SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 16-072456- -00000-0000
Fecha: 2016-03-22 15:24:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~101~~ 102

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** DERIVADOS DE ÉSTER DE NITRATOS DE ALHEÍDOS CON MÚLTIPLES PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD DE CELULAS FALCIFORMES.

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY.

DOMICILIO 800 E. LEIGH ST., SUITE 3000, RICHMOND, VA, ESTADOS UNIDOS DE NORTE AMERICA.

74. **APODERADO** JUAN OSWALDO MARTINEZ MARTINEZ.

22. **BOGOTÁ, D. C.,** CALLE 19 # 4-20 oficinas 1305 y 1503
3203005325 juanos@iure.co

(FORMA P-10)

117144-Imprenta Nacional de Colombia-2012

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 16-072456- -00000-0000

Fecha: 2016-03-22 15:24:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~101~~ 102

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	X Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad X Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2014052099	**Fecha**	21.08.2014
Publicación Internacional No.	WO2015027067 A2	**Fecha**	26.02.2015

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

DERIVADOS DE ÉSTER DE NITRATOS DE ALDEHÍDOS AROMÁTICOS CON MÚLTIPLES PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD DE CÉLULAS FALCIFORMES

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1.	VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY			.

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	800E.LEIGH ST., SUITE 3000	No. TELÉFONO	
CIUDAD	RICHMOND	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO	VA	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	ESTADOS UNIDOS
PAÍS DE RESIDENCIA	ESTADOS UNIDOS		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	SAFO	MARTIN	ESTADOS UNIDOS
2.	VENITZ	JURGEN	ESTADOS UNIDOS
3.	DANSO-DANQUAH	HENRICO	ESTADOS UNIDOS
4.	DESPANDE	TANVI	ESTADOS UNIDOS
5.	ZHANG	YAN	ESTADOS UNIDOS

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1.	ESTADOS UNIDOS	VA	RICHMOND	3300 PEMBERTON CREEK COURT
2.	ESTADOS UNIDOS	VA	RICHMOND	222 W BROOK RUN DRIVE
3.	ESTADOS UNIDOS	VA	RICHMOND	12032 COURTYARD GLEN PLACE
4.	ESTADOS UNIDOS	MD	BALTIMORE	30 PARKIN ST, BALTIMORE, MD
5.	ESTADOS UNIDOS	VA	GLEN ALLEN	11060 OLD MILLRACE TERRACE

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 ☐ **REPRESENTANTE LEGAL** **X APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
MARTINEZ MARTINEZ	JUAN OSWALDO	C.C . 80843544 T.P 167227

DIRECCIÓN	Calle 19 No. 4 - 20 OF. 1305	No. TELÉFONO	2865989
CIUDAD	BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO	juanos@iure.com
PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10	**DECLARACIONES DE PRIORIDAD** X SI ☐ NO			
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
	1 ESTADOS UNIDOS	US	201361869162P	2013/08/23
	2.			
	3.			

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI X NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI X NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI X NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 13 de anexos

14	**COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO**	**N°**	**Fecha**

15 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

APODERADO: JUAN OSWALDO MARTINEZ MARTINEZ C.C. 80843544 TP 167227

16 ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 34
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 57
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 5
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☐ Poderes, si fuera el caso.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN

☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad X PCT

(21) No. De solicitud	(51) int. Cl:
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) **VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY**
(30) Prioridad (31) No. Prioridad **US201361869162P** (32) Fecha **23/08/2013** (33) País **US**	(72) Interventor **SAFO, MARTIN.** **VENITZ, JURGEN.** **DANSO-DANQUAH, RICHMOND** **DESPANDE, TANVI** **ZHANG, YAN**
	(74) Apoderado (s) **MARTINEZ MARTINEZ JUAN OSWALDO**

(54) Título **DERIVADOS DE ÉSTER DE NITRATOS DE ALDEHÍDOS AROMÁTICOS CON MÚLTIPLES PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD DE CÉLULAS FALCIFORMES**

Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT

(85) Fecha límite inicio Fase Nacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 21/08/2014 ***No. de solicitud*** **PCT/US2014/052099**	(87) Publicación internacional Fecha 26/02/2015 No. Publicación **WO2015/027067 A2**

Resumen reivindicación (es):

La invención proporciona nuevos compuestos de aldehído aromáticos que tienen mayor potencia en el aumento de la afinidad de la Hb por el oxígeno, mayor potencia para la prevención de formación de células falciformes y propiedades farmacológicas adicionales que mejoran otros síntomas de la drepanocitosis (SCD). La invención proporciona además métodos para el tratamiento de la SCD proporcionando un sujeto que tiene la SCD con un compuesto de acuerdo con la invención.

PATENTE DE INVENCIÓN

DERIVADOS DE ÉSTER DE NITRATOS DE ALDEHÍDOS AROMÁTICOS CON MÚLTIPLES PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD DE CÉLULAS FALCIFORMES

RESUMEN

La invención proporciona nuevos compuestos de aldehído aromáticos que tienen mayor potencia en el aumento de la afinidad de la Hb por el oxígeno, mayor potencia para la prevención de formación de células falciformes y propiedades farmacológicas adicionales que mejoran otros síntomas de la drepanocitosis (SCD). La invención proporciona además métodos para el tratamiento de la SCD proporcionando un sujeto que tiene la SCD con un compuesto de acuerdo con la invención.

DERIVADOS DE ÉSTER DE NITRATOS DE ALDEHÍDOS AROMÁTICOS CON MÚLTIPLES PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD DE CÉLULAS FALCIFORMES

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención.

La invención se refiere a aldehídos aromáticos y su uso en el tratamiento de la enfermedad de células falciformes.

Resumen de la técnica relacionada.

La enfermedad de anemia de células falciformes o drepanocitosis (SCD por sus siglas en inglés) es la consecuencia de la sustitución de Glu por Val en la 6ª posición de la cadena β-globina de la hemoglobina (Hb) resultando en la formación de Hb falciforme (HbS). La polimerización intracelular de Hb falciforme desoxigenada entre largas, rígidas e insolubles fibras provoca la fisiopatología asociada con SCD; facilitando una cascada de eventos adversos que incluyen la disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), activación de células endoteliales, la vasoconstricción compensatoria, aumento del recuento de neutrófilos, la adhesión de los glóbulos rojos (GR) al endotelio del tejido, vasoconstricción y deterioro del flujo sanguíneo micro vascular. El cuadro clínico se caracteriza por una anemia hemolítica crónica, crisis dolorosas frecuentes y graves y la patología multisistémica que tienen un impacto en casi todos los órganos.

Los individuos con SCD han revelado niveles significativos de citoquinas pro-inflamatorio, como el TNF-a, que puede desencadenar las dolorosas crisis vaso-oclusivas y dar lugar a la aparición de episodios infecciosos e inflamatorios. El TNF-a también estimula la producción de radicales libres y otros mediadores inflamatorios, tales como IL-1 y PGE2 y provoca cambios

de las propiedades coagulantes y anticoagulantes. Los individuos con SCD también han demostrado disminución de los niveles de óxido nítrico (NO) en el endotelio vascular fisiológicos que también han sido vinculados a la hemólisis, la inflamación, la vasoconstricción y el estrés de múltiples órganos. Producida naturalmente por el endotelio vascular, los niveles de óxido nítrico (NO) proporciona efectos micro vasculares favorables (es decir, la dilatación y aumento del flujo sanguíneo) y también posee propiedades anti-inflamatorias.

La hidroxiurea (HU) es el único fármaco aprobado para el tratamiento de la SCD. Cuando se metaboliza in vivo que libera óxido nítrico (NO) que es responsable de inducir la expresión de gamma globina y la formación fetal de Hb (HbF). Varios compuestos donadores de NO, tales como S-nitrosocisteína, detaNONOate y talidomidas también se han demostrado para aumentar la expresión de la globina gamma. HbF es capaz de prevenir la formación RBC de células falciformes mediante la inhibición de la polimerización de HbS. El óxido nítrico (NO) también tiene una vasodilatación positiva y efectos directos de anti-inflamación, así como la inhibición de la agregación plaquetaria; la reducción de la severidad y duración de las crisis vaso-oclusivos. Sin embargo, se ha informado de que el tratamiento HU estimula la producción de citoquinas pro-inflamatorio, tales como TNF-a, IL-IA, IL-1B, etc., contrarrestando los efectos beneficiosos de la droga.

La entrega de oxígeno a los tejidos está influenciada en parte por la afinidad de la Hb por el oxígeno. En la circulación normal, el oxígeno se libera cada vez más en el siguiente orden - en recipientes más grandes, en arteriolas y en los capilares. Sin embargo, en pacientes con SCD, la afinidad por el oxígeno baja compensatoria (P_5o = 32 ± 2 mm Hg; Normal P_5o = 26 ± 2 mm de Hg), paradójicamente causa más oxígeno que el que se libera en las arterias y arteriolas. La vasoconstricción, que se produce en las arteriolas para contrarrestar este proceso, exacerba la formación desfavorable de células falciformes, vasoconstricción y la oxigenación del tejido ineficiente en los capilares. Varios aldehídos aromáticos, tales como la vitamina B6 (piridoxal), vainillina, derivados de piridilo de vainillina (compuestos INN), 12C79 y 5-HMF se han estudiado que son prometedoras en la prevención de la hipoxia tisular mediante el aumento de la afinidad por el oxígeno de falciforme Hb y asegurar la disponibilidad de más oxígeno en los capilares.

Algunos de estos compuestos también inhiben la formación de polímero estereoespecífica. 5HMF, un no-tóxico subproducto del metabolismo del azúcar está siendo estudiado por el NIH/Baxter para el tratamiento de la SCD.

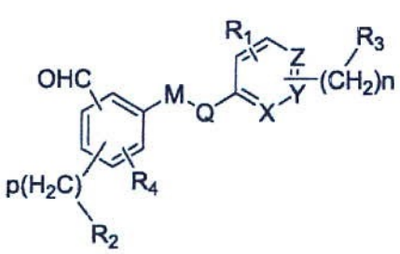
Hay una necesidad de nuevos compuestos que tienen una mayor potencia en el aumento de la afinidad de la Hb por el oxígeno, mayor potencia para la prevención de formación de células falciformes, y propiedades farmacológicas adicionales que mejoran otros síntomas de SCD.

