



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PLT

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

10-2271

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO MÉTODO Y COMPOSICIONES PARA INHIBIR EL FACTOR
DE EDEMA Y LA ADENILIL CICLASA.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A01N 35/00

71. SOLICITANTE MISSION PHARMACAL CO. Y

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM.

DOMICILIO San Antonio, Texas, Estados Unidos de América y
Austin, Texas, Estados Unidos de América.

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

Título, Patente, Cera
En 19-01-2010



No. 10-002271- -00000-0000

Fecha: 2010-01-12 15:06:12 Dep: 2020 DIR NUL VASCR
Tra: 11 PATENTILYII Lve: 378 FASLNACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 292

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

**2
SOLICITANTE
(71)**

Nombre: MISSION PHARMACAL CO. Y
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY
OF TEXAS SYSTEM.

Dirección: 10999 IH 10 West, Suite 1000, San
Antonio, Texas 78230, Estados Unidos y 201 W. 7th
Street, Austin, Texas 78701, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o domicilio: San Antonio, Texas,
Estados Unidos y Austin, Texas, Estados Unidos.

Lugar de Constitución: Texas, Estados Unidos
de América.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número

**3
REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 **Fax:** 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número 41.654.892 TP 20824

**4
INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER ANEXOS

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/066898 Fecha 13 de junio de 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/038842 A3 Fecha 26 de marzo de 2009

**6 TÍTULO (54) MÉTODO Y COMPOSICIONES PARA INHIBIR EL FACTOR DE EDEMA Y LA
ADENILIL CICLASA.**

7 Clasificación Internacional (51) A01N 35/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

(32) Fecha

15 de junio de 2007

10 de marzo de 2008

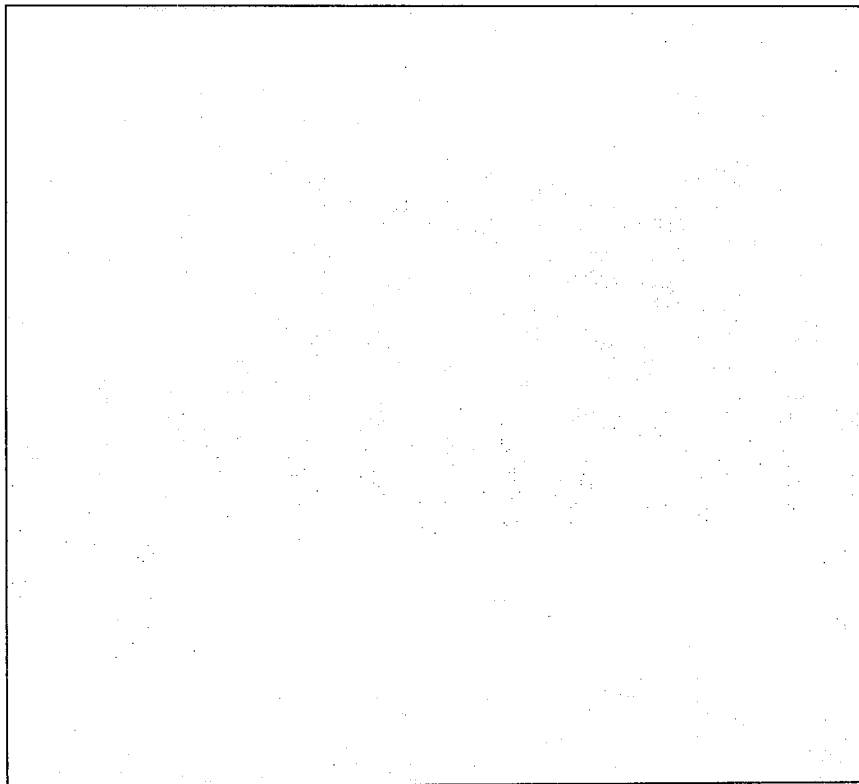
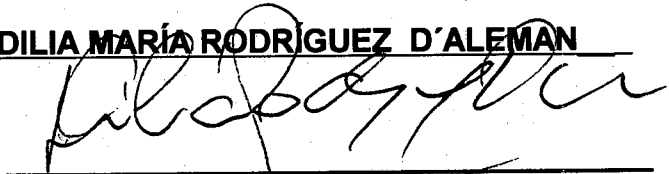
(31) Número de Solicitud

60/944,375

61/035,269

**9 Comprobante de pago No. 10-1.430 // 10-1.431 // 10-1.432 // 10-1.433 // 10-1.470 // 10-1.035 // 10-1.042 // 10-1.046
Fecha Todos de 6 de enero de 2010**

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente**NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMANFIRMA: 

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 1.430
FECHA : ENERO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002271-00000-0000

Fecha 2010-01-12 15:06:12 Dep 2020 DIR NULVASC
Lra 11 PALENTIYII Lve 378 PASLACIONAL
Act 411 PRLSLNACION Folios 292

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175684121	06/01/2010	100.325.000,00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD ?	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			500.000,00
		TOTAL :	\$ 500.000,00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

P-2401
2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 1.431
FECHA : ENERO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002271- -00000-0000

Fecha: 2010-01-12 15:06:12 Dep: 2020 DIR NUI VASCO
Tra: 11 PATENTE/IIII Lve: 378 PASSE NACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 292

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175684121	06/01/2010	100.325.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00
		TOTAL :	\$ 500.000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 1.432
FECHA : ENERO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Nº. 10-002271-00000-0000

Fecha: 2010-01-12 15:06:12 Dep: 2020 DIR. NUL. VASCO
Lm: 11 PATENTELIYH Lve: 378 FASE NACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 292

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175684121	06/01/2010	100.325.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD :	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00
		TOTAL :	\$ 500.000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 1,433
FECHA : ENERO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002271-00000-0000

Fecha: 2010-01-12 15:06:12 Dep: 2020 DIR NCO VIGIL
TOL 11 PATENTE (YII) LVE 3/8 FASU NACIONAL
ACT 411 PRESENTACION Folios: 292

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175684121	06/01/2010	100.325,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500,000.00
		TOTAL :	\$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 1,470
FECHA : ENERO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Nº. 10-002271-00000-0000

Fecha: 2010-01-12 15:06:12 Dep: 2020 DIR NUT VASCH
Dir: 11 PATENTILYII Lve: 378 FASE NACIONAL I
Art: 411 PRESENTACION Folios: 292

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175684121	06/01/2010	100,325,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	325,000.00
		TOTAL :	\$ 325,000.00

SON: TRESCIENTOS VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE:

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Nº: 000176000

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 1,035
FECHA : ENERO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Nº. 10-002271-00000-0000

Fecha: 2010-01-12 15:06:12 Dep: 2020 DIR NDI TASCOR
Dir: 11 PATENTILYH LVR: 378 PASL NACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 292

***** C O N C E D I D O *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	PANOR	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	VAL. PAGO
CLARKE MODET Y CIA. COMERCIALIZADORA	PANOR DE REGISTRO	062754387		175/64110	06/01/2010	1,035,000.00

***** C O N C E D I D O *****

CANT. REGISTRADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50000 01 01 SOLIDITUDES	20,000.00
	VALOR COMPLEMENTO TARIFA A+B ANTO	20,000.00
	TOTAL	20,000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE: _____

RECIBO DE CAJA ADJUNTO AL EXPEDIENTE Nº. _____

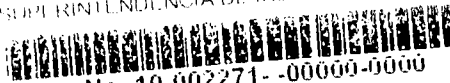
7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT. 000170100

CERTIFICACION DE EXCEDENTE N. 10
FECHA: 1 DE MARZO DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002271-00000-0000

Fecha: 2010-01-12 15:08:12 Dep. 2020 DIR. NUL. VASCO
Lra. 11 PAT. NUL. YII Lve. 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios 292

***** CANCELACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. C/C	FECHA DEP.	V. DEP.
CLARKE MOORE Y CO. DE COMISIONACION		BANCO DE BOGOTA	000754357	175624110	06/01/2010	1.000.000.00

***** CANCELACION *****

CANT. ENTREGADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50000 01 09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	2.000.00
	TOTAL :	2.000.00

SON: DOS MIL PESOS

RESPONSABLE:

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N.º _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO DE O POR O A LA LEY 1712 DE 2014
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE LA TARJETA VIGENTE Y LA TERCERA DEL
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

17 . 000176069-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 1,094
FECHA : ENERO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002271- -00000-0000

Fecha: 2010-01-12 15:06:32 Dep: 2026 DIR NUL VASCO
Tra: 11 PATENTILYII Lve: 378 FASE NACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 292

***** CANCELACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BAJOS	CUENTA	AG. PAGO	FECHA PAGO	VAL. PAGO
CLARKE MODET Y CO. DE EMBOCACIONACION	BAJOS DE DEPOSITA	060754307		175604110	06/01/2010	1.000.000.00

***** CANCELACION *****

CANT.	RENTISTAS	CENCIENTOS	TOTAL CENCIENTOS
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD	90
		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00
		TOTA	1.000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA O SER USADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

ANEXOS

INVENTORES

- 1.) **SCHEIN, Catherine, H.**
(1308 Edgewater Dr., Friendswood, Texas 77546, Estados Unidos de América);
- 2.) **CHEN, Deliang**
(2518 Goldeneve Ln., League City, Texas 77573, Estados Unidos de América);
- 3.) **GILBERTSON, Scott, R.**
(7112 Spanish Grant, Galveston, Texas 77554, Estados Unidos de América);
- 4.) **ESTRELLA-JIMENEZ, Maria**
(10533 Maple Leaf Dr., Lawrenceville, New Jersey 08648, Estados Unidos de América);
- 5.) **GAO, Jian**
(8838 Firebaugh Drive, Helotes, Texas 78023, Estados Unidos de América);
- 6.) **WALTER, Mary, A.**
(28418 Quadrille Lane, Fair Oaks Ranch, Texas 78015, Estados Unidos de América);
- 7.) **PETERSON, Johnny, W.**
(P.O. Box 1143, Dickinson, Texas 77539, Estados Unidos de América).

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INHIBIR EL FACTOR DE EDEMA Y LA
ADENILIL CICLASA

RESUMEN

Se describen moléculas pequeñas y sus derivados para el tratamiento y/o la prevención de la pérdida de fluido intestinal. También se describen métodos para usar dichas moléculas y sus derivados para tratar y/o prevenir condiciones asociadas con niveles incrementados de 3',5'-monofosfato de adenosina. Las composiciones específicas de la invención también son novedosas.

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INHIBIR EL FACTOR DE EDEMA Y LA **ADENILIL CICLASA**

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud invoca prioridad sobre la Solicitud Provisoria de los EEUU N° 60/944375, presentada el 15 de Junio de 2007, y la Solicitud Provisoria de los EEUU N° 61/035269, presentada el 10 de Marzo de 2008, ambas incorporadas en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN RELACIONADA CON LA INVESTIGACIÓN O EL DESARROLLO CON AUSPICIO FEDERAL

[0002] La presente invención se llevó a cabo con fondos provenientes de los subsidios del Gobierno de los Estados Unidos número NIAID U01AI5385802 y DAMD 170210699. Entonces, el Gobierno de los Estados Unidos tiene determinados derechos sobre la invención.

CAMPO TÉCNICO

[0003] La presente invención se relaciona en general con el tratamiento de condiciones biológicas y/o con compuestos químicos. La presente invención también se relaciona con un método para tratar condiciones causadas por niveles incrementados de 3',5'-monofosfato de adenosina, y con composiciones usadas para tratar dichas condiciones. Adicionalmente, la invención se relaciona con un método para tratar la pérdida de fluido intestinal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] La patogénesis de varias enfermedades comprende factores que incrementan la concentración de 3',5'-monofosfato de adenosina (AMPc) en los tejidos de los seres humanos y animales no humanos. En las células de mamíferos, este mediador intracelular importante se forma mediante la conversión de trifosfato de adenosina (ATP) en AMPc; donde esta última reacción es catalizada por la adenilil ciclasa. Las células bacterianas también forman AMPc con la catálisis de una versión procariótica de la adenilil ciclasa.

[0005] El incremento en la concentración de AMPc en los tejidos es el factor clave en numerosas infecciones bacterianas. Por ejemplo, las toxinas bacterianas

producidas por *Vibrio cholerae* y muchas cepas de *Escherichia coli* (ETEC) enterotoxinogénicas estimulan la adenilil ciclase de las células del epitelio intestinal, lo que evoca un incremento en los niveles intracelulares y extracelulares de AMPc (FIG. 1). La consecuencia fisiológica de este efecto es el impacto estimulador del AMPc sobre los canales de cloruro, potasio y sodio en las membranas de las células que recubren el lumen del intestino delgado. La hipersecreción de cloruro y otros iones culmina en la acumulación de agua y electrolitos en el lumen intestinal, lo que finalmente resulta en diarrea. Esto también se conoce como cólera, en el caso de *V. cholerae*, y diarrea del turista o el viajero en el caso de *Escherichia coli*.

[0006] Otras bacterias que evocan incrementos en el AMPc tisular incluyen *Bordetella pertussis*, el agente causal de la tos ferina o pertussis. Estas bacterias secretan dos proteínas bacterianas que incrementan los niveles de AMPc en el tracto respiratorio. Un factor de virulencia es una adenilil ciclase bacteriana que es tomada por las células respiratorias y convierte el ATP respiratorio en AMPc. Además, *B. pertussis* secreta la toxina de pertussis, que se une a las células respiratorias y estimula la adenilil ciclase de mamífero en las células del tracto respiratorio (Young y Collier, 2007). La significación fisiológica de la necesidad de estas bacterias de incrementar el AMPc en el tracto respiratorio no está completamente clara, pero se sabe que el AMPc inhibe la fagocitosis de las bacterias por los macrófagos ($m\phi$) y los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), lo que limitaría la protección del cuerpo contra las bacterias. Las drogas que incrementan los niveles de AMPc en los pulmones provocan la dilatación de las vías aéreas, lo que podría facilitar el acceso y la colonización de los sacos alveolares. Como el AMPc estimula la expresión de muchos genes de células de mamíferos, las proteínas formadas podrían mejorar la síntesis de receptores tisulares para bacterias y sus toxinas.

[0007] Gran parte de este edema tisular en los pacientes infectados con *B. anthracis* se atribuye a la toxina de edema de *B. anthracis*, que es una combinación del factor de edema (EF) y el antígeno protector (PA). Esta última proteína se une a las toxinas de ántrax a los receptores en las células blanco en los

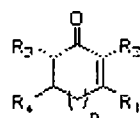
pulmones y muchos otros tejidos en el cuerpo (Firoved *et al.*, 2005; Milne *et al.*, 1995). Aunque todos estos ejemplos son infecciones bacterianas, se sabe que algunos tipos de tumores hipersecretan prostaglandinas (por ejemplo, PGE_2) que estimulan la adenilil ciclasa en las células epiteliales a lo largo del tracto intestinal para que formen cantidades excesivas de AMPc. Estos pacientes presentan una diarrea virtualmente continua. Todos los usos posibles de estas pequeñas moléculas que inhiben la adenilil ciclasa aún pueden no ser obvios, pero muchas drogas usadas en el tratamiento de pacientes con asma operan incrementando los niveles de AMPc para abrir las vías aéreas. En pacientes sobremedicados con drogas tales como teofilina, podría usarse una pequeña molécula inhibidora de adenilil ciclasa para neutralizar los niveles excesivos de AMPc. Puede haber muchos usos clínicos para las pequeñas moléculas que inhiben la adenilil ciclasa.

[0008] Como se describió con anterioridad, muchas bacterias patógenas, independientemente de su morfología celular y su patrón de agrupamiento, producen toxinas con funciones similares que comúnmente están codificadas en plásmidos. Por ejemplo, *Bacillus anthracis*, una bacteria Gram positiva que tiene forma de bacilo y forma esporas, produce dos tipos de factores que incrementan su letalidad: una cápsula de polisacáridos (Drysdale *et al.*, 2005) y dos toxinas proteicas, la toxina letal (LT) y la toxina de edema (ET). Ambas toxinas son letales cuando se inyectan en ratones, y suprimen las funciones de los macrófagos, los polimorfoneutrófilos y los linfocitos. Por consiguiente existe la necesidad de inhibidores de toxinas como coadyuvantes para los tratamientos con antibióticos. Un componente de ambas toxinas es el antígeno protector (PA), que permite el ingreso en la célula de los componentes tóxicos enzimáticos, el factor letal (LF) y el factor de edema (EF) (Abrami *et al.*, 2005). LF presenta una actividad de metaloproteasa que es específica para las proteínas MAP quinasas. Se ha identificado un inhibidor de LF, y se ha demostrado que es un coadyuvante efectivo para la terapia con antibióticos en estudios en animales (Xiong *et al.*, 2006). Este inhibidor no afecta la actividad de EF, que es una adenilil ciclasa análoga a la producida por *Bordetella pertussis* (el agente causal de la tos ferina) (Munier *et al.*, 1992; Hewlett *et al.*, 1979; Hewlett *et al.*, 1976). Estas toxinas de

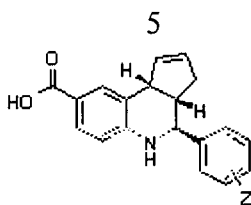
“adenilil ciclasa” (Drum *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2005) catalizan la producción intracelular de AMPc a partir de ATP (Leppa, 1982; de Rooij *et al.*, 1998; Lacy *et al.*, 2002; Lacy *et al.*, 2002). Los niveles elevados de AMPc perturban la homeostasis acuosa de la célula, lo que resulta en anormalidades en las vías de señalización intracelulares y la estimulación del canal de cloruro (Ajuha *et al.*, 2004; Ascenzi *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 2001). Esto contribuye al edema (y la dilatación) del mediastino localizado entre los lóbulos de los pulmones de los pacientes con inhalación de ántrax. Los pacientes con ántrax cutáneo comúnmente presentan edema tisular cerca de la lesión. Los inhibidores que pudieran unirse a EF y prevenir su actividad enzimática intracelular podrían reducir la severidad de las infecciones de *B. anthracis* y otras bacterias que producen toxinas similares. Los inhibidores de AMPc actualmente conocidos en la técnica son tóxicos (Soelaiman *et al.*, 2003), lo que demuestra la necesidad de la presente invención.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

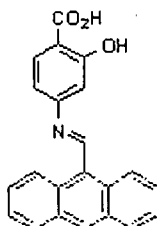
[0009] Una realización de la invención es un método para tratar y/o prevenir la pérdida de fluido intestinal en un sujeto. En una realización general, la composición comprende una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un compuesto o una sal de éste aceptable para el uso farmacéutico, que se administra al sujeto. En una realización específica, la fórmula general del compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



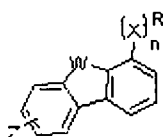
Fórmula I



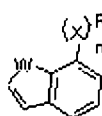
Fórmula II



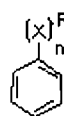
Fórmula III



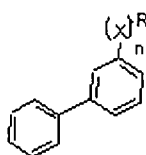
Fórmula IV



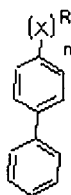
Fórmula V



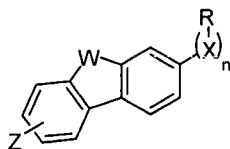
Fórmula VI



Fórmula VII



Fórmula VIII



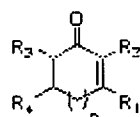
Fórmula IX,

[0010] y cualquier combinación de éstas. En realizaciones específicas de la invención, el grupo R de la fórmula general es una estructura de anillo cíclico o bicíclico; R₁ es una estructura de anillo cíclico o bicíclico; R₁' es un hidrógeno, una estructura de anillo cíclico o bicíclico; Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilanilo, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido,

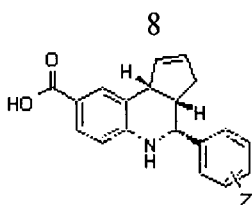
ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado; W se selecciona del grupo que consiste en CO, NH, metileno, un átomo de azufre, un átomo de oxígeno y tionilo; X es alquilo, oxígeno, un éster, una amina o una amida; y m y n son iguales o diferentes, y son 0 ó 1. En otra realización específica de la invención, R está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piranonilo, piridilo, imidazolilo, 1,8-naftiridinilo y N-óxido de piridilo. En otra realización de la invención, R está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxilámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos. En otra realización de la invención, R₁ está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxilámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o

sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos. En una realización específica de la invención, R_4 es una estructura de anillo cíclico o bicíclico, sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo. En otra realización de la invención, R_4 está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxíámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

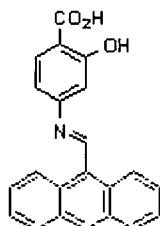
[0011] Una realización de la invención es un método para tratar o prevenir una condición asociada con niveles incrementados de 3',5'-monofosfato de adenosina en un sujeto. En una realización general, la composición comprende una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un compuesto o una sal de éste aceptable para el uso farmacéutico, que se administra a un sujeto. En una realización específica, la fórmula general del compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



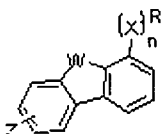
Fórmula I



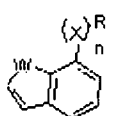
Fórmula II



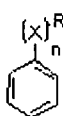
Fórmula III



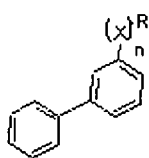
Fórmula IV



Fórmula V



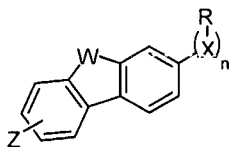
Fórmula VI



Fórmula VII



Fórmula VIII



Fórmula IX,

[0012] y cualquier combinación de éstas. En realizaciones específicas de la invención, el grupo R de la fórmula general es una estructura de anillo cíclico o bicíclico; R₁ es una estructura de anillo cíclico o bicíclico; R₁' es un hidrógeno, una estructura de anillo cíclico o bicíclico; X es alquilo, oxígeno, un éster, una amina o una amida; Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo,

arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado; W se selecciona del grupo que consiste en CO, NH, metileno, un átomo de azufre, un átomo de oxígeno y tionilo; y m y n son iguales o diferentes, y son 0 ó 1. En otra realización específica de la invención, R está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piranonilo, piridilo, imidazolilo, 1,8-naftiridinilo y N-óxido de piridilo. En otra realización de la invención, R está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos. En otra realización de la invención, R₁ está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos. En una

realización específica de la invención, R_4 es una estructura de anillo cíclico o bicíclico, sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo. En otra realización de la invención, R_4 está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxíamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

[0013] En una realización de la invención, el compuesto usado en la realización general pertenece al grupo que consiste en FIV-50, FIV-1, FIV-29, FIV-31, FIV-34, FIV-35, FIV-39, FIV-40, FIV-46, FIII-1, FII-1, FI-3, FI-1, FI-2, FIV-54, FIV-58, FIV-55, FIV-53, FIV-67, FIV-70, FIV-65, FIV-68, FIV-66, FIV-61, FIV-60, FIV-64, FIV-71, FIV-46, FIV-72, FIV-73, FIV-49, FIV-75, y cualquier combinación de éstos.

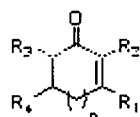
[0014] En una realización específica de la invención, el método para tratar la pérdida de fluido intestinal comprende inhibir la adenilil ciclase, el factor de edema, CTA1, o cualquier combinación de éstos. En otra realización, la pérdida de fluido intestinal es el resultado de una infección de uno o más patógenos. En una realización específica, el patógeno es *B. anthracis*, *V. cholerae*, *E. coli*, Pertussis, *Y. pestis*, o cualquier combinación de éstos. En otra realización específica, cuando el patógeno es *B. anthracis*, el método puede comprender además administrar una droga inhibidora de LT. En otra realización específica, la droga inhibidora de LT se selecciona del grupo que consiste en bestatina, captopril, adefovir, y cualquier combinación de éstas. En una realización general de la invención, la pérdida de fluido intestinal es causada por un incremento en los niveles de 3',5'-monofosfato

de adenosina en el tejido del sujeto. En una realización específica de la invención, la pérdida de fluido intestinal es causada por cáncer.

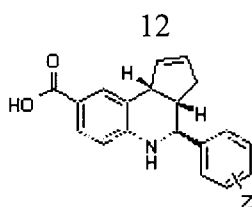
[0015] En otra realización de la invención, la composición se administra en combinación con una o más drogas adicionales. En otra realización de la invención, la droga es un antibiótico o un antiinflamatorio. En otra realización, la composición comprende un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. En otra realización de la invención, la composición se administra a través de una ruta seleccionada del grupo que consiste en alimentaria, parenteral, tópica, mucosal, por inhalación, y cualquier combinación de éstas. En una realización específica de la invención, el compuesto se administra en dosificaciones de entre 0,01 mM y 10 mM. En otra realización específica de la invención, el compuesto se administra en dosificaciones de entre 0,1 mM y 1 mM. En otra realización de la invención, el sujeto es un ser humano.

[0016] Otra realización de la invención es una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en FIV-50, FIV-1, FIV-29, FIV-31, FIV-34, FIV-35, FIV-39, FIV-40, FIV-46, FIII-1, FII-1, FI-3, FI-1, FI-2, FIV-54, FIV-58, FIV-55, FIV-53, FIV-67, FIV-70, FIV-65, FIV-68, FIV-66, FIV-61, FIV-60, FIV-64, FIV-71, FIV-46, FIV-72, FIV-73, FIV-49, FIV-75, y cualquier combinación de éstos. La invención también puede comprender uno o más de cualquiera de los compuestos anteriores, solos o combinados.

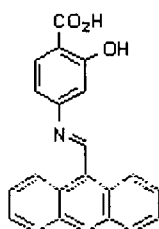
[0017] Otra realización de la invención es un conjunto de elementos para tratar y/o prevenir una condición médica directa o indirectamente, para el tratamiento la pérdida de fluido intestinal causada por niveles incrementados de 3',5'-monofosfato de adenosina en un sujeto. En una realización general, el conjunto de elementos comprende una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un compuesto o una sal de éste aceptable para el uso farmacéutico, se administra a un sujeto. En una realización específica, la fórmula general del compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



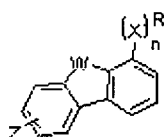
Fórmula I



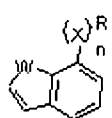
Fórmula II



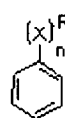
Fórmula III



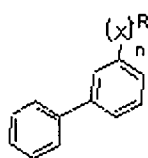
Fórmula IV



Fórmula V



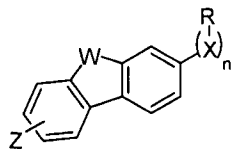
Fórmula VI



Fórmula VII



Fórmula VIII



Fórmula IX,

[0018] y cualquier combinación de éstos. En realizaciones específicas de la invención, el grupo R de la fórmula general es una estructura de anillo cíclico o bicíclico; R₁ es una estructura de anillo cíclico o bicíclico; R₁' es un hidrógeno, una estructura de anillo cíclico o bicíclico; X es alquilo, oxígeno, un éster, una amina o una amida; Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo,

arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado; W se selecciona del grupo que consiste en CO, NH, metileno, un átomo de azufre, un átomo de oxígeno y tionilo; y m y n son iguales o diferentes, y son 0 ó 1. En otra realización específica de la invención, R está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piranonilo, piridilo, imidazolilo, 1,8-naftiridinilo y N-óxido de piridilo. En otra realización de la invención, R está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxilámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos. En otra realización de la invención, R₁ está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxilámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos. En una

realización específica de la invención, R_1 es una estructura de anillo cíclico o bicíclico, sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo. En otra realización de la invención, R_1 está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos. Las realizaciones de los grupos R , R_1 , R_4 y Z pueden ser como se describió con anterioridad en otras realizaciones. En una realización específica, el conjunto de elementos comprende además una droga seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un antidiarreico y una droga inhibidora de LT. En otra realización general, el conjunto de elementos comprende además un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

[0019] En los párrafos precedentes se han descripto en términos amplios las características y las ventajas técnicas de la presente invención, con el fin de comprender mejor la descripción detallada de la invención que se presentará más adelante. Más adelante se describirán otras características y ventajas de la invención, que conforman el sujeto de las reivindicaciones de la invención. Aquellos entrenados en la técnica han de apreciar que la concepción y la realización específica descripta pueden emplearse fácilmente como una base para modificar o diseñar otras estructuras para poner en práctica los mismos propósitos de la presente invención. Aquellos entrenados en la técnica también han de saber que estas construcciones equivalentes no se apartan del espíritu y el alcance de la invención, como se los indica en las reivindicaciones adjuntas. Las nuevas

características, de las que se cree que son propias de la invención, con relación a su organización y su método de operación, junto con otros objetos y ventajas, han de comprenderse mejor con referencia a la siguiente descripción, cuando se la considere en combinación con las figuras adjuntas. Sin embargo, ha de comprenderse explícitamente que cada una de las figuras se proporciona solamente para propósitos ilustrativos y descriptivos, y no constituye una definición de los límites de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020] Con el objeto de comprender mejor la presente invención, a continuación se hará referencia a las siguientes descripciones, tomadas en combinación con los dibujos adjuntos.

[0021] En la FIG. 1 se ilustra un esquema del mecanismo de la acción patogénica de *B. anthracis*.

[0022] En la FIG. 2 se ilustra un esquema del mecanismo de acción de la toxina de cólera de *Vibrio cholerae*.

[0023] En la FIG 3 se ilustra una comparación de los sitios metálicos en dos estructuras cristalinas de EF de ántrax *B. anthracis* (Designaciones de la Base de Datos de Proteínas (PDB): 1K90, 1XFV), en la estructura cristalina de *E. Pertussis* (1ZOT) y la estructura cristalina de AC (1CJV) de mamífero: en las FIGS. 3A y E se ilustra el sitio activo de EF (de 1K90) con 1 metal (Yb^{3+}). Los residuos Asp491, Asp493, His577 de EF y el α -fosfato del 3'-dATP quelan el ión metálico. En las FIGS. 3B y F se ilustra el sitio activo de EF (de 1XFV), que presenta dos iones Mg con una separación de 4,32 Å. Mg901 quela los residuos Asp491, Asp493 y His577 de EF, mientras que Mg101 quela los oxígenos de los tres fosfatos de 3'-dATP. En las FIGS. 3C y G se ilustra el sitio activo de *B. Pertussis* (de 1ZOT), que presenta tres iones Mg. Mg902 interactúa con Asp188. Mg902 interactúa con el α -fosfato de EMA. Mg901 quela los residuos Asp188 y Asp190, y el α -fosfato EMA. En las FIGS. 3D y H se ilustra el sitio activo de la adenilil ciclasa de mamífero (de 1CJV) con dos iones metálicos (Zn y Mg). El ión Mg quela los fosfatos α , β y γ de 2'3'-ddATP, Asp396 y Asp440. El ión Zn quela los α -fosfatos de 2'3'-ddATP, Asp396 y Asp440.

[0024] En la FIG 4 se ilustran las estructuras de 3'dATP, 2'3'-ddATP, EMA y PGE₂-imidazol.

[0025] En la FIG. 5 se ilustra un ejemplo de un farmacóforo basado en un fragmento que puede usarse con el programa UNITY en Sybyl para realizar una búsqueda 3-D entre los más de 250000 compuestos en la base de datos NCI.

[0026] En la FIG. 6A se ilustran los compuestos más importantes obtenidos en el análisis de la base de datos NCI con UNITY (las cifras debajo de la estructura representan el código NCI/la calificación FlexX). En la FIG 6 B se ilustran ejemplos de fragmentos basados en estos compuestos principales. Estos fragmentos se usaron para realizar búsquedas en la base de datos 2-D ZINC.

[0027] En la FIG. 7 se ilustra el esquema para analizar bibliotecas de compuestos para seleccionar nuevos inhibidores de EF.

[0028] En la FIG. 8 se ilustra CTA1 (dominio superior) y ARG (dominio inferior) para diseñar inhibidores selectivos para la toxina del cólera. Se ilustra NAD anclado en CTA y GTP anclado en ARF, en los sitios activos.

[0029] En la FIG. 9 se ilustra NAD⁺ anclado en el sitio activo de CTA1.

[0030] En la FIG. 10 se ilustra el sitio activo de EF de ántrax (PDB 1K90) y fragmentos usados para realizar una búsqueda UNITY en la base de datos NCI. En la FIG. 10A se ilustra el sitio activo de EF y las interacciones de enlaces hidrógeno entre los residuos en el sitio activo y el sustrato 3'dATP. En la FIG. 10B se ilustra la localización de los mejores fragmentos de unión en el sitio activo. F1: anillo de fenilo; F2, F3, y F4: grupos carboxilo; F5: grupo amonio. FIG. 10C. Superposiciones de los fragmentos y el análogo de sustrato en la estructura cristalina, 3'dATP. En la FIG. 10D se ilustra un ejemplo de la combinación de fragmentos que contiene dos grupos carboxilo (F2 y F3) y un anillo de fenilo (F1) para un farmacóforo usado en una búsqueda UNITY.

[0031] En la FIG 11 se ilustra un diagrama de flujo donde se ilustra el esquema usado para seleccionar el conjunto final de 19 compuestos entre aproximadamente 10000 aciertos iniciales en la base de datos ZINC.

[0032] En la FIG 12 se ilustran los resultados AutoDock de inhibidores y sustratos conocidos del factor de edema, incluyendo tres formas de una descripción previa

de inhibidores basados en nucleótidos (Soleiman), en combinación con 19 compuestos seleccionados. Vale destacar que, de manera consistente con sus calificaciones de anclaje mediocres, los compuestos Soleiman tienen una capacidad relativamente pobre de inhibición de EF.

[0033] En la FIG. 13 se ilustran cuatro compuestos con sus valores de IC₅₀ correspondientes.

[0034] En la FIG. 14 se ilustra una comparación de la capacidad de inhibir la producción AMPc inducida por la toxina del edema (EdTx) de tres compuestos seleccionados con el PGE₂-imidazol. Se incubaron células RAW 264.7 con diversas concentraciones de PGE₂-imidazol o inhibidores, y luego se las trató con PA 30 nM y EF 7 nM durante 4 horas. Se agregó IBMX (50 µM, inhibidor de la fosfodiesterasa) a cada cavidad. Cada muestra se procesó por triplicado. Vale destacar que los tres compuestos fueron más activos que el PGE₂-imidazol en este ensayo. Los compuestos son 1) FIII-1, 2) FII-1 y 3) FIV-50 en la Tabla 1.

[0035] En la FIG. 15 se ilustra una comparación de los niveles de AMPc obtenidos en un ensayo de ELISA con células a las que se les administró factor de edema, entre células tratadas con DC-5 y compuestos adicionales. En las figuras con dos gráficos se ilustran dos ensayos independientes a pH diferentes. El compuesto adicional en la FIG. 15A es FIV-61; en la FIG. 15B, es FIV-39; en la FIG. 15C, es FIV-67; en la FIG. 15D, es FIV-65; en la FIG. 15E, es FIV-70; en la FIG. 15F, es FIV-68; en la FIG. 15G, es FIV-66; en la FIG. 15H, es FIV-64; en la FIG. 15I, es FIV-54; en la 15J, es FIV-35; en la 15K, es FIV-59; en la FIG. 15L, es FIV-55; en la FIG. 15M, es FIV-58; en la FIG. 15N, es FIV-53; en la FIG. 15O, es FIV-60.

[0036] En la FIG. 16 se ilustra una comparación de los niveles de AMPc obtenidos en un ensayo de ELISA con células a las que se les administró factor de edema, entre DC-5 y un compuesto adicional. El pH de los compuestos fue de aproximadamente 7,8, y la curva se ajustó en función del logaritmo normal acumulativo para todos los compuestos. El compuesto adicional en la FIG. 16A es FIV-46; en la FIG. 16B, es FIV-71; en la FIG. 16C, es FIV-72; en la FIG. 16D, es FIV-73; en la FIG. 16E, es FIV-75; y en la FIG. 16F, es FIV-35.

[0037] En la FIG. 17 se ilustran las estructuras de ejemplos de compuestos diseñados modificando FIV-50 y FII-1 para alterar la actividad.

[0038] En la FIG. 18 se ilustran ejemplos de compuestos diseñados para que sean más solubles y menos tóxicos, y su mutagenicidad calculada con un método computacional.

[0039] En la FIG. 19 se ilustran ejemplos de derivados FIV-50 con actividades < 20 μ M.

[0040] En la FIG. 20 se demuestra el anclaje del inhibidor PGE₂-imidazol en 1K90 y 1XFV con tres programas de anclaje, mediante la comparación de la posición con mejor calificación con la posición experimental de 3'dATP. La FIG. 20A es PGE₂-imidazol anclado en 1K90 con AutoDock; la FIG. 20B es PGE₂-imidazol anclado en 1K90 con LigandFit/Cerius2; la FIG. 20C es PGE₂-imidazol anclado en 1K90 con FlexX; la FIG. 20D es PGE₂-imidazol anclado en 1XFV con AutoDock; la FIG. 20E es PGE₂-imidazol anclado en 1XFV con LigandFit/Cerius2; la FIG. 20F es PGE₂-imidazol anclado en 1XFV con FlexX.

[0041] En la FIG. 21 se comparan las calificaciones de anclaje de los estados desprotonados y protonados de 25 compuestos analizados de las bases de datos NCI y ZINC, y 4 análogos de ATP, donde los inhibidores de EF más activos en la búsqueda están marcados con *. Las calificaciones de anclaje para otros sustratos e inhibidores de EF se indican con los siguientes símbolos: #: el inhibidor de CiaA EMA. %: ATP; y: 3'dATP; \$: 2'3'ddATP. En la FIG 21A se ilustran los compuestos anclados en 1K90 con AutoDock. En la FIG 21B se ilustran los compuestos anclados en 1XFV con AutoDock. En la FIG 21C se ilustra los compuestos anclados en 1CJV con AutoDock.

[0042] En la FIG. 22 se ilustra la conformación AutoDock de menor energía del KM011 en el sitio activo EF. Vale destacar que el grupo metoxilo está cerca del ión metálico, y que ambos anillos apunta a la cara interna del sitio activo. Este es el único compuesto en la serie que hace esto. En la FIG. 22B 1B se ilustra la unión del otro lado de la hendidura, con una superposición de la posición del análogo ATP en aras de la claridad.

[0043] En la FIG. 23 se ilustra una superposición de las posiciones de anclaje de algunos ejemplos de compuestos. En este caso, todos los compuestos tienen un carbonilo que apunta al ión metálico, pero los anillos adicionales apuntan al frente del sitio activo.

[0044] En la FIG. 24 se ilustra un ensayo de concentración de AMPc extracelular llevado a cabo con la toxina del cólera y los compuestos PEG-2-imidazol y FI-3.

[0045] En la FIG. 25 se ilustra un ensayo de concentración de AMPc extracelular llevado a cabo con la toxina del cólera y los compuestos PEG-2-imidazol y FI-1.

[0046] En la FIG. 26 se ilustra un ensayo de citotoxicidad de LDH para FI-3.

[0047] En la FIG. 27 26 se ilustra un ensayo de citotoxicidad de LDH para FI-1.

[0048] En la FIG. 28 26 se ilustra un ensayo de citotoxicidad de LDH para FI-2.

[0049] En la FIG. 29 se ilustra un ensayo de concentración de AMPc extracelular llevado a cabo con la toxina del cólera donde se comparan los compuestos PEG-2-imidazol, FII-1 y FIV-50.

[0050] En FIG. 30 se ilustra un ensayo de concentración de AMPc extracelular llevado a cabo con EF donde se comparan FIII-1, FIV-50 y FII-1.

[0051] En la FIG. 31 se ilustra un ensayo de citotoxicidad de LDH para FIV-50.

[0052] En la FIG. 32 se ilustra un ensayo de citotoxicidad de LDH para FIII-1, FIV-50, y FII-1.

[0053] En la FIG. 33 se ilustra un esquema de los métodos usados en los experimentos con el modelo de ETEC en ratón.

[0054] En la FIG. 34 se ilustra la CFU/el segmento para una dosis específica de FIV-50 en el modelo de ETEC murino.

[0055] En la FIG. 35 se ilustra el peso del intestino para dosis determinadas de FIV-50 en el modelo de ETEC murino.

[0056] En la FIG. 36 se ilustra la relación entre el peso y la longitud para una dosis determinada de FIV-50 en el modelo de ETEC murino.

[0057] En la FIG. 37 se compara el tratamiento en el modelo de ETEC murino con PGE₂-imidazol y FIV-50. En la FIG. 37A se ilustra el peso del intestino. En la FIG. 37B se ilustra la relación entre el peso y la longitud.

[0058] En la FIG. 38 se ilustra el conteo de bacterias en el modelo de ETEC murino con distintas dosificaciones de FIV-50.

[0059] En la FIG. 39 se ilustra la histología de los intestinos murinos en el modelo de ETEC y con un tratamiento con FIV-50 o PGE₂-imidazol.

[0060] En la FIG. 40 se presenta una microscopía electrónica del intestino de un ratón CD-1 sometido a un tratamiento con PGE₂-imidazol.

[0061] En la FIG. 41 se presenta una microscopía electrónica 32000X del intestino de un ratón CD-1 sometido a un tratamiento con PGE₂-imidazol.

[0062] En la FIG. 42 se presenta una microscopía electrónica 64000X del intestino de un ratón CD-1 sometido a un tratamiento con PGE₂-imidazol.

[0063] En la FIG. 43 se presenta una microscopía electrónica del intestino de un ratón CD-1 sometido a un tratamiento con PGE₂-imidazol.

[0064] En la FIG. 44 se presenta una microscopía electrónica del intestino de un ratón CD-1 sometido a un tratamiento con FIV-50.

[0065] En la FIG. 45 se ilustra peso/longitud en función del transcurso del tiempo para un ratón tratado con FIV-50.

[0066] En la FIG. 46 se ilustran conteos de bacterias en el intestino de los ratones tratados

[0067] En la FIG. 47 se ilustra el promedio de peso/longitud en el intestino de ratones tratados con una dosis inicial de FIV-50 oral versus i.p.

[0068] En la FIG. 48 se ilustra el conteo de bacterias en el intestino de un ratón (ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EPEC: *E. coli* enteropatogénica; EAEC: *E. coli* enteroagregativa).

[0069] En la FIG. 49 se ilustra la velocidad de crecimiento de las bacterias en LB +/-FIV-50 (cepas adicionales).

[0070] En la FIG. 50 se ilustra el efecto de FIV-50 sobre la adhesión de las bacterias a células HeLa (ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EPEC: *E. coli* enteropatogénica; EAEC: *E. coli* enteroagregativa, *S. typhimurium*).

[0071] En la FIG. 51 se ilustra el efecto de FIV-50 sobre la adhesión de las bacterias a células HeLa (ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; EAEC: *E. coli* enteroagregativa, *Vibrio cholerae*).

[0072] En la FIG. 52 se ilustra el efecto de FIV-50 sobre la adhesión de las bacterias a células HeLa (ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; *Vibrio cholerae*; *Shigella flexneri*).

[0073] En la FIG. 53 se ilustra el efecto de FIV-50 sobre la adhesión de las bacterias a células Caco-2 (ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EPEC: *E. coli* enteropatogénica; EAEC: *E. coli* enteroagregativa, *Salmonella typhimurium*).

[0074] En la FIG. 54 se ilustra el efecto de FIV-50 sobre la adhesión de las bacterias a células Caco-2 (ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*).

[0075] En la FIG. 55 se ilustran conteos de bacterias en ratones infectados con ETEC.

[0076] En la FIG. 56 se demuestra el efecto del PGE₂-imidazol sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0077] En la FIG. 57 se ilustra el efecto de la pre-incubación con PGE₂-imidazol sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0078] En la FIG. 58 se demuestra el efecto de FI-3 sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0079] En la FIG. 59 se demuestra el efecto de la pre-incubación con FI-3 sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0080] En la FIG. 60 se demuestra el efecto de FI-2 sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0081] En la FIG. 61 se ilustra el efecto de la pre-incubación con FI-2 sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0082] En la FIG. 62 se ilustra una visualización de los intestinos de ratones antes y después de un tratamiento con FI-2. En la FIG. 62A se ilustra la situación correspondiente a la ausencia de tratamiento (antes de la cirugía); en la FIG. 62B se ilustra un ratón pre-tratado con FI-2 i.p. durante 4 horas; en la FIG. 62C se ilustra un ratón pre-tratado con FI-2 post-ligación; en la FIG. 62D se ilustra el ratón control tratado con DMSO al 1% durante 4 horas; en la FIG. 62E se ilustra el ratón control tratado con DMSO al 1% durante 7 horas; en la FIG. 62F se ilustra un ratón

tratado con FI-2 i.p. durante 5,5 horas; en la FIG. 62G se ilustra un ratón pre-tratado con FI-2 i.p. durante 7 horas; en la FIG. 62H se ilustra una ligación de trompas en un ratón sometido a un tratamiento con CT; 3 horas después de la cirugía; en la FIG. 62I se ilustra un ratón pre-tratado con FI-2 i.p. durante 4 horas, y luego una ligación de trompas con CT/FI-2; 3 horas después de la cirugía.

[0083] En la FIG. 63 se demuestra el efecto de FI-1 sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0084] En la FIG. 64 se ilustra el efecto de FIV-50 sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0085] En la FIG. 65 se demuestra el efecto de la pre-incubación con FIV-50 sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0086] En la FIG. 66 se ilustra el efecto de la pre-incubación con FII-1 sobre la pérdida de fluido intestinal en ratones durante la infección experimental con CT.

[0087] En la FIG. 67 se ilustra un esquema con un aducto covalente formado como intermediario.

[0088] La FIG. 68 es un esquema donde se ilustra el uso de la reacción de Suzuki para sintetizar compuestos.

[0089] En la FIG. 69 se ilustra una cantidad de compuestos simples que presentan actividad de inhibición de adenilil ciclasa.

[0090] En la FIG. 70 se ilustran aductos de histidina e imidazol de prostaglandina- E_2 .

[0091] En la FIG. 71 es un esquema donde se ilustra una reacción de un solo paso para preparar vinil bromo enonas.

[0092] En la FIG. 72 se ilustra un método de síntesis para preparar el compuesto FIV-49.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Ejemplos de definiciones

[0093] Para cumplir con la convención legal establecida desde hace tiempo para las publicaciones de patentes, los términos “un” y “uno”, cuando se usan en esta memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, en combinación con el término “que comprende”, denotan “uno o más.” Algunas realizaciones de la

invención pueden consistir o consistir esencialmente en uno o más elementos, pasos de métodos, y/o métodos de la invención. Se contempla la posibilidad de implementar cualquier método o composición descrita en la presente documentación con relación a cualquier otro método o composición descrita en la presente documentación.

[0094] La frase "cantidad eficaz para el uso terapéutico", como se la usa en la presente documentación, hace referencia a la cantidad de un compuesto, un material o una composición que comprende un compuesto de la presente invención que es efectiva para producir un efecto terapéutico deseado, por ejemplo, el tratamiento (es decir, la prevención y/o la mejora) de la pérdida de fluido intestinal o una condición asociada con el AMPc, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. En una realización, la cantidad eficaz para el uso terapéutico es suficiente para reducir o eliminar al menos un síntoma. Aquél entrenado en la técnica ha de reconocer que una cantidad puede considerarse eficaz para el uso terapéutico aún si la condición no es erradicada por completo, sino que es mejorada en forma parcial. Por ejemplo, la dispersión de la condición puede ser detenida o reducida, un efecto colateral de la condición puede ser reducido parcialmente o eliminado completamente, y semejantes.

[0095] La frase "aceptable para el uso farmacéutico" se emplea en la presente documentación para hacer referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación, que dentro del juicio médico reconocido, son apropiados para usar en contacto con los tejidos de los seres humanos y los animales, sin una toxicidad, una irritación o una respuesta alérgica excesiva, u otro problema o complicación, de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable.

[0096] Como se la usa en la presente documentación, la "afinidad de unión" hace referencia a la fuerza de una interacción entre dos entidades, tal como una interacción entre proteínas. La afinidad de unión se conoce algunas veces como K_a , o constante de asociación, que describe la probabilidad de que dos entidades separadas se unan. En general, la constante de asociación se determina con una

variedad de métodos donde se mezclan dos entidades separadas, se separa la porción no unida de la porción unida, y se miden las concentraciones de las porciones no unidas y unidas. Aquellos entrenados en la técnica han de saber que hay una variedad de métodos disponibles para medir las constantes de asociación. Por ejemplo, las porciones no unidas y unidas pueden separarse unas de otras, por ejemplo, por adsorción, precipitación, filtración en gel, diálisis o centrifugación. La medición de las concentraciones de las porciones no unidas y unidas puede realizarse, por ejemplo, midiendo la radiactividad o la fluorescencia. Como alternativa, la afinidad de unión puede medirse con simulaciones dinámicas de anclaje o moleculares.

[0097] Como se lo usa en la presente documentación, un "sujeto" es un individuo apropiado para el método de la presente invención. Un sujeto puede ser un mamífero, y en realizaciones específicas, es cualquier miembro de la clase de vertebrados superiores Mammalia, que incluye los seres humanos y se caracteriza por el nacimiento de crías vivas, el pelo corporal y la presencia de glándulas mamarias en las hembras, glándulas que secretan leche para alimentar a la cría. Adicionalmente, los mamíferos se caracterizan por su capacidad de mantener una temperatura corporal constante, a pesar de las condiciones climáticas cambiantes. Los ejemplos de mamíferos son los seres humanos, los gatos, los perros, las vacas, los ratones, las ratas y los chimpancés. Los sujetos también pueden conocerse como "pacientes" o "individuos".

[0098] El término "tratamiento" hace referencia a cualquier proceso, acción, aplicación, terapia, o semejantes, donde a un sujeto, incluyendo un ser humano, se le ofrece una ayuda médica para mejorar su condición, o uno o más síntomas asociados con una condición, directa o indirectamente.

[0099] El término "cáncer", como se lo usa en la presente documentación, se define como un nuevo desarrollo de tejido que comprende una multiplicación descontrolada y progresiva. En una realización de la invención, el cáncer resulta en una pérdida de fluido intestinal incrementada. En otra realización de la invención, el cáncer provoca niveles incrementados de AMPc.

[0100] Como se lo usa en la presente documentación, el término “reducir” hace referencia a una disminución en la pérdida de fluido intestinal, una respuesta inflamatoria, etcétera, en comparación con la situación donde no se aplica el tratamiento con el compuesto de la presente invención. Por ende, aquellos entrenados en la técnica han de poder determinar el alcance de la reducción de cualquiera de los síntomas y/o las condiciones asociadas con la pérdida de fluido intestinal o una condición relacionada con el AMPc donde el sujeto ha recibido el tratamiento de la presente invención, en comparación con la misma condición, pero sin tratamiento, y/u otro tipo de situación que pudiera ser el resultado de la ausencia de intervención.

[0101] El término “prevenir”, como se lo usa en la presente documentación, denota minimizar, reducir o suprimir el riesgo de desarrollo de un estado de enfermedad o parámetros relacionados con el estado de la enfermedad, su progreso u otras condiciones anormales o perjudiciales.

[0102] Como se lo usa en la presente documentación, el término “inhibir” hace referencia a la capacidad del compuesto de bloquear, bloquear parcialmente, interferir, disminuir, reducir o desactivar una proteína, por ejemplo, un factor de edema. Por lo tanto, aquellos entrenados en la técnica han de comprender que el término inhibición abarca una pérdida completa y/o parcial de la actividad de una proteína. La actividad de una proteína puede ser inhibida por la unión de un compuesto al sitio activo, o por otros medios, tal como mediante la desactivación de una segunda proteína que activa la primera proteína inhibida. Por ejemplo, una pérdida completa y/o parcial de actividad del factor de edema puede estar indicada por una disminución en los niveles de AMPc, una disminución en el crecimiento bacteriano, o por ejemplo, la adhesión, la inhibición de la detección de quórum, la disminución de la diarrea o el flujo de fluido hacia el intestino, la disminución de la menor pérdida de peso, la temperatura después de la infección y/o la mortalidad.

II. Ejemplos de métodos para diseñar compuestos

[0103] Un objetivo del diseño racional de drogas es producir análogos estructurales de compuestos con actividad biológica u otros efectores de los que se esperaría que se unieran a un sitio o una superficie biológica dada, por

ejemplo. Con la creación de estos análogos, es posible concebir drogas que sean más activas o estables que las moléculas naturales, que tengan una susceptibilidad diferente a la alteración o puedan afectar la función de otras moléculas diversas. En un abordaje, sería posible generar una estructura tridimensional para la proteína, o un fragmento de ésta. Esto se lograría por cristalografía de rayos X, modelado por computadora o una combinación de ambos abordajes. En un abordaje, pueden identificarse compuestos de importancia de forma similar. Un abordaje alternativo comprende el reemplazo al azar de grupos funcionales en la proteína, y la determinación del efecto resultante sobre la función.

[0104] Por consiguiente, es posible diseñar drogas que tienen una actividad biológica potenciada y mejorada, por ejemplo, un efecto antidiarreico, en comparación con una estructura inicial de la invención. Además, el conocimiento de las características químicas de estos compuestos permite realizar predicciones de las relaciones de estructura-función con el uso de computadoras.

III. Condiciones asociadas con el incremento del AMPc

[0105] Las realizaciones generales de la invención son el tratamiento y/o la prevención de condiciones asociadas con el incremento del AMPc. Aquellos entrenados en la técnica han de conocer las condiciones que están asociadas con el incremento del AMPc; sin embargo, más adelante se detallarán ejemplos de condiciones. En algunas realizaciones de la invención, la condición relacionada con el AMPc está asociada con la infección de un patógeno. En realizaciones específicas, el patógeno es *E. anthracis*, *V. cholerae*, *E. coli*, Pertussis, *Y. pestis*, o cualquier combinación de éstos. En otras realizaciones de la invención, los niveles incrementados de AMPc están asociados con un cáncer o un tumor. En otras realizaciones específicas de la invención, los niveles incrementados de AMPc están asociados con determinadas drogas.

A. **Adenilil ciclase y AMPc**

[0106] La adenilil ciclase convierte ATP en AMPc, un segundo mensajero intracelular crucial para una variedad de funciones celulares cuya concentración se altera en respuesta a una variedad de estímulos ambientales. La regulación de

la adenilil ciclase de los mamíferos está mediada por las proteínas G, que sirven para unir muchos receptores superficiales a proteínas efectoras en la membrana plasmática. Se han desarrollado ensayos enzimáticos específicos para diversas toxinas que afectan directamente la actividad de la adenilil ciclase, tales como la toxina pertussis y el EF de ántrax, y aquellas que la afectan indirectamente, tales como la toxina del cólera. La toxina del cólera también tiene efectos estimulatorios en la adenilil ciclase de las células intestinales (Peterson *et al.*, 1983; Peterson *et al.*, 1988A; Peterson *et al.*, 1988B; Peterson *et al.*, 1989; Rabbani *et al.*).

[0107] Recientemente, se ha desarrollado nuevos ensayos enzimáticos *in vitro*, libres de células y basados en células, para determinar la actividad de adenilil ciclase del EF, y se los ha usado para detectar inhibidores (por ejemplo, FIV-50, PGE2-L-histidina y PGE2-imidazol) que previenen los incrementos en el AMPc intracelular y el fluido de edema en el mediastino, la cavidad torácica y otros tejidos. En el intestino y los pulmones, los niveles elevados de AMPc en las células epiteliales estimulan la secreción de Cl⁻. El transporte neto de electrolitos hacia el exterior de las células resulta en un gradiente osmótico transepitelial que provoca el flujo de agua desde las células hacia las áreas intersticiales. Aunque está claro que los canales de cloruro pueden estar regulados por protein quinasas dependientes de AMPc, en estudios previos no se han identificado drogas que regulen negativamente la adenilil ciclase, ni se ha concebido este potencial como una estrategia para controlar enfermedades tales como el ántrax. Aunque estas isoformas de la adenilil ciclase de los mamíferos están reguladas uniformemente por las proteínas G, el patrón de expresión y otras propiedades de regulación de las nueve isoformas principales de la AC varían ampliamente, lo que resulta en patrones distintivos con especificidad celular y tisular de la respuesta de AC. Las adenilil ciclasas bacterianas secretadas (por ejemplo, EF de *B. anthracis* EF y AC de *B. pertussis*) no están reguladas por proteínas G ni están unidas a membranas. Los genes de algunas isoformas de AC de mamíferos, incluyendo AC4, AC7 y AC9, se expresan en una amplia variedad de tejidos; sin embargo, otras isoformas de AC tienen una distribución más restringida en los tejidos (Simonds, 1999; Patel *et al.*, 2001; Hanoune y Defer, 2001; Sunahara *et al.*, 1998). Por ejemplo, AC1 y

AC8 solamente se hallan en tejido neural, mientras AC5 se expresa predominantemente en corazón y cerebro (Simonds, 1999).

B. Ántrax

[0108] El agente etiológico del ántrax es *B. anthracis*, una bacteria bacilar Gram positiva de gran tamaño que forma esporas bajo condiciones ambientales desfavorables (por ejemplo, el agotamiento de los nutrientes). Las infecciones de *B. anthracis* se manifiestan como ántrax cutáneo, intestinal o por inhalación. La mayoría de las infecciones naturales son de tipo cutáneo, debido al contacto con restos orgánicos o productos contaminados con *B. anthracis*. La forma más severa y el tipo más probable de infección que puede resultar del contacto con esporas aerosolizadas de *B. anthracis* es el ántrax por inhalación, que comienza abruptamente como un síndrome similar a la influenza, a lo que sigue una fiebre elevada y un dolor en el pecho, que progresa rápidamente hasta una enfermedad hemorrágica sistémica con 80-100% de mortalidad, a menos que se la trate rápidamente con antibióticos (Brachman, 1972). El abordaje tradicional para controlar el ántrax ha sido prevenir la infección por vacunación, cuando sea posible, o prevenir la extensión del crecimiento bacteriano mediante la administración de antibióticos después de la infección. Friedlander *et al.* (Friedlander *et al.*, 1993) informaron que varios regímenes de antibióticos (por ejemplo, penicilina, ciprofloxacina y doxiciclina), administrados a monos partir del día posterior a la exposición a una dosis letal de *B. anthracis*, proporcionaron una protección completa durante los 30 días del tratamiento. Cada antibiótico proporcionó una protección a largo plazo significativa una vez terminada la administración de las drogas (70-90%), mientras que los animales tratados con antibióticos que fueron vacunados de forma concomitante recibieron una protección de 100%. Sin embargo, el tratamiento con antibióticos no es suficientemente efectivo para tratar las formas de inhalación de la enfermedad después del inicio de los síntomas. La tasa de mortalidad preocupantemente alta para las víctimas humanas recientes, aún con la aplicación de un tratamiento en un hospital, ilustró la necesidad de una mejor terapia posterior a la infección. Además de proporcionar una cura posible para los pacientes con ántrax por

inhalación avanzado, las drogas inhibitoras que bloquean la acción de EF y LF pueden resultar valiosas para reducir la virulencia de las células de *B. anthracis* que germinan a partir de esporas en los pulmones una vez completo el tratamiento con antibióticos.

[0109] La virulencia de *B. anthracis* depende de los plásmidos pXO1 y pXO2, que codifican los genes (Leppla, 2000) de dos tipos de productos extracelulares, la toxina del ántrax y una cápsula anti-fagocítica de ácido poli-gamma-D-glutámico (Brossier *et al.*, 2000). Los componentes de la toxina del ántrax, codificados por genes no contiguos en el plásmido pXO1, son el factor de edema (EF, 89 kDa), el factor letal (LF, 90 kDa) y el antígeno protector (PA, 83 kDa). Los anticuerpos contra el antígeno protector (PA), que se une a los componentes de la toxina en los receptores celulares y facilita el ingreso de la toxina, protegen a los animales de la infección, lo que indica que el ántrax está clasificado correctamente como una enfermedad mediada por toxinas; sin embargo, la bacteremia y la sepsis son facetas muy importantes de estas infecciones (Leppla, 2000). Recientemente, se informó que el anticuerpo monoclonal anti-PA reducía la diseminación de *B. anthracis* desde los pulmones hacia la sangre y otros órganos (Peterson *et al.*, 2007). El LF es una metaloproteasa de Zn^{++} que puede destruir la actividad catalítica de varias protein quinasas mediadas por mitógenos, incluyendo MAPKK1, MAPKK2, MAPKK3b, MAPKK4, MAPKK5b y MAPKK7b (Leppla, 2000; Vitale *et al.*, 2000; Pellizzari *et al.*, 1999; Vitale *et al.*, 1998; Pellizzari *et al.*, 2000), y se sabe que dos inhibidores de proteasas (por ejemplo, bestatina, captopril) protegen a los macrófagos de la toxina letal (LeTx) *in vitro* (Inglesby, 1999). Es importante destacar que Merck ha desarrollado un inhibidor potente, *Iffi*, que puede tener un beneficio terapéutico en el ántrax por inhalación (Cummings *et al.*, 2002; Shoop *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2006). El componente de PA une los componentes EF o LF a las membranas celulares y transloca los complejos hacia el interior de las células eucariotas. Por ende, el componente de PA representa el dominio de unión para EF y LF. En el ántrax por inhalación, las esporas son inhaladas profundamente hacia el interior de los pulmones, donde germinan y dan lugar a células vegetativas de división rápida. La cápsula antifagocítica protege a los

bacilos de ántrax de la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares. El mecanismo patogénico de EF y LF se ilustra en la FIG. 1. EdTx y LeTx son factores de virulencia cruciales en las infecciones de *B. anthracis* (Brossier *et al.*, 2000; de Vos, 1994; Leppla, 2000). Erwin *et al.* (Erwin *et al.*, 2001) observaron que LeTx suprime la producción de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF α) por los macrófagos estimulados por LPS. Se cree que este efecto tóxico sobre la función de los macrófagos en la fagocitosis y la eliminación de *B. anthracis* en los pulmones y el mediastino durante el ántrax por inhalación es muy importante en la patogénesis de esta enfermedad. El EF es una adenilil ciclase dependiente de calmodulina (Leppla, 2000) que convierte trifosfato de adenosina (ATP) en 3',5'-monofosfato de adenosina (AMPc). A pesar de los nombres de toxina letal y toxina de edema, estas toxinas proteicas provocan la muerte en ratones (Milne *et al.*, 1995).

[0110] Como se mencionó con anterioridad, la toxina del ántrax producida por *Bacillus anthracis*, el agente causal del ántrax, consiste en tres proteínas: el factor letal (LF), el antígeno protector (PA) y el factor de edema (EF). El trabajo conjunto de estas proteínas es el responsable de la virulencia asociada con las infecciones de ántrax por inhalación que, de no ser tratadas rápidamente, comúnmente son fatales (Brachman, 1972). Individualmente, las tres proteínas no son tóxicas, pero la combinación de las formas PA y LF forma la toxina letal (LT), que provoca la muerte cuando se inyecta en animales experimentales (Brossier *et al.*, 2000). La combinación de PA y EF forma la toxina de edema (ET), que produce edema tisular en el sitio de la infección. Las toxinas de edema y letal tienen una acción sinérgica contra la inmunidad innata del huésped. Se ha demostrado que la supresión del gen de EF o LF resulta en una reducción de la virulencia de las bacterias de ántrax (Brossier *et al.*, 2000). Como EF es una adenilil ciclase, se cree que la función de la toxina de edema en la patogénesis es la alteración de la función de los fagocitos. Por esta razón, las pequeñas moléculas inhibidoras de EF pueden cumplir una función en el tratamiento de las infecciones de ántrax por inhalación, así como otras enfermedades que comprenden edema debido a una producción incrementada de AMP cíclico.

[0111] El factor de edema (EF), una toxina de adenilil ciclasa extracelular dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (Drum *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2005) que es producida por *Bacillus anthracis*, cataliza la producción intracelular de AMPc a partir de ATP (de Rooij *et al.*, 1996; Lacy *et al.*, 2002; Leppla *et al.*, 1982). La hinchazón del tejido causada por el incremento en la producción de AMPc contribuye a la letalidad de las infecciones de ántrax. Los niveles elevados de AMPc perturban la homeostasis acuosa de la célula, lo que resulta en anomalías en las vías de señalización intracelular y la estimulación de los canales de cloruro (Ajuja *et al.*, 2004; Ascenzi *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 2001). Si bien el edema es difícil de observar directamente en las células (Wu *et al.*, 2003), la generación de AMPc a partir de ATP puede evaluarse con facilidad cuando se introduce antígeno protector (PA), otro componente de la toxina del ántrax en la célula (Guidi-Rontani *et al.*, 2000), para transportar el EF hacia las células (Zmuda *et al.*, 2005). La inhibición de la actividad intracelular de EF es una manera para tratar el ántrax en la etapa tardía y reducir la letalidad de las infecciones. Los inhibidores de EF podrían usarse para tratar la infección en la etapa tardía de otras bacterias, tales como *Bordetella pertussis* (que provoca tos ferina) y *Yersinia pestis* (peste), que producen toxinas con áreas similares (Hewlett *et al.*, 1979; Hewlett *et al.*, 1976; Munier *et al.*, 1992).

[0112] Recientemente, con la obtención de estructuras cristalinas de EF en complejos con análogos de sustratos y pequeñas moléculas inhibitoras, ha sido posible identificar los residuos de los sitios activos (Drum *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004). Sin embargo, hay un grado de variación en la orientación absoluta de los residuos y el modo de unión a los iones metálicos. Si bien hay una concordancia general en el hecho de que hay un metal unido a la proteína EF (Drum *et al.*, 2002), se ha visualizado un segundo ion metálico, posiblemente catalítico, unido a los fosfatos del ATP sustrato (Shen *et al.*, 2005). En contraste, la adenilil ciclasa de mamíferos tiene el sitio de unión a 2 iones metálicos típico, con ambos metales unidos por grupos aniónicos en la proteína y el sustrato (Tesmer *et al.*, 1999). Todas estas estructuras se obtuvieron con iones metálicos más grandes. Otra estructura reciente de una toxina de

adenilil ciclasa bacteriana producida por *pertussis* (PT) (archivo PDB 1ZOT) presenta 3 iones Mg en el sitio activo, dos de los cuales tienen ligandos para proteínas y nucleótidos, y uno cerca del esqueleto de fosfato. El o los iones metálicos fijan la posición del ATP, de modo que el grupo hidroxilo 3' en la ribosa del ATP puede desprotonarse durante la producción de AMPc. Varios residuos de Lys y Arg en el sitio activo también están cerca de los oxígenos del fosfato del ATP. El sitio activo de la enzima de mamíferos es diferente, lo que favorece la búsqueda de inhibidores que pueden unirse específicamente a las enzimas bacterianas. Por ejemplo, los inhibidores del sitio P de la adenilil ciclasa de mamíferos (AC) o los nucleótidos de adenina con grupos 3'-O fosfato o polifosfato (Tesmer *et al.*, 1999; Dessauer y Gilman, 19997; Gille *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 1997; Onda *et al.*, 2001) no tienen efectos sobre la actividad catalítica de EF (Johnson *et al.*, 1990). Se han identificado inhibidores de EF más selectivos con un abordaje computacional y experimental combinado, pero no se descubrió que fueran tóxicos (Soelaiman *et al.*, 2003).

C. Cólera

[0113] El cólera, una enfermedad potencialmente letal, es causado por la bacteria *Vibrio cholera*. El síntoma característico del cólera es la producción de diarrea acuosa con diversos grados de deshidratación, que varían entre una deshidratación nula y una deshidratación severa y peligrosa. El inicio de la enfermedad es abrupto y se caracteriza por la producción de diarrea acuosa sin tensión, estreñimiento o dolor abdominal prominente, rápidamente seguido o algunas veces precedido por vómitos. A medida que la diarrea continúa, se manifiestan otros síntomas de deshidratación severa, tales como dolores generalizados y oliguria. El examen físico demostrará un paciente alerta la mayor parte del tiempo, a pesar del hecho de que es imposible palpar el pulso o medir la presión sanguínea.

[0114] La subunidad "A" de la toxina del cólera (CTA1) es una ADP-ribosiltransferasa que activa la adenilil ciclasa, que a su vez, eleva los niveles de AMPc, que altera la homeostasis acuosa y resulta en diarrea acuosa. La toxina del cólera es una enterotoxina AB5 que se une a los gangliósidos GM1. Además, la

toxina del cólera incrementa los niveles de AMPc y es la causa primaria de la liberación masiva de fluidos y electrolitos asociada con el cólera. En la FIG. 2 se ilustra un mecanismo para el cólera que provoca diarrea acuosa.

D. Pertussis

[0115] La pertussis, conocida como tos ferina, es causada por la bacteria *Bordetella pertussis*. La pertussis se manifiesta como un período de incubación que varía entre menos de 1 semana y a lo sumo 3 semanas, con síntomas tales como inyección conjuntiva leve, malestar y fiebre baja; después de lo cual se desarrolla una tos no productiva. Una etapa posterior se caracteriza por síntomas hematológicos, principalmente leucocitosis con predominancia de linfocitos. El conteo total de linfocitos, que algunas veces puede exceder 50000 células/mm³, consiste en una linfocitosis relativa con células T y B, y un incremento menos marcado en los neutrófilos. Los métodos usados en los diagnósticos de laboratorio incluyen el cultivo de hisopados de nasofaringe en medio Bordet-Gengou, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la inmunofluorescencia (DFA), y métodos serológicos.

[0116] *B. pertussis* produce una cantidad de sustancias con actividad biológica que participan en la enfermedad. Éstas incluyen la toxina de pertussis y la toxina de la adenilil ciclase (ACT). ACT contiene un dominio enzimático de adenilil ciclase que puede ingresar en las células de mamíferos, donde es activado por la calmodulina endógena para catalizar la producción de AMPc a partir de trifosfato de adenosina. La acumulación resultante de AMPc hasta niveles suprafisiológicos resulta en la alteración de las funciones de los leucocitos. La toxina es un miembro de la familia RTX de toxinas bacterianas (incluyendo hemolisina de *Escherichia coli* y leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*), y ella misma es hemolítica y es responsable de la zona de hemólisis asociada con *B. pertussis* virulenta en placas de sangre en agar. Las cepas de *B. pertussis* que presentan una producción defectuosa de ACT son avirulentas en ratones amamantados, y los anticuerpos contra la toxina mejoran la fagocitosis de la bacteria por los fagocitos. Es posible hallar más información en Principles and Practice of Infectious Disease, 2000, incorporado en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad.

E. Otros

[0117] La presente invención también es útil en la prevención, la inhibición o el tratamiento de infecciones bacterianas, incluyendo, sin limitaciones, los 83 o más serotipos diferentes de neumococos, estreptococos, tales como *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. canis*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. anginosus*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. mutans*, otros estreptococos viridans, peptostreptococos, otras especies relacionadas de estreptococos, enterococos tales como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, estafilococos, tales como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, particularmente en la nasofaringe, *Hemophilus influenzae*, especies de *Pseudomonas*, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas mallei*, brucelas, tales como *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium hemolyticum*, *Corynebacterium equi*, etcétera, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia asteroides*, especies de Bacteroides, especies de Actinomycetes, *Treponema pallidum*, especies de Leptospirilla y organismos relacionados. La invención también puede ser útil contra bacterias Gram negativas, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Serratia* species, *Acinetobacter*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Enterobacter* species, especies de Bacteroides y *Legionella*, y semejantes. Además, la invención puede ser útil para controlar las infecciones de protozoos u otros organismos macroscópicos, tales como *Cryptosporidium*, *Isospora belli*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, especies de *Ciclospora*, por ejemplo, y para *Chlamydia trachomatis* y otras infecciones de *Chlamydia*, tales como *Chlamydia psittaci*, o *Chlamydia pneumoniae*, por ejemplo. Otra realización de la invención es el tratamiento de enfermedades originadas en el agua, tales como *Salmonella typhimurium*, *S. typhi*, *E. coli* patogénica, *Campylobacter jejuni*, *Proteus* sp. *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*. Por supuesto, ha de comprenderse que la invención puede usarse en cualquier

patógeno que pueda afectar los niveles de AMPc en un sujeto. Hay muchas más cepas de bacterias y virus que las que han sido descritas, y aquellos entrenados en la técnica podrán anticipar compuestos de la invención que puedan inhibir algún porcentaje de estos organismos desconocidos.

[0118] Una realización específica de la invención se relaciona con el tratamiento de infecciones de otros patógenos que provienen del agua y están asociados con la diarrea. Los ejemplos de patógenos incluyen *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *Campylobacter jejuni* Enteritis, *C. coli*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter* spp., *Clostridium perfringens*, type C, *Enterobacter* spp., *E. coli* de diversos serotipos, *Flavobacterium meningosepticum*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Klebsiella* spp., *Leptospira icterohaemorrhagiae* y otras *Leptospira* spp., *Legionella pneumophila* y otras *Legionella* spp., *Morganella morganii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. marinum* y otras *Mycobacterium* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella enteritidis*, *S. montevideo* B, *S. typhimurium* y otros serotipos de *Salmonella*, *S. paratyphi* A y B, *S. typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y otras *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica*, (véase, por ejemplo, T. C. Hazen y G. A. Toranzos "Tropical Source Water" p. 33, en G. A. McFeters Drinking Water Microbiology [Springer Verlag, Nueva York 1990]).

[0119] En algunas realizaciones de la invención, la composición se usa en un sujeto infectado por *E. coli*, *S. typhimurium*, *A. hydrophila* y *V. parahaemolyticus*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica* y *V. cholera*. Otras enfermedades con usos clínicos para estos tipos de drogas incluyen rotavirus, diarrea relacionada con SIDA y síndrome de intestino irritable. Otras realizaciones de la invención incluyen el tratamiento de pacientes sobremedicados con drogas tales como teofilina, un inhibidor de la adenilil ciclase. Otra realización es el tratamiento de la diarrea en pacientes con cáncer.

IV. Pérdida de fluido intestinal

[0120] Un síntoma de la pérdida de fluido intestinal es la diarrea, que hace referencia la evacuación intestinal frecuente, blanda o líquida, que resulta en una pérdida significativa de agua y sales. La pérdida de fluido intestinal también puede estar acompañada por calambres abdominales, fiebre, sangre en las heces, hinchazón, y pérdida de cantidades significativas de agua y sales. La diarrea aguda y severa es una causa común de muerte en los países en desarrollo, y es una causa importante de muerte infantil en todo el mundo.

[0121] En una realización, las bacterias entéricas provocan síntomas de pérdida de fluido intestinal, tales como diarrea. Los patógenos entéricos bacterianos provocan varios efectos perjudiciales sobre la mucosa intestinal, incluyendo lesiones de inflamación y potenciación del transporte de agua y electrolitos desde el epitelio intestinal. La base del transporte incrementado de agua y electrolitos desde el intestino es la hiperestimulación del transporte de iones, que es regulado por nucleótidos cíclicos, incluyendo el AMPc. Muchas bacterias secretan enterotoxinas proteicas que estimulan la adenilil ciclasa de la mucosa, la cual regula positivamente los niveles de AMPc en las células epiteliales. El AMPc se une a la protein quinasa A celular, que a su vez, fosforila las proteínas de los canales de cloruro que recubren las células epiteliales. Los canales de cloruro hipersecretan Cl^- hacia el lumen intestinal, a lo que sigue Na^+ , K^+ y HCO_3^- . En una realización específica de la invención, la pérdida de fluido intestinal es causada por los métodos detallados con anterioridad.

[0122] Es posible usar varios ensayos *in vivo* en una variedad de animales de laboratorio para documentar el efecto del AMPc sobre el transporte de fluido intestinal, y en una realización, dicho efecto se mide ligando pequeñas porciones de intestino para formar cavidades, lo que se logra anestesiando los ratones y realizando suturas con seda. Las bacterias enterotoxinogénicas o las toxinas que secretan (por ejemplo, la toxina del cólera) se inyectan en el lumen de la cavidad intestinal artificial. Después de 4-6 horas, se mide el volumen de fluido acumulado y se mide la longitud del rizo de intestino que forma la cavidad en cm. En una realización, los resultados se expresan como ml/cm.

[0123] En otra realización, se usa un ensayo intestinal abierto, y los ratones se someten a un tratamiento previo con un antibiótico para reducir la población de bacterias residentes en su intestino delgado. No se preparan ligaduras, y las bacterias o las enterotoxinas se administran por la boca con una aguja roma para alimentación gástrica. Después de un período de tiempo determinado (12-24 horas), se estima el volumen de fluido que se acumula en el tracto intestinal completo disectando el tracto intestinal y pesándolo, junto con el peso del resto del cadáver del animal. En una realización, los resultados se expresan como una relación entre el peso del intestino y el peso del cadáver.

