14C



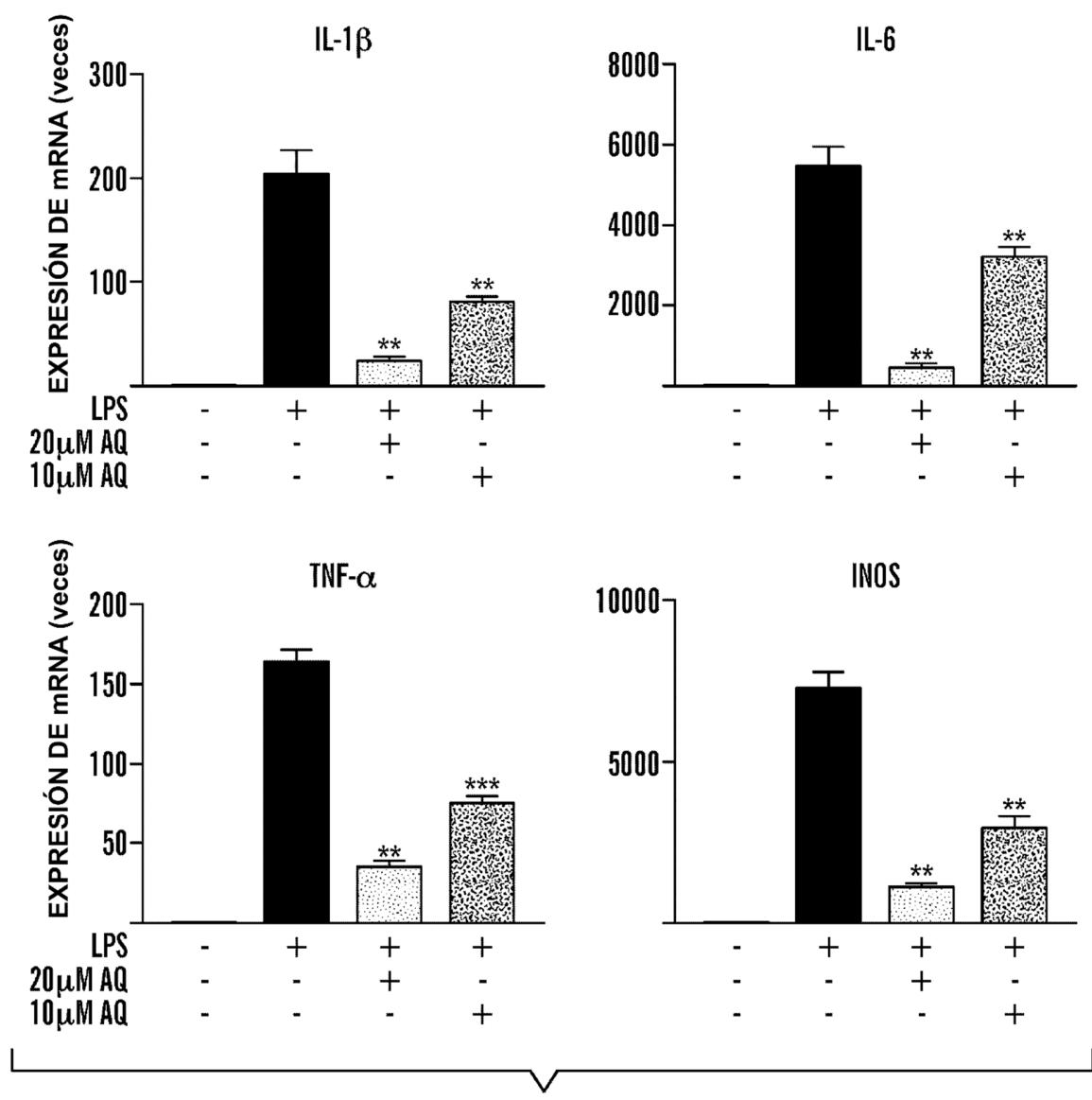


FIG. 14G

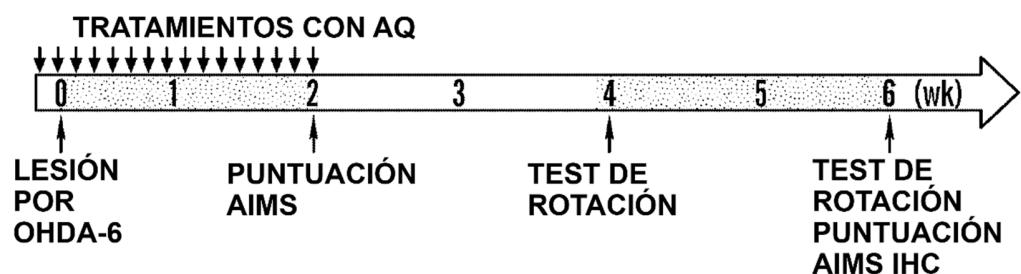


FIG. 15A