Breve resumen de la invención.

La invención se refiere a aldehídos aromáticos y su uso en el tratamiento de la enfermedad de células falciformes. La invención proporciona nuevos compuestos que tienen una mayor potencia en el aumento de la afinidad de la Hb por el oxígeno, mayor potencia para la prevención de formación de células falciformes y propiedades farmacológicas adicionales que mejoran otros síntomas de SCD. La invención proporciona además métodos para el tratamiento SCD proporcionando un sujeto que tiene SCD con un compuesto de acuerdo con la invención.

En un primer aspecto, la invención proporciona nuevos aldehídos anti-drepanocitosis aromáticos que tienen una mayor potencia para aumentar la afinidad de la hemoglobina (Hb) y de células falciformes especialmente Hb (scHb) y/o la reducción de la capacidad de scHb para polimerizar, reduciendo así la formación de células falciformes de glóbulos rojos falciformes.

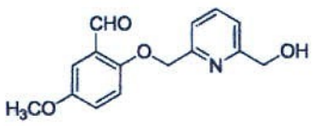
Los compuestos según la invención tienen la fórmula:



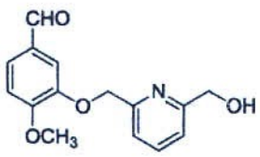
en el que R1 y R4 son iguales o diferentes y son H, OH, alquilo, alcoxi,

halógeno, arilo o O-arilo; y M y Q son diferentes y son O ó $(CH_2)q$; y R2 y R3 son iguales o diferentes y son H u OH; y X ó Y ó Z son iguales o diferentes y son C ó N; y n es 0-5; y p es 0-5; y q es 0-5; con la condición de que cuando M es O, entonces o bien n es 1-5 o R1 no es H; y sales de los mismos.

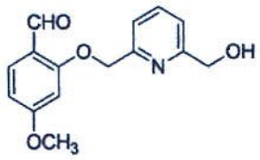
Los compuestos representativos seleccionados del grupo anterior incluyen:



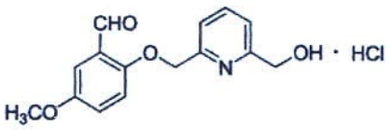
TD-7,



TD-8

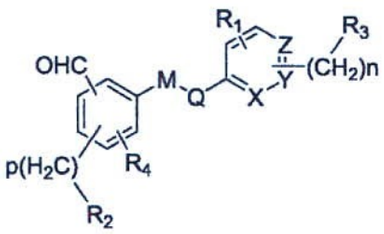


TD-9

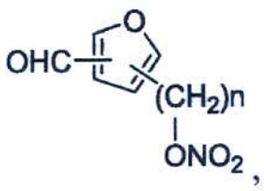


TD-7 HCl.

En un segundo aspecto, la invención proporciona nuevos aldehídos aromáticos que se metabolizan para producir NO_2 y anti-drepanocitosis aldehídos aromáticos. Compuestos de acuerdo con este aspecto tienen una estructura seleccionada de:

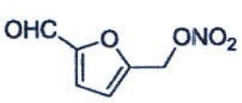


y

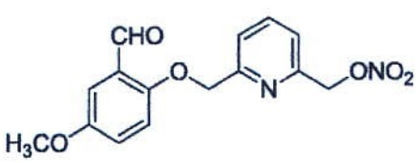


en el que R1 y R4 son iguales o diferentes y son H, OH, alquilo, alcoxi, halógeno, arilo o O-arilo; y M y Q son diferentes y son O ó $(CH_2)q$; y R2 y R3 son los mismos y son ONO_2 o diferente con cualquiera como ONO_2 y el otro como H u OH; y X ó Y ó Z son iguales o diferentes y son C ó N; y n es 0-5; y p es 0-5; y q es 0-5; y sales de los mismos. En algunas realizaciones, R1 es H; y M es O; y R2 es H; y R3 es ONO_2; y p es 0.

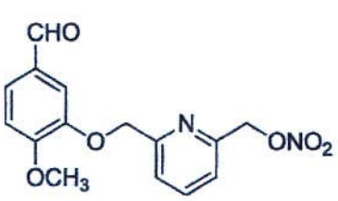
Los compuestos representativos seleccionados del grupo anterior incluyen:



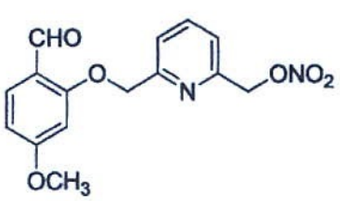
TD-1,



TD7-1,



TD8-1



TD9-1.

En un tercer aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad de células falciformes (SCD) que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos seleccionados de los compuestos de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención.

Breve descripción de los dibujos.

La Figura 1 muestra los resultados de los estudios de curva de equilibrio de oxígeno de 5-HMF y combinaciones TD-7, TD-7-1, TD-8, TD-8-1, TD-9 y TD-9-1.

La Figura 2 muestra el efecto del tiempo de incubación sobre la afinidad de la Hb por el 0_2 con sangre entera para 5-HMF y compuesto TD-7.

Figura 3 muestra los resultados de un estudio de la liberación de óxido nítrico (NO) para los compuestos TD-1, TD-7-1, 8-1 y TD-TD-9-1.

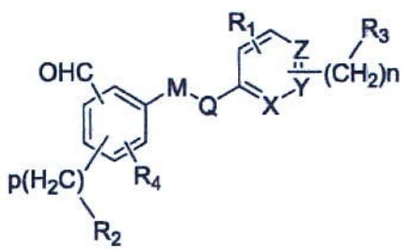
La Figura 4 muestra la inhibición de formación de células falciformes de células SS por los compuestos de ensayo en 4% 0_2 a 37°C durante 5 h.

La Figura 5A muestra la unión de TD-7 (verde) en deoxyHb. La figura 5B muestra una vista cercana de TD-7 (amarillo) la interacción con la hélice que αF de la proteína (verde).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas.

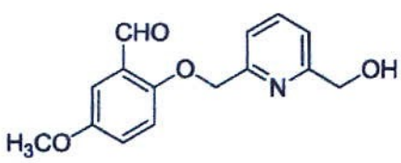
La invención se refiere a aldehídos aromáticos y su uso en el tratamiento de la enfermedad de células falciformes. La invención proporciona nuevos compuestos que tienen una mayor potencia en el aumento de la afinidad de la Hb por el oxígeno, mayor potencia para la prevención de formación de células falciformes, y propiedades farmacológicas adicionales que mejoran otros síntomas de SCD. La invención proporciona además métodos para el tratamiento SCD proporcionando un sujeto que tiene SCD con un compuesto de acuerdo con la invención.

En un primer aspecto, la invención proporciona nuevos aldehídos anti-drepanocitosis aromáticos que tienen una mayor potencia para aumentar la afinidad de la hemoglobina (Hb), y células especialmente falciformes Hb (SCHB) y/o la reducción de la capacidad de SCHB para polimerizar, reduciendo así la falciforme de células rojas de la sangre de células falciformes. Los compuestos según la invención tienen la fórmula:

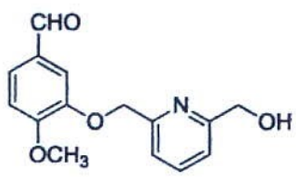


en el que R1 y R4 son iguales o diferentes y son H, OH, alquilo, alcoxi, halógeno, arilo o O-arilo; y M y Q son diferentes y son O ó $(CH_2)q$; y R2 y R3 son iguales o diferentes y son H u OH; y X ó Y ó Z son iguales o diferentes y son C ó N; y n es 0-5; y p es 0-5; y q es 0-5; con la condición de que cuando M es O, entonces o bien n es 1-5 o R1 no es H; y sales de los mismos.

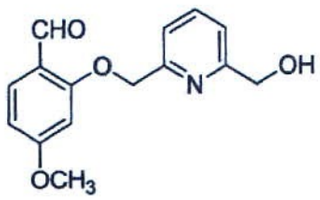
Los compuestos representativos seleccionados del grupo anterior incluyen:



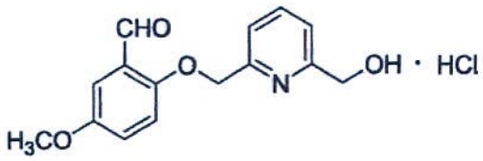
TD-7,



TD-8

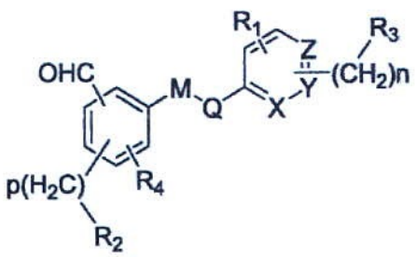


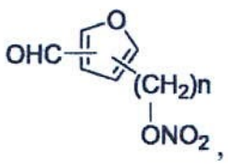
TD-9



TD-7 HCl.

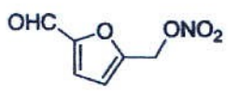
En un segundo aspecto, la invención proporciona nuevos aldehídos aromáticos que se metabolizan para producir NO_2 y anti-drepanocitosis aldehídos aromáticos. Compuestos de acuerdo con este aspecto tienen una estructura seleccionada de:



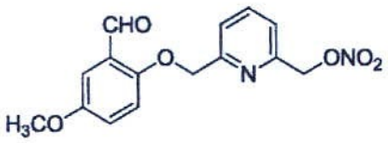


en el que R1 y R4 son iguales o diferentes y son H, OH, alquilo, alcoxi, halógeno, arilo o arilo O-; y M y Q son diferentes y son O ó $(CH_2)q$; y R2 y R3 son los mismos y son ONO_2 o diferente con ya sea como ONO_2 y el otro como H u OH; y X ó Y ó Z son iguales o diferentes y son C ó N; y n es 0-5; y p es 0-5; y q es 0-5; y sales de los mismos. En algunas realizaciones, R1 es H; y M es O; y R2 es H; y R3 es ONO_2; y p es 0; y sales de los mismos.

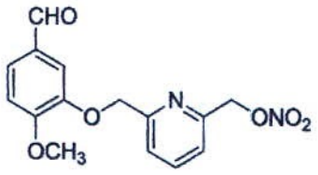
Los compuestos representativos seleccionados del grupo anterior incluyen:



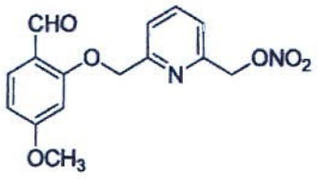
TD-1,



TD7-1,



TD8-1



TD9-1.