[0124] En otra realización de la invención, los inhibidores de adenilil ciclasa reducen la cantidad de AMPc, y por lo tanto, reducen la cantidad de fluido intestinal en las cavidades intestinales artificiales o el intestino.

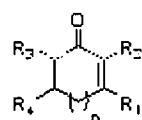
[0125] En una realización, la invención se relaciona con el tratamiento o la prevención de la pérdida de fluido intestinal. En realizaciones generales, la pérdida de fluido intestinal es el resultado de la infección con un patógeno. En realizaciones específicas, el patógeno es *B. anthracis*, *V. cholerae*, *E. coli*, Pertussis, *Y. pestis*, o cualquier combinación de éstos. En otras realizaciones, la pérdida de fluido intestinal es el resultado de un incremento en los niveles de AMPc. En otra realización, la pérdida de fluido intestinal es el resultado de un cáncer.

V. Composiciones de la invención

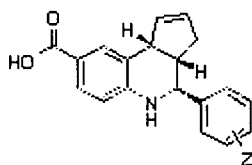
[0126] El término "derivado", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un compuesto que se forma a partir de un compuesto similar, o a un compuesto del que puede considerarse que surge de otro compuesto si se reemplaza un átomo por otro átomo o grupo de átomos. Un derivado también puede hacer referencia a compuestos que, al menos teóricamente, pueden formarse a partir del compuesto precursor.

[0127] El término "derivado funcionalmente activo" o "derivado funcional" hace referencia a un derivado, como se lo definió con anterioridad, que retiene la función del compuesto del que deriva.

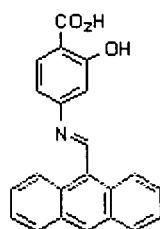
[0128] Una realización de la invención es la composición que comprende una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un compuesto o una sal de éste aceptable para el uso farmacéutico, donde la fórmula general del compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



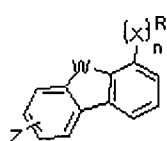
Fórmula I



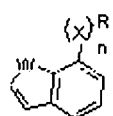
Fórmula II



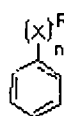
Fórmula III



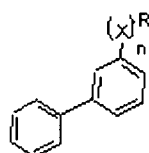
Fórmula IV



Fórmula V



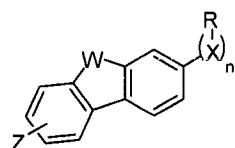
Fórmula VI



Fórmula VII



Fórmula VIII



Fórmula IX,

[0129] y combinaciones de éstas, donde, 1) R es una estructura de anillo cíclico o bicíclico; 2) R₁ es una estructura de anillo cíclico o bicíclico; 3) R₂ es un hidrógeno, una estructura de anillo cíclico o bicíclico; 4) Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo,

sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alqueno, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado; 5) W se selecciona del grupo que consiste en CO, NH, metileno, un átomo de azufre, un átomo de oxígeno y tionilo; and, 6) m y n son iguales o diferentes, y son 0 ó 1.

[0130] En realizaciones generales de la invención, R está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piranilo, piridilo, imidazolilo, 1,8-naftiridinilo y N-óxido de piridilo; R₁ está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo; R₄ es una estructura de anillo cíclico o bicíclico, sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo;

[0131] En realizaciones específicas de la invención, R está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alqueno, alquino, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alqueno, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos. En otras realizaciones específicas de la invención, R₁ está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alqueno, alquino, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo,

cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxilámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos. En otra realización específica de la invención, R_4 está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxilámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

[0132] En realizaciones específicas de la invención, la composición comprende uno o más del grupo que consiste en FIV-50, FIV-1, FIV-29, FIV-31, FIV-34, FIV-35, FIV-39, FIV-40, FIV-46, FIII-1, FII-1, FI-3, FI-1, FI-2, FIV-54, FIV-58, FIV-55, FIV-53, FIV-67, FIV-70, FIV-65, FIV-68, FIV-66, FIV-61, FIV-60, FIV-64, FIV-71, FIV-46, FIV-72, FIV-73, FIV-49, FIV-75, y cualquier combinación de éstos.

A. Estructuras y grupos químicos

[0133] Como se la usa en la presente documentación, la terminología “actividad biológica” incluye la actividad enzimática y la unión a otras moléculas, incluyendo inhibidores y sustratos.

[0134] El término “análogo” como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una sustancia que no comprende el mismo esqueleto básico de

carbono o la misma funcionalidad de los carbonos en su estructura que un "compuesto dado", pero que puede imitar a dicho compuesto porque incorpora una o más sustituciones apropiadas, tales como, por ejemplo, la sustitución de carbonos por heteroátomos.

[0135] El término "alquilo", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a cadenas rectas o ramificadas de hasta siete átomos de carbono. El término "alquilo inferior", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a cadenas rectas o ramificadas que tienen hasta cuatro átomos de carbono, y es un subgrupo del término "alquilo".

[0136] El término "alquilo sustituido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a cadenas rectas o ramificadas de hasta siete átomos de carbono, donde uno o más, y particularmente uno, dos o tres átomos de hidrógeno pueden reemplazarse por un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, amino, ciano, halógeno, trifluorometilo, -NH(alquilo inferior), -N(alquilo inferior)₂, alcoxilo inferior, alquiltiol y carboxilo inferior, arilo y heteroarilo.

[0137] Los términos "alcoxilol inferior" y "alquiltiol inferior", como se los usa en la presente documentación, hacen referencia a aquellos grupos alquilo definidos con anterioridad que están unidos a un átomo de oxígeno o azufre.

[0138] El término "cicloalquilo", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a anillos saturados de entre 3 y 7 átomos de carbono.

[0139] El término "alquenilo", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a cadenas rectas o ramificadas de entre 3 y 7 átomos de carbono que tienen uno o dos enlaces dobles. Algunas realizaciones de grupos "alquenilo" son cadenas rectas de entre 3 y 5 átomos de carbono que tienen un enlace doble.

[0140] El término "alquenilo sustituido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a aquellas cadenas rectas o ramificadas de entre 3 y 7 átomos de carbono que tienen uno o dos enlaces dobles, y donde un átomo de hidrógeno ha sido reemplazado por un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, amino, halo, trifluorometilo, ciano, -NH(alquilo inferior), -N(alquilo inferior)₂, alcoxilo inferior, alquiltiol inferior y carboxilo.

[0141] El término “alquileo”, como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a cadenas divalentes, rectas o ramificadas, que tienen hasta siete átomos de carbono (es decir, $-\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2)_2-$, $-(\text{CH}_2)_3-$, $-(\text{CH}_2)_4-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, etcétera).

[0142] El término “arilo”, como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a fenilo, 1-naftilo y 2-naftilo. El término “arilo sustituido”, como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a fenilo, 1-naftilo y 2-naftilo con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en fenilo, heteroarilo, alquilo inferior, alcoxilo inferior, alquiltiol inferior, halo, hidroxilo, trifluorometilo, amino, $-\text{NH}(\text{alquilo inferior})$, y $-\text{N}(\text{alquilo inferior})_2$, y también fenilo 1-naftilo y 2-naftilo mono, di y tri-sustituido con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en metilo, metoxilo, metiltiol, halo, hidroxilo y amino.

[0143] En la presente documentación, el término trifenilmetilo se abrevia Trt (tritilo).

[0144] El término “heteroarilo”, como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a anillos no saturados de cinco o seis átomos que contienen uno o dos átomos de O y/o S, y/o uno a cuatro átomos de N, con la condición de que la cantidad total de heteroátomos en el anillo sea de 4 o menos. El anillo de heteroarilo está unido a través de un átomo de carbono o nitrógeno disponible. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen 2, 3 ó 4-piridilo, 4-imidazolilo, 4-tiazolilo, 2 y 3-tienilo, y 2 y 3-furilo. El término “heteroarilo”, como se lo usa en la presente documentación, también incluye los anillos bicíclicos donde el anillo de cinco o seis miembros que contiene átomos de O, S y N definido con anterioridad está fusionado a un anillo de benceno o piridilo. Los ejemplos de anillos bicíclicos incluyen, sin limitaciones, 2 y 3-indolilo, así como 4 y 5-quinolinilo. El anillo de heteroarilo mono o bicíclico también puede estar sustituido en un átomo de carbono disponible con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en alquilo inferior, halo, hidroxilo, bencilo y ciclohexilmetilo. Adicionalmente, si el anillo mono o bicíclico tiene un átomo de N disponible, este átomo también puede estar sustituido con grupo protector de N, tal como *N*-carbamatos, *N*-fenilsulfenilo, *N*-fenilsulfonilo, *N*-2,4-dinitrofenilo, *N*-alquilo inferior, *N*-bencilo, o *N*-benzhidrilo, o

cualquier otro grupo aplicable conocido en la técnica (T.W. Greene, P.G.M. Wuts: Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª edición, John Wiley and Sons, NY, 1991, incorporado en la presente documentación a modo de referencia).

[0145] Los términos “halógeno” y “halo”, como se los usa en la presente documentación, hacen referencia a cloro, bromo, flúor e iodo.

[0146] El término “sal(es)”, como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a sales ácidas y/o básicas formadas con ácidos y bases inorgánicas y/u orgánicas. Los zwitteriones (sales internas o interiores) están incluidos dentro del término “sal(es)”, como se lo usa en la presente documentación, al igual que las sales de amonio cuaternario, tales como las sales de alquilamonio. Ha de comprenderse que las composiciones de la invención también pueden existir como aniones o cationes. Pueden usarse sales no tóxicas aceptables para el uso farmacéutico, aunque pueden ser útiles otras sales, tales como, por ejemplo, en pasos de aislamiento o purificación.

[0147] Una “sal aceptable para el uso farmacéutico” de un compuesto descrito en la presente documentación es una sal ácida o básica que es apropiada para usar en contacto con los tejidos de los seres humanos o los animales, sin una toxicidad o una carcinogenicidad excesiva, y que no provoca irritación, respuestas alérgicas u otro tipo de problema o complicación. Estas sales incluyen sales de ácidos minerales y orgánicos de residuos básicos, tales como aminas, así como sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos, tales como ácidos carboxílicos. Las sales farmacéuticas específicas incluyen sin limitaciones, sales de ácidos tales como ácido clorhídrico, fosfórico, bromhídrico, málico, glicólico, fumárico, sulfúrico, sulfámico, sulfanílico, fórmico, toluensulfónico, metansulfónico, bencensulfónico, etandisulfónico, 2-hidroxietilsulfónico, nítrico, benzoico, 2-acetoxibenzoico, cítrico, tartárico, láctico, esteárico, salicílico, glutámico, ascórbico, pamoico, succínico, fumárico, maleico, propiónico, hidroximaleico, iodhídrico o fenilacético, ácidos alcanóicos, tales como ácido acético, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, donde n es 0-4, y semejantes. De forma similar, los cationes aceptables para el uso farmacéutico incluyen, sin limitaciones, sodio, potasio, calcio, aluminio, litio y amonio. Aquellos entrenados en la técnica podrán reconocer otras sales aceptables para el uso

farmacéutico para los compuestos proporcionados en la presente documentación, incluyendo aquellas indicadas en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., p. 1418 (1985). En general, una sal ácida o básica aceptable para el uso farmacéutico puede sintetizarse a partir de un compuesto progenitor que contiene una porción básica o ácida de acuerdo con un método químico convencional. Brevemente, estas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido en agua o un solvente orgánico, o en una mezcla de ambos; en general, se incluye el uso de medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo.

[0148] Los ejemplos de sales de adición ácida incluyen, sin limitaciones, sales de acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencensulfonato, bisulfato, butirato, citrato, AMPcorato, AMPcorsulfonato, ciclopentanpropionato, digluconato, dodecilsulfato, etansulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, iodhidrato, 2-hidroxietansulfonato, lactato, maleato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato.

[0149] Los ejemplos de sales básicas incluyen, sin limitaciones, sales de amonio; sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio, litio y potasio; sales de metales alcalinos térreos, tales como sales de calcio y magnesio; sales que comprenden bases orgánicas, tales como aminas (por ejemplo, dicitclohexilamina, alquilaminas, tales como *t*-butilamina y *t*-amilamina, alquilaminas sustituidas, aril-alquilaminas, tales como bencilamina, dialquilaminas, dialquilaminas sustituidas, tales como N-metil glucamina (especialmente N-metil D-glucamina), trialquilaminas, y trialquilaminas sustituidas); y sales que comprenden aminoácidos, tales como arginina, lisina, y semejantes. Los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferiores (por ejemplo, cloruros, bromuros e ioduros de metilo, etilo, propilo y butilo), sulfatos de dialquilo (por ejemplo, sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo, y diamilo), haluros de cadena larga (por ejemplo cloruros, bromuros e

ioduros de decilo, laurilo, mirtistilo y estearilo), haluros de arilalquilo (por ejemplo, bromuros de bencilo y fenetilo), y otros conocidos en la técnica.

[0150] En la presente documentación también se contemplan las prodrogas y los solvatos de la presente invención. El término "prodroga", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un compuesto que, al administrársele a un sujeto, es sometido a una conversión química por procesos metabólicos o químicos para proporcionar un compuesto de la presente invención, o una sal y/o un solvato de éste. Los solvatos de los compuestos de la invención también pueden ser hidratos.

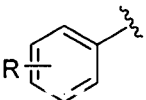
[0151] Se contempla que todos los estereoisómeros posibles de la presente invención están dentro del alcance de la presente invención. Los estereoisómeros individuales de los compuestos de la presente invención pueden estar, por ejemplo, sustancialmente libres de otros estereoisómeros, pueden estar mezclados, por ejemplo, como racematos, o pueden estar combinados con otros estereoisómeros seleccionados, o con todos los otros estereoisómeros. Los centros quirales de la presente invención pueden tener la configuración S o R, tal como se las define en las recomendaciones IUPAC 1974.

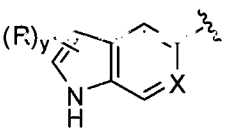
[0152] Cuando se indica que un grupo particular con su estructura de unión está entre dos grupos asociados, por ejemplo, $-\text{OCH}_2-$, luego ha de comprenderse que cualquiera de los dos grupos asociados puede estar unido a uno de los extremos de dicho grupo particular, y el otro grupo asociado está unido necesariamente al otro extremo de dicho grupo particular.

[0153] Los métodos para preparar y/o separar y aislar estereoisómeros individuales a partir de mezclas racémicas o mezclas no racémicas de estereoisómeros son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los isómeros con actividad óptica (R) y (S) pueden prepararse usando sintones quirales o reactivos quirales, o pueden resolverse usando técnicas convencionales. Cuando se lo desee, los isómeros R y S podrán resolverse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, por ejemplo, mediante la formación de sales o complejos diastereoisoméricos, los cuales pueden separarse, por ejemplo, por cristalización; mediante la formación de derivados diastereoisoméricos, los cuales pueden

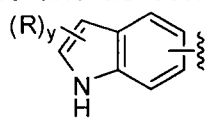
separarse, por ejemplo, por cristalización, cromatografía gaseosa-líquida o líquida; mediante la reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico para el enantiómero, por ejemplo, una oxidación o una reducción enzimática, seguida por la separación de los enantiómeros modificados y no modificados; por medio de una cromatografía gaseosa-líquida o líquida en un ambiente quiral, por ejemplo, en un soporte quiral, tal como sílice, con un ligando quiral o en presencia de un solvente quiral. Ha de apreciarse que, cuando un enantiómero deseado se convierte en otra entidad química merced a uno de los procedimientos de separación descritos con anterioridad, puede ser necesario un paso más para liberar la forma enantiomérica deseada. Como alternativa, un enantiómero específico puede sintetizarse por síntesis asimétrica, usando reactivos, sustratos, catalizadores o solventes con actividad óptica, o convirtiendo un enantiómero en el otro por transformación asimétrica. Para una mezcla de enantiómeros enriquecida en un enantiómero, el contenido del enantiómero que es el componente más importante puede incrementarse aún más (con la pérdida de rendimiento concomitante) por recristalización.

[0154] El símbolo “-” representa un enlace simple, “=” representa un enlace doble, y “≡” representa un enlace triple. Cuando un grupo se ilustre separado de su fórmula progenitora, se usará el símbolo “~” en el extremo de enlace que teóricamente fue cortado para separar el grupo de la fórmula estructural progenitora.

[0155] Cuando un grupo “R” se ilustra en el contexto de un sistema de anillos, por ejemplo, en la fórmula , el sustituyente “R” puede residir en cualquier átomo del sistema de anillos, asumiendo el reemplazo del hidrógeno ilustrado, implicado o definido expresamente de uno de los átomos del anillo, siempre que se forme una estructura estable.

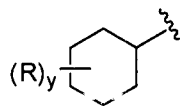
[0156] Cuando un grupo “R” se ilustra en el contexto de un sistema de anillos fusionados, tal como, por ejemplo, en la fórmula , el sustituyente “R” puede residir en cualquier átomo del sistema de anillos fusionados, asumiendo el reemplazo del hidrógeno ilustrado (por ejemplo, el -NH- en la fórmula anterior),

implicado (por ejemplo, en la fórmula anterior, donde se han representado los hidrógenos, sino que se interpreta que están presentes) o definido expresamente por ejemplo, en la fórmula anterior, cuando "X" es igual a -CH-) de uno de los átomos de los anillos, siempre que se forme una estructura estable. En el ejemplo ilustrado, el grupo "R" puede residir en el anillo de 5 miembros o el anillo de 6 miembros del sistema de anillos fusionados. En la fórmula ilustrada con anterioridad, cuando y es, por ejemplo, 2, luego los dos "R" pueden residir en cualquiera de los dos átomos del sistema de anillos, asumiendo nuevamente que cada uno reemplaza a un hidrógeno ilustrado, implicado o definido expresamente en los anillos. Cuando hay más de uno de estos grupos "flotantes" ilustrados, tal



como, por ejemplo, en la fórmula , donde hay dos grupos, a saber, el "R" y el enlace que indica la unión a una estructura progenitora, los grupos "flotantes" pueden residir en cualquier átomo del sistema de anillos, asumiendo nuevamente que cada uno reemplaza un hidrógeno ilustrado, implicado o definido expresamente en los anillos.

[0157] Cuando un grupo "R" se ilustra en el contexto de un sistema de anillos



saturados, tal como, por ejemplo, en la fórmula , donde "y" puede ser más de uno, asumiendo que cada uno reemplaza un hidrógeno ilustrado, implicado o definido expresamente en el anillo ilustrado, luego cuando la estructura resultante sea estable, dos "R" podrán residir en el mismo carbono. Un ejemplo simple es cuando R es un grupo metilo, caso en el cual existe un dimetilo geminal en un carbono del anillo ilustrado. En otro ejemplo, dos R en el mismo carbono, incluyendo dicho carbono, pueden formar un anillo, con lo que crean una estructura de anillo espirocíclico con el anillo ilustrado.

[0158] Un "alquilo" incluye estructuras de hidrocarburos lineales, ramificados o cíclicos, e inclusive combinaciones de éstos. Por ejemplo, un "C₈ alquilo" puede hacer referencia a *n*-octilo, *iso*-octilo, ciclohexiletilo, y semejantes. Un alquilo inferior hace referencia a grupos alquilo de entre uno y ocho átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo inferior incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *s*-butilo, *t*-butilo, isobutilo, pentilo, ciclopentilo, hexilo, ciclohexilo, y

semejantes. Un alquilo superior hace referencia a grupos alquilo que contienen más de 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo son aquellos de C_{20} o menos. Un cicloalquilo es un subconjunto de los alquilos, e incluye grupos hidrocarburo de entre 3 y 13 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen c-propilo, c-butilo, c-pentilo, norbornilo, adamantilo, y semejantes. En esta solicitud, un alquilo hace referencia a residuos alcanilo, alquenilo y alquinilo (y combinaciones de éstos); e incluye ciclohexilmetilo, vinilo, alilo, isoprenilo, y semejantes. Por consiguiente, cuando se nombra un residuo alquilo que tiene una cantidad específica de carbonos, se incluyen todos los isómeros geométricos que tienen dicha cantidad de carbonos; por lo que "butilo" o " C_4 alquilo" incluyen n-butilo, sec-butilo, isobutilo, t-butilo, isobutenilo y but-2-inos, por ejemplo; "propilo" o " C_3 alquilo" incluyen n-propilo, propenilo e isopropilo, por ejemplo. Los alquilos con cantidades variables de carbonos pueden nombrarse usando rangos numéricos como subíndices, de modo que, por ejemplo, un alquilo inferior es equivalente a C_{1-8} alquilo.

[0159] "Alquileno" hace referencia a una cadena divalente, recta o ramificada, que consiste exclusivamente en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones, y que tiene entre uno y diez átomos de carbono, por ejemplo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, y semejantes. Un alquileno es un subconjunto de los alquilos, que se denomina con los mismos residuos que el alquilo, pero que tiene dos puntos de unión y específicamente está completamente saturado. Los ejemplos de alquileno incluyen etileno ($-CH_2CH_2-$), propileno ($-CH_2CH_2CH_2-$), 2-dimetilpropileno ($-CH_2C(CH_3)_2CH_2-$) y 2-ciclohexilpropileno, ($-CH_2CH(C_6H_{13})CH_2-$).

[0160] Un "alquilideno" hace referencia a una cadena divalente insaturada, recta o ramificada, que consiste exclusivamente en átomos de carbono e hidrógeno, que tiene entre dos y diez átomos de carbono, por ejemplo, etilideno, propilideno, n-butilideno, y semejantes. Un alquilideno es un subconjunto de los alquilos, al que se pueden aplicársele los mismos residuos que un alquilo, pero que tiene dos puntos de unión, y específicamente una insaturación debida a un enlace doble. La insaturación presente incluye al menos un enlace doble, y puede haber un enlace

doble entre el primer carbono de la cadena y un átomo de carbono del resto de la molécula a la que esté unido.

[0161] Un "alquilidino" hace referencia a una cadena divalente insaturada, recta o ramificada, que consiste exclusivamente en átomos de carbono e hidrógeno, que tiene entre dos y diez átomos de carbono, por ejemplo, propilid-2-inilo, n-butilid-1-inilo, y semejantes. Un alquilidino es un subconjunto de los alquilo, al que se pueden aplicársele los mismos residuos que un alquilo, pero que tiene dos puntos de unión, y específicamente una insaturación debida a un enlace triple. La insaturación presente incluye al menos un enlace triple, y puede haber un enlace triple entre el primer carbono de la cadena y un átomo de carbono del resto de la molécula a la que esté unido.

[0162] Cualquiera de los grupos funcionales anteriores, "alquilenos", "alquilidenos" y "alquilidinos", cuando está opcionalmente sustituido, puede contener una sustitución de alquilo que puede estar sustituida en sí misma. Por ejemplo, el 2-(2-feniletinil-but-3-enil)-naftaleno (nombre IUPAC) contiene un n-butilid-3-inilo con un sustituyente vinilo en la posición 2 de dicho grupo.

[0163] "Alcoxi" o "alcoxilo" hace referencia a un grupo -O-alquilo, por ejemplo, que incluye entre 1 y 8 átomos de carbono en una cadena insaturada recta, ramificada o de configuración cíclica, y combinaciones de éstas, unida a la estructura progenitora a través de un oxígeno. Los ejemplos incluyen metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, ciclopropiloxilo, ciclohexiloxilo, y semejantes. Un alcoxilo inferior hace referencia a grupos que contienen entre uno y seis carbonos.

[0164] Un "alcoxilo sustituido" hace referencia al grupo -O-(alquilo sustituido), donde la sustitución en el grupo alquilo generalmente contiene más que solamente carbono (véase la definición de alcoxilo). Un ejemplo de grupo alcoxilo sustituido es el "polialcoxilo" u -O- (alquilenos opcionalmente sustituidos)-(alcoxilos opcionalmente sustituidos), e incluye grupos tales como $-OCH_2CH_2OCH_3$ y éteres de glicol, tales como polietilenglicol y $-O(CH_2CH_2O)_xCH_3$, donde x es un número entero entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20; en otro ejemplo, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10, y en otro ejemplo, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5. Otro ejemplo de grupo alcoxilo

sustituido es el hidroxialcoxilo o $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_y\text{OH}$, donde y es, por ejemplo, un número entero entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10; en otro ejemplo, y es un número entero entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4. Por ende, cuando un grupo se define como $-\text{OR}$, donde "R" es un alquilo opcionalmente sustituido, luego dicho grupo ha de incluir, sin limitaciones, hidroxialcoxilo, polialcoxilo, y semejantes.

[0165] Un "acilo" hace referencia a grupos de entre uno y diez átomos de carbono de configuración recta, ramificada o cíclica, que se hallan saturados, no saturados, o son aromáticos, y combinaciones de estas variantes, y que están unidos a la estructura progenitora a través de una funcionalidad de carbonilo. Es posible reemplazar uno o más carbonos en el residuo de acilo por nitrógeno, oxígeno o azufre, siempre que el punto de unión a la porción progenitora permanezca en el carbonilo. Los ejemplos incluyen acetilo, benzoilo, propionilo, isobutirilo, t-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, y semejantes. Un acilo inferior hace referencia a los grupos que contienen entre uno y seis carbonos.

[0166] Los "α-aminoácidos" hacen referencia a aminoácidos de ocurrencia natural y disponibles comercialmente, e isómeros ópticos de éstos. Los α-aminoácidos naturales y disponibles comercialmente típicos son los siguientes: glicina, alanina, serina, homoserina, treonina, valina, norvalina, leucina; isoleucina, norleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, ornitina, histidina, arginina, cisteína, homocisteína, metionina, fenilalanina, homofenilalanina, fenilglicina, orto-tirosina, meta-tirosina, para-tirosina, triptofano, glutamina, asparragina, prolina e hidroxiprolina. Una "cadena lateral de un α-aminoácido" hace referencia al grupo localizado en el carbono α de un α-aminoácido, tal como se lo definió con anterioridad, por ejemplo, hidrógeno (para la glicina), metilo (para la alanina), bencilo (para la fenilalanina), y semejantes.

[0167] "Amino" hace referencia al grupo $-\text{NH}_2$. "Amino sustituido" hace referencia al grupo $-\text{NHR}$ o $-\text{NRR}$, donde cada R se selecciona independientemente del siguiente grupo: alquilo opcionalmente sustituido, alcoxilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido,

acilo, carboxilo, alcóxicarbonilo, sulfanilo, sulfinilo y sulfonilo, por ejemplo, dietilamino, metilsulfonilamino, furanil-oxi-sulfonamino.

[0168] "Arilo" hace referencia a anillos carbocíclicos aromáticos de entre 6 y 14 miembros, incluyendo, por ejemplo, benceno, naftaleno, indano, tetralina, fluoreno, y semejantes.

[0169] "Arilalquilo" hace referencia a un residuo donde una porción de arilo está unida a una estructura progenitora a través de un alquileo, un alquilideno o un alquilidino. Los ejemplos incluyen bencilo, fenetilo, fenilvinilo, fenilalilo, y semejantes. La porción de arilo, alquileo, alquilideno o alquilidino de un grupo arilalquilo puede estar opcionalmente sustituida. "Arilalquilo inferior" hace referencia a un arilalquilo donde la porción de "alquilo" del grupo tiene entre uno y ocho carbonos.

[0170] "Halógeno" o "halo" hace referencia a flúor, cloro, bromo o yodo. Dihaloarilo, dihaloalquilo, trihaloarilo, etcétera, hacen referencia a arilos y alquilos sustituidos con una pluralidad de halógenos, pero no necesariamente una pluralidad del mismo halógeno; por lo que el 4-cloro-3-fluorofenilo está dentro de alcance de un dihaloarilo.

[0171] "Heterátomo" hace referencia a O, S, N o P.

[0172] "Heterociclilo" hace referencia a un anillo estable de entre 3 y 15 miembros que consiste en átomos de carbono y entre uno y cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre. Para los propósitos de esta invención, el anillo de heterociclilo puede ser un sistema de anillos monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillos fusionados o con puentes, aromáticos, saturados, o combinaciones de éstos; y el nitrógeno, el fósforo, el carbono o el azufre en el anillo de heterociclilo puede estar opcionalmente oxidado en diversos estados de oxidación, por ejemplo, para los propósitos de esta invención y para evitar una repetición innecesaria en la descripción de los derivados de N-óxido de piridina correspondientes, y semejantes, se los incluye como compuestos de la invención. Además, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el anillo puede estar parcial o completamente saturado, o puede ser aromático. Los ejemplos de estos

anillos de heterociclilo incluyen, sin limitaciones, azetidinilo, acridinilo, benzodioxolilo, benzodioxanilo, benzofuranilo, carbazoilo, cinnolinilo, dioxoianilo, indolizinilo, naftiridinilo, perhidroazepinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrazolilo, tetrahydroisoquinolilo, piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxoazepinilo, azepinilo, pirrolilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazolilo, pirazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, dihidropiridinilo, tetrahidropiridinilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, oxazolilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, triazolilo, indanilo, isoxazolilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, quinuclidinilo, isotiazolidinilo, indolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, quinolilo, isoquinolilo, decahidroisoquinolilo, benzimidazolilo, tiadiazolilo, benzopiranilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, furilo, tetrahidrofurilo, tetrahidropiranilo, tienilo, benzotielililo, tiamorfolinilo, tiamorfolinil sulfóxido, tiamorfolinil sulfona, dioxafosfolanilo, y oxadiazolilo.

[0173] “Heteroalíclico” específicamente hace referencia a un sistema de anillos de heterociclilo no aromático.

[0174] “Heteroarilo” específicamente hace referencia a un sistema de anillos de heterociclilo aromático.

[0175] “Heterociclilalquilo” hace referencia a un residuo donde un anillo de heterociclilo está unido a una estructura progenitora a través de un alquileo, un alquilideno o un alquilidino. Los ejemplos incluyen (4-metilpiperazin-1-il) metilo, (morfolin-4-il) metilo, 2-(oxazolin-2-il) etilo, 4(4-metilpiperazin-1-il)-2-butenilo, y semejantes. La porción de heterociclilo, alquileo, alquilideno o alquilidino de un grupo arilalquilo puede estar opcionalmente sustituida. Un “heterociclilalquilo inferior” hace referencia a un arilalquilo donde la porción de “alquilo” del grupo tiene entre uno y ocho carbonos.

[0176] El término “imino” hace referencia a una sustitución en un átomo de carbono, más específicamente un nitrógeno unido a través de un enlace doble. Por ejemplo, una imina, una amidina y una oxima contienen el grupo “imino”.

[0177] “Opcional” u “opcionalmente” denota que el suceso o la circunstancia que ha de describirse subsiguientemente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye instancias donde dicho suceso o circunstancia ocurre, e instancias donde no ocurre. Con relación a cualquier grupo que contiene uno o más sustituyentes, aquellos entrenados en la técnica han de comprender que en estos grupos no se introduce ninguna sustitución o patrón de sustitución (por ejemplo, un alquilo sustituido incluye grupos cicloalquilo opcionalmente sustituidos, que a su vez, tienen una definición que incluye los grupos alquilo opcionalmente sustituidos, potencialmente *ad infinitum*) que sea impráctico desde el punto de vista estérico y/o no factible desde el punto de vista de la síntesis. “Opcionalmente sustituido” hace referencia a todos los modificadores subsiguientes en un término, por ejemplo, en el término “C₁₋₈alquilarilo opcionalmente sustituido”, una sustitución opcional puede hallarse en la porción de “C₁₋₈alquilo” y la porción de “arilo” de la molécula; y por ejemplo, un alquilo opcionalmente sustituido incluye grupos cicloalquilo opcionalmente sustituidos, que a su vez tienen una definición que incluye los grupos alquilo opcionalmente sustituidos, potencialmente *ad infinitum*. Si un anillo heterocíclico está “opcionalmente sustituido”, luego el carbono y cualquier heteroátomo en el anillo pueden presentar una sustitución. Los ejemplos de sustituciones opcionales incluyen, sin limitaciones, alquilo, halógeno, alcoxilo, hidroxilo, oxo, carbamilo, acilamino, sulfonamido, carboxilo, alcoxicarbonilo, acilo, alquiltiol, alquilsulfonilo, nitro, ciano, amino, alquilamino, cicloalquilo, y semejantes. Por consiguiente, por ejemplo, si se describe un grupo “-C(O)R”, donde “R” es alquilo opcionalmente sustituido, luego “R” ha de incluir, sin limitaciones, -CH₂Ph, -CH₂CH₂OPh, -CH=CHPhCH₃, -C₃H₄CH₂N(H)Ph, y semejantes.

[0178] El término “orto” normalmente se usa en referencia a la posición relativa de dos sustituyentes en un anillo de benceno; sin embargo, en esta solicitud, el término “orto” ha de aplicarse a otros sistemas de anillos aromáticos donde dos sustituyentes residen en carbonos adyacentes. Por ejemplo, un 3-bromo-4-fluorotiofeno posee un grupo bromo y un grupo fluoro que tiene una relación de posición 1,2 en una configuración orto.

[0179] El término "oxo" hace referencia a una sustitución en un átomo de carbono, más específicamente, un oxígeno con un enlace doble. Por ejemplo, una oxo-morfolina, una ciclohexanona y un grupo acilo contienen la funcionalidad "oxo".

[0180] Un alquilo, un arilo y un heterociclilo "sustituido" hacen referencia, respectivamente, a un alquilo, un arilo y un heterociclilo donde uno o más (por ejemplo, a lo sumo aproximadamente 5, o en otro ejemplo, a lo sumo aproximadamente 3) átomos de hidrógeno han sido reemplazados por un sustituyente seleccionado independientemente del siguiente del grupo: alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fluoroalquilo), alcoxilo opcionalmente sustituido, alquilendioxilo (por ejemplo metilendioxilo), amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilamino y dialquilamino), amidino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenilo), arilalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, bencilo), ariloxilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenoxilo), arilalquiloxilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, benciloxilo), carboxilo (-COOH), carboalcoxilo (es decir, aciloxilo u -OOCR), carboxialquillo (es decir, ésteres o -COOR), carboxamido, aminocarbonilo, benciloxicarbonilamino (CBZ-amino), ciano, carbonilo, halógeno, hidroxilo, heterociclilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, nitro, sulfanilo, sulfinilo, sulfonilo y tiol.

[0181] "Sulfanilo" hace referencia a los grupos -S-(alquilo opcionalmente sustituido), -S-(arilo opcionalmente sustituido) y -S-(heterociclilo opcionalmente sustituido).

[0182] "Sulfinilo" hace referencia a los grupos -S(O)-H, -S(O)-(alquilo opcionalmente sustituido), -S(O)-(arilo opcionalmente sustituido) y -S(O)-(heterociclilo opcionalmente sustituido).

[0183] "Sulfonilo" hace referencia a los grupos -S(O₂)-H, -S(O₂)-(alquilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(arilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(heterociclilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(alcoxilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(ariloxilo opcionalmente sustituido) y -S(O₂)-(heterocicliloxilo opcionalmente sustituido).

[0184] El término "tiona" hace referencia a una sustitución en un átomo de carbono, más específicamente un azufre unido a través de un enlace doble. Por ejemplo, una tiocetona y una tioamida contienen la funcionalidad "tiona".

[0185] El "rendimiento", para el caso de las reacciones descritas en la presente documentación, se expresa como porcentaje del rendimiento teórico.

[0186] En algunas realizaciones, como han de apreciarlo aquellos entrenados en la técnica, dos grupos adyacentes en un sistema aromático pueden estar fusionados uno con otro para formar una estructura de anillo. La estructura de anillo fusionado puede contener heteroátomos y puede estar opcionalmente sustituida con uno o más grupos. Además, vale destacar que los carbonos saturados de dichos grupos fusionados (es decir, las estructuras de anillos saturados) pueden contener dos grupos de sustitución.

[0187] Algunos de los compuestos de la invención pueden tener sustituyentes imino, amino, oxo o hidroxilo provenientes de sistemas de anillos de heterociclilo. Para los propósitos de esta descripción, ha de comprenderse que estos sustituyentes imino, amino, oxo o hidroxilo pueden existir en su forma tautomérica correspondiente, es decir, amino, imino, hidroxilo u oxo, respectivamente.

[0188] Los compuestos de la invención generalmente se nombran usando ACD/Name (disponible en Advanced Chemistry Development, Inc., de Toronto, Canadá). Este software deriva de estructuras químicas de acuerdo con la aplicación sistemática de las reglas de nomenclatura acordadas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), y el Servicio de Resúmenes Químicos (CAS).

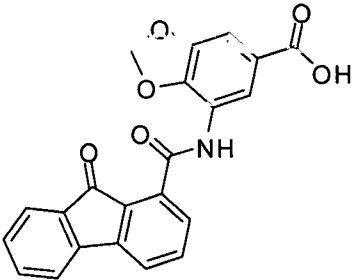
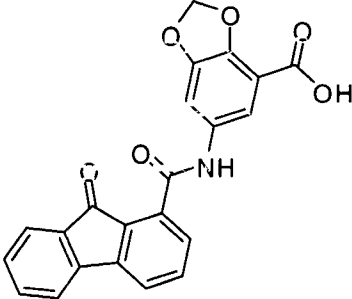
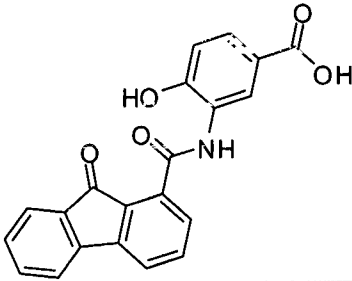
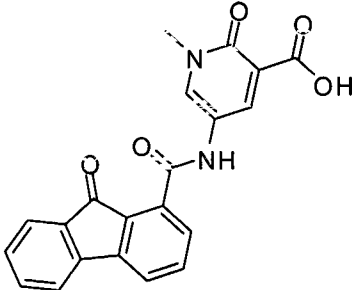
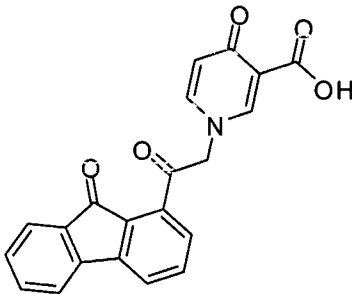
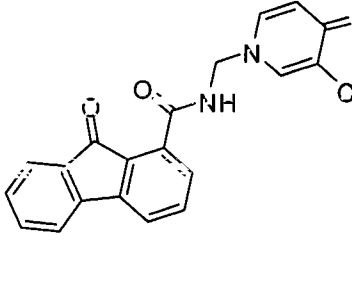
Ejemplos de compuestos de la invención

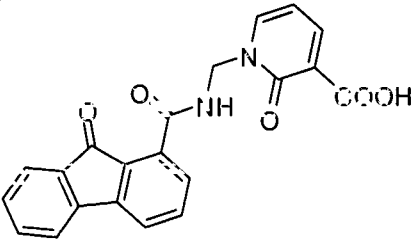
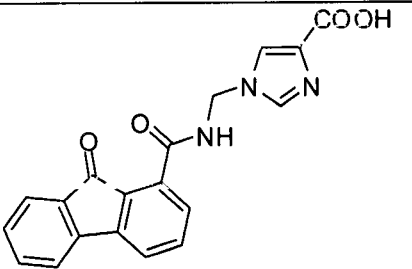
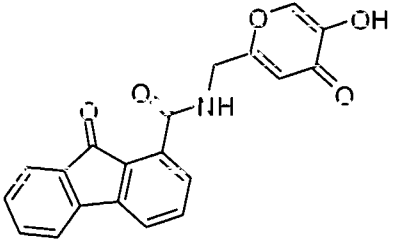
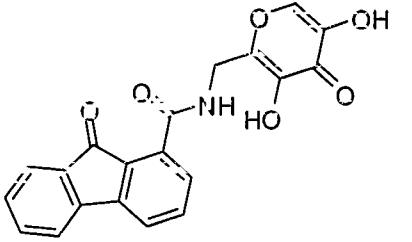
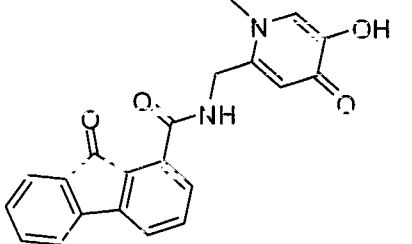
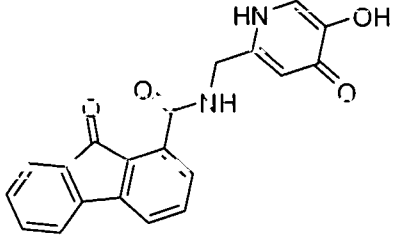
[0189] A continuación se proporcionan compuestos solamente a modo de ejemplo. Dadas las realizaciones anteriores, aquellos entrenados en la técnica han de conocer otros compuestos proporcionadas por la presente invención. Los compuestos también pueden conocerse con sus nombres de acuerdo con la IUPAC, indicados en la Tabla 1.

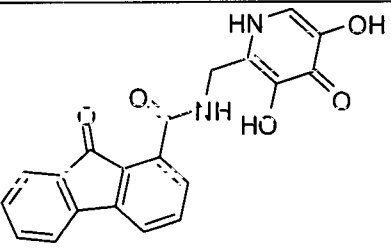
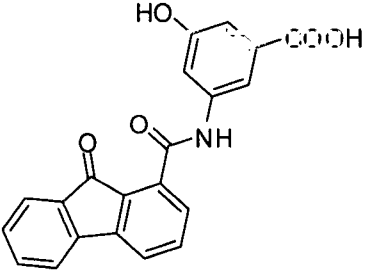
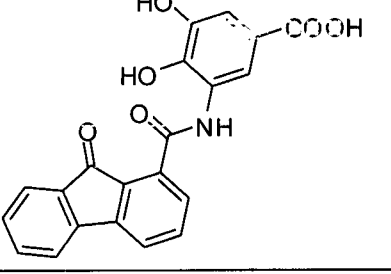
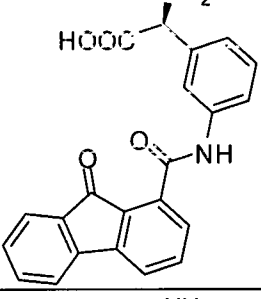
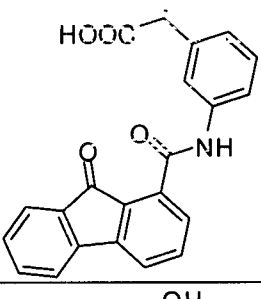
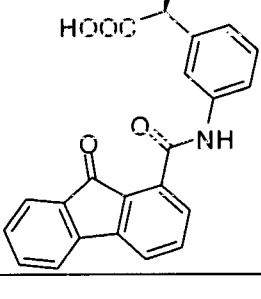
TABLA 1

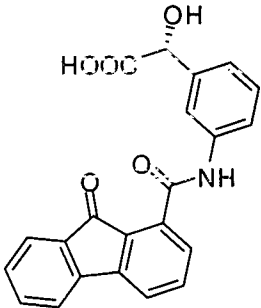
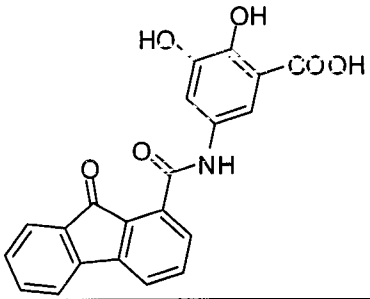
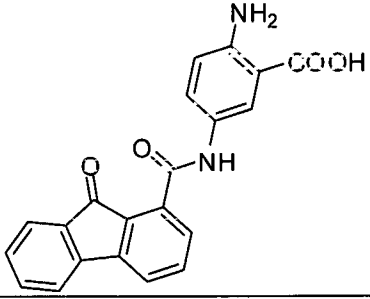
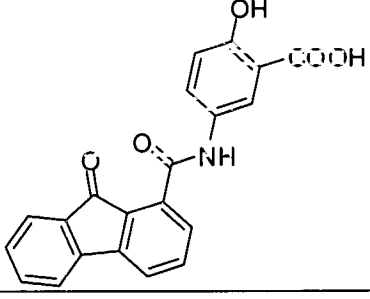
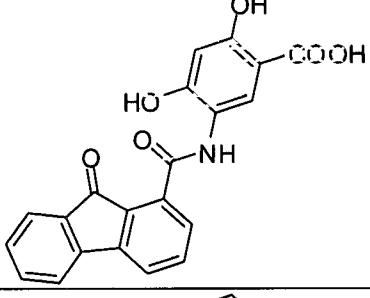
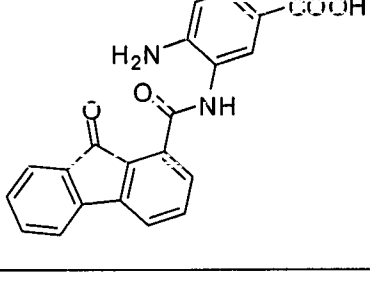
Compuest o	Nomenclatura IUPAC	Estructura
FIV-1	ácido 4-metoxi-3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-2	ácido 2-metoxi-5-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-3	ácido 3-metoxi-5-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-4	ácido 4-metil-3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-5	ácido 2-metil-5-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-6	2-fluoro-5-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico ácido	

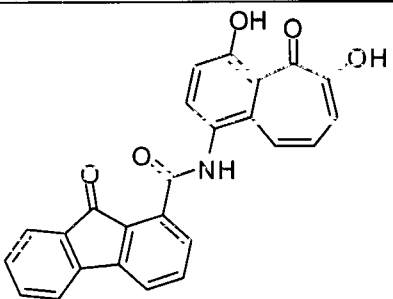
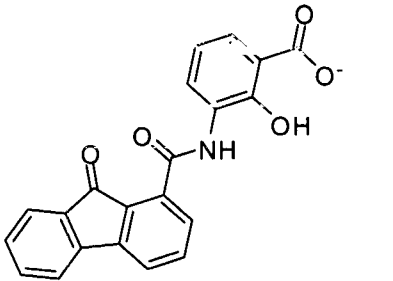
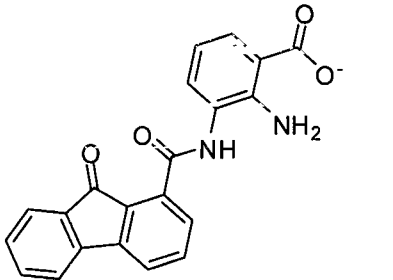
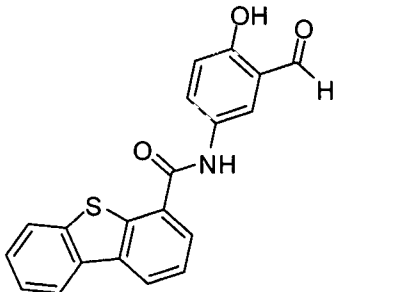
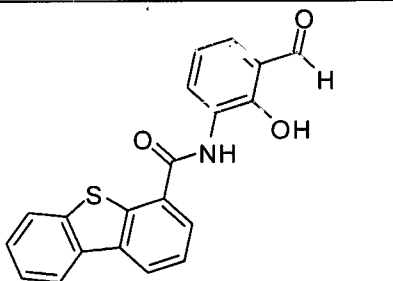
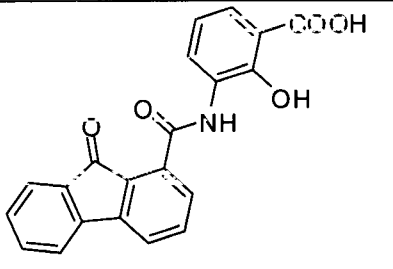
FIV-7	ácido 4-fluoro-3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-8	[1,8]naftiridin-4-ilamida de ácido 9-oxo-9H-fluoren-1-carboxílico	
FIV-9	ácido 3-[(9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-10	ácido 3-[(dibenzofuran-4-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-11	ácido 3-[(9H-carbazol-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-12	ácido 3-[(9-tioxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-13	ácido 3-[(dibenzotiofen-4-carbonil)-amino]-benzoico	

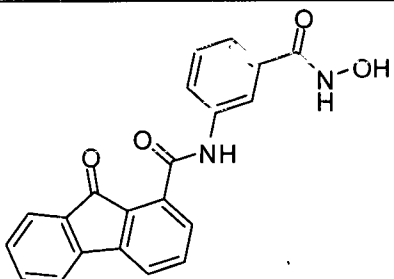
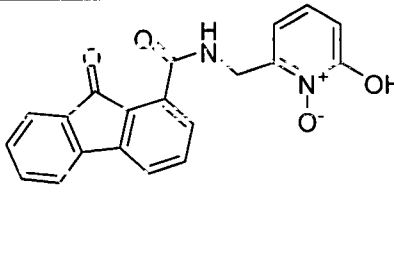
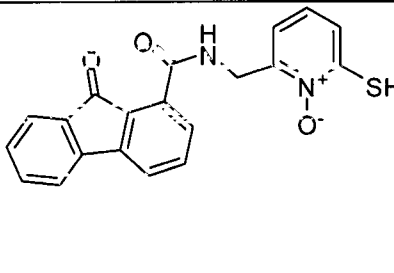
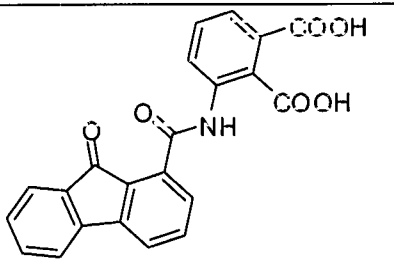
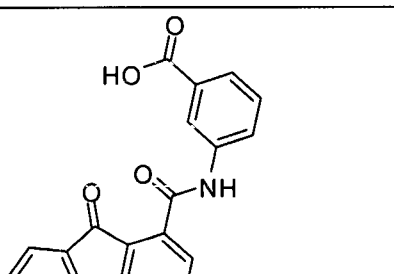
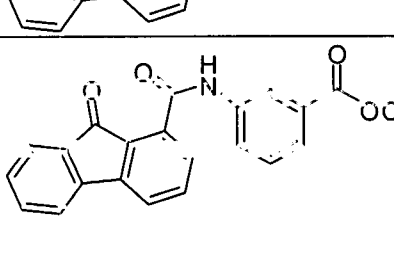
FIV-14	ácido 7-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico	
FIV-15	ácido 6-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzo[1,3]dioxol-4-carboxílico	
FIV-16	ácido 4-hidroxi-3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-17	ácido 1-metil-2-oxo-5-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-1,2-dihidro-piridin-3-carboxílico	
FIV-18	ácido 4-oxo-1-[2-oxo-2-(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-il)-etil]-1,4-dihidro-piridin-3-carboxílico	
FIV-19	ácido 4-oxo-1-[[9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-metil]-1,4-dihidro-piridin-3-carboxílico	

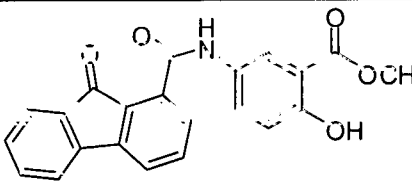
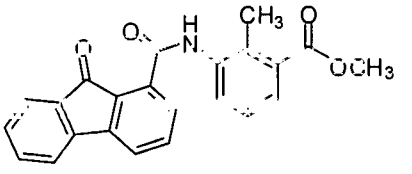
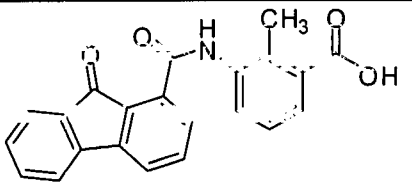
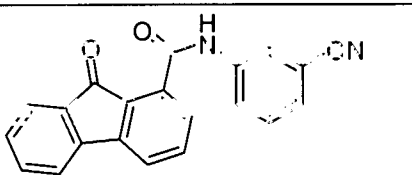
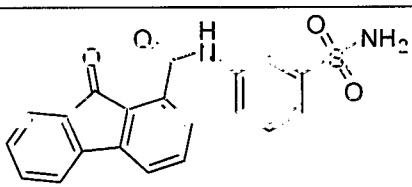
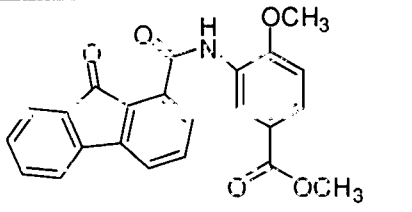
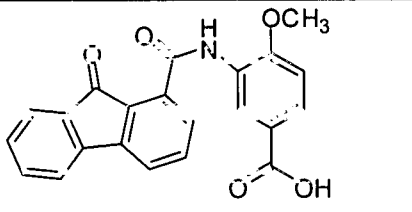
FIV-20	ácido 2-oxo-1-[[[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-metil]-1,2-dihidro-piridin-3-carboxílico	
FIV-21	ácido 1-[[[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-metil]-1 <i>H</i> -imidazol-4-carboxílico	
FIV-22	(5-hidroxi-4-oxo-4 <i>H</i> -piran-2-ilmetil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-23	(3,5-dihidroxi-4-oxo-4 <i>H</i> -piran-2-ilmetil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-24	(5-hidroxi-1-metil-4-oxo-1,4-dihidro-piridin-2-ilmetil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-25	(5-hidroxi-4-oxo-1,4-dihidro-piridin-2-ilmetil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	

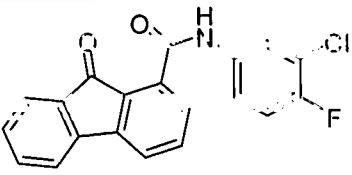
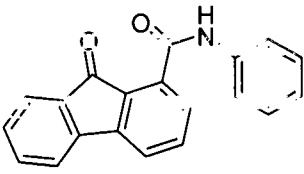
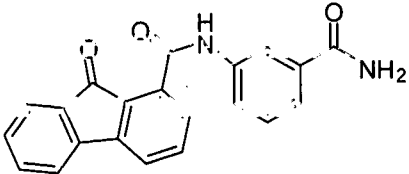
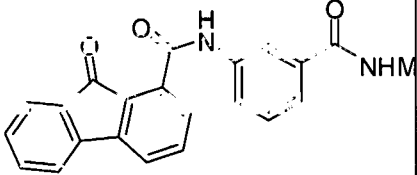
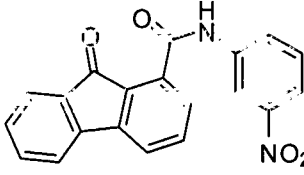
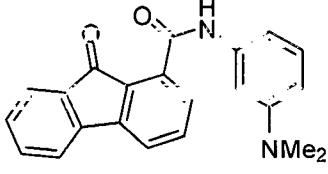
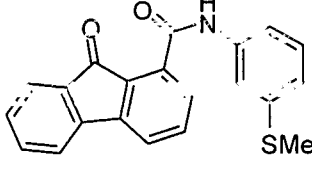
FIV-26	(3,5-dihidroxi-4-oxo-1,4-dihidropiridin-2-ilmetil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-27	ácido 3-hidroxi-5-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-28	ácido 3,4-dihidroxi-5-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-29	ácido (S)-amino-[3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-fenil]-acético	
FIV-30	ácido (R)-amino-[3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-fenil]-acético	
FIV-31	ácido (S)-hidroxi-[3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-fenil]-acético	

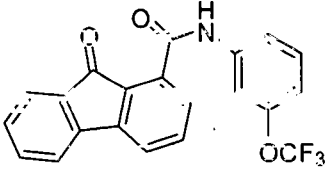
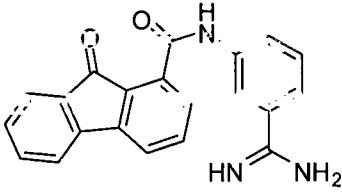
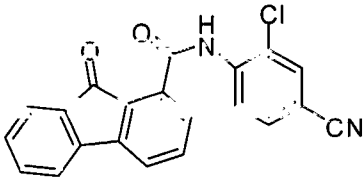
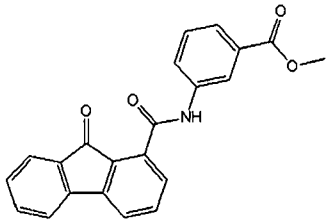
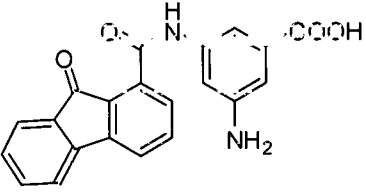
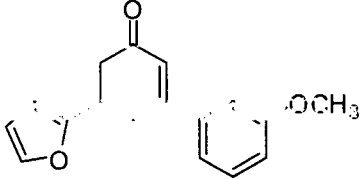
FIV-32	ácido (R)-hidroxi-[3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-fenil]-acético	
FIV-33	ácido 2,3-dihidroxi-5-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-34	ácido 2-amino-5-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-35	ácido 2-hidroxi-5-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-36	ácido 2,4-dihidroxi-5-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-37	ácido 4-amino-3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	

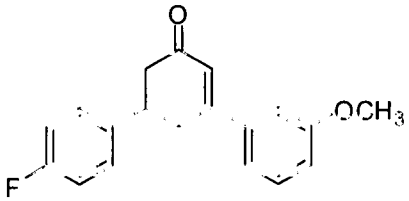
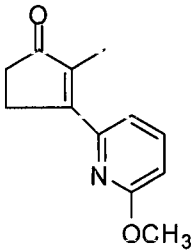
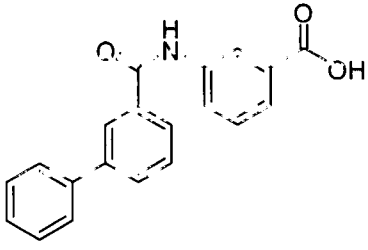
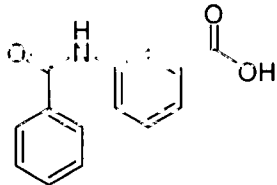
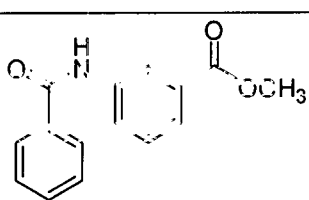
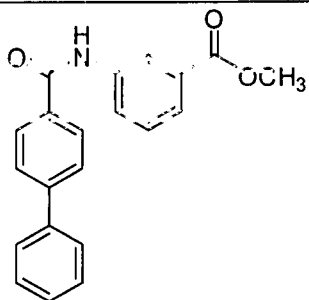
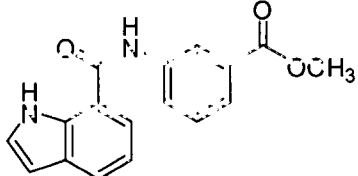
FIV-38	(4,6-dihidroxi-5-oxo-5 <i>H</i> -benzociclohepten-1-il)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-39	ácido 2-hidroxi-3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-40	ácido 2-amino-3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-41	(3-formil-4-hidroxi-fenil)-amida de ácido dibenzotiofen-4-carboxílico	
FIV-42	(3-formil-2-hidroxi-fenil)-amida de ácido dibenzotiofen-4-carboxílico	
FIV-43	ácido 2-hidroxi-3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	

FIV-46	(3-hidroxicarbamil-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9H-fluoren-1-carboxílico	
FIV-47	1-óxido de 2-hidroxi-6-((9-oxo-9H-fluoren-1-carboxamido)metil)piridina	
FIV-48	1-óxido de 2-mercapto-6-((9-oxo-9H-fluoren-1-carboxamido)metil)piridina	
FIV-49	ácido 3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-ftálico	
FIV-50	ácido 3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-51	metil éster de ácido 3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	

FIV-53	metil éster de ácido 2-hidroxi-5-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-54	metil éster de ácido 2-metil-3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-55	ácido 2-metil-3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-56	(3-ciano-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-57	(3-sulfamil-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-58	metil éster de ácido 4-metoxi-3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-59	ácido 4-metoxi-3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	

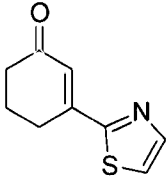
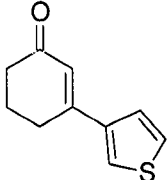
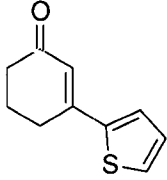
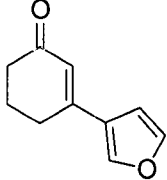
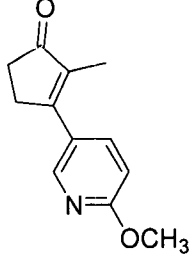
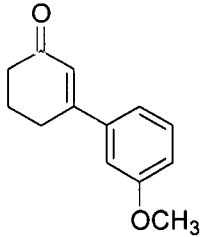
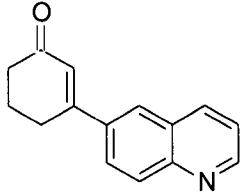
FIV-60	(3-cloro-4-fluoro-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-61	fenilamida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-62	(3-carbamil-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-63	(3-metilcarbamil-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-64	(4-nitro-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-65	(3-dimetilamino-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	
FIV-66	(3-metilsulfanil-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carboxílico	

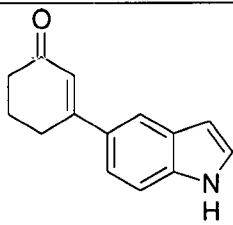
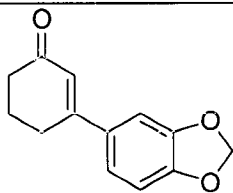
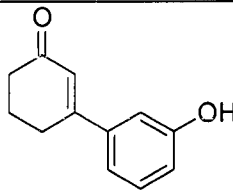
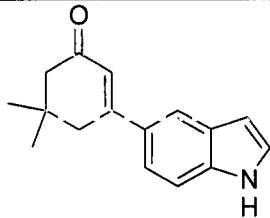
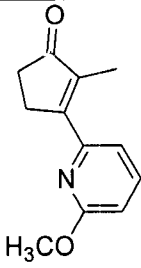
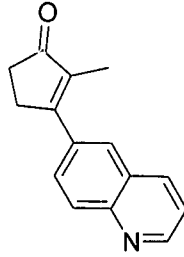
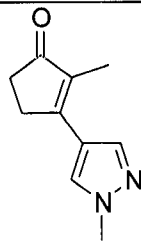
FIV-67	(3-trifluorometoxi-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1- carboxílico	
FIV-68	(3-carbamimidil-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1- carboxílico	
FIV-70	(2-cloro-4-ciano-fenil)-amida de ácido 9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1- carboxílico	
FIV-74		
FIV-75		
FI-1	5-furan-2-il-3-(3-metoxi-fenil)- ciclohex-2-enona	

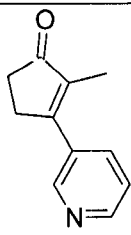
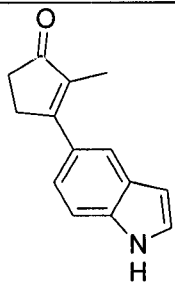
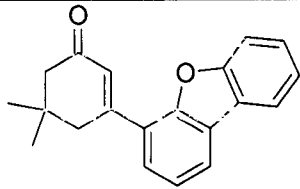
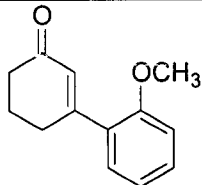
FI-2	5-(4-fluoro-fenil)-3-(3-metoxi-fenil)-ciclohex-2-enona	
FI-3	3-(6-metoxi-piridin-2-il)-2-metil-ciclopent-2-enona	
FVII-1	ácido 3-[(bifenil-3-carbonil)-amino]-benzoico	
FVI-1	ácido 3-benzoilamino-benzoico	
FVI-2	metil éster de ácido 3-benzoilamino-benzoico	
FVIII-1	metil éster de ácido 3-[(bifenil-4-carbonil)-amino]-benzoico	
FV-1	metil éster de ácido 3-[(1H-Indol-7-carbonil)-amino]-benzoico	

FV-2	ácido 3-[(1 <i>H</i> -Indol-7-carbonil)-amino]-benzoico	
FII-1		
FII-2	ácido 4-(3-metoxi-fenil)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3 <i>H</i> -ciclopenta[<i>c</i>]quinolin-7-carboxílico	
FIII-1	ácido 4-[(antracen-9-ilmetilen)-amino]-2-hidroxi-benzoico	
FIV-71	ácido 2-cloro-3-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FIV-72	ácido 5-amino-2-[(9-oxo-9 <i>H</i> -fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	

FIV-73	ácido 2-amino-5-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico	
FI-4	3-fenilciclohex-2-enona	
FI-5	3-piridin-3-il-ciclohex-2-enona	
FI-6	3-dibenzofuran-4-il-ciclohex-2-enona	
FI-7	3-benzo[b]tiofen-2-il-ciclohex-2-enona	
FI-8	3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-ciclohex-2-enona	
FI-9	3-(6-metoxi-piridin-2-il)-ciclohex-2-enona	

FI-10	3-tiazol-2-il-ciclohex-2-enona	
FI-11	3-tiofen-3-il-ciclohex-2-enona	
FI-12	3-tiofen-2-il-ciclohex-2-enona	
FI-13	3-furan-3-il-ciclohex-2-enona	
FI-14	3-(6-metoxi-piridin-3-il)-2-metil-ciclopent-2-enona	
FI-15	3-(3-metoxi-fenil)-ciclohex-2-enona	
FI-16	3-quinolin-6-il-ciclohex-2-enona	

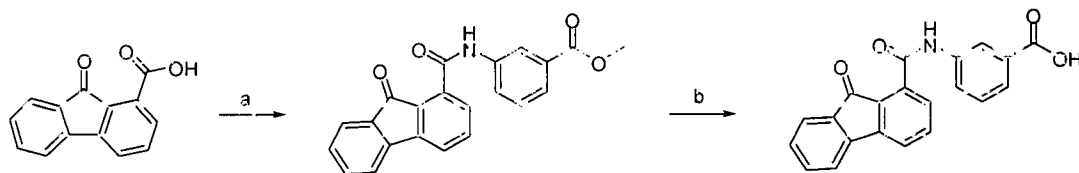
FI-17	3-(1 <i>H</i> -Indol-5-il)-ciclohex-2-enona	
FI-18	3-benzo[1,3]dioxol-5-il-ciclohex-2-enona	
FI-19	3-(3-hidroxi-fenil)-ciclohex-2-enona	
FI-20	3-(1 <i>H</i> -Indol-5-il)-5,5-dimetil-ciclohex-2-enona	
FI-21	3-(6-metoxi-piridin-2-il)-2-metil-ciclopent-2-enona	
FI-22	2-metil-3-quinolin-6-il-ciclopent-2-enona	
FI-23	2-metil-3-(1-metil-1 <i>H</i> -pirazol-4-il)-ciclopent-2-enona	

FI-24	2-metil-3-piridin-3-il-ciclopent-2-enona	
FI-25	3-(1 <i>H</i> -Indol-5-il)-2-metil-ciclopent-2-enona	
FI-26	3-dibenzofuran-4-il-5,5-dimetil-ciclohex-2-enona	
FI-27	3-(2-metoxi-fenil)-ciclohex-2-enona	

B. Ejemplos de métodos de síntesis

[0190] A continuación se describirán ejemplos de métodos para sintetizar compuestos del tipo de la fluorenona. Las reacciones a continuación son conocidas por aquellos entrenados en la técnica, y se incluyen a modo de ejemplo, pero no constituyen una limitación para los siguientes métodos. Como han de apreciarlo aquellos entrenados en la técnica, hay alternativas para los siguientes métodos de síntesis.

Química a escala de laboratorio:



Paso a: unión amida

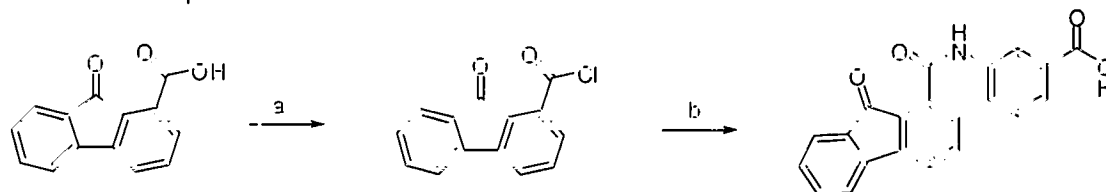
[0191] En un frasco de reacción fondo redondo de 100 ml, se agregó ácido 9-fluorenon-1-carboxílico (1,02 g, 4,55 mmol, 1 equiv.) y hexafluorofosfato de

(benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetilamino)fosfonio (BOP) (2,21 g, 5 mmol, 1,1 equiv.) y CH_3CN (50 ml). Luego se agregó diisopropil etil amina (diPEA) (13,6 mmol, 2,38 ml, 3,0 equiv.) y la mezcla de reacción se tornó homogénea. Después de agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se agregó 3-aminobenzoato de metilo (5 mmol, 0,76 g, 1,1 equiv.). La reacción se monitoreó por TLC y LCMS. Una vez completa la reacción, el producto se separó por precipitación. Los precipitados se filtraron y se lavaron con CH_2Cl_2 y H_2O , para proporcionar el producto deseado con 91% de rendimiento.

Paso b: separación del éster metílico

[0192] En un frasco de reacción de fondo redondo de 500 ml, se agregó 3-(9-oxo-9H-fluoren-1-carboxamido)benzoato de metilo (1,61 g, 4,5 mmol, 1 equiv.), $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0,57 g, 13,5 mmol, 3 equiv.) y THF: H_2O (100 ml: 100 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche. Una vez completada la reacción, lo que se monitoreó por TLC, se evaporó el solvente, se diluyó la mezcla en CH_2Cl_2 y se acidificó con HCl 0,5 M hasta que se alcanzó un pH de 6. Después, el sólido precipitado se filtró y se lavó con CH_2Cl_2 y H_2O , para proporcionar el producto deseado con 98% de rendimiento.

Química del proceso:



Paso a: formación de cloruro ácido

[0193] En un frasco de reacción de fondo redondo de 500 ml seco y pesado con antelación, equipado con una barra agitadora, se agregó ácido 3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-amino]-benzoico (88,7 mmol, 19,9 g) y cloruro de tionilo (200 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. Una vez completada la reacción, lo que se monitoreó por TLC, se eliminó el cloruro de tionilo por destilación. El sólido resultante se secó al vacío durante la noche para eliminar las cantidades traza de cloruro de tionilo y proporcionar el cloruro ácido en bruto con 97% de rendimiento.

Paso b: formación del enlace amida a través del cloruro ácido

[0194] A una solución agitada de ácido 3-aminobenzoico (13,4 g, 97,6 mmol, 1,1 equiv.) y trietilamina (44,9 ml, 322 mmol, 3,3 equiv.) disuelta en 120 ml de CH_2Cl_2 seco a 0°C se le agregó por goteo una solución de cloruro de 9-oxo-9H-fluoren-1-carbonilo (88,7 mmol, 1 equiv.) en 120 ml de CH_2Cl_2 seco. Se continuó con la agitación a 0°C por 1 hora, y luego a temperatura ambiente por 3 horas. Una vez completa la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con 100 ml de CH_2Cl_2 y se acidificó con HCl 2 N hasta que se alcanzó un pH de 3. El precipitado se filtró, se lavó con H_2O y CH_2Cl_2 , y se secó para proporcionar el producto deseado con 94% de rendimiento.

[0195] Si bien los anteriores son ejemplos de métodos, las composiciones de la presente invención, y cualquier derivado de ellas que sea funcionalmente activo, podrán obtenerse con cualquier medio apropiado. En realizaciones específicas, los derivados se sintetizan. Para la síntesis química de los derivados pueden emplearse técnicas bien conocidas y materiales de partida de fácil acceso. Estas transformaciones de síntesis pueden incluir, sin limitaciones, pasos de protección, desprotección, oxidación, reducción, unión de C-C cruzados catalizada con metales, unión de Heck o unión de Suzuki (véase, por ejemplo, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structures, 5ª edición, John Wiley and Sons, por Michael B. Smith y Jerry March, incorporado en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad)

VI. Tratamientos de combinación

[0196] En una realización, los compuestos de la invención pueden usarse en combinación con otros tratamientos. A continuación se describirán ejemplos de tratamientos de combinación; sin embargo, aquellos entrenados en la técnica han de conocer otros tratamientos que podrían aplicarse en combinación con la presente invención para proporcionarle un tratamiento adicional al sujeto.

A. Antibacterianos

[0197] Los antibacterianos generalmente se usan para reducir o prevenir la infección. Los ejemplos no limitativos de antibacterianos incluyen antibióticos antibacterianos, antibacterianos sintéticos, antibacterianos leprostáticos,

antibacterianos contra rickettsias, antibacterianos tuberculostáticos, o combinaciones de éstos. Los antibióticos son bien conocidos en la técnica, y aquellos entrenados en la técnica han de conocer cuáles antibióticos usar dependiendo de diversos factores conocidos, tales como el tipo de patógeno o la localización de la infección, por ejemplo. El tratamiento de una enfermedad con síntomas de diarrea con antibióticos también puede estar contraindicado, ya que esto puede resultar en infecciones subsiguientes, por ejemplo, con *Clostridium difficile* u otras bacterias, levaduras u hongos resistentes a múltiples drogas. Aquellos entrenados en la técnica han de conocer el tratamiento correcto. A continuación, se presentarán ejemplos de antibacterianos.

a) Antibióticos antibacterianos

[0198] Los ejemplos no limitativos de antibióticos antibacterianos incluyen un aminoglicósido (por ejemplo, amikacina, apramicina, arbekacina, una bambermicina, butirosina, dibekacina, dihidrostreptomycin, una fortimicina, gentamicina, isepamicina, kanamicina, micronomicina, neomicina undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, espectinomicina, estreptomycin, streptonicozid, tobramicina), un anfenol (por ejemplo, azidanfenicol, cloranfenicol, palmitato de cloranfenicol, pantotenato de cloranfenicol, florfenicol, tianfenicol), una ansamicina (por ejemplo, rifamida, rifampina, rifamicina, rifaximina), una β -lactama (por ejemplo, un carbapenem, una cefalosforina, una cefamicina, una monobactama, un oxacefem, una penicilina), una lincosamida (por ejemplo, clindamicina, lincomicina), un marcólido (por ejemplo, azitromicina, carbomicina, claritromicina, acistrato de eritromicina, estolato de eritromicina, glucoheptonato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, propionato de eritromicina, estearato de eritromicina, josamicina, leucomicina, midecamicina, miokamicina, oleandomicina, primicina, primicina, rokitamicina, rosaramicina, roxitromicina, espiramicina, troleandomicina), polipéptidos (por ejemplo, amfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, fusagungina, una gramicidina, una gramicidina S, mikamicina, polimixina, ácido polimixin B-metansulfónico, pristamicina, ristocetina, teicoplanina, tiostreptona, tuberactinomicina, tirocidina,

tirotricina, vancomicina, viomicina, pantotenato de viomicina, virginiamicina, bacitracina de cinc), tetraciclina (por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina, demeclociclina, doxiciclina, guameciclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, penimepiciiclina, pipaciclina, rolitetraciclina, sanciclina, senociclina, tetraciclina) o un antibiótico antibacteriano misceláneo (por ejemplo, cicloserina, mupirocina, tuberina).