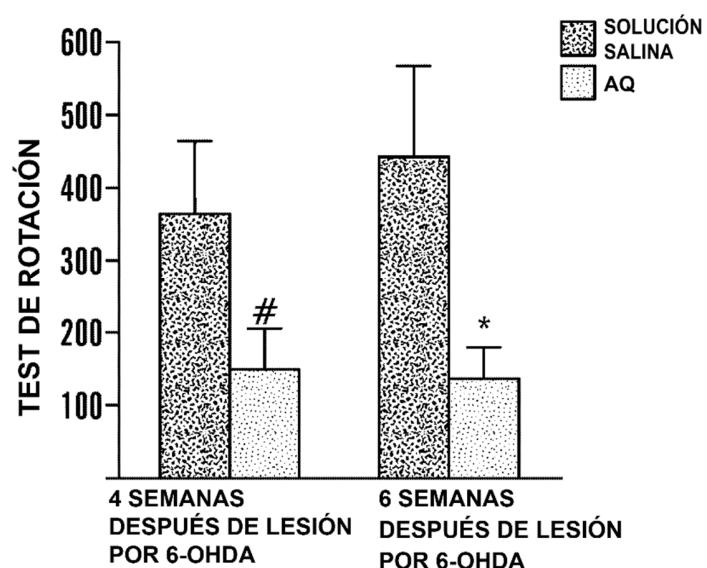


FIG. 15B

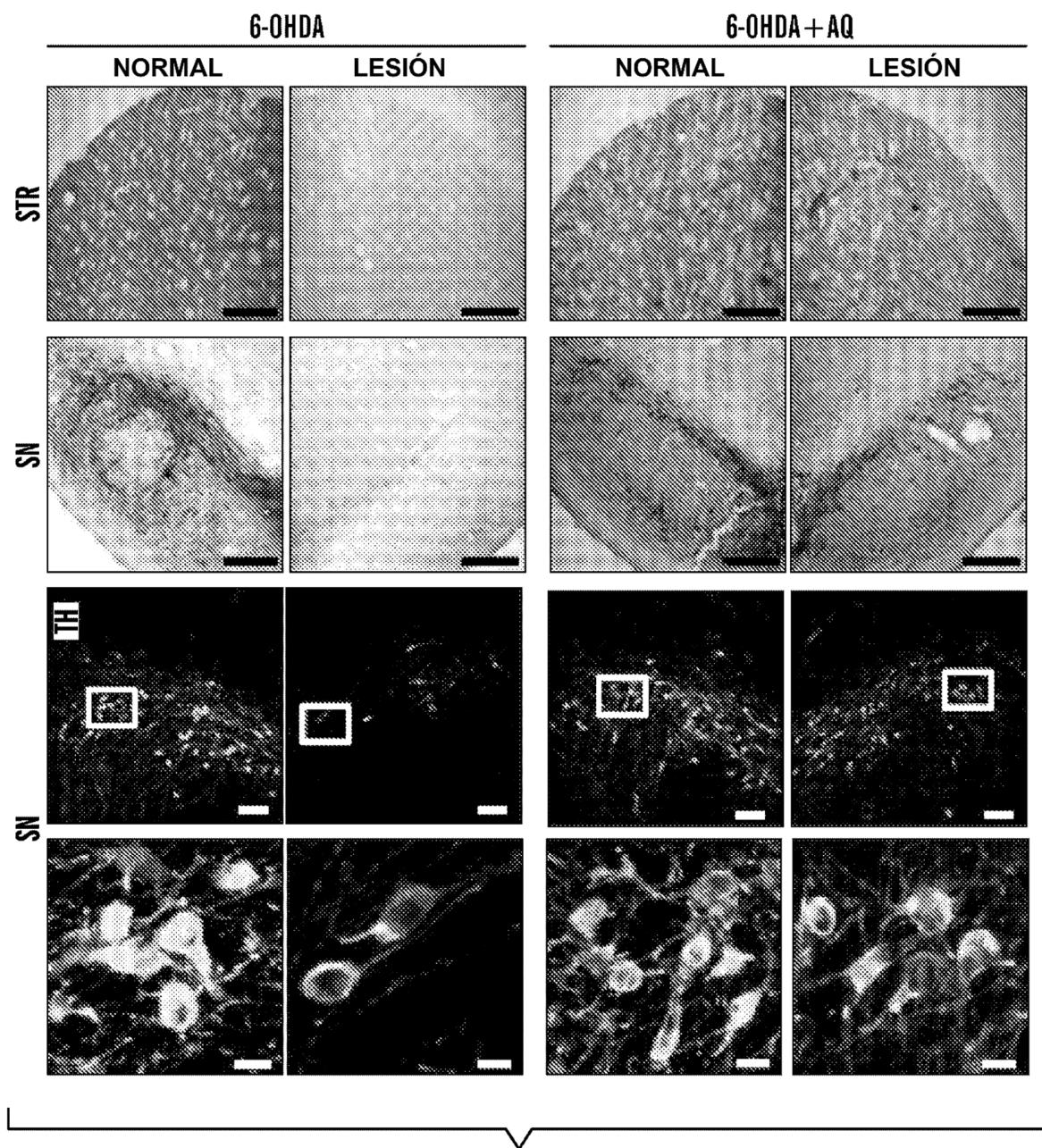
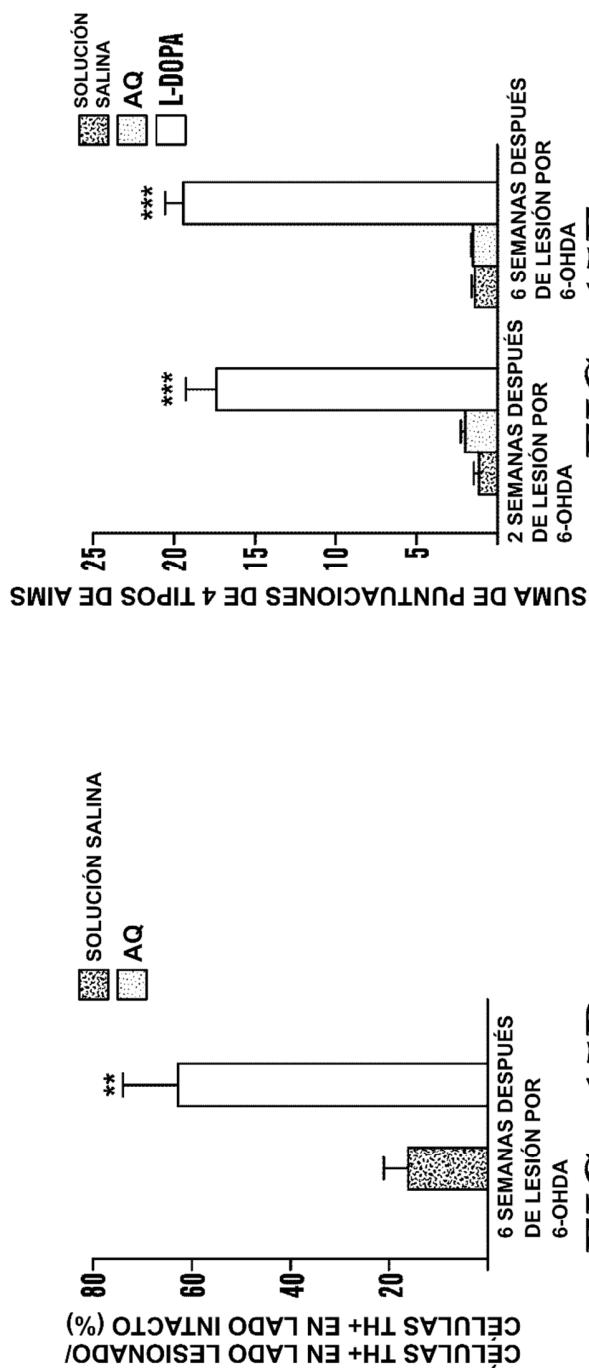