En un tercer aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad de células falciformes sujeto que tiene (SCD), que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos seleccionados de los compuestos de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención.

En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 20 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto. En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 20 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto.

En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 20 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto. En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 20 mg a aproximadamente 100

mg del compuesto. En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg del compuesto.

En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto. En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto. En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto.

En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 200 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto. En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 200 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto.

En algunas realizaciones, el sujeto se administra desde aproximadamente 500 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto. En algunas formas de realización se administra al sujeto de aproximadamente 1,000 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto. En algunas formas de realización se administra al sujeto de aproximadamente 5,000 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.

La administración de los compuestos puede ser por cualquier vía adecuada, incluyendo, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, inhalación, intratraqueal o intrarrectal. En algunas realizaciones preferidas, la administración es por vía oral, por inyección, o por inhalación.

Los compuestos usados en la presente invención pueden estar presentes en cualquier diluyente adecuado (incluyendo agua), vehículo o excipiente.
Los compuestos usados en el método de la presente invención pueden formar sales que están también dentro del alcance de esta invención. El término "sal (s)", como se emplea aquí, denota sales ácidas y/o básicas formadas con ácidos y bases inorgánicos y/u orgánicos. Farmacéuticamente aceptables (es decir, no tóxico, que exhiben efectos lógicos mínimos o no tóxicoinfecciosos no deseado, fisiológicamente aceptables) se prefieren las sales.

Tal como se utiliza aquí, el término "sales farmacéuticamente aceptables" pretende significar sales que retienen la actividad biológica deseada de los compuestos y exhiben efectos toxicológicos no deseados mínimos o nulos. Ejemplos de tales sales incluyen, pero no se limitan a, sales formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, y similares), y sales formadas con ácidos orgánicos tales como acético ácido, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmoico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido poligalacturónico. Otras sales incluyen sales cuaternarias farmacéuticamente aceptables conocidas por los expertos en la técnica, que incluir específicamente la sal de amonio cuaternario de la fórmula -NR + Z--, en el que R es hidrógeno, alquilo, o bencilo, y Z es un contraión, incluyendo cloruro, bromuro, yoduro, -O-alquilo, toluenosulfonato, metilsulfonato, sulfonato, fosfato, o carboxilato (tal como benzoato, succinato, acetato, glicolato, maleato, malato, citrato, tartrato, ascorbato, benzoato, cinamoato, mandeloato, benzyloate, y acetato de difenilo).

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para aliviar o eliminar los signos o síntomas de la enfermedad.

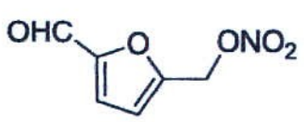
Sin desear estar limitado por la teoría, se ha determinado la unión de TD-7 en deoxyHb para ayudar a dilucidar su actividad antipolimerizante. Dos moléculas de TD-7 se unen de una manera relacionada α–hendido de la Hb, donde los aldehídos forman la interacción de bases de Schiff con las dos α–subunidades N-terminal Vall1 nitrógenos (Fig. 5A). La formación de la base de Schiff dispone el grupo sustituyente metoxi-piridina-metoxilo hacia la boca de la cavidad central de agua, en el que el hidroxilo del metoxilo hace interacciones de enlaces de hidrógeno con los átomos de nitrógeno de la amida y el oxígeno de αAsp75 y αAsp74, respectivamente (Fig. 5B); ambos residuos localizados en la hélice αF. Estas interacciones parecen perturbar la hélice αF, así como el resultado en un cambio conformacional significativo en la cadena lateral de hélice αAsn78. El residuo de hélice αF, Asn78 se ha implicado en la estabilización de la fibra de Hb S, y la variante de Hb, Stanelyville (αAsn78 → αLsy78) es conocida para inhibir la polimerización Hb S y la formación de células falciformes RBS. Por lo tanto, no sólo TD-7

aumenta la afinidad por el oxígeno de la Hb mediante la unión a la α-hendido y el contenido de las dos α-subunidades desde la transición de la conformación oxiHb a la desoxi Hb como se describe previamente para el 5HMF; basado en la estructura que parece que la potencia mejorada de TD-7 es también en parte debido al aumento de la perturbación de la hélice αF que conduce a una mayor desestabilización del contacto mediada polímero de la hélice αF.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas de la invención y no están destinados a ser interpretados como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo de síntesis 1

5-nitrooximetil furfural (TD-1):



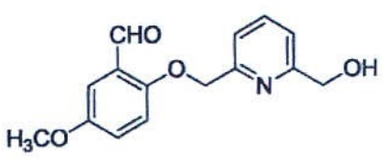
Se preparó el compuesto TD-1 de acuerdo con procedimiento de la bibliografía para un compuesto similar. (Gavrila, A .; Andersen, L .; Skrydstrup, T., Tetrahedron Lett., 2005, 46, 6205-6207).

Se añadió anhídrido trifluoroacético (5,5 ml, 2 mmol) a una suspensión de nitrato de litio (2,7 g, 2 mmol) en anhidro CH3CN (30 ml) a 20°C. La mezcla de reacción se agitó hasta que quedó transparente (30 min) y se enfrió a 0°C (baño de hielo). El carbonato de sodio (4,2g, 2 mmol) y 5- (hidroximetil) furfural (2,5 g, 1 mmol) se añadieron juntos y se dejó que la mezcla de reacción en agitación durante 7 horas a 0°C (baño de hielo). La mezcla de reacción se vertió en una solución enfriada con hielo de NaHCC saturado "3 y se extrajo con EtOAc (2 x 10 ml). La porción orgánica combinada se lavó con salmuera (10 ml), se secó sobre Na 2 S0 4 y se evaporó bajo reducida . presión para dar un producto bruto El residuo bruto se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo/EtOAc, 2:1) para dar 2,9 g (85%) de TD-1 como un aceite viscoso incoloro: IR (KBr, cm "1): 1678 (C = 0),

1631, 1276 (N0 2), 845 (EN); 1H-NMR (CDC1 3): δ 5,48 (s, 2H, CH 2), 6,73 (d, J = 3,5 Hz, 1H, ArH), 7,25 (d, J = 3,6, 1H, ArH), 9,68 (s, 1H, CHO); 13C-RMN (CDCl3): δ 177,9, 153,4, 151,5, 120,9, 114,5, 65,4. Análisis calculado para (C 6 H 5 N0 5): C, 42,12; H, 2,95; N, 8,19. Encontrado: C, 42,02; H, 2,86; N, 8,26. La pureza del compuesto se comprobó por HPLC y se encontró que era 98,8% puro.

Ejemplo de síntesis 2

2-FF6-fHvdroxymethyl) piridin-2-il) metoxi) -5-metoxi-benzaldehído (TD-7):



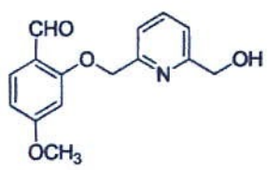
Se preparó compuesto TD-7 de acuerdo con procedimiento de la bibliografía para un compuesto similar. (Nnamani, EN; Joshi, GS; Danso-DANQUAH, R .; Abdulmalik, O .; Asakura, T .; Abraham, DJ;... Seguro, MK, Chem Biodiversidad de 2008, 5, 1762-1769).

Una mezcla de 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehído (0,20 ml, 1,5 mmol), 6-(bromometil) -2-piridinametanol (0,30 g, 1,5 mmol), y K_2CO_3 (0,25 g, 1,8 mmol) en DMF anhidro (20 ml) se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con H20 (2 x 20 ml), salmuera (2 x lOmL), se secó sobre Na2S04 y se evaporó a presión reducida para dar un producto bruto. El residuo se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo / EtOAc; 1: 1) para dar 0,32 g (78%) de TD-7 como un sólido de color amarillo: pf 84-85 ° C; IR (KBr, cm "1): 3396 (OH), 1678 (C = 0); 1H-NMR (CDCI 3): δ 3,51 (s, 1H, OH), 3,81 (s, 3H, OCH 3), 4,79 (s, 2H, CH 2), 5,29 (s, 2H, CH 2), 6,99 (d, J = 9,0 Hz, 1H, ArH), 7.9 a 7.13 (dd, J = 9,0, 3,2 Hz, 1H, ArH) , 7,21 (d, J = 7,7 Hz, 1H, ArH), 7,37 (d, J = 3,2 Hz, 1H, ArH), 7,43 (d, J = 7,6 Hz, 1H, ArH), 7,74 (t, 1H, ArH), 10,58 (s, 1H, CHO); 13C-RMN (CDCI 3): δ 189.24, 158.80, 155.61, 154.17, 154.17, 137.66, 125.56, 123.40, 119.84, 119.64, 114.92, 110.917, 71.65, 64.02, 55.86 . MS (ESI) *m / z* 274,15 (m + H) +, 296,14 (m + Na) +. la pureza

del compuesto se comprobó por HPLC y se encontró que era 97,8% puro.

Ejemplo de síntesis 3

2-FF6-fHvdroxymethyl) piridin-2-il) metoxi) -4-metoxi-benzaldehído (TD-9):



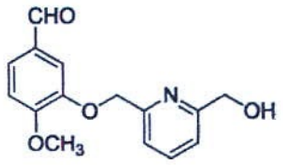
Se preparó Compuesto TD-9 según el procedimiento de la literatura para un compuesto similar. (Nnamani, EN; Joshi, GS; Danso-DANQUAH, R .; Abdulmalik, O .; Asakura, T .; Abraham, DJ;... Seguro, MK, Chem Biodiversidad de 2008, 5, 1762-1769).