[0199] Los ejemplos no limitativos de una β -lactama de carbapenem incluyen imipenem. Los ejemplos no limitativos de una β -lactama de cefalosporina incluyen cefaclor, cefadroxil, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefazolina, cefixima, cefmenoxima, cefodizima, cefonicid, cefoperazona, ceforanida, cefotaxima, cefotiam, cefpimizol, cefpiramida, proxetil cefpodoxima, cefroxadina, cefsulodina, ceftazidima, cefteteram, cftazol, ceftibuten, ceftizoxima, ceftriaxona, cefuroxima, cefuzonam, cephacetril sodio, cefalexina, cefaloglicina, cefaloridina, cefalosporina C, cefalotina, cefapirin sodio, cefradina y pivcefalexin. Los ejemplos no limitativos de una β -lactama de cefamicina incluyen cefbuperazona, cefmetazol, cefminox, cefotetan y cefoxitin. Los ejemplos no limitativos de una β -lactama de monobactam incluyen aztreonam, carumonam y tigemonam. Los ejemplos no limitativos de una β -lactama de oxacefem incluyen flomoxef y moxolactama. Los ejemplos no limitativos de una β -lactama de penicilina incluyen amidinociclina, pivoxil amdinociclina, amoxiciclina, ampiciclina, apalciclina, aspoxiciclina, azidociclina, azlociclina, bacampiciclina, ácido bencilpenicilínico, bencilpeniciclina sodio, carbeniciclina, carfeciclina sodio, carindaciclina, clometociclina, cloxaciclina, ciclaciclina, dicloxaciclina difeniciclin sodio, epiciclina, fenbeniciclina, floxaciclina, hetaciclina, lenampiciclina, metampiciclina, meticiclina sodio, mezlociclina, nafciclina sodio, mezlociclina, nafciclina sodio, oxaciclina, penameciclina, hidridida de penetamato, peniciclina G benetiamina, peniciclina G benzatina, peniciclina G benzhidrilamina, peniciclina G calcio, peniciclina G hidrabamina, peniciclina G potasio, peniciclina G procaína, peniciclina N, peniciclina O, peniciclina V, peniciclina V benzatina, peniciclina V hidrabamina, penimepiciiclina, feneticiclina potasio, piperaciclina, pivampiciclina, propiciclina, quinaciclina, sulbeniciclina, talampiciclina, temociclina y ticarciclina.

b) Antibacterianos sintéticos

[0200] Los ejemplos no limitativos de antibacterianos sintéticos incluyen 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprim, tetroxoprim, trimetoprim), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona, cloruro de furazolio, nifuradeno, nifuratel, nifurfolina, nifurpirinol, nifurprazina, nifurtoinol, nitrofurantion), quinolonas y análogos de quinona (por ejemplo, amifoxacina, cinoxacina, ciprofloxacina, levofloxacina, difloxacina, enoxacina, fleroxacina, flumequina, lomefloxacina, miloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, ácido oxolínico, pefloxacina, ácido pipemídico, ácido piromídico, rosoxacina, temafloxacina, tosulfoxacina), sulfonamidas (por ejemplo, acetil sulfamehtoxipraxina, acetil sulfisoxazol, azosulfamida, bencilsulfamida, cloramina-B, cloramina-T, dicloramina T, formosulfatiazol, N^2 -formilsulfisomidina, N^4 - β -D-glucosilsulfanilamida, mafenida, 4'-(metilsulfanoil)sulfanilamida, p-nitrosulfatiazol, ftalilsulfacetamida, ftalilsulfatiazol, salazosulfadimidina, succinilsulfatiazol, sulfabenzamida, sulfacetamida, sulfaclorpiridazina, sulfacrisoidina, sulfacitina, sulfadiazina, sulfadicramida, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfaetidol, sulfaguanidina, sulfaguanol, sulfaleno, ácido sulfalóxico, sulfamerazina, sulfaméter, sulfametazina, sulfametizol, sulfametomidina, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfametrol, sulfamidocrisoidina, sulfamoxol, sulfanilamida, sal de trietanolamina de ácido sulfanilamidometansulfónico, ácido 4-sulfanilamidosalicílico, N^4 -sulfanililsulfanilamida, sulfanililurea, N-sulfanilil-3,4-xilamida, sulfanitran, sulfaperina, sulfafenazol, sulfaproxilina, sulfapirazina, sulfapiridina, sulfasomizol, sulfasimazina, sulfatiazol, sulfatiourea, sulfatolamida, sulfisomidina, sulfisoxazol), sulfonas (acedapsona, acediasulfona, acetosulfona sodio, dapsona, diatimosulfona, glucosulfone sodio, solasulfona, succisulfona, ácido sulfanílico, p-sulfanililbencilamina, p,p'-sulfonildianilin-N,N'diagalactosida, sulfoxona sodio, tiazolsulfona), y antibacterianos sintéticos misceláneos (por ejemplo, clofoctol, hexedina, metenamina, anhidrometilen-citrato de metenamina, hipurato de metenamina, mandelato de metenamina, sulfosalicilato de metenamina, nitroxolina, xibornol).

c) Antibacterianos leprostáticos

[0201] Los ejemplos no limitativos de antibacterianos leprostáticos incluyen acedapsona, acetosulfona sodio, clofazimina, dapsona, diatimosulfona, glucosulfona sodio, ácido hidnocárpico, solasulfona, succisulfona y sulfoxona sodio.

d) Antibacterianos contra rickettsias

Los ejemplos no limitativos de antibacterianos contra rickettsias, también conocidos como antirickettsianos, incluyen ácido *p*-aminobenzoico, cloranfenicol, palmitato de cloranfenicol, pantotenato de cloranfenicol y tetraciclina.

e) Antibacterianos tuberculostáticos

[0202] Los ejemplos no limitativos de antibacterianos tuberculostáticos incluyen ácido *p*-aminosalicílico, ácido *p*-aminosalicílico, hidrazina, benzoilpas, ácido 5-bromosalicilhidroxámico, capreomicina, clofazimina, ciacetacida, cicloserina, dihidroestreptomina, enviomina, etambutol, etionamida, ácido 4'-formilsuccinanílico, tiosemicarbazona, furonazida, gliconiazida, isobutol, isoniazida, metansulfonato de isoniazid, morfazinamida, opiniazida, parsiniazida, aminosalicilato de fenilo, protionamida, pirazinamida, rifampina, salinazida, estreptomina, subatizona, sulfoniazida, tiacetazona, tiocarilda, tuberactinomicina, tubercidina, tuberina verazida, viomicina y pantotenato de vicmicina.

B. Antiinflamatorios

[0203] Los agentes antiinflamatorios son agentes que disminuyen las señales y los síntomas de la inflamación. Aquellos entrenados en la técnica han de conocer una amplia variedad de agentes antiinflamatorios. Los agentes antiinflamatorios de uso más común son los agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), que operan inhibiendo la producción de prostaglandinas. Los ejemplos no limitativos incluyen, ibuprofeno, cetoprofeno, piroxicam, naproxeno, naproxeno sodio, sulindac, aspirina, subsalicilato de colina, diflunisal, oxaprozin, diclofenac sodio de liberación demorada, diclofenac potasio de liberación inmediata, etodolac, cetorolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, fenamatos, meclofenamato, ácido mefenámico, nabumetona, oxicam, piroxicam, salsalato, tolmetina y salicilato de magnesio. Otro grupo de agentes antiinflamatorios comprende los agentes

antiinflamatorios potentes basados en esteroides, por ejemplo, los corticosteroides, por ejemplo, y sin limitaciones, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona y triamcinolona. Varios de estos agentes antiinflamatorios están disponibles bajo nombres comerciales bien conocidos, por ejemplo, los NSAID que comprenden ibuprofeno incluyen Advil, Motrin IB, Nuprin; los NSAID que comprenden acetaminofenos incluyen Tylenol; los NSAID que comprenden naproxeno incluyen Aleve.

C. Drogas antidiarreicas

[0204] Es posible usar cualquier droga antidiarreica en combinación con la presente invención. Los ejemplos de drogas antidiarreicas incluyen loperamida, subnitrato de bismuto, subcarbonato de bismuto o cloruro de berberina, bisacodilo, hidróxido de magnesio, loperamida, difenoxilato, y dioctil sulfosuccinato de sodio.

D. Otros

[0205] Aquellos entrenados en la técnica han de conocer otros tratamientos específicos y drogas adicionales que podrán usarse con la presente invención. En una realización, la invención comprende además drogas inhibidoras de LT. En una realización específica, la droga inhibidora de LT se selecciona del grupo que consiste en bestatina, captopril, adefovir, y cualquier combinación de éstas.

VII. Preparaciones farmacéuticas

[0206] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de uno o más de compuestos reivindicados en la invención, eventualmente junto con agentes adicionales, disuelto o dispersado en un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. La frase "aceptable para el uso farmacéutico o farmacológico" hace referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o de otra naturaleza cuando se las administra a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos uno de los compuestos de la invención o un ingrediente activo adicional ha de ser conocida por aquellos entrenados en la técnica al tomar en consideración la presente descripción, y se presentan ejemplos de dicha preparación en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición. Mack Printing Company, 1990,

incorporado en la presente documentación a modo de referencia. Más aún, para la administración a animales (por ejemplo, seres humanos), ha de comprenderse que las preparaciones deberán satisfacer regulaciones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, tal como lo requiere la Oficina de Regulaciones Biológicas de la FDA.

[0207] Como se lo usa en la presente documentación, un "vehículo aceptable para el uso farmacéutico" incluye cualquier solvente, medio de dispersión, recubrimiento, agente tensioactivo, antioxidante, preservante (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agente isotónico, agente para demorar la absorción, sal, preservante, droga, estabilizador de drogas, gel, aglutinante, excipiente, agente desintegrador, lubricante, agente edulcorante, agente saborizante, colorante, y materiales similares y combinaciones de éstos, como ha de ser conocido para aquellos entrenados en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 13^a edición. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, incorporado en la presente documentación a modo de referencia). Excepto cuando un vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contemplará su uso en las composiciones farmacéuticas.

[0208] El compuesto de la invención puede comprender distintos tipos de vehículos, dependiendo de su forma de administración, es decir, en forma sólida líquida o de aerosol, y si será necesario que sea estéril para rutas de administración tales como la inyección. La presente invención puede administrarse por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intramuscular, subcutánea, mucosal, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, por inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada para bañar directamente las células blanco, a través de un catéter, a través de un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o con cualquier otro método o cualquier combinación de los anteriores que sea conocida para aquellos entrenados en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's

Pharmaceutical Sciences, 18ª edición. Mack Printing Company, 1990, incorporado en la presente documentación a modo de referencia).

[0209] La composición de la invención puede formularse en una composición en forma de base libre, en una forma neutra o en forma de sal. Las sales aceptables para el uso farmacéutico incluyen las sales de adición ácida, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteica, o aquellas que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaina. Una vez formuladas, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación a dosificar, y en una cantidad que sea efectiva para el uso terapéutico. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como aquellas formuladas para una administración parenteral como soluciones inyectables, o aerosoles para una administración pulmonar, o pueden formularse para una administración por vía alimentaria, tal como en forma de cápsulas liberadoras de drogas, y semejantes.

[0210] Además, de acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición de la presente invención que es apropiada para la administración en un vehículo aceptable para el uso farmacéutico, con o sin un diluyente inerte. El vehículo debería ser asimilable, e incluye vehículos líquidos, semisólidos, es decir, pastas, o sólidos. Excepto cuando el medio, el agente, el diluyente o el vehículo convencional sea perjudicial para el receptor o la efectividad terapéutica de la composición contenida en él, su uso en la composición para administración que se empleará en la práctica de los métodos de la presente invención ha de ser apropiado. Los ejemplos de vehículos o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, rellenos, y semejantes, o combinaciones de éstos. La composición también puede comprender diversos antioxidantes para demorar la oxidación de uno o más

componentes. Adicionalmente, es posible efectuar la prevención de la acción de los microorganismos con preservantes, tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, sin limitaciones, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, o combinaciones de éstos.

[0211] De acuerdo con la presente invención, la composición se combina con el vehículo de cualquier manera conveniente y práctica, es decir, por solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, absorción, y semejantes. Estos procedimientos son de uso común para aquellos entrenados en la técnica.

[0212] En una realización específica de la presente invención, la composición se combina o se mezcla exhaustivamente con un vehículo semisólido o sólido. La mezcla puede efectuarse de cualquier manera conveniente, tal como por trituration. También pueden agregarse agentes estabilizadores en el proceso de mezcla para proteger la composición de la pérdida de actividad terapéutica, es decir, la desnaturalización en el estómago. Los ejemplos de estabilizadores para usar en una composición incluyen amortiguadores, aminoácidos tales como glicina y lisina, hidratos de carbono, tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etcétera.

[0213] En otras realizaciones, la presente invención puede relacionarse con el uso de un vehículo farmacéutico lipídico para las composiciones que incluyen un compuesto y/o una composición de la invención, uno o más lípidos, y un solvente acuoso. Como se lo usa en la presente documentación, el término "lípidos" incluye cualquiera de una amplia variedad de sustancias que típicamente son insolubles en agua y pueden extraerse con un solvente orgánico. Esta clase amplia de compuestos son bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica, y tal como el término "lípidos" se usa en la presente documentación, no se halla limitado a una estructura en particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípidos puede ser de ocurrencia natural o sintético (es decir, puede haber sido diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, un lípidos comúnmente es una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, grasas

neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicoesfingolípidos, glicolípidos, sulfátidos, lípidos con éter y ácidos grasos con enlaces éster, y lípidos polimerizables, y combinaciones de éstos. Por supuesto, los compuestos distintos de aquellos descritos en la presente documentación, que también sean conocidos por aquellos entrenados en la técnica como lípidos, estarán incluidos igualmente en las composiciones y los métodos de la presente invención.

[0214] Aquellos entrenados en la técnica han de conocer una amplia variedad de procedimientos que pueden emplearse para dispersar una composición en un vehículo lipídico. Por ejemplo, el compuesto de la invención puede dispersarse en una solución que contiene un lípido, puede disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse de forma covalente a un lípido, contenerse como una suspensión en un lípido, contenerse o unirse en complejos con una micela o un liposoma, o asociarse de otro modo con un lípido o una estructura lipídica, por cualquier medio conocido por aquellos entrenados en la técnica. La dispersión puede resultar o no en la formación de liposomas.

[0215] La cantidad dosificada real de una composición de la presente invención administrada a un paciente animal puede determinarse sobre la base de factores físicos y fisiológicos, tales como el peso corporal, la severidad de la condición, el tipo de enfermedad a tratar, las intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, la idiopatía del paciente y la ruta de administración. Dependiendo de la dosificación y la ruta de administración, la cantidad a administrar de una dosificación preferida y/o una cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la respuesta del sujeto. En cualquier caso, el médico a cargo de la administración determinará la concentración de los uno o más ingredientes activos en una composición, y la o las dosis apropiadas para el sujeto individual.

[0216] En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1% de un compuesto activo. En otras realizaciones, el compuesto activo puede constituir entre aproximadamente 2% y aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre

aproximadamente 25% y aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier rango derivado de dichos valores. Naturalmente, la cantidad de los uno o más compuestos activos en cada composición de utilidad terapéutica podrá fijarse de modo tal que se obtenga una dosificación apropiada en cualquier dosificación individual dada del compuesto. Cuando preparen dichas formulaciones farmacéuticas, aquellos entrenados en la técnica han de contemplar factores tales como la solubilidad, la biodisponibilidad, la vida media biológica, la ruta de administración, la vida de almacenamiento del producto, y también otras consideraciones farmacológicas, por lo que puede ser deseable una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

[0217] En otros ejemplos no limitativos, una dosis también puede comprender entre aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, y aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal, o más, por administración, y cualquier rango que derive de los valores anteriores. En ejemplos no limitativos de un rango que deriva de los valores indicados en la presente documentación, puede administrarse un rango de entre aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal y aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, entre aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal y aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etcétera, sobre la base de las cantidades descriptas con anterioridad.

A. Composiciones y formulaciones alimenticias

[0218] En determinadas realizaciones de la presente invención, los compuestos de la invención se formulan para administrarlos a través de una ruta alimentaria. Las rutas alimentarias incluyen todas las rutas de administración posibles donde la composición se halla en contacto directo con el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente documentación pueden administrarse por vía oral, bucal, rectal o sublingual. Por lo tanto, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable, pueden encerrarse en cápsulas de gelatina duras o blandas, pueden comprimirse en tabletas, o pueden incorporarse directamente en la alimentación que constituye la dieta.

[0219] En determinadas realizaciones, los compuestos activos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, grageas, y semejantes (Matiowitz *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1998; Patentes de los EEUU N° 5641515, 5580579 y 5792451, cada una incorporada específicamente en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad). Las tabletas, las pastillas, las píldoras, las cápsulas, y semejantes, también pueden contener los siguientes ingrediente: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma tragacanto, acacia, almidón de maíz, gelatina, o combinaciones de éstos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato de dicalcio, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, o combinaciones de éstos; un agente desintegrador, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico, o combinaciones de éstos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina, o combinaciones de éstos; un agente saborizante, tal como, por ejemplo, menta salvaje, aceite de gaulteria, sabor a cereza, sabor a naranja, etcétera. Cuando la forma de dosificación individual es una cápsula, además de los materiales del tipo anterior, puede contener un vehículo líquido. Puede haber presentes otros materiales diversos, tales como recubrimientos o materiales de otro tipo, para modificar la forma física de la dosis

individual. Por ejemplo, las tabletas, las píldoras o las cápsulas pueden estar recubiertas con goma laca, azúcar, o ambas. Cuando la forma de dosificación es una cápsula, además de los materiales del tipo anterior, puede contener vehículos tales como un vehículo líquido. Las cápsulas de gelatina, las tabletas o las píldoras pueden tener un recubrimiento entérico. Los recubrimientos entéricos previenen la desnaturalización de la composición en el estómago o la primera porción del intestino, donde el pH es ácido. Véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU N° 5629001. Una vez que alcanzan el intestino delgado, el pH básico disuelve el recubrimiento y permite que la composición sea liberada y absorbida por células especializadas, por ejemplo, enterocitos epiteliales y células M de Peyer. Un jarabe o un elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenes como preservantes, un colorante y un saborizante, tal como sabor a cereza o naranja. Por supuesto cualquier material usado en la preparación de las formas de dosificación debería ser puro desde el punto de vista farmacéutico y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

[0220] Para la administración oral, las composiciones de la presente invención pueden incorporarse como alternativa con uno o más excipientes, en forma de un lavado bucal, un dentífrico, una tableta bucal, un rocío oral o una formulación oral de administración sublingual. Por ejemplo, puede prepararse un lavado bucal incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado, tal como una solución de borato de sodio (solución de Dobell). Como alternativa, el ingrediente activo puede incorporarse en una solución oral, tal como una que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o puede dispersarse en un dentífrico o agregarse en una cantidad eficaz para el uso terapéutico a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes saborizantes, agentes espumantes y humectantes. Como alternativa, a las composiciones puede dársele la forma de una tableta o una solución que puede colocarse bajo la lengua o disolverse en la boca de otro modo.

[0221] Otras formulaciones que son apropiadas para otros modos de administración alimentaria incluyen los supositorios. Los supositorios son formas de dosificación sólidas con diversos pesos y formas, que comúnmente se median para insertarlas en el recto. Una vez insertados, los supositorios se ablandan, se funden o se disuelven en los fluidos en la cavidad. En general, para los supositorios, los vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles, triglicéridos, o combinaciones de éstos. En determinadas realizaciones, los supositorios pueden prepararse a partir de mezclas que contienen, por ejemplo, el ingrediente activo en un rango de entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 10%, y en determinadas realizaciones, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 2%.

B. Composiciones y formulaciones parenterales

[0222] En otras realizaciones, el compuesto de la invención puede administrarse a través de la ruta parenteral. Como se lo usa en la presente documentación, el término "parenteral" incluye rutas que atraviesan el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente documentación pueden administrarse, por ejemplo, pero sin limitaciones, por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea o intraperitoneal. Patentes de los EEUU N° 6613308, 5466468, 5543158, 5641515 y 5399363 (cada una incorporada específicamente en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad).

[0223] Pueden prepararse soluciones de los compuestos activos como bases libres o sales aceptables para el uso farmacológico en agua mezclada apropiadamente con un agente tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de éstos, y en aceites. Bajo condiciones de almacenamiento y uso convencionales, estas preparaciones contienen un preservante para prevenir el desarrollo de microorganismos. Las formas farmacéuticas apropiadas para el uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (Patente de los EEUU N° 5466468, incorporada específicamente en la

presente documentación a modo de referencia en su totalidad). En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida para que sea fácil de inyectar. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (es decir, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y semejantes), mezclas apropiadas de éstos, y/o aceites vegetales. Es posible mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y usando agentes tensioactivos. La acción de los microorganismos puede prevenirse con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenes, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y semejantes. En muchos casos, pueden usarse agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede obtenerse una absorción prolongada de las composiciones inyectables usando agentes que demoran la absorción en las composiciones, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0224] Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería amortiguarse, de ser necesario, y el diluyente líquido primero debería tornarse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente apropiadas para una administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Con relación a esto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse han de ser conocidos para aquellos entrenados en la técnica, tomando en consideración la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en una solución isotónica de NaCl, y puede agregársele fluido de hipodermocclisis o puede inyectársela en el sitio propuesto para la infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Será necesario que haya una variación en la dosificación, dependiendo de la condición del sujeto a tratar. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Más aún, para la administración en seres humanos, las preparaciones deberían satisfacer

regulaciones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, tal como lo requiere la Oficina de Regulaciones Biológicas de la FDA.

[0225] Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado, con varios de los otros ingredientes enumerados con anterioridad, según sea necesario, a lo que seguirá una esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos, seleccionados entre aquellos enumerados con anterioridad. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, dos ejemplos de métodos de preparación son las técnicas de secado al vacío y secado por congelamiento, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado proveniente de una so esterilizada por filtración con antelación. Una composición en polvo se combina con un vehículo líquido, tal como, por ejemplo, agua o una solución salina, con o sin un agente estabilizador.

C. Composiciones y formulaciones farmacéuticas misceláneas

[0226] En otras realizaciones de la invención, el compuesto activo de la invención puede formularse para una administración a través de rutas misceláneas, por ejemplo, la administración tópica (es decir, transdérmica), la administración mucosal (intranasal, vaginal, etcétera) y/o por inhalación.

[0227] Las composiciones para administración tópica pueden incluir el compuesto activo formulado para una aplicación médica, tal como un ungüento, una pasta, una crema o un polvo. Los ungüentos incluyen todas las composiciones oleaginosas, para adsorción, emulsión y con una base soluble en agua para aplicación tópica, mientras que las cremas y las lociones son aquellas composiciones que incluyen solamente una base de emulsión. Las medicaciones administradas por vía tópica pueden contener un potenciador de la penetración para facilitar la adsorción de los ingredientes activos a través de la piel. Los potenciadores de la penetración apropiados incluyen glicerina, alcoholes, alquil metil sulfóxidos, pirrolidonas y laurocapram. Las bases posibles para las

composiciones para aplicación tópica incluyen polietilenglicol, lanolina, crema fría y vaselina, y también otra base apropiada para la absorción, la emulsión o un ungüento soluble en agua. Las preparaciones tópicas también pueden incluir emulsionantes, agentes gelificantes y preservantes antimicrobianos, según sea necesario, para preservar el ingrediente activo y proporcionar una mezcla homogénea. La administración transdérmica de la presente invención también puede comprender el uso de un "parche". Por ejemplo, el parche puede proporcionar una o más sustancias activas a una velocidad predeterminada y de forma continua durante un período de tiempo fijo.

[0228] En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por medio de gotas para los ojos, rocíos intranasales, por inhalación, y/o con vehículos para la administración en forma de aerosol. Los métodos para administrar las composiciones directamente en los pulmones a través de un aerosol de rocío nasal han sido descritos, por ejemplo, en las Patentes de los EEUU N° 5756353 y 5804212 (cada una incorporada específicamente en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad). Del mismo modo, la administración de drogas usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga *et al.*, 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente de los EEUU N° 5725871, incorporada específicamente en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad) también es bien conocida en la técnica farmacéutica. De la misma manera, la administración transmucosal de drogas drug en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la Patente de los EEUU N° 5780045 (incorporada específicamente en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad).

[0229] El término aerosol hace referencia a un sistema coloidal de partículas sólidas finamente divididas dispersadas en un propelente gaseoso licuado o a presión. El aerosol típico de la presente invención para inhalación consistirá en una suspensión de los ingredientes activos en un propelente líquido o una mezcla de un propelente líquido y un solvente apropiado. Los propelentes apropiados incluyen hidrocarburos y éteres de hidrocarburos. Los recipientes apropiados variarán de acuerdo con los requerimientos de presión del propelente. La

administración del aerosol variará de acuerdo con la edad y el peso del sujeto, y la severidad y la respuesta de los síntomas.

VIII. Conjuntos de elementos

[0230] Cualquiera de las composiciones descritas en la presente documentación puede estar incluida en un conjunto de elementos. En un ejemplo no limitativo, la composición de la invención, un lípido y/o un agente adicional pueden estar incluidos en un conjunto de elementos. Por consiguiente, los conjuntos de elementos comprenderán, en un medio apropiado, la composición de la invención, un lípido y/o un agente adicional de la presente invención.

[0231] Los conjuntos de elementos pueden comprender una composición en alícuotas apropiadas, un lípido y/o composiciones de agentes adicionales de la presente invención, con o sin marcas, del modo en que se las usaría para preparar una curva de calibración para un ensayo de detección. Los componentes de los conjuntos de elementos pueden estar envasados en medios acuosos o en formas liofilizadas. Los medios para alojar los conjuntos de elementos generalmente incluirán al menos un recipiente, un tubo de ensayo, un frasco, una botella, una jeringa u otro recipiente apropiado en el cual un componente pueda colocarse y dividirse en alícuotas apropiadas. Cuando haya más de un componente en el conjunto de elementos, el conjunto de elementos generalmente también contendrá un segundo, tercer, u otro recipiente adicional donde puedan colocarse los otros componentes por separado. Sin embargo, puede haber varias combinaciones de componentes en un recipiente. Los conjuntos de elementos de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener un compuesto de la invención, un lípido, un agente adicional, y cualquier otro recipiente con reactivos, en un envase de un tamaño apropiadamente pequeño para la comercialización. Estos recipientes pueden incluir envases plásticos moldeados por inyección o soplado donde se retienen los recipientes deseados.

[0232] Los conjuntos de elementos terapéuticos de la presente invención son conjuntos de elementos que comprenden un compuesto químico de la invención o una sal de éste aceptable para el uso farmacéutico, una proteína, un polipéptido, un inhibidor, un gen, un vector y/u otros efectores. Estos conjuntos de elementos

generalmente contendrán, en un medio de alojamiento apropiado, una formulación aceptable para el uso farmacéutico formulación de un compuesto químico de la invención, o una sal de éste aceptable para el uso farmacéutico, en una formulación aceptable para el uso farmacéutico. El conjunto de elementos puede tener un solo recipiente y/o puede tener distintos recipientes para cada compuesto.

[0233] Cuando los componentes del conjunto de elementos se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, y también puede usarse una solución acuosa estéril. Las composiciones también pueden formularse en una composición para colocar en una jeringa, en cuyo caso, el recipiente puede ser una jeringa, una pipeta y/u otra forma similar, tal como un aparato con el cual la formulación pueda aplicarse en un área infectada del cuerpo, inyectarse en un animal y/o incluso aplicarse y/o mezclarse con los otros componentes del conjunto de elementos.

[0234] Sin embargo, los componentes del conjunto de elementos pueden proporcionarse como uno o más polvos secos. Cuando los reactivos y/o los componentes se proporcionan como un polvo seco, este polvo puede reconstituirse agregando un solvente apropiado. Se contempla que el solvente también pueda proporcionarse en otro recipiente.

[0235] El recipiente generalmente incluirá al menos un vial, un tubo de ensayo, un frasco, una botella, una jeringa y/u otro medio de alojamiento donde un compuesto químico de la invención en una formulación pueda colocarse y localizarse apropiadamente. Los conjuntos de elementos también pueden comprender un segundo recipiente para contener un amortiguador estéril aceptable para el uso farmacéutico y/u otro diluyente.

[0236] Los conjuntos de elementos de la presente invención también incluirán típicamente un medio para alojar los recipientes en un tamaño apropiadamente pequeño para la comercialización, tal como, por ejemplo, envases plásticos moldeados por inyección y/o soplado donde se alojen los recipientes deseados.

[0237] Independientemente de la cantidad y/o el tipo de los recipientes, los conjuntos de elementos de la invención también pueden comprender y/o pueden

envasarse con un instrumento para ayudar en la inyección/administración y/o la colocación del compuesto químico final de la invención en el cuerpo de un animal. Este instrumento puede ser una jeringa, una pipeta, fórceps, y/o cualquier vehículo de administración aprobado para el uso médico.

[0238] Aunque la presente invención y sus ventajas han sido descritas en detalle, ha de comprenderse que es posible realizar diversos cambios, sustituciones y alteraciones en la presente documentación sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención, tal como se lo define en las reivindicaciones adjuntas. Más aún, el alcance de esta solicitud no se limita a las realizaciones particulares del proceso, la máquina, el medio de fabricación, la composición de materia, los medios, los métodos y los pasos descritos en la memoria descriptiva. Como han de apreciarlo fácilmente aquellos entrenados en la técnica a partir de la descripción de la presente invención, los procesos, las máquinas, los medios de fabricación, las composiciones de materia, los medios o los pasos que existan en la actualidad o puedan ser concebidos en el futuro, que cumplan sustancialmente la misma función o permitan obtener sustancialmente el mismo resultado que las realizaciones correspondientes descritas en la presente documentación, podrán utilizarse de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, las reivindicaciones adjuntas han de incluir dentro de su alcance dichos procesos, máquinas, medios de fabricación, composiciones de materia, medios o pasos.

EJEMPLOS

[0239] Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones de la invención. Aquellos entrenados en la técnica han de apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descritas por los inventores que funcionan correctamente en la práctica de la invención, y por ello, pueden ser consideradas para constituir métodos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos entrenados en la técnica, en vista de la presente descripción, han de apreciar que es posible realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen e igualmente obtener un resultado parecido o similar, sin apartarse del espíritu y el objetivo de la invención.

EJEMPLO 1

ESTRUCTURAS DE BASE DE DATOS DE PROTEÍNAS USADAS Y REGIONES DE SITIO ACTIVO

[0240] 1) 1K90 (Drum *et al.*, 2002): la estructura cristalina del dominio de adenilil ciclasa del factor de edema del ántrax (EF) en complejo con calmodulina y un análogo de nucleótido que no ciclable, 3'-desoxi-ATP (3'dATP) con resolución 2,75Å y valor R 0,225. El 3'dATP no ciclable se encuentra en el bolsillo de unión a sustrato, que se ilustra en la FIG. 3 (A y E). En 1K90, el metal es Yb^{3+} , un aditivo de cristalización, en lugar de Mg^{2+} , el supuesto ión metálico fisiológico. El Yb^{3+} coordina con 2 grupos carboxilo cargados negativamente de residuos de Asp491 (Yb-O distancia: 2,14Å, 2,56Å), Asp493 (2,16Å, 2,23Å) e His577 (Yb-N: 2,78Å) y coordina con un átomo de oxígeno cargado negativamente del grupo α -fosfato de 3'-dATP (Yb-O: 2,38Å). Más allá de formar enlaces coordinados con Yb^{3+} , las interacciones fosfato más notables se dan por Lys 346 (que tiene contacto con átomos de oxígeno de los tres fosfatos, la distancia del puente de hidrógeno entre Lys346 y α -, β -, y γ -fosfato son de alrededor de 2,66Å, 2,47Å y 1,80Å respectivamente) y Arg 329 (que interacciona con el β -fosfato con una longitud de puente de hidrógeno de 2,19) y Lys 372 y Ser 354, que interacciona con el γ -fosfato con un puente de hidrógeno de 1,6Å y 2,5Å respectivamente.

[0241] 2) 1XFV (Shen *et al.*, 2005), la estructura cristalina del factor de edema del ántrax en complejo con calmodulina y un análogo de nucleótido no ciclable, 3'dATP con resolución 3,35Å y valor R 0,263. Dos iones magnesio, que se encuentran a una distancia entre sí de alrededor de 4,32 Å, se localizan en el sitio catalítico de EF y ATP. Tal como 1K90, el 3'-dATP no ciclable se encuentra en el bolsillo de unión a sustrato, que se ilustra en la FIG. 3(B y F). De los dos iones metálicos, uno se coordina con los residuos Asp491, Asp493, His577 y átomos de oxígeno cargados negativamente del grupo fosfato de 3'dATP. El otro coordina solo con átomos cargados negativamente de 3'dATP y no tiene ninguna interacción con la proteína. Por lo tanto, cuando se une PGE_2 -imidazol a 1XFV, se quitó el ión metálico que no tiene ligandos a la proteína. Los residuos Lys346,

Arg329, Lys372 se unen por puente de hidrógeno con los átomos de oxígeno cargados negativamente de 3'dATP.

[0242]3) 1CJV (Tesmer *et al.*, 1999): La estructura cristalina del complejo de Gs- α con los dominios catalíticos de la adenilil ciclasa de mamífero y del complejo con β -L-2',3'-didesoxiATP (2'3'-ddATP) con resolución 3,00Å y valor R 0,203. El sitio activo se ilustra en la FIG. 3(C y G). En el sitio activo de la adenilil ciclasa de mamífero (de 1CJV), hay dos iones metálicos (Zn y Mg), que se encuentran apartados 3,68. Los residuos Asp396 y Asp440 proveen una unión carbonilo y se ubica entre los metales para quelar los dos metales. Además de formar enlaces coordinados con los residuos, el ión Mg también forma enlaces coordinados con los átomos de oxígeno de los tres fosfatos de 2'3'-ddATP, mientras que el ión Zn forma enlace coordinado solo con un átomo de oxígeno del grupo α -fosfato.

[0243]4) 1ZOT: Estructura cristalina de la toxina de Adenilil Ciclasa de *Bordetella pertussis* en complejo con adenina-9-il-etoximetil-hidroxifosfinil-difosfato (EMA) con resolución 2,20Å y valor R 0,252. En el sitio activo se encuentran tres iones magnesio (Mg901, Mg902 y Mg903). Además de coordinar con 2 grupos carboxilo cargados negativamente de los residuos Asp190 y Asp188, Mg901 también coordina con un átomo oxígeno del α -fosfato. Mg903 coordina con el otro átomo oxígeno del α -fosfato. Alrededor de los grupos fosfato, hay cuatro residuos con carga positiva: Arg41, Lys58, Lys65 y Lys84. Solo Lys65 tiene una interacción fuerte con el grupo γ -fosfato. La FIG. 3 muestra el sitio activo de las cuatro proteínas.

[0244]Ligandos Control (FIG. 4): 3'dATP, 2'3'ddATP y EMA son nucleótidos no ciclables análogos de ATP. PGE₂-imidazol es un inhibidor conocido del Factor de Edema. Todos los grupos carboxilo y grupos fosfato se desprotonaron. Para todos los anclajes de 1K90, Yb³⁺ se reemplazó con Mg²⁺. Los ensayos hechos con *AutoDock* y diferentes iones metálicos y cargas indicaron que había una diferencia relativamente pequeña en la calificación o clasificación de ligandos. Se sintetizó PGE₂-imidazol tal como se describió previamente y se almacenó congelado.

[0245]La adenilil ciclasa de mamífero (FIG 3D, FIG 3H) tiene un verdadero sitio activo con 2 iones metálicos. El Zn²⁺ y Mg²⁺ unidos tienen ligandos a la proteína y

el sustrato. El ión Mg^{2+} quelata los fosfatos α , β , y γ de 2'3'-ddATP, Asp396 y Asp440. El ión Zn^{2+} quelata los α -fosfatos de 2'3'-ddATP, Asp396 y Asp440.

EJEMPLO 2

PROGRAMAS DE ANCLAJE Y MÉTODOS

[0246] 1) *AutoDock* (versión 3.0.5) (Brisson *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 1996): Para ajustar los parámetros de búsqueda, se usó el Algoritmo Genético Lamarckian (LGA) y el número de ejecuciones GA fue 200 y el tamaño de la población fue 100. El sitio activo se definió usando *AutoGrid*. El tamaño de la cuadrícula se ajustó en $90 \times 90 \times 90$ puntos con un espacio de cuadrícula de 0,375Å. El centro de ligando de la correspondiente estructura cristalina se ajustó para que fuese el centro de la caja de la cuadrícula. El ligando y el solvente se quitaron de la estructura cristalina y el modelo de proteína remanente se usó en el procedimiento de anclaje. La conformación mejor clasificada se selecciona de la conformación con la menor energía de unión. Para el ión Zn en 1CJV, sus parámetros se ajustaron a radio, 0,87Å; profundidad de la cavidad, 0,35kcal/mol y carga: +0,95e.

[0247] 2) *LigandFit/Cerius2* (versión 4.10) (Venkatachalam *et al.*, 2003): Los procedimientos son como se implementa en Cerius2 (versión 4.10). Las posiciones se evalúan por *DockScore*. Hay dos tipos de *DockScore*, uno basado en campo de fuerza, y el otro basado en Potencial Linear Piecewise (PLP). Se seleccionó la posición mejor clasificada de PLP *DockScore*. Los modelos de proteína se generaron luego de que se quitaron los ligandos y el solvente. Las definiciones de los sitios activos se basaron en la estructura cristalina del ligando. El "Cantidad máxima de posiciones guardadas [Max number of poses Saved]" se ajustó en 100. El "uso de cuadrícula para la energía de preparación [Setup energy grid using]" se ajustó en PLP v.1.

[0248] 3) *FlexX* (Rarey *et al.*, 1996; Bohm, 1992; Bohm, 1994; Bohm, 1996; Bohm, 1998), como se implementó en sybyl7.0: el valor *exceCyaAthe* de las conformaciones se ajustó en 100, otros ajustes por defecto se usaron para el anclaje. Para el anclaje *FlexX*, la posición mejor clasificada se seleccionó de la Calificación *FlexX*. Las cargas formales de los ligandos son asignadas por el programa SYBYL.

[0249] *FlexX*. Se usó FlexX (Rarey *et al.*, 1996; Bohm, 1992; Bohm, 1994; Bohm, 1996; Bohm, 1998; Jones *et al.*, 1997) para anclar EF con los compuestos obtenidos de la búsqueda UNITY de la base de datos NCI. Como se incluye en SYBYL, FlexX usa un algoritmo de construcción incremental, donde el ligando se descompone en fragmentos discretos en los enlaces con capacidad de rotación. Luego se elige un fragmento base y se coloca en el sitio activo usando una técnica llamada agrupamiento de posiciones (Rarey *et al.*, 1996). Luego se agregan las otras partes del ligando de modo tal que se maximizan las interacciones con la proteína. Se usaron condiciones de anclaje por defecto, excepto que el número de conformaciones se ajustó en 100. Las cargas Formales de los metales se asignaron con el programa SYBYL.

[0250] *AutoDock*. Los compuestos obtenidos del análisis de la base de datos CINC se anclaron con EF usando *AutoDock* versión 3.0.5 (que resultó más preciso (Chen *et al.*, 2007) y fue más fácil de implementar en paralelo para anclajes múltiples que *FlexX*). *AutoDock* (Morris *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1996) provee tres algoritmos diferentes para anclaje: alineamiento simulado (SA), algoritmo genético (GA) y algoritmo genético "Lamarckian" (LGA), que se usó en estos estudios. Las conformaciones de anclaje se clasificaron por una función de calificación que incluye términos para interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, y electrostáticas, más la energía interna del ligando. Para un análisis inicial, se usaron los parámetros por defecto (10 iteraciones). Se aumentó a 60 iteraciones y se compararon los resultados. Para la calificación inicial, el número de iteraciones se ajustó en 200 y el tamaño de la población en 100. Las moléculas de ligandos y de solvente se quitaron de la estructura cristalina para obtener la cuadrícula de anclaje y se definió en sitio activo usando *AutoGrid*. El tamaño de cuadrícula se ajustó en $90 \times 90 \times 90$ puntos con un espacio de cuadrícula de 0,375 Å. La caja de la cuadrícula se ubicó en el centro del ligando de los complejos de estructura cristalina correspondientes. Para el ión Zn^{2+} en PDB 1CJV, los parámetros se ajustaron como se describe por Hu *et al.* (Hu *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004): radio = 0,87 Å, profundidad de la cavidad = 0,35 kcal/mol, y carga = +0,95. Los iones Mg^{2+} usaron potenciales de campo de fuerza Amber como se define en el programa

AutoDock. Las energías de anclaje absolutas, pero no las relativas, se alteraron por la carga asignada al magnesio. Se asignó una carga parcial de +0,8 ya que si la carga formal se ajustaba en +1,2, la interacción del ligando y del grupo carboxilo del ligando se sobreestimaba y llevaba a distancias O-Mg muy cortas. La conformación con la menor energía de anclaje se usó para analizar la ubicación del ligando en el sitio activo.

[0251] Calificaciones de anclaje para diferentes sitios activos: Los valores de anclaje/unión son relativos, dependientes del sitio activo, y no se pueden relacionar directamente con los valores de K_m para enzimas. Sin embargo, un compuesto con mayor energía de unión/anclaje a un dado sitio activo que aquella para ligandos conocidos (tal como ATP y sus análogos y el inhibidor EF, PGE_2 imidazol) es más probable que funcione como un inhibidor que aquellos con valores menores. Las energías de unión del último se usan como valores de corte para energías de anclaje cuando se seleccionan compuestos para anclaje prolongado.

EJEMPLO 3

MÉTODOS DE DISEÑO DEL FARMACOFORO

[0252] *Base de datos de fragmentos*. La base de datos de fragmentos está compuesta por estructuras 3-D (archivos MOL2 contruidos en SYBYL) de aproximadamente 60 moléculas pequeñas, y contiene puentes de hidrógeno donador/aceptor o regiones hidrofóbicas, con un enlace con capacidad de rotación como máximo. Estas fueron moléculas ionizables comunes, o se seleccionaron de la base de datos de fragmentos SYBYL.

[0253] Calificación HINT: El programa de INTERacciones Hidrofílicas, o HINT, (Fornabaio *et al.*, 2003; Fornabaio *et al.*, 2004; Cozzini *et al.*, 2002) utiliza datos de reparto de solvente experimentales como base para un modelo de interacción molecular empírico que calcula la calificación de energía libre que mostraron que reproducen en forma precisa las medidas experimentales de unión (Fornabaio *et al.*, 2003; Fornabaio *et al.*, 2004; Cozzini *et al.*, 2002). Las interacciones "Hidrofílicas" son uniones no covalentes tales como los puentes de hidrógeno,

ácido-base, Coulómbicas, e interacciones hidrofóbicas. El cálculo HINT es la suma de las interacciones hidrofílicas entre todos los pares de átomos:

$$B = \sum \sum b_{ij}$$

$$b_{ij} = S_i a_i S_j a_j R_{ij} T_{ij} + r_{ij}$$

[0254] donde b_{ij} es la calificación de interacción entre los átomos i y j , S es el área de superficie accesible de solvente, a es la constante atómica de hidrofobicidad, R_{ij} y r_{ij} son las funciones de distancia entre i y j , y T_{ij} es una función lógica con valor de 1 y -1, dependiendo de la naturaleza de los átomos polares que interaccionan. En la práctica, una diferencia de calificación HINT de 500 corresponde a una diferencia de energía de alrededor de 1 kcal/mol.

[0255] *Diseño del farmacóforo desde el inicio:* El objetivo del diseño del farmacóforo fue hallar una estructura de fragmentos con impedimentos de distancia flexibles que llenarían en forma óptima el sitio activo. La posición de unión óptima de cada molécula en el sitio activo de EF (PDB 1K90) en la base de datos de fragmentos se obtuvo por translación y rotación del fragmento, usando un algoritmo previamente descrito (Kellogg y Chen, 2004), de modo de lograr la mejor calificación HINT para la interacción del fragmento y sitio activo. Se guardaron las coordenadas de las pequeñas moléculas que tuvieron la mejor calificación HINT con el receptor. La molécula con la mejor energía de interacción se incorporó al receptor de modo de bloquear aquella área en el sitio activo. Luego los fragmentos se anclaron de nuevo en este receptor de compuesto para encontrar los sitios de unión secundarios óptimos que no tuvieran conflictos estéricos con fragmentos unidos previamente. Los cinco fragmentos con las calificaciones HINT más favorables rodean la posición de 3'dATP en la estructura cristalina de EF, pero también indican posibles sitios adicionales de interacción fuerte periféricos a ésta. Se usaron diferentes combinaciones de estos cinco fragmentos en las posiciones relativas indicadas para identificar varios farmacóforos tal que un dado farmacóforo incluyera tres o cuatro fragmentos.

EJEMPLO 4

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE BASE DE DATOS

[0256] Se realizó una búsqueda UNITY (en SYBYL de Tripos) con el uso de farmacóforos obtenidos como se menciona anteriormente. Se quitaron todos los átomos de hidrógeno en los fragmentos y los impedimentos de distancia (es decir, las distancias entre los átomos pesados de los fragmentos únicos en la configuración mostrada en la FIG. 5) se extrajeron automáticamente de un archivo PDB usado para iniciar las búsquedas 3D UNITY. Por ejemplo, un impedimento podría ser la distancia, en angstroms (Å), en el farmacóforo de la FIG. 5, entre el centro del anillo de fenilo (un sitio hidrofóbico) y el punto medio de los dos oxígenos del grupo carboxilo (un aceptor de puente hidrógeno). La búsqueda del farmacóforo 3D se realizó en la base de datos NCI-2000, que contiene aproximadamente 250000 estructuras, como se incorpora en SYBYL. Todos los compuestos en la base de datos se almacenaron como estructuras 3-D convertidas de sus formas 2-D por el módulo CONCORD de SYBYL. A pesar que se almacena solo una conformación por cada entrada, UNITY usa un algoritmo de búsqueda 3D de conformación flexible para ligandos tal que se pueden identificar moléculas con conformaciones que concuerdan sin tener en cuenta la conformación almacenada.

[0257] Luego se seleccionaron compuestos similares al farmacóforo en base a las energías de anclaje. Los compuestos se anclaron en el sitio activo de EF usando *FlexX* y se seleccionaron aquellos con el menor *ChemScores* (FIG. 6A). Luego se descompusieron estos compuestos en fragmentos 2-D (FIG. 6B), seleccionados en base a las principales interacciones con el metal y el sitio activo, tal como uniones hidrógeno, hidrofóbicas, e interacciones de coordinación de metal y se usaron para la búsqueda en la base de datos CINC. Por conveniencia se usó una búsqueda 2D en la base de datos CINC en este punto.

[0258] CINC (Irwin *et al.*, 2005) es una base de datos de Internet de más de 2,7 millones de compuestos comercialmente disponibles para análisis virtual. Los fragmentos 2-D de los compuestos identificados con computadora con *FlexX* de la base de datos NCI se incorporaron en la búsqueda de la base de datos CINC

dibujando las estructuras en el editor molecular provisto. Los compuestos se clasificaron en base a las calificaciones de *AutoDock* y *FlexX* para la unión a enzimas blanco.

EJEMPLO 5

GENERALIDADES DEL PROCESO DE DISEÑO POR COMPUTADORA

[0259] Se usaron estructuras cristalinas del ántrax EF en complejos con análogos de sustrato e inhibidores pequeños para identificar los residuos del sitio activo (Drum *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004). Debido a que el sitio activo de la AC de mamífero es diferente al de la toxina, los inhibidores fueron diseñados para unirse específicamente a ántrax EF. Estudios previos han identificado inhibidores tipo nucleótido de adenilil ciclasas, comenzando por ATP (Tesmer *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007; Gottle *et al.*, 2007) o por anclaje molecular de grandes bibliotecas (Soelaiman *et al.*, 2003). Para ampliar los tipos de moléculas consideradas, y elegir inhibidores más específicos, se usó una estrategia en base a fragmentos *de novo* basada en estructuras cristalinas del ántrax EF (Drum *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2004) para determinar una molécula esqueleto (farmacóforo 3D) que se uniría mejor al sitio activo. Esto se usó para tamizar aproximadamente 250000 compuestos en la base de datos NCI. Se seleccionaron compuestos de la base de datos NCI, con mejores calificaciones de anclaje FlexX que aquellas para inhibidores análogos de nucleótidos y PGE₂-imidazol, un inhibidor eficaz de edema inducido por toxina (Peterson *et al.*, 2001). De estos compuestos se seleccionaron fragmentos en dos dimensiones (2-D) y se usaron para buscar en la base de datos CINC (Irwin y Shoichet, 2005). De una lista inicial de alrededor de 10000 compuestos, se usó *AutoDock* para seleccionar alrededor de 100 compuestos que tuvieran buena calificación de anclaje/unión molecular a EF. Estos luego se seleccionaron en base a un peso molecular bajo y valores logP, y se compraron 19 y se ensayó su capacidad para inhibir la producción de AMPc inducida por EF en células de mamífero. Los pasos básicos del procedimiento se resumen en la FIG. 7. Este mismo proceso se usó para CTA1 para diseñar y anclar ligandos (FIG. 8 y FIG. 9).

EJEMPLO 6

PREPERACIÓN DEL ANÁLISIS DEL FARMACÓFORO DEL FACTOR DE EDEMA

[0260] Se usó un método *de novo* en base a estructura, que no requiere conocimiento del sustrato natural, para identificar inhibidores no nucleótidos de EF. Se ancló una biblioteca de fragmentos pequeños de molécula al sitio activo de EF en estructuras cristalinas actuales y aquellas con las calificaciones HINT más altas integradas al farmacóforo 3D. Los impedimentos de distancia se basaron en aquellas extraídas de distancias interfragmento en el sitio activo (+/- un dado margen), para el uso en el programa UNITY.

[0261] El objetivo del diseño del farmacóforo fue hallar una estructura de fragmentos con impedimentos de distancias flexibles que llenarían en forma óptima el sitio activo. La posición de unión óptima de cada molécula en la base de datos de fragmentos en el sitio activo de EF (PDB 1K90) se obtuvo por translación y rotación del fragmento de modo que se lograra la mejor calificación HINT para la interacción del fragmento y el sitio activo. Se archivaron las coordenadas de las moléculas pequeñas que tuvieron la mejor calificación HINT con el receptor. La molécula con la mejor energía de interacción se incorporó al receptor de modo de bloquear aquella área en el sitio activo. Luego se anclaron nuevamente los fragmentos en este receptor de compuesto para encontrar las posiciones óptimas secundarias que no tuvieran conflicto estérico con fragmentos unidos previamente. Los cinco fragmentos con las calificaciones HINT más favorables (FIG. 10b) se superponen con la posición de 3'dATP en la estructura cristalina (FIG. 10c). Se usaron diferentes combinaciones de estos cinco fragmentos en las posiciones relativas indicadas para identificar varios farmacóforos, de modo que un farmacóforo dado incluya tres o cuatro fragmentos (FIG. 10d).

[0262] Se llevó a cabo una búsqueda y anclaje en una biblioteca de fragmentos, y se usaron 5 fragmentos con calificación HINT mayor que 700 para las posiciones indicadas y sin impedimento estérico interfragmento para definir farmacóforos para las búsquedas UNITY de la base de datos NCI (FIG. 5). Los fragmentos se superponen hasta cierto punto con la posición del análogo de sustrato, 3'dATP, en el sitio activo (FIG. 4); el fragmento de unión más fuerte, F1, es un anillo de fenilo

que está localizado exactamente sobre el centro del anillo purina, mientras que los fragmentos F2, F3, y F4 son grupos carboxilo cercanos que se encuentran cerca de los grupos fosfato. El fragmento F2 se encuentran en una distancia de puente de hidrógeno del ión metálico y Lys346 en el EF sitio activo, mientras F3 y F4 interaccionan con Arg329. El fragmento F5 contiene un grupo amonio que interacciona con Glu588.

[0263] Se realizó una búsqueda de base de datos NCI con UNITY (en SYBYL de Tripos) usando los farmacóforos descritos anteriormente. Luego se seleccionaron los compuestos más similares al farmacóforo en base a las energías de anclaje. Se obtuvo un total de 82 compuestos que coincidieron con farmacóforos en el margen de distancias de impedimento del análisis de la base de datos NCI. Los compuestos se anclaron en el sitio activo de EF usando FlexX y se seleccionaron aquellos con los ChemScores más bajos (FIG. 6A). El análisis de los resultados de anclaje por otro lado describió fragmentos/grupos que tuvieron interacciones fuertes con EF. Además estos compuestos luego se descompusieron en fragmentos 2-D (FIG. 6B) para obtener subestructuras para buscar la base de datos CINC. Las subestructuras se seleccionaron en base a las interacciones principales con el metal y el sitio activo, tal como uniones hidrógeno, hidrofóbicas, e interacciones de coordinación de metales y se usaron para la búsqueda de la base de datos CINC.

[0264] Por ejemplo, los resultados de anclaje mostraron que áreas discretas del compuesto V en la FIG. 6A, forma puentes de hidrógeno fuertes, iónicamente potenciados entre los grupos carboxilo/carbonilo y el ión metálico unido o los residuos cargados positivamente de EF, Arg329, Lys346, Lys353. Los ácidos para y meta-amino benzoico V y VI (FIG. 6B), subestructuras de estos compuestos que también tuvieron altas energías HINT cuando se anclaron en el sitio activo, se seleccionaron entonces para el uso en el análisis 2D de la biblioteca CINC.

[0265] Para encontrar un rango más amplio de espacio químico que se encuentre disponible en la base de datos NCI, se usaron las subestructuras obtenidas del análisis de farmacóforo original para obtener una lista de compuestos de la base de datos CINC mucho más grande. Las búsquedas con las subestructuras de FIG.

6B estaban contenidas en aproximadamente 10000 compuestos en la base de datos CINC, usando las herramientas de búsqueda provistas en aquél sitio de Internet. Los compuestos se almacenaron en formato de archivo MOL2, usando las herramientas CINC. Se usaron los farmacóforos originales y los fragmentos de FIG. 6B para buscar los compuestos relacionados en la base de datos CINC. Estas búsquedas dieron como resultados alrededor de 10000 compuestos, que se clasificaron de acuerdo a su capacidad para unirse al sitio activo de EF vía simulación por computadora. Se usó *AutoDock* para clasificar los compuestos, ya que funciona muy bien en el anclaje de sustratos con ántrax EF (PDB 1K90 y PDB 1XFV) y AC de mamífero (PDB 1CJV).

EJEMPLO 7

SELECCIÓN DE FIII-1, FIV-50, Y FII-1 PARA ESTUDIO ADICIONAL

[0266] Algunos estudios indicaron que las condiciones por defecto de *AutoDock* no dan resultados utilizables con inhibidores conocidos. Por lo tanto, se realizaron unas series de experimentos controles usando un subconjunto de compuestos para ensayar el efecto de la carga en el ión metálico (Chen *et al.*, 2007, incorporado en su totalidad a modo de referencia en la presente documentación) y el número de iteraciones en cómo se separaron los compuestos de acuerdo a sus calificaciones de anclaje. Estos resultados indicaron que 60 iteraciones fueron adecuadas para seleccionar los compuestos con las menores clasificaciones de unión de la variedad de compuestos, pero aquellos para obtener las menores energías y posicionamiento más preciso, uno necesita usar tiempos de anclaje considerablemente más largos. Consistentemente se encontraron energías mínimas en aproximadamente 200 iteraciones. Se usó una estrategia de pasos múltiples (FIG. 11) para acelerar los cálculos. Todos los 10000 compuestos se anclaron nuevamente para 10 (por defecto) o 60 iteraciones de algoritmo genético (GA). Se usó un valor de corte de energía de unión de -14 kcal/mol (la menor energía de unión cuando se ancla 3'dATP con EF) para discriminar entre compuestos inactivos y aquellos con unión razonable al sitio activo. Se hallaron más compuestos por debajo de la energía umbral cuando los anclajes se ejecutaron más tiempo (431 aciertos para el primer procedimiento con ejecuciones

10 GA vs 671 aciertos para el segundo procedimiento con ejecuciones 60 GA). Todos estos compuestos fueron entonces anclados nuevamente, con el número de ejecuciones GA aumentado a 200 para una mayor exactitud y el valor de corte de la energía de unión se cambió a -16 kcal/mol para obtener compuestos más activos. Este paso produjo 81 y 100 aciertos respectivamente de las dos listas iniciales. Estos resultados indicaron que a pesar que se obtuvieron más compuestos de baja energía usando tiempos de anclaje más grandes, la diferencia al final fue sólo con respecto a compuestos que tuvieron valores de energía relativamente grandes.

[0267] Se compararon las propiedades y estructuras de los 100 compuestos con las calificaciones de *AutoDock* más favorables (es decir, aquellos con energía de unión menor o igual que -16 kcal/mol). La FIG. 12 muestra las calificaciones *AutoDock* para 19 compuestos, así como para controles para inhibidores seleccionados previamente, ATP y análogos de los mismos.

[0268] Aproximadamente 10000 compuestos, sobre 2,7 millones de compuestos en la base de datos CINC, tuvieron una estructura molecular similar. Estos se clasificaron de acuerdo a sus calificaciones de anclaje, usando metodología que se mostró que alcanza máxima exactitud (es decir, cuán bien coincide la posición anclada con el sitio determinado experimentalmente para análogos de ATP en estructuras cristalinas del complejo).

EJEMPLO 8

ENSAYO IN VITRO DE INHIBICIÓN DE LA PRODUCCION DE AMPC POR EL FACTOR DE EDEMA

[0269] Tres de los compuestos del Ejemplo 7 tuvieron mejor actividad que el control PGE₂-imidazol, y muchos compuestos derivados de los tres originales también mejoraron la actividad. Las actividades de inhibición de los compuestos se compararon con la del inhibidor previamente conocido, PGE₂-imidazol (Peterson *et al.*, 2001), que inhibe la producción de AMPc inducida por EF en células en el rango de 100 µM (FIG. 13). Estos tres compuestos de la lista de citada anteriormente, con estructuras moleculares muy diferentes, tuvieron valores de IC₅₀ en el rango µmolar bajo (FIG. 13): ácido 3-[(9-oxo-9H-fluoren-1-carbonil)-

amino]-benzoico (FIV-50 en la Tabla 1; CINC #75209; 1,7-5 μ M), ácido 4-(3-metoxi-fenil)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolin-8-carboxílico (FII-1; CINC #75022; 1,3-7 μ M), y ácido 4-[(antracen-9-ilmetilen)-amino]-2-hidroxi-benzoico (FIII-1; CINC #132715; 9 μ M). A pesar de sus diversas estructuras, ninguno de ellos se parece al ATP, los 3 de estos compuestos se superponen bien con el farmacóforo inicial y se ancla en posiciones cercanas a aquellas del ATP en estructuras cristalinas de complejos EF. Las subestructuras comunes en los tres compuestos fue una estructura aromática plana, que se ancla cerca de la posición de la purina (plana) del ATP (y centra en la posición F1 del fragmento fenilo), y un grupo carboxilo (que corresponde aproximadamente al fragmento carboxilo F2) que interacciona en el anclaje con el ión metálico y cadenas laterales cargadas positivamente en EF. Los valores de IC₅₀ de FIV-50 varían en un rango entre 0,291 y 12,26 con una media de 4,74, y una desviación estándar de 4,37. Ninguno de los tres compuestos iniciales se parece a ninguna droga o metabolito conocidos. Sin embargo, FII-1 tiene un poco de similitud con una familia de inhibidores de fosfatasa identificada experimentalmente por ensayo de una biblioteca diversa de 10000 compuestos (Brisson *et al.*, 2004).

[0270] Las FIG. 3E, 3F, y FIG. 14 ilustran cuán bien se corresponde la conformación de anclaje de menor energía de los tres compuestos activos con el farmacóforo inicial y la del análogo de ATP en la estructura cristalina de EF. Se realizó un diseño adicional de estos compuestos para potenciar las propiedades farmacéuticas, y los ensayos de actividad de esos derivados se encuentran en las FIG. 15A-O y FIG. 16A-D.

EJEMPLO 9

REDISEÑO DE FIV-50

[0271] Se han explorado tres métodos para el rediseño de compuestos, en base a 1) reelección de compuestos de CINC que se parecen en estructura a FIV-50, o que contienen unidades estructurales con buenas posibilidades de síntesis orgánica; 2) agregado de fragmentos en posiciones específicas usando el programa *Leapfrog* o a mano en base al farmacóforo inicial; y 3) disponibilidad de compuestos generados por Chemist Draw que pudieran constituir la siguiente

generación lógica y fueran fáciles de sintetizar. En cada uno de estos casos, los compuestos han sido elegidos por su *AutoDock*, y calificación Gold para unión.

[0272] Se anclaron 1954 compuestos CINC difenilo con GOLD (*ChemScore*) y *AutoDock*. Más de 60 compuestos tuvieron mejor ChemScore que el compuesto inicial (FIV-50). Sin embargo, solo un compuesto tuvo mejor calificación *AutoDock* que el compuesto inicial. Los datos muestran que no hay una relación lineal entre la calificación *AutoDock* y el ChemScore GOLD. Los compuestos difenilo que tienen buena calificación *AutoDock* también tienen buen ChemScore GOLD. Pero algunos compuestos tienen buen ChemScores pero no buenas calificaciones *AutoDock*.

[0273] También se anclaron compuestos más grandes seleccionados de CINC específicamente para ajustarse al farmacóforo. Se usó el programa UNITY implementado en SYBYL para buscar en la base de datos CINC, que contenía aproximadamente 4,6 millones de compuestos, para los compuestos (aciertos) que coincidían con el fragmento en base a farmacóforos. Todos los compuestos en la base de datos CINC se descargaron en formato mol2 y luego se convirtieron al formato usado por el programa UNITY. Se agregaron impedimentos de distancia a los fragmentos y el programa UNITY se ejecutó para buscar los compuestos en la base de datos CINC para los compuestos con coincidencia con el farmacóforo. En todos, se obtuvo alrededor de 20000 aciertos, que luego fueron anclados al sitio activo de CTA preparado usando tres programas diferentes.

Los aciertos obtenidos con el análisis de la base de datos CINC con UNITY se anclaron con *AutoDock3*, 4 y GOLD. Para obtener resultados de *AutoDock* más exactos, el número de ejecuciones debe ser 200, que tomaría entre 0,5 y 1 hora por compuestos. Por lo tanto, se anclaron los primeros 20000 aciertos con el número de ejecuciones ajustado a 10. Luego alrededor de 2000 compuestos (aproximadamente 10%) se seleccionaron para el anclaje exacto por ajuste del número de ejecuciones a 200. Se obtuvieron más de 100 compuestos que tienen calificaciones *AutoDock4* mejores que el sustrato NAD⁺ y más de 100 compuestos que tienen calificaciones *AutoDock3* mejores que NAD⁺. Las calificaciones de

AutoDock3, *AutoDock4* y GOLD no se correlacionan bien entre sí. No se clasificó ningún compuesto en los 10 mejores en base a las tres funciones de calificación.

[0274]A continuación, en la Tabla 2 se indican diferentes valores determinados por computadora para ejemplos de compuestos de la invención. También se muestran valores de IC50 producidos experimentalmente por el ELISA específico para AMPc (Assay Designs, Ann Arbor, MI).

TABLA 2

	BE						IC50
	<i>AutoDock4</i>	(AD3)	DE(AD3)	GOLD	cLogP	MW	
FIV-50	-11,8	-14,3	-14,49	31,97	4,29	343	1,7-9,0
FIV-1	-11,45	-14,54	-14,87	29,4	4,19	373	5,8
FIV-29	-11,18	-15,22	-14,68	37,09	2,72	372	ND
FIV-31	-12,75	-15,13	-14,86	33,48	3,26	373	ND
FIV-34	-11,74	-14,83	-14,45	34,66	3,57	358	ND
FIV-35	-11,33	-14,53	-14,58	34,69	3,99	359	6,2
FIV-39	-12,09	-14,4	-14,67	32,58	3,99	359	5,6
FIV-40	-11,43	-14,84	-15,03	33,02	3,57	358	ND
FIV-46	-8,87	-15,33	-14,93	32,77	3,56	358	ND
FI-3	-5,8	-8,31	-8,28	27,43	2,22	203,2	30
FI-1	-7,33	-10,5	-5,16	26,09	3,14	268,3	20
FI-2	-7,31	-11,5	-6,11	27,92	4,2	296,3	28
FII-1	-11,58	-16,76	-16,03	34,16	4,52	340,4	44
FIII-1	-10,59	-14,02	-14,02	33,15	3,36	320,67	20
FIV-54	-8,32	-7,04	-7,04	27,16	5,06	371,4	12,9
FIV-58	-8,06	-16,99	-17,21	26,29	4,64	387,4	7,2
FIV-55	-11,99	-18,91	-17,96	33,67	4,61	356,4	11,4
FIV-53	-8,61	-16,98	-17,06	32,06	4,45	373,4	ND
FIV-67	-7,86	-16,01	-15,34	26,35	5,6	383,3	6,9
FIV-70	-7,92	-12,57	-11,1	28,97	4,47	358,8	50
FIV-65	-7,51	-16	-15,91	32,17	4,77	342,4	1,5
FIV-68	-9,68	-17,52	-17,7	32,56	3,15	341,4	2,71

FIV-66	-7,81	-15,65	-13,93	29,82	5,27	345,4	ND
FIV-61	-7,03	-11,7	-11,3	30,84	4,77	299,3	28,6
FIV-60	-7,59	-12,18	-12,09	31,03	5,45	351,8	3,8
FIV-64	-12,65	-15,72	-15,49	35,55	4,7	344,3	ND

EJEMPLO 10

EJEMPLOS DE MÉTODOS PARA MODIFICAR COMPUESTOS PARA AUMENTAR LA SOLUBILIDAD Y REDUCIR LOS EFECTOS SECUNDARIOS TÓXICOS

Los compuestos se enviaron a un sitio de Internet de análisis de toxicidad química que predice la probabilidad de que un compuesto preparado por un usuario tenga efectos tóxicos (mutagénicos, tumorigénicos, irritantes y reproductivos). El algoritmo se basa en la comparación de compuestos tóxicos conocidos con drogas generalmente reconocidas como seguras (GRAS) e ilustra los fragmentos de la molécula especificada por el usuario que son considerados sospechosos.

[0275] El proceso de predicción localiza posibles centros de problemas de un conjunto precalculado de fragmentos estructurales que dan origen a alertas de toxicidad en la estructura dibujada por el usuario. Las listas de fragmentos tóxicos se arman a partir de compuestos de fragmentación de la base de datos RTECS que tenían toxicidad conocida (por ejemplo mutagenicidad). Cada molécula se cortó primero en cada enlace con capacidad de rotación, llevando a un conjunto de fragmentos centrales. Estos a su vez se usaron para reconstruir todos los posibles fragmentos más grandes que fueron una subestructura de las moléculas originales. También se determinaron las frecuencias de las estructuras tóxicas en la lista de 3000 drogas comerciales consideradas principalmente libres de efectos tóxicos. Un fragmento fue considerado un factor de riesgo si se lo encontró con frecuencia como una subestructura de compuestos perjudicial pero nunca o pocas veces en drogas comerciales. El sitio indica que su proceso reconoció aproximadamente 80% de los compuestos conocidos como mutagénicos, irritantes o tumorigénicos como tales, y solo identificó aproximadamente 10% de los compuestos GRAS como que tienen potencial toxicidad.

[0276] La Tabla 3 lista los resultados para FIV-50 y FII-1. Las áreas de FIV-50 y FII-1 que pueden causar efectos secundarios mutagénicos e irritantes, de acuerdo a este análisis, fueron en realidad en las cadenas laterales, específicamente en el mismo anillo benceno y no los anillos oxifluoreno o ciclopentilquinolona. La Tabla 3 muestra los efectos secundarios estimados, calificación de anclaje y logP calculado de FIV-50 y FII-1

TABLA 3

Compuesto	Mutagenicidad	Tumorigenicidad	Efectos irritantes	Efectos reproductivos	ADK4	AD3 (BE)	AD3 (DE)	cLogP
FIV-50	Riesgo Alto	Riesgo Bajo	Riesgo Medio	Riesgo Bajo	- 11,93	- 18,95	-19,4	4,29
FII-1	Riesgo Bajo	Riesgo Bajo	Riesgo Bajo	Riesgo Alto	- 11,64	-17,8 17,02	-	3,59

Luego se alteraron las estructuras de FIV-50 y FII-1 introduciendo cambios para minimizar los efectos secundarios y para reducir los valores logP para aumentar la solubilidad sin reducir las afinidades de unión. La FIG. 17 lista las estructuras de compuestos obtenidos por modificación de FIV-50 y FII-1, para convertirlos de modo que sus efectos estimados de mutagenicidad, tumorigenicidad, irritabilidad y reproductivos fuesen de bajo riesgo. En la FIG. 18 se listan derivados adicionales de FIV-50.

Los dibujos de anclaje de FII-1 indicaron que el grupo carboxilo en el anillo ciclopentilquinolona estaba cercano al ión metálico, y que la actividad podría ser potenciada por el agregado aquí de otro carboxilo más. Se espera que los efectos secundarios, incluyendo efectos de mutagenicidad e irritación, de 14 de los compuestos rediseñados sean bajos, y sus solubilidades (logP calculado), excepto para el compuesto 1, son mejores que las de FIV-50. Las calificaciones de anclaje no son, para la mayor parte, afectados por los agregados.

[0277] Se diseñaron otros compuestos con modificaciones en la porción ácido benzoico de FIV-50, para optimizar la unión a ión metálico. Aquí, se usó una estrategia basada en el ensayo de diferentes sustituyentes que afectarían el potencial de ionización (o pKa) del ácido carboxílico. De estas modificaciones

realizadas y ensayadas hasta ahora (FIG. 19), hay poca indicación clara de que los compuestos más activos son efectivamente mejores quelantes de metales.

[0278] La Tabla 4 muestra los resultados de los cálculos hechos para diferentes determinantes de mutagenicidad.

TABLA 4

	Mutagenicidad	Tumorigénico	Irritante	Reproductivo
FIV-50	Alto	Bajo	medio	Bajo
FIV-1	Medio	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-29	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-31	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-34	Alto	alto	medio	Bajo
FIV-35	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-39	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-40	Medio	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-46	Medio	Bajo	Bajo	Bajo
FI-3	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FI-1	Bajo	Bajo	Bajo	Alto
FI-2	Bajo	Bajo	Bajo	Alto
FIII-1	Alto	Bajo	Bajo	Bajo
FII-1	Bajo	Bajo	Bajo	Alto
FIV-54	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-58	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-55	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-53	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-67	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-70	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-65	Alto	Bajo	alto	Bajo
FIV-68	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-66	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-61	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
FIV-60	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo

EJEMPLO 11

COMPARACIÓN DE PROGRAMAS DE ANCLAJE

[0279] Los programas de anclaje *AutoDock*, *LigandFit/Cerius2*, y *FlexX* se compararon usando tres ensayos de su capacidad para determinar correctamente interacciones de sustratos e inhibidores del factor de edema (EF) de *Bacillus anthracis*. En el primer ensayo, se determinó el RMSD entre las posiciones de menor energía de un análogo de sustrato (3'-dATP o 2',3'-ddATP), determinado por los tres programas, y aquél en dos estructuras diferentes co-cristalinas de EF. El grupo *AUTODOCK* de menor energía también fue el más cercano a la posición de estructura cristalina. A pesar de que la correlación general fue relativamente débil, el programa *AutoDock* fue más consistente con los resultados experimentales.

[0280] A pesar de que estos programas han mostrado que son útiles para diferentes proyectos, no está claro qué estrategia es más adecuada para el anclaje de proteínas con iones metálicos en sus sitios activos, tal como EF y PT. En la FIG. 20 se muestra una comparación del rendimiento de *AutoDock*, *LigandFit/Cerius2* y *FlexX*, en el anclaje de sustratos e inhibidores de EF conocidos a los cuatro sitios activos de proteína. La exactitud de anclaje se evaluó por comparación de las posiciones ancladas de análogos de ATP (3'-dATP o 2',3'-ddATP) en los sitios activos de EF y CYAA con aquellos determinados experimentalmente por cristalografía de rayos X. También se comparó como anclan los programas un inhibidor conocido de ambas toxinas bacterianas AC, PGE₂-imidazol (Peterson *et al.*, 2001). Como un control final, se anclaron análogos de ATP y PGE₂-imidazol en el sitio activo de la adenilil ciclasa de mamífero, que tiene un sitio activo completamente diferente. Se determinó 1) cuál programa de anclaje es más exacto en la predicción del modo de interacción de sustrato; 2) las diferencias entre los programas en la determinación de las interacciones proteína-ligando e ión metálico-ligando. Los resultados indicaron que el programa *AutoDock* fue adecuado para el análisis de bibliotecas de compuestos para seleccionar inhibidores de toxinas bacterianas de adenilil ciclasa. Adicionalmente, se

descubrió que los tres mejores compuestos de acuerdo a sus calificaciones de anclaje fueron todos activos en un bioensayo.

EJEMPLO 12

ANCLAJE DE ESTRUCTURAS TIPO FÓRMULA I

[0281]El compuesto FI-3 ha sido consistentemente más activo en los ensayos de AMPc *in vitro* de EF y en toxina del Cólera. Tal como muestra la Tabla 5 más adelante, este compuesto tiene calificación mediocre independientemente del programa de calificación o si está anclado al sitio activo de cualquiera de las dos estructuras cristalinas del factor de edema del ántrax (nombres de archivos PDB 1 K90 y 1XFV). Los valores de energía relativamente no favorables (cuanto más bajo el valor de energía, más fuerte es la unión esperada al blanco) son debido al relativamente pequeño tamaño de KM11. Se debe observar que quizás debido al tamaño pequeño, ambos anillos del compuesto en la posición anclada (FIG. 22) se unen fuertemente en el bolsillo del sitio activo, y especialmente cerca al ión metálico. Los compuestos activos más recientes de MEJ (FIG. 23) tienen una conformación más extendida. En la Tabla 5 se muestran resultados (IC50) seleccionados de ensayos.

TABLA 5

FI-1	20,4 μ M	>100			
FI-2	21,4 μ M	27,3 μ M			
FI-3	38,8 μ M	64,1 μ M	29,85	11,1	29,44

EJEMPLO 13

EJEMPLOS DE MATERIALES Y MÉTODOS DE BIOENSAYO

[0282]Se sintetizó PGE₂-imidazol, usado como el control positivo en los ensayos biológicos, como se describió previamente (Peterson *et al.*, 2001) y se almacenó congelado. PGE₂-imidazol se identificó primero como un inhibidor de la actividad de la toxina del cólera, (Peterson *et al.*, 2001) pero también se ha mostrado que es un eficaz inhibidor del ántrax EF en el rango μ M. Se obtuvieron otros compuestos del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) o se compraron en Asinex, Ryan Scientific, Sigma-Aldrich, TimTec, o se sintetizaron como se describe. Los compuestos se

disolvieron en medio de cultivo celular o DMSO, y cuando fue necesario el pH se ajustó en la neutralidad con pequeñas cantidades de NaOH o HCl.

[0283] *Condiciones de solución para FIV-50:* el compuesto se recolectó en DMSO limpio, de grado farmacéutico, con mínimo contenido de agua. De este modo es soluble hasta al menos 100 mM. Para diluirlo en solución amortiguadora o agua, se usaron entre 1 y 2 miliequivalentes de NaOH (por lo tanto por cada μl de la solución 100 mM en DMSO, se usa entre 1 y 2 μl de NaOH 0,1 N) por cada mM de FIV-50.

[0284] *Cultivo celular.* Se propagaron células monocitos/macrófagos murinos (RAW 264.7) en frascos T75 que contenían Medio de Eagle modificado Dulbecco (DMEM) (Mediatech, Inc., Herndon, VA) a 37°C con 5% de CO_2 . El medio de cultivo contenía 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina/estreptomicina y L-glutamina.

[0285] *Ensayo celular para EF:* Se plaquearon células a 1×10^6 células por cavidad en DMEM que contenía 10% de FBS, 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina/estreptomicina y L-glutamina con isobutilmetilxantina (IBMX) (50 μM) en placas de cultivo celular de 48 cavidades y se dejaron adherir durante la noche a 37°C en 5% de CO_2 . Se diluyeron PGE₂-imidazol, PA (2,5 $\mu\text{g/ml}$) y EF (0,625 $\mu\text{g/ml}$) con medio de ensayo que contenía DMEM (sin rojo fenol) con 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina/estreptomicina y L-glutamina. El medio se aspiró de las células y se reemplazó con concentraciones variables de PGE₂-imidazol o de un compuesto de interés junto con PA y EF u otra proteína productora de AMPc. Luego se incubaron las placas durante 4 horas a 37°C en 5% de CO_2 . Luego de la incubación, los sobrenadantes de cultivo se quitaron (AMPc extracelular) y se transfirieron a placas de 48 cavidades nuevas para la determinación de AMPc.

[0286] *Determinación de AMPc.* Se midió la concentración de AMPc extracelular en los sobrenadantes de cultivo con un ELISA específico para AMPc de Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, Michigan) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Ensayos previos de los efectos de la toxina han mostrado que los niveles extracelulares fueron más confiables que los niveles intracelulares de AMPc. Un

informe reciente que describe el mecanismo de salida del ribonucleótido además respalda el uso de este ensayo (Lin *et al.*, 2008).