FIG. 15C



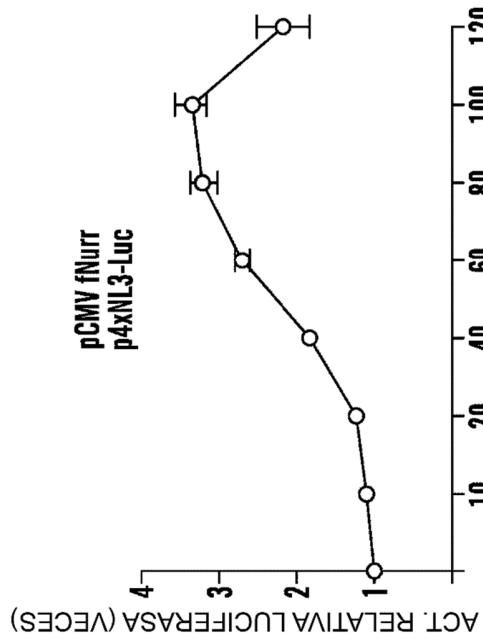


FIG. 16B

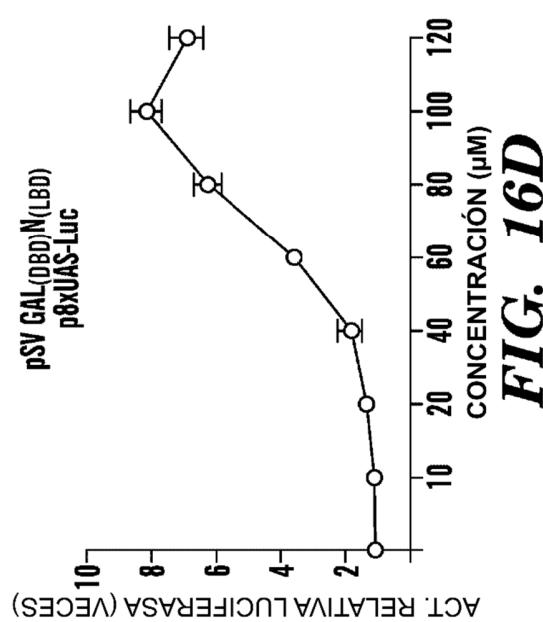


FIG. 16B

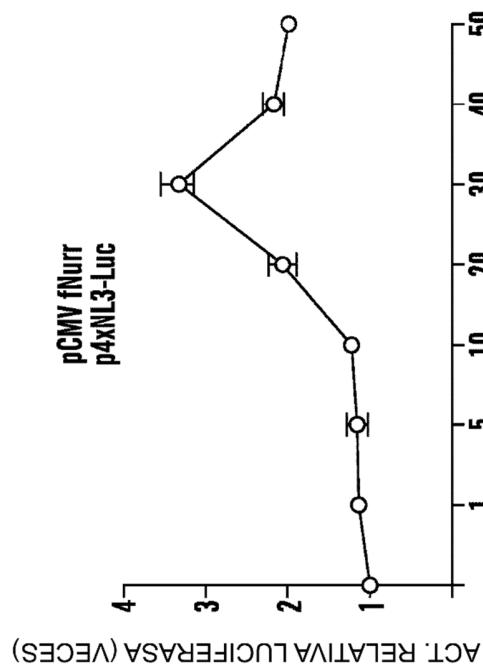


FIG. 16A

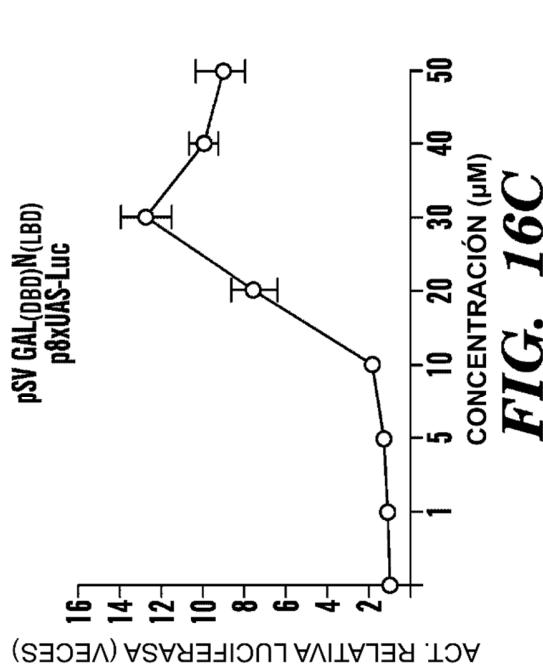


FIG. 16C

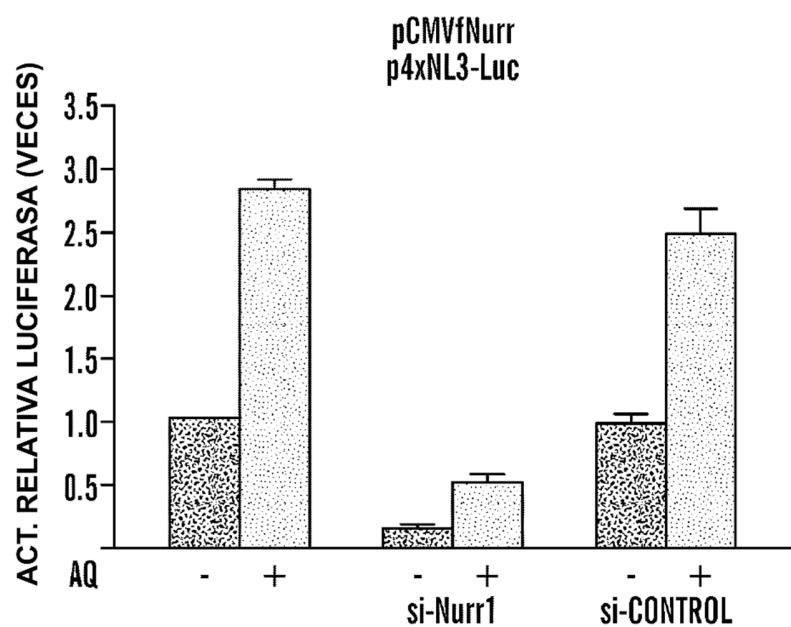