Una mezcla de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (113 mg, 0,74 mmol), 6-(bromometil) -2-piridinametanol (150 mg, 0,74 mmol), y K_2CO_3 (123 mg, 0,90 mmol) en DMF anhidro (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con H_20 (2 x 20 ml), salmuera (2 x lOmL), se secó sobre Na_2S0_4 y se evaporó a presión reducida para dar un producto bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo / EtOAc; 1: 1) para dar 190 mg (94%) de TD-9 como un sólido de color amarillo: pf 104-105°C; IR (KBr, cm "1): 3153 (OH), 1599 (C = 0); 1H-NMR (CDCI 3): δ 3,58 (s, 1H, OH), 3,85 (s, 3H, OCH 3), 4,78 (d, 2H, CH 2), 5,30 (s, 2H, CH 2), 6,53 (d, J = 2,2 Hz, 1H, ArH), 6,60 (d, J = 2,16 Hz, 1H, ArH), 7,22 (d , J = 7,68 Hz, 2H, ArH), 7,47 (d, J = 7,76 Hz, 2H, ArH), 7,76 (t, 1H, ArH), 7,85 (d, J = 8,64 Hz, 1H, ArH), 10,43 (s, 1H, CHO); 13 C RMN (CDC1 3): δ 166.16, 162.27, 158.67, 155.51, 137.74, 131.04, 119.85, 119.69, 118.1, 106.68, 99.16, 70.85, 63.87, 55.66 MS (ESI) m/z 274,11 (M + H) +, 296,09 (M + Na) +. la pureza del compuesto se comprobó por HPLC y se encontró que era 96,9% puro.

Ejemplo de síntesis 4

3-FF6-fHvdroxymethyl) piridin-2-il) metoxi) -4-metoxi-benzaldehído (TD-

8):

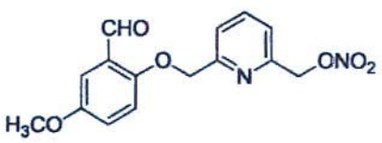


Se preparó Compuesto TD-8 de acuerdo con procedimiento de la bibliografía para un compuesto similar. (Nnamani, EN; Joshi, GS; Danso-DANQUAH, R .; Abdulmalik, O .; Asakura, T .; Abraham, DJ;... Seguro, MK, Chem Biodiversidad de 2008, 5, 1762-1769)

Una mezcla de 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (200 mg, 1,0 mmol), 6-(bromometil) - 2-piridinametanol (152 mg, 1,0 mmol), y carbonato de potasio (165 mg, 1,2 mmol) en DMF anhidro (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con H_20 (2 x 20 ml), salmuera (2 x lOmL), se secó sobre Na2S04 y se evaporó a presión reducida para dar un producto bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo / EtOAc; 1: 1) para dar 220 mg (80%) de TD- 8 como un sólido de color blanco: pf 120-121 ° C; IR (KBr, cm "1): 3176 (OH), 1681 (C = 0); 1H-NMR (CDC1 3): δ 3,65 (s, 1H, OH), 4,00 (s, 3H, OCH 3), 4,78 (d, 2H, CH 2), 5,32 (d, 2H, CH 2), 7,03 (d, J = 8,72 Hz, 1H, ArH), 7,17 (d, J = 7,68 Hz, 1H, ArH), 7,44-7,51 (m, 3H, ArH), 7,71 (t, 1H, ArH); 13 C-RMN (CDCl3): δ 190,66, 155,53, 154,95, 137,54, 130,11, 126,88, 119,99, 119,60, 111,92, 110,98, 158,79, 71,40, 63,90, 56,22. MS (ESI) m / z 274,11 (m + H) +, 296,09 (m + Na) + la pureza del compuesto se comprobó por HPLC y se encontró que era 99,5% puro.

Ejemplo de síntesis 5

f6-FF2-formil-4-metoxifenoxi) metil) piridin-2-il) nitrato de metilo (TD-7-1)

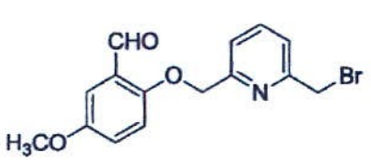


Compuesto TD-7-1 se preparó según el procedimiento de la literatura para un compuesto similar. (Fotopoulou, T .; Iliodromitis, EK; Koufaki, M .; Tsotinis, A .; Zoga, A .; Gizas, V .; Pyriochou, A .; Papapetropoulos, A .; Andreadou, I .; Kremastinos, DT, Bioorg . Med. Chem. 2008, 76, 4523 a 4531).

Se añadió nitrato de plata (76 mg, 0,45 mmol) a una solución de 2 - ((6- (bromometil) piridin-2-il) metoxi) -5-metoxi-benzaldehído (100 mg, 0,3 mmol) en CH3CN anhidro (5 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a 80°C durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y se lavó con CH2Cl2 (15 ml), y se evaporó bajo presión reducida para dar un producto bruto. El residuo bruto se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo / EtOAc; 5: 1) para dar 80 mg (83,78%) de TD-7-1 como un sólido de color blanco: pf 92-93°C; IR (KBr, cm "1): 1664 (C = 0), 1632 (N0 2), 1274 (N0 2), 872 (ON); 1H-NMR (CDC1 3): δ 3,81 (s, 3H, OCH3) , 5,28 (d, 2H, CH 2), 5,56 (s, 2H, CH 2), 6,98 (d, J = 9.08Hz, 1H, ArH), 7.10- 7.13 (dd, J = 9,08, 3,28 Hz, 1H, ArH), 7,33-7,37 (dd, J = 8,4, 3,24 Hz, 2H, ArH), 7,53 (d, J = 7,84 Hz, 1H, ArH), 7,80 (t, 1H, ArH), 10,57 (s, 1H, CHO); 13C-RMN (CDC1 3):. δ 189.18, 157.08, 155.20, 154.20, 152.50, 138.05, 125.52, 123.38, 121.27, 121.19, 114.85, 111.00, 74.15, 71.51, 55.85 MS (ESI) *m/z* encontrado 319,09 (M + H) +, 341,07 (M + Na) +. la pureza del compuesto se comprobó por HPLC y se encontró que era 94,5% puro.

Ejemplo de síntesis 6

2 - ((6- (bromometil) piridin-2-il) metoxi) -5-metoxi-benzaldehído:



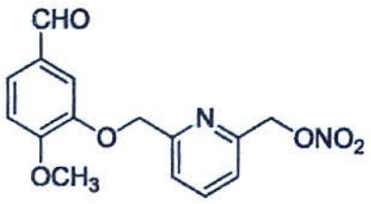
2 - ((6- (bromometil) piridin-2-il) metoxi) -5-metoxi-benzaldehído, un precursor para la síntesis de TD-7-1 se preparó según el procedimiento de la literatura para un procedimiento similar. (Fotopoulou, T .; Iliodromitis, EK; Koufaki, M .; Tsotinis, A .; Zoga, A .; Gizas, V .; Pyriochou, A .; Papapetropoulos, A .; Andreadou, I .; Kremastinos, DT, Bioorg Med.. Chem. 2008, 16, 4.523-

4.531.).

Se añadió trifenilfosfina (140 mg, 0,6 mmol) y tetrabromometano (180 mg, 0,6 mmol) se añadió a una solución de 2 - ((6- (hidroximetil) piridin-2-il) metoxi) -5- metoxibenzaldehído (100 mg, 0,4 mmol) en anhidro CH2CI2 (6 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se neutralizó con NaHCC saturado a 0°C (baño de hielo) y se extrajo con EtOAc (10 ml). La porción orgánica se lavó con salmuera (2 x 10 ml), se secó sobre Na2S04 y se evaporó a presión reducida para dar un producto bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo / EtOAc; 5: 1) para dar 100 mg (74,6%) como sólido de color amarillo: 1H-NMR (CDC1 3): δ 3,81 (s, 3H, OCH 3) , 4,56 (s, 2H, CH 2), 5,28 (d, 2H, CH 2), 6,98 (d, J = 9,08 Hz, 1H, ArH), 7.10 a 7.13 (dd, J = 9,08, 3,28 Hz, 1H, ArH), 7,33-7,37 (dd, J = 8,4, 3,24 Hz, 2H, ArH), 7,53 (d, J = 7,84 Hz, 1H, ArH), 7,80 (t, 1H, ArH), 10,58 (s, 1H, CHO). El siguiente compuesto se utiliza para la síntesis de TD-7-1.

Ejemplo de síntesis 7

(6 - ((5-formil-2-metoxifenoxi) metil) piridin-2-il) nitrato de metilo (TD-8-1)



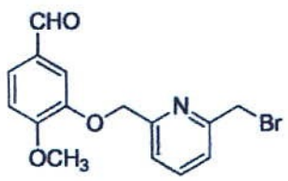
Compuesto TD-8-1 se preparó según el procedimiento de la literatura para un compuesto similar. (Fotopoulou Iliodromitis, T;., EK; Koufaki, M;. Tsotinis, A;. Zoga, A;. Gizas, V;. Pyriocfiou , a;. Papapetropoulos, a;. Andreadou, I;.... Kremastinos, DT, Bioorg Med .. Chem 2008, 16, 4,523-4,531).

Se añadió nitrato de plata (76 mg, 0,45 mmol) a una solución de 3 - ((6- (bromometil) piridin-2-il) metoxi) -4-metoxi-benzaldehído (100 mg, 0,3 mmol) en anhidro CH3CN (5 ml) la mezcla de reacción se dejo en agitación a una temperatura de 80°C Durante 2 h. La mezcla de reacción sí filtro a través de Celita y se lavo con CH2CI2 (15 ml) y se evaporó una presión reducida para

obtener un producto bruto. El producto en bruto se purificó por columna Cromatográfica (éter de petróleo / EtOAc; 5: 1) para dar 94 mg (98%) de TD-8-1 como un sólido de color de amarillo-: Punto de fusión 43-44 ° C; IR (KBr, cm "1): 1683 (C = 0), 1632 (N0 2), 850 (ON); 1H-NMR (CDCI 3): δ 3,99 (s, 3H, OCH 3), 5,31 (s, 2H, CH 2), 5,57 (s, 2H, CH 2), 7,02 (d, J = 8,24 Hz, 1H, ArH), 7,31 (d, J = 7,68 Hz, 1H, ArH) , 7,46 (d, J = 2,16 Hz, 1H, ArH), 7,49-7,52 (dd, J = 8,2, 1,76 Hz, 1H, ArH), 7,55 (d , J = 7,76 Hz, 1H, ArH), 9,82 (s, 1H, CHO); 13 C-RMN (CDCI 3) :. δ 190,56, 157,157, 155,01, 152,01, 152,47, 148,42, 137,91, 130,20 , 126.78, 121.34, 121.00, 112.24, 111.08, 74.27, 71.43, 56.24 MS (ESI) m / z 341,08 (m + Na) + . La Pureza del Compuesto se comprobó por HPLC y se Encontró que se era 96,9% Puro.