[0287] Estimación de efectos citotóxicos. Se probaron todos los compuestos para estudiar su citotoxicidad, y se descartó a cualquiera que produjese una respuesta citotóxica dentro del rango de concentración probado (hasta 100 μ M). La citotoxicidad se midió mediante observación visual de las células control (compuesto sin agregado de PA/EF) y cuantitativamente por liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) a partir de una línea celular de monocitos-macrófagos murinos (RAW 264.7; American Type Culture Collection, Manassas, VA) (Peterson *et al.*, 2006) o mediante el ensayo MTT, que es una prueba colorimétrica que se basa en la captación de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por parte de células en proliferación (los compuestos citotóxicos reducen el MTT captado por las células a medida que se incrementa la concentración de la droga) (Peterson *et al.*, 2007). Para el ensayo de LDH, se propagaron las células RAW 264.7 en medio esencial modificado por Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 μ g/ml de penicilina-estreptomicina, y L-glutamina 2 mM (Mediatech, Inc., Herndon, VA) a 37°C con 5% de CO₂ usando botellas para cultivo de tejidos. Subsiguientemente, se plaquearon las células en placas de cultivo de tejido de 96 cavidades de fondo plano (Corning) a una densidad de 1×10^6 células/ml y se incubaron durante una noche a 37°C en 5% de CO₂. Se lavaron las monocapas dos veces con medio esencial modificado por Dulbecco desprovisto de suero o rojo de fenol. Se midió la citotoxicidad en función de la cantidad de enzima LDH liberada por los macrófagos a los sobrenadantes del cultivo celular. Se incubaron diferentes diluciones de los compuestos durante 4 horas a 37°C en 5% de CO₂. Se midió la liberación de LDH al sobrenadante del cultivo de las células de macrófagos usando el conjunto de componentes para ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96 (Promega, Madison, WI) y se cuantificó por medida de la absorbancia a longitud de onda de 490 nm. Un incremento en el color del medio de cultivo fue una indicación de citotoxicidad.

[0288] Para el ensayo de MTT, se usó un conjunto de componentes comprado de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Se plaquearon células tipo monocitos/macrófagos murinos J774A.1 (ATCC) a 5×10^5 células/ml y se crecieron a entre 60 y 80% de confluencia a 37°C durante una noche en 5% de CO₂. Se agregaron a las células diluciones al medio de cada compuesto y se incubaron durante 4 horas. Luego de la incubación, se agregó 10 µl/cavidad de sal amarilla de tetrazolio MTT a las células y se dejó durante 2 horas. La sal fue reducida por parte de las células metabólicamente activas. El formazán púrpura intracelular resultante se solubilizó durante una noche en reactivo con detergente (ATCC número de catálogo 30-1010K) provisto en el conjunto de componentes de ensayo de MTT. Se midió el producto de reacción a 570 nm y se cuantificó. La reducción de color fue una indicación de citotoxicidad.

EJEMPLO 14

INHIBICIÓN DE PRODUCCIÓN DE AMPC IN VITRO CON TOXINA COLÉRICA

[0289] Debido a que el ensayo *in vivo* usa toxina colérica (enterotoxina AB5) para inducir la secreción de fluidos y electrolitos mediante el incremento de AMPc y debido a que la misma lo hace a través de una vía diferente a la del factor de edema de *B. anthracis*, se iniciaron estudios para determinar si estos compuestos también podían inhibir a la toxina colérica en ensayos *in vitro*. Para estos estudios, se utilizaron células RAW264.7. Las mismas se propagaron como se describió previamente.

[0290] *Plaqueo de células para el ensayo.* Se contaron las células usando un hemocitómetro y se plaquearon 1×10^6 células por cavidad en una placa para cultivo de tejidos de 48 cavidades. Se dejó que las células se adhirieran al plástico durante una noche a 37°C en 5% de CO₂.

[0291] *Ensayo Celular.* En una placa nueva de 48 cavidades, se prepararon las condiciones experimentales para transferirse a la placa de 48 cavidades que contenía las células. Se calcularon las concentraciones de toxina e inhibidor y se agregaron los volúmenes a la placa de 48 cavidades. Luego se transfirieron las condiciones experimentales a la placa de 48 cavidades que contenía las células y se incubaron las placas durante 4 horas a 37°C en 5% de CO₂. Al final del período

de incubación de 4 horas, se sacaron los sobrenadantes de los cultivos (AMPc extracelular) y se transfirieron a una nueva placa de 48 cavidades. Se usó el conjunto de componentes para AMP cíclico directo Correlate-EIA de Assay Designs para determinar cuantitativamente las cantidades de AMPc extracelular de los sobrenadantes por duplicado.

[0292] Las FIGS. 24 y 25 son los datos de FI-3 y FI-1. En este ensayo, FI-3 inhibe al AMPc inducido por la toxina colérica, pero no tan bien como PGE₂-imidazol. Además se muestra que FI-1 no inhibió al AMPc inducido por la toxina colérica (FIG. 25).

EJEMPLO 15

ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE COMPUESTOS CON LDH

[0293] Se iniciaron estudios para determinar si los ejemplos de compuestos fueron citotóxicos para las células *in vitro* (ensayos de LDH) antes de usarlos en el modelo de asa ileal de ratón.

[0294] Ensayos de LDH. Brevemente, se plaquearon células de monocito/macrófagos murinos (RAW 264.7) en una placa para cultivo de tejidos de 96 cavidades a 5×10^5 células/ml en cada cavidad. Las células se dejaron adherir a la placa durante una noche a 37°C/5% de CO₂. Al día siguiente, se lavaron las células con DMEM límpido, (200 µl). Las diluciones de los artículos de prueba se hicieron en tubos separados y se agregaron a las células. Se agregó Amortiguador de Lisis a los cavidades rotuladas como "100% de Lisis" y se incubaron las células a 37°C/5% de CO₂ durante 3 horas. Se centrifugó la placa a 200 x g durante 5 minutos y se agregaron 50 µl de sobrenadante a otra placa para cultivo de tejidos estéril de 96 cavidades. Se agregó Mezcla de Sustratos a cada cavidad y se incubó a temperatura ambiente sin luz durante al menos 30 minutos. Se agregó Solución de Detención a cada cavidad y se leyó la placa a 490 nm.

[0295] Se debe destacar que ninguno de los compuestos ensayados fue citotóxico *in vitro* en el ensayo de LDH usado (FIG. 26, FIG. 27, FIG. 28). A pesar de que FI-1 no inhibió la acumulación *in vitro* de AMPc en ningún ensayo, el mismo se probó en el ensayo *in vivo*. Ninguno de los compuestos fue citotóxico en los ensayos de LDH.

[0296] Los datos generados a partir de ambos ensayos EdTx y CT se muestran en las FIG. 29 y FIG. 30. Notar que la inhibición de la liberación de AMPc es o bien igual o bien mejor que la de PGE₂-imidazol. Ninguno de estos compuestos fue citotóxico en los ensayos de LDH *in vitro* (FIG. 31 y FIG. 32).

EJEMPLO 16

ESTUDIOS DE FIV-50 IN VITRO EN RATONES CON E. COLI ENTEROTÓXICA

[0297] El diseño experimental para este ejemplo se ilustra en la FIG. 33. Brevemente, a las -48 horas se administró a los ratones agua estéril suplementada con estreptomicina y fructosa. Se les sacó la comida 12 horas antes de la infección. Se inyectó un antagonista de receptor H₂ de histamina entre -3 y -1 horas i.p. para inhibir la producción de ácido en el estómago. A las 0 horas, se incubaron los ratones con 400 µM del compuesto a probar y con *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC) (1x10⁸) administrada intragástricamente. A las 12, 24, 36, y 60 horas desde la incubación inicial, los animales recibieron alícuotas del compuesto de prueba a por vía i.p. A las 24, 48, o 72 horas se sacrificaron los animales con isoflurano y dislocación cervical. Se midió el peso y la longitud del intestino, se estimó gravimétricamente el contenido de fluido y se contó el número de bacterias en el intestino.

[0298] *Diferentes dosificaciones de FIV-50:* El tratamiento con DC-4 tuvo un efecto inhibitorio sobre la cantidad de bacterias (ETEC) que se recuperaron del fluido intestinal a las 72 horas, incluso a concentraciones de 0,1 mM (FIG. 34). El incremento de fluido (estimado por peso de intestino) se redujo en presencia de FIV-50 medido a las 72 horas luego de la infección (FIG. 35). A pesar de que las diferencias entre los grupos usando la relación peso/longitud no son tan drásticas como con solo el peso, es más común en la literatura científica relacionar la pérdida de fluido con la longitud intestinal. Debido a la distensión intestinal en ratones tratados con ETEC, la relación representa una verdadera reducción de fluido en base al peso y la longitud (FIG. 36).

[0299] Se midió el efecto de FIV-50 en comparación con el de PGE₂-imidazol. Se usaron ocho animales por grupo con 4 grupos: (1) grupo de ratones CD-1 control negativo + GSNO + PBS; (2) CD-1 + bacterias ETEC; (3) CD-1 + bacterias ETEC

+ FIV-50 0,1 mM; (4) CD-1 + bacterias ETEC + PGE₂-imidazol 1 mM. Los animales recibieron ETEC (1×10^8) +/-FIV-50 (0,1 mM) o PGE₂-imidazol (0,1 mM) a tiempo 0 horas. Se administraron refuerzos de FIV-50 o PGE₂-imidazol i.p. a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas antes del sacrificio a las 72 horas. Se obtuvieron datos a las 72 horas luego de la infección. Se analizaron el peso de intestino, la relación peso/longitud intestinal, y las unidades formadoras de colonias (UFC) en el fluido intestinal mediante una prueba *t* de Student de dos colas para muestras independientes.

[0300] Se observó una reducción en el peso del intestino (indicativo de acumulación de fluido) en los ratones tratados con FIV-50 y PGE₂-imidazol (FIG. 37A). Se observó una mayor reducción en el peso en los animales tratados con ETEC + FIV-50. El efecto fue más pronunciado en el tratamiento con FIV-50 que con PGE₂-imidazol. A pesar de que las diferencias entre el cálculo de la relación peso/longitud no fueron estadísticamente diferentes, el efecto sobre la acumulación de fluido total en los animales tratados con FIV-50 fue más evidente aún (FIG. 37A).

[0301] Ambos compuestos tuvieron un efecto sobre la recuperación de bacterias del fluido intestinal a las 72 horas luego de la infección (FIG. 38). Estos resultados sugieren que la habilidad de las bacterias ETEC para colonizar y persistir en el intestino disminuyen en presencia de PGE₂-imidazol o FIV-50. Si las bacterias no son capaces de colonizar, las mismas serán expulsadas del intestino.

[0302] El examen inicial de los tejidos indicó una alteración en la integridad de la superficie del intestino delgado de los animales tratados solo con ETEC, según se demostró mediante el acortamiento de la longitud de las microvellosidades y el tejido necrótico (FIG. 39, fotos superiores). Por el contrario, la integridad del intestino estuvo intacta en los animales tratados con FIV-50 así como también con PGE₂-imidazol (también infectados con ETEC) (FIG. 39, fotos al medio e inferiores).

[0303] Los estudios ultraestructurales del intestino delgado de ratones infectados con ETEC solamente demostraron una destrucción de las microvellosidades y muerte celular (FIG. 40). Se usó tejido control (no infectado) para comparación.

Las FIG. 41 y 42 demuestran más ejemplos de destrucción de tejido debido a toxicidad bacteriana (magnificación más alta, 32000X y 64000X respectivamente). Se mantuvo la integridad de la barrera del epitelio intestinal cuando los animales infectados con ETEC también se trataron con PGE₂-imidazol (FIG. 43). Como se observa en las imágenes de ME, las microvellosidades de las células parecen bastante intactas (pequeñas áreas de destrucción de microvellosidades), pero no se encontró evidencia de muerte celular. La integridad de la barrera epitelial intestinal se mantuvo completamente en ratones CD1 infectados con ETEC y que recibieron FIV-50 (FIG. 44). Como se observa en las imágenes de ME, las microvellosidades de las células estuvieron intactas (sin signos de destrucción de microvellosidades), y tampoco hubo evidencia de muerte celular. Microscópicamente, FIV-50 fue más eficaz que PGE₂-imidazol en la prevención del daño tisular por ETEC.

[0304] Se observó destrucción de las microvellosidades del intestino delgado de los animales infectados con ETEC. Fue evidente una reducción en el daño con el PGE₂-imidazol, pero la protección fue más evidente en los animales tratados con FIV-50. No se observó evidencia de toxicidad en los animales tratados con PGE₂-imidazol o con FIV-50 (no hubo sangrado, se mantuvo la integridad del epitelio intestinal, no hubo evidencia de muerte celular).

[0305] *Curso temporal luego de tratamiento con FIV-50:* se usaron 32 animales: (1) 4 ratones CD-1 por grupo a las 24 horas, (n = 8); (2) 4 ratones por grupo a las 48 horas (n = 8); (3) 8 ratones por grupo a las 72 horas (n = 16). Los animales recibieron ETEC (1x10⁸) +/-FIV-50 (0,1 mM) al tiempo 0 horas. Se administraron refuerzos de FIV-50 a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas. Los grupos de animales se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas. Se obtuvieron datos a las 24 horas (4 ratones por grupo), 48 horas (4 ratones por grupo) y 72 horas (8 ratones por grupo) luego de la infección. Se analizaron el peso del intestino, la relación peso/longitud intestinal y las unidades formadoras de colonias (UFC) en el fluido intestinal mediante una prueba *t* de Student de dos colas para muestras independientes.

[0306] Se observó un incremento transitorio en la acumulación de fluidos a las 24 horas en los animales tratados con FIV-50 (FIG. 45). Esta acumulación de fluidos

disminuye progresivamente en forma significativa con el tiempo (entre 24 y 72 horas) No se observó una significación estadística entre ETEC + FIV-50 a las 72 horas. Nota: se observó que se obtiene un efecto más significativo cuando el FIV-50 está recién preparado.

[0307] Se contaron las bacterias en el fluido intestinal, se incluyen los datos crudos de los animales seleccionados para demostrar diferencias significativas entre animales tratados con ETEC (ETEC) versus tratados con ETEC + FIV-50 (FIV-50) a diferentes tiempos, 24, 48 y 72 horas luego de la infección. Los datos que se presentan aquí son solamente a las 72 horas ($P < 0,01$ en animales tratados con FIV-50 vs. ETEC) (FIG. 46). Se observaron diferencias de 3 logaritmos en el número de bacterias recuperadas.

[0308] *Comparación entre tratamiento con FIV-50 – oral vs. tratamiento i.p.:* Para evaluar si el pico inicial de fluido a las 24 horas se debía a la administración de FIV-50 por vía oral, estos animales se compararon con animales infectados con ETEC que solo recibieron FIV-50 por ruta i.p. Se usaron 72 animales, (1) 24 ratones CD-1 que recibieron ETEC ($n = 8$ a las 24 horas, 8 a las 48 horas y 8 a las 72 horas); (2) 24 ratones CD-1 que recibieron ETEC + FIV-50 oral e i.p. ($n = 8$ a las 24 horas, 8 a las 48 horas y 8 a las 72 horas); (3) 24 ratones CD-1 que recibieron ETEC + FIV-50 solamente por vía i.p. ($n = 8$ a las 24 horas, 8 a las 48 hora y 8 a las 72 horas); Los animales recibieron ETEC (1×10^8) +/-FIV-50 (0,1 mM) al tiempo 0 horas (oral). Un solo grupo comenzó recibiendo FIV-50 después de 12 horas por vía i.p. Los refuerzos de FIV-50 i.p. se administraron a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas. Se sacrificaron los animales a las 24, 48 y 72 horas. Se obtuvieron datos a las 24 horas (4 ratones por grupo), 48 horas (4 ratones por grupo) y 72 horas (8 ratones por grupo) luego de la infección. Se analizó la relación peso/longitud intestinal mediante una prueba t de Student de dos colas para muestras independientes.

[0309] Se observó un incremento en la acumulación de fluidos a las 24 horas (* $P < 0,05$) en los animales tratados con ETEC + FIV-50-oral (FIV-50 oral) (FIG. 47). La eliminación de la inoculación oral inicial redujo la acumulación de fluidos. El efecto máximo de FIV-50 se observó a las 48 horas ($P < 0,01$) en este experimento.

Sin embargo, a las 72 horas luego de la infección, la acumulación de fluidos en los animales tratados con FIV-50 oral fue menor que en el control (ETEC).

[0310] *Cinética de crecimiento bacteriano en presencia o ausencia de FIV-50:*

Para determinar si las diferencias en la colonización intestinal se atribúan a la muerte de los organismos por FIV-50, se llevó a cabo una serie de estudios *in vitro* para establecer el efecto antibacteriano de FIV-50. Se crecieron cultivos de ETEC H10507 u otra bacteria entérica (aislados de *E. coli* y *Salmonella* patogénicos) en medio de crecimiento Luria-Bertani (LB) en presencia o ausencia de FIV-50 0,1 mM. El crecimiento de las cepas se monitoreó mediante medida de absorbancia a 600 nm a incrementos de una hora durante 6 h así como también mediante la cuantificación de diluciones seriadas y el plaqueo a las 0 y 6 horas para evaluar las velocidades de crecimiento. La densidad óptica de los cultivos corresponde directamente a las unidades formadoras de colonias/ml de bacteria: $1 \text{ OD } 600 = 8 \times 10^8$ bacterias.

[0311] Los datos mostraron que FIV-50 no tuvo efecto sobre el crecimiento debido a que no se observaron diferencias en la tasa de crecimiento en ausencia o en presencia de FIV-50 (FIG. 48). Por lo tanto, los efectos observados en la colonización intestinal no fueron debidos a la muerte de los organismos por FIV-50. La FIG. 49 es similar a la anterior, no se observaron diferencias en el crecimiento de bacterias incubadas con o sin FIV-50.

[0312] *Adhesión bacteriana a células epiteliales cultivadas:* Para determinar además si FIV-50 estaba teniendo un efecto sobre la adhesión bacteriana, se diseñó un experimento para evaluar la adherencia *in vitro* de la células tisulares en cultivo. Las bacterias se crecieron estáticamente en medio LB durante una noche a 37°C y se inocularon a una multiplicidad de infección de aproximadamente 10:1 sobre monocapas de células epiteliales cultivadas semiconfluentes (células HeLa en experimento 6 y células Caco-2 en experimento 7) crecidas en placas de microtitulación de 24 cavidades. Antes de su uso, se lavaron las células con solución salina amortiguada con fosfato estéril (PBS, pH 7,4) y se restituyeron con DMEM (medio de cultivo tisular esencial mínimo de Dulbecco). Las bacterias y las células se incubaron durante 3 horas a 37°C y 5% de CO₂, y luego se lavaron las

células cinco veces con 1 ml de PBS. Para cuantificar la adherencia de *E. coli*, se recuperaron las células con 200 µl de Triton X-100 al 0,1% en solución amortiguadora de PBS y se plaquearon en placas de agar con Luria con el antibiótico apropiado. Los datos se expresan como UFC/ml de bacterias recuperadas adherentes a partir de cavidades por triplicado, y representan al menos dos experimentos separados llevados a cabo por triplicado.

[0313] Solo se observó reducción de adherencia para ETEC (sin significación estadística) (FIG. 50). Por lo tanto, los resultados sugieren que FIV-50 no interfiere con la unión de las bacterias a las células in vitro y sustentan la importancia de los estudios vivo en donde el efecto inhibitorio sobre la adhesión se debe probablemente a la inhibición de la adenilato ciclasa. Se infectaron 1×10^6 células HeLa con 1×10^7 bacterias +/-FIV-50 y se cuantificó la adhesión luego de 3 horas. (Las células HeLa son una línea celular estándar que se usa en ensayos de adhesión bacteriana). La FIG. 51 es similar a la anterior, la reducción en la adherencia se observó solamente para ETEC. El pequeño incremento de adherencia en las otras cepas no fue estadísticamente significativo. FIV-50 no interfiere con la unión de las bacterias a las células o con la prevención del crecimiento bacteriano. Se infectaron 1×10^6 células HeLa con 1×10^7 bacterias +/-FIV-50 y se cuantificó la adhesión luego de 3 horas. La FIG. 52 es similar a las dos previas, la reducción de adherencia se observó para ETEC, pero en este caso se redujo la adherencia de dos cepas diferentes de ETEC y no se observó el mismo efecto en otros patógenos (no productoras de toxina LT). Se infectaron 1×10^6 HeLa células con 1×10^7 bacterias +/-FIV-50 y se cuantificó la adhesión luego de 3 horas. También se probó el efecto de FIV-50 sobre la adhesión bacteriana a células Caco-2 con FIV-50. En este caso, no se observó reducción de adherencia en muestras de bacterias incubadas con FIV-50, en su lugar, se observó un pequeño incremento de adherencia en las células tratadas con FIV-50 (sin significación estadística) (FIG. 53). El efecto puede deberse al tipo de células que se usó o a la falta de los receptores apropiados sobre las células. Se infectaron 1×10^6 células Caco-2 con 1×10^7 bacterias +/-FIV-50 y se cuantificó la adhesión luego de 3 horas (las células Caco-2 son una línea de células de la colonia

intestinal que también se usa en ensayos de adhesión bacteriana). La FIG. 54 es similar al experimento previo, no se observó reducción de adherencia, en su lugar, se observó un leve incremento en las muestras tratadas con FIV-50. Estos datos se obtuvieron luego de 3 horas de incubación y es posible que el efecto sobre estas células requiera mayores tiempos de incubación. Se infectaron 1×10^6 células Caco-2 con 1×10^7 bacterias +/-FIV-50 y se cuantificó la adhesión luego de 3 horas.

[0314] *Tratamiento comparativo con FIV-50 (FIV-50 solo por rutas oral o i.p.; definición de toxicidad):* Para evaluar si la presencia de FIV-50 en el intestino produce algún efecto tóxico sobre el tejido, se compararon los animales que recibieron ETEC solo, FIV-50 solo, ETEC + FIV-50 (ruta oral solamente), y ETEC + FIV-50 (ruta i.p. solamente). Se usaron 32 animales (8 animales por grupo), (1) ratones CD-1 que recibieron ETEC solamente; (2) ratones CD-1 que recibieron FIV-50 solamente; (3) ratones CD-1 que recibieron ETEC + FIV-50 solamente oral; (4) ratones CD-1 que recibieron ETEC + FIV-50 solamente i.p. Los animales recibieron ETEC (1×10^8) +/-FIV-50 (0,1 mM) a tiempo de 0 horas (oral o i.p.). Un grupo solamente recibió FIV-50 por vía oral (no ETEC), FIV-50 i.p. o refuerzos orales administrados a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas. Se sacrificaron los animales a las 24 y 72 horas. Los datos obtenidos a las 24 horas (4 ratones por grupo) y 72 horas (4 ratones por grupo) luego de la infección se analizaron para ver signos físicos de toxicidad (inflamación, acumulación de fluidos, sangrado, etc.) y se determinó el conteo bacteriano en ambos puntos de tiempo. Los datos se analizaron mediante una prueba *t* de Student de dos colas para muestras independientes.

[0315] No se observaron signos de sangrado o inflamación en ninguna de las condiciones probadas. Se observó acumulación de fluidos a las 24 horas (ETEC + FIV-50 por infección oral) como se informó en los experimentos previos. El tejido intestinal estuvo normal en comparación con los animales control (no infectados o con administración de FIV-50). Se hicieron los conteos bacterianos en los animales infectados con ETEC y se obtuvo una reducción en el conteo bacteriano en los ratones tratados con FIV-50 (FIG. 55). No se recuperaron bacterias en los animales que recibieron solamente FIV-50.

[0316] El modelo de ratón tratado con antibiótico con dieta restringida y los estudios llevados a cabo con FIV-50 y PGE₂-imidazol se optimizaron como se muestra en la presente. Además, se confirmó que FIV-50 inhibe la pérdida de fluido intestinal durante la infección experimental con *E. coli* enterotoxigénica, pero este compuesto incrementa la acumulación de fluidos en forma temprana durante la infección probablemente debido al modo de administración. FIV-50 tuvo un efecto sobre la habilidad de ETEC para colonizar el intestino delgado. Además, los datos histológicos y microscópicos confirmaron que el tratamiento con FIV-50 no daña la arquitectura intestinal. Los ensayos de adhesión in vitro confirmaron que FIV-50 afecta la unión de ETEC pero no exhibe un efecto similar sobre otros patógenos.

EJEMPLO 17

ESTUDIOS EN RATÓN DE COMPUESTOS DE TIPO FÓRMULA 1 CON TOXINA COLÉRICA

[0317] *Resumen del procedimiento experimental y resultados globales.* La toxina colérica (CT), cuando se inocula en el asa intestinal ligada de ratones, causa una distensión marcada debido a la acumulación de fluidos. Con el objetivo de determinar si PGE₂-L-histidina u otros compuestos reducen la actividad de PGE₂ inducida por CT, se usó el modelo murino de cólera experimental. El ensayo en asa intestinal ligada de ratón se llevó a cabo en ratones Swiss-Webster adultos (entre 6 y 8 semanas de edad) que se adquirieron y alojaron en un bioterio animal libre de patógenos. Brevemente, los ratones recibieron agua sin comida durante 18 horas antes de la cirugía para reducir el contenido de alimento del intestino delgado. Se hizo una incisión en la línea media ventral bajo anestesia con mezcla de isoflurano: etanol para exponer el intestino delgado. Se creó un segmento individual de entre 5 y 8 cm de intestino delgado, ligado con sutura de Vicril 00, en cada ratón. Se llevó a cabo el desafío intestinal mediante inyección de CT (1 µg) con o sin PGE₂ 200 µM en 100 µl de solución salina amortiguada con fosfato (PBS y albúmina bovina sérica (BSA) o entre 100 y 200 µM de los diferentes compuestos probados (FI-3, FI-2, FI-1, FIV-50, y FII-1) en 100 µl de PBS + BSA. Los grupos controles incluyeron animales inoculados con PGE₂-imidazol o con los

diferentes compuestos análogos probados en PBS/BSA o con dimetilsulfóxido al 1% (DMSO; usado para solubilizar los diferentes compuestos). Después de 6 horas de observación, se sacrificaron los animales mediante dislocación cervical y se sacaron las asas intestinales. En algunos de los experimentos, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de PGE₂-imidazol entre 100 y 200 µM o de los diferentes compuestos análogos como pretratamiento previo a la cirugía. Se midió la cantidad de fluido luminal y se expresó como µl/cm. Se analizaron los datos de acumulación de fluidos mediante una prueba *t* de Student de dos colas para muestras independientes o mediante prueba de Comparación para Grupos Múltiples de Dunnett.

[0318] En la Tabla 6 se muestra un resumen de los cambios mostrados por los análogos de PGE₂-imidazol y PGE₂-imidazol en un modelo murino de cólera experimental.

TABLA 6

Compuesto probado	Condiciones experimentales	Reducción de la acumulación de fluidos	Toxicidad
PGE ₂ -imidazol	Sin preincubación	Si	No
	4 horas de preincubación	Si	No
FI-3	Sin preincubación	Si	No
	4 horas de preincubación	Si	Si
FI-2	Sin preincubación	Si	No
	4 horas de preincubación	Si	No
FI-1	Sin preincubación	No	Si
FIV-50	Sin preincubación	Si	No

	4 horas de preincubación	Si	No
FII-1	Sin preincubación	No*	No

[0319] Con la optimización del modelo murino, PGE₂-imidazol confiere protección contra la pérdida de fluido intestinal durante la infección experimental con CT. Se llevaron a cabo estudios en el modelo murino de infección con CT con PGE₂-imidazol para una optimización adicional.

[0320] Como se ilustra en la FIG. 56, el PGE₂-imidazol reduce en forma eficaz la pérdida de fluido intestinal luego de la infección experimental con CT. Este experimento se repitió al menos dos veces y en la FIG. 56 se muestra un experimento representativo. Como experimentos controles, se llevaron a cabo infecciones con PGE₂-imidazol solo o con PBS+BSA, y los mismos confirmaron que estos compuestos en ausencia de CT no causan acumulación de fluidos en la configuración experimental.

[0321] Luego se determinó si la preincubación con PGE₂-imidazol potenciaba el efecto antisecretorio del compuesto. Se administraron cuarenta µg de PGE₂-imidazol en 200 µl de PBS por ruta intraperitoneal 4 horas antes del desafío. Como se ilustra en la FIG. 57, la preincubación con PGE₂-imidazol causa una reducción significativa en la acumulación de fluido intestinal luego de la infección experimental con CT. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes llevados a cabo en dos días diferentes.

[0322] Estos resultados indicaron que PGE₂-imidazol inhibe en forma significativa la secreción intestinal inducida por toxina colérica y que el modelo experimental era óptimo para probar cuál de los análogos identificados por tener una actividad in vitro incrementada es más eficaz durante la infección in vivo.

[0323] FI-3 también confirió protección contra la pérdida de fluido intestinal durante la infección experimental con CT pero mostró efectos tóxico. El primer análogo probado fue FI-3, que previamente se había demostrado que tenía una actividad dependiente de la dosis y una acumulación extracelular de AMPc reducida in vitro causada por la toxina de Edema de Bacillus anthracis.

[0324] En forma similar a los resultados obtenidos con PGE₂-imidazol, FI-3 causó una reducción eficaz y significativa en la acumulación de fluido intestinal luego de la infección experimental con CT (FIG. 58, representativa de dos experimentos independientes). Sin embargo, se observó que varios animales tratados con la mezcla de CT + FI-3 murieron antes del final del experimento a las 6 horas. Más aun, en los animales sobrevivientes, se observó que las asas ligadas se volvieron inflamadas y se recolectó sangre del lumen intestinal. En algunos casos, se observaron coágulos de sangre y acumulación de fluidos en el asa.

[0325] Se llevó a cabo un experimento adicional en donde se compararon los animales tratados con FI-3 al tiempo de la infección con aquellos que recibieron una dosis I.P. de FI entre 3 y 4 horas antes de la infección. Como se ilustra en la FIG. 59, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en los diferentes grupos de tratamiento sin importar el tiempo de preincubación. Otra vez, los animales murieron antes del punto final del experimento y varios animales que recibieron tratamiento con FI-3 mostraron edema, y acumulación de fluidos y sangre.

[0326] El siguiente compuesto que se probó fue FI-2, otro análogo de PGE₂-imidazol que mostró actividad inhibitoria de AMPc in vitro con efecto citotóxico mínimo. El análisis inicial mostró que FI-2 puede ser un compuesto promisorio que fue eficaz en la reducción de la acumulación de fluido intestinal luego de la infección experimental con CT (FIG. 60). Con FI-2 comúnmente no hubo edema presente, sin embargo, se observó acumulación de sangre en el asa y en la cavidad peritoneal. FI-2 fue protector contra la pérdida de fluido intestinal pero fue altamente tóxico para los animales.

[0327] Un aspecto para tener en mente es que FI-2 requiere el agregado de DMSO para solubilizarse y este solvente podría ser potencialmente tóxico in vivo. Como se demuestra en la FIG. 60, la inyección de las asas ligadas con DMSO al 1% causó una leve acumulación de fluido (sin embargo, una experimentación adicional demostró que el DMSO no era una fuente de toxicidad).

[0328] Similarmente a los estudios con FI-3, se compararon los animales tratados con CT al tiempo de la infección con aquellos que recibieron dosis I.P. Como se

ilustra en la FIG. 61, se observó una reducción de acumulación de fluidos (sin embargo, estadísticamente no significativa) cuando los animales pretratados se compararon con controles con CT. Sin embargo, el número de animales que sobrevive las 6 horas completas de incubación se redujo a la mitad, lo que no fue debido a la anestesia de la cirugía sino que se asoció con el efecto tóxico del compuesto. Los animales sobrevivientes que recibieron tratamientos con FI-2 mostraron intestinos sangrientos, destrucción de la microvasculatura y en algunos casos acumulación de fluidos.

[0329] Se iniciaron estudios adicionales para investigar el efecto tóxico que se observó en los animales tratados con FI-2. Los animales se pretrataron con FI-2, con DMSO al 1% solo o con CT/ FI-2 y luego se sacrificaron a diferentes puntos de tiempo para observar y registrar cambios en la arquitectura intestinal, acumulación de fluidos y daño de la cavidad peritoneal debidos al pretratamiento con FI-2 por ruta intraperitoneal (i.p.). Como se observa en la FIG. 62, panel A, el color del intestino ("rosado") y la provisión de sangre intacta (venas y arterias) representan un intestino de ratón intacto. En contraste, los intestinos que se obtuvieron de los animales pretratados con FI-2, 4 horas antes de la cirugía de asa intestinal, se volvieron frágiles y se observaron sangrantes incluso antes de la cirugía (panel B) y se observó un extenso sangrado luego de la ligación (panel C). Para descartar la posibilidad de que el DMSO que se usó para solubilizar el FI-2 fuera el responsable del sangrado, los ratones se inyectaron i.p. con DMSO al 1% y se incubaron durante 4 horas (panel D) o 7 horas (panel E). La integridad de los intestinos permaneció intacta y no se observó toxicidad. En contraste, los intestinos de los ratones inyectados con FI-2 e incubados durante 5,5 horas (panel F) o 7 horas (panel G) mostraron cambios drásticos en la coloración y la textura del intestino. Más aun, se interrumpió la provisión de sangre e incluso las heces mostraron una decoloración "verdosa/amarillenta" (panel F).

[0330] Para confirmar que el experimento resultó bien, se ligó el intestino de un animal control y se inyectó toxina colérica (CT) en el asa. 3 horas luego de la cirugía, se observó acumulación de fluidos en el asa (panel H). Por el contrario, los animales pretratados con FI-2 y luego inyectados con una solución con ambos CT

y FI-2 mostraron una reducción en la acumulación de fluidos, pero se observó un sangrado masivo y una destrucción de la arquitectura intestinal. Más aun, se observó sangre en la cavidad intraperitoneal y pulmonar (panel I). En resumen, el experimento confirmó que a pesar de que FI-2 es eficaz para reducir la acumulación de fluidos inducida por CT, también fue tóxico para los animales.

[0331] FI-1, un compuesto análogo a FI-2, no reduce la acumulación de fluidos y aún así fue tóxico. Para determinar si la toxicidad que se observó con FI-2 fue causada por la estructura del compuesto, se probó un compuesto análogo, FI-1, en el modelo del asa (FIG. 63).

[0332] En contraste al compuesto FI-2, FI-1 no causó una reducción en la acumulación de fluidos y en su lugar, produjo un leve incremento. Más aun, se observaron efectos tóxicos similares a FI-2 en aquellos animales inyectados con este compuesto. Los resultados sugieren que estructuras de compuestos similares podrían producir un efecto tóxico similar en la cavidad intestinal y en el asa intestinal pero los mismos no muestran la misma eficacia con respecto a la acumulación de fluidos.

[0333] FIV-50 fue protector contra la pérdida de fluido intestinal y no mostró ningún efecto tóxico evidente en los animales. Los compuestos que se clasificaron como inhibidores eficaces *in vivo* tanto para la Toxina de Edema como para la Toxina colérica, se probaron *in vitro*. El primer compuesto que se probó fue FIV-50, que fue extremadamente eficaz en los experimentos *in vitro* sin un efecto citotóxico obvio.

[0334] El primer juego de experimentos mostró que FIV-50 reduce eficazmente la acumulación de fluido intestinal luego de la infección experimental con CT (FIG. 64). No hubo edema presente en los animales tratados con FIV-50 solo, lo que indica que este compuesto no fue tóxico bajo las condiciones probadas. En algunos animales, se observó acumulación de sangre en el asa intestinal.

[0335] Se llevaron a cabo experimentos subsiguientes en donde los animales se pretrataron con una preincubación con FIV-50 antes de la ligación del asa, debido a que los compuestos previos, que no eran aparentemente tóxicos en el primer experimento, muestran una toxicidad si se usan para pretratar usando la ruta i.p.

Como se ilustra en la FIG. 65, se observó una reducción significativa en la acumulación de fluidos cuando se compararon los animales pretratados con los controles CT. Casi todos los animales sobrevivieron las 6 horas completas de incubación y no se observaron signos de efecto tóxico asociado con el pretratamiento con compuesto. Varios de los animales sobrevivientes que recibieron pretratamiento con FIV-50 mostraron intestinos sangrientos y la acumulación de sangre en el asa fue más común que en los animales controles tratados con CT solo.

[0336] FII-1 produjo una leve reducción en la pérdida de fluido intestinal pero no fue realmente eficaz debido a que se separó de la solución cuando se mezcló el compuesto con el amortiguador que se usa para ajustar el volumen a inyectar. Se probó un segundo compuesto identificado a partir de los estudios *in vivo*, que fue FII-1. Este compuesto también fue eficaz en los experimentos *in vitro* sin ningún efecto citotóxico obvio.

[0337] FII-1 no causó una reducción significativa en la acumulación de fluidos y en su lugar, produjo un leve incremento en la acumulación de fluidos cuando los animales recibieron el compuesto solo (FIG. 66). Se observaron efectos tóxicos; sin embargo, es importante destacar que el compuesto FII-1 se separó de la solución cuando se lo mezcló con el amortiguador de carga (PBS y BSA).

[0338] Se optimizaron el modelo murino de cólera experimental y los estudios llevados a cabo con PGE₂-imidazol y otros análogos. Se confirmó que PGE₂-imidazol confiere protección contra la pérdida de fluido intestinal durante la infección experimental con CT. Más aun, se demostró que FI-3 y FI-2 también pueden reducir la pérdida de fluido intestinal. El compuesto FIV-50 es un análogo promisorio eficaz en el modelo de asa murino. Finalmente, se iniciaron estudios con FII-1 y los resultados indicaron que este compuesto también es un inhibidor.

EJEMPLO 18

EJEMPLOS DE COMPUESTOS Y SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0339] Las moléculas que originalmente se calificaron como activas fueron aductos de aminas de una ciclopentenona, PGA₂. Esta fue la primera estructura que condujo a la síntesis de una serie de aductos de amina simple de enonas

cíclicas (FIG. 67). A pesar de ser activos, los aductos de este tipo se calificaron como inestables con respecto a su reacción inversa. Como consecuencia, se desarrolló una nueva serie de compuestos en donde el enlace carbono-nitrógeno se reemplazó por un enlace carbono-carbono que sería no susceptible a la reacción de eliminación no deseada. Estas moléculas se diseñaron para contener un anillo heterocíclico muy parecido a los aductos de imidazol originales. Una vez que se desarrolló la química para su síntesis, estas estructuras constituyeron uno de los primeros juegos de compuestos sintetizados y probados. Se descubrieron varios compuestos con actividades semejantes a la encontrada en el primer compuesto.

[0340] Nuevos heterocíclicos asociados a uniones bC-N: Las moléculas que originalmente se clasificaron como activas fueron aductos de aminas de una ciclopentenona, FGA₂. Esta fue la primera estructura que condujo a la síntesis de una serie de aductos de amina simple de enonas cíclicas (FIG. 67). A pesar de ser activos, se estableció que los aductos de este tipo eran inestables con respecto a su reacción inversa. Como consecuencia, se desarrolló una nueva serie de compuestos en donde el enlace carbono-nitrógeno se reemplazó por un enlace carbono-carbono que sería no susceptible a la reacción de eliminación no deseada. Estas moléculas se diseñaron para contener un anillo heterocíclico muy parecido a los aductos de imidazol originales. Una vez que se desarrolló la química para su síntesis, estas estructuras constituyeron uno de los primeros juegos de compuestos sintetizados y probados. Se descubrieron varios compuestos con actividades semejantes a la encontrada en el primer compuesto. Este trabajo se ha expuesto en informes previos.

[0341] Se siguió otra estrategia para la síntesis de aductos heterocíclicos que sean estables. Debido a que los aductos originales eran inestables a la eliminación, se diseñó un juego de moléculas que unió el heterociclo a un carbono con hibridización sp². Es posible que estos compuestos que poseen un enlace C-N con un carbono de hibridización sp² sean eliminados debido a que dicha reacción transformaría un alquino en un anillo pequeño de cinco o seis miembros. Se sintetizaron y ensayaron tanto los aductos de ciclopentenona como de

ciclohexenona. Interesantemente, estos compuestos fueron inactivos para la inhibición del factor de edema del ántrax y de la toxina colérica.

[0342] *Estructuras tricíclicas.* Los tipos de estructuras que se probaron originalmente fueron muy simples. Debido a que los resultados del ensayo parecen plancharse en el rango de los 10 μmol , se decidió sintetizar una serie de compuestos que tiene un segundo anillo anclado a la cetona cíclica parental, mientras que se mantiene al mejor farmacóforo hallado en los análisis previos. Estas moléculas poseen un segundo anillo unido al núcleo de ciclohexanona en la posición 5 (FIG. 68). Se compraron el fluorobenceno y el las furanociclohexa-1,3-ciclodionas y se desarrolló la química para convertirlos a las moléculas deseadas en dos pasos. En el ensayo inicial, el derivado de parafluorofenilo demostró una actividad que pareció promisoria. Sin embargo, en el ensayo en asa intestinal se descubrió que era tóxico.

[0343] *Nuevos compuestos principales en base a desarrollo computacional.* En conjunto con la química medicinal que se lleva a cabo, se hizo modelado molecular sobre el sitio activo de la enzima en un intento por encontrar nuevos tipos de estructura que puedan tener potencial como inhibidores. Se ensayó un compuesto que surgió del modelado molecular y halló una actividad promisoria. En base a este compuesto principal, se sintetizaron tres nuevos compuestos (FIG. 69). En una forma de realización, estas estructuras proveen acceso a nuevos compuestos con mejor actividad y propiedades fisiológicas.

[0344] En un intento por hallar nuevos derivados con mejor solubilidad, se sintetizó una serie de nuevas moléculas en base al compuesto principal de fluorenona. El objetivo en la síntesis de estas moléculas es mejorar la actividad, solubilidad y aprender más acerca de la relación estructura actividad de la molécula. Se sintetizaron las benzamidas (**FI-10** y **FI-11**) primariamente para mejorar la solubilidad del sistema. Las versiones de bifenilo se sintetizaron para mejorar la solubilidad a la vez reteniendo un carácter hidrofóbico más similar a la fluorenona. Se sintetizaron moléculas que toman ventaja del farmacóforo original teniendo a la vez una funcionalidad adicional. El objetivo de esta estrategia fue identificar compuestos que tengan mayor actividad a través de la interacción con

un segundo sitio de unión. A pesar de ser eficaces en el ensayo, mostraron ser tóxicos. Además, a través de una estrategia de modelado molecular, se identificaron dos tipos de estructura que demostraron una actividad promisorio en los ensayos *in vivo*.

EJEMPLO 19

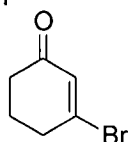
MÉTODOS PARA EL EJEMPLO 20

[0345] Métodos generales: Todos los solventes usados en las reacciones se secaron antes de usarse salvo que se indique lo contrario. La cromatografía en capa delgada se llevó a cabo usando placas pre-recubiertas con gel de sílice 60 F₂₄ (250 µm de espesor). La cromatografía de columna se llevó a cabo usando gel de sílice 60 de malla 230-400. Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Varian 300 MHz; los desplazamientos químicos se informan en unidades δ en relación con la señal de tetrametilsilano (TMS) a 0,00 ppm. Las constantes de acoplamiento se informan en Hz. La espectroscopía de masa de alta resolución fue realizada en el centro de espectrometría de masa y proteómica de la Ohio State University.

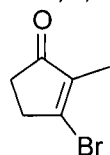
[0346] Procedimiento general para la síntesis de las bromoenonas 16 y 21: Se diluyó trifenilfosfina (14,4 g, 55 mmol, 1,1 equiv.) en 80 ml de benceno anhidro. La solución se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se agregó por goteo una solución de Br₂ 1M en benceno (55 mmol, 1,1 equiv.) empleando un embudo de adición. Después de la adición del bromo, se dejó subir la temperatura de la mezcla hasta la temperatura ambiente y se agregó trietilamina (7,8 ml, 55 mmol, 1,1 equiv.) con una jeringa seguido la adición rápida de una suspensión de la 1,3-diona (7,0 g, 50 mmol, 1,0 equiv.) en cloruro de metileno. La mezcla luego se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente. El solvente se eliminó en un evaporador rotativo y el residuo se diluyó en CH₂Cl₂ y se adsorbió en gel de sílice antes de la cromatografía flash eluyendo con 0-50% acetato de etilo-hexano para dar la bromoenona en buenos rendimientos.

[0347] Procedimiento general para el acoplamiento de Suzuki: Se cargó un vial para microondas con una varilla de agitación, bromoenona (100 mg, 1 equiv.), ácido borónico o éster (1,2 equiv.) y etanol (4 ml). A la solución se agregó K₂CO₃

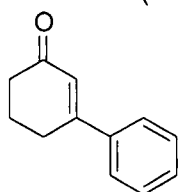
1M (1,2 equiv.) seguido por la adición del catalizador de paladio (FC 1001, 0,8 mol % Pd) con soporte de polímero. La reacción se sometió a las siguientes condiciones de microondas: Potencia 250 W, Temperatura 110°C, Rampa 1:00 min, Tiempo de mantenimiento 5 min, Potencia máxima activada (enfriamiento de aire continuo). La reacción luego se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de un tapón de celite eluyendo con acetato de etilo o cloruro de metileno. El solvente se evaporó en un evaporador rotativo. El residuo se diluyó en cloruro de metileno y se lavó con salmuera. Las capas orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice automática para dar el producto deseado con rendimientos moderados a buenos.



[0348] 3-Bromociclohex-2-enona. A un balón de 250 ml con varilla de agitación bajo atmósfera de nitrógeno se agregó 17,72 g de trifenilfosfina (67,57 mmol) y 60 ml de benceno anhidro. La reacción se agitó y se enfrió a 0°C en un baño de agua hielo. Se agregó bromo (3,50 ml, 68,11 mmol) por goteo a la solución bien agitada durante un período de 30 minutos. Después de la adición, la reacción se agitó por otra hora a temperatura ambiente y se agregaron 9,5 ml de trietilamina (67,60 mmol) con jeringa seguido por una solución de 1,3-ciclohexanodiona (5,125 g en 25 ml de CHCl_3 , 45,71 mmol). La reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La reacción se purificó haciendo pasar la mezcla a través de un embudo de filtro que contenía 3 cm de gel de sílice y lavando con éter (50 ml). El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía flash en el sistema Biotage, eluyendo con entre 0% y 50% de acetato de etilo/hexanos. Las fracciones de producto se recolectaron y se concentró para dar un aceite incoloro (5,634 g, 70%). (Ref. *JOC* **1982**, 47, 2829.) ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 2,07 (quintuplete, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,81 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 6,46 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 23,0, 36,3, 36,4, 132,4, 150,0, 196,0.

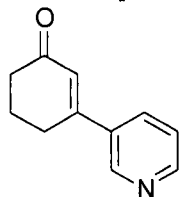


[0349] 3-Bromo-2-metilciclopent-2-enona. Un balón de 250 ml se secó en el horno y se enfrió bajo vacío. Al recipiente se agregaron 25,03 g de PPh_3Br_2 (59,31 mmol), y el recipiente se colocó bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregó benceno anhidro (150 ml) con jeringa, y la solución se agitó durante 20 min. antes de la adición de Et_3N (8,40 ml, 59,76 mmol). Después de la adición, se agregó 2-metilciclopentanediona (5,23 g, 46,66 mmol) a la solución agitada. La reacción se agitó durante 12 horas y se purificó haciendo pasar la mezcla de reacción anaranjado pálido a través de un embudo de filtro con relleno de gel de sílice. El filtrado se recolectó en un recipiente de fondo esférico y el gel de sílice se lavó con otros 20 ml de éter. El solvente se eliminó bajo presión reducida y el compuesto se purificó por destilación al vacío (42-43°C, 0,1 mm Hg) para dar un aceite amarillo pálido (4,10 g, 50%). (Ref. *Synthetic Communications* **1975**, 5 (3), 193-199). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1,79 (t, $J = 2,4$ Hz, 3H), 2,54-2,57 (m, 2H), 2,90-2,95 (m, 2H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 10,0, 35,1, 35,8, 141,3, 156,1, 204,0.

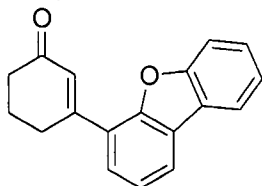


[0350] 3-Fenilciclohex-2-enona (FI-4). Un vial para microondas se cargó con una varilla de agitación, 3-bromociclohex-2-enona (65 mg, 1 equiv., 0,37 mmol), ácido fenilborónico (55 mg, 1,2 equiv., 0,45 mmol) y etanol (4 ml). A la solución se agregó 1M K_2CO_3 (1,2 equiv., 0,45 mmol) seguido por la adición de el catalizador de paladio soportado en polímero FC 1001 (27 mg, 3 mol % Pd). La reacción se sometió a las siguientes condiciones de microondas: Potencia 250 W, Temperatura 110°C, tiempo de rampa 1:00 min, tiempo de mantenimiento 5 min, Potencia Máxima conectada (enfriamiento continuo con aire). La reacción luego se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de un tapón de celite eluyendo con acetato de etilo. El solvente se evaporó en un evaporador rotativo. El residuo se diluyó en cloruro de metileno y se lavó con salmuera. La capa orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice automática usando elución en gradiente (0 a 20% acetato de etilo/hexanos) para dar el producto deseado como un sólido blanco (48 mg, 75% de rendimiento). ^1H

RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,50-7,53 (m, 2H), 7,36-7,41 (m, 3H), 6,40 (t, $J = 1,4$ Hz, 1H), 2,76 (td, $J = 6,9, 1,2$ Hz, 2H), 2,48 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 2,14 (quintuplete, $J = 6,9$ Hz, 2H). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 199,6, 159,6, 138,6, 129,8, 128,6, 125,9, 125,3, 37,3, 28,1, 22,9. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}$) m/z 172,09; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 173,17.

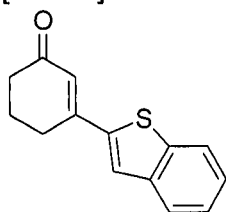


[0351] 3-Piridin-3-il-ciclohex-2-enona (FI-5). Se preparó como se describe precedentemente a partir de 3-bromociclohex-2-enona y 3-ácido piridinilborónico. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (20 a 60 % acetato de etilo/hexanos) dio el producto (42 mg, 54%) como un sólido anaranjado oscuro. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,80 (ddd, $J = 7,8, 2,4, 1,5$ Hz, 1H), 7,34 (ddd, $J = 7,8, 4,5, 0,6$ Hz, 1H), 6,41 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H), 2,78 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 2,51 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,19 (quintuplete, $J = 6,2$ Hz, 2H). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 199,2, 156,5, 150,8, 147,3, 133,4, 126,6, 123,6, 37,4, 28,0, 22,9. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}$) m/z 173,08; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 174,16.

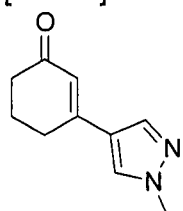


[0352] 3-Dibenzofuran-4-il-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y ácido dibenzofuran-4-borónico de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 20 % acetato de etilo/hexanos) dio el producto (141 mg, 83%) como un sólido blanco. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,91 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H), 7,30-7,58 (m, 5H), 6,90 (s, 1H), 2,97 (t, $J = 4,7$ Hz, 2H), 2,56 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), 2,21 (quintuplete, $J = 5,8$ Hz, 2H). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 200,1, 156,2, 155,9, 153,3, 128,6, 127,7, 125,6, 125,3, 124,0, 123,5, 123,2, 123,0, 122,0, 120,7, 111,9, 37,7, 29,0, 23,2. HRMS

(Electrospray LCT): masa calculada para ($C_{13}H_{14}O_2 + Na$) m/z 285,0891; medida $[M+Na]^+$: m/z 285,0895.

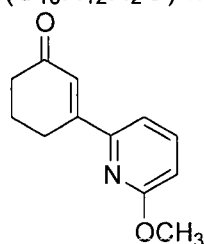


[0353] 3-Benzo[b]tiofen-2-il-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y ácido benzotiofen-2-borónico de acuerdo con el procedimiento general descripto para el acoplamiento de Suzuki. La purificación por cromatografía flash automática dio el producto (134 mg, 89%) como un sólido blanco. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7,73-7,82 (m, 2H), 7,58 (s, 1H), 7,31-7,39 (m, 2H), 6,46 (s, 1H), 2,87 (td, $J = 5,9, 1,2$ Hz, 2H), 2,51 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,18 (quintuplete, $J = 6,3$ Hz, 2H). ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): 199,3, 152,5, 142,6, 140,2, 139,8, 126,3, 125,04, 125,0, 124,9, 124,6, 122,5, 37,6, 27,9, 22,8. HRMS (Electrospray LCT): masa calculada para ($C_{14}H_{12}OS + Na$) m/z 251,0507; medida $[M+Na]^+$: m/z 251,0501.

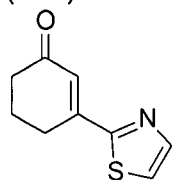


[0354] 3-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-ciclohex-2-enona. A un balón de 50 ml con varilla de agitación se agregó 0,152 g de 3-bromociclohex-2-enona (0,868 mmol), 0,216 g de 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1,04 mmol), 5 ml de THF, 4,0 ml de una solución acuosa de solución de KF 2,0 M, y 0,139 g de 5% Pd sobre carbón activado (Degussa tipo E105 CAW, 7,5 mol %). La reacción se agitó, se colocó bajo nitrógeno, y se calentó a 60°C en un baño de aceite durante la noche. La reacción no se completó por TLC de modo que la temperatura se elevó a 80°C y se calentó por otras 18 horas. La reacción se purificó por filtración de la mezcla cruda a través de un tapón de celite y extracción con cloruro de metileno (2 veces con 5 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se secó con sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. La mezcla se hizo pasar a través de una columna Fisher Prep Sep SCX eluyendo con 8 ml de CH_2Cl_2 seguido por 5 ml de metanol/amoniaco (7N). Las fracciones no

eran puras, de manera que la purificación se realizó usando cromatografía flash en el sistema Biotage utilizando elución en gradiente (0% a 80% acetato de etilo/hexanos). Las fracciones de producto se combinaron y se concentró para dar un polvo blanco (45 mg, 29%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 2,09 (quintuplete, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,41-2,46 (m, 2H), 2,63 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 3,92 (s, 3H), 6,26 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,69 (s, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 22,5, 27,9, 37,4, 39,4, 121,5, 128,6, 137,6, 151,9, 199,3. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$) m/z 176,09; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 177,08.

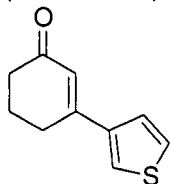


[0355] 3-(6-Metoxi-piridin-2-il)-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y éster de ácido 6-metoxi-2-piridinborónico N-fenildietanolamina de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 80 % acetato de etilo/hexanos) dio el producto (156 mg, 89%) como un polvo blanco. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 2,15 (quintuplete, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,50 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,86 (td, 6,3, 1,5 Hz, 2H), 3,95 (s, 3H), 6,75 (dd, $J = 8,4, 0,6$ Hz, 1H), 6,91 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H), 7,13 (dd, 7,5, 0,6 Hz, 1H), 7,59 (td, $J = 7,5, 0,6$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 22,7, 26,2, 37,7, 53,3, 112,2, 114,1, 126,1, 138,8, 152,6, 157,7, 163,2, 200,5. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2$) m/z 203,09; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 204,05.



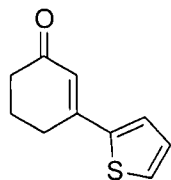
[0356] 3-Tiazol-2-il-ciclohex-2-enona. A un recipiente de fondo esférico de 100 ml con varilla de agitación se agregó 0,185 g de polvo de cinc (2,83 mmol) y 3 ml de N, N-dimetilacetamida. El recipiente se colocó bajo nitrógeno y se agregaron 0,08 ml de TMS-cloruro (0,63 mmol) y 0,05 ml de 1,2-dibromoetano (0,58 mmol). La reacción se agitó durante 5 min. y se agregó con jeringa 0,09 ml de 2-bromotiazol (0,998 mmol). La reacción se agitó durante 1 hora a temperatura

ambiente bajo nitrógeno. A un recipiente de fondo esférico de 100 ml separado con varilla de agitación se agregó 0,124 g de 3-bromociclohex-2-enona (0,708 mmol) y 0,024 g de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (4,8 mol%), y 10 ml de THF anhidro. La especie organocina preparada previamente se agregó a la solución de enona por goteo eliminando el cino en exceso usando una jeringa provista de un tapón de algodón. La reacción se calentó durante la noche a 60°C en un baño de aceite con agitación bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se purificó transfiriendo la solución a un vial que contenía 10 ml de solución saturada de cloruro de amonio, y el producto se extrajo con acetato de etilo (2 veces con 8 ml). La capa orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró, y el solvente se concentró bajo presión reducida. El producto se purificó por cromatografía flash usando el Sistema Biotage con elución en gradiente (0% a 80% acetato de etilo/hexanos). Las fracciones de producto se combinaron y se concentró para dar un sólido amarillo pálido (35 mg, 28%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 2,17 (quintuplete, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,52 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,97 (td, $J = 6,3, 1,5$ Hz, 2H), 6,69 (br s, 1H), 7,45 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 7,93 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 22,4, 27,0, 37,8, 121,4, 126,6, 144,4, 151,7, 166,7, 199,4. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_9\text{H}_9\text{NOS}$) m/z 179,04; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 180,03.

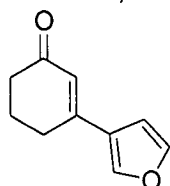


[0357] 3-Tiofen-3-il-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y ácido 3-tiofeno borónico de acuerdo con el procedimiento general descripto para el acoplamiento de Suzuki. El producto se purificó por cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 50% acetato de etilo/hexanos). Un sólido amarillo se aisló después de recoger las fracciones y recrystalizar a partir de hexanos y acetato de etilo para dar 0,086 g de agujas incoloras (72%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 2,13 (quintuplete, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,47 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,76 (dd, $J = 6,3, 1,2$ Hz, 2H), 6,39 (t, $J = 1,2$ Hz, 1H), 7,31-7,36 (m, 2H), 7,55 (dd, $J = 2,7, 1,5$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ

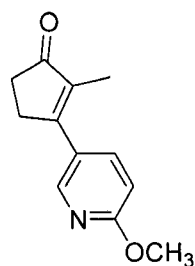
22,6, 27,8, 37,4, 123,8, 124,9, 125,0, 126,6, 140,5, 153,3, 199,9. LCMS (ESI): masa calculada para (C₁₀H₁₀OS) m/z 178,05; medida [M+H]⁺: m/z 179,04.



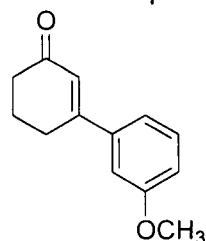
[0358] 3-Tiofen-2-il-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y ácido 2-tiofenborónico de acuerdo con el procedimiento general descripto para el acoplamiento de Suzuki. El producto se purificó haciendo pasar el producto a través de un pequeño tapón de gel de sílice eluyendo con cloruro de metileno y recristalización a partir de hexanos y acetato de etilo para dar un sólido cristalino amarillo pálido (125 mg, 83%). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 7,42 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 7,36 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,08 (t, J = 3,9 Hz, 1H), 6,41 (s, 1H), 2,79 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 2,46 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 2,14 (quintuplete, J = 6,3 Hz, 2H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ 199,2, 152,3, 142,6, 128,7, 128,2, 127,2, 122,7, 37,3, 28,1, 22,5. LCMS (ESI): masa calculada para (C₁₀H₁₀OS) m/z 178,05; medida [M+H]⁺: m/z 179,04.



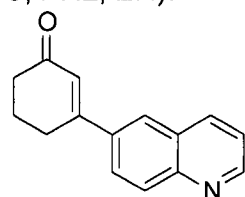
[0359] 3-Furan-3-il-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y ácido furan-3-borónico de acuerdo con el procedimiento general descripto para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice usando elución en gradiente (0 a 30 % éter/hexanos) dio el producto (13 mg, 16%) como un sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,70 (s, 1H), 7,44 (t, J = 1,9 Hz, 1H), 6,59 (t, J = 1,1 Hz, 1H), 6,24 (s, 1H), 2,63 (td, J = 5,7, 1,1 Hz, 2H), 2,46 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 2,11 (quintuplete, J = 6,3 Hz, 2H). ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 200,1, 152,0, 144,6, 142,4, 126,0, 123,3, 107,6, 37,6, 27,5, 22,7. HRMS (Electrospray LCT): masa calculada para (C₁₀H₁₀O₂ + Na) m/z 185,0578; medida [M+Na]⁺: m/z 185,0574.



[0360] 3-(6-Metoxi-piridin-3-il)-2-metil-ciclopent-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromo-2-metilciclopent-2-enona y ácido 6-metoxipiridin-3-borónico de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación por cromatografía flash automática dio el producto (138 mg, 92%) como un sólido blanco. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8,41 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,77 (dd, $J = 8,5, 2,5$ Hz, 1H), 6,83 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 3,99 (s, 3H), 2,92-2,87 (m, 2H), 2,56-2,53 (m, 2H), 1,99 (t, $J = 1,9$ Hz, 3H). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 208,9, 164,4, 162,6, 146,4, 137,4, 135,9, 125,4, 110,9, 53,8, 33,8, 28,7, 10,2. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2$) m/z 203,09; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 204,09.

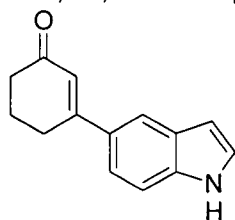


[0361] 3-(3-Metoxi-fenil)-ciclohex-2-enona (FI-15). Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y ácido 3-metoxifenilborónico de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 80% acetato de etilo/hexanos) dio el producto (141 mg, 88%) como un sólido amarillo pálido. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,30 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,10 (dd, $J = 8,0, 0,8$ Hz, 1H), 7,03 (t, $J = 2,2$ Hz, 1H), 6,93 (dd, $J = 8,3, 2,5$ Hz, 1H), 6,39 (bs, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,75 (td, $J = 6,1, 0,8$ Hz, 2H), 2,48 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,14 (quintuplete, $J = 6,1$ Hz, 2H).

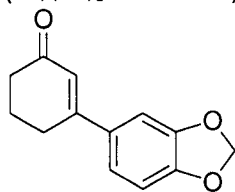


[0362] 3-Quinolin-6-il-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)quinolina de

acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (40 a 100 % acetato de etilo/hexanos) dio el producto (164 mg, 88%) como un polvo blanco. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8,92 (dd, $J = 4,2, 1,5$ Hz, 1H), 8,17 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 8,11 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,95 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,86 (dd, $J = 9,0, 2,4$ Hz, 1H), 7,43 (dd, $J = 8,4, 4,5$ Hz, 1H), 6,54 (s, 1H), 2,89 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 3,53 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,21 (pent, $J = 6,3$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 199,4, 158,3, 151,2, 148,6, 136,7, 136,5, 129,9, 127,8, 126,8, 126,3, 125,7, 121,7, 37,3, 28,2, 22,8. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}$) m/z 223,10; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 224,80.

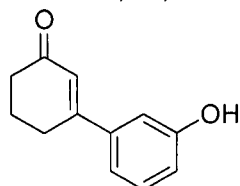


[0363] 3-(1H-Indol-5-yl)-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y pinacol éster de ácido indol-5-borónico de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente dio el producto (151 mg, 83%) como un sólido amarillo pálido. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8,68 (bs, 1H), 7,86 (d, $J = 0,3$ Hz, 1H), 7,37-7,44 (m, 2H), 7,25 (dd, $J = 3,3, 2,5$ Hz, 1H), 6,59 (t, $J = 2,5$ Hz, 1H), 6,51 (t, $J = 1,1$ Hz, 1H), 2,88 (td, $J = 6,3, 1,4$ Hz, 2H), 2,51 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,18 (quintuplete, $J = 6,0$ Hz, 2H). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 200,1, 161,5, 136,7, 130,1, 127,9, 125,4, 123,7, 120,2, 119,1, 111,3, 103,3, 37,3, 28,5, 23,0. HRMS (Electrospray LCT): masa calculada para ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO} + \text{Na}$) m/z 234,0895; medida $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 234,0897.

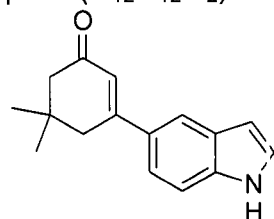


[0364] 3-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y ácido 3,4-metilendioxifenilborónico de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 80%

acetato de etilo/hexanos) dio el producto (164 mg, 85%) como un sólido blanco. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,07-7,00 (m, 2H), 6,81 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 6,31 (s, 1H), 5,99 (s, 2H), 2,70 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 2,45 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,12 (quintuplete, $J = 6,3$ Hz, 2H). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 199,7, 159,0, 149,2, 143,2, 132,8, 124,2, 120,7, 108,4, 106,3, 101,6, 37,4, 28,3, 23,0. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_3$) m/z 216,08; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 216,95.

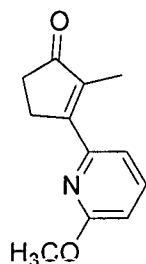


[0365] 3-(3-Hidroxi-fenil)-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y ácido 3-hidroxifenilborónico de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación por cromatografía flash automática dio el producto (83 mg, 64%) como un sólido amarillo pálido. ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7,22 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,05 (ddd, $J = 7,8, 1,5, 0,9$ Hz, 1H), 6,98 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H), 6,83 (ddd, $J = 8,1, 2,4, 1,2$ Hz, 1H), 6,31 (t, $J = 1,2$ Hz, 1H), 2,79 (td, $J = 6,0, 1,5$ Hz, 2H), 2,46 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,12 (quintuplete, $J = 6,6$ Hz, 2H). ^{13}C (75 MHz, CD_3OD): 202,5, 163,4, 158,8, 141,3, 130,7, 125,2, 118,4, 118,2, 113,8, 38,1, 29,2, 23,9. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$) m/z 188,08; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 189,0.

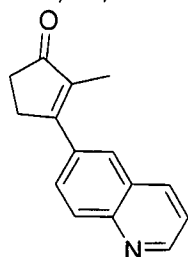


[0366] 3-(1H-Indol-5-il)-5,5-dimetil-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-Bromo-5,5-dimetil-ciclohex-2-enona y ácido indol-5-borónico pinacol éster de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 80% acetato de etilo/hexanos) dio el producto (177 mg, 95%) como un sólido blancuzco. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8,97 (bs, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,39 (d, $J = 1,2$ Hz, 2H), 7,22 (dd, $J = 3,0, 2,1$ Hz, 1H), 6,56 (dd, $J = 3,0, 2,1$ Hz, 1H), 6,49 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H), 2,74 (d, $J = 1,2$ Hz, 2H), 2,35 (s, 2H), 1,25 (s, 3H), 1,14 (s, 3H). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 200,4, 159,5, 136,8, 130,2, 127,9, 125,5, 122,4, 120,1,

119,1, 111,3, 103,1, 50,9, 42,6, 33,8, 28,4, 24,9. HRMS (Electrospray LCT): masa calculada para ($C_{16}H_{17}NO + Na$) m/z 262,1208; medida $[M+Na]^+$: m/z 262,1204.

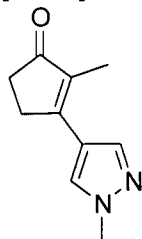


[0367] 3-(6-Metoxi-piridin-2-il)-2-metil-ciclopent-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromo-2-metilciclopent-2-enona y ácido 6-metoxi-2-piridinborónico N-fenildietanolamina éster de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 50% acetato de etilo/hexanos) dio el producto (94 mg, 69%) como un sólido amarillo pálido. ^1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7,64 (dd, $J = 8,4, 7,5$ Hz, 1H), 7,17 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,75 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,00-2,95 (m, 2H), 2,56-2,53 (m, 2H), 2,20 (t, $J = 2,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 210,2, 163,2, 152,0, 138,8, 138,6, 129,1, 116,1, 111,7, 53,6, 33,9, 27,7, 10,6. LCMS (ESI): masa calculada para ($C_{12}H_{13}NO_2$) m/z 203,09; medida $[M+H]^+$: m/z 204,04.

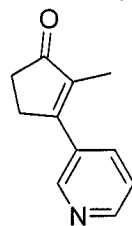


[0368] 2-Metil-3-quinolin-6-il-ciclopent-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromo-2-metilciclopent-2-enona y ácido indol-5-borónico pinacol éster de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (40 a 100% acetato de etilo/hexanos) dio el producto (146 mg, 78%) como un sólido blanco. ^1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8,95 (dd, $J = 4,2, 1,5$ Hz, 1H), 8,21 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 8,16 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,95 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,86 (dd, $J = 8,7, 1,8$ Hz, 1H), 7,45 (dd, $J = 8,1, 4,2$ Hz, 1H), 3,01-3,05 (m, 2H), 2,59-2,62 (m, 2H), 2,05 (t, $J = 2,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 209,3, 165,2, 151,3, 148,1, 137,4, 136,4, 134,6, 129,8, 128,4, 127,9, 127,0, 121,8, 34,1,

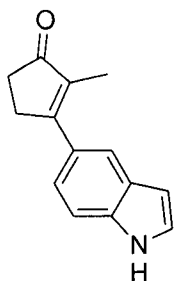
29,5, 10,2. LCMS (ESI): masa calculada para ($C_{15}H_{13}NO$) m/z 223,10; medida $[M+H]^+$: m/z 223,74.



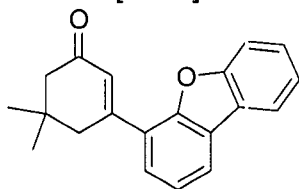
[0369] 2-Metil-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-ciclopent-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromo-2-metilciclopent-2-enona y 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 100% acetato de etilo/hexanos) y recristalización posterior dio el producto (21 mg, 16%) como un sólido blanco. ^1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7,80 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 2,84-2,80 (m, 2H), 2,52-2,48 (m, 2H), 1,95 (t, $J = 2,1$ Hz, 3H). LCMS (ESI): masa calculada para ($C_{10}H_{12}N_2O$) m/z 176,09; medida $[M+H]^+$: m/z 177,09.



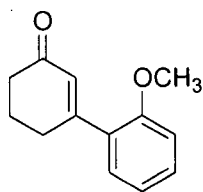
[0370] 2-Metil-3-piridin-3-il-ciclopent-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromo-2-metilciclopent-2-enona y ácido 3-piridinborónico de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 100% acetato de etilo/hexanos) y recristalización posterior dio el producto (38 mg, 31%) como un aceite pardo. ^1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8,78 (s, 1H), 8,63 (br d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 7,82 (dt, $J = 8,1, 2,1$ Hz, 1H), 7,40 (dd, $J = 8,1, 4,8$ Hz, 1H), 2,91-2,96 (m, 2H), 2,53-2,59 (m, 2H), 1,98 (t, $J = 2,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 208,8, 162,5, 150,1, 148,3, 137,9, 134,5, 129,1, 123,4, 33,9, 29,0, 9,9. LCMS (ESI): masa calculada para ($C_{11}H_{11}NO$) m/z 173,08; medida $[M+H]^+$: m/z 174,07.



[0371] 3-(1H-Indol-5-yl)-2-metil-ciclopent-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromo-2-metilciclopent-2-enona y 5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-indol de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 100% acetato de etilo/hexanos) y recristalización posterior dio el producto (138 mg, 92%) como sólido amarillo pálido. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7,86 (s, 1H), 7,47-7,39 (m, 2H), 7,27 (t, $J = 3,0$ Hz, 1H), 6,62 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H), 3,02-2,97 (m, 2H), 2,57-2,54 (m, 2H), 2,05 (t, 3H, $J = 1,8$). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 210,0, 168,3, 136,2, 134,5, 128,2, 127,8, 125,3, 121,9, 120,6, 111,1, 103,4, 34,2, 29,7 10,5. LCMS (ESI): masa calculada para ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}$) m/z 211,10; medida $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 212,03.



[0372] 3-Dibenzofuran-4-il-5,5-dimetil-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromo-5,5-dimetilciclohex-2-enon y ácido dibenzofuran-4-borónico de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación por cromatografía flash automática dio el producto (192 mg, 96%) como un sólido blanco. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,93 (dd, $J = 7,4, 1,1$ Hz, 1H), 7,92 (ddd, $J = 7,7, 0,8, 0,6$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,51-7,43 (m, 2H), 7,34 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,33 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 6,91 (t, $J = 1,4$ Hz, 1H), 2,85 (d, $J = 1,4$ Hz, 2H), 2,42 (s, 2H), 1,19 (s, 6H). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 200,3, 156,0, 153,9, 153,4, 127,7, 127,6, 125,6, 125,3, 124,3, 123,6, 123,2, 123,0, 122,0, 120,7, 112,0, 51,3, 43,0, 34,2, 28,7. HRMS (Electrospray LCT): masa calculada para ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_2 + \text{Na}$) m/z 313,1204; medida $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 313,1201.



[0373] 3-(2-Metoxi-fenil)-ciclohex-2-enona. Se sintetizó a partir de 3-bromociclohex-2-enona y ácido 2-metoxifenilborónico de acuerdo con el procedimiento general descrito para el acoplamiento de Suzuki. La purificación mediante cromatografía flash automatizada usando elución en gradiente (0 a 80% acetato de etilo/hexanos) dio el producto (166 mg, 98%) como un aceite amarillo pálido. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,32 (ddd, $J = 8,3, 7,4, 1,9$ Hz, 1H), 7,18 (dd, $J = 7,7, 1,9$ Hz, 1H), 6,96 (dd, $J = 7,4, 1,1$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,18 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H), 3,83 (s, 3H), 2,73 (td, $J = 6,1, 1,4$ Hz, 2H), 2,48 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,14-2,06 (m, 2H).

EJEMPLO 20

SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE INHIBIDORES MOLECULARES PEQUEÑOS

[0374] Estas moléculas derivan del descubrimiento inicial de que los aductos de histidina e imidazol de la prostaglandina PGE_2 reducen la respuesta secretoria neta de los ratones desafiados con toxina colérica y actúan directamente sobre la acción del factor de edema de ántrax, una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina. Las enonas simples examinadas aquí se prepararon mediante reacción de Suzuki catalizada con paladio.

[0375] El compuesto principal inicial para el desarrollo de las moléculas que se informan en la presente documentación surgen del informe de Peterson acerca de que los aductos de histidina e imidazol de la prostaglandina E_2 (PGE_2) (FIG. 70) reducen la respuesta secretoria neta del intestino delgado de ratones desafiados con toxina colérica (CT) (Peterson *et al.*, 2001). Se informó que ante la incubación *in vitro* de PGE_2 ya sea con L-histidina o imidazol, se forma un aducto covalente, presumiblemente con PGA_2 como intermediario (FIG. 67). Se descubrió que estos eran responsables de la actividad antisecretoria observada. Los estudios subsiguientes revelaron que los aductos de imidazol-prostaglandina no solamente fueron activos contra adenilato ciclasas de mamíferos, sino que también contra el factor de edema de ántrax. Con estos derivados como compuestos principales, se

ha hecho un esfuerzo para desarrollar nuevos inhibidores moleculares pequeños de EF a través de la síntesis de una serie de compuestos relacionados.

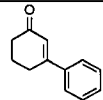
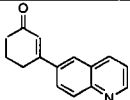
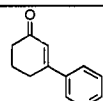
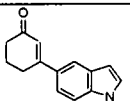
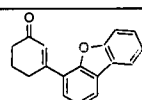
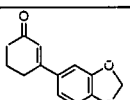
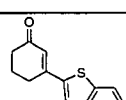
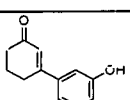
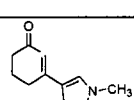
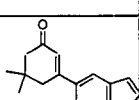
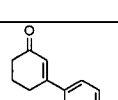
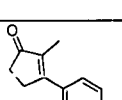
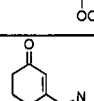
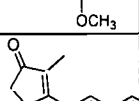
[0376] Con PGE₂-L-histidina y PGE₂-imidazol en mente, se examinó una serie de aductos de enona simples de imidazol. Un problema que se tuvo que considerar en el desarrollo de las nuevas moléculas inhibitoras fue que los compuestos principales iniciales fueron inestables a la eliminación de la amina en la posición β con la subsiguiente formación de PGA₂ (FIG 67). A pesar de que se comprendió que la naturaleza reversible de los aductos de amina presentarían un problema, se tomó la decisión de examinar dichos aductos, debido a que estaban fácilmente disponibles. Interesantemente, varios de estos compuestos muy simples (FIG. 68) exhibieron actividad inhibitoria de la adenilato ciclasa en el mismo rango de potencia que los aductos de PGE₂ imidazol (entre 100 y 500 μ M). En los experimentos iniciales los aductos de ciclohexanona aparecieron más activos que los compuestos de anillo de cinco miembros. Sin embargo, estas observaciones no fueron conclusivas, debido a que las mismas podrían haber estado influenciadas por el hecho de que los aductos de anillos de seis miembros aparecieron como más estables a la eliminación de imidazol que los derivados de anillos de cinco miembros.