FIG. 17

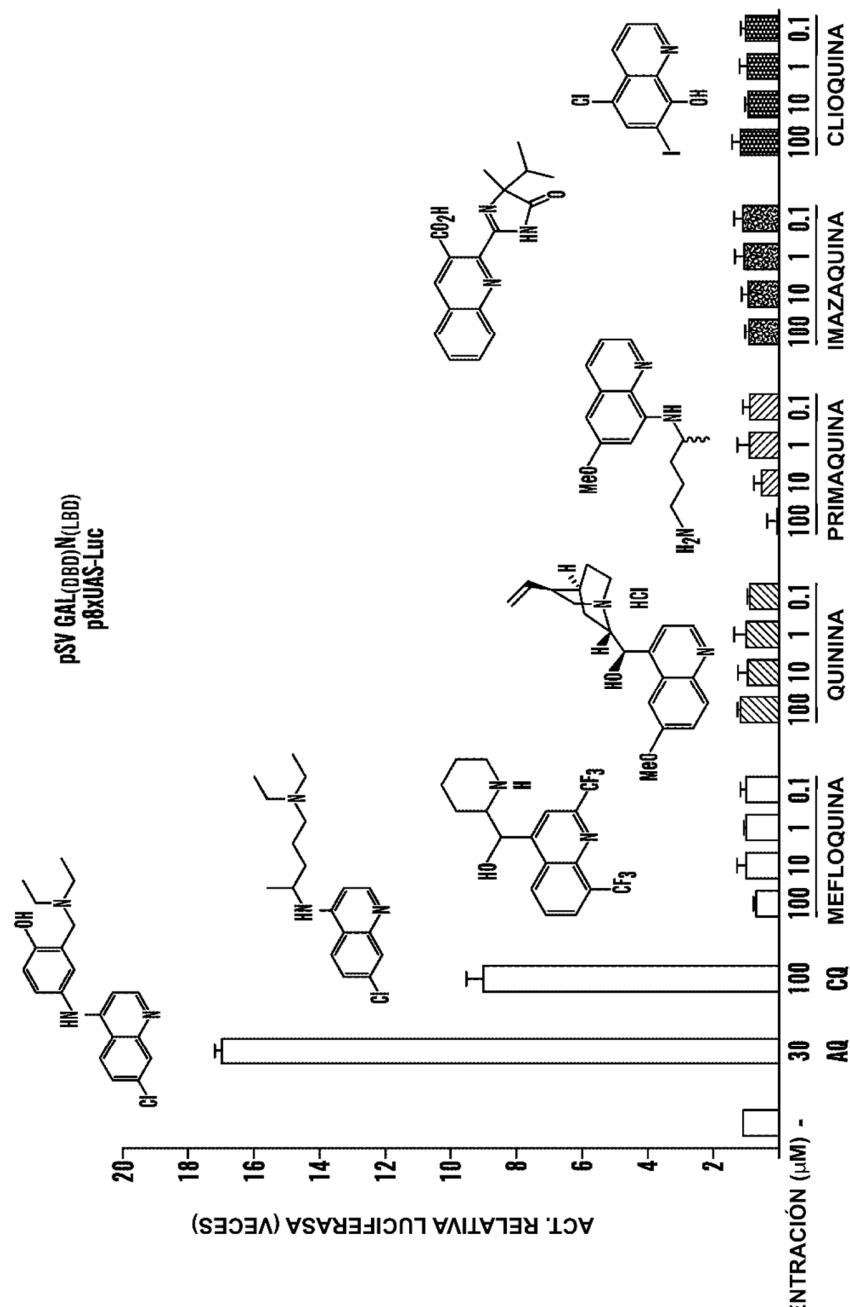


FIG. 18

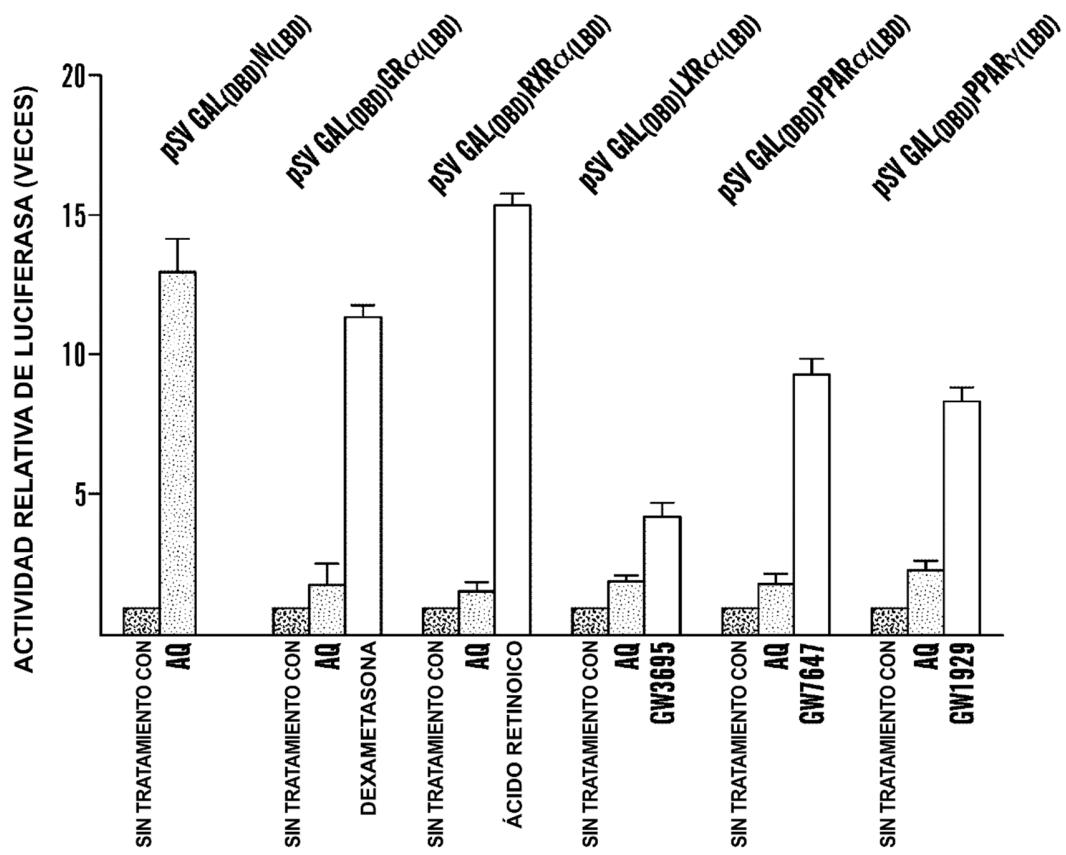


FIG. 19

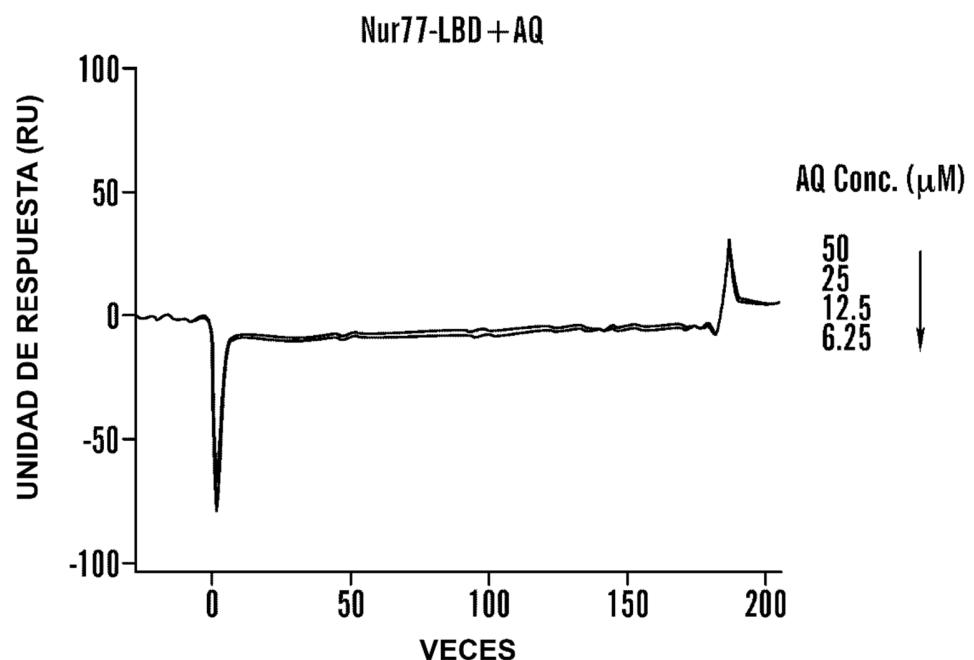


FIG. 20A

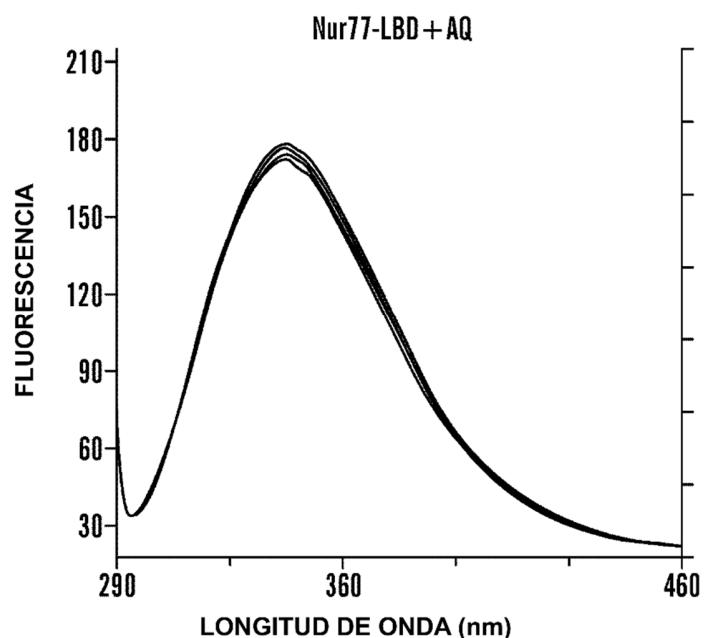


FIG. 20B

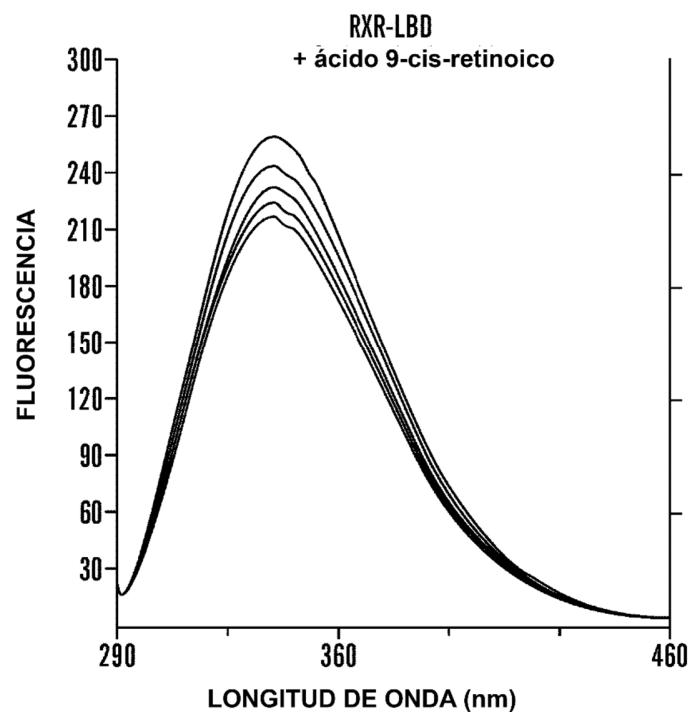