Ejemplo de síntesis 8

3 - ((6- (bromometil) piridin-2-il) metoxi) -4-metoxi-benzaldehído:



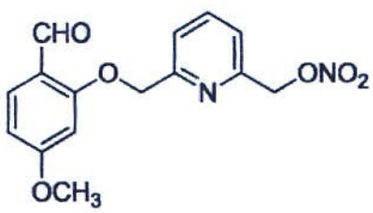
3 - ((6- (bromometil) piridin-2-il) metoxi) -4-metoxi-benzaldehído. Para la síntesis de TD-8-1 se preparó según el procedimiento de la literatura para un procedimiento similar. (Fotopoulou Iliodromitis, T;., EK; Koufaki, M;. Tsotinis, A;. Zoga, A;. Gizas, V;. Pyriocfiou, A;. Papapetropoulos, A;. Andreadou, I;. Kremastinos, DT, Bioorg Med. ... Chem. 2008, 16, 4,523-4,531).

Se añadió trifenilfosfina (140 mg, 0,6 mmol) y tetrabromometano (180 mg, 0,6 mmol) a una solución f de 3 - ((6- (hidroximetil) piridin -2-il) metoxi) -4-metoxi-benzaldehído (100 mg, 0,4 mmolin) anhidro CH2Cl2 (6 ml). La mezcla se dejo en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se neutralizó con solución saturada de NaHC0 3 a 0°C (baño de hielo) y se extrajo con EtOAc (10 ml). La porción orgánica se lavo con salmuera (2 x 10 ml), Se secó sobre Na2S04 y se evaporó a presión reducida para obtener un producto bruto y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo / EtOAc; 5: 1) para dar 76 mg

(56,5%) como un sólido de color de amarillo: 1H-NMR (CDCl $ 3 -di): δ 3,99 (s, 3H, OCH 3), 4,56 (s, 2H, CH 2), 5,31 (s, 2H, CH 2), 7,02 (d, J = 8,2 Hz, 1H, ArH), 7,38 (d, J = 7,8 Hz, 1H, ArH) , 7,46 (d, J = 7,8 Hz, 1H, ArH), 7,49 (d, J = 1,84 Hz, 1H, ArH), 7,52 (d, J = 1,76 Hz, 1H, ArH), 7,72 (t, 1H, ArH), 9,82 (s, 1H, CHO). El siguiente compuesto sí utilización para la síntesis de TD-8-1.

Ejemplo de síntesis 9

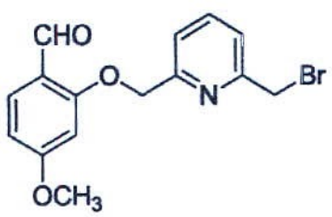
(6 - ((2-formil-5-metoxifenoxi) metil) piridin-2-il) nitrato de metilo (TD-9-1)



El compuesto TD-9-1 se preparó según el procedimiento de la literatura para un compuesto similar. (Fotopoulou, T;. Iliodromitis, EK; Koufaki, M;. Tsotinis, A;. Zoga, A;. Gizas, V;. Pyriochou , A;. Papapetropoulos, A;. Andreadou, I;. Kremastinos, DT, Bioorg Med .. Chem 2008, 16, 4,523-4,531).

Se añadió nitrato de plata (76 mg, 0,5 mmol) a una solución de 2-((6-(bromometil) piridin-2-il) metoxi) -4-metoxi-benzaldehído (100 mg, 0,3 mmol) en anhidro CH3CN (5 ml). La mezcla de reacción se dejo en agitación un 80ºC Durante 2 h y la mezcla de reacción sí filtro a través de celita y se lavo con CH2Cl2 (15 ml) y se evaporó a presión reducida para obtener un producto en bruto y se purificó por Cromatografía en columna (éter de petróleo / EtOAc; 5: 1) para dar 53 mg (56%) de TD-9-1 como un producto sólido de color blanco: pf 70-71 ° C; IR (KBr, cm "1): 1677 (C = 0), 1285 (N0 2), 871 (ON); 1H-NMR (CDCl $ 3 -di): δ 3 , 85 (s, 3H, OCH 3), 5,29 (s, 2H, CH 2), 5,56 (s, 2H, CH 2), 6,52 (d, J = 2,16 Hz, 1H, ArH), 6,58-6,61 (m, 1H, ArH), 7,34 (d, J = 7,68 Hz, 1H, ArH), 7,58 (d, J = 7,88 Hz, 1H, ArH), 7,79-7,85 (m, 2H, ArH), 10,42 (s, 1H , CHO); 13 C-RMN (CDC1 3):. delta 166.19, 163.05, 158.71, 155.53, 138.15, 131.18, 121.31, 121.28, 118.15, 106.95, 99.07, 74.14, 70.80, 55.68 MS (ESI) m / z 341 , 08 (M + Na) + . La pureza del Compuesto se comprobó por HPLC y se encontró que se era 99,8% puro.

2-FF6-fBromomethyl) piridin-2-il) metoxi) -4-metoxi-benzaldehído:



2 - ((6- (bromometil) piridin-2-il) metoxi) -4-metoxi-benzaldehído, precursora para la síntesis de TD-9-1 se preparó según el procedimiento de la literatura para un procedimiento similar. (Fotopoulou , T;. Iliodromitis, EK; Koufaki, M;. Tsotinis, A;. Zoga, A;. Gizas, V;. Pyriochou, A;. Papapetropoulos, A;. Andreadou, I;.. Kremastinos, DT, Bioorg Med . Chem. 2008, 16, 4523 a 4531).

Se añadió trifenilfosfina (140 mg, 0,6 mmol) y tetrabromometano (180 mg, 0,6 mmol) se Añadío A una solución f de 2 - ((6- (hidroximetil) piridin-2-il) metoxi) -4-metoxi -benzaldehído (100 mg, 0,4 mmol) en anhidro CH2Cl2 (6 ml) y la mezcla se dejo en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se neutralizó con NAHC0 saturado de 3 a 0°C (baño de hielo) y se extrajo con EtOAc (10 ml). La porción orgánica se lavo con salmuera (2 x 10 ml), se secó Sobre Na 2 S0 4 y se evaporó a un presión reducida para obtener un producto bruto. El producto se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo / EtOAc; 5: 1) para dar 100 mg (75%) de color amarillo como sólido: 1H-RMN (CDC1 3): δ 3,85 (s, 3H, OCH 3), 4,56 (s, 2H, CH 2), 5,30 (s, 2H, CH 2), 6,53 (d, J = 2,16 Hz, 1H, ArH), 6,57-6,59 (m, 1H, ArH), 7,40 (d, J = 7,72 Hz, 1H, ArH), 7,50 (d, J = 7,8 Hz, 1H, ArH), 7,76 (t, 1H , ArH), 7,84 (t, J = 8,68 Hz, 1H, ArH), 10,43 (s, 1H, CHO). El compuesto resultante se usó para la síntesis de TD-9-1.

Ejemplo de síntesis 10

TD-7 clorhídrico Sal

Se añadió una solución de HCl 1,0 M (5 ml) en éter de dietilo de una manera gota a gota a una solución en agitación de TD-7 (200 mg) en etanol absoluto (3 ml), dando como resultado la precipitación de la sal de hidrocloruro de TD -7. Se añadió éter etílico (10 ml) a la mezcla para precipitar completamente toda la sal HCl. El compuesto se filtró por filtración a vacío, se lavó con más éter y se secó adicionalmente a vacío. El rendimiento obtenido fue del 88%.

Ejemplo biológico 1

Curva de Equilibrio de Oxigeno (OEC) La Estudios

Los estudios se realizaron en compuestos TD-7, TD-7-1, TD-8, TD-8-1, TD-9 y TD-9-1 utilizando 100 mM en solución en DMSO y la sangre normal (AA). TD-7, TD-8 y TD-9 son compuestos con un grupo hidroximetilo en el anillo de piridina, mientras que TD-7-1, 8-1 y TD-TD-9-1 son los derivados de éster de nitrato respectivos. Las muestras de toda la sangre tenían hematocrito valores que van desde 29 hasta 36%, y se purificó Hb libre de células de 10 a 12 g/dl en la ausencia o presencia de efectores solubilizados en DMSO a 2 mM o en algunos casos con concentración variable del compuesto. Las muestras de sangre se incubaron en un tonómetro IL 237 {Instrumentation Laboratories, Inc., Lexington, MA) durante aproximadamente 5-7 minutos a 37 ° C contra una mezcla de gases que contiene 02 concentraciones de 0,804%, 2,935% y 5,528% y se dejaron equilibrar a 02 tensiones de 6, 20 y 40 mmHg. Después del equilibrado, la muestra se retiró mediante una jeringa y se aspira en un analizador de gases en sangre superior de la mesa automatizado 700 serie ABL (Radiometer America, Inc., Westlake, OH) para determinar la hemoglobina total (THB), el hematocrito (Hct), pH, pC02, presión parcial de oxígeno (p02), y los valores de saturación de oxígeno de Hb (s02). Procedimientos similares se siguieron para la concentración y tiempo de estudios de dependencia. Los valores medidos de P02 y S02 en cada nivel de saturación de oxígeno se sometieron entonces a un análisis de regresión no lineal utilizando el programa Scientist (Micromath, Salt Lake

City, UT) con la siguiente ecuación:

$$sO_2\% = 100 \times \frac{pO_2^N mmHg}{P_{50}^N(mmHg) + pO_2^N(mmHg)}$$

Esta ecuación se utilizó para calcular los valores P50 y el coeficiente de Hill (N). También se realizaron experimentos de control correspondiente sin el compuesto de ensayo (P50-controi) pero que contiene DMSO. 5HMF se sabe que presentan una actividad óptima izquierda de desplazamiento de entre 1-2 h cuando se incubaron con toda la sangre necesitando el uso de 1,5 h para el tiempo de incubación para nuestros estudios. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y la Figura 1. La palanca de cambios izquierda más potente fue TD-7 con un cambio ΔP5o de -17.0 mmHg, más potente que el control positivo, 5HMF (ΔP50 de -1 1,1 mmHg).

Tabla 1. Efectos de compuestos de desplazamiento izquierdo en afinidad Hb por el 02 con toda la sangre normal.