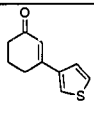
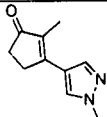
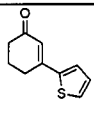
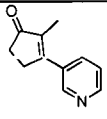
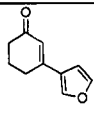
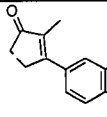
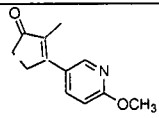
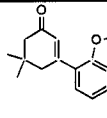
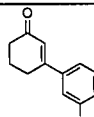
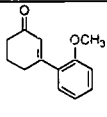
[0377] Debido a la naturaleza lábil de los aductos de amina, se tomó la decisión de examinar las moléculas con el heterociclo unido a través de un enlace carbono-carbono. Había varios métodos que se podrían haber usado en la síntesis de dichas moléculas. Se intentó con el agregado de cuprato de imidazol a la ciclohexanona (Tatsuta *et al.*, 1995; Krik, 1978). Sin embargo el uso inicial de la química de cuprato por parte de los inventores demostró que cada agregado de cuprato requería su propio juego de condiciones de reacción. Esto lo excluyó como método para proveer un acceso rápido a varios derivados diferentes. El intento de usar la reacción de Heck también resultó problemático. La reacción de Heck entre ciclohexanona y bromuros de vinilo o arilo con frecuencia dio mezclas de productos saturados y no saturados. Estos materiales demostraron ser dificultosos para separar y consecuentemente esta estrategia no se consideró

apropiada para un sistema en donde se deseaba un acceso rápido a una variedad de compuestos.

[0378] Se sintetizaron se ensayaron varios compuestos seleccionados. Se observó que las versiones no saturadas de estas moléculas tuvieron actividades inhibitorias comparables a los aductos saturados. Como consecuencia, se decidió sintetizar versiones no saturadas del objetivo primario. Esto permitió usar la reacción de Suzuki para sus síntesis (FIG. 68). Para los grupos de moléculas deseadas, la reacción de Suzuki pareció una buena elección. Existen alrededor de 500 ácidos y ésteres borónicos disponibles comercialmente y los enones de vinil bromo están disponibles a partir de las 1,3-dionas en un solo paso (FIG. 71) (Piers y Nagakura, 1975). La fácil disponibilidad de las dos materias primas principales permitió sintetizar y probar una variedad de diferentes tipos estructurales (Tabla 7).

TABLA 7 DATOS DE RENDIMIENTO Y ACTIVIDAD SELECCIONADA PARA ADUCTOS DE ENONA

Cp d #	Estructur a	Rendimiento a	IC-50	Cpd #	Estructu ra	Rendimiento a	IC50
FI-4		75%	>100µm	FI-16		88%	>100µm
FI-5		54%	>100µm	FI-17		83%	56 µm
FI-6		83%	>100µm	FI-18		85%	53 µm
FI-7		89%	*	FI-19		64%	>100µm
FI-8		29%	>100µm	FI-20		95%	>100µm
FI-9		89%	>100µm	FI-21		69%	30 µm
FI-10		28%	>100µm	FI-22		78%	*

FI-11		72%	>100µm	FI-23		16%	*
FI-12		83%	>100µm	FI-24		31%	*
FI-13		16%	>100µm	FI-25		92%	*
FI-14		92%	24µm	FI-26		96%	>100µm
FI-15		88%	30µm	FI-27		98%	35µm

*No se determinó la IC-50 a) datos espectrales para compuestos, la información de purificación está disponible en el ejemplo previo.

[0379] En el trabajo anterior se sintetizaron veinticuatro enonas. La reacción de Suzuki se catalizó mediante una variedad de diferentes catalizadores de paladio en donde FC1007 proveyó los resultados más consistentes (Wang y Sauer, 2004; Sauer *et al.*, 2003). Las reacciones se llevaron a cabo bajo condiciones de microondas (250 Watts a 110°C durante 10 minutos). Los rendimientos estuvieron en el rango entre bajos a bastante buenos, sin ningún intento por optimizar las condiciones de reacción. En todos los casos se purificaron las muestras mediante cromatografía en columna para eliminar cualquier contaminante de base metálica y otras impurezas.

[0380] Se probaron las moléculas en células completas para determinar su habilidad para inhibir la producción de AMPc por parte del factor de edema de ántrax. Como se puede ver, los aductos de metoxipiridina de 2-metilciclopentenona (FI-14 y FI-21) tuvieron una buena actividad, mientras que los aductos análogos de ciclohexanona (FI-9) no fueron efectivos. El aducto de indol de ciclohexanona (FI-17) también exhibió una actividad comparable a los mejores compuestos.

[0381] Este ejemplo establece relaciones de estructura y actividad. Se determinó que solamente los aductos de cetona cíclica y enona son activos. Las versiones no cíclicas de estructuras activas no lo son. La funcionalidad cetona parece ser necesaria debido a que aquellas moléculas donde ha reducido la cetona a un

alcohol son inactivas. Además, solamente los aductos heterocíclicos aromáticos son activos. El agregado de aminas simples no proveyó inhibidores.

[0382] La reacción de Suzuki de las β -bromoenonas con ácidos borónicos proveyó los compuestos deseados para el análisis. Se pueden sintetizar versiones adicionales de estas moléculas usando los mismos métodos.

[0383] Otro ejemplo de un método de síntesis se encuentra en la FIG. 72.

REFERENCIAS

[0384] Todas las patentes y publicaciones citadas en la presente documentación se incorporan en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad. En la siguiente lista se proporcionan las citas completa de las referencias citadas en la presente documentación.

Patente de los EEUU N° 5466468

Patente de los EEUU N° 5629001

Patente de los EEUU N° 6613308

Patente de los EEUU N° 5466468

Patente de los EEUU N° 5543158

Patente de los EEUU N° 5641515

Patente de los EEUU N° 5399363

Patente de los EEUU N° 5466468

Patente de los EEUU N° 5756353

Patente de los EEUU N° 5804212

Patente de los EEUU N° 5725 871

Patente de los EEUU N° 5780045

Patente de los EEUU N° 5641515

Patente de los EEUU N° 5580579

Patente de los EEUU N° 5792 451

Abrami L, Reig N, van der Goot FG. Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol* 2005;13(2):72-78.

Abramova, FA, LM Grinberg, OV Yampolskaya, y DH Walker. 1993 Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:2291-94.

- Ahuja, N.; Kumar, P.; Bhatnagar, R., The adenylate cyclase toxins. *Crit. Rev. Microbiol.* **2004**, 30, (3), 187-196.
- Ascenzi, P.; Visce, P.; Ippolito, G.; Spallarossa, A.; Bolognesi, M.; Montecucco, C., Anthrax toxin: a tripartite lethal combination. *FEBS Lett.* **2002**, 531, (3), 384-388.
- Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D., Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, (25), 4759-4767.
- Bohm, H. J., Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, 12, (4), 309-323.
- Bohm, H. J., LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, 6, (6), 593-606.
- Bohm, H. J., Computational tools for structure-based ligand design. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1996**, 66, (3), 197-210.
- Bohm, H. J., The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, 8, (3), 243-256.
- Bohm, H. J., Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, 12, (4), 309-323.
- Brachman, P.S. 1972. Anthrax. en: *Infectious Diseases*, capitulo 80, pp757-762, ed. P.D. Hoeprich. Harper& Rowe, Nueva York.
- Brisson, M.; Nguyen, T.; Vogt, A.; Yalowich, J.; Giorgianni, A.; Tobi, D.; Bahar, I.; Stephenson, C. R. J.; Wipf, P.; Lazo, J. S., Discovery and characterization of novel small molecule inhibitors of human Cdc25B dual specificity phosphatase. *Molecular Pharmacology* **2004**, 66, (4), 824-833.
- Brooijmans, N.; Kuntz, I. D., Molecular recognition and docking algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, 32, 335-373.
- Brossier, F, M Weber-Levy, M Mock, y J Sirard. 2000. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect. Immun.* **68**:1781-86.

- Chen, D. L.; Menche, G.; Power, T. D.; Sower, L.; Peterson, J. W.; Schein, C. H., Accounting for ligand-bound metal ions in docking small molecules on adenylyl cyclase toxins. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2007**, 67, (3), 593-605.
- Chopra, A. K.; Gorenstein, D. *Biochimica et Biophys Acta* **2001**, 1537, 27-41.
- Cozzini, P.; Fornabaio, M.; Marabotti, A.; Abraham, D. J.; Kellogg, G. E.; Mozzarelli, A., Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein-ligand complexes. 1. Models without explicit constrained water. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, (12), 2469-2483.
- Cummings RT, SP Salowe, BR Cunningham, J Wiltsie, YW Park, LM Sonatore, D Wisniewski, CM Douglas, JD Hermes, y EM Scolnick. 2002. A peptide-based fluorescence resonance energy transfer assay for *Bacillus anthracis* lethal factor protease. *PNAS*. **99**: 10: 6603-6606.
- Dessauer, C. W.; Gilman, A. G., The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, (44), 27787-27795.
- Drum, C. L.; Yan, S. Z.; Bard, J.; Shen, Y. Q.; Lu, D.; Soelaiman, S.; Grabarek, Z.; Bohm, A.; Tang, W. J., Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* **2002**, 415, (6870), 396-402.
- Drysdale M, Heninger S, Hutt J, Chen YH, Lyons CR, Koehler TM. Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. *Embo Journal* 2005;24(1):221-227.
- Erwin, J.L., L.M. DaSilva, S. Bavari, S.F. Little, A.M. Friedlander, y .C. Chanh. 2001. Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Infect. Immun.* **69**:1175-1177.
- Firoved, AM, GF Miller, M Moayeri, R Kakkar, Y Shen, JF Wiggins, EM McNally, W-J Tang, y SH Leppla. 2005. *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. *Amer. J. Path.* 167: 5: 1309-1320.
- Fornabaio, M.; Cozzini, P.; Mozzarelli, A.; Abraham, D. J.; Kellogg, G. E., Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein-ligand complexes. 2.

- Computational titration and pH effects in molecular models of neuraminidase-inhibitor complexes. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, (21), 4487-4500.
- Fornabaio, M.; Spyraakis, F.; Mozzarelli, A.; Cozzini, P.; Abraham, D. J.; Kellogg, G. E., Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein-ligand complexes. 3. The free energy contribution of structural water molecules in HIV-1 protease complexes. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, (13), 4507-4516.
- Friedlander, A.M, S.L. Welkos, M.L. Pitt, J.W. Ezzell, P.L. Worsham, K.J. Rose, B.E. Ivins, J.R. Lowe, G.B. Howe, P. Mikesell, *et al.* 1993. Postexposure prophylaxis against experimental inhalation anthrax. *J. Infect. Dis.* **167**:1239-1243.
- Friesner, R. A.; Ebanks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S., Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, (7), 1739-1749.
- T.W. Greene, P.G.M. Wuts: Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª edición, John Wiley & Sons, NY, 1991
- Gehlhaar, D. K.; Verkhivker, G. M.; Rejto, P. A.; Sherman, C. J.; Fogel, D. B.; Fogel, L. J.; Freer, S. T., Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. *Chem. Biol.* **1995**, 2, (5), 317-324.
- Gille, A.; Lushington, G. H.; Mou, T. C.; Doughty, M. B.; Johnson, R. A.; Seifert, R., Differential inhibition of adenylyl cyclase isoforms and soluble guanylyl cyclase by purine and pyrimidine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, (19), 19955-19969.
- Gottle, M.; Dove, S.; Steindel, P.; Shen, Y.; Tang, W.-J.; Geduhn, J.; Konig, B.; Seifert, R., Molecular Analysis of the Interaction of Bordetella pertussis Adenylyl Cyclase with Fluorescent Nucleotides. *Mol Pharmacol* **2007**, 72, (3), 526-535.
- Grinberg, LM, FA Abramova, OV Yampolskaya, DH Walker, y JH Smith. 2001. Quantitative pathology of inhalational anthrax I: quantitative microscopic findings. *Mod. Pathol.* **14**:482-95.

- Guidi-Rontani, C.; Weber-Levy, M.; Mock, M.; Cabiaux, V., Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. *Cell Microbiol.* **2000**, 2, (3), 259-264.
- Guo, Q.; Shen, Y.; Zhukovskaya, N. L.; Florian, J.; Tang, W. J., Structural and kinetic analyses of the interaction of anthrax adenyl cyclase toxin with reaction products cAMP and pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, (28), 29427-29435.
- Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L., Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, (7), 1750-1759.
- Hanoune, J. y N. Defer. 2001. Regulation and role of adenyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**:145-174.
- Hewlett EL, Underhill LH, Cook GH, Manclark CR, Wolff J. A protein activator for the adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *J Biol Chem* 1979;254(13):5602-5605.
- Hewlett EL, Urban MA, Manclark CR, Wolff J. Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73(6):1926-1930.
- Hu, X.; Shelper, W. H., Docking studies of matrix metalloproteinase inhibitors: zinc parameter optimization to improve the binding free energy prediction. *J. Mol. Graph. Model.* **2003**, 22, (2), 115-126.
- Hu, X.; Balaz, S.; Shelper, W. H., A practical approach to docking of zinc metalloproteinase inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* **2004**, 22, (4), 293-307.
- Inglesby, TV, *et al.* 1999. Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. WorkingGroup on Civilian Biodefense. *JAMA*, **281**:1735-1745.
- Irwin, J. J.; Shoichet, B. K., ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, 45, 177-182.
- Irwin, J. J.; Raushel, F. M.; Shoichet, B. K., Virtual screening against metalloenzymes for inhibitors and substrates. *Biochemistry* **2005**, 44, (37), 12316-12323.

- Kellogg, G. E.; Chen, D. L., The Importance of Being Exhaustive. Optimization of Bridging Structural Water Molecules and Water Networks in Models of Biological Systems. *Chem. & Biodivers.* **2004**, 1, (1), 98-105.
- Kirk, K. L. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 4381-3.
- Johnson, R. A.; Shoshani, I., Inhibition of Bordetella pertussis and Bacillus anthracis adenylyl cyclases by polyadenylate and "P"-site agonists. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, (31), 19035-19039.
- Johnson, R. A.; Desaubry, L.; Bianchi, G.; Shoshani, I.; Lyons, E., Jr.; Taussig, R.; Watson, P. A.; Cali, J. J.; Krupinski, J.; Pieroni, J. P.; Iyengar, R., Isozyme-dependent sensitivity of adenylyl cyclases to P-site-mediated inhibition by adenine nucleosides and nucleoside 3'-polyphosphates. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, (14), 8962-8966.
- Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, (3), 727-748.
- Lacy DB, Collier RJ. Structure and function of anthrax toxin. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002;271:61-85.
- Lacy, D. B.; Mourez, M.; Fouassier, A.; Collier, R. J., Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, (4), 3006-3010.
- Leppla, S. H., Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1982**, 79, (10), 3162-3166.
- Leppla, SH. 2000. Anthrax toxin, vol 145, pp 445-472 en *Handbook of Experimental Pathology*, Springer, NY
- Lin, Z. P.; Zhu, Y.-L.; Johnson, D. R.; Rice, K. P.; Nottoli, T.; Hains, B. C.; McGrath, J.; Waxman, S. G.; Sartorelli, A. C., Disruption of cAMP and Prostaglandin E2 Transport by Multidrug Resistance Protein 4 Deficiency Alters cAMP-Mediated Signaling and Nociceptive Response. *Mol Pharmacol* **2008**, 73, (1), 243-251.
- March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structures, 5ª edición, John Wiley and Sons, por Michael B. Smith y Jerry March

- Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, (14), 1639-1662.
- Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Huey, R.; Olson, A. J., Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, 10, (4), 293-304.
- Milne JC, SR Blanke, PC Hanna, RJ Collier. 1995. Protective antigen-binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fused to its amino- or carboxy-terminus. *Mol. Microbiol.* 15: 4: 661-6.
- Muegge, I.; Martin, Y. C., A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, (5), 791-804.
- Munier H, Bouhss A, Krin E, Danchin A, Gilles AM, Glaser P, Barzu O. The role of histidine 63 in the catalytic mechanism of Bordetella pertussis adenylate cyclase. *J Biol Chem* 1992;267(14):9816-9820.
- Onda, T.; Hashimoto, Y.; Nagai, M.; Kuramochi, H.; Saito, S.; Yamazaki, H.; Toya, Y.; Sakai, I.; Homcy, C. J.; Nishikawa, K.; Ishikawa, Y., Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, (51), 47785-47793.
- Patel T.B., Z. Du, S. Pierre, L. Cartin, y K. Scholich. 2001. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* **269**:13-25.
- Pellizzari, R., C. Guidi-Rontani, G. Vitale, M. Mock, y C. Montecucco. 1999. Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN γ -induced release of NO and TNF α . *FEBS Letters* **462**:199-204.
- Pellizzari, R., C. Guidi-Rontani, G. Vitale, M. Mock, y C. Montecucco. 2000. Lethal factor of *Bacillus anthracis* cleaves the N-terminus of MAPKKs: Analysis of the intracellular consequences in macrophages. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:421-427.

- Peterson, J. W.; King, D.; Ezell, E. L.; Rogers, M.; Gessell, D.; Hoffpauer, J.; Reuss, L.; Chopra, A. K.; Gorenstein, D., Cholera toxin-induced PGE(2) activity is reduced by chemical reaction with L-histidine. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, 1537, (1), 27-41.
- Peterson JW, NC Molina, CW Houston y RC Fader. 1983. Elevated cAMP in intestinal epithelial cells during experimental cholera and salmonellosis. *Toxicon.* **21**: 761-775.
- Peterson JW, WD Berg, y LG Ochoa. 1988. Indomethacin inhibits cholera toxin-induced cyclic AMP accumulation in Chinese hamster ovary cells. *FEMS Microbiol. Letts.* **49**: 187-192.
- Peterson JW, LG Ochoa, y WD Berg. 1988. Inhibitory effect of ibuprofen on cholera toxin-induced cyclic AMP formation in Chinese hamster ovary cells. *FEMS Microbiol. Letts.* **56**: 139-144.
- Peterson JW, y LG Ochoa. 1989. Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin. *Science.* **245**: 857-859.
- Peterson, J. W.; King, D.; Ezell, E. L.; Rogers, M.; Gessell, D.; Hoffpauer, J.; Reuss, L.; Piers, E.; Nagakura, I. *Sny. Commun.* **1975**, 5, 193-199.
- Peterson, J. W. J.E. Comer; D.M. Noffsinger; A. Wenglikowski; K.G. Walberg; B.M. Chatuev; A.K. Chopra; L.R. Stanberry; A.S. Kang; W.W. Scholz; Sircar., J., Human monoclonal anti-protective antigen antibody completely protects rabbits and is synergistic with ciprofloxacin in protecting mice and guinea pigs against inhalation anthrax. *Infect. Immun.* **2006**, 74, 1016-24.
- Peterson, J. W. J.E. Comer, W.B. Baze, D.M. Noffsinger, A.Wenglikowski, K.G. Walberg, J.Hardcastle, J. Pawlik, K. Bush, S. Moen, J. Thomas, B.M. Chatuev, L. Sower, A.K. Chopra, L.R. Stanberry, R. Sawada, W.W. Scholz, y J. Sircar. , Human monoclonal antibody (AVP-21D9) to protective antigen reduces the dissemination of Bacillus anthracis Ames strain from the lungs in a rabbit model. . *Infect. Immun.* **2007**, 75, 3414-3424.
- Peterson, J. W.; King, D.; Ezell, E. L.; Rogers, M.; Gessell, D.; Hoffpauer, J.; Reuss, L.; Chopra, A. K.; Gorenstein, D., Cholera toxin-induced PGE(2) activity

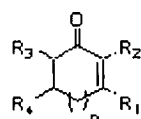
- is reduced by chemical reaction with L-histidine. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, 1537, (1), 27-41.
- Rarey, M.; Wefing, S.; Lengauer, T., Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, 10, (1), 41-54.
- Recommendations on the use of anthrax vaccine in the US, 2000. MMWR Weekly Reports, vol 49, CDC, Atlanta
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 1ª edición. Mack Printing Company, 1990.
- de Rooij, J.; Zwartkruis, F. J.; Verheijen, M. H.; Cool, R. H.; Nijman, S. M.; Wittinghofer, A.; Bos, J. L., Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **1998**, 396, (6710), 474-477.
- Sauer, D. R.; Kalvin, D.; Phelan, K. M. *Org. Lett.* **2003**, 5, 4721-4724.
- Shen, Y.; Guo, Q.; Zhukovskaya, N. L.; Drum, C. L.; Bohm, A.; Tang, W. J., Structure of anthrax edema factor-calmodulin-adenosine 5'-(alpha,beta-methylene)-triphosphate complex reveals an alternative mode of ATP binding to the catalytic site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 317, (2), 309-314.
- Shen, Y.; Lee, Y. S.; Soelaiman, S.; Bergson, P.; Lu, D.; Chen, A.; Beckingham, K.; Grabarek, Z.; Mrksich, M.; Tang, W. J., Physiological calcium concentrations regulate calmodulin binding and catalysis of adenylyl cyclase exotoxins. *EMBO J.* **2002**, 21, (24), 6721-6732.
- Shen, Y.; Zhukovskaya, N. L.; Zimmer, M. I.; Soelaiman, S.; Bergson, P.; Wang, C. R.; Gibbs, C. S.; Tang, W. J., Selective inhibition of anthrax edema factor by adefovir, a drug for chronic hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, 101, (9), 3242-3247.
- Shen, Y.; Zhukovskaya, N. L.; Guo, Q.; Florian, J.; Tang, W. J., Calcium-independent calmodulin binding and two-metal-ion catalytic mechanism of anthrax edema factor. *EMBO J.* **2005**, 24, (5), 929-941.
- WL Shoop, Y Xiong, J Wiltsie, A Woods, J Guo, JV Pivnichny, T Felcetto, BF Michael, A Bansal, RT Cummings, BR Cunningham, AM Friedlander, CM Douglas, SB Patel, D Wisniewski, G Scapin, SP Salowe, DM Zaller, KT Chapman, EM Scolnick, DM Schmatz, K Bartizal, M MacCoss, y JD Hermes.

2005. Anthrax lethal factor inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**: 22: 7958-7963.
- Simonds, W.F. 1999. G protein regulation of adenylyl cyclase. *TIPS* **20**:66-73.
- Soelaiman, S.; Wei, B. Q.; Bergson, P.; Lee, Y. S.; Shen, Y.; Mrksich, M.; Shoichet, B. K.; Tang, W. J., Structure-based inhibitor discovery against adenylyl cyclase toxins from pathogenic bacteria that cause anthrax and whooping cough. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, (28), 25990-25997.
- Sunahara, R.K., A. Beuve, J.J.G. Tesmer, S.R. Sprang. 1998. Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **273**:16332-16338.
- Tatsuta, K.; Miura, S.; Ohta, S.; Gunji, H. *J. Antibiotics* **1995**, 48, 286-8.
- Tesmer, J. J.; Sunahara, R. K.; Johnson, R. A.; Gosselin, G.; Gilman, A. G.; Sprang, S. R., Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* **1999**, 285, (5428), 756-760.
- Vitale, G., R. Pellizzari, C. Recchi, G. Napolitani, M. Mock, y C. Montecucco. 1998. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**:706-711.
- Vitale, G., L. Bernardi, G. Napolitani, M. Mock, y C. Montecucco. 2000. Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem. J.* **352**:739-745.
- Wang, R.; Lu, Y.; Fang, X.; Wang, S., An extensive test of 14 scoring functions using the PDBbind refined set of 800 protein-ligand complexes. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, 44, (6), 2114-2125.
- Wang, R. X.; Lu, Y. P.; Wang, S. M., Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, (12), 2287-2303.
- Wang, Y.; Sauer, D. R. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2793-2796.
- Wang, J. L.; Guo, J. X.; Zhang, Q. Y.; Wu, J. J. Q.; Seifert, R.; Lushington, G. H., A conformational transition in the adenylyl cyclase catalytic site yields different binding modes for ribosyl-modified and unmodified nucleotide inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15, (8), 2993-3002.

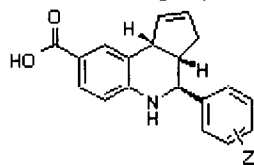
- Welkos SL, TJ Kaener, y PH Gibbs. 1986. Differences in susceptibility of inbred mice to *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **51**:795-800.
- Wu, A. G.; Alibek, D.; Li, Y. L.; Bradburne, C.; Bailey, C. L.; Alibek, K., Anthrax toxin induces hemolysis: an indirect effect through polymorphonuclear cells. *J. Infect. Dis.* **2003**, 188, (8), 1138-1141.
- Venkatachalam, C. M.; Jiang, X.; Oldfield, T.; Waldman, M., LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *J. Mol. Graph. Model.* **2003**, 21, (4), 289-307.
- de Vos, V. 1994. Anthrax, vol. 2, pp1262-1289. en: *Infectious Disease of Livestock*. ed. Oxford Univ. Press. NY.
- Xiong YS, Wiltsie J, Woods A, Guo J, Pivnichny JV, Tang W, Bansal A, Cummings RT, Cunningham BR, Friedlander AM, Douglas CM, Salowe SP, Zaller DM, Scolnick EM, Schmatz DM, Bartizal K, Hermes JD, MacCoss M, Chapman KT. The discovery of a potent and selective lethal factor inhibitor for adjunct therapy of anthrax infection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006;16(4):964-968.
- Young JA, y RJ Collier. 2007. Anthrax Toxin: Receptor Binding, Internalization, Pore Fomrnation and Translocation. *Annu. Rev. Biochem.* 17: 17.1-17.23
- Zhang, C.; Liu, S.; Zhu, Q. Q.; Zhou, Y. Q., A knowledge-based energy function for protein-ligand, protein-protein, and protein-DNA complexes. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, (7), 2325-2335.
- Zmuda, J. F.; Zhang, L.; Richards, T.; Pham, Q.; Zukauskas, D.; Pierre, J. L.; Laird, M. W.; Askins, J.; Choi, G. H., Development of an edema factor-mediated cAMP-induction bioassay for detecting antibody-mediated neutralization of anthrax protective antigen. *J. Immunol. Methods* **2005**, 298, (1-2), 47-60.

REIVINDICACIONES:

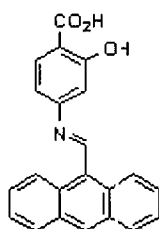
1. Un método para tratar y/o prevenir la pérdida de fluido intestinal en un sujeto CARACTERIZADO PORQUE comprende administrarle al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un compuesto o una sal de éste aceptable para el uso farmacéutico, donde la fórmula general del compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



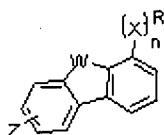
Fórmula I



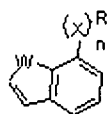
Fórmula II



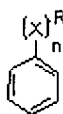
Fórmula III



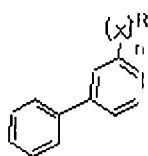
Fórmula IV



Fórmula V



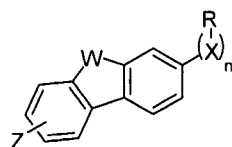
Fórmula VI



Fórmula VII



Fórmula VIII



Fórmula IX,

y cualquier combinación de éstas, donde,

- 1) R es una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 2) R₁ es un hidrógeno, una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 3) R₂ es un hidrógeno, alquilo, una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 4) R₃ es un hidrógeno, o alquilo;

- 5) R_5 es un hidrógeno, alquilo, una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 6) X es un alquilo, oxígeno, un éster, una amina o una amida
- 7) Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado;
- 8) W se selecciona del grupo que consiste en CO, NH, metileno, un átomo de azufre, un átomo de oxígeno y tionilo; y
- 9) n es 0, 1, o más de 1.
2. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE R está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piranonilo, piridilo, imidazolilo, 1,8-naftiridinilo y N-óxido de piridilo.
3. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE R está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no

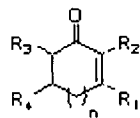
ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

4. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE R_1 está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo.
5. El método de la reivindicación 4, CARACTERIZADO PORQUE R_1 está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.
6. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE R_4 es una estructura de anillo cíclico o bicíclico, sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo.
7. El método de la reivindicación 6, CARACTERIZADO PORQUE R_4 está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido,

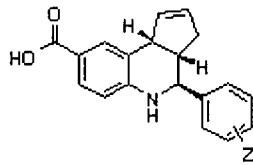
ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

8. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto pertenece al grupo que consiste en FIV-50, FIV-1, FIV-29, FIV-31, FIV-34, FIV-35, FIV-39, FIV-40, FIV-46, FIII-1, FII-1, FI-3, FI-1, FI-2, FIV-49, FIV-54, FIV-58, FIV-55, FIV-53, FIV-67, FIV-70, FIV-65, FIV-68, FIV-66, FIV-61, FIV-60, FIV-64, FIV-71, FIV-46, FIV-72, FIV-73, FIV-75, y cualquier combinación de éstos.
9. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende inhibir la adenilil ciclasa, el factor de edema, CTA1, o cualquier combinación de éstos.
10. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la pérdida de fluido intestinal es el resultado de la infección de un patógeno.
11. El método de la reivindicación 10, CARACTERIZADO PORQUE el patógeno es *B. anthracis*, *V. cholerae*, *E. coli*, Pertussis, *Y. pestis*, o cualquier combinación de éstos.
12. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la pérdida de fluido intestinal es causada por un incremento en los niveles de 3',5'-monofosfato de adenosina en el tejido del sujeto.
13. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la pérdida de fluido intestinal es causada por cáncer.
14. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la composición se administra en combinación con una o más drogas adicionales.
15. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la composición comprende además un antibiótico o un antiinflamatorio.
16. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la composición comprende un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.
17. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto se administra en dosificaciones de entre 0,001 mM y 10 mM.
18. El método de la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto se administra en dosificaciones de entre 0,1 mM y 1 mM.

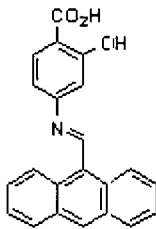
19. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto es un ser humano.
20. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la composición se administra a través de una ruta seleccionada del grupo que consiste en alimentaria, parenteral, tópica, mucosal, por inhalación, y cualquier combinación de éstas.
21. Un método para tratar y/o prevenir una condición asociada con niveles incrementados de 3',5'-monofosfato de adenosina en un sujeto, CARACTERIZADO PORQUE comprende administrarle al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un compuesto o una sal de éste aceptable para el uso farmacéutico, donde la fórmula general del compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



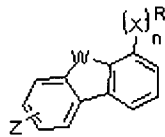
Fórmula I



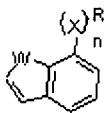
Fórmula II



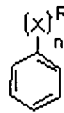
Fórmula III



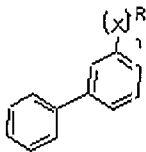
Fórmula IV



Fórmula V



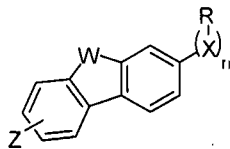
Fórmula VI



Fórmula VII



Fórmula VIII



Fórmula IX,

y combinaciones de éstas, donde,

- 1) R es una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 2) R_1 es un hidrógeno, una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 3) R_2 es un hidrógeno, alquilo, una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 4) R_3 es un hidrógeno, o alquilo;
- 5) R_5 es un hidrógeno, alquilo, una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 6) X es un alquilo, oxígeno, un éster, una amina o una amida
- 7) Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alqueno, alquino, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alqueno, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado;
- 8) W se selecciona del grupo que consiste en CO, NH, metileno, un átomo de azufre, un átomo de oxígeno y tionilo; y
- 9) n es 0, 1, o más de 1.

22. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE R está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piranonilo, piridilo, imidazolilo, 1,8-naftiridinilo y N-óxido de piridilo.

23. El método de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE R está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alqueno, alquino, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto,

sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alqueno, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

24. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE R_1 está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo.

25. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE R_1 está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alqueno, alquino, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcóxido, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosoóxido, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiámico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alqueno, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

26. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE R_4 es una estructura de anillo cíclico o bicíclico, sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo.

27. El método de la reivindicación 26, CARACTERIZADO PORQUE R_4 está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alqueno, alquino, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcóxido, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosoóxido, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-

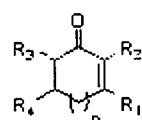
piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxianico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alqueno, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

28. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto pertenece al grupo que consiste en FIV-50, FIV-1, FIV-29, FIV-31, FIV-34, FIV-35, FIV-39, FIV-40, FIV-46, FIV-49, FIII-1, FII-1, FI-3, FI-1, FI-2, FIV-54, FIV-58, FIV-55, FIV-53, FIV-67, FIV-70, FIV-65, FIV-68, FIV-66, FIV-61, FIV-60, FIV-64, FIV-71, FIV-46, FIV-72, FIV-73, FIV-75, y cualquier combinación de éstos.
29. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto inhibe la adenilil ciclasa, el factor de edema, CTA1, o cualquier combinación de éstos.
30. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE la condición es el resultado de la infección de un patógeno.
31. El método de la reivindicación 26, CARACTERIZADO PORQUE el patógeno es *B. anthracis*, *V. cholerae*, *E. coli*, Pertussis, *Y. pestis*, o cualquier combinación de éstos.
32. El método de la reivindicación 27, CARACTERIZADO PORQUE el patógeno es *B. anthracis* y el método comprende además la administración de una droga inhibidora de LT.
33. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE la droga inhibidora de LT se selecciona del grupo que consiste en bestatina, captopril, adefovir, y cualquier combinación de éstas.
34. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE la composición comprende un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.
35. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto se administra en dosificaciones de entre 0,001 mM y 10 mM.

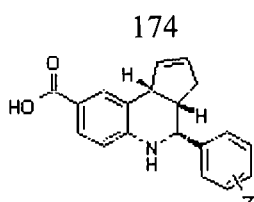
36. El método de la reivindicación 35, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto se administra en dosificaciones de entre 0,1 mM y 1 mM.
37. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto es un ser humano.
38. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE la composición se administra a través de una ruta seleccionada del grupo que consiste en alimentaria, parenteral, tópica, mucosal, por inhalación, y cualquier combinación de éstas.
39. Una composición CARACTERIZADA PORQUE comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en FIV-1, FIV-29, FIV-31, FIV-34, FIV-35, FIV-39, FIV-40, FIV-46, FI-3, FI-1, FI-2, FIV-49, FIV-54, FIV-58, FIV-55, FIV-53, FIV-67, FIV-70, FIV-65, FIV-68, FIV-66, FIV-61, FIV-60, FIV-64, FIV-71, FIV-46, FIV-72, FIV-73, FIV-75, y combinaciones de éstos.
40. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-1.
41. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-29.
42. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-31.
43. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-34.
44. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-35.
45. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-39.
46. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-40.
47. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-46.
48. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FI-3.

49. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FI-1.
50. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FI-2.
51. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-54.
52. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-58.
53. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-55.
54. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-53.
55. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-67.
56. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-70.
57. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-65.
58. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-68.
59. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-66.
60. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-61.
61. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-60.
62. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-64.
63. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-71.

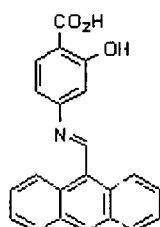
64. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-46.
65. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-72.
66. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-73.
67. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-49.
68. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE el compuesto es FIV-75.
69. La composición de la reivindicación 39, CARACTERIZADA PORQUE está formulada en una composición farmacéutica.
70. Un conjunto de elementos para el tratamiento de la pérdida de fluido intestinal en un sujeto, CARACTERIZADO PORQUE comprende una composición que comprende una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un compuesto o una sal de éste aceptable para el uso farmacéutico, donde la fórmula general del compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



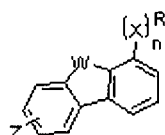
Fórmula I



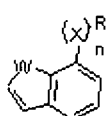
Fórmula II



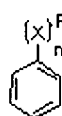
Fórmula III



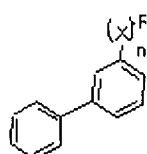
Fórmula IV



Fórmula V



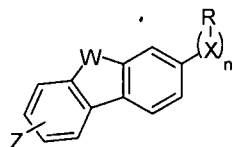
Fórmula VI



Fórmula VII



Fórmula VIII



Fórmula IX,

y cualquier combinación de éstas, donde,

- 1) R es una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 2) R₁ es un hidrógeno, una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 3) R₂ es un hidrógeno, alquilo, una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 4) R₃ es un hidrógeno, o alquilo;
- 5) R₅ es un hidrógeno, alquilo, una estructura de anillo cíclico o bicíclico;
- 6) X es un alquilo, oxígeno, un éster, una amina o una amida
- 7) Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto,

sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado;

8) W se selecciona del grupo que consiste en CO, NH, metileno, un átomo de azufre, un átomo de oxígeno y tionilo; y

9) n es 0, 1, o más de 1.

71. El conjunto de elementos de la reivindicación 70, CARACTERIZADO PORQUE R está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piranono, piridilo, imidazolilo, 1,3-naftiridinilo y N-óxido de piridilo.

72. El conjunto de elementos de la reivindicación 71, CARACTERIZADO PORQUE R está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alquenilo, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

73. El conjunto de elementos de la reivindicación 70, CARACTERIZADO PORQUE R₁ está sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo.

74. El conjunto de elementos de la reivindicación 73, CARACTERIZADO PORQUE R₁ está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alquenilo, alquinilo, fenilo,

bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alqueno, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

75. El conjunto de elementos de la reivindicación 70, CARACTERIZADO PORQUE R_4 es una estructura de anillo cíclico o bicíclico, sustituido o no sustituido, y se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo y furanilo.

76. El conjunto de elementos de la reivindicación 75, CARACTERIZADO PORQUE R_4 está mono, di, tri, tetra o penta sustituido apropiadamente con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en alqueno, alquino, fenilo, bencilo, halo, fluoro, cloro, bromo, iodo, hidroxilo, ceto, oxo, aldo, carbonato, carboxilo, alcoxilo, éster, carboxamido, amino, amonio, imino, imido, azido, azo, cianato, isociano, isocianato, isotiocianato, nitroxilo, ciano, nitrosooxilo, nitro, nitroso, 4-piridilo, 3-piridilo, 2-piridilo, tioéter, sulfonilo, sulfo, sulfinilo, mercapto, sulfanilo, sulfhidrilo, sulfonamino, tiocianato, alquil amino, ácido hidroxiamico, metilo, etilo, 1,3-dioxilano, propilo, iso-propilo, butilo, ter-butilo, alquilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, (C1-C3) alqueno, arilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, alquilarilo no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, hidrato de carbono no sustituido o sustituido, ramificado o no ramificado, y cualquier combinación de éstos.

77. El conjunto de elementos de la reivindicación 70, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto es del grupo que consiste en FIV-50, FIV-1, FIV-29, FIV-31, FIV-34, FIV-35, FIV-39, FIV-40, FIV-46, FIII-1, FII-1, FI-3, FI-1, FI-2, FIV-54, FIV-58, FIV-55, FIV-53, FIV-67, FIV-70, FIV-65, FIV-68, FIV-66, FIV-61, FIV-60, FIV-64, FIV-49, FIV-75, y cualquier combinación de éstos.

78. El conjunto de elementos de la reivindicación 70, CARACTERIZADO PORQUE comprende además una droga seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un antidiarreico y una droga inhibidora de LT.
79. El conjunto de elementos de la reivindicación 70, CARACTERIZADO PORQUE comprende además un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

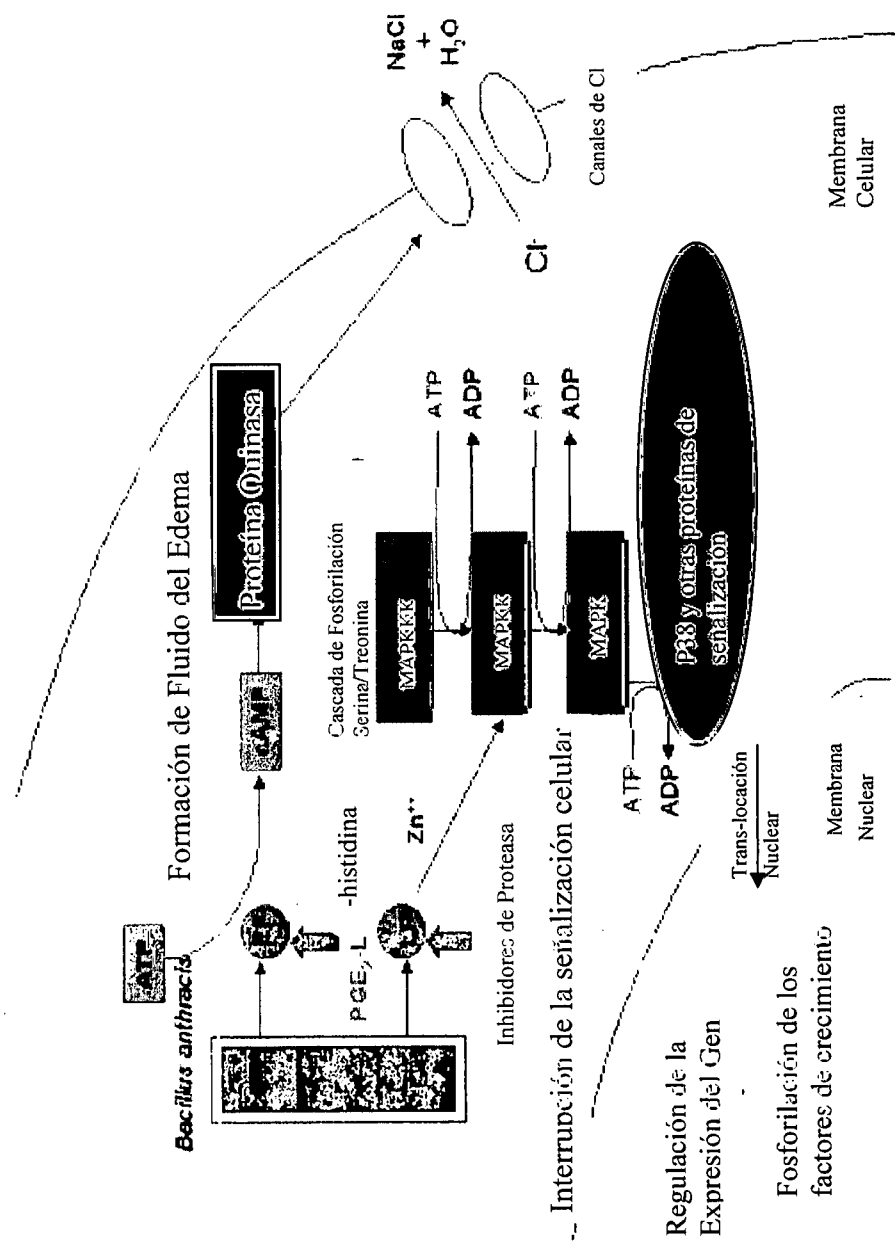


FIG. 1

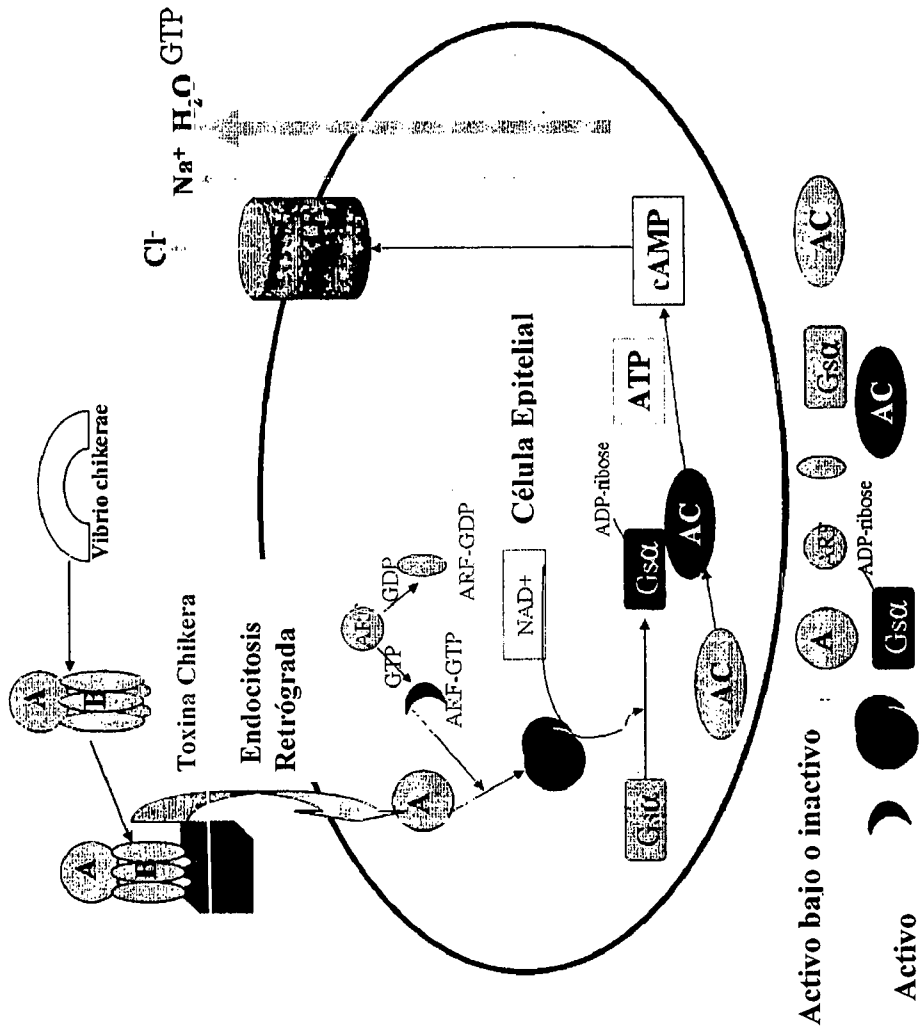


FIG. 2

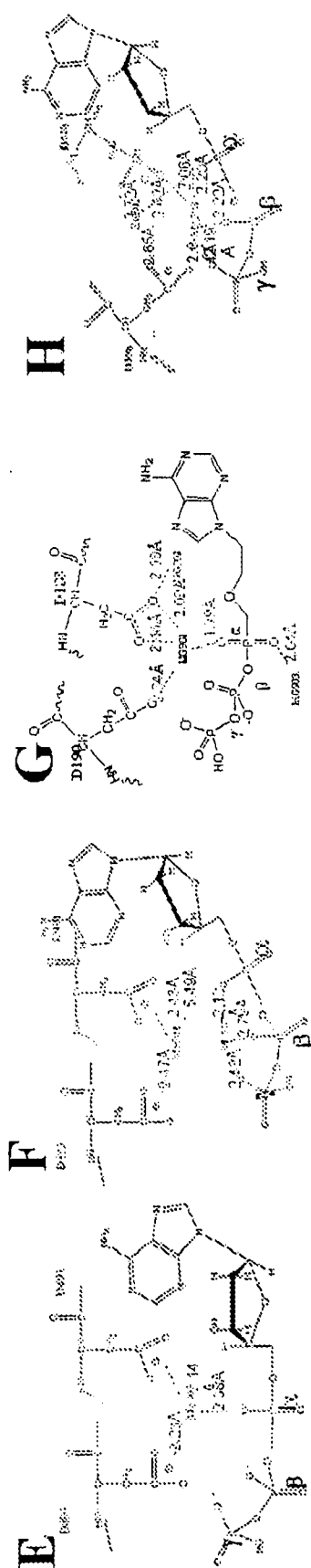
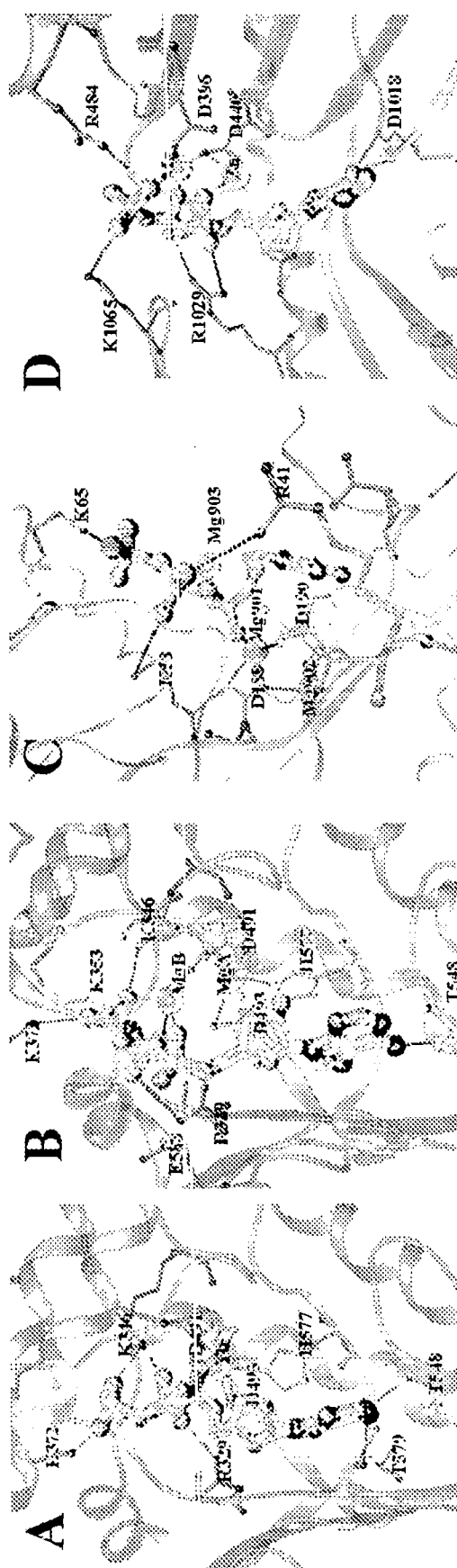


FIG 3

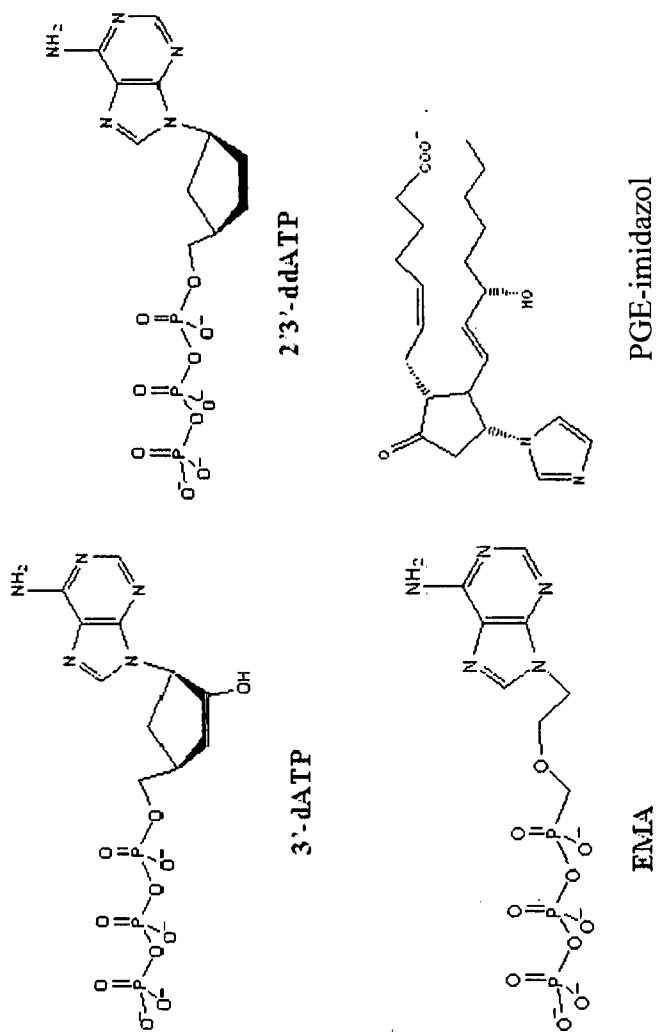
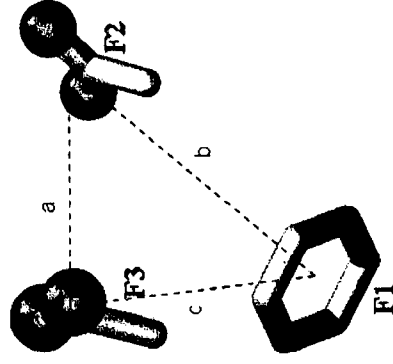


FIG. 4

Farmacofora basada en el fragmento para investigar base de datos en 3D



Las farmacoforas basadas en fragmento como este se utilizaron con el programa UNITY en Civil para realizar una búsqueda en 3-D de los más de 250.000 compuestos en la base de datos NCI

FIG. 5

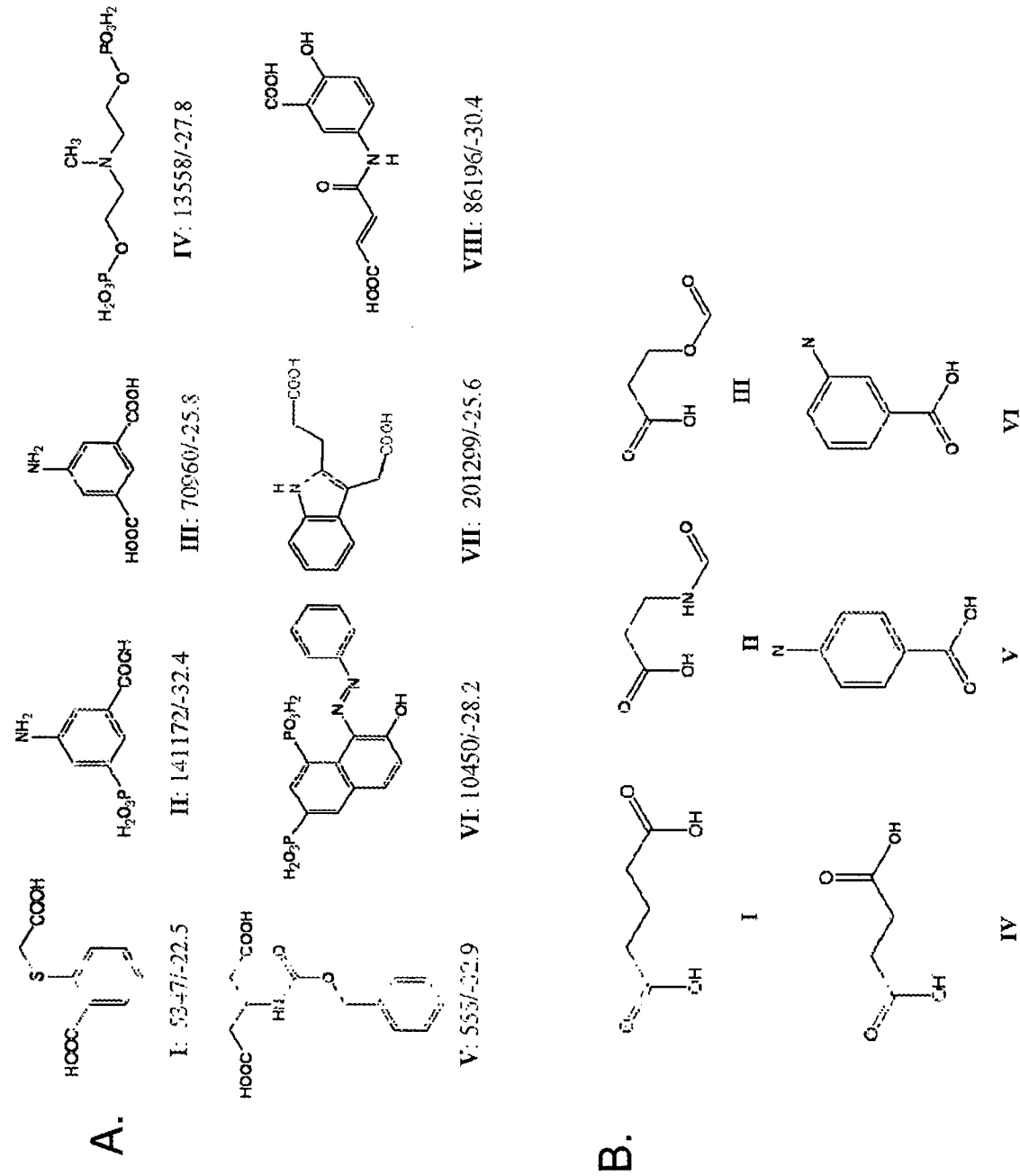


FIG. 6

Esquema 1: Investigar base de datos NCI con UNITY

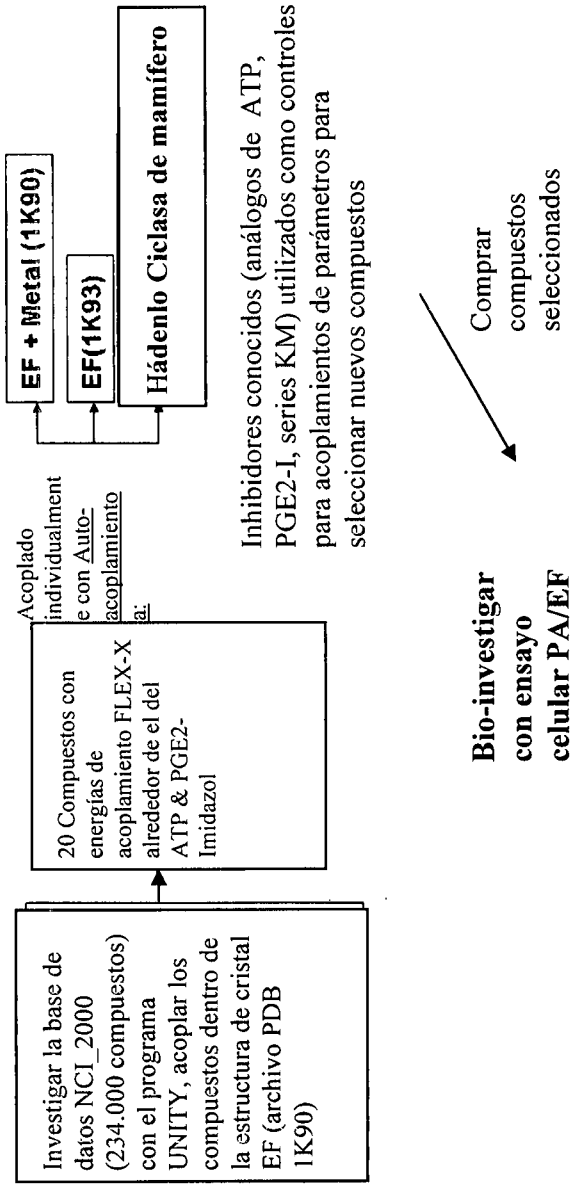
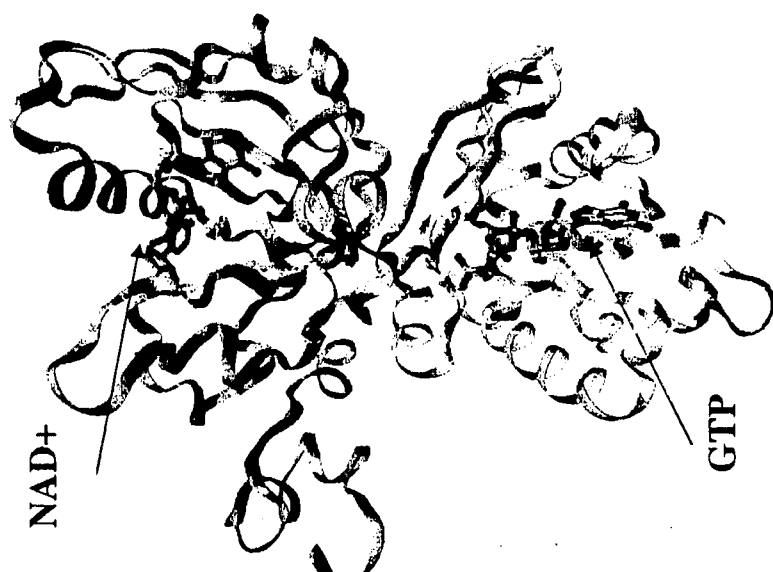


FIG. 7



Superior: CTA 1
ARF Inferior

FIG. 8



Sitio activo del CTA1, los fragmentos se acoparon a este sitio para construir la farmacofora basada en el fragmento

FIG. 9

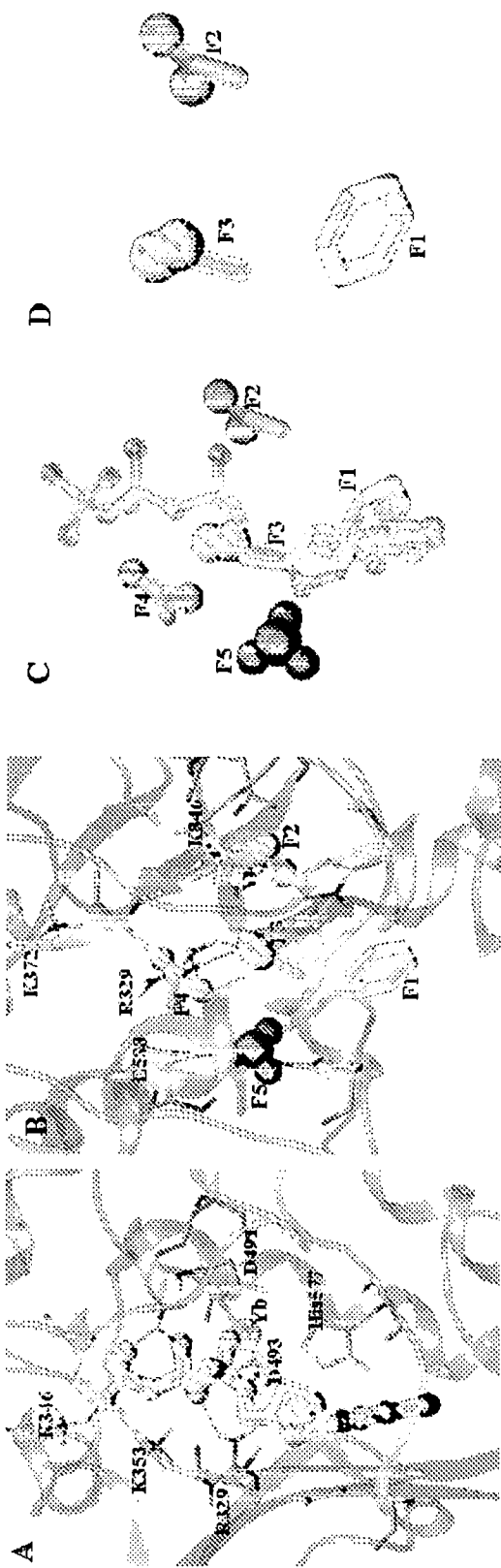


FIG. 10

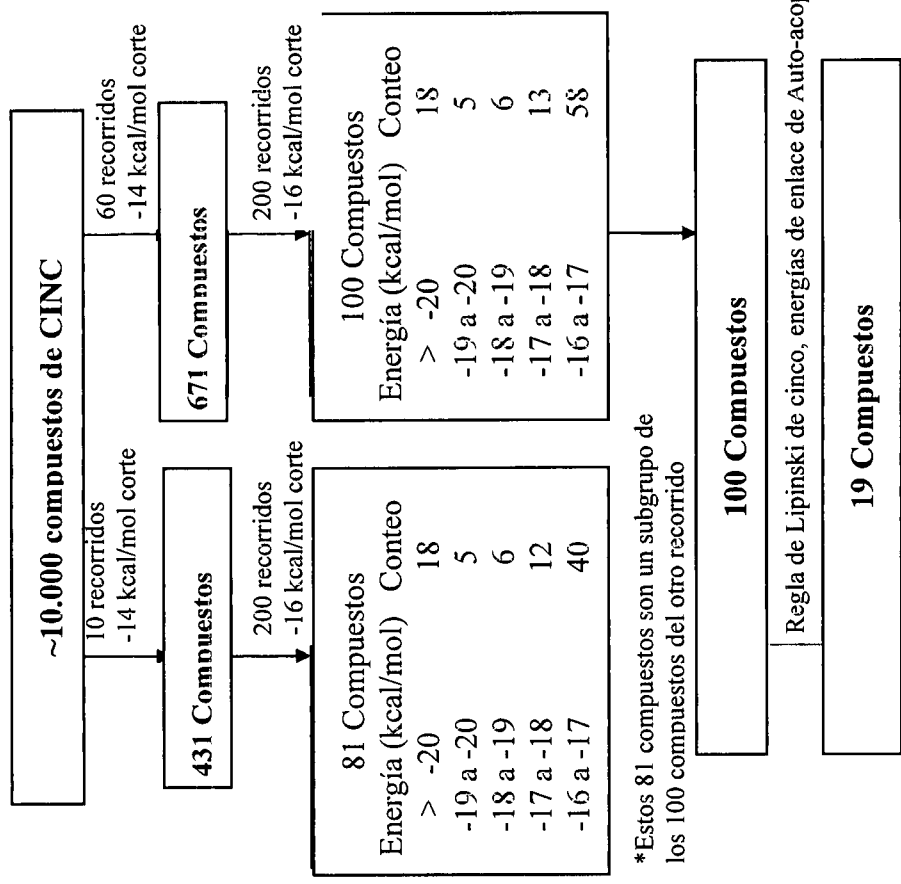


FIG. 11

Los compuestos de cinc seleccionados tienen mejores resultados que los inhibidores conocidos y análogos del sustrato

Compuesto	BE (kcal/mol)	BE ₁ (kcal/mol)	BE ₂ (kcal/mol)	BE ₁ , BE ₂ (kcal/mol)
controles				
ATP	-19.0	-15.0	-15.0	-15.0
5'-ATP	-18.7	-13.2	-13.2	-13.2
2'-5'-BMP	-18.9	-15.3	-15.3	-15.3
1'-5'-BMP	-14.9	-13.1	-13.1	-13.1
Nuestros compuestos				
FIL-1	-20.6	-17.8	-17.8	-17.8
LOC	-20.6	-16.1	-16.1	-16.1
LOC	-20.4	-17.8	-17.8	-17.8
LOC	-20.1	-15.5	-15.5	-15.5
FIV-50	-19.2	-17.5	-17.5	-17.5
LOC	-18.8	-14.1	-14.1	-14.1
LOC	-18.6	-15.4	-15.4	-15.4
PH-1	-18.1	-16.2	-16.2	-16.2
Inhibidores previamente identificados				
Soelaiman7 (25 µM)	-10.7	-10.7	-10.7	0.0
Soelaiman6 (30 µM)	-11.4	-10.8	-10.8	-0.6
Soelaiman2 (70 µM)	-11.0	-10.3	-10.3	-0.7

BE energías de enlace de Auto-acoplamiento para el ántrax EF
 BE energías de enlace de Auto-acoplamiento para adenilato ciclasa de maníferos
 Estos compuestos tenían los mejores valores IC50 (en paréntesis) en Soelaiman et al., (2003) Boletín de Etología Química 278 25990-25997

Fig. 12

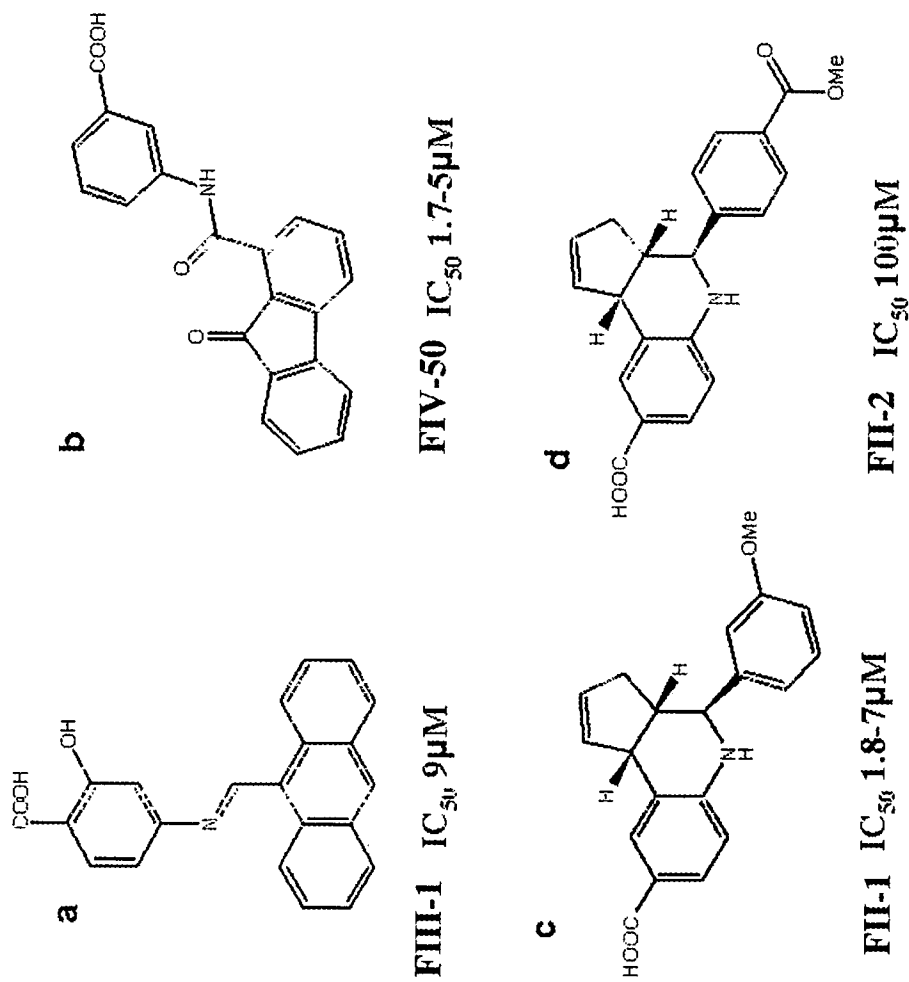


FIG. 13

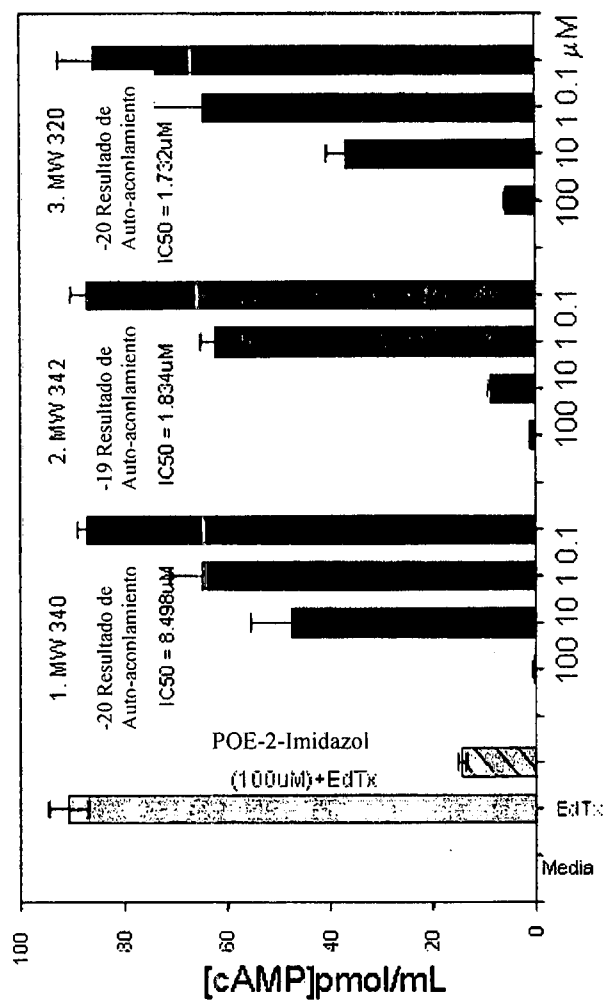


FIG. 14

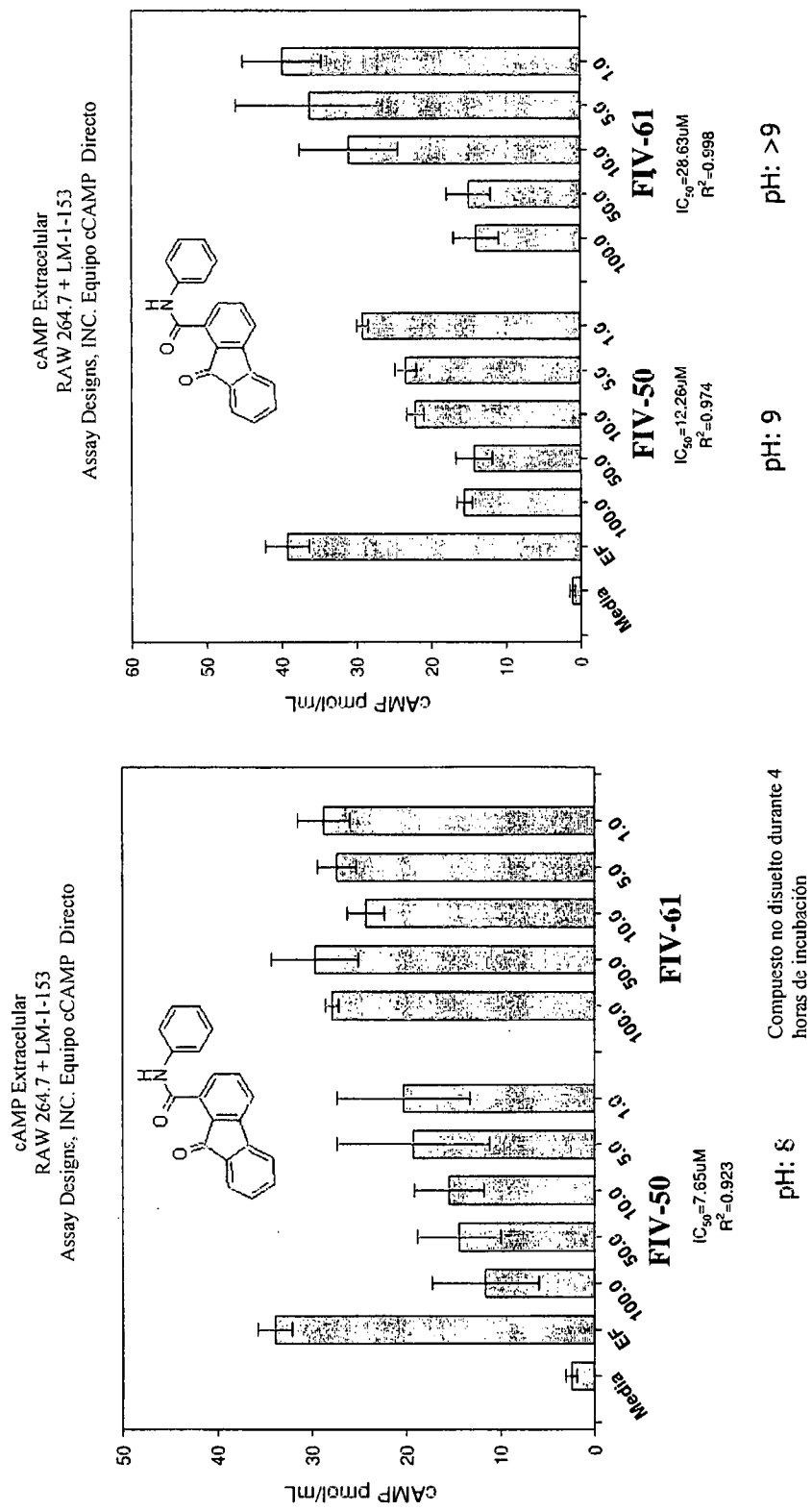
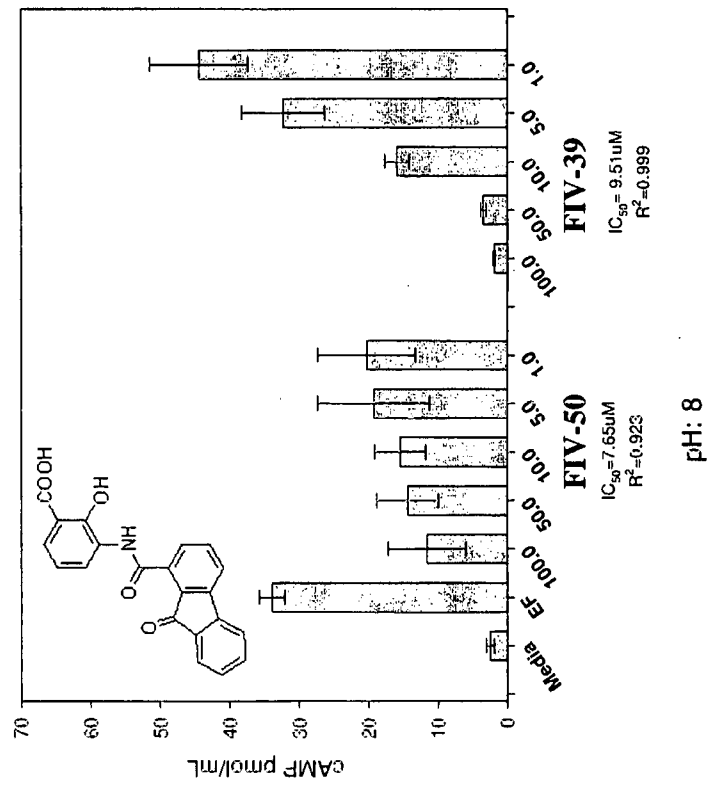