FIG. 20C

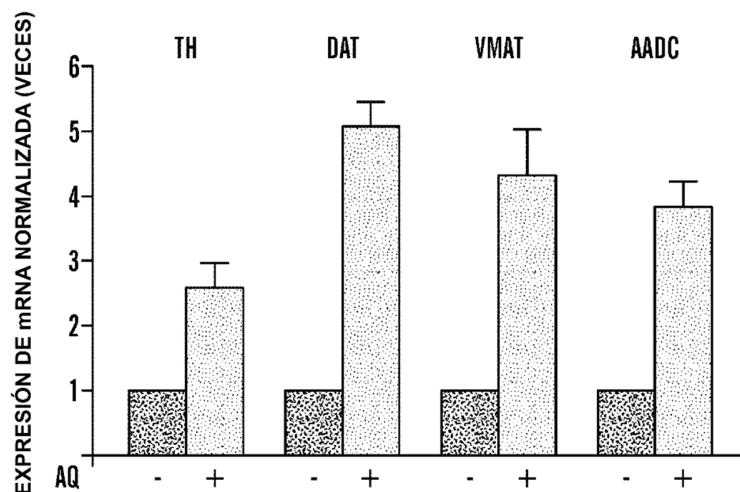


FIG. 21

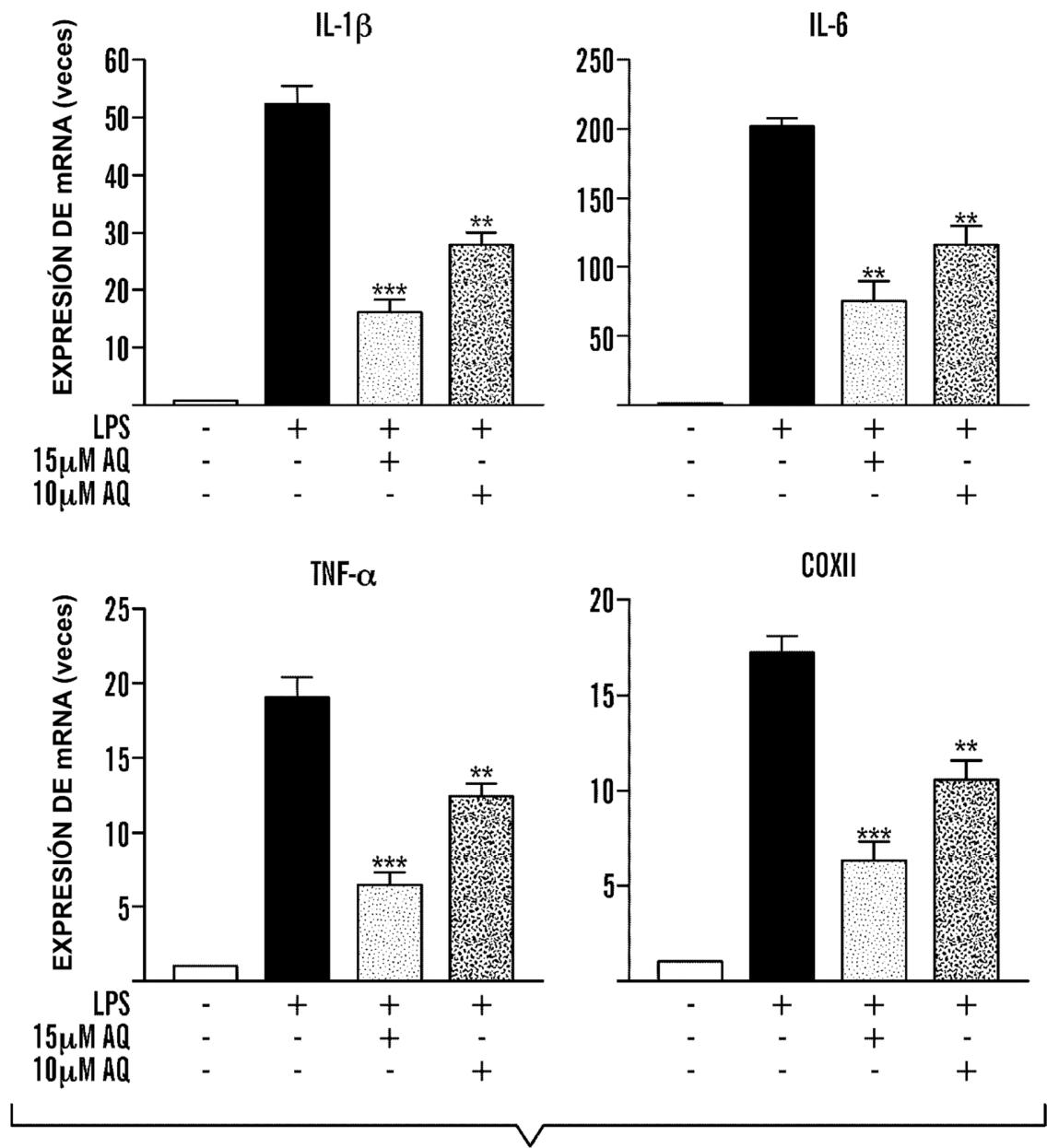


FIG. 22A

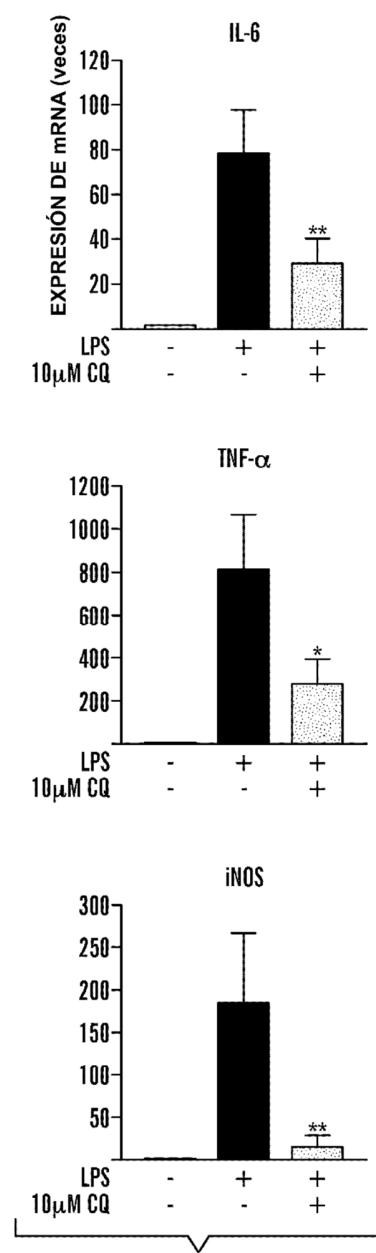


FIG. 22B

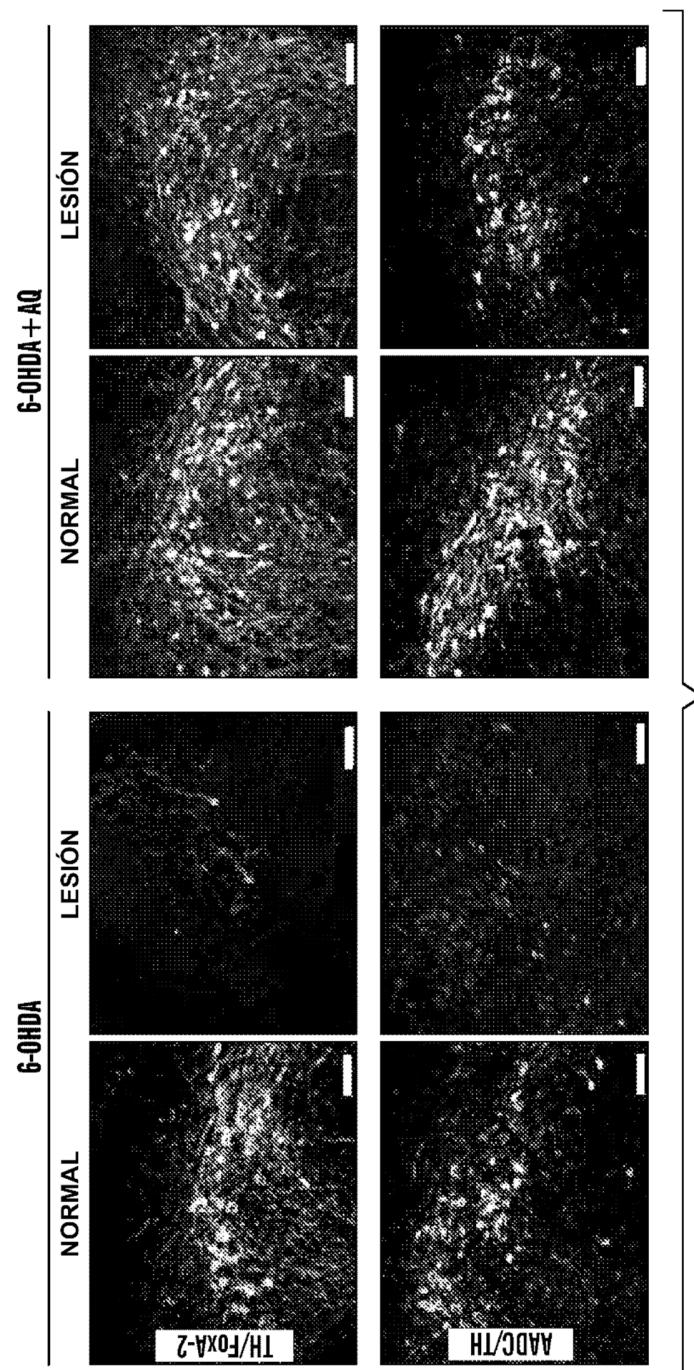


FIG. 23

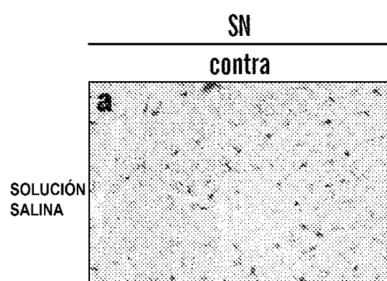