Compuesto	Concentración (mM)	P_{50} (mmHg)	N[a]	ΔP_{50}[b] (mmHg)
5HMF	2	$20.2 \pm 2.0^{c\dagger}$	$1.8 \pm 0.1^{c\dagger}$	-11.1
TD-7	0.1	30.1^{d*}	2.5^{d*}	-0.5
	0.5	25.9^{d*}	2.1^{d*}	-4.7
	1	23.2^{d*}	1.7^{d*}	-7.4
	2	$14.3 \pm 4.3^{c\dagger}$	$1.3 \pm 0.3^{c\dagger}$	-17.0
TD-8	2	$25.9 \pm 2.5^{c\dagger}$	$1.9 \pm 0.1^{c\dagger}$	-5.4
TD-9	2	$21.1 \pm 1.2^{c\dagger}$	$1.6 \pm 0.3^{c\dagger}$	-10.2
TD-1	2	$27.4 \pm 2.3^{c\dagger}$	$1.9 \pm 0.1^{c\dagger}$	-3.9
TD-7-1	2	$23.4 \pm 1.6^{c\dagger}$	$1.7 \pm 0.1^{c\dagger}$	-7.9
TD-8-1	2	$30.8^{d\dagger}$	$2.1^{d\dagger}$	-0.5
TD-9-1	2	$28.6^{d\dagger}$	$1.9^{d\dagger}$	-2.7

[a] Coeficiente Hill; [b] ΔP50 es (P50(control)-P50 (ejemplo)) expresado en

mmHg; [c] Las mediciones se llevaron a cabo en n ≥ 3; [d] Las mediciones se llevaron a cabo en n < 3.

Ejemplo biológico 2

La Recogida de Sangre y la Purificación de la hemoglobina

La hemoglobina se preparó a partir de centrifugar la sangre humana a 2500 rpms durante 20 minutos a 4 ° C. La solución sobrenadante, los desechos y el plasma se descartan de las botellas de centrifugación, dejando tras de glóbulos rojos. Los glóbulos rojos se lavaron tres veces con un exceso de volumen de 0,9% de NaCl, y una vez con 1,0% de NaCl, cada vez que la centrifugación y descartar la solución sobrenadante. Los glóbulos rojos se agruparon en un matraz enfriado y hemolizadas para liberar Hb mediante la adición de 1 -2 exceso de volumen de tampón Tris 50 mM, pH 8,6 (que contiene EDTA). La mezcla se dejó en reposo en hielo durante 30 min con agitación ocasional. La solución de Hb se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 horas a 4 ° C. La solución de Hb sobrenadante se combinaron en un matraz enfriado y NaCl (/ solución de 40 a 60 mg ml Hb) se añadió lentamente con agitación. La solución de hemoglobina se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 horas a 4°C para eliminar cualquier resto del estroma celular. La solución de Hb claro sobrenadante se combinaron en un matraz enfriado y el pellet "jarabe" se descartó. solución de hemoglobina se dializó frente a tampón Tris 50 mM, pH 8,6 (que contiene EDTA) a 4 ° C para eliminar el NaCl y / o otras impurezas de bajo peso molecular. Tiras de tubos de diálisis de celulosa estándar que se habían lavado 3- 4 veces y se hirvieron durante 10 min en agua desionizada se utilizaron para la diálisis. La Hb dializada se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando DEAE Sephacel excluir 2,3 -DPG. La resina se equilibró con tampón de Tris 50 mM, pH 8,6, y la solución de Hb se ejecuta a través de la columna con tampón Tris 50 mM, pH 8,6 (que contiene EDTA). Las fracciones reunidas se concentraron con una célula agitada Amicon (Amicon, modelo 402), a una concentración final de alrededor de HbA 80-120 mg / ml. HbA concentrada se almacenó a -80 ° C.

Ejemplo biológico 3.

OEC estudio con Compuestos TD-1, TD-7. TD-7-1. TD-8 y TD-9 con la normalidad de las Células Libres de Hb

Como resultado de las bajas actividades de desplazamiento de la izquierda de TD-8 y TD-9, así como los derivados de éster de nitrato, evaluamos adicionalmente la actividad de los compuestos TD-1, TD-7, TD-7-1, TD -8, y TD-9 usando libre de células Hb (desprovisto de cualquier proteínas, las enzimas, el plasma y las membranas celulares) para determinar si la proteína de plasma o membrana RBC podrían tener ningún efecto sobre la actividad biológica del compuesto. Estudios anteriores han demostrado un efecto limitado de proteína del plasma y la membrana de RBC en 5 actividad HMF. El mismo procedimiento utilizado en la tonometría de sangre completa se utilizó con la hemoglobina libre de células usando el compuesto 2 mM y 12 mg / ml de Hb. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Efectos de compuestos de desplazamiento izquierdo en afinidad Hb por el 02 con células libres de Hb.

Compuesto	P_{50} (mmHg)	N[a]	ΔP_{50}[b] (mmHg)
Control	12.5	2.6	-
5HMF	8.3	2.0	-4.2
TD-7	7.6	1.8	-4.9
TD-8	7.6	1.9	-4.9
TD-9	6.8	1.7	-5.7
TD-1	8.4	2.0	-4.1
TD-7-1	7.7	2.1	-3.9

[a] Coeficiente Hill; [b] ΔP50 es (P50(control)-P50 (ejemplo)) expresado en mmHg; Las mediciones se llevaron a cabo en n = 1.

A diferencia de los resultados obtenidos a partir de todo el estudio de la sangre (Tabla 1), los resultados representados en la Tabla 2 muestran que todos los compuestos exhiben significativa izquierda-cambio en la OEC con Hb libre de células. TD-8, que casi no cambió el OEC con toda la sangre ahora muestra turno comparables como TD-7 con la Hb por células libres. Además, TD-9 parece ser un desplazador izquierdo aún más potente en la Hb libre de células de TD-7, que era opuesta a lo que se observó con la toda la sangre . Aunque los ésteres de nitrato todavía muestran menos izquierda de desplazamiento en comparación con los compuestos originales, todavía hay una mejora significativa en su potencia de desplazamiento de izquierda con Hb libre de células. Esta observación sugiere que las actividades funcionales de ambos TD-8 y TD-9 se ven significativamente afectados por RBC cuestiones permeabilidad de la membrana y / o unión a proteínas plasmáticas resultante en sus actividades alostéricos reducidos.

Ejemplo biológico 4

OEC Estudios Dependientes del tiempo con TD-7

Este estudio muestra un efecto dependiente del tiempo de desplazamiento de izquierda de TD-7 en comparación con 5 HMF. Todas las muestras se pre-encubaron con toda sangre (Hct ~ 34%) con los compuestos especificados concentraciones de 0,5 mm durante el tiempo especificado. El experimento de control sin compuesto de ensayo (P50 (control)) contiene la misma concentración de DMSO utilizado para solubilizar la solución de ensayo (P50 (de la muestra)). Los resultados se muestran en la Tabla 3 y la Figura 2.

Tabla 3. Efecto del tiempo de incubación sobre la afinidad de la Hb por el 02 con toda la sangre para los compuestos de desplazamiento izquierdo.

Compuesto	Tiempo Incub. (Horas)	P_{50} (mmHg)	N[a]	ΔP_{50}[b] (mmHg)
Control	1	32.7 ± 0.2	2.5 ± 0.1	-
	2	33.0 ± 0.4	2.5 ± 0.1	-
	4	33.1 ± 0.6	2.5 ± 0.1	-
	6	34.2 ± 0.3	2.5 ± 0.1	-
	10	35.1 ± 0.3	2.5 ± 0.1	-
	12	36.1 ± 0.4	2.4 ± 0.1	-
5HMF	1	29.8 ± 0.2	2.2 ± 0.1	-2.9
	2	29.2 ± 0.3	2.2 ± 0.1	-3.8
	4	29.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	-3.9
	6	30.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	-4.2
	10	31.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	-3.3
	12	32.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	-3.3

Compuesto	Tiempo Incub. (Horas)	P_{50} (mmHg)	N	ΔP_{50} (mmHg)
TD-7	1	28.2 ± 0.9	2.2 ± 0.2	-4.5
	2	28.2 ± 0.8	2.1 ± 0.1	-4.8
	4	28.8 ± 0.6	2.1 ± 0.1	-4.3
	6	29.1 ± 0.6	2.0 ± 0.2	-5.1
	10	30.6 ± 1.0	2.0 ± 0.1	-4.5
	12	31.1 ± 0.7	2.0 ± 0.2	-5.0

[a] Coeficiente Hill; [b] ΔP50 es (P50(control)-P50 (ejemplo)) expresado en mmHg; [c] Las mediciones se llevaron a cabo en n ≥ 3. Los valores de control de P50 revelan que aumentan constantemente, con la incubación. Mientras que los valores de P50 de 5 HMF parecen volver a la línea de base después de 6 h, no hubo recuperación de TD-7, incluso después de 12 h que sugiere TD-7 tendrá un efecto más sostenido (Figura 2).

Ejemplo biológico 5.

Estudio de liberación de Óxido nítrico (NO) para compuestos TD-1, TD-7-1, 8-1 y TD-TD-9-1

El ensayo de Griess se realizó en los compuestos de éster de nitrato de desplazamiento izquierdo (TD-1, TD-7-1, 8-1-TD y TD-9-1) para medir la liberación de NO. Los ensayos de Griess comprende un ensayo colorimétrico, que se utiliza para la detección de NO en forma de iones de nitrito (NO_2^-). El NO liberado en solución es altamente inestable, con una vida media de la 1 a 30 seg. Se oxida rápidamente a (NO_2^-) que es detectada por el reactivo de Griess. En este método, primero el NO reacciona con la sulfanilamida presente en el reactivo para formar una sal de diazonio transitoria. Esta sal de diazonio reacciona adicionalmente con IV-naftil-etilendiamina (NED) para formar un compuesto azo estable que posee un color púrpura intenso. La absorbancia del compuesto azo se midió a 540 nm y se encontró que era directamente proporcional a la concentración de (NO_2^-) en la muestra. El nitrito de sodio (NaN02) fue utilizado como un estándar para el ensayo de Griess. muestras NaN02 en agua desionizada se prepararon de concentraciones dentro del intervalo lineal del ensayo (1-100 µM). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37 ° C, después de lo cual se añadió reactivo de Griess y la absorbancia se midió a 540 nm. Las absorbancias medidas se utilizaron para obtener una curva estándar (Figura 3). Para la medición de la liberación de (NO_2^-) para todos los compuestos de ensayo (TD-1, TD-7-1, 8-1 y TD-TD-9-1), las absorbancias se extrapolaron a partir de la curva estándar NaN02.