FIG. 15A

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-161
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo



cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-161
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo

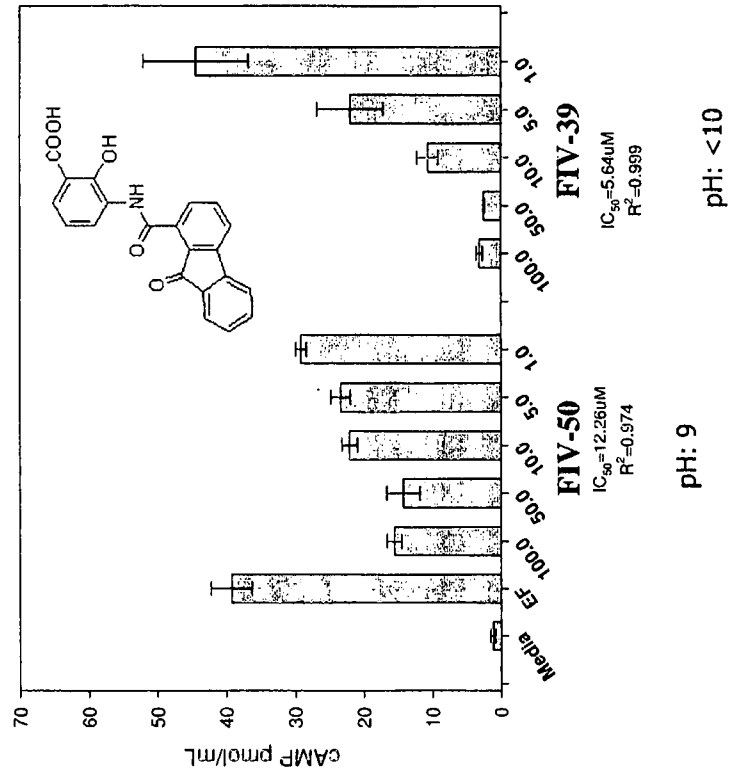
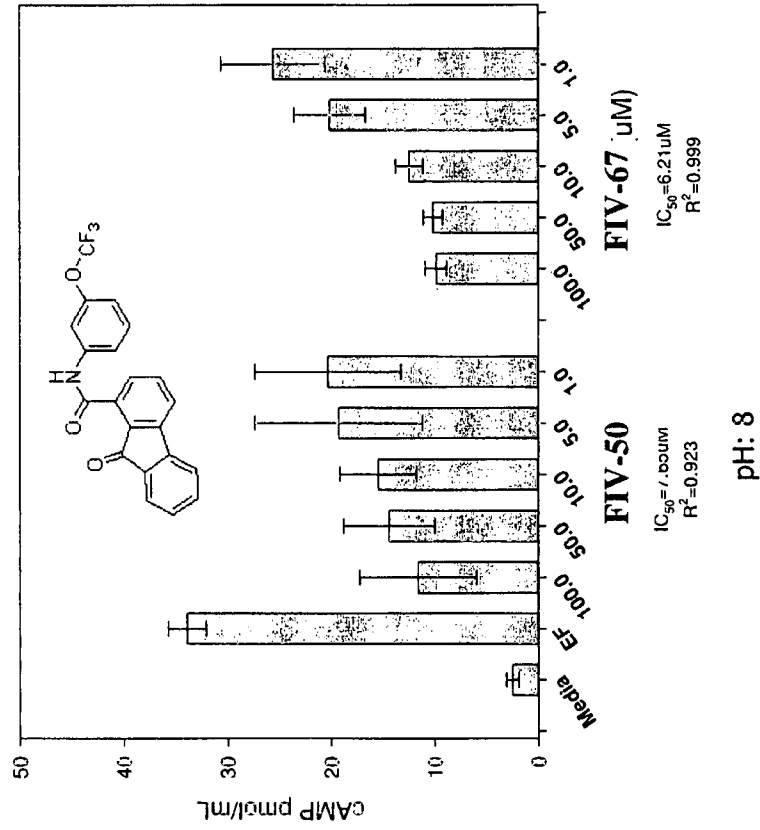


FIG. 15B

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-078
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo



cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-078
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo

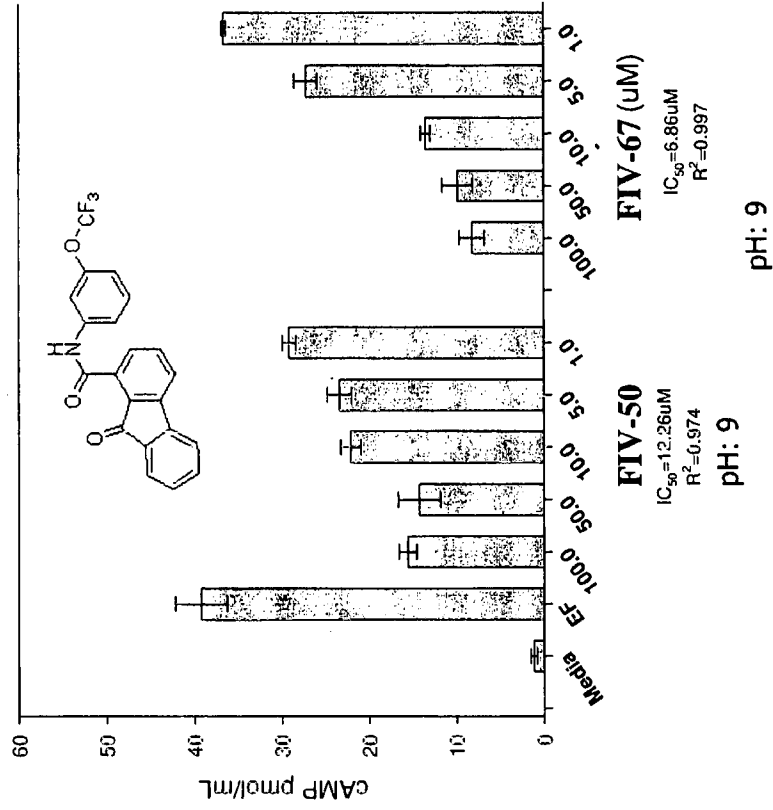
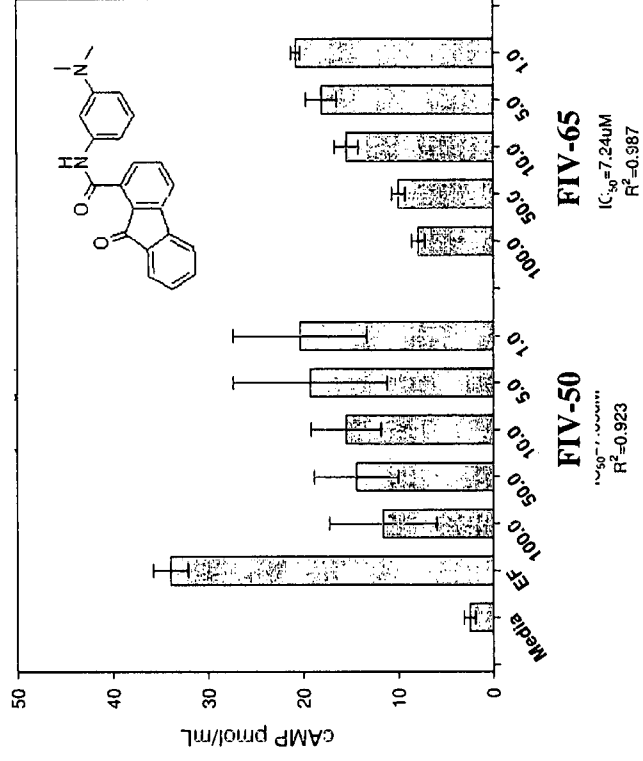


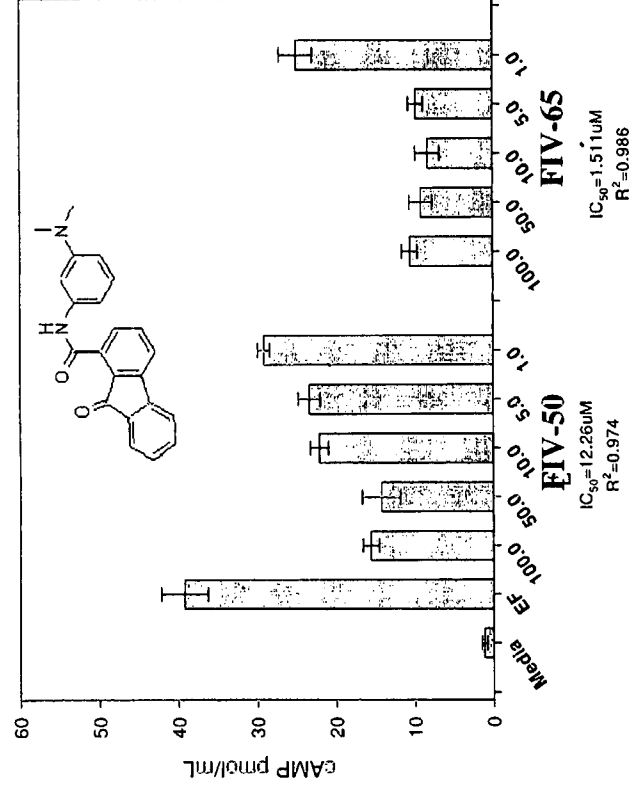
FIG. 15C

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-086
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo



pH: 8

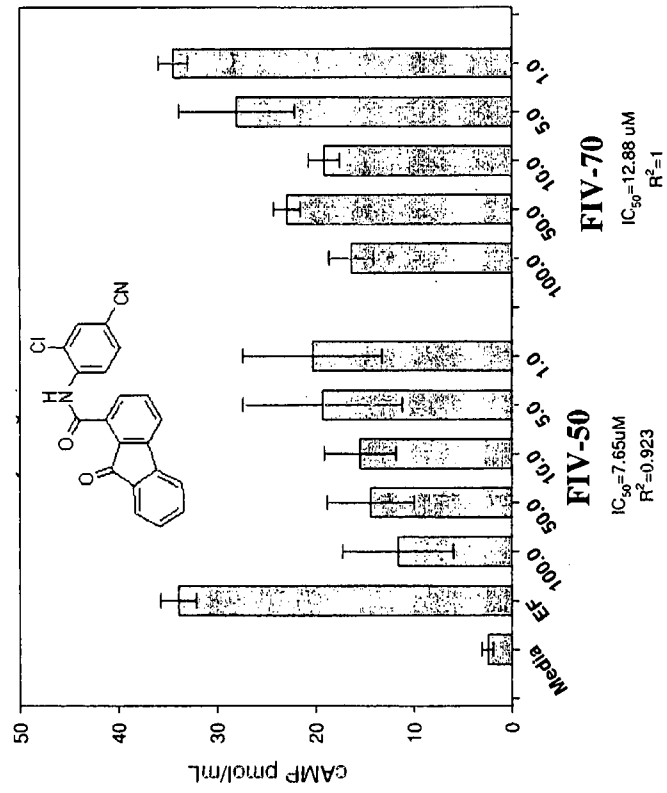
cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-086
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo



pH: >9

FIG. 15D

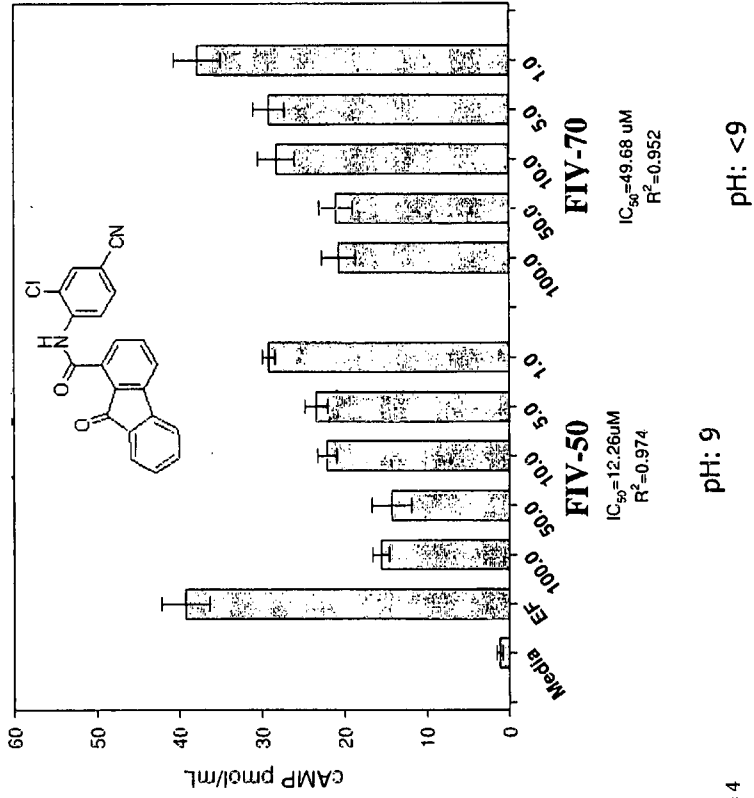
cAMP Extracelular
RAW 264.7 + LM-1-084
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo



pH: 8

Células muertas encontradas después de 4 horas de incubación con compuesto

cAMP Extracelular
RAW 264.7 + LM-1-084
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo

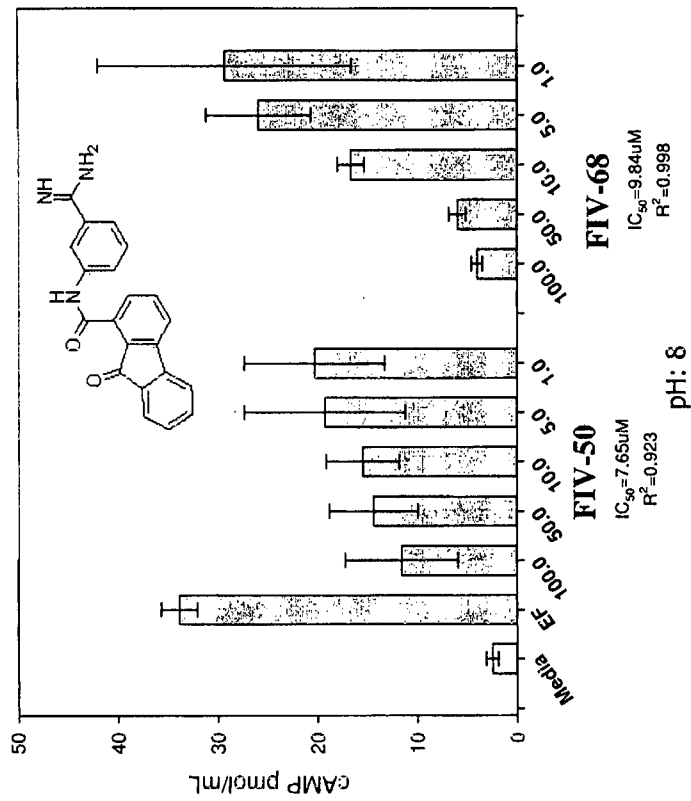


pH: 9

pH: <9

FIG. 15E

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-096
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo



cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-096
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo

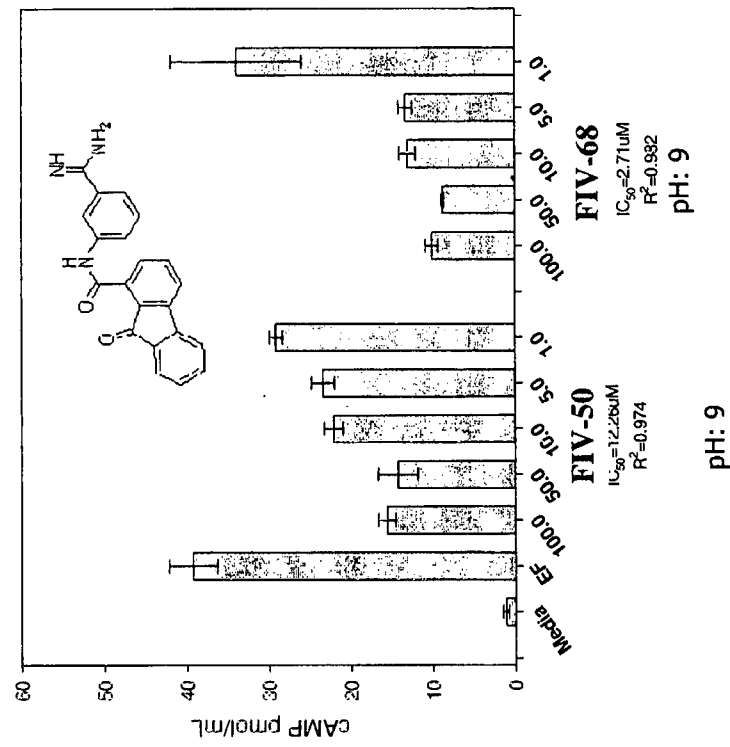
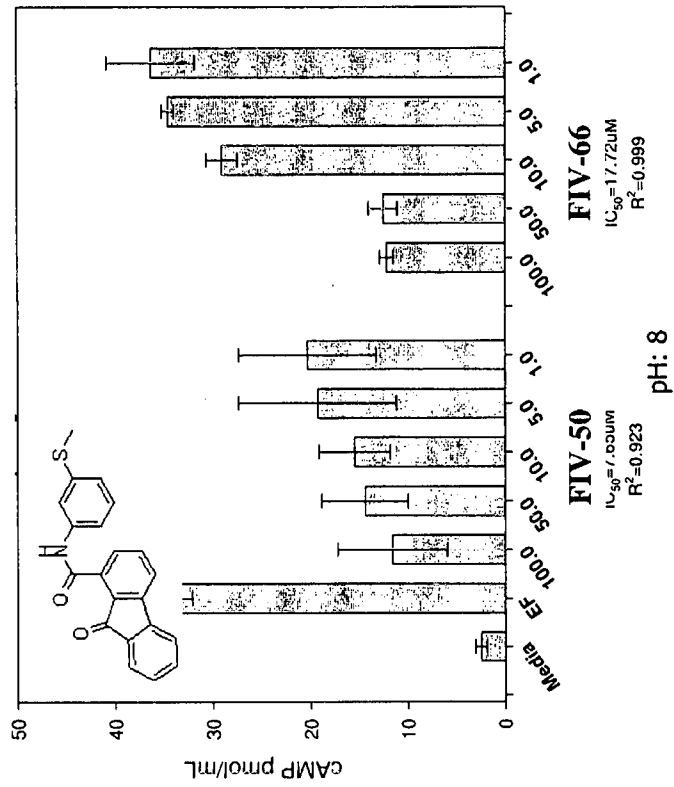


FIG. 15F

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-085
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo



cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-085
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo

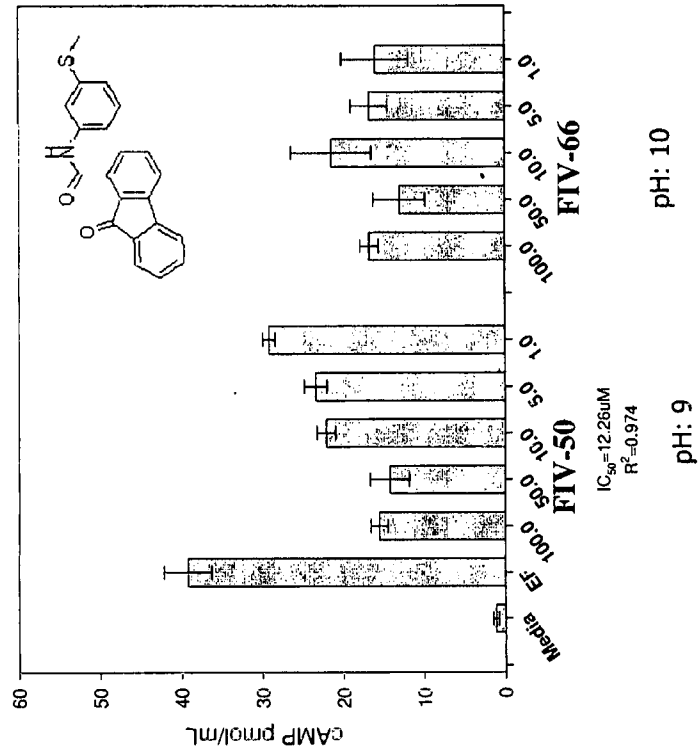
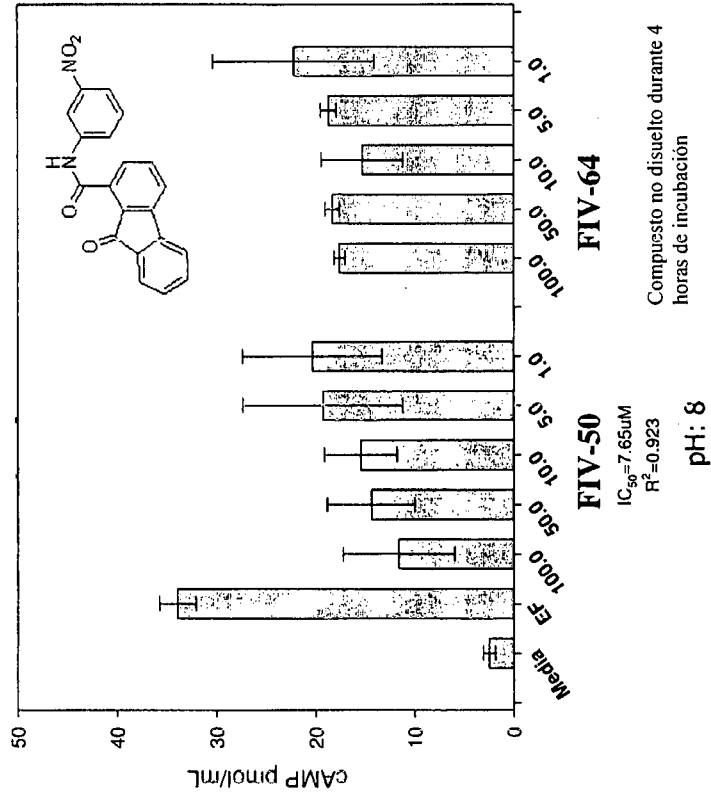


FIG. 15G

cAMP Extracelular
RAW 264.7 + LM-I-054
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo



cAMP Extracelular
RAW 264.7 + LM-I-054
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo

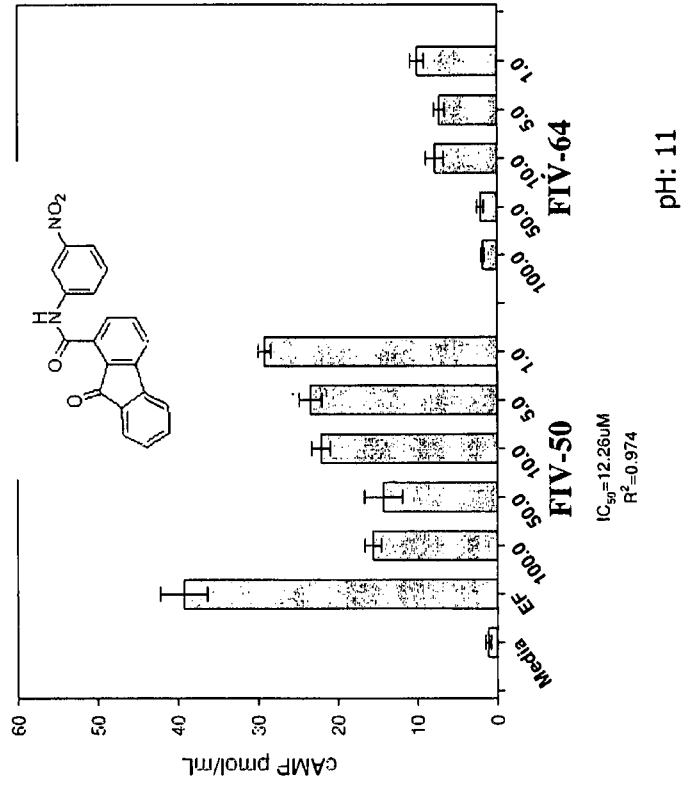


FIG. 15H

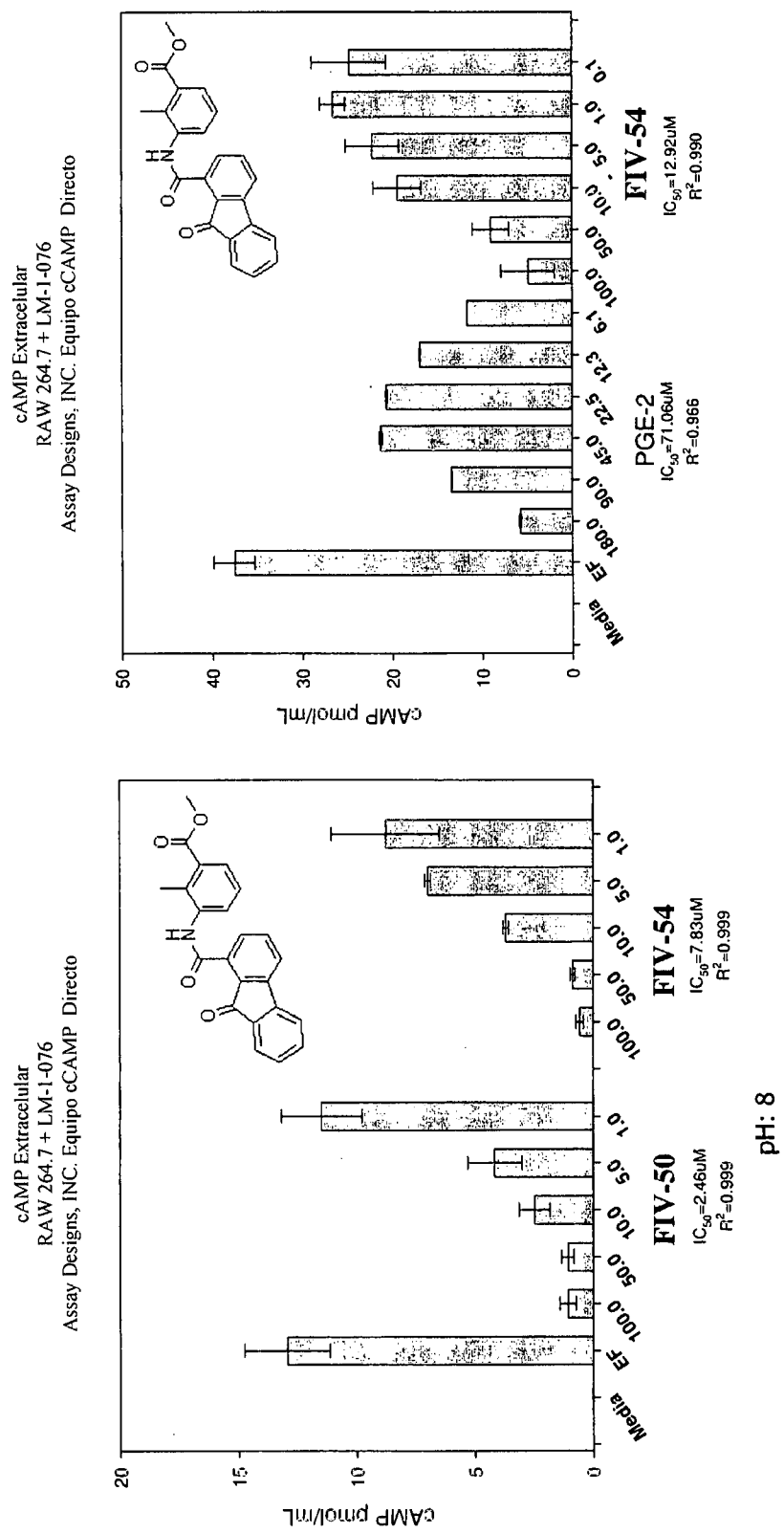


FIG. 15I

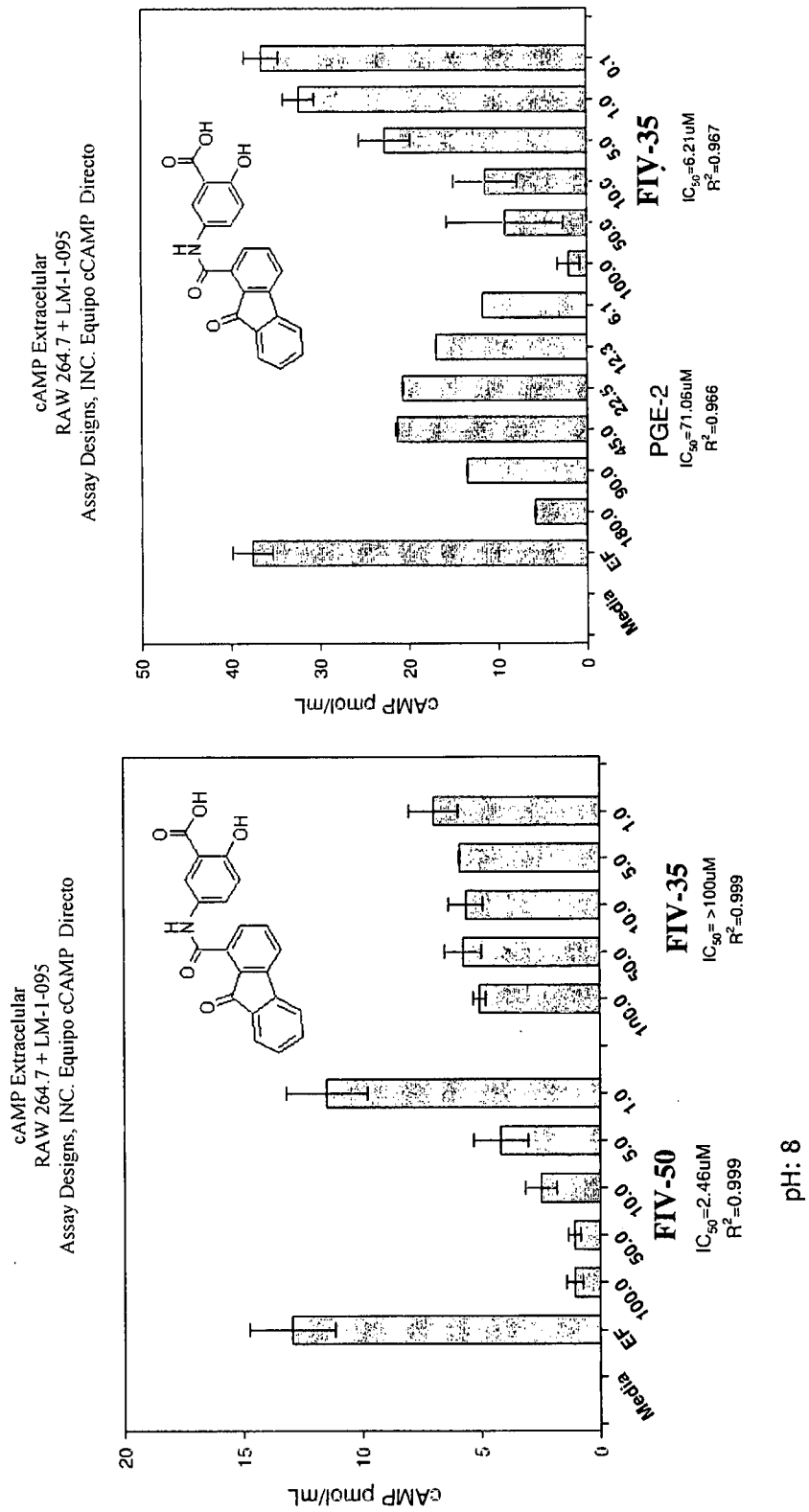


FIG. 15J

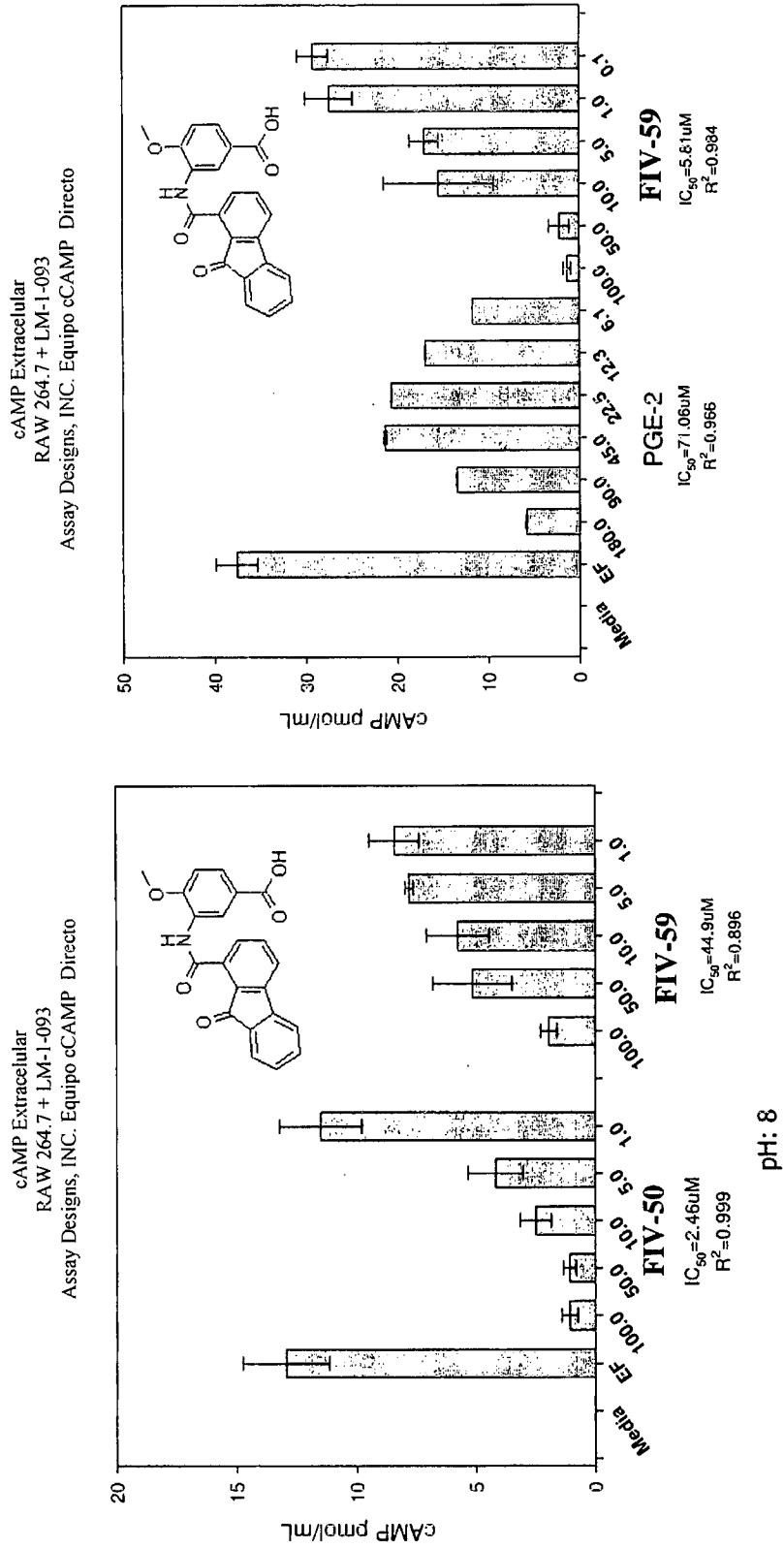
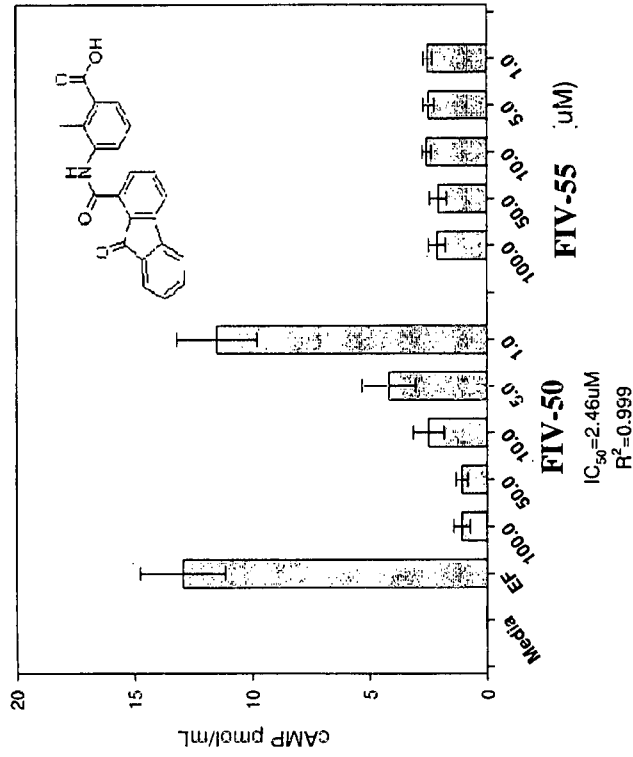


FIG. 15K

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-092
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo



pH: 8

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-092
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo

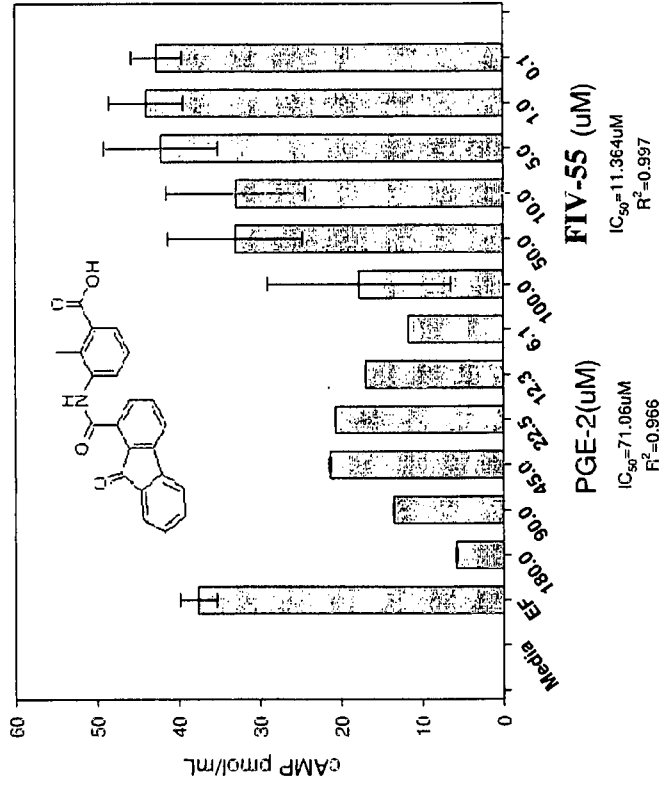
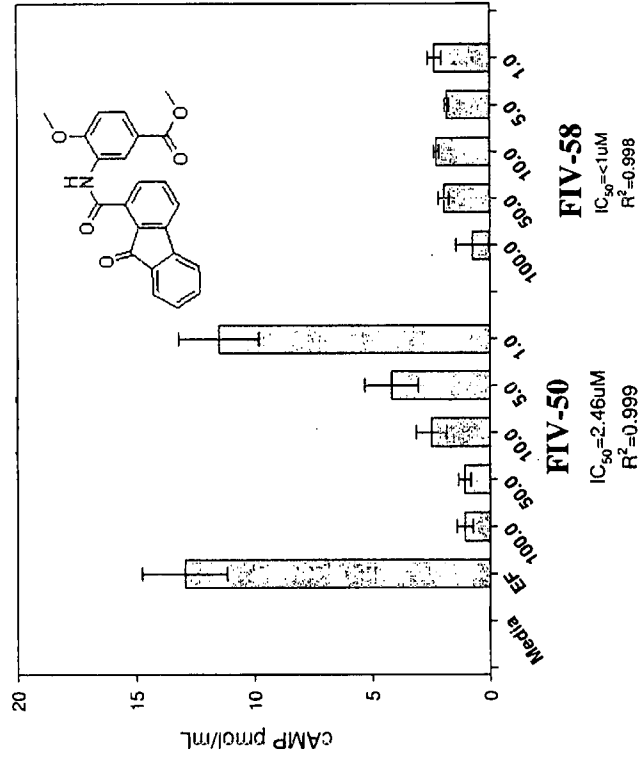


FIG. 15L

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-089
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo



cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-089
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo

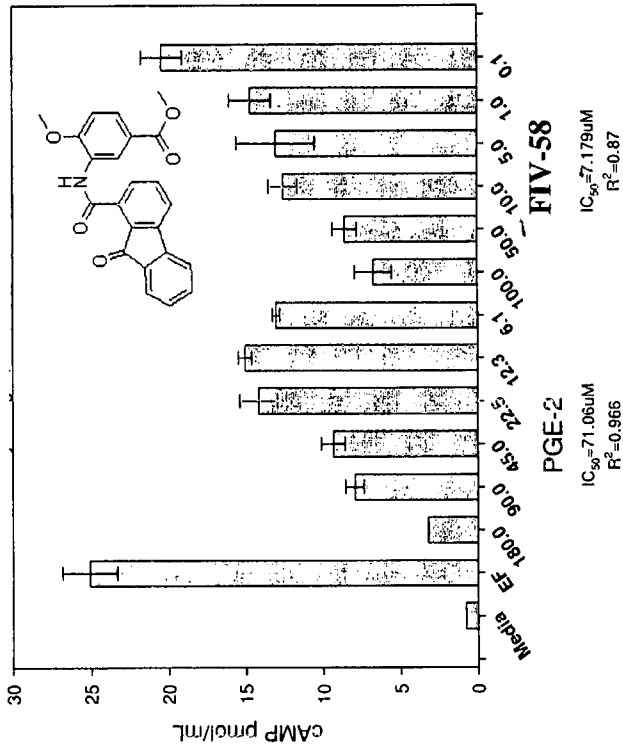
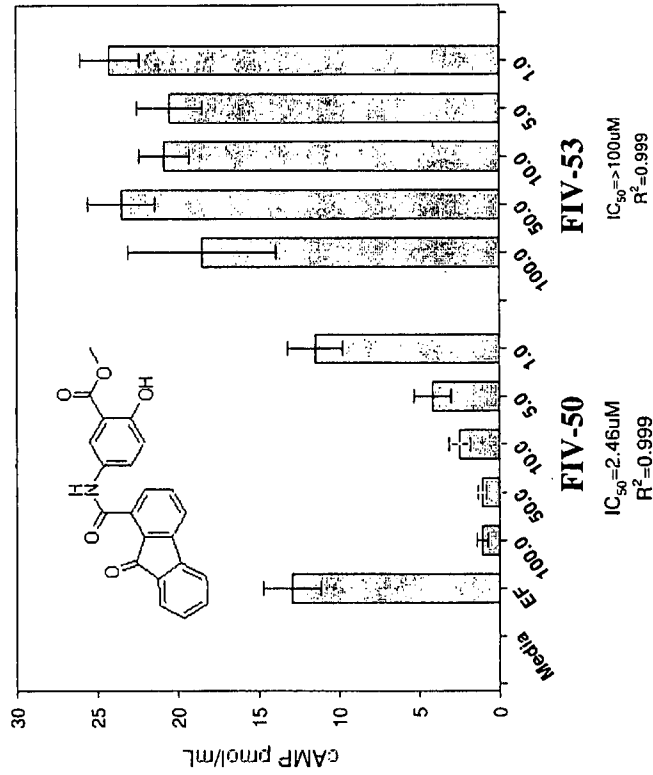


FIG. 15M

pH: 8

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-094
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo



cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-094
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo

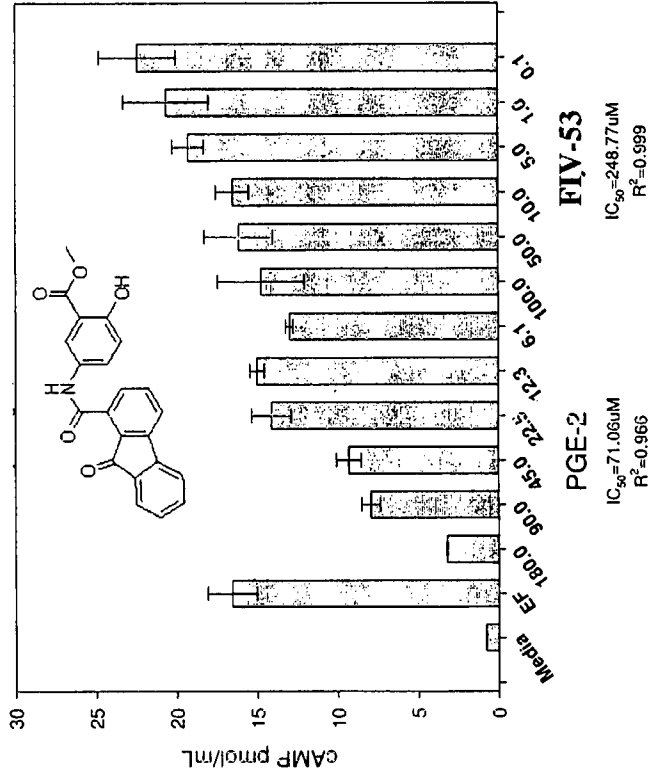
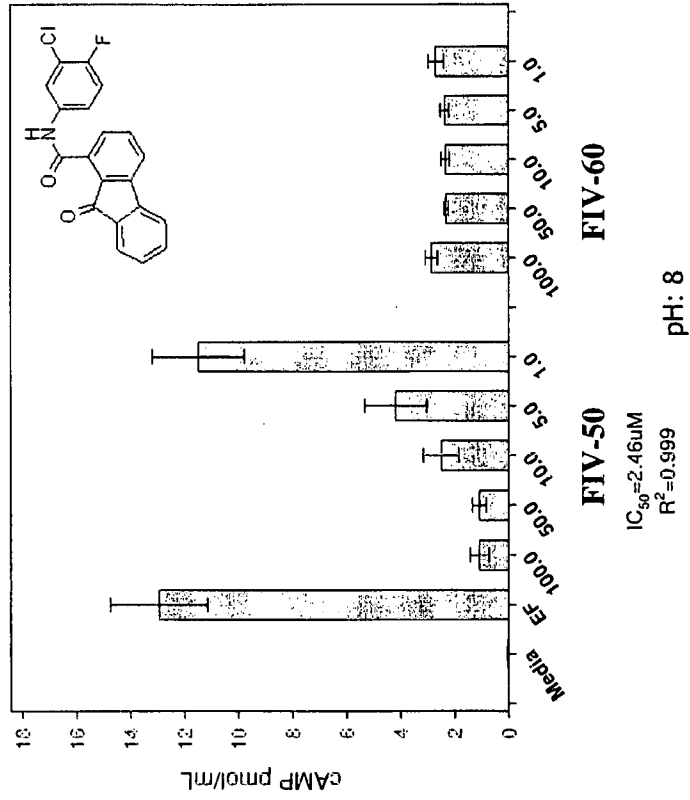


FIG. 15N

pH: 8

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-077
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo



cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-077
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo

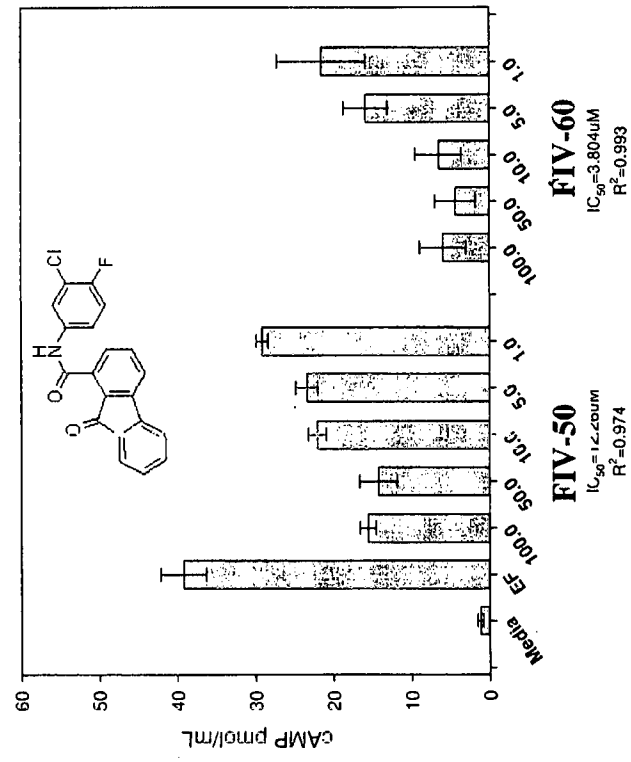


FIG. 150

cAMP Extracelular
 RAW 264.7 + LM-1-204
 Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo

Todos los compuestos pH ~7-8.
 Las curvas se fijaron contra el
 Log Normal acumulado (Eqn.
 8080) para todos los
 compuestos.

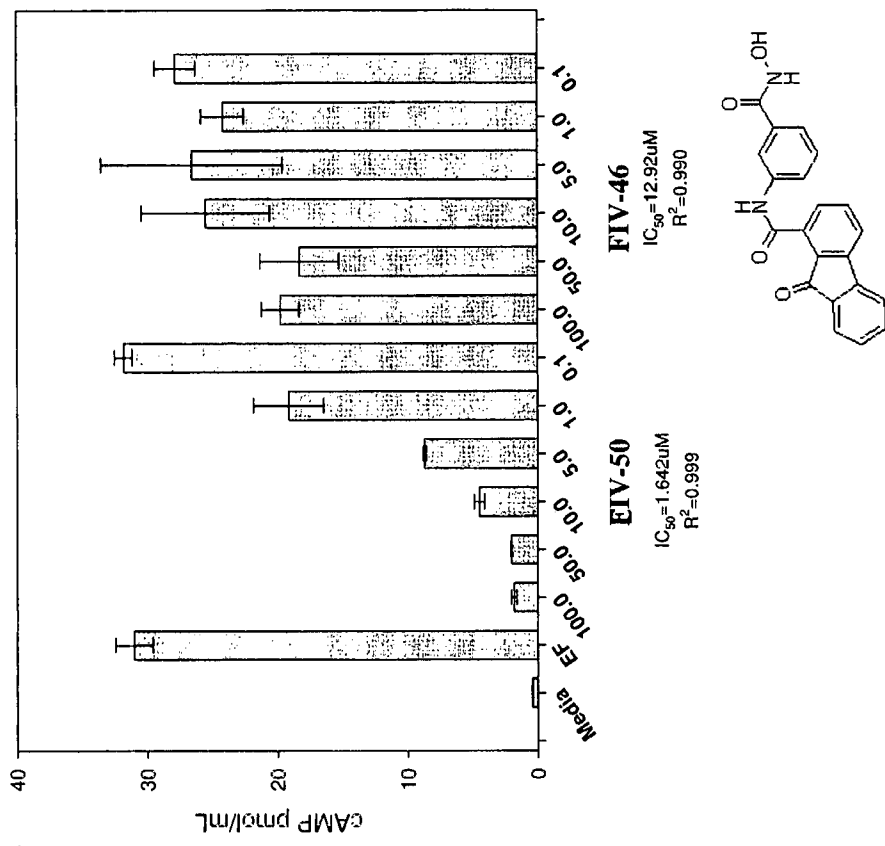


FIG. 16A

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-216
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo

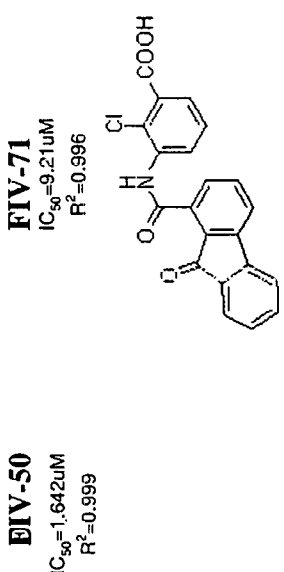
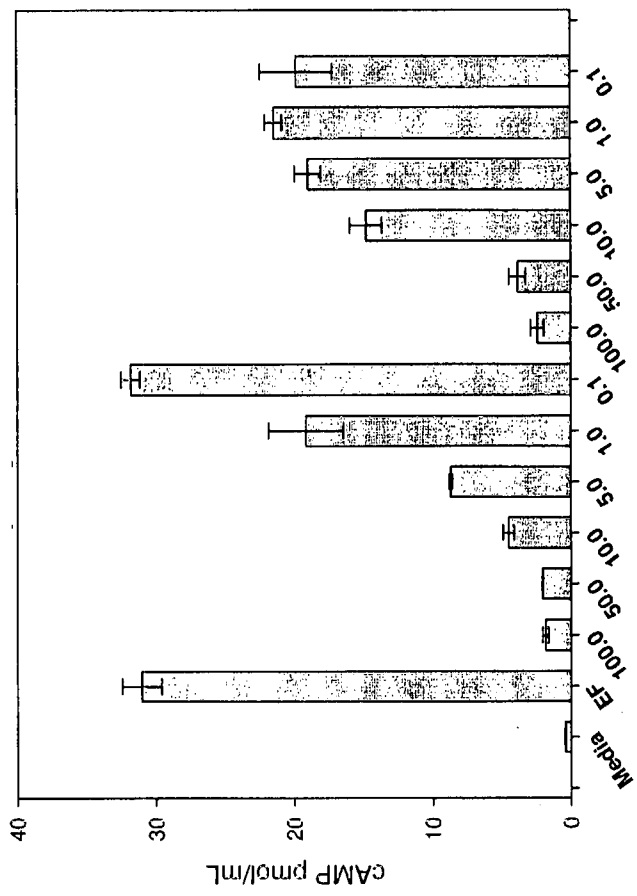
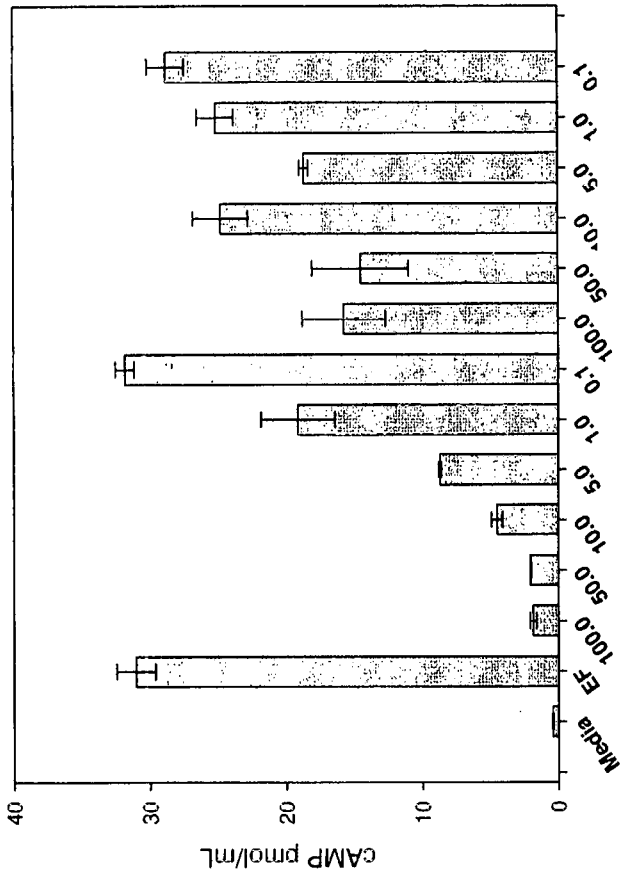


FIG. 16B

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-206F1
Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo



FIV-50
 $IC_{50}=1.642\mu M$
 $R^2=0.999$

FIV-72
 $IC_{50}=80.001\mu M$
 $R^2=0.790$

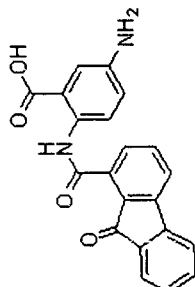


FIG. 16C

cAMP Extracellular
RAW 264.7 + LM-1-206F2
Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo

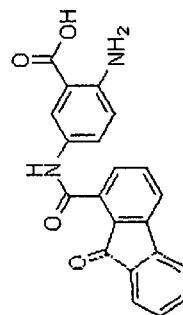
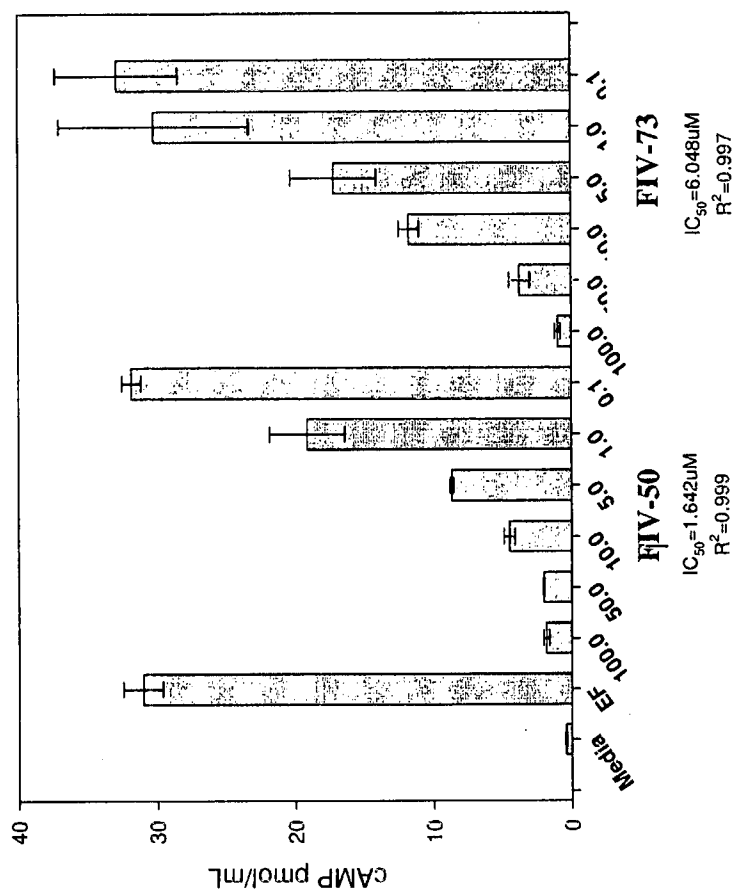
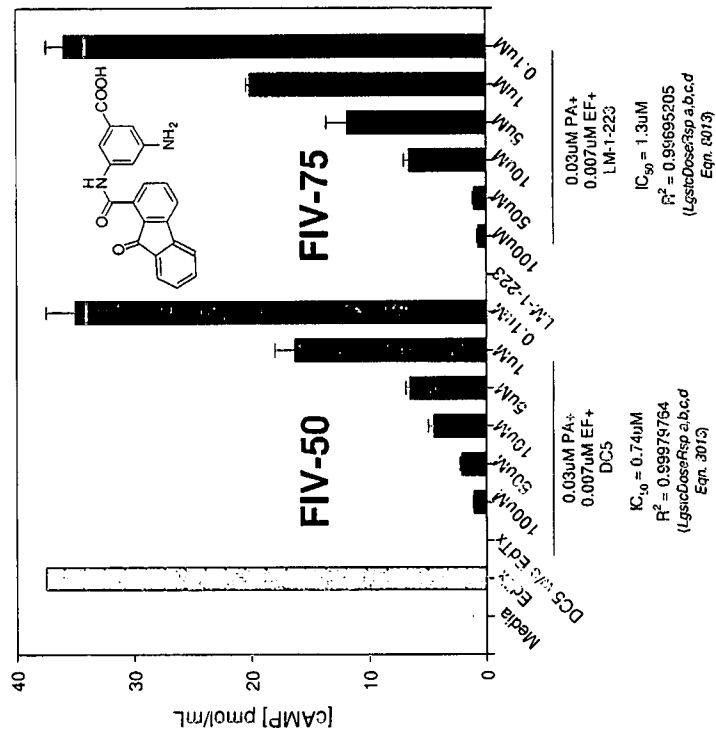


FIG. 16D

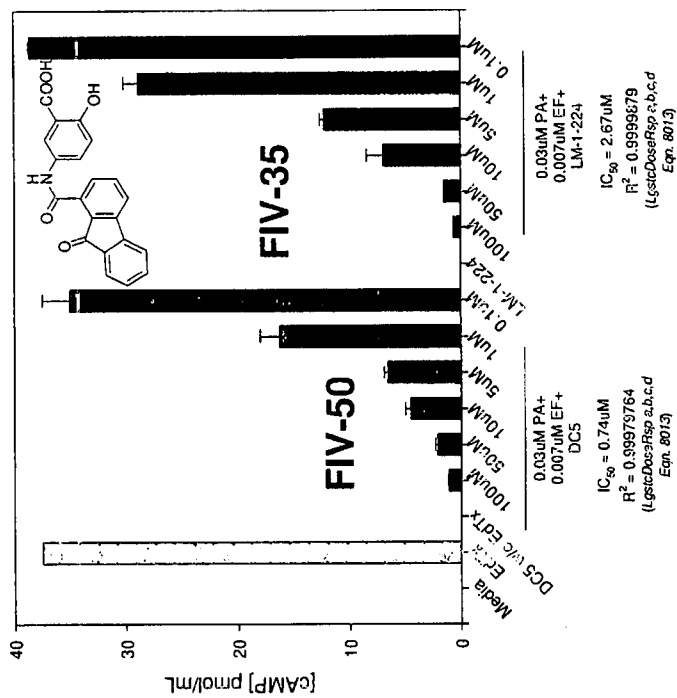
cAMP Extracelular
 RAW 264.7 + DC-5+EdTx
 RAW 264.7 + LM-1-223+EdTx
 Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo
 06.06.08



-IBMX (inhibidor de fosfodiesterasa) se añadió en una concentración de 50uM.
 -A los compuestos se les permitió incubar con células por cuatro horas.

FIG. 16E

cAMP Extracellular
 RAW 264.7 + DC-5+EdTx
 RAW 264.7 + LM-1-224+EdTx
 Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo
 06.06.08



-IBMX (inhibidor de fosfodiesterasa) se añadió en una concentración de 50uM.
 -A los compuestos se les permitió incubar con células por cuatro horas.

FIG. 16F

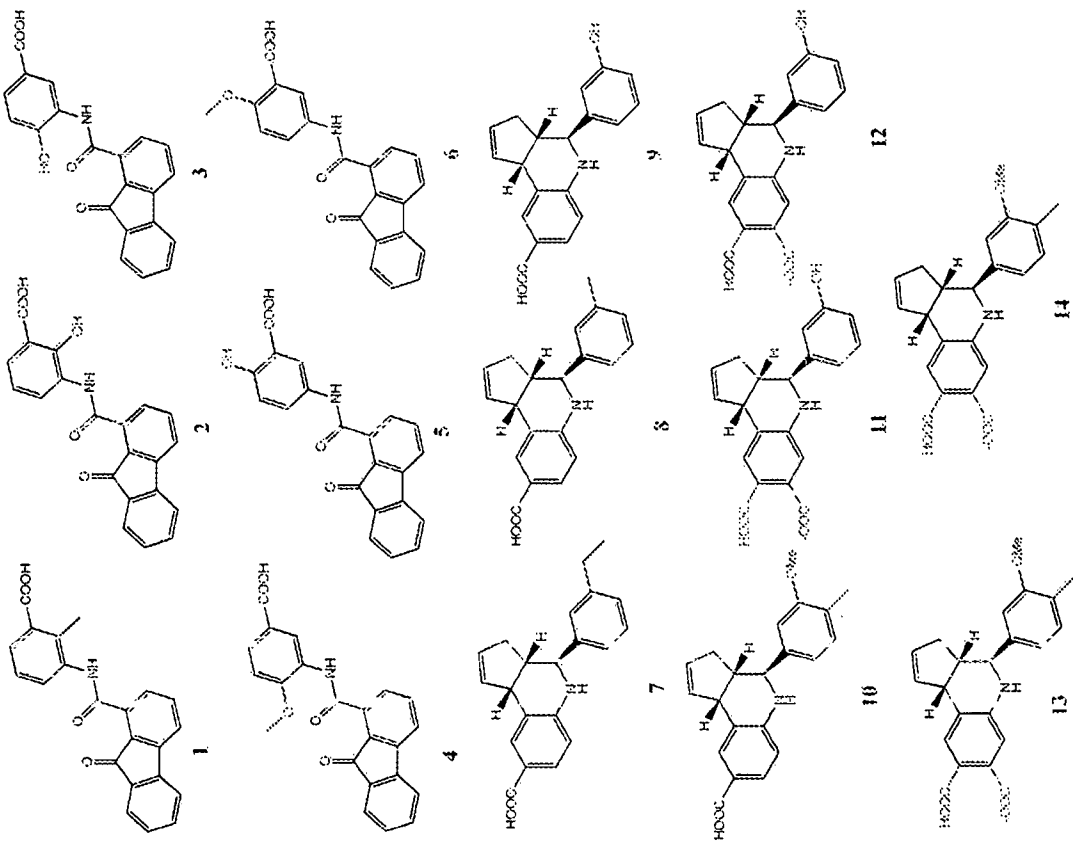
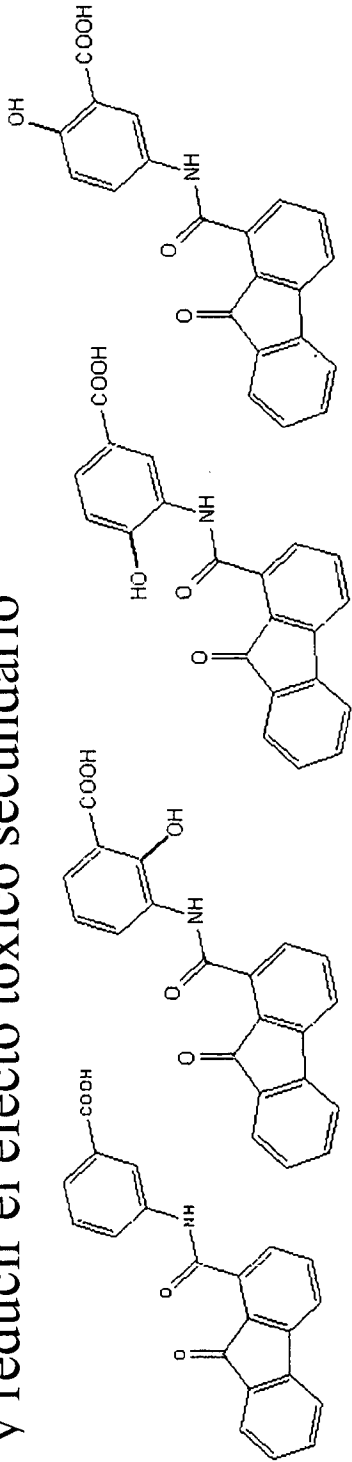


FIG. 17

Rediseñar DC-5 y DC-8 para aumentar la solubilidad y reducir el efecto tóxico secundario



Compuesto	Mutagenicidad	umorogenicidad	Efectos Irritantes	Efectos Reproductivos	cLogP
FIV-50	Alto Riesgo	Baio Riesgo	Riesgo Medio	Baio Riesgo	4.29
FIV-43	Baio Riesgo	Baio Riesgo	Baio Riesgo	Baio Riesgo	3.99
FIV-16	Baio Riesgo	Baio Riesgo	Baio Riesgo	Baio Riesgo	3.99
FIV-35	Baio Riesgo	Baio Riesgo	Baio Riesgo	Baio Riesgo	3.99

FIG. 18

Derivados de DC5 con Actividades <20μ M

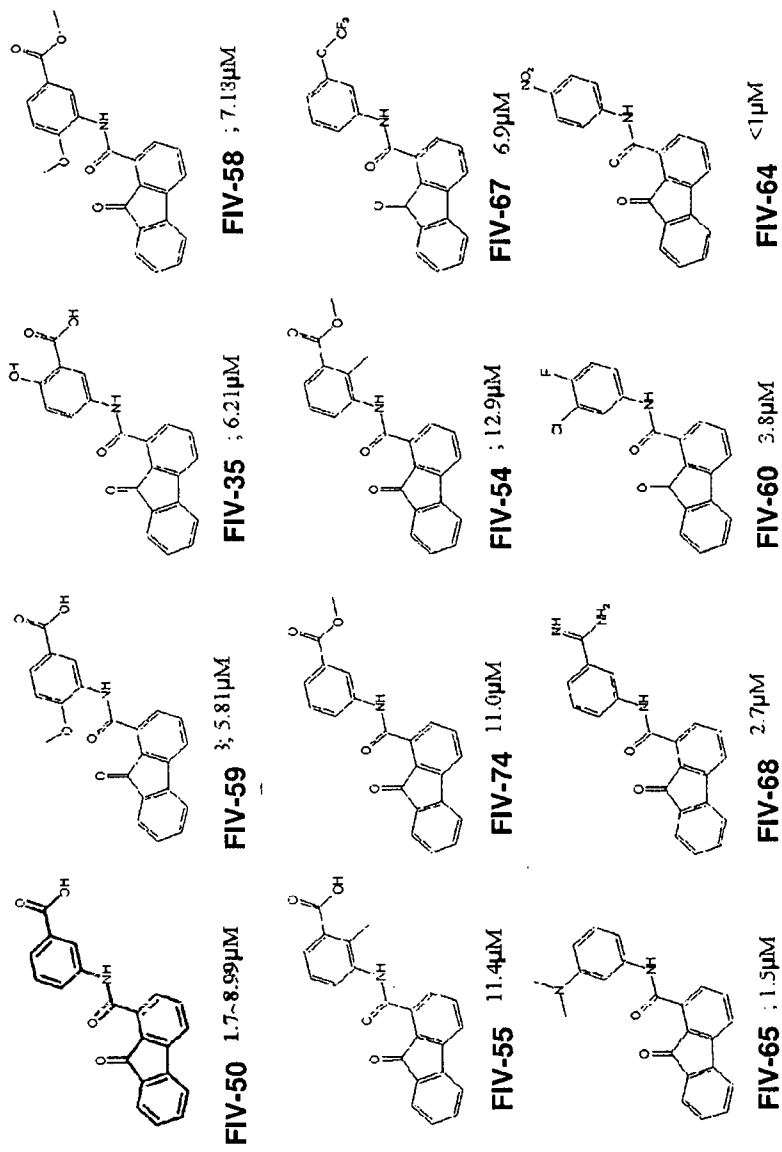


FIG. 19

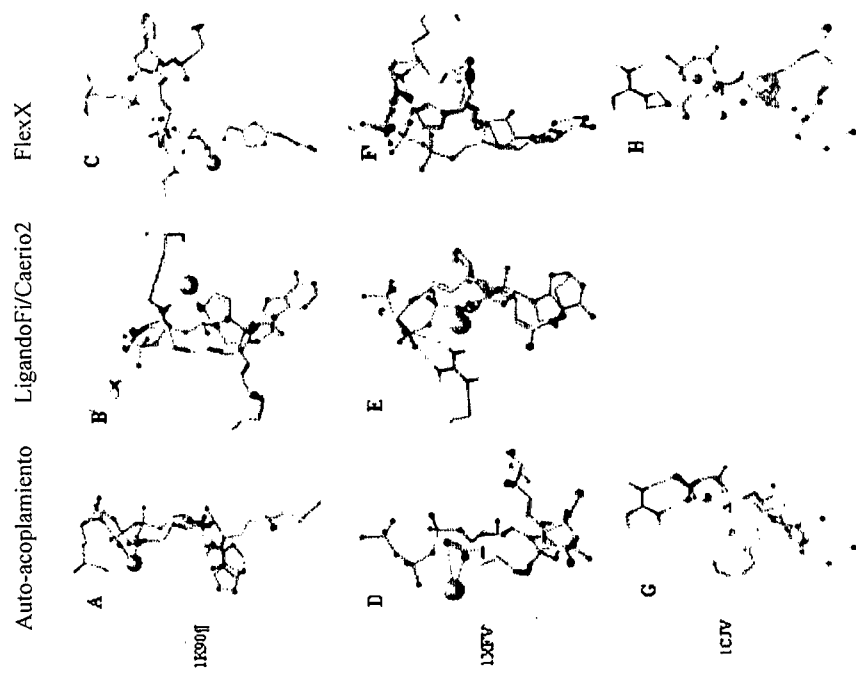


FIG 20

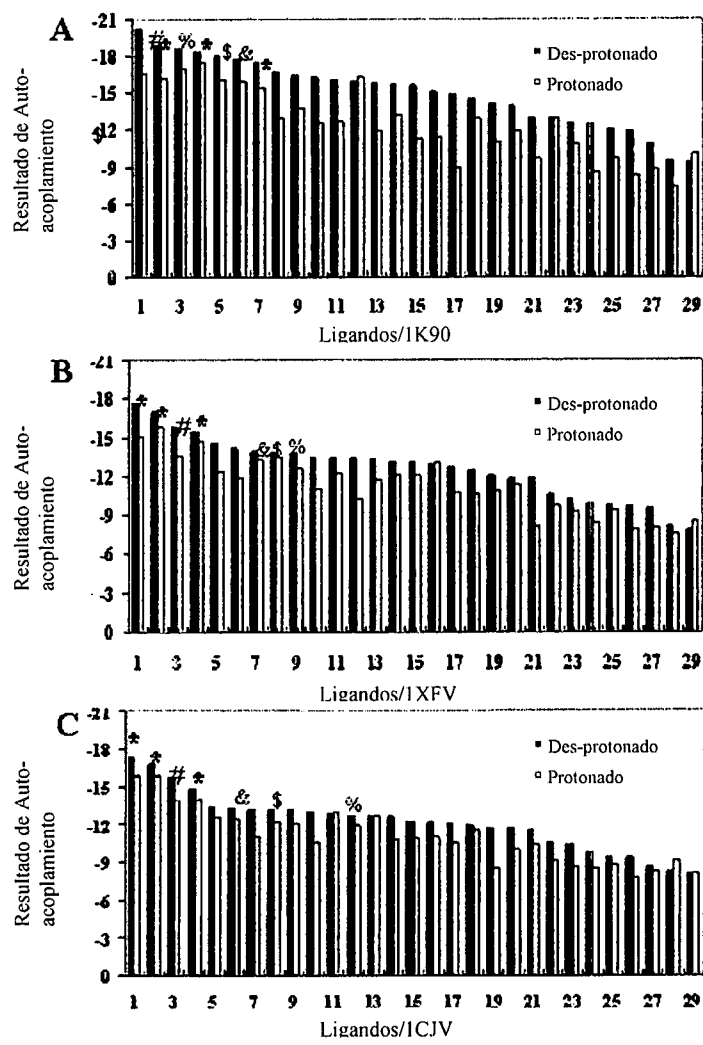


FIG. 21

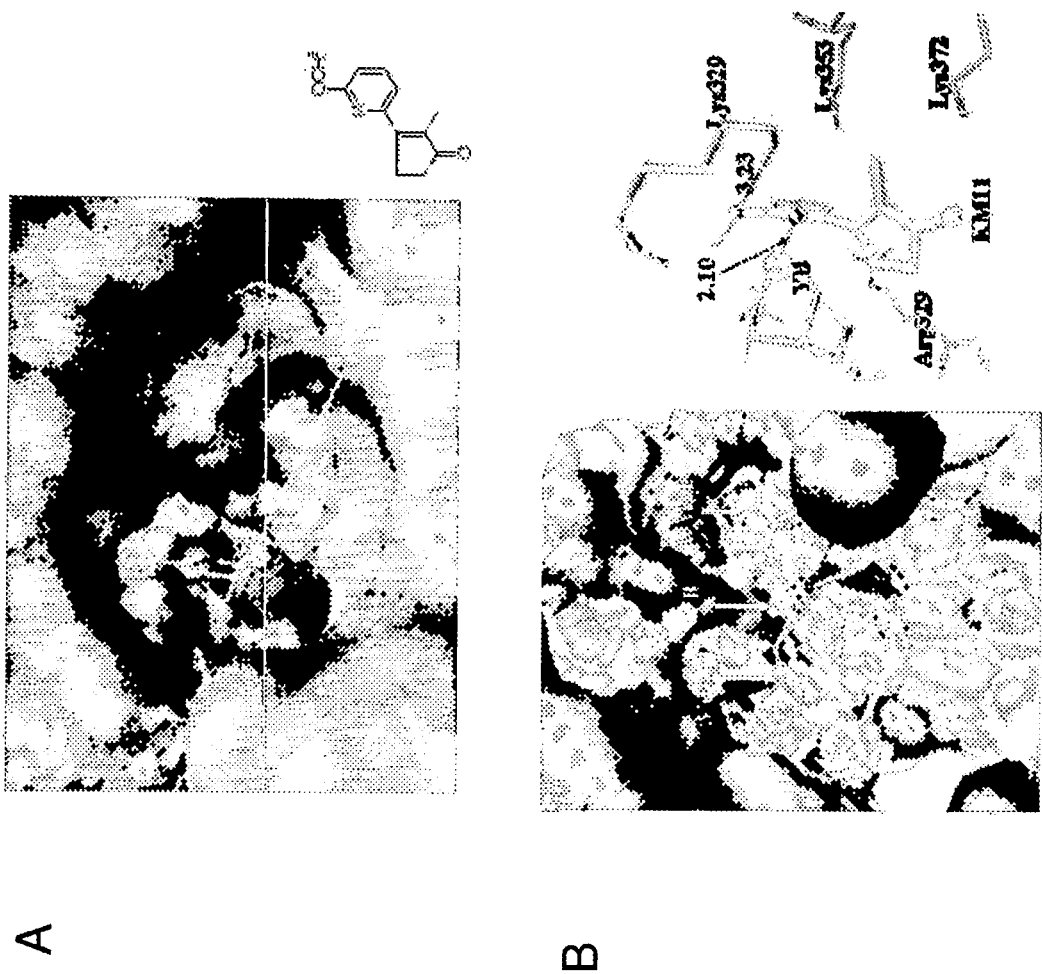


FIG. 22

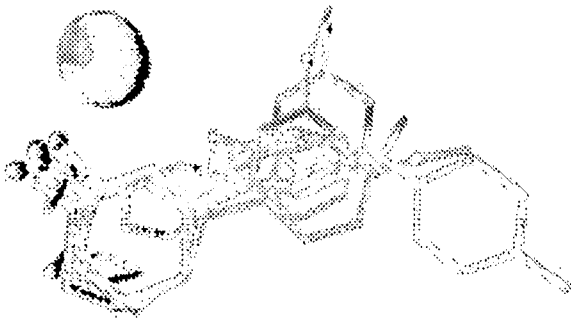
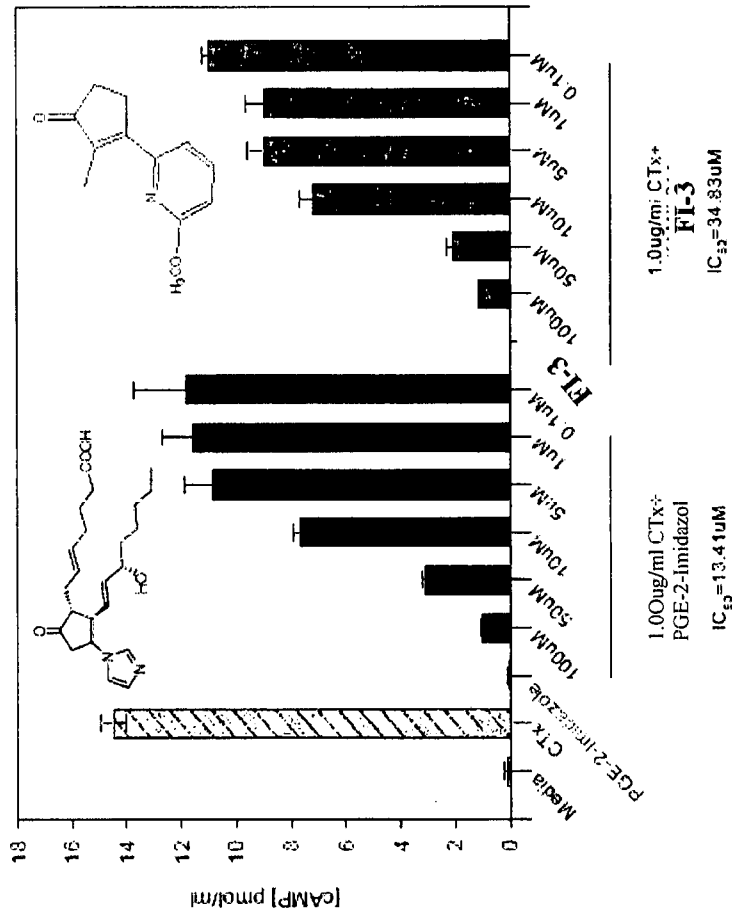


FIG. 23

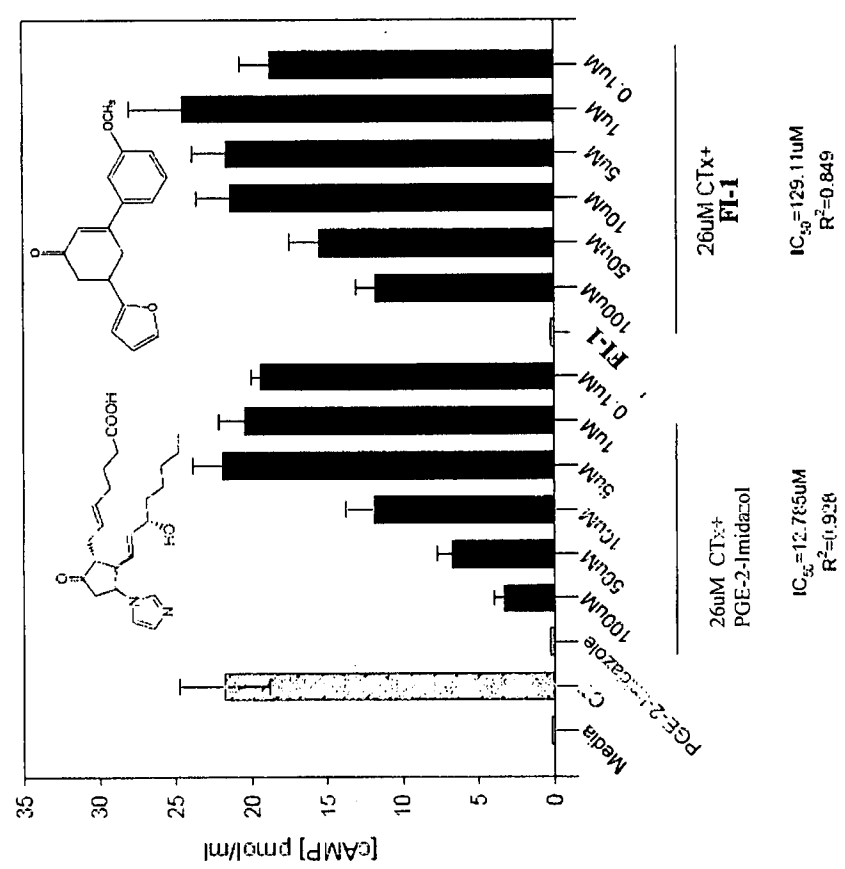
cAMP Extracelular
 RAW 264.7 + PGE-2-Imidazol+CTx
 RAW 264.7 + FI-3 +CTx
 Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo



-IEMX (inhibidor de fosfodiesterasa) se añadió en una concentración de 50uM.
 -A los compuestos se les permitió incubar con células por cuatro horas.