FIG. 24A

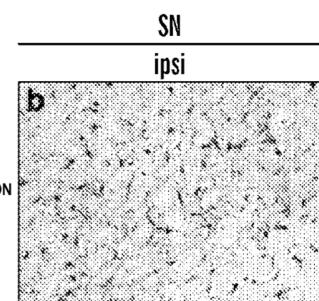


FIG. 24B

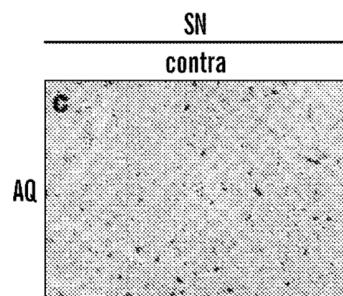


FIG. 24C

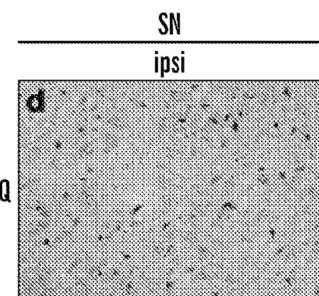


FIG. 24D

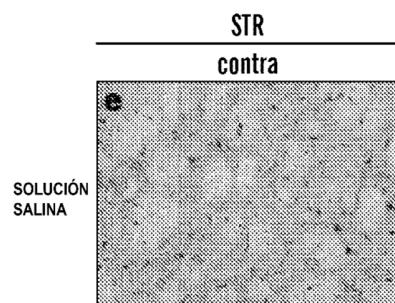


FIG. 24E

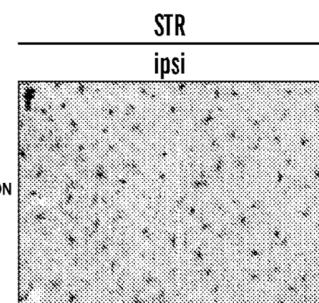