En este ensayo, una solución del compuesto de ensayo (1 ml de una solución 2 mM en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4)) se mezcló a fondo con una solución recién preparada de L-cisteína (1 ml de una solución 36 mM en 0,1 M tampón fosfato, pH 7,4), y se incubaron a 37°C, durante 1 y 16 h en condiciones anaerobias. Después de la exposición al aire durante 10 min a 25°C, una parte alícuota del reactivo de Griess (1 ml) [recién preparada mediante la mezcla de volúmenes iguales de 1,0% sulfanilamida (preparado y almacenado en ácido fosfórico acuoso al 5%) y 0,1% de N-naftilo dihidrocloruro de etilendiamina en agua] se añadió a un volumen igual (1 ml) de cada solución de incubación después de la mezcla. Después de 10 min, se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un Hewlett Packard (Agilent) 8,453 Espectroscopia UV-visible. Soluciones NaN02 de 1-100 concentraciones µM se utilizaron para preparar una curva estándar de nitrito de absorbancia (nm) frente a la concentración (µM). El NO liberado (cuantificada como la liberación de (NO_2^-) en µM) se calculó a partir de la

curva estándar de nitrito por extrapolación de la absorbancia. Presencia de (NO_2^-) muestra la formación de un color rosa, la intensidad de la cual es directamente proporcional a la cantidad de (NO_2^-) presente en la mezcla.

Tabla 4. Valores de absorción y liberación de (NO_2^-) para compuestos TD-1, TD-7 -1, 8-1 y TD-TD-9-1.

Tiempo Incub. (Horas)	NO_2^- release[a] (μM) after 1 hour	NO_2^- release[a] (μM) after 16 hours
TD-1	4.02	11.93
TD-7-1	7.61	59.25
TD-8-1	21.94	102.54
TD-9-1	20.45	78.66

[a] La liberación de (NO_2^-) en uM fue calculada desde la curva estándar $NaN0_2$ por extrapolación de la absorbancia (nm) de los compuestos de ensayo frente a la concentración (μM) de $NaN0_2$.

Los cuatro compuestos (TD-1, TD-7-1, 8-1 y TD-TD-9-1) mostraron liberación de óxido nítrico significativa (4,0 - el 21,9 μM rango en 1 h y el 59 - 102.5 gama μM a 16 h) tras la incubación en presencia de L-cisteína. Se encontró que la liberación de NO después de 16 h de incubación a ser 3-10 veces mayor que 1 h de incubación. A partir de la Tabla 4, se puede interpretar que para todos los compuestos, se encuentra la liberación NO en la forma de NOJ a aumentar con el tiempo, con el TD-1, que muestra la menor liberación, mientras que TD-8-1 mostró la mayor liberación.

Ejemplo biológico 6

En Estudios in vitro anti-RBC drepanocitosis con Compuestos 5HMF, TD-1, TD-7 y TD-7-1

El análisis in vitro RBC morfológico (anti-formación de células falciformes) se llevó a cabo en el Hospital de Niños de Filadelfia (por los Drs. Toshio Asakura y Osheiza Abdulmalik). Los efectos antipolimerizante de 5 HMF, TD-7 HCl, TD-7, TD-1, y TD-7-1 se estudiaron incubando suspensiones de células SS en la ausencia o presencia de tres concentraciones diferentes de los efectores en presencia de aire durante 1 hora a 37 ° C, seguido de incubación en 4% de oxígeno a 37 ° C durante 5 h. Todas las muestras se pre-incubaron durante 1 h con diversos compuestos y después se incubaron bajo 4% 02 durante 5 h. Hb tenía un hematocrito de 30%. Tabla 5 representa las concentraciones de los efectores junto con el% de inhibición de células de formación de células falciformes. Los hemolizados que habían sido preparados a partir de células SS después de la incubación con compuestos de ensayo también se sometieron a HPLC de intercambio catiónico como se informó anteriormente (Abdulmalik et al., 2005). Tabla 5 muestra el efecto de las diferentes concentraciones de los compuestos de ensayo sobre la cantidad de Hb S modificada que refleja la formación de aductos de base de Schiff entre el aldehído aromático y la proteína.

Tabla 5. Efectos de diversas concentraciones de los compuestos sobre la inhibición de la formación de células falciformes de células SS.

Compuesto	Concentración (mM)	inhibición de la formación de células falciformes (%)
5HMF	0.5	4
	1.0	17
	2.0	35
	5.0	75
TD-7 HCl salt	1.0	100
	2.0	100
	5.0	100
TD-7	0.5	95
	1.0	95
	2.0	100
	5.0	100
TD-8	0.5	14
	1.0	20
	2.0	38
TD-9	0.5	26
	1.0	35
	2.0	57
TD-7-1	0.5	72
	1.0	100
	2.0	100

Los efectos anti-drepanocitosis de 5 HMF, TD-7, TD-7 sal HCl, TD-1, y TD-7-1 fueron estudiados y los resultados mostrados en la Tabla 5 y la Figura 4 (% de inhibición). En ausencia de compuestos de ensayo, aproximadamente el 95% de la Hb se sometió a formación de células falciformes en 5 h. En presencia del control positivo, 5 HMF, el porcentaje de las células falciformes

se redujo de una manera dependiente de la dosis con 4, 17, 35 y 75% de inhibición a 0,5 mM, 1 mM, 2 mM y la concentración de 5 mM, respectivamente. En comparación, TD-1, el análogo de éster de nitrato de 5HMF mostró sólo una modesta disminución en el efecto anti-formación de células falciformes (No se muestra en la Tabla).

Esta observación puede deberse en parte a la mala paso de la membrana de glóbulos rojos. Sorprendentemente TD-7, ya sea la base libre o sal HCl, mostró un efecto anti-formación de células falciformes muy potente, tanto como la inhibición de 95% a una concentración de 0,5 mM. A efecto de meseta se observó como la concentración de TD-7 se incrementó. La sal de HCl soluble en agua de TD-7 curiosamente apenas mostró ningún efecto antipolimerizante a 0,5 mM, pero notablemente inhibida 100% falciforme en 1,0 mM que muestra una meseta con el aumento de concentración de fármaco. INN-312, el control positivo de segunda generación, también se redujo el porcentaje de células falciformes de una manera dependiente de la dosis, pero en 0.5 mM que sólo inhibe formación de células falciformes a 15% en comparación con el 95% en TD-7. TD-7-1, el nitrato de éster de TD-7, aunque la prevención de RBC formación de células falciformes, hemolizados el RBC en concentraciones más altas de drogas. Además, parece a engrosar/hidratar la RBC debido a la posible absorción intracelular de agua, que podría ser beneficioso para contrarrestar la rigidez de las células falciformes. TD-8 y TD-9 que no eran tan potentes como el análogo TD- 7 con solamente la inhibición de 38 y 57% de formación de células falciformes RBC, respectivamente a 2 mM. En comparación, la vainillina, que es la matriz de la estructura para el INN y compuestos TD, sólo se inhibió el 12% de glóbulos rojos falciformes a 5 mM.

Referencias.

Wishner, B. C; Ward, K. B.; Lattman, E. E.; Love, W. E. Crystal structure of sickle-cell deoxyhemoglobin at 5 A resolution. J. Mol. Biol. 1975, 98, 179-194.

Vekilov, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: Is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? Br. J. Haematol 2007, 139, 173-184.

Abdulmalik, O.; Safo, M. K.; Chen, Q.; Yang, J.; Brugnara, C; Ohene-Frempong, K.; Abraham, D. J.; Asakura, T. 5-Hydroxymethyl-2-furfural

modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. Br. J. Haematol. 2005, 128, 552- 561.

Nnamani, I. N.; Joshi, G. S.; Danso-Danquah, R.; Abdulmalik, O.; Asakura, T.; Abraham, D. J.; Safo, M. K. Pyridyl derivatives of benzaldehyde as potential antisickling agents. Chem. Biodivers. 2008, 5, 1762-1769.

Abdulmalik, O.; Safo, M. K.; Chen, Q.; Yang, J.; Brugnara, C; Ohene-Frempong, K.; Abraham, D. J.; Asakura, T. 5-Hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. Br. J. Haematol. 2005, 128, 552- 561.

Abdulmalik, O.; Ghatge, M. S.; Musayev, F. N.; Parikh, A.; Chen, Q.; Yang, J.; Nnamani, I.; Danso-Danquah, R.; Eseonu, D. N.; Asakura, T.; Abraham, D. J.; Venitz, J.; Safo, M. K. Crystallo graphic analysis of human hemoglobin elucidates the structural basis of the potent and dual antisickling activity of pyridyl derivatives of vanillin. Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr. 2011, 67, 920-928.

Parikh, A.; Ghatge, M.; Safo, M; Venitz, J. Comparative pharmacodynamic (PD) profiling of the m-vitro time- and concentration- dependent effects of known, synthetic allosteric effectors of hemoglobin (AEH). Presented at the 2011 American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition, Washington, DC, October 2011.

Rees, D. C; Williams, T. N.; Gladwin, M. T. Sickle-cell disease. The Lancet 2010, 376, 2018-2031.

Sun, K.; Xia, Y. New insights into sickle cell disease: A disease of hypoxia. Curr. Opin. Hematol. 2013, 20, 215-221. Ricart-Jane, D.; Llobera, M.; Lopez-Tejero, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. Nitric Oxide 2002, 6, 178-185.

Mack, A. K.; Kato, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? Int. J. Biochem. Cell Biol. 2006, 38, 1237-1243.

Girgis, R. E.; Qureshi, M. A.; Abrams, J.; Swerdlow, P. Decreased exhaled nitric oxide in sickle cell disease: Relationship with chronic lung involvement. Am. J. Hematol. 2003, 72, 177-184.

Hunter, C. J.; Dejam, A.; Blood, A. B.; Shields, H.; Kim-Shapiro, D. B.; Machado, R. F.; Tarekegn, S.; Mulla, N.; Hopper, A. O.; Schechter, A. N.; Power, G. G.; Gladwin, M. T. Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator. Nat. Med. 2004, 10, 1122-1127.