FIG. 24

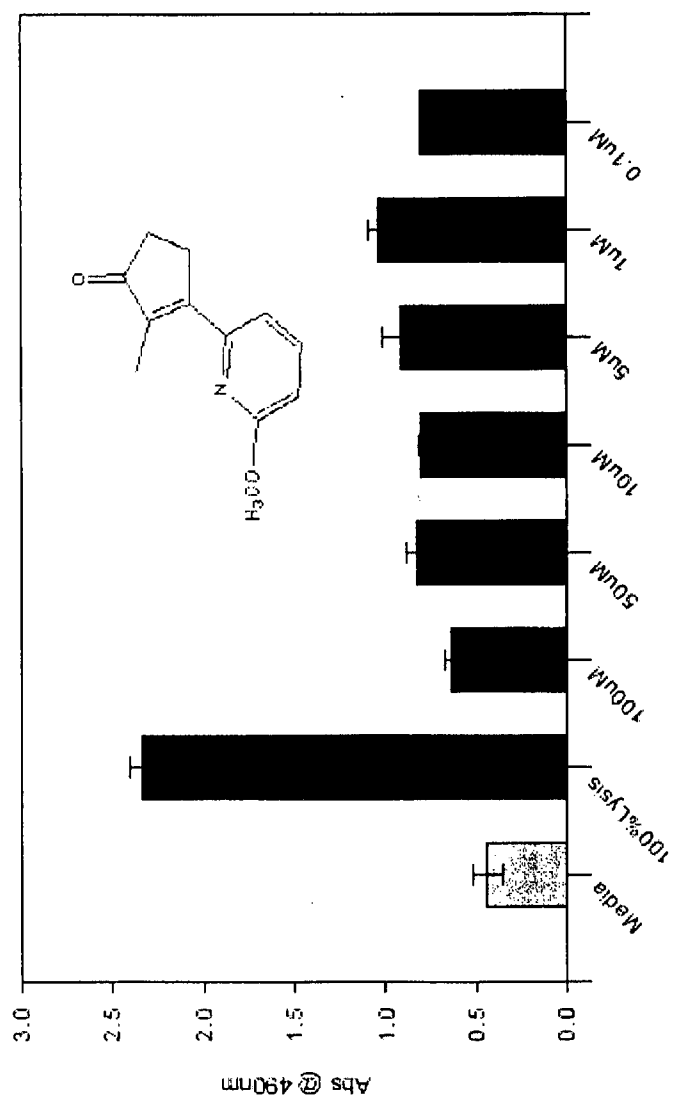
cAMP Extracelular
 RAW 264.7 + PGE-2-Imidazol+CT
 RAW 264.7 + **FI-1** +CT
 Assay Designs, INC. Equipo cAMP Directo



-IBMX: (inhibidor de fosfodiesterasa) se añadió en una concentración de 50uM.
 -A los compuestos se les permitió incubarse con células por cuatro horas.

FIG. 25

Citotoxicidad de **FI-1** (Sup)
 Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo



FI-3 (Old)

FIG. 26

Citotoxicidad de **FI-1**
CytoTox 96 Equipo LDH

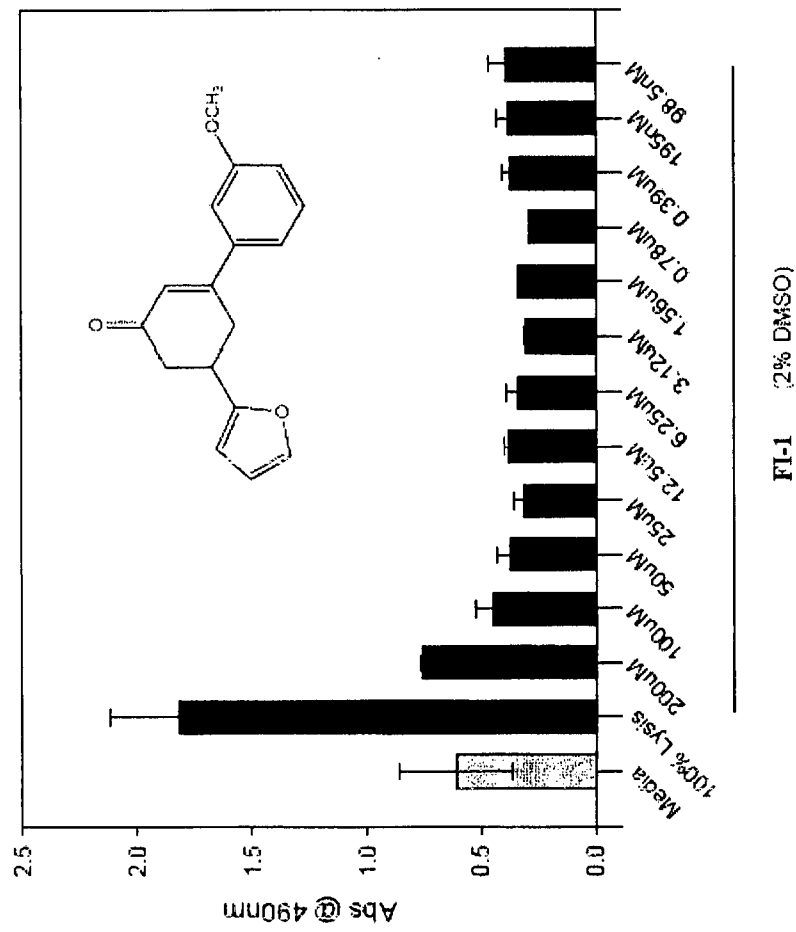
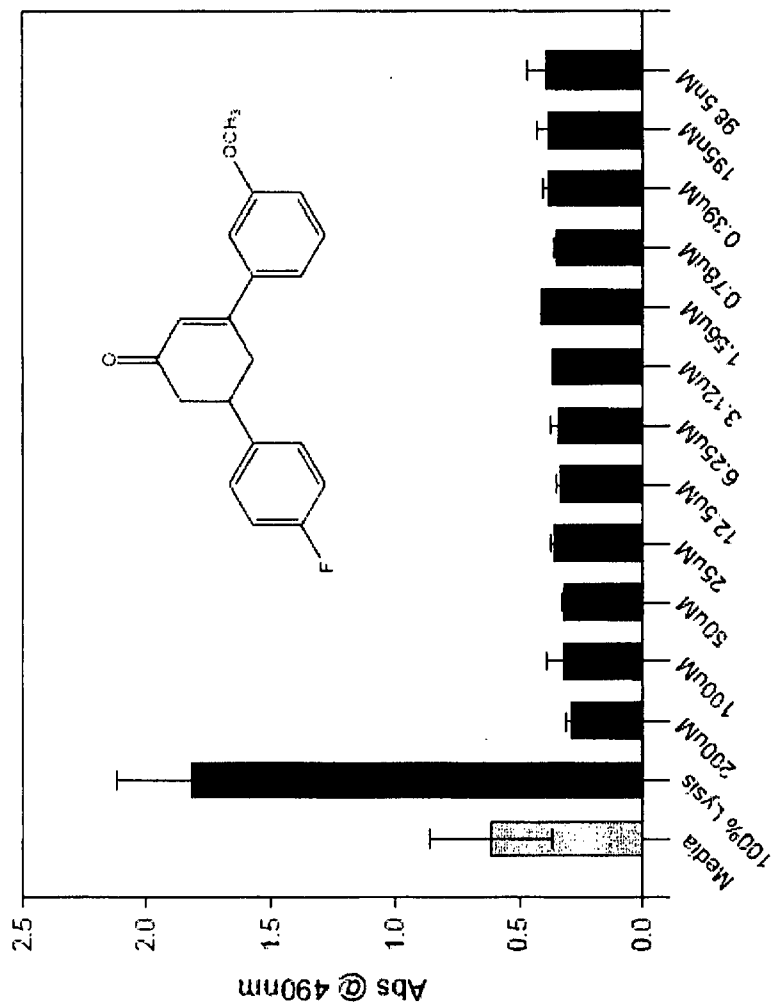


FIG. 27

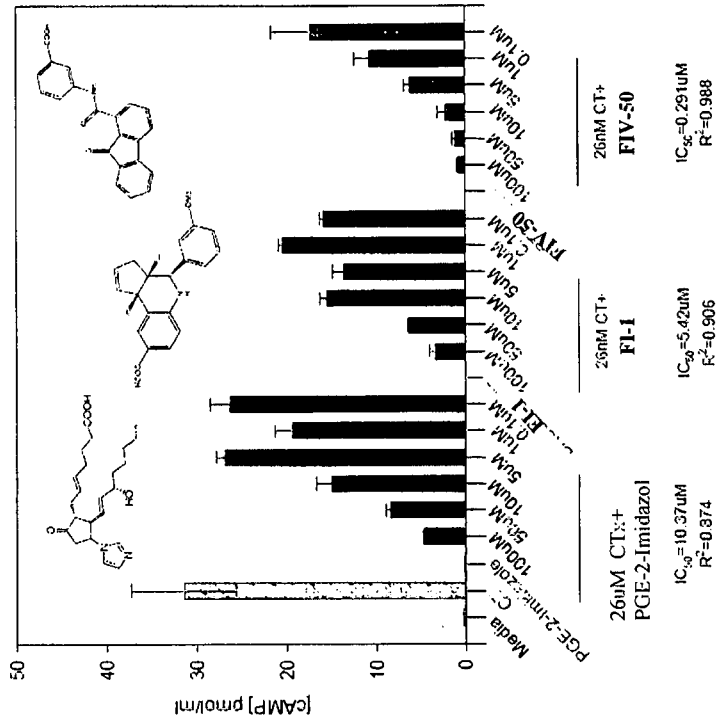
Citotoxicidad de **FI-2**
CytoTox 96 Equipo LDH



FI-2 (2% DMSO)

FIG. 28

cAMP Extracelular
 RAW 264.7 + PGE-2-Imidazol+CT
 RAW 264.7 + FI-2 +CT
 RAW 264.7 - FIV-50 -CT
 Assay Designs, IlIC, Equipo cCAMP Directo



-IBMX (inhibidor de fosfodiesterasa) se añadió en una concentración de 50uM.
 -A los compuestos se les permitió incubar con células por cuatro horas.

FIG. 29

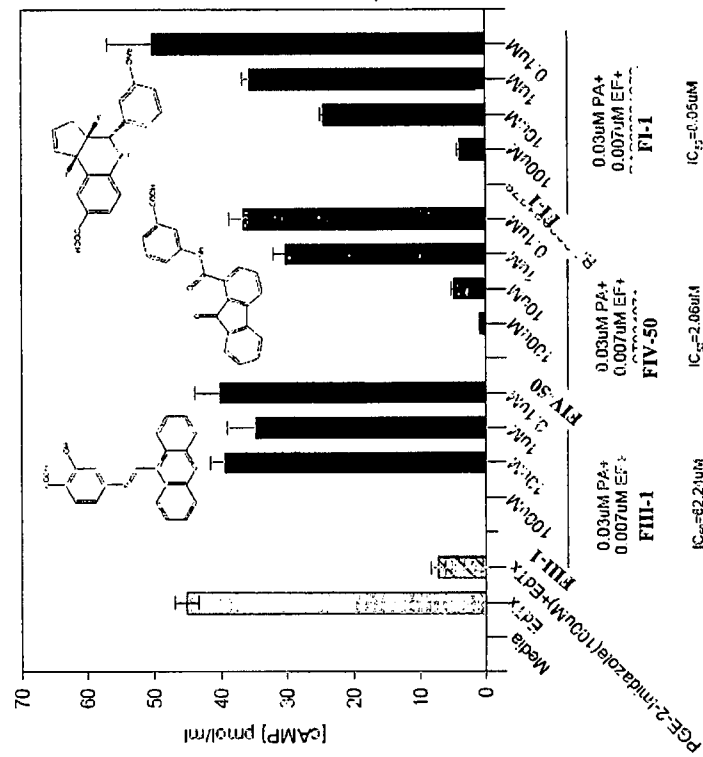
cAMP Extracelular

FAW 264.7 + **FIII-1** +EdTx

FAW 264.7 + **FIV-50** +EdTx

RAW 264.7 - **FI-2** -EdTx

Assay Designs, INC. Equipo cCAMP Directo



-IBMX (inhibidor de fosfodiesterasa) se añadió en una concentración de 50uM.

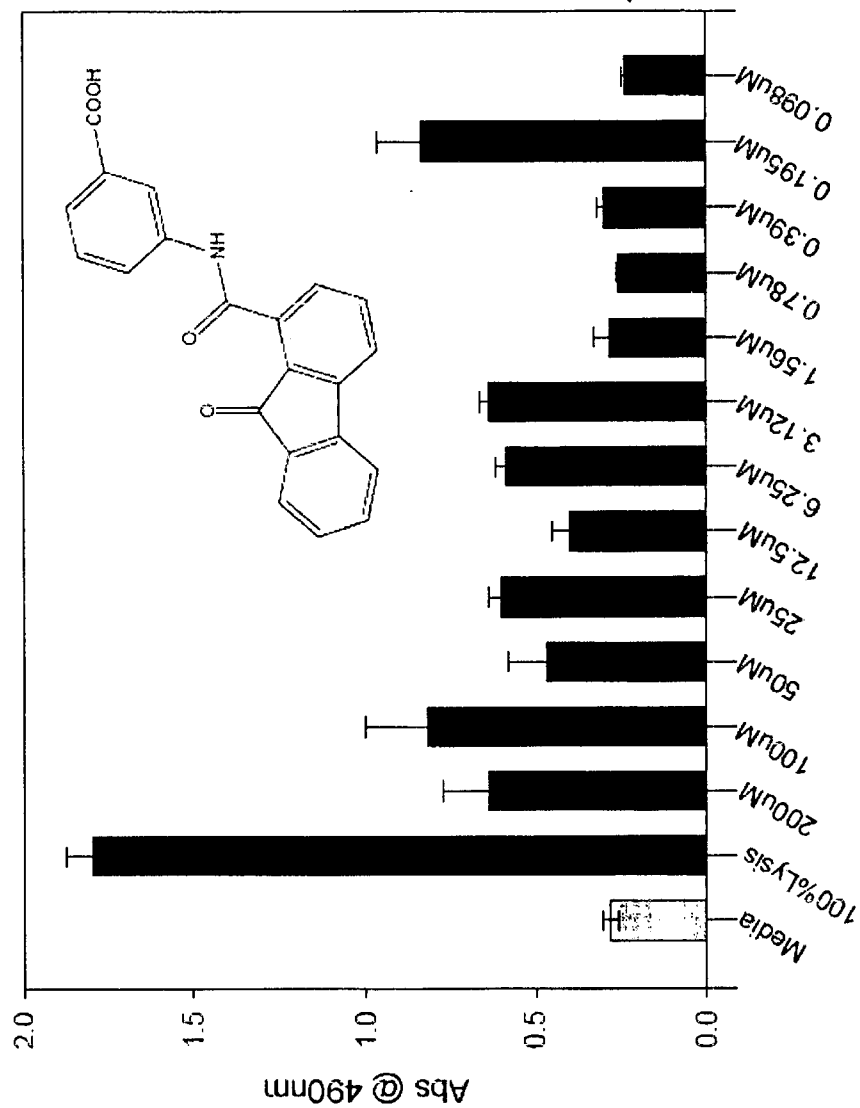
-el ST026836 era de color marrón claro y parecía tener minúsculas partículas flotando en él.

-el ST024071 era de color marrón claro y separado de la solución.

-A los compuestos se les permitió incubar con células por cuatro horas.

FIG. 30

Citotoxicidad de **FIV-50**
CytoTox 96 Equipo LDH



FIV-50

FIG. 31

Citotoxicidad de **FIII-1** (Sup)
 Citotoxicidad de **FIV-50** (Sup)
 Citotoxicidad de **FII-1** (Sup)
 CytoTox 96 Equipo LDH

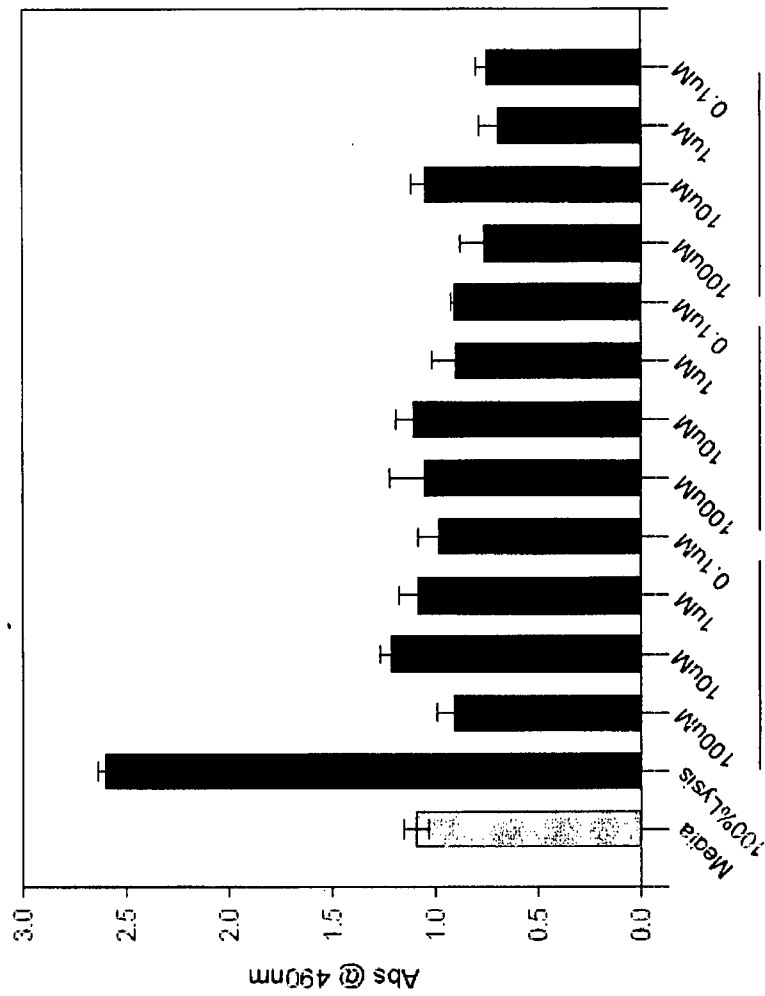


FIG. 32

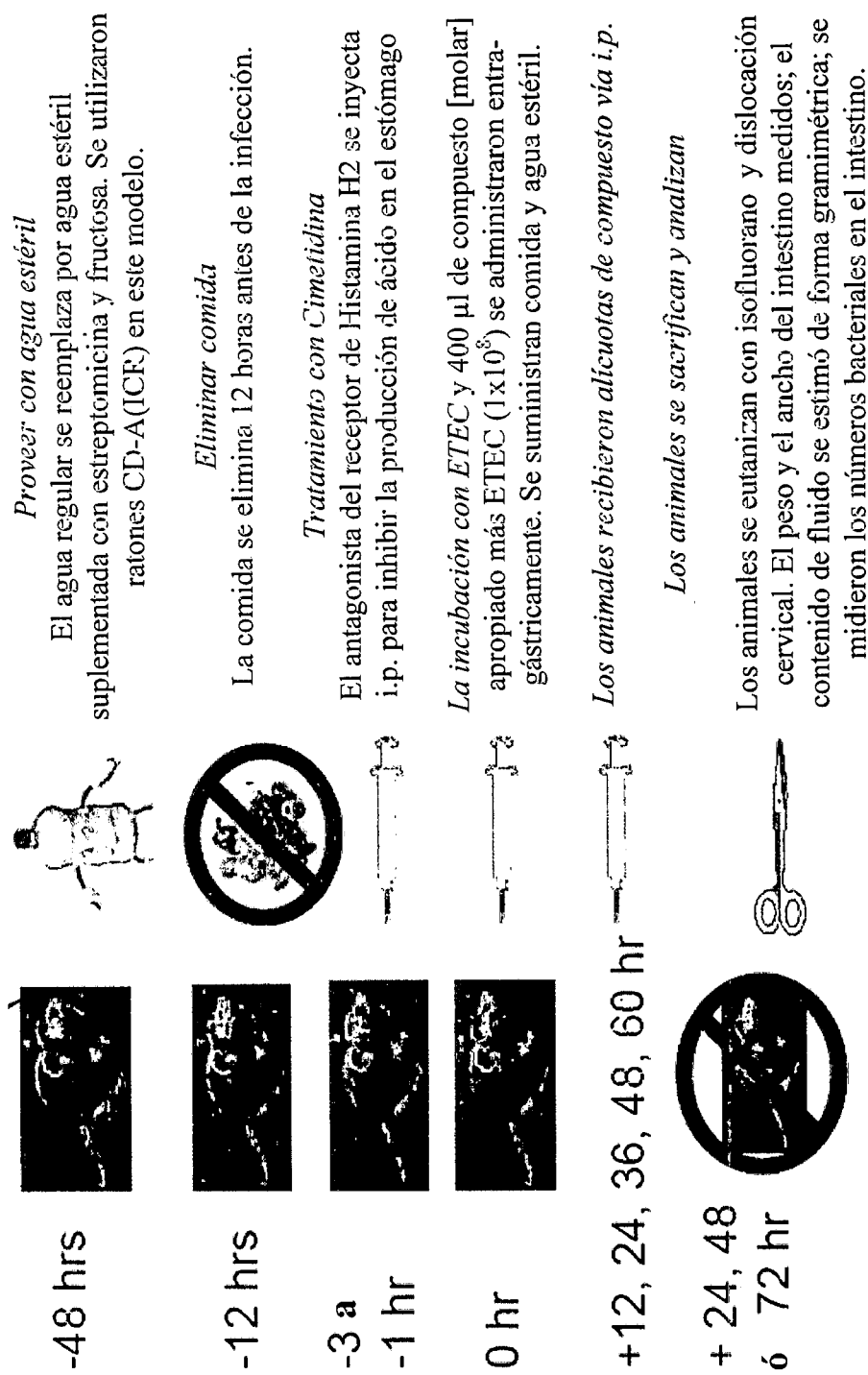


FIG. 33

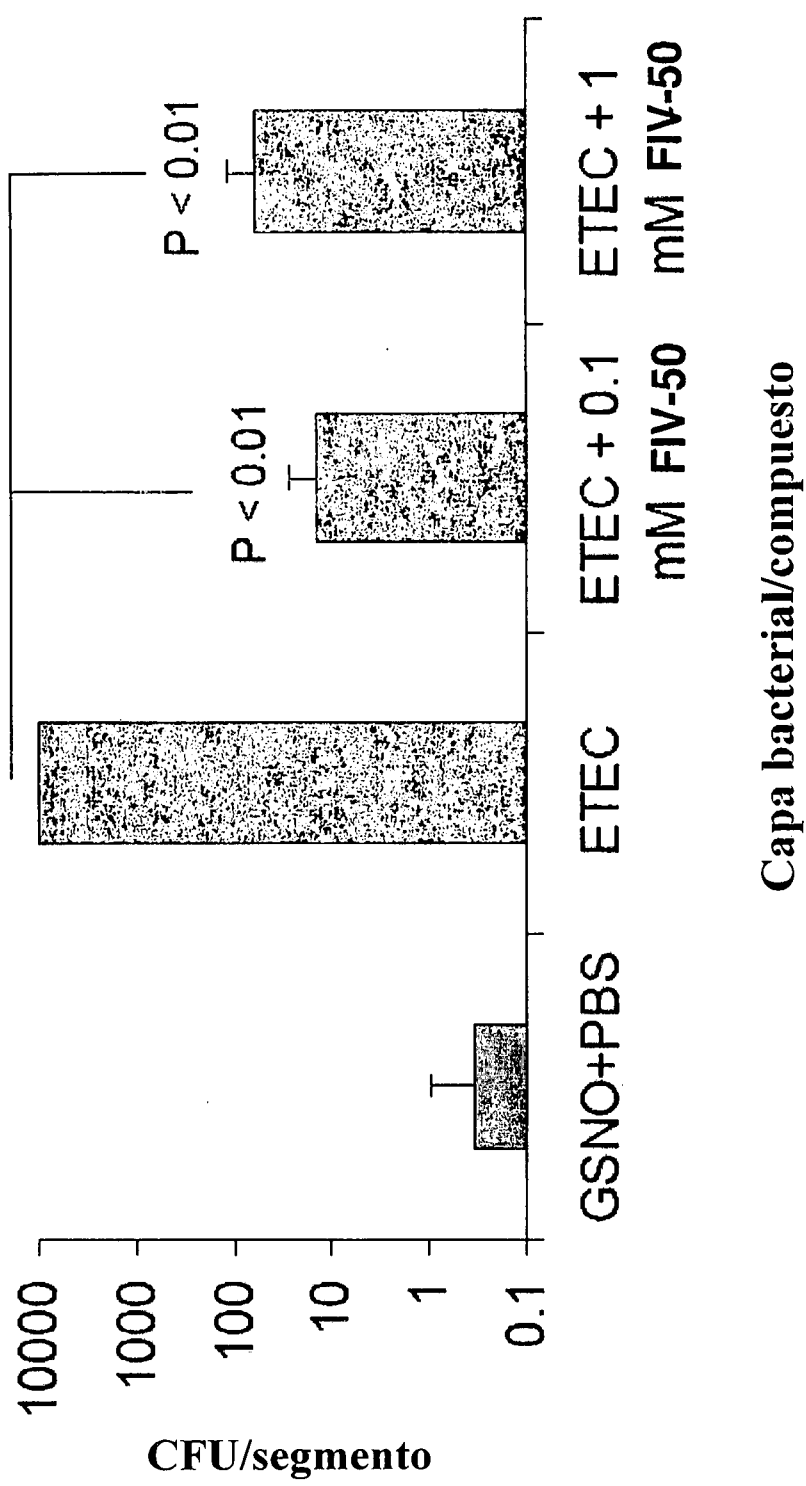


FIG. 34

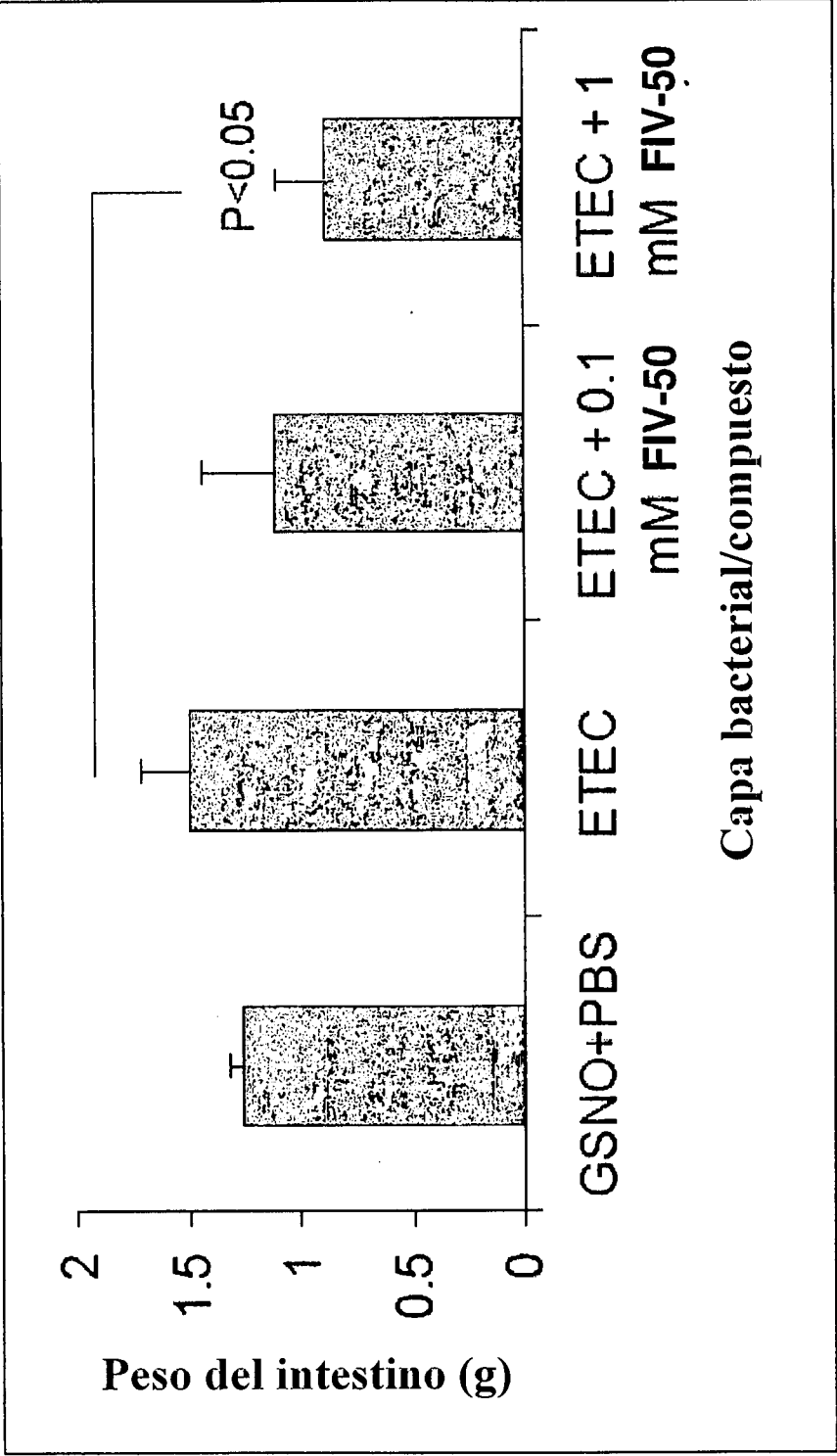
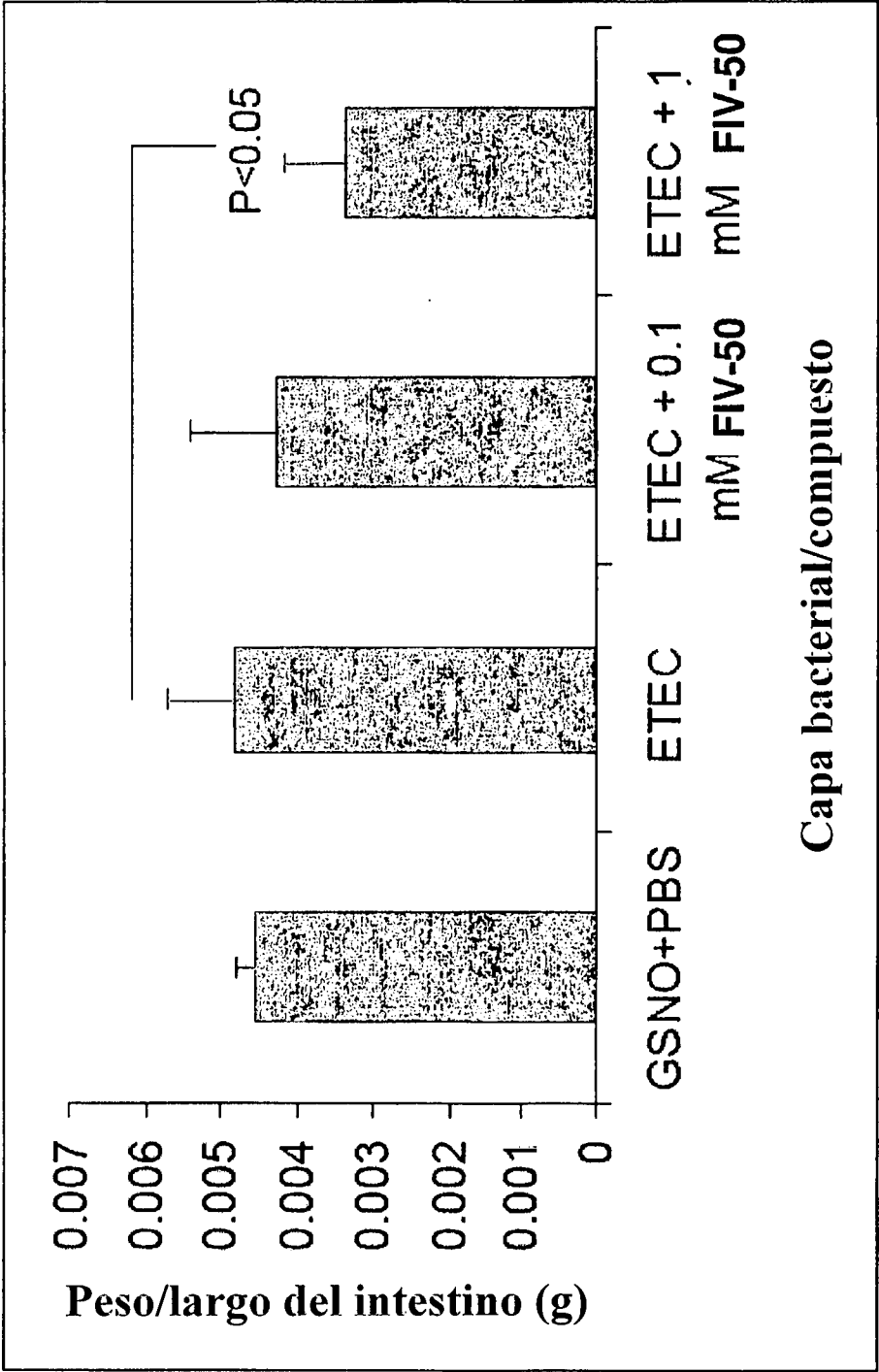


FIG. 35



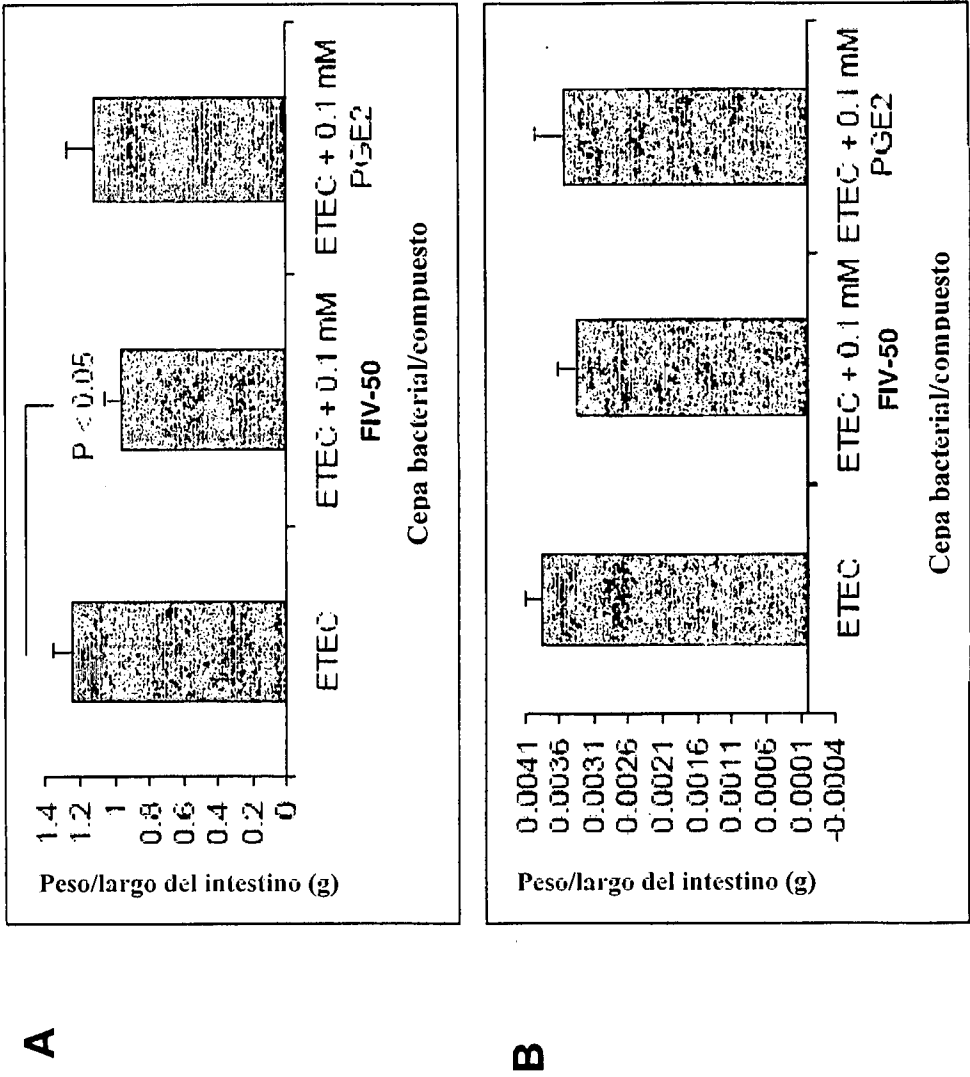


FIG. 37

Conteos de la Colonia del Rató CD1

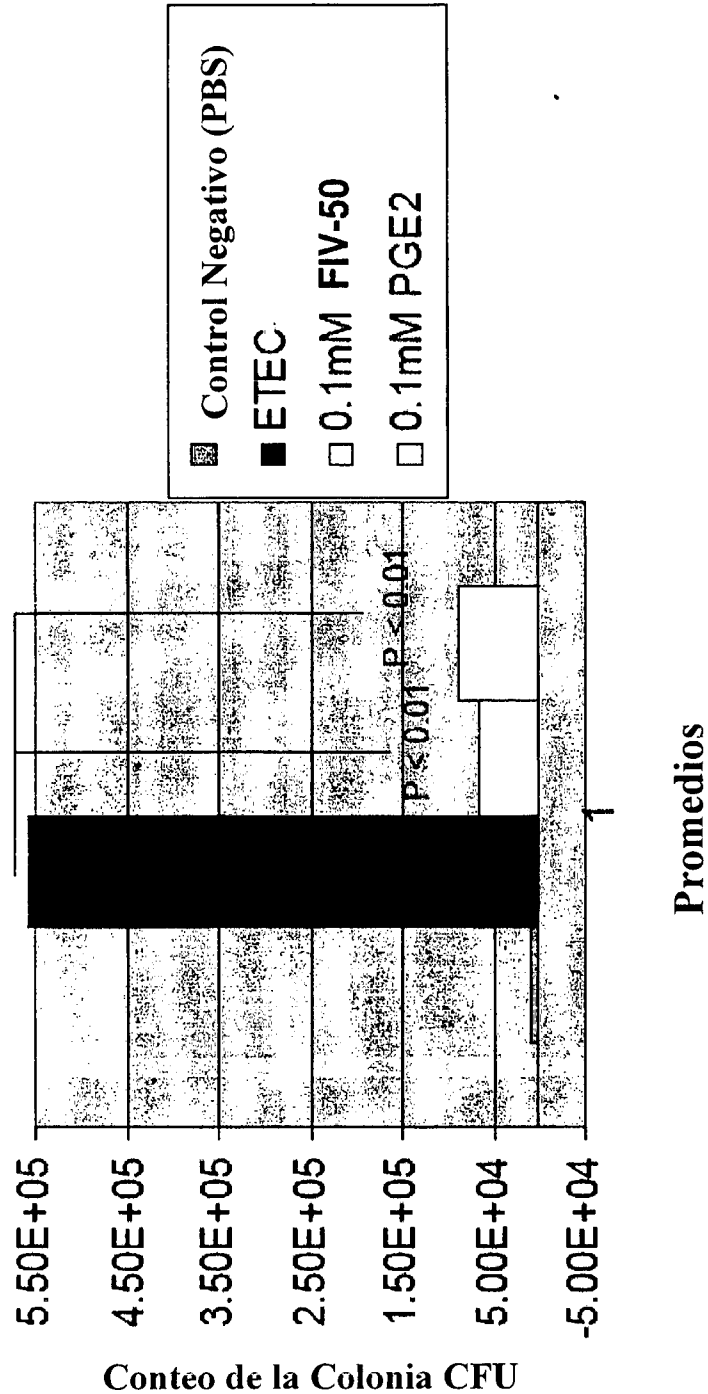


FIG. 38

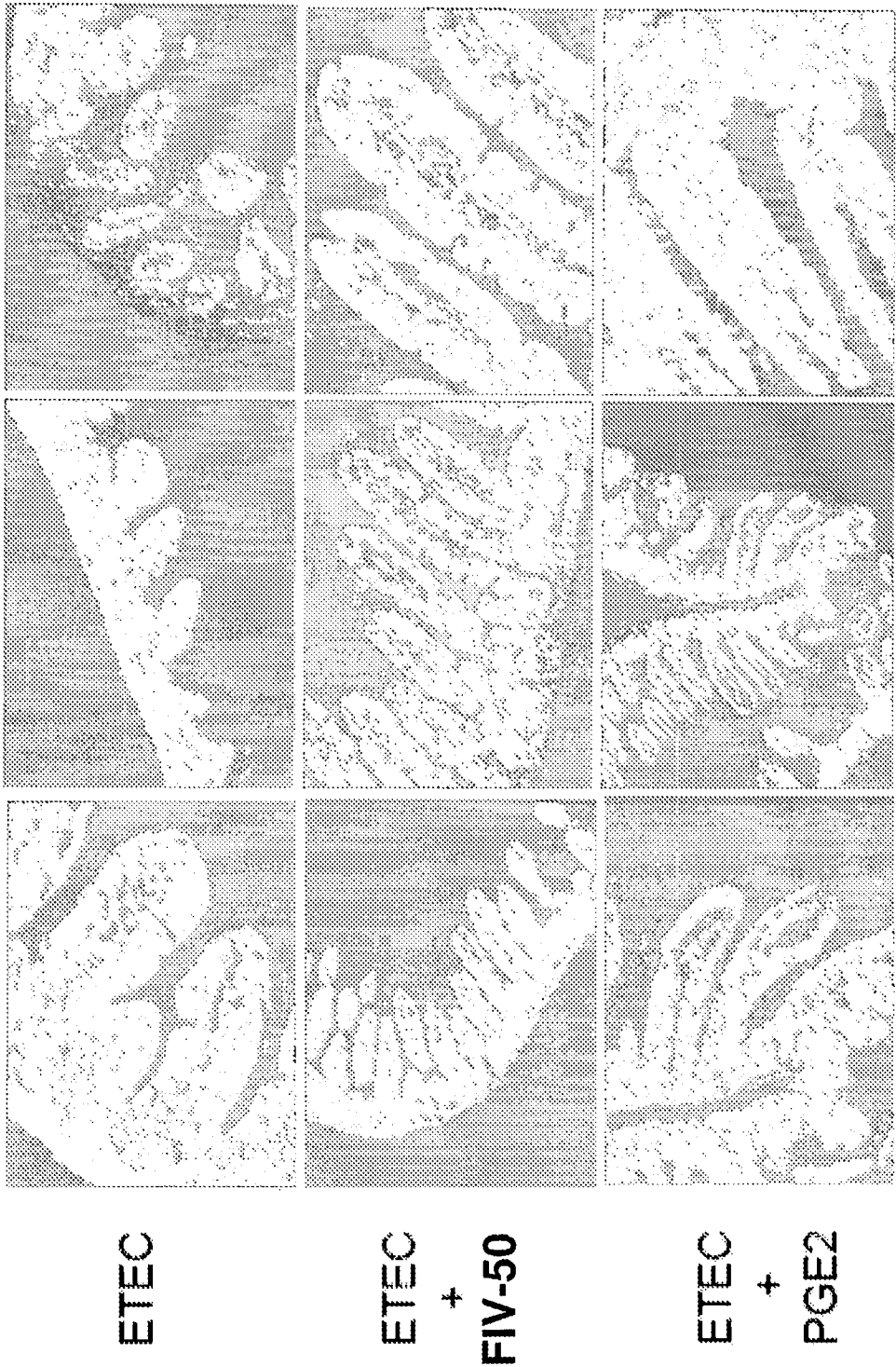


FIG. 39

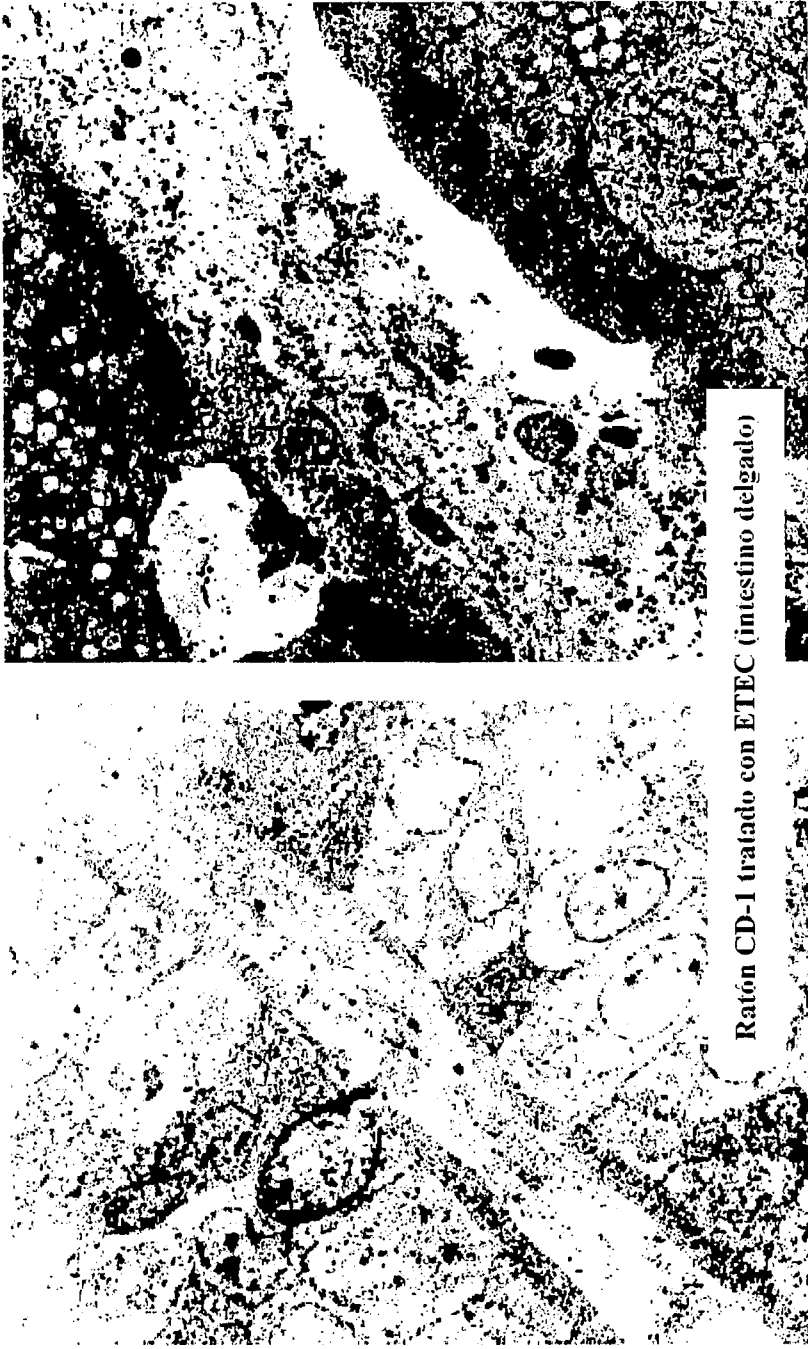


FIG. 40

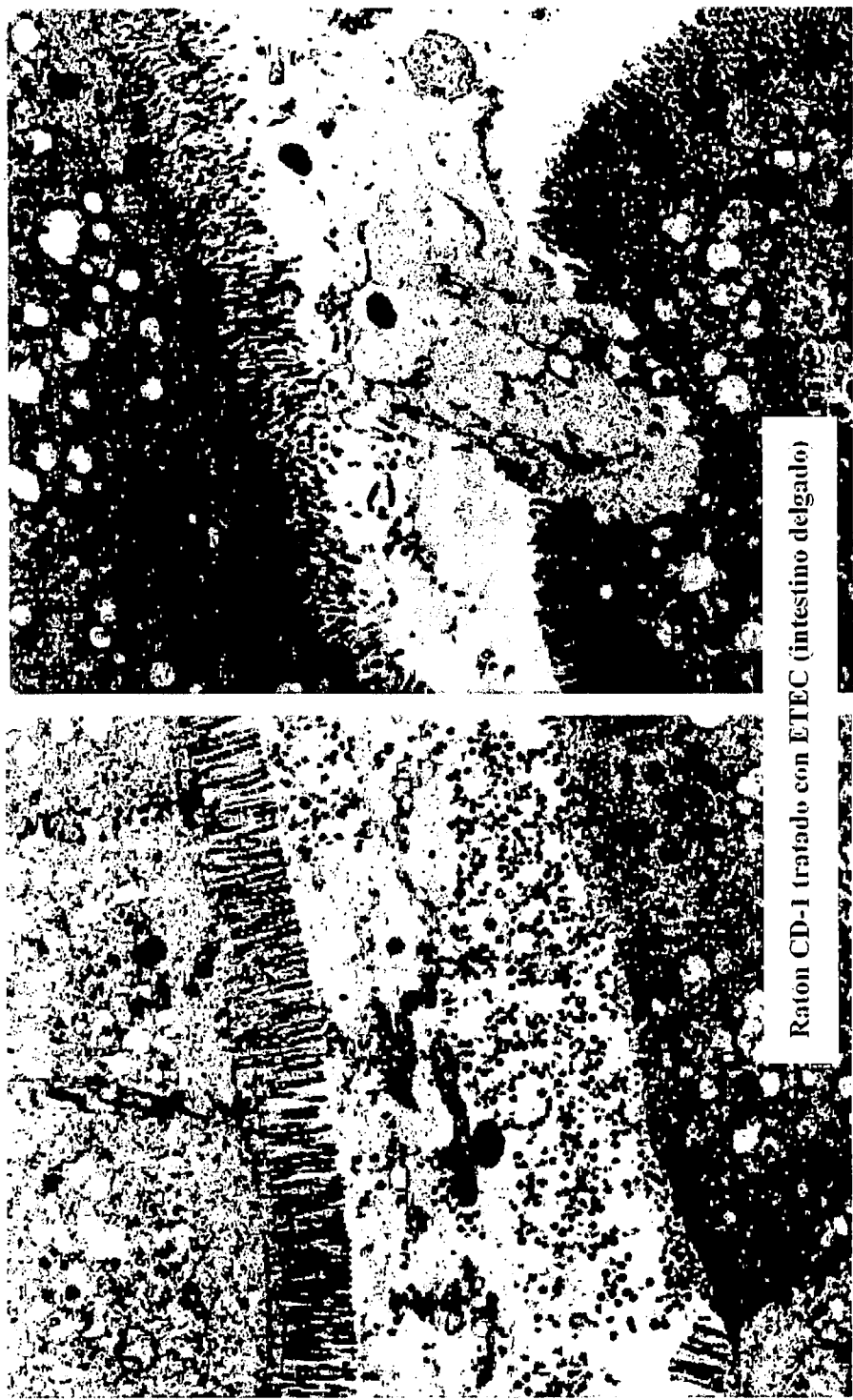
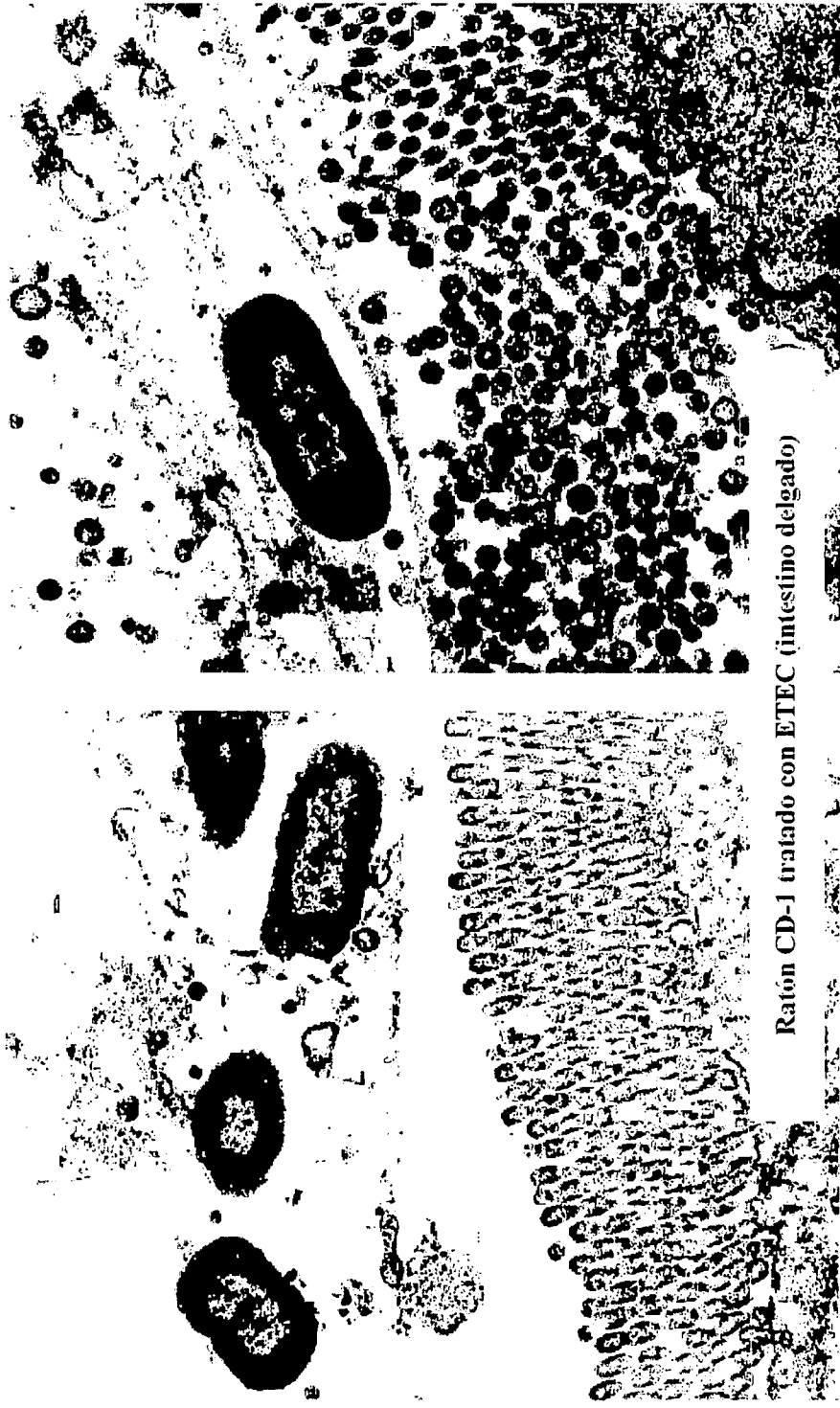


FIG. 41



Ratón CD-1 tratado con ETEC (intestino delgado)

FIG. 42

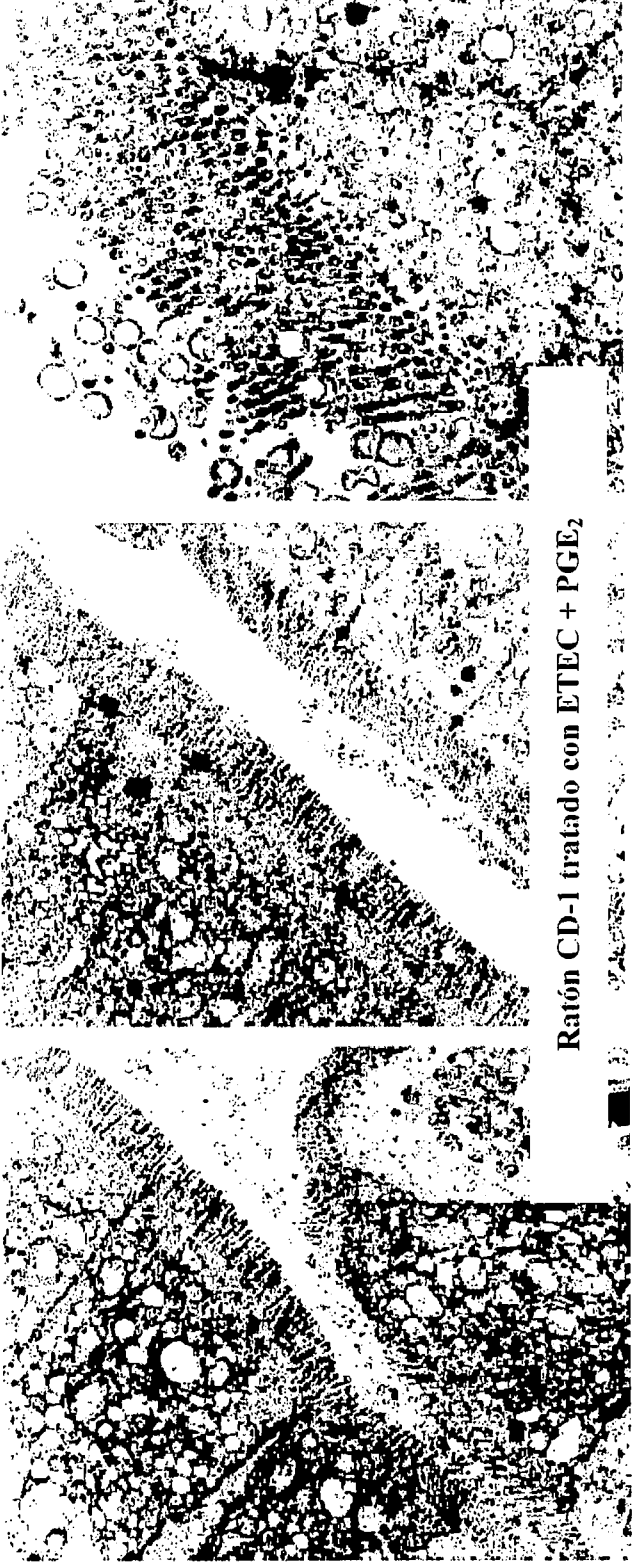
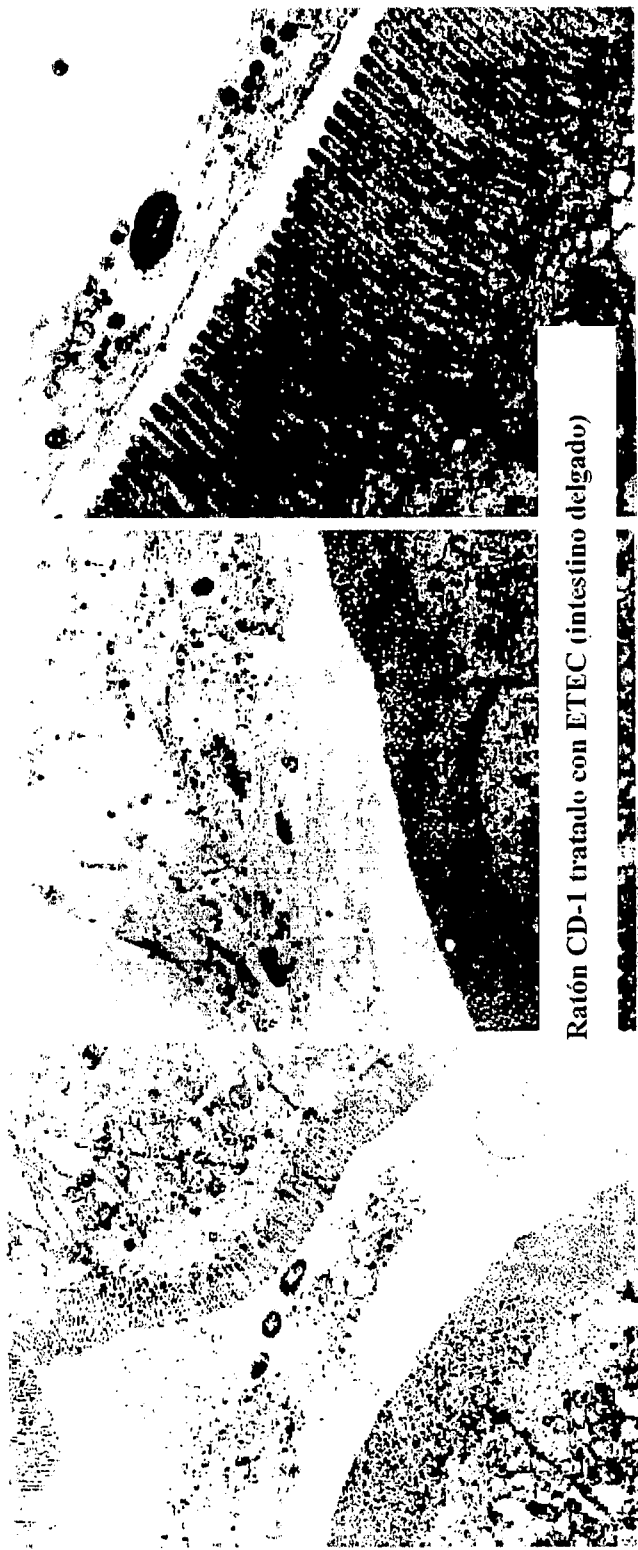
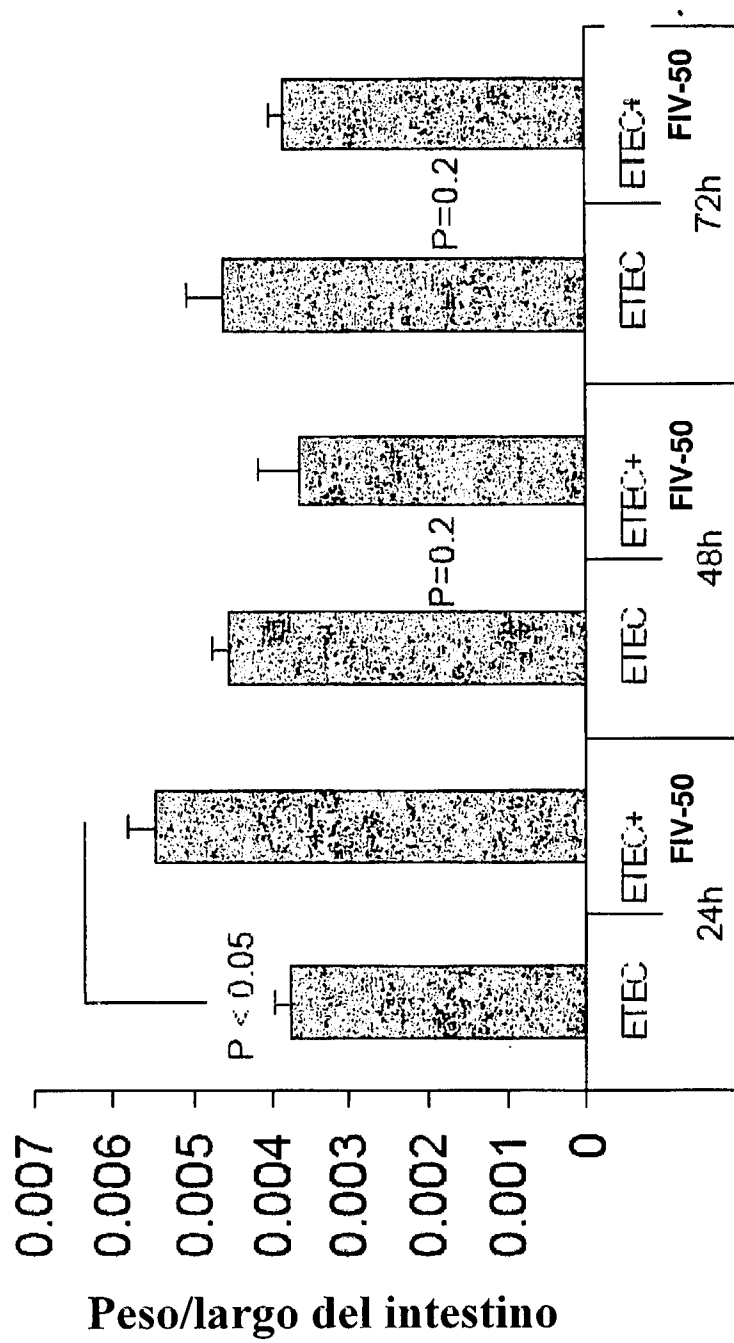


FIG. 43



Ratón CD-1 tratado con ETEC (intestino delgado)

FIG. 44



Capa bacterial/compuesto

FIG. 45

Adaptación del Ratón 72 Horas						
		CFU x 10 ⁻²	CFU x 10 ⁻³	CFU x 10 ⁻⁴	CFU x 10 ⁻⁵	Promedio
ETEC	M9	TNTC	TNTC	TNTC	260	
ETEC	M10	TNTC	TNTC	TNTC	58	
ETEC	M11	TNTC	TNTC	57	13	
ETEC	M12	TNTC	TNTC	TNTC	105	1.09E+08
		CFU x 10 ⁻¹	CFU x 10 ⁻²	CFU x 10 ⁻³	Promedio	
FIV-50	M13	TNTC	TNTC	1760		
FIV-50	M14	TNTC	TNTC	768		
FIV-50	M15	TNTC	TNTC	1424		
FIV-50	M16	TNTC	TNTC	1440	1.35E+06	