FIG. 24F

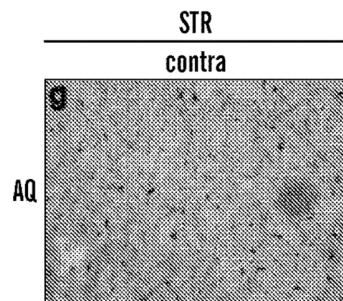


FIG. 24G

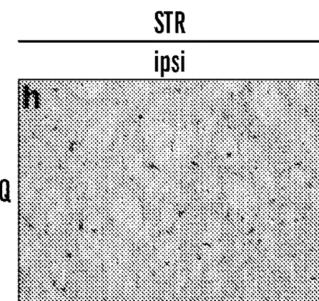


FIG. 24H

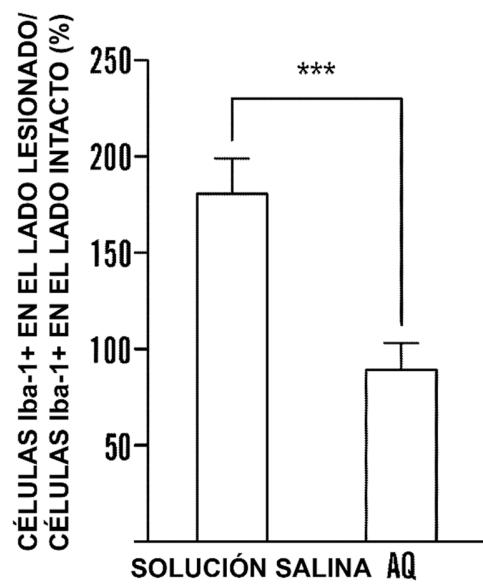


FIG. 24I

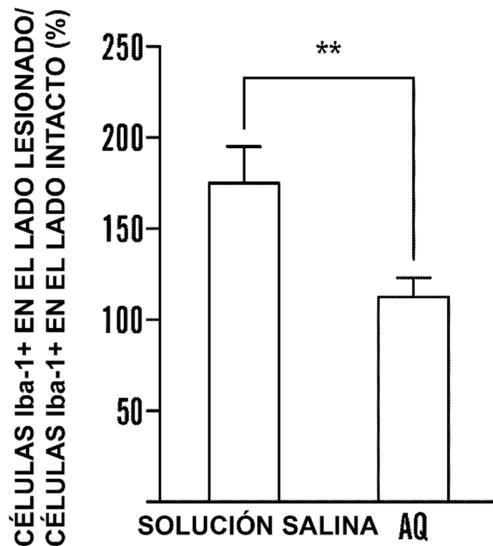


FIG. 24J

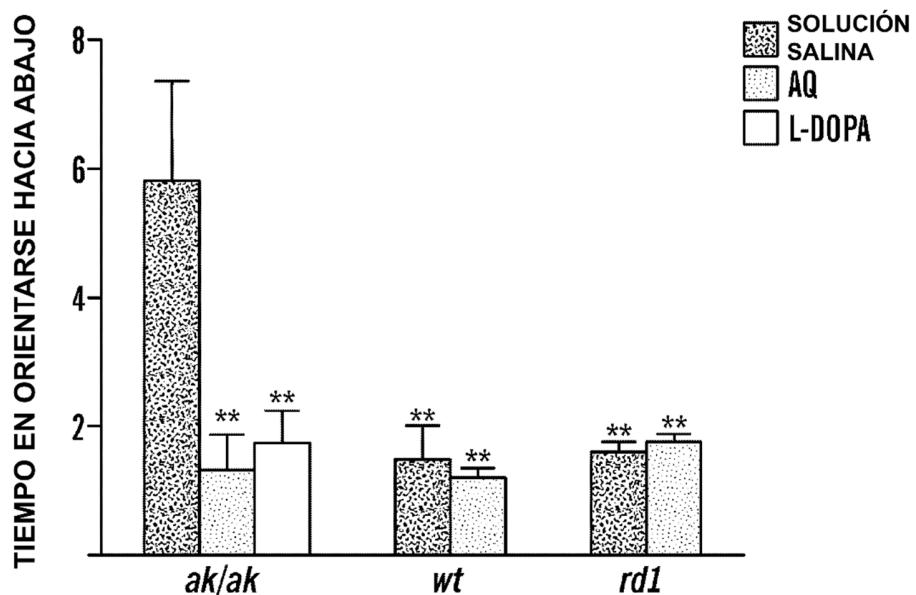


FIG. 25A

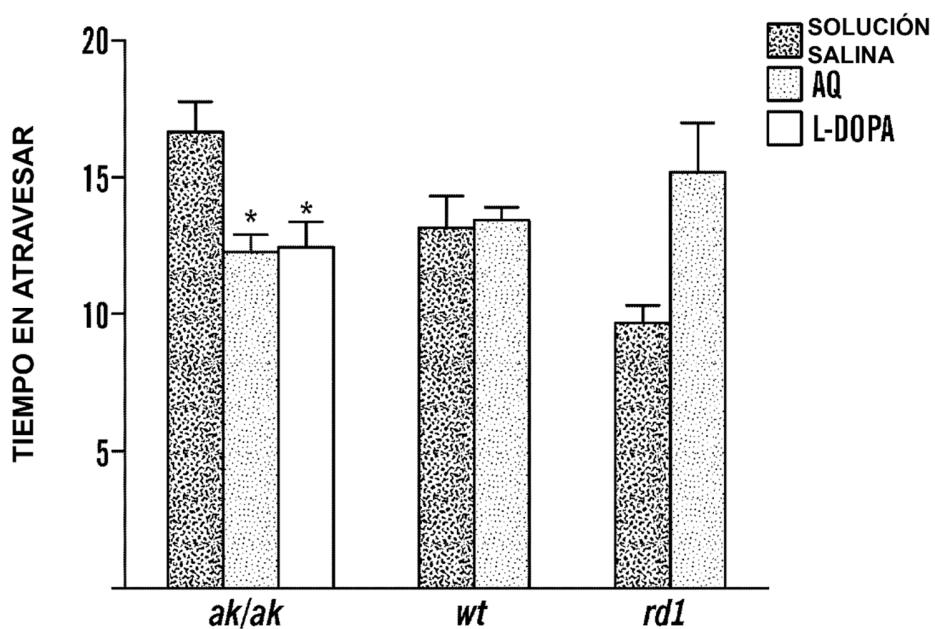


FIG. 25B

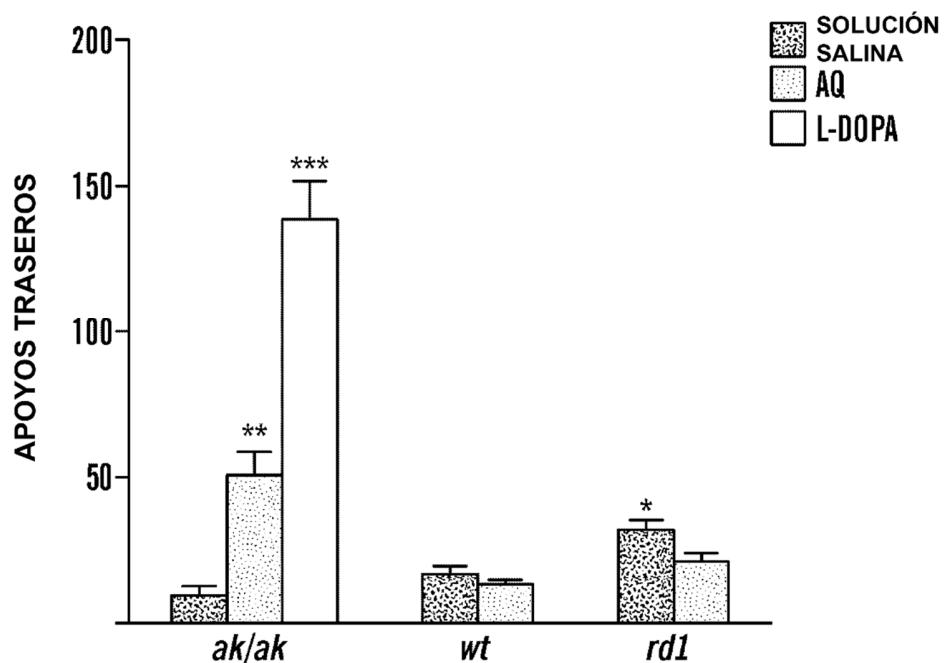


FIG. 25C

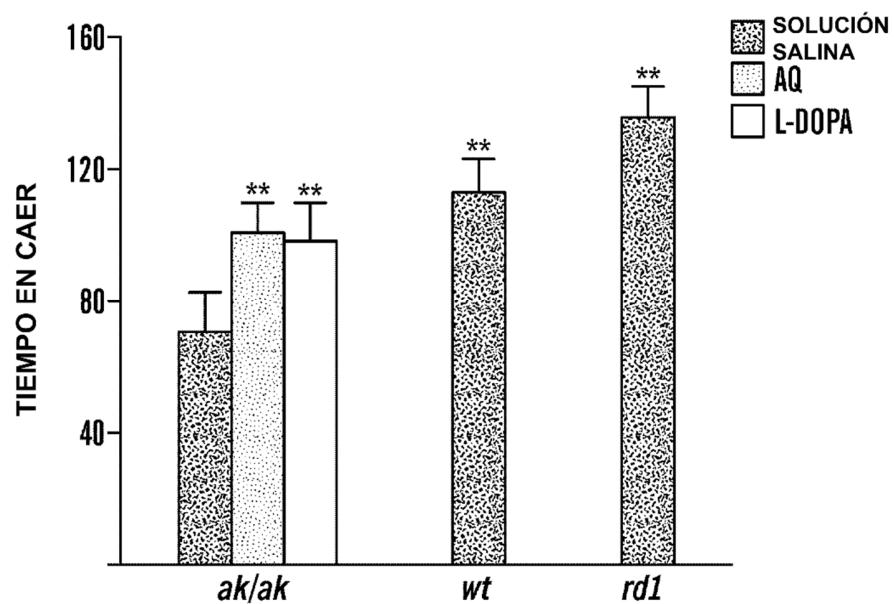


FIG. 25D

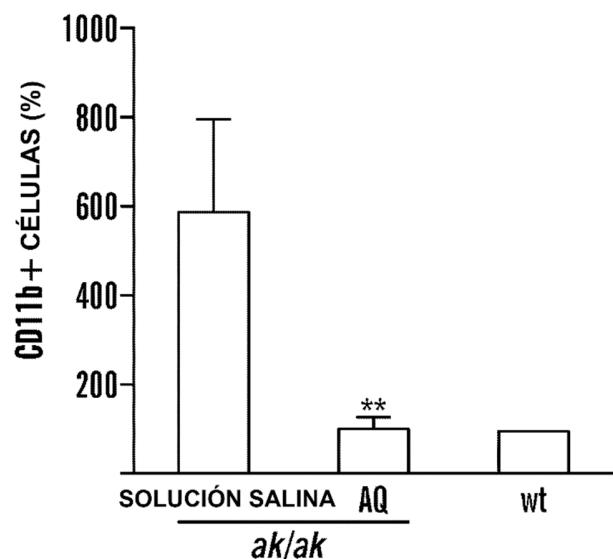


FIG. 26

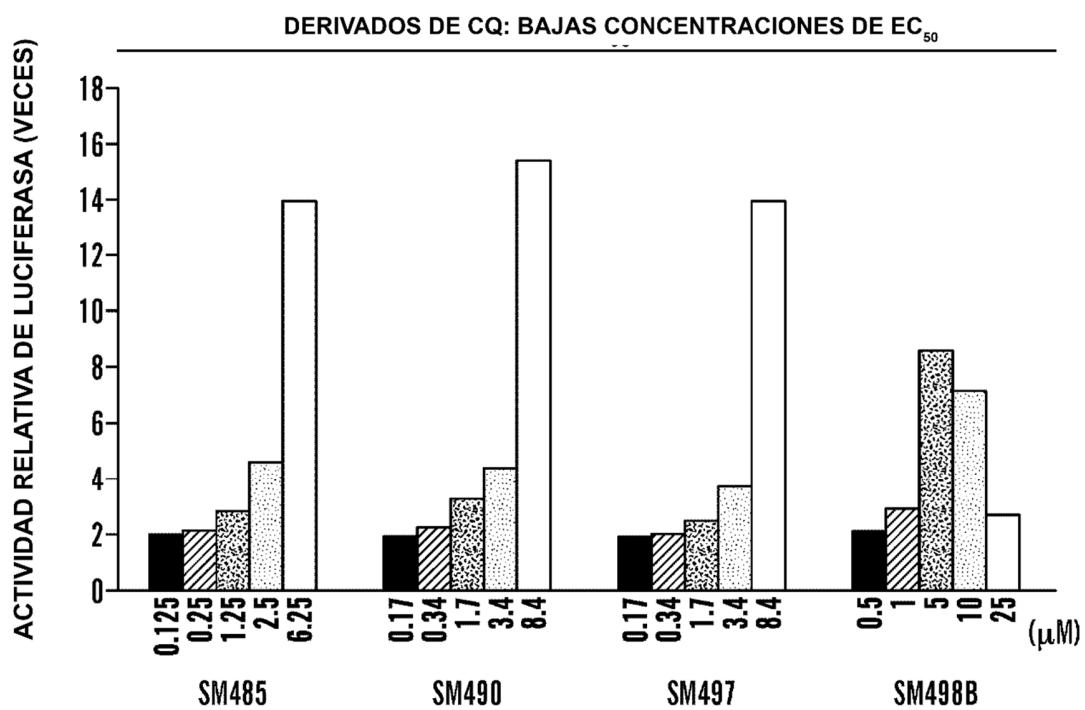


FIG. 27