(TNTC = Numeroso para cambiar) (M9, M10, etc. = Número de ratón

FIG. 46

Tiempo de Supervivencia del Ratón CD-1

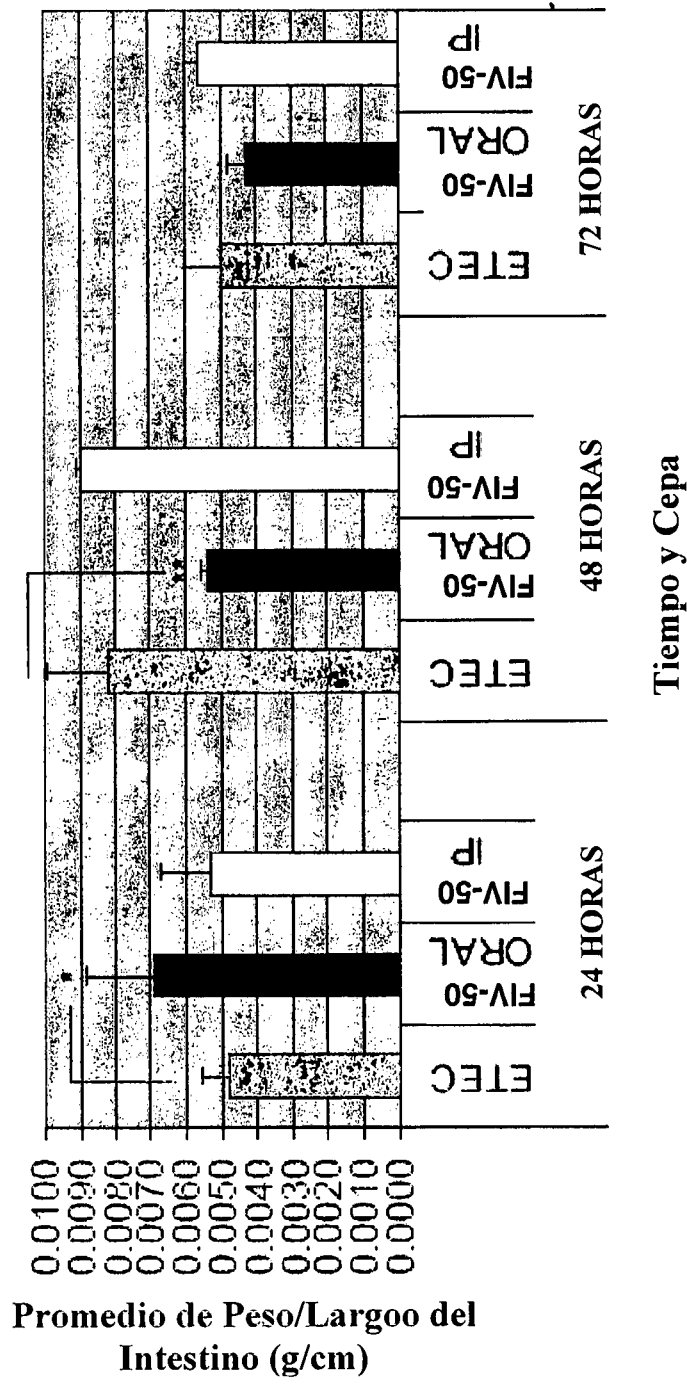


FIG. 47

Índice de Crecimiento LB

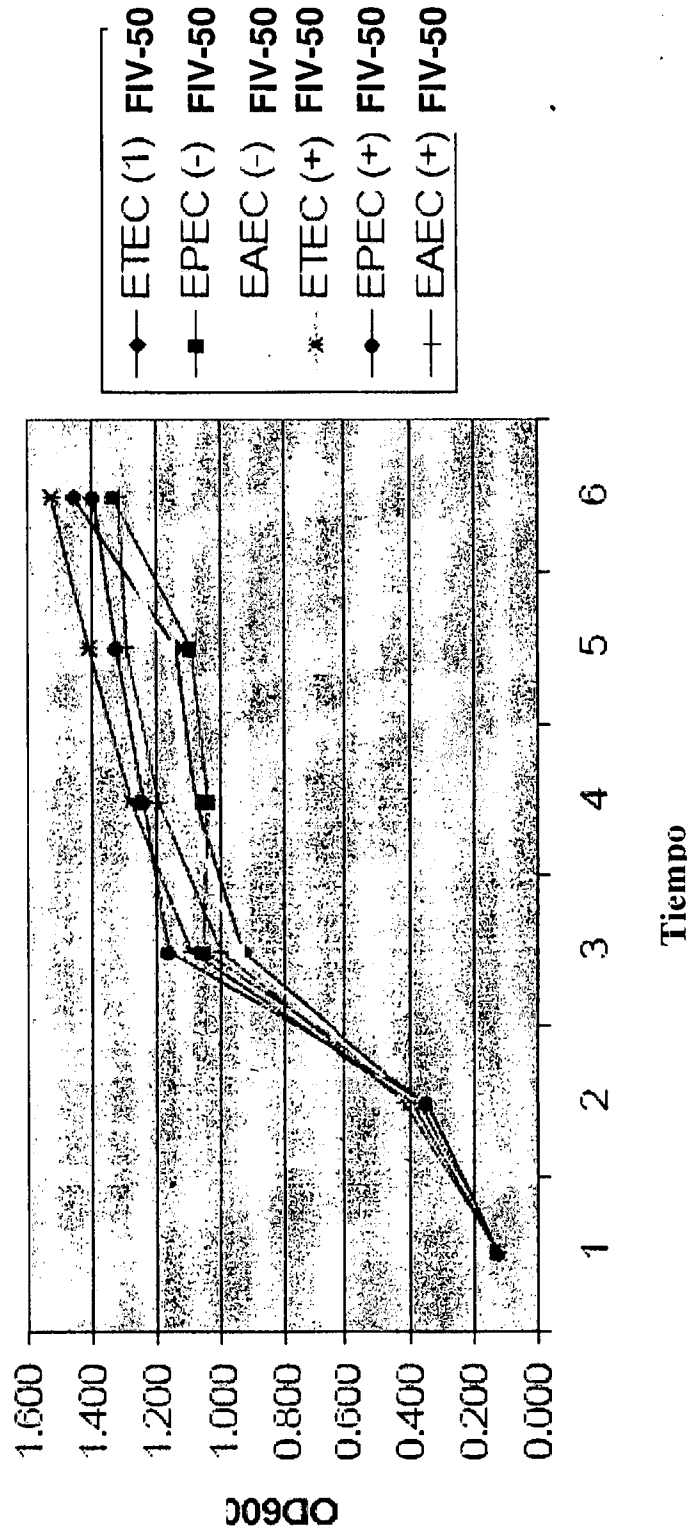


FIG. 48

Índice de Crecimiento LB

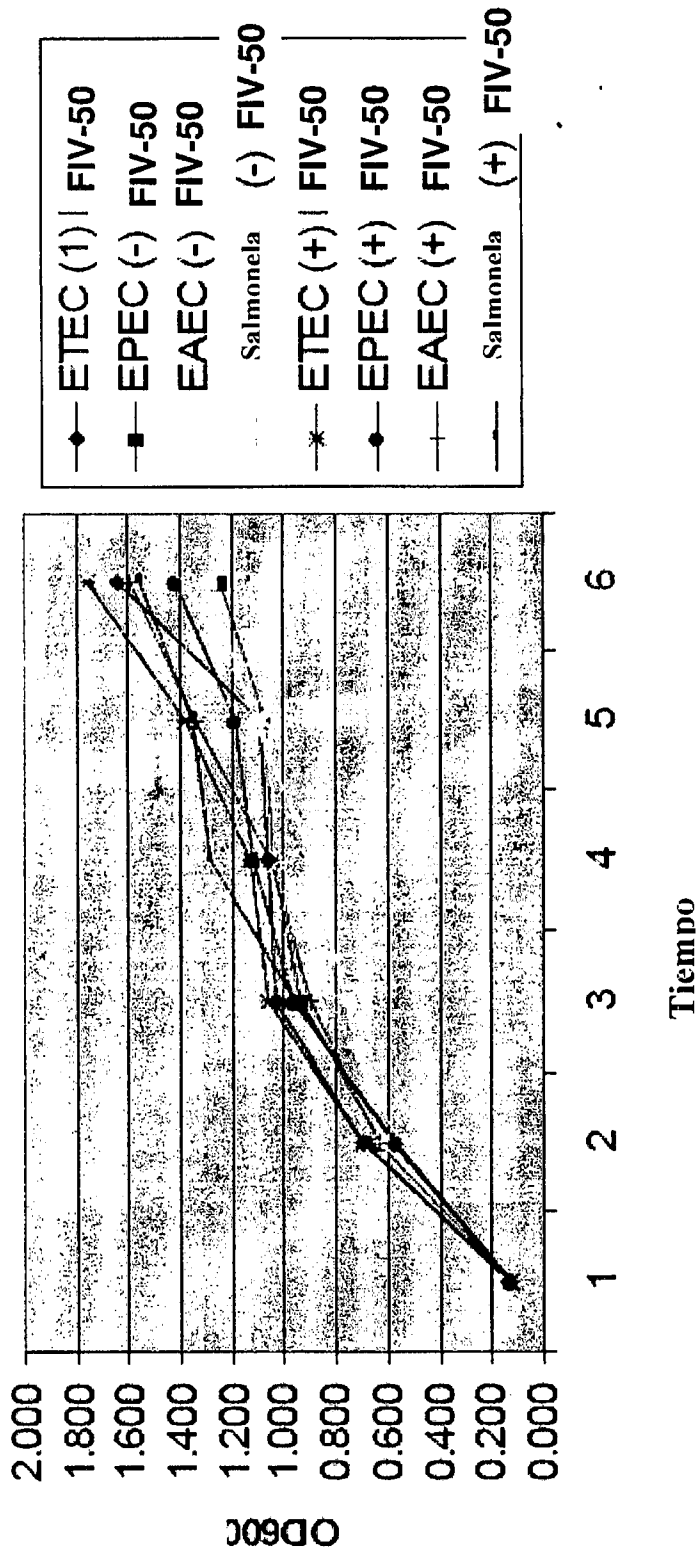
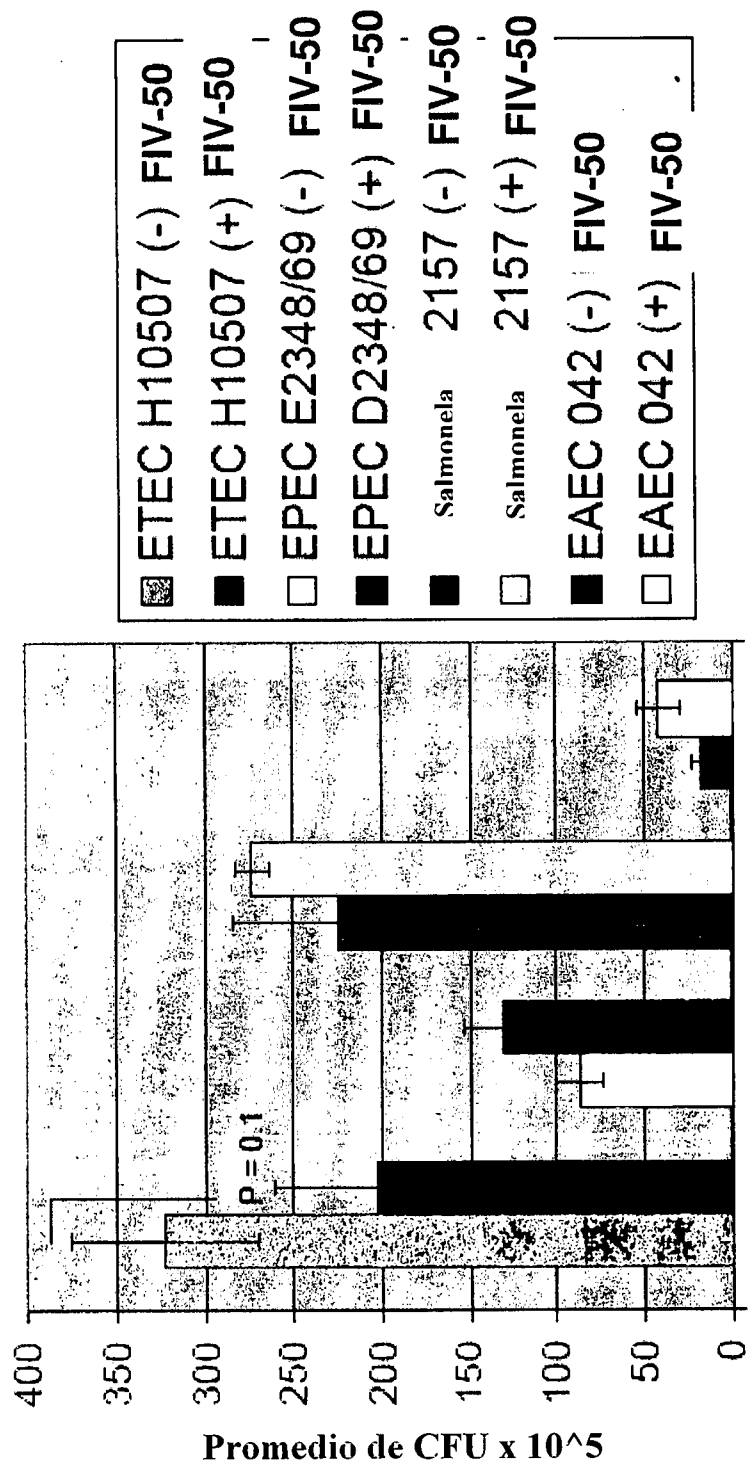
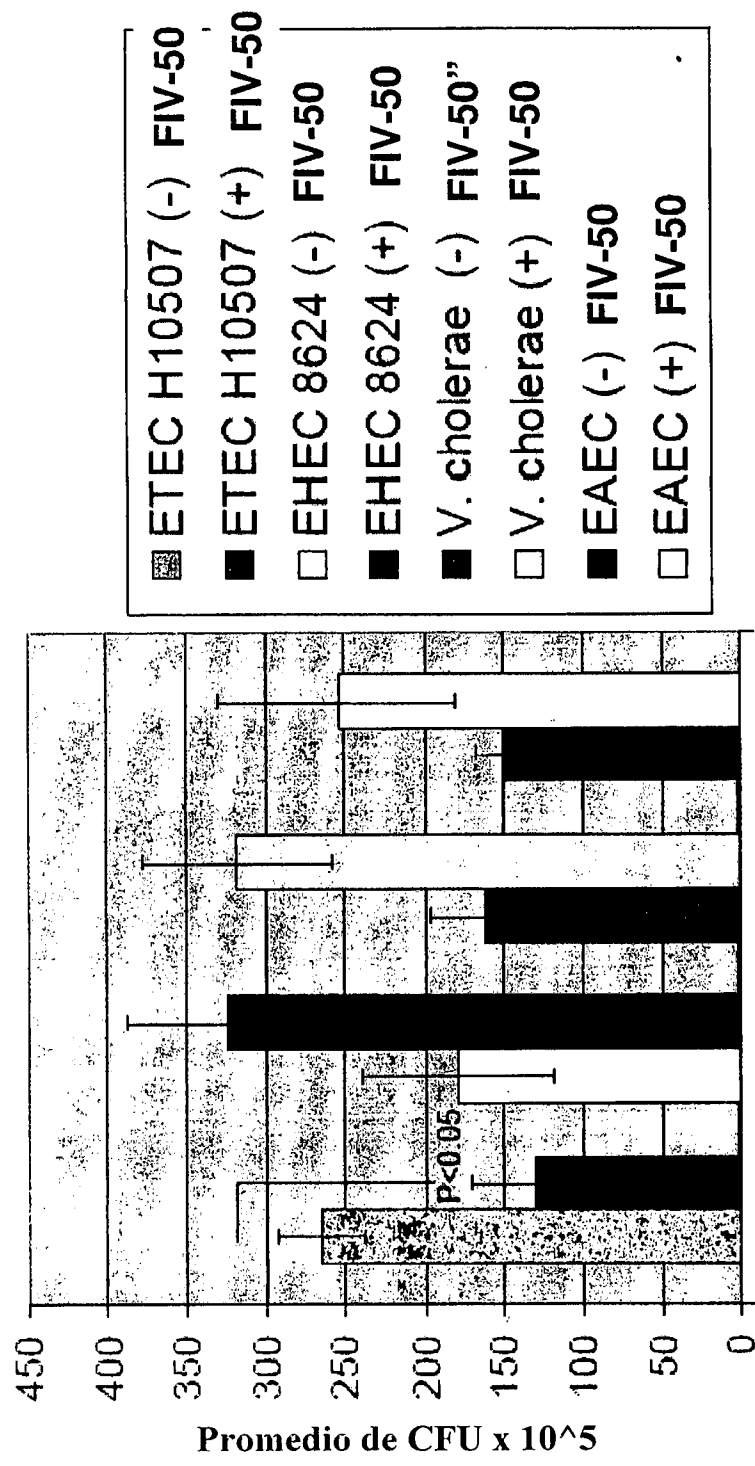


FIG. 49



Cepas Bacteriales

FIG. 50



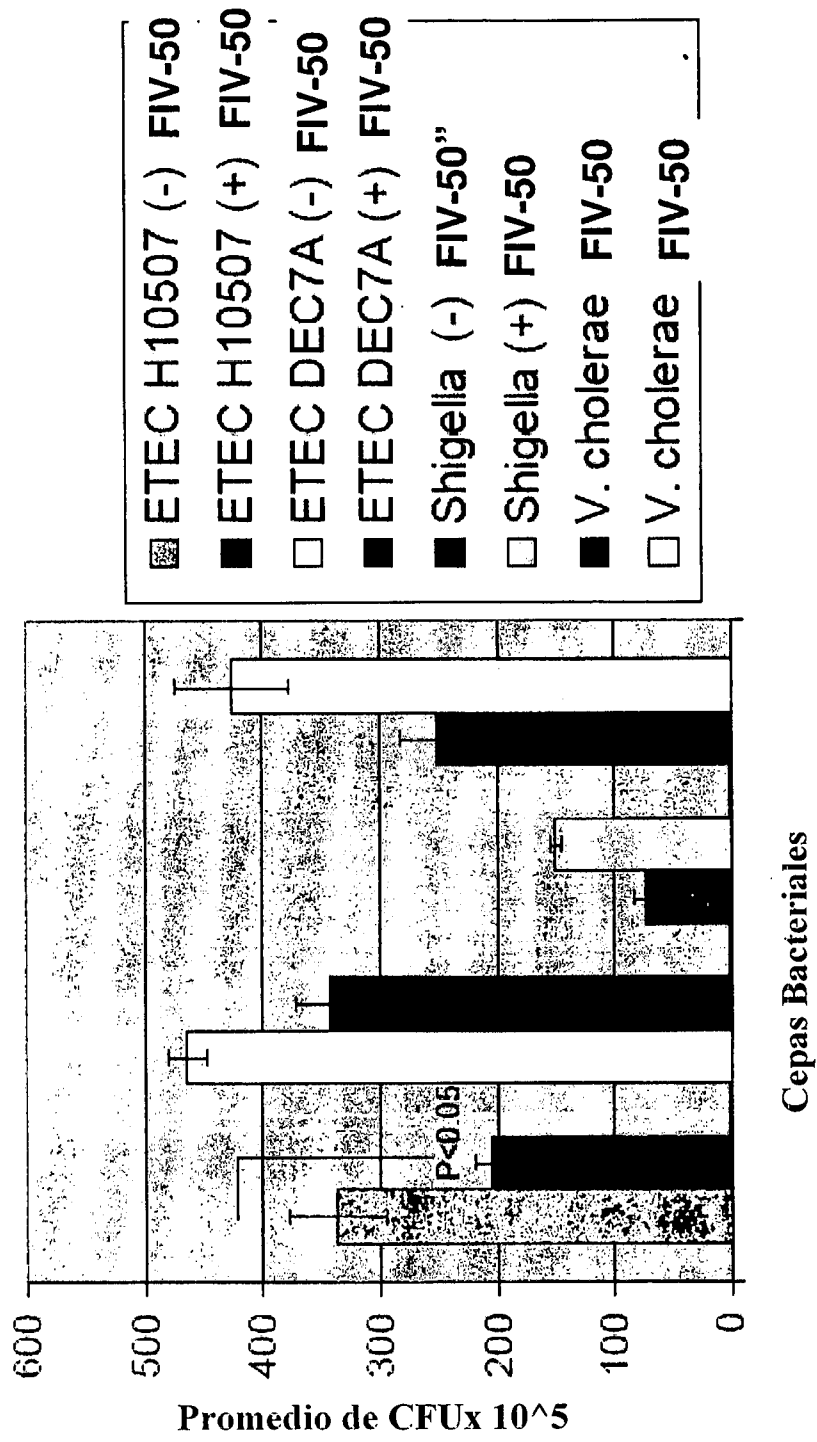


FIG. 52

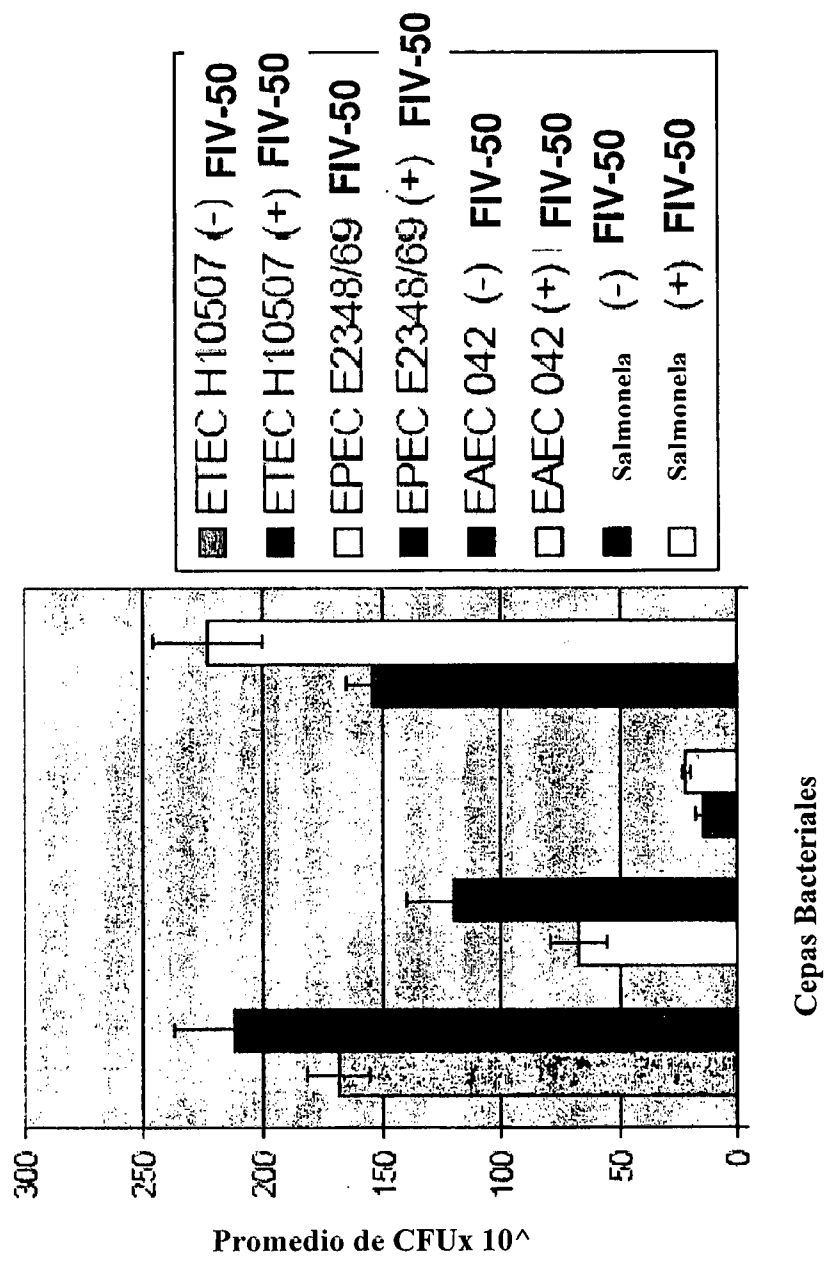


FIG. 53

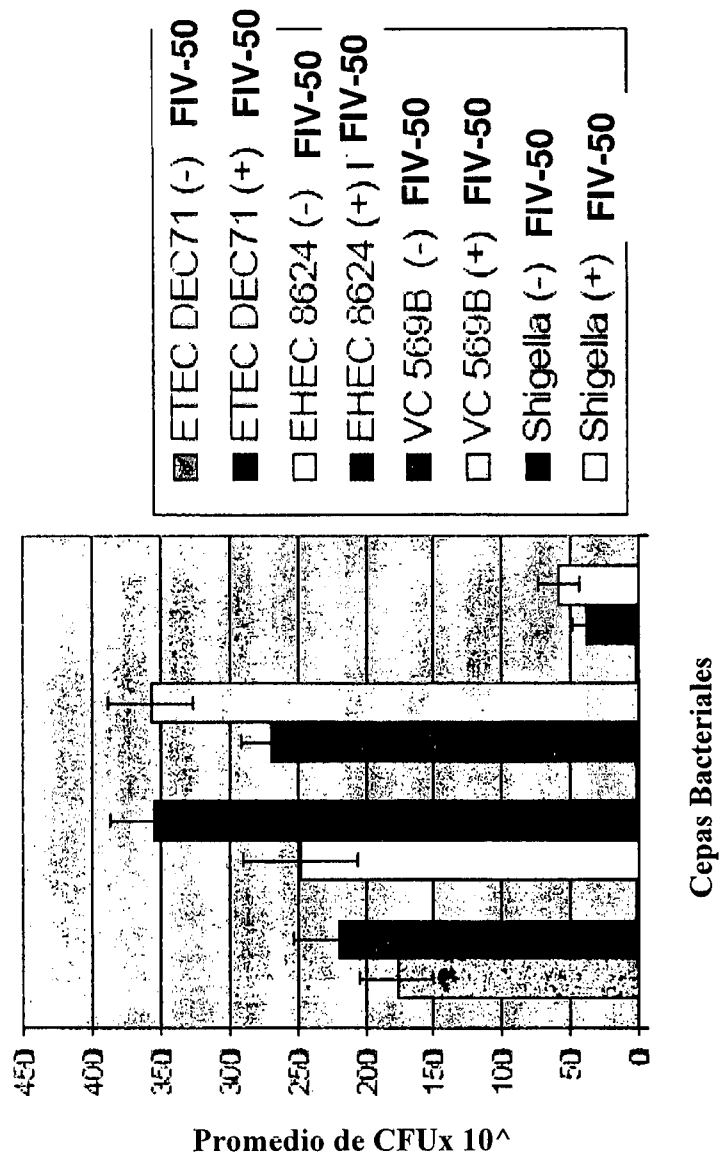


FIG. 54

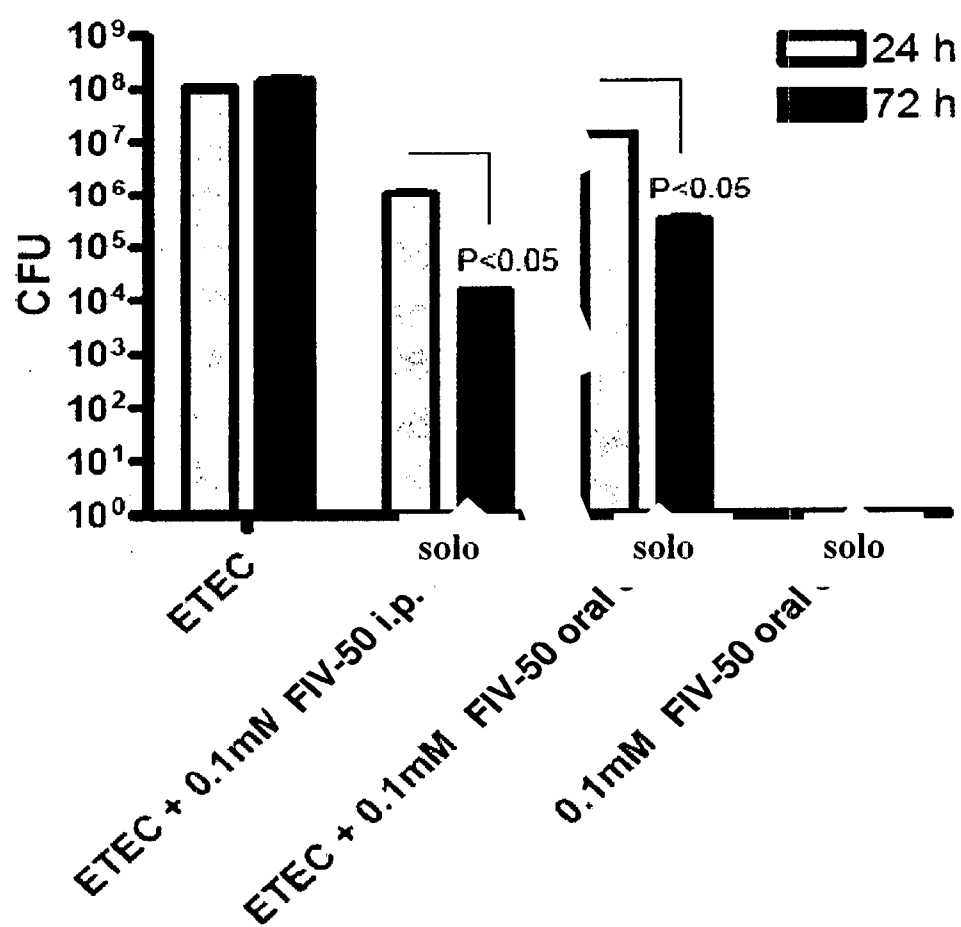


FIG. 55

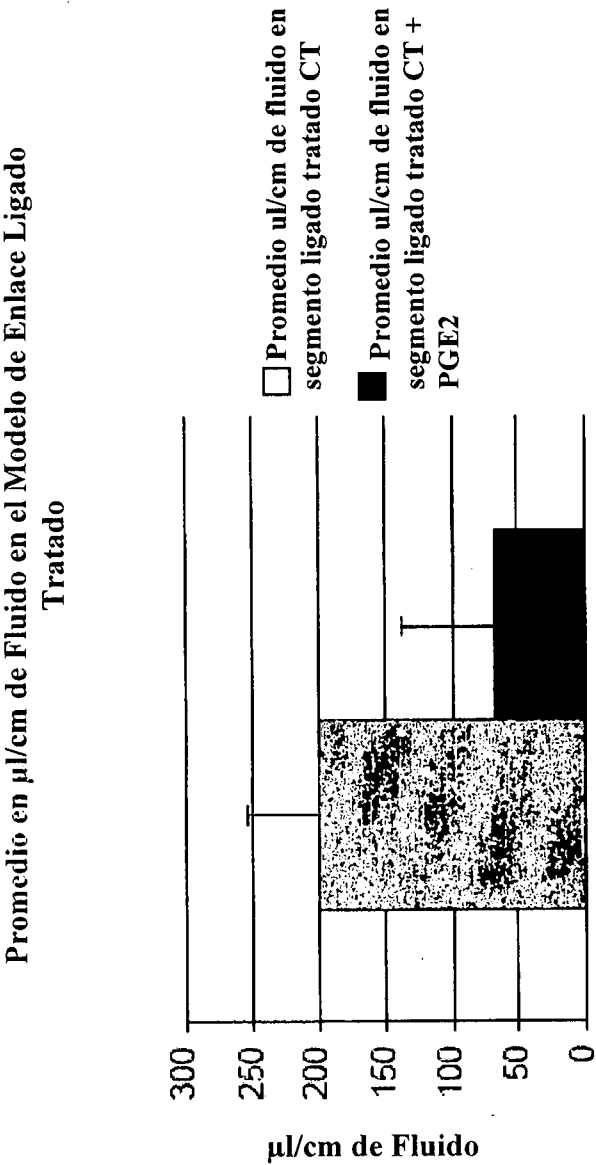
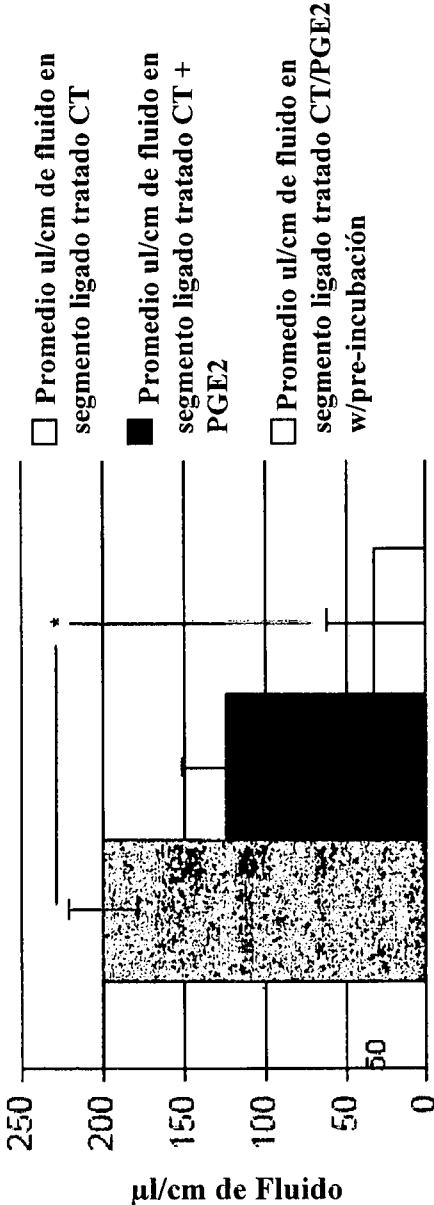


FIG. 56

Promedio $\mu\text{l}/\text{cm}$ de Fluido en el Modelo de Enlace Ligado Tratado



* $P < 0.01$ (prueba t) (3 animales tratados con CT; 3 animales tratados con CT+PGE2; 4

FIG. 57

Promedio $\mu\text{l}/\text{cm}$ de Fluido en el Modelo de Enlace Ligado Tratado

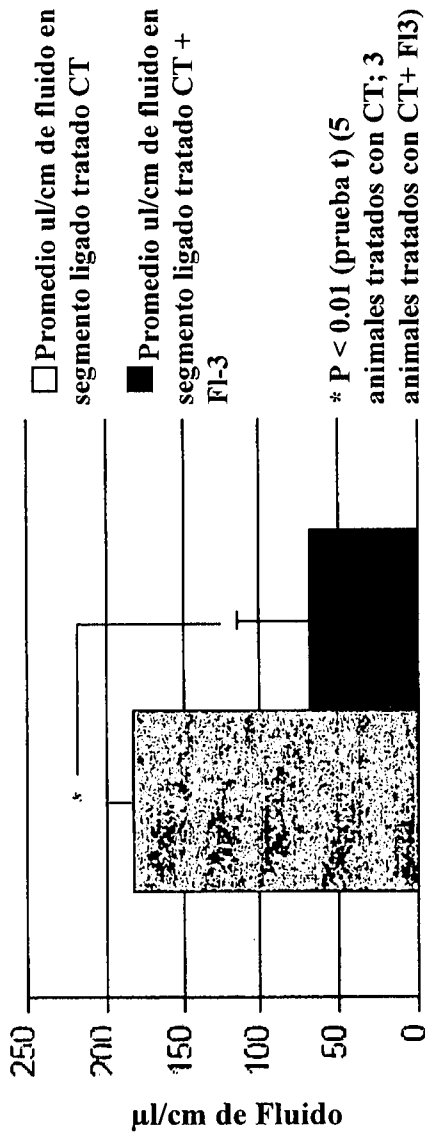
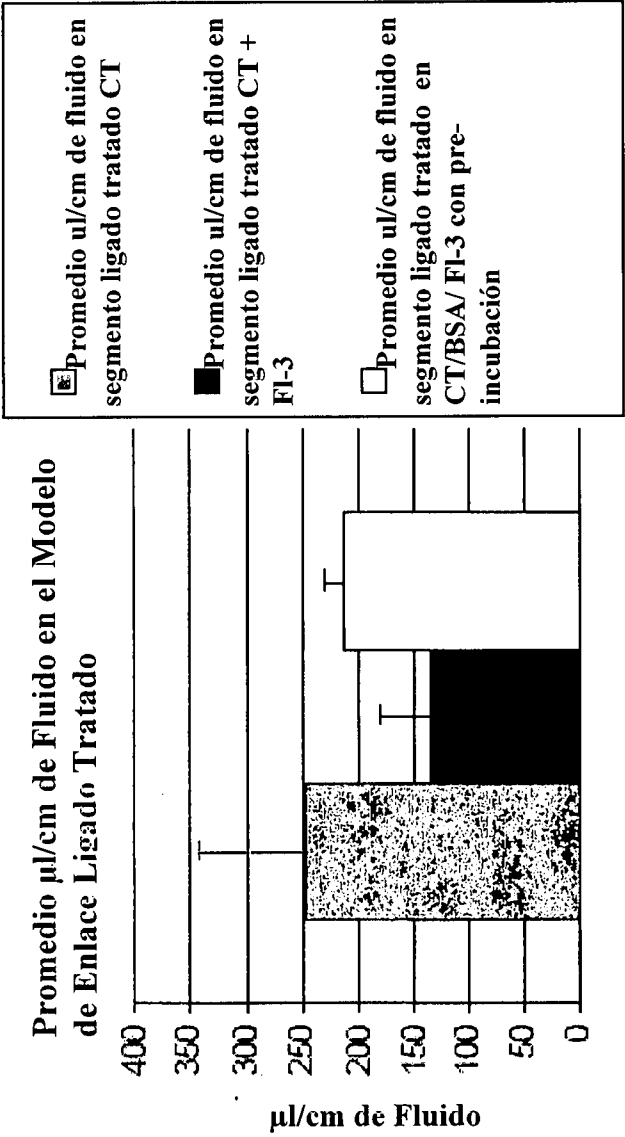


FIG. 58



* $P > 0.05$ (3 animales por grupo de tratamiento)

FIG. 59

Promedio $\mu\text{l}/\text{cm}$ de Fluido en el Modelo de Enlace Ligado Tratado



* $P < 0.01$ (prueba t) (4 animales tratados con CT; 3 animales tratados con CT+MEJ196; 2 animales tratados 1% DMSO)

FIG. 60

Promedio $\mu\text{l}/\text{cm}$ de Fluido en el Modelo de Enlace Ligado Tratado

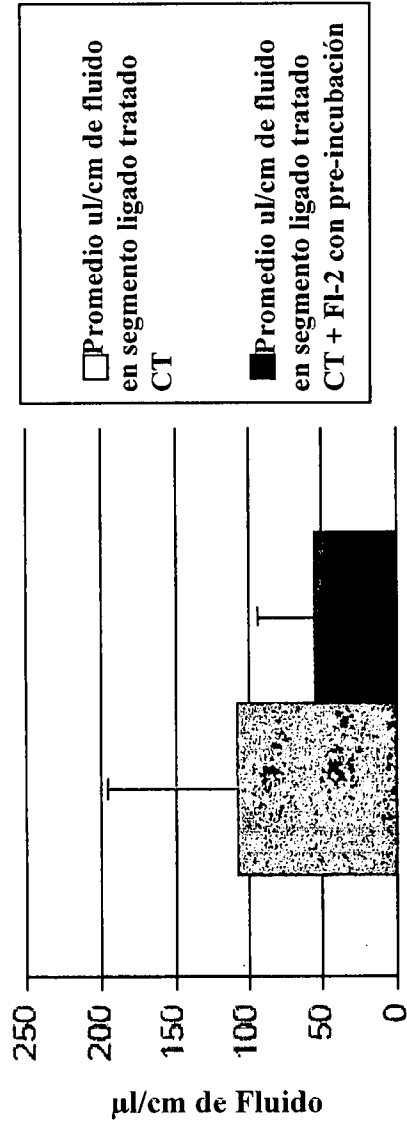


FIG. 61

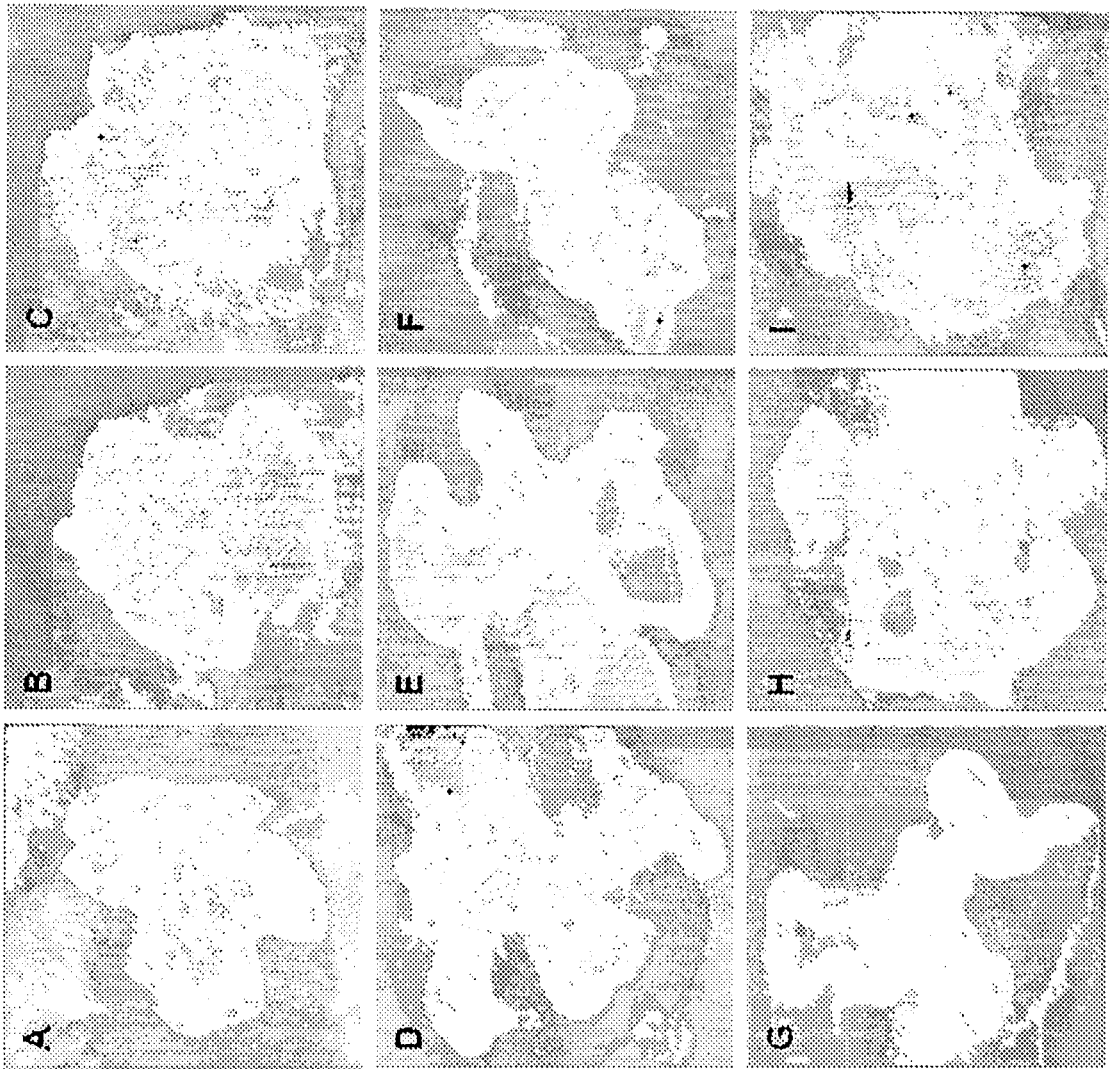


FIG. 62

Promedio $\mu\text{l}/\text{cm}$ de Fluido en el Modelo de Enlace Ligado Tratado

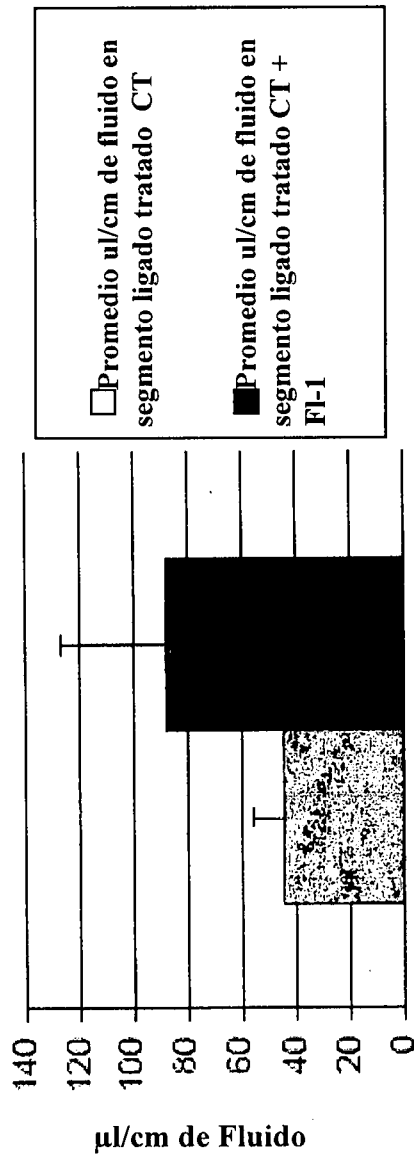


FIG. 63

Promedio $\mu\text{l}/\text{cm}$ de Fluido en el Modelo de Enlace Ligado Tratado

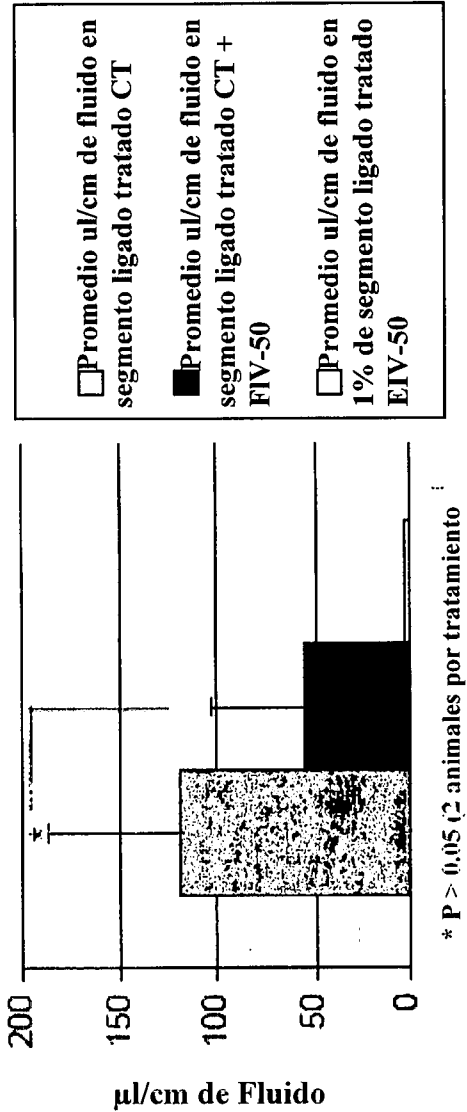


FIG. 64

Promedio $\mu\text{l}/\text{cm}$ de Fluido en el Modelo de Enlace Ligado Tratado

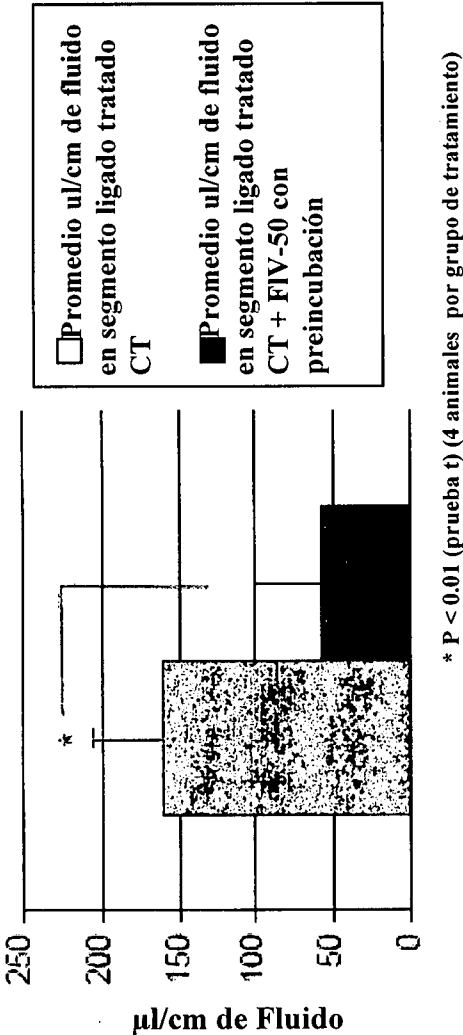


FIG. 65

Promedio $\mu\text{l/cm}$ de Fluido en el Modelo de Enlace Ligado Tratado

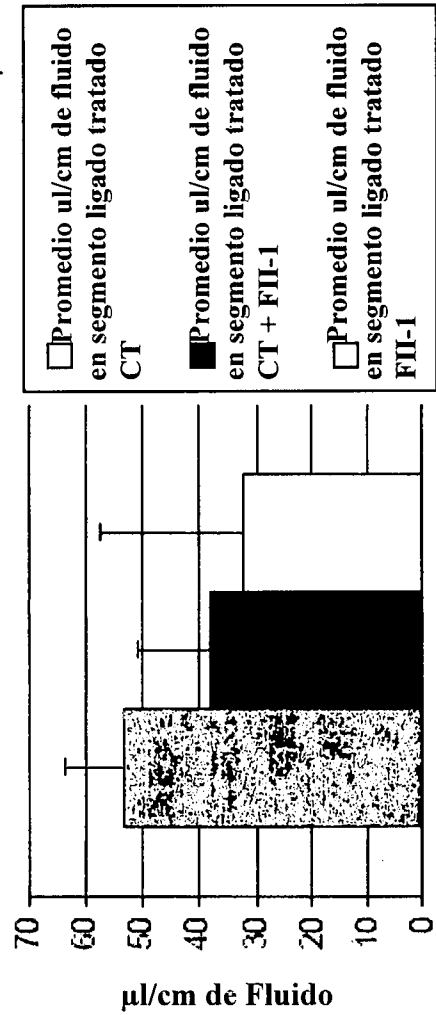


FIG. 66

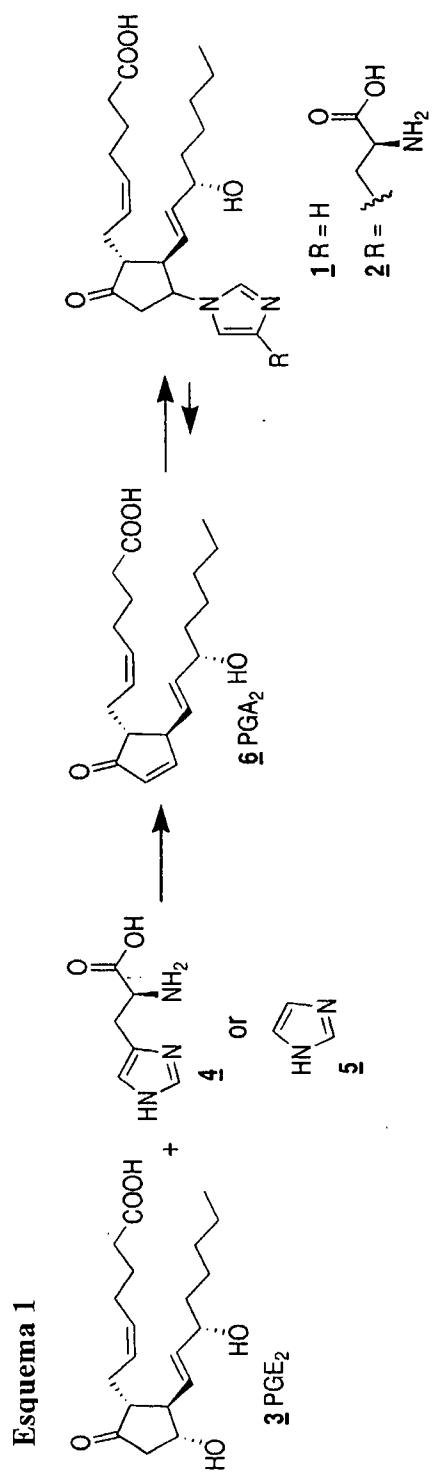


FIG. 67

Esquema 2

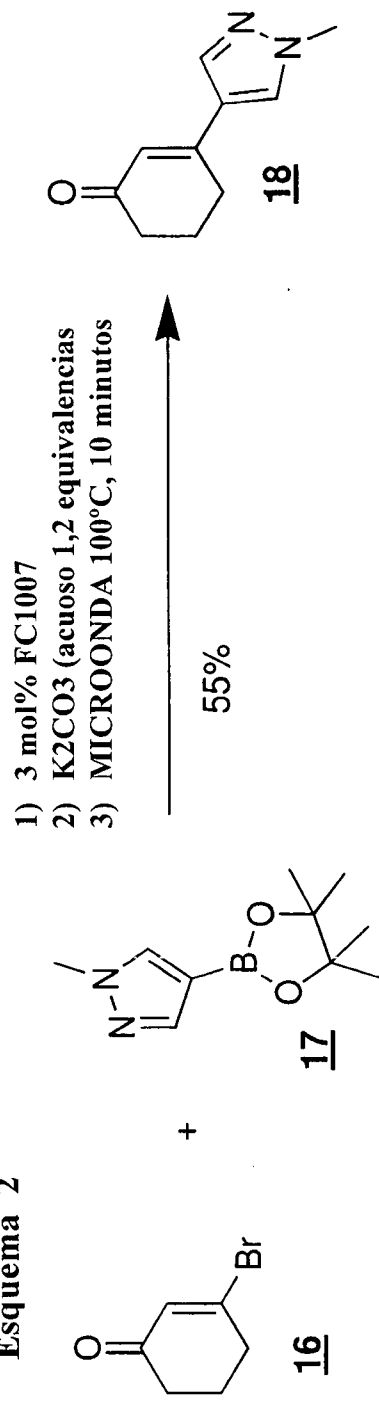


FIG. 68

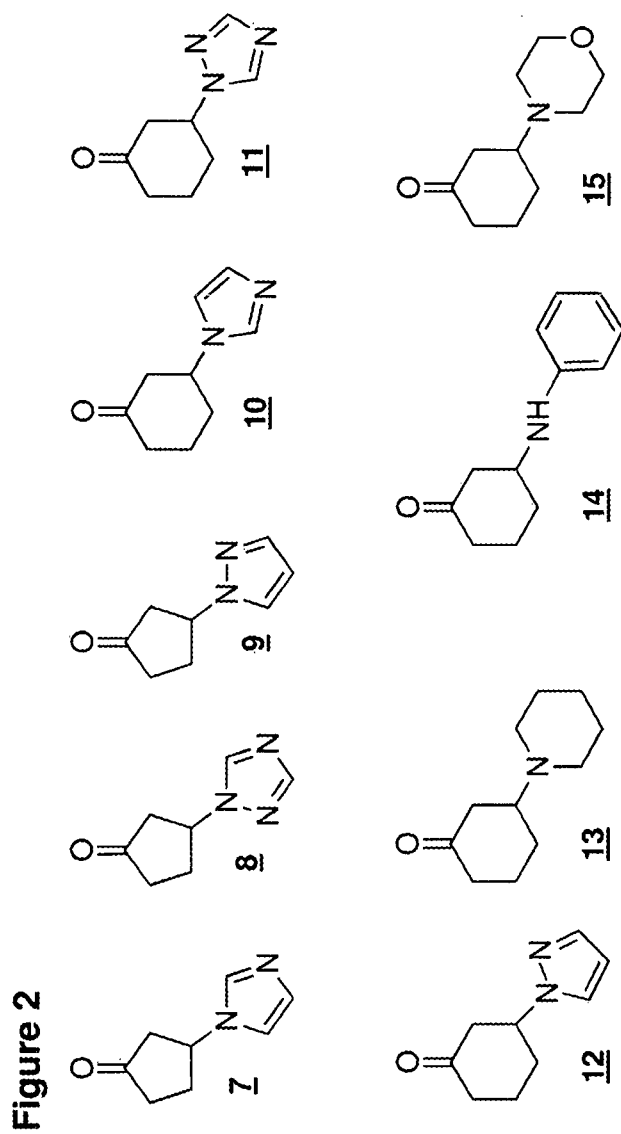


FIG. 69

Figura 1

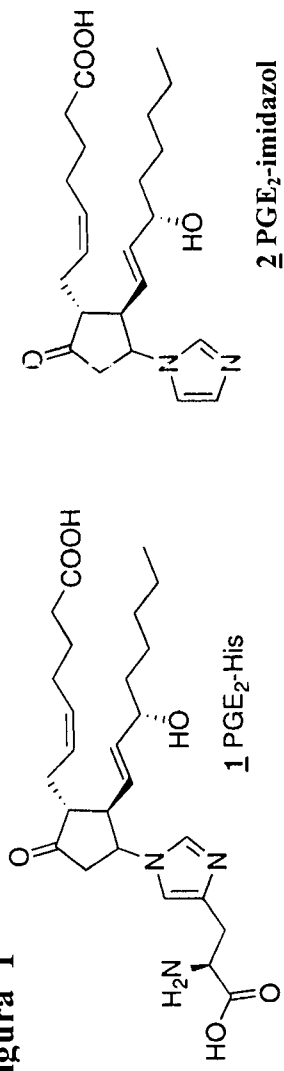


FIG. 70

Esquema 3

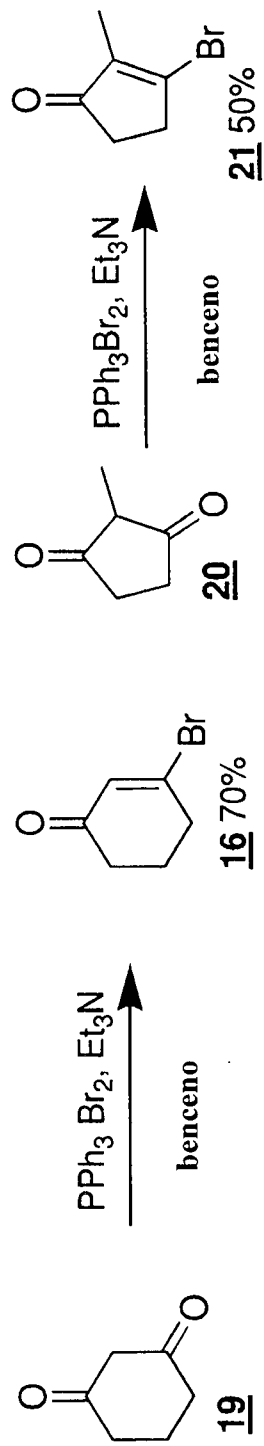


FIG. 71

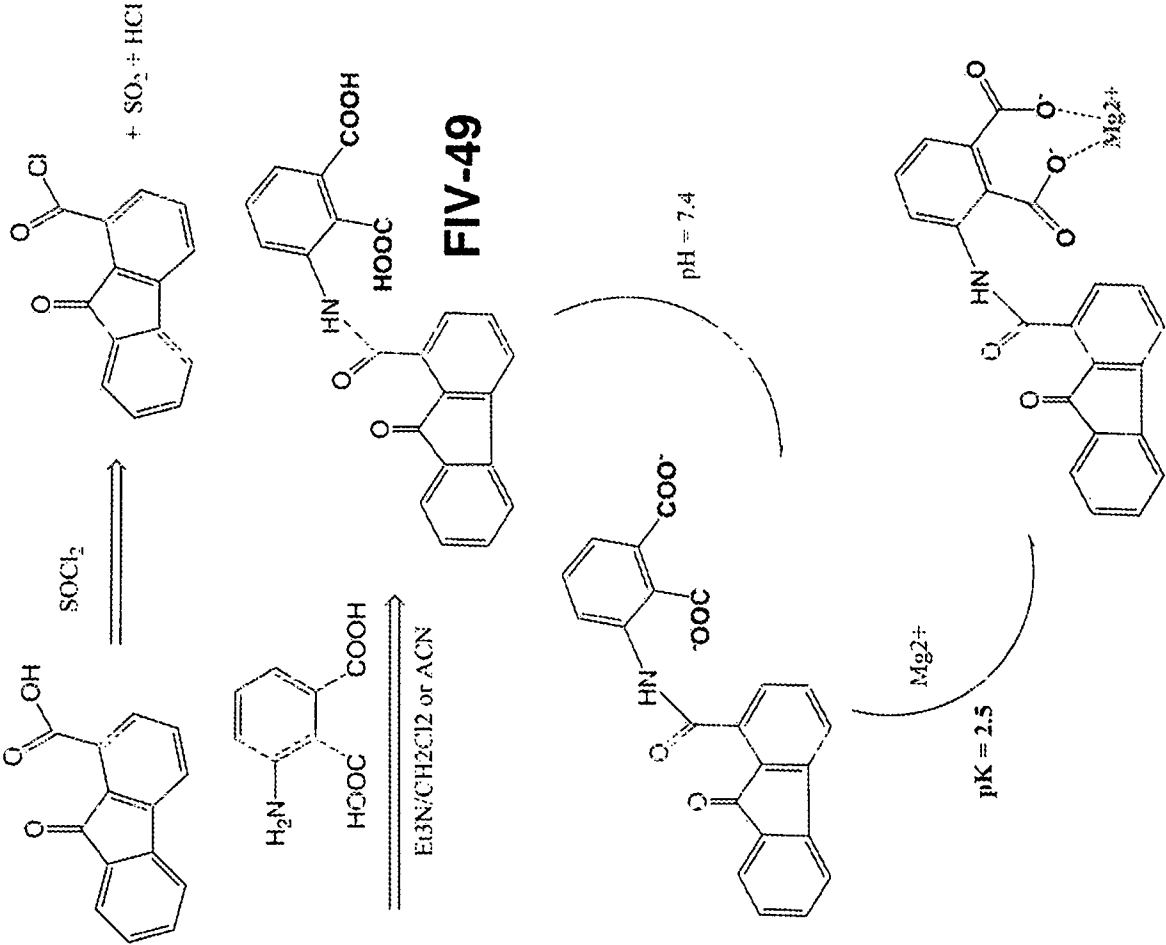


FIG. 72

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 March 2009 (26.03.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/038842 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 31.47 (2006.01) A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31.192 (2006.01) A61K 31/216 (2006.01)
A61K 31.44 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
A61K 31.34 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/066898

(22) International Filing Date: 13 June 2008 (15.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/944,375 15 June 2007 (15.06.2007) US
61/035,269 10 March 2008 (10.03.2008) US

(71) Applicants (for all designated States except US): MIS-
SION PHARMACAL CO. [US/US]; 10999 IH 10 West,
Suite 1000, San Antonio, TX 78230 (US). BOARD OF
REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM
[US/US]; 201 W. 7th Street, Austin, TX 78701 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHEIN, Cath-
line, H. [US/US]; 1308 Edgewater Tr., Friendswood, TX
77546 (US). CHEN, Dellang [CH/US]; 2518 Goldeneye

Ln., League City, TX 77573 (US). GILBERTSON, Scott,
R. [US/US]; 7112 Spanish Grant, Galveston, TX 77554
(US). ESTRELLA-JIMENEZ, Maria [US/US]; 10533
Maple Leaf Dr., Lawrenceville, NJ 08648 (US). GAO, Jian
[CH/US]; 8838 Firebaugh Drive, Helotes, TX 78023 (US).
WALTER, Mary, A. [US/US]; 28418 Quadrille Lane, Fair
Oaks Ranch, TX 78015 (US). PETERSON, Johnny, W.
[US/US]; P.O. Box 1143, Dickinson, TX 77539 (US).

(74) Agents: CATENA, Gino et al.; Fulbright & Jaworski
L.L.P., Fulbright Tower, 1301 McKinney, Suite 5100,
Houston, TX 77010-3095 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS TO INHIBIT EDEMA FACTOR AND ADENYLYL CYCLASE

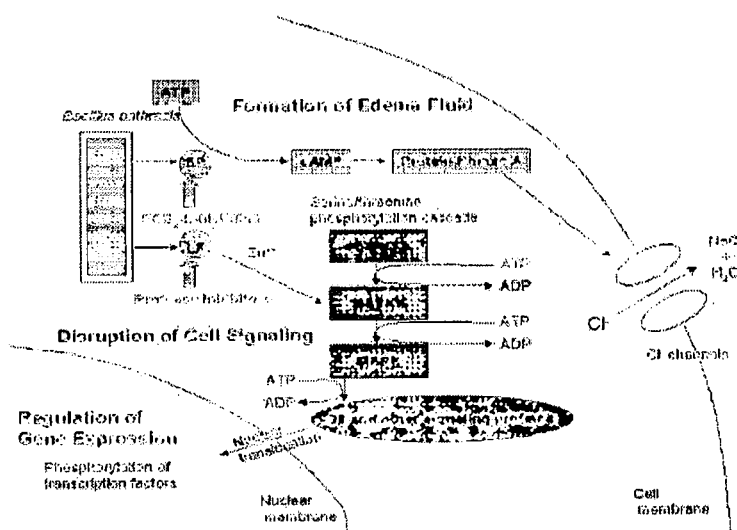


FIG. 1

(57) Abstract: Small molecules and their derivatives are described for the treatment and/or prevention of intestinal fluid loss. Also disclosed are methods of using said molecules and their derivatives to treat and/or prevent conditions associated with increased levels of 5'-adenosine monophosphate. Specific compositions of the invention are also novel.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 March 2009 (26.03.2009)

(10) International Publication Number
WO 2009/038842 A3

(51) International Patent Classification:

A01N 35/00 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/066898

(22) International Filing Date:

13 June 2008 (13.06.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/944,375 15 June 2007 (15.06.2007) US
61/035,269 10 March 2008 (10.03.2008) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **MIS-
SION PHARMACAL CO.** [US/US]; 10999 IH 10 West,
Suite 1000, San Antonio, TX 78236 (US). **BOARD OF
REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYS-
TEM** [US/US]; 201 W. 7th Street, Austin, TX 78701
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **SCHEIN, Cath-
erine, H.** [US/US]; 1308 Edgewater Dr., Friendswood, TX
77546 (US). **CHEN, Deliang** [CH/US]; 2518 Goldeneye
Ln., League City, TX 77573 (US). **GILBERTSON,
Scott, R.** [US/US]; 7112 Spanish Gram, Galveston, TX
77554 (US). **ESTRELLA-JIMENEZ, Maria** [US/US];
10533 Maple Leaf Dr., Lawrenceville, NJ 08648 (US).

GAO, Jian [CH/US]; 8828 Firebaugh Drive, Helotes, TX
78022 (US). **WALTER, Mary, A.** [US/US]; 28418
Quadrille Lane, Fair Oaks Ranch, TX 78015 (US). **PE-
TERSON, Johnny, W.** [US/US]; P.O. Box 1143, Dickin-
son, TX 77539 (US).

(74) Agents: **CATENA, Gino** et al.; Fulbright & Jaworski
L.L.P., Fulbright Tower, 1301 McKinney, Suite 5100,
Houston, TX 77010-3095 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CI, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, IE, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LF, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, ML, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GU, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS TO INHIBIT EDEMA FACTOR AND ADENYLYL CYCLASE

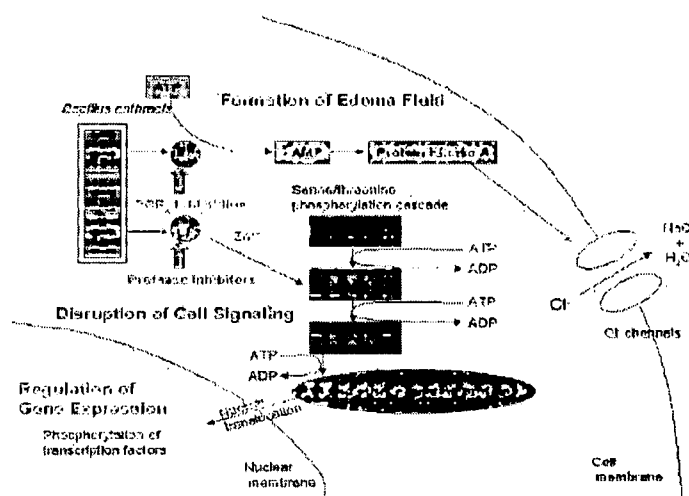


FIG. 1

(57) Abstract: Small molecules and their derivatives are described for the treatment and/or prevention of intestinal fluid loss. Also disclosed are methods of using said molecules and their derivatives to treat and/or prevent conditions associated with increased levels of 2',5'-adenosine monophosphate. Specific compositions of the invention are also novel.

WO 2009/038842 A3



Published:

(88) Date of publication of the international search report:

— *with international search report (Art. 21(3))*

30 December 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/66898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 35/00; A61K 31/12, 31/445 (2009.01) USPC - 514/325, 678 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/325, 678 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 514/130, 411, 437, 454, 662 (text search-see search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patent/Scholar Search terms: cAMP, prostaglandin, cyclohexanone, cyclopentanone, diarrhea, edema, dibenzofuran		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2000/56341 A1 (Santoro et al.) 28 September 2000 (28.09.2000) p1, para 3; p3, para 3, 5; p13, para 1, 10; Fig. 1a	1-79
Y	US 2006/0205800 A1 (Dondo et al.) 14 September 2006 (14.09.2006) para [0002], [0010]-[0011], [0031], [0036]	7-8, 27-28, 39-69, 76-77
Y	US 4,086,834 A (Woessner et al.) 03 January 1978 (03.01.1978) col 4, ln 6-14; col 5, ln 18-23	1-38, 70-79
Y	US 4,222,944 A (Berger et al.) 16 September 1980 (16.09.1980) col 1, ln 15-23; col 10, ln 42-63	1-38, 70-79
Y	US 2006/0178418 A1 (Balasubramanian et al.) 10 August 2006 (10.08.2006) para [0002]-[0004], [0007], [0011], [0028], [0162]	1-38, 40-47, 51-68, 70-79
Y	US 6,294,674 B1 (Picard et al.) 25 September 2001 (25.09.2001) col 4, ln 47-57	40-47, 51-68
Y	US 2002/0188016 A9 (Peterson et al.) 12 December 2002 (12.12.2002) para [0003], [0005]-[0006], [0022], [0038], [0043], [0047], [0055], [0068], [0124]	9-12, 14-20, 29-30, 78-79
Y	US 2003/0224403 A1 (Popov et al.) 04 December 2003 (04.12.2003) para [0017]-[0018], [0068]	32-33
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 April 2009 (23.04.2009)		Date of mailing of the international search report 19 MAY 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/66898

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
see extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-73, limited to compounds of formula I, IV and IX.
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/66898

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Inventions 1-7: compounds having formulae I (1), II (2), III (3), IV and IX (4), V (5), VI (6), VII and VIII (7).

The inventions listed as inventions 1-7 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Compounds having formulae I, II, III, IV and IX, V, VI, VII and VIII do not share any special technical feature, as the various structures are not related and would be expected to exhibit different physical, chemical and pharmacological properties.

Thus, the inventions listed as inventions 1-7 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical feature. According to PCT Rule 13.2, unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by all claimed inventions.

In this case the first named invention and first named species that will be searched without additional fees is Group I represented by claims 1-79, limited to compounds of formula I.

In order for more than one species (invention) to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid and the desired species clearly identified.

CERTIFICATE OF ELECTRONIC TRANSMISSION § 1.6(a)(4) I hereby certify that this correspondence is being electronically filed with the United States Patent and Trademark Office via EFS Web on the date below: <u>June 13, 2008</u> Electronic signature: /S/Elana Anderson/ Date: Elana Anderson
--

PCT REQUEST The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.	For receiving Office use only	
	PCT/US08/66898 International Application No.	
	(13.06.08) 13 JUN 2008 International Filing Date	
	PCT INTERNATIONAL APPLICATION RO/US Name of receiving Office and "PCT International Application"	
Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) HQ-P03501W00		
Box No. I TITLE OF INVENTION METHODS AND COMPOSITIONS TO INHIBIT EDEMA FACTOR AND ADENYNYL CYCLASE		
Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor		
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) MISSION PHARMACAL CO. 10999 IH 10 West Suite 1000 San Antonio, Texas 78230 UNITED STATES OF AMERICA		Telephone No. Facsimile No. Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US		State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box		
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)		
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM 201 W. 7th Street Austin, Texas 78701 UNITED STATES OF AMERICA		This person is: ☒ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US		State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box		
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.		
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE		
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative		
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) CATENA, Gino Fulbright & Jaworski L.L.P. Fulbright Tower 1301 McKinney, Suite 5100 Houston, Texas 77010-3095 United States of America		Telephone No. (713) 651-5411 Facsimile No. (713) 651-5246 Agent's registration No. with the Office 45,546
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.		

CERTIFICATE OF ELECTRONIC TRANSMISSION § 1.6(a)(4)	
I hereby certify that this correspondence is being electronically filed with the United States Patent and Trademark Office via EFS-W as on this date below:	
<u>June 13, 2008</u>	Electronic signature / Svetlana Anderson /
Date	Svetlana Anderson

Sheet No. 2 of 6

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> SCHEIN, Catherine H. 1308 Edgewater Dr. Friendswood, Texas 77546 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> Applicant's registration No. with the Office
State <i>(that is, country)</i> of nationality: US	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> CHEN, Deliang 2518 Goldeneye Ln. League City, Texas 77573 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> Applicant's registration No. with the Office
State <i>(that is, country)</i> of nationality: CN	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> GILBERTSON, Scott R. 7112 Spanish Grant Galveston, Texas 77554 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> Applicant's registration No. with the Office
State <i>(that is, country)</i> of nationality: US	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> ESTRELLA-JIMENEZ, Maria 10533 Maple Leaf Dr. Lawrenceville, New Jersey 08648 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> Applicant's registration No. with the Office
State <i>(that is, country)</i> of nationality: US	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

CERTIFICATE OF ELECTRONIC TRANSMISSION
§ 1.6(a)(4)
I hereby certify that this correspondence is being electronically filed with the United States
Patent and Trademark Office via EPC-WA on the date below.
June 12, 2008 Electronic signature: /S/Juliana Anderson/
Date Juliana Anderson

Sheet No. 3 of 6

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: <i>(Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> GAO, Jian 8838 Firebaugh Drive Helotes, Texas 78023 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> Applicant's registration No. with the Office
State <i>(that is, country)</i> of nationality: CN	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> WALTER, Mary A. 28418 Quadrille Lane Fair Oaks Ranch, Texas 78015 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> Applicant's registration No. with the Office
State <i>(that is, country)</i> of nationality: US	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> PETERSON, Johnny W. P.O. Box 1143 Dickinson, Texas 77539 UNITED STATES OF AMERICA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> Applicant's registration No. with the Office
State <i>(that is, country)</i> of nationality: US	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> 	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> Applicant's registration No. with the Office
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

CERTIFICATE OF ELECTRONIC TRANSMISSION

§ 1.6(a)(4)

I hereby certify that this correspondence is being electronically filed with the United States Patent and Trademark Office via EFS-Web on the date below.

June 13, 2007 Electronic signature / Svetlana Anderson /
Date Svetlana Anderson

Sheet No. 4 of 6

Supplemental Box*If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of box No." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:
 - (i) if more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
 - (ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
 - (iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
 - (iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box IV;
 - (v) if, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.
2. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other patent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1(a) or (b)).
3. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1(d)).

Continuation of Box No. IV:

J. Reid Eungearner, 56,761;
Gino Catena, 45,546;
David L. Fox, 40,612;
Eric B. Hall, 46,751;
Daniel S. Leventhal, 59,528;
Michael S. McCoy, 46,913;
John M. Mings, 35,955;
Lucas Osborn, 59,528;
David L. Parker, Esq., 32,165;
Thomas D. Paul, 32,714;
James W. Rapass, 30,407;
John E. Schneider, 31,998;
Jan K. Simpson, 33,283;
Melissa L. Sistrunk, 45,579;
Charles E. Walker, Jr., 43,231;
Allen E. White, 55,727; and
Richard S. Zambek, 43,306.

CERTIFICATE OF ELECTRONIC TRANSMISSION
§ 1.6(a)(4)
I hereby certify that this correspondence is being electronically filed with the United States
Patent and Trademark Office via EFS/WEB on the date below.
June 15, 2008 Electronic signature of William Anderson/
Date William Anderson

Sheet No. 5 of 6

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.
However,

☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection.
☐ JP Japan is not designated for any kind of national protection.
☐ KP Republic of Korea is not designated for any kind of national protection.
☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection.

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned if, at the time of filing or subsequently under Rule 25bis.1, the international application contains in Box No. VI a priority claim to an earlier national application filed in the particular State concerned, in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of this earlier national application.

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application receiving Office
item (1) 15 June 2007 (15.06.2007)	60/944,375	US		
item (2) 10 March 2008 (10.03.2008)	61/035,269	US		
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Transmit certified copy: the receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

Restore the right of priority: the receiving Office is requested to restore the right of priority for the earlier application(s) identified above or in the Supplemental Box as item(s) (). (See also the Notes to Box No. VI; further information must be provided to support a request to restore the right of priority.)

Incorporation by reference: where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):
ISA/US
Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):
Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

		Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

CERTIFICATE OF ELECTRONIC TRANSMISSION
§ 1.6(a)(4)
I hereby certify that this correspondence is being electronically filed with the United States
Patent and Trademark Office via EFS-Web on the date below:
June 13, 2008 Electronic signature /Gino Catena/Anderson/
Date Sylvia Anderson

Sheet No. 6 of 6

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING		
This international application contains: (a) on paper, the following number of sheets: request (including declaration and supplemental sheets) : 6 description (excluding sequence listings and/or tables related thereto) : 143 claims : 16 abstract : 1 drawings : 91 Sub-total number of sheets : 257 sequence listings : tables related thereto : (for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below) Total number of sheets : 257 (b) ☐ only in electronic form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in electronic form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☐ sequence listing: ☐ tables related thereto: (additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): 1. ☒ fee calculation sheet : 1 2. ☐ original separate power of attorney : 3. ☐ original general power of attorney : 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: : 5. ☐ statement explaining lack of signature : 6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): : 7. ☐ translation of international application into (language): : 8. ☐ separate indications concerning deposited microorganisms or other biological material : 9. ☐ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers) (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) : (ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter : (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column : 10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers) (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802 (b-quarter) only (and not as part of the international application) : (ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802 (b-quarter) : (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column : 11. other (specify): :	Number of items
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1	Language of filing of the international application: English	
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE <i>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</i>		
/Gino Catena/ Gino Catena, Agent for Applicant(s) FULBRIGHT & JAWORSKI L.L.P. Attorney Reg. No. (when applicable): 45, 546		
For receiving Office use only		
1. Date of actual receipt of the purported international application: Rec'd PCT/PTO 13 JUN 2008 (13.06.08)	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / US	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	
For International Bureau use only		
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:		

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/066898

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

CATENA, Gino
Fulbright & Jaworski L.L.P.
Fulbright Tower
1301 McKinney, Suite 5100
Houston, TX 77010-3095
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 28 January 2009 (28.01.2009)	
Applicant's or agent's file reference HQ-P03501W00	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/066898	International filing date (day/month/year) 13 June 2008 (13.06.2008)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 15 June 2007 (15.06.2007)
Applicant MISSION PHARMACAL CO. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "TR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Office, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
15 June 2007 (15.06.2007)	60/944,375	US	18 January 2009 (18.01.2009)
10 March 2008 (10.03.2008)	61/035,269	US	NR

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Dorothee Mülhausen

e-mail PT01.PCT@WIPO.INT

Telephone No. +41 22 338 74 01

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IE/304 (October 2005)

1/DXVIULH10



No. 10-002271- -00000-0000

Fecha 2010-01-12 15:06:12 Dep. 2020 DIR NULVASCH
Nº 11 PATENTILYI Lve 378 PASLNACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 292



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D^a ALEMAN DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	10 2271
	Solicitud internacional	PCT/US2008/066898
	Fecha inicio fase nacional	15/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2162

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular Única 5.2.9)

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente anunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2. literal

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el rótulo

Continúa en la página siguiente...
Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CMN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5830070
Call Center 6512240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

295

Radicación No.: 10 2271

e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CEREPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 19 FEB. 2010
adpall