Weiner D. L.; Hibberd, P. L.; Betit, P.; Cooper, A. B.; Botelho, C. A.; Brugngra, C. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. JAMA 2003, 289, 1136-1142.

Miller, M. R.; Megson, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. Br. J. Pharmacol. 2007, 151, 305-21.

de Franceschi, L.; Baron, A.; Scarpa, A.; Adrie, C; Janin, A.; Barbi, S.; Kister, J.; Rouyer-Fessard, P.; Corrocher, R.; Leboulch, P.; Beuzard, Y. Inhaled nitric oxide protects transgenic sad mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. Blood 2003, 102, 1087-1096.

Kahn, M. J.; Maley, J. H.; Lasker, G. F.; Kadowitz, P. J. Updated role of nitric oxide in disorders of erythrocyte function. Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets 2013, 13, 83-87.

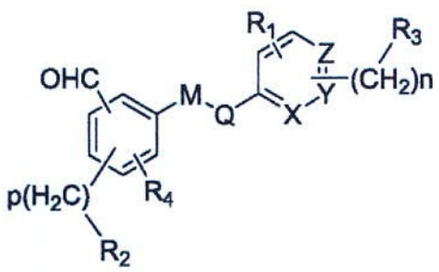
Perutz, M. F. Structure and mechanism of haemoglobin. Br. Med. Bull. 1976, 32, 195- 208.

Stea, B.; Shaw, E.; Pinter, T.; Hackman, J.; Craig, M.; May, J.; Steffen, R. P.; Suh, J. H. Efaproxiral red blood cell concentration predicts efficacy in patients with brain metastases. Br. J. Cancer 2006, 94, 1777-1784.

Bunn, H.F. & Forget, G. B. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. 1986, p 462, W. B. Saunders company.

REIVIDICACIONES.

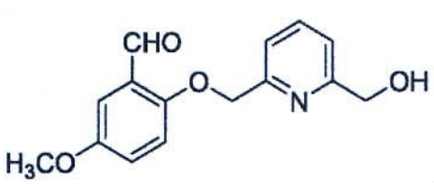
1. Un compuesto de la fórmula:



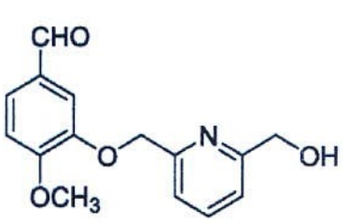
en el que R1 y R4 son iguales o diferentes y son H, OH, alquilo, alcoxi, halógeno, arilo o arilo O-; y M y Q son diferentes y son O ó $(CH_2)q$; y R2 y R3 son iguales o diferentes y son H u OH; y X ó Y ó Z son iguales o diferentes y son C ó N; y n es 0-5; y p es 0-5; y q es 0-5; con la condición de que cuando M es O, entonces o bien n es 1-5 o R1 no es H; y sales de los mismos.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R1 es H; y M es O; y R2 es H; y R3 es OH; y p es 0; y sales de los mismos.

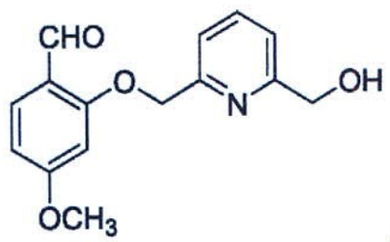
3. Un compuesto que tiene la siguiente estructura:



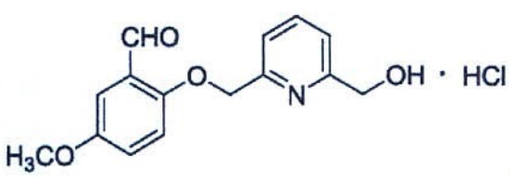
4. Un compuesto que tiene la siguiente estructura:



5. Un compuesto que tiene la siguiente estructura:

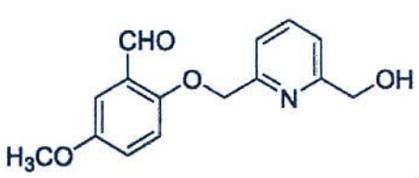


6. Un compuesto que tiene la siguiente estructura:

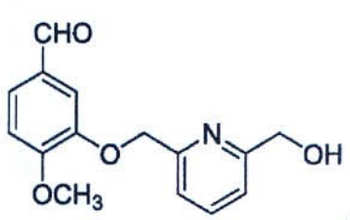


7. Un método para tratar una enfermedad de células falciformes sujeto que tiene (SCD), que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1.

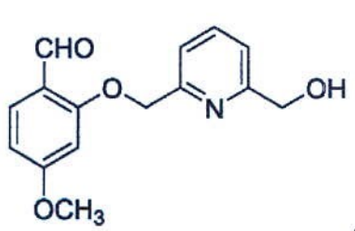
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el compuesto es



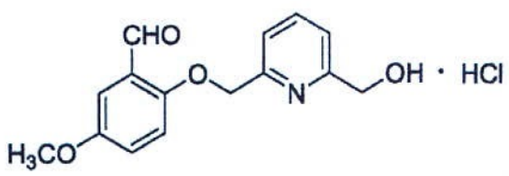
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el compuesto es



10. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el compuesto es



11. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el compuesto es



12. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 MgO sobre 500 mg del compuesto.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 MgO sobre 300 mg del compuesto.

14. El método según la reivindicación 7, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 MgO sobre 200 mg del compuesto.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 MgO sobre 100 mg del compuesto.

16. El método según la reivindicación 7, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg del compuesto.

17. El método según la reivindicación 7, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto.

18. El método según la reivindicación 7, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto.

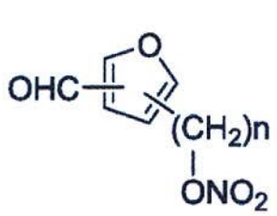
19. El método según la reivindicación 7, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto.

20. El método según la reivindicación 7, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 500 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.

21. El método según la reivindicación 7, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 1,000 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.

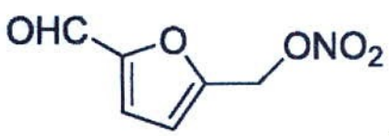
22. El método según la reivindicación 7, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 5,000 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.

23. Un compuesto de la fórmula:



en la que n es 0-5; y sales de los mismos.

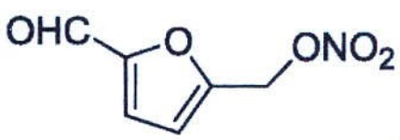
24. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 23, que tiene la siguiente estructura



.

25. Un método para tratar una enfermedad de células falciformes sujeto que tiene (SCD), que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 23.

26. El método según la reivindicación 25, en el que el compuesto es



.

27. El método según la reivindicación 25, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto.

28. El método según la reivindicación 25, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto.

29. El método según la reivindicación 25, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto.

30. El método según la reivindicación 25, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 100 mg del compuesto.

31. El método según la reivindicación 25, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg del compuesto.

32. El método según la reivindicación 25, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto.

33. El método según la reivindicación 25, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto.

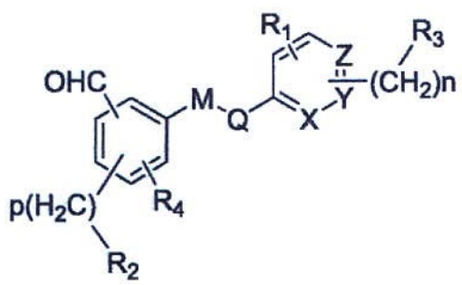
34. El método según la reivindicación 25, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto.

35. El método según la reivindicación 25, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 500 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.

36. El método según la reivindicación 25, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 1,000 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.

37. El método según la reivindicación 25, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 5,000 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.

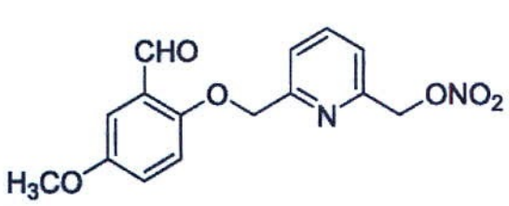
38. Un compuesto de la fórmula:



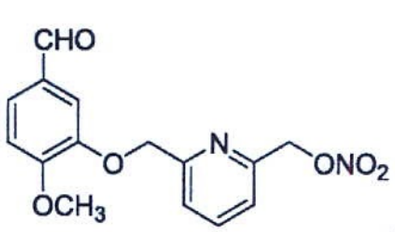
en el que R1 y R4 son iguales o diferentes y son H, OH, alquilo, alcoxi, halógeno, arilo o O-arilo; y M y Q son diferentes y son O ó $(CH_2)q$; y R2 y R3 son los mismos y son ONO_2 o diferente con ya sea como ONO_2 y el otro como H u OH; y X ó Y ó Z son iguales o diferentes y son C ó N; y n es 0-5; y p es 0-5; y q es 0-5; y sales de los mismos.

39. Un compuesto según la reivindicación 38, en el que R1 es H; y M es O; y R2 es H; y R3 es ONO_2; y p es 0; y sales de los mismos.

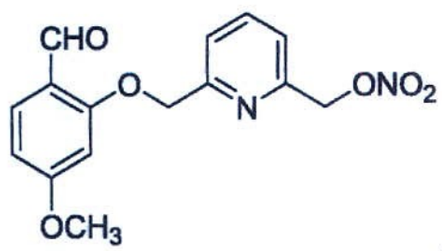
40. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 38, que tiene la siguiente estructura:



41. Un compuesto según la reivindicación 38, que tiene la siguiente estructura:

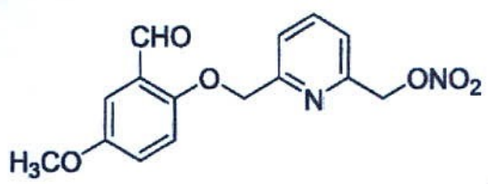


42. Un compuesto según la reivindicación 38, que tiene la siguiente estructura:

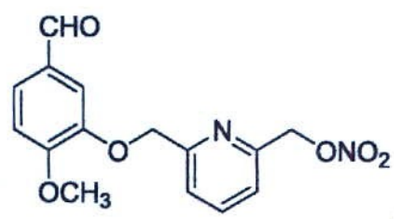


43. Un método para tratar una enfermedad de células falciformes sujeto que tiene (SCD), que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 38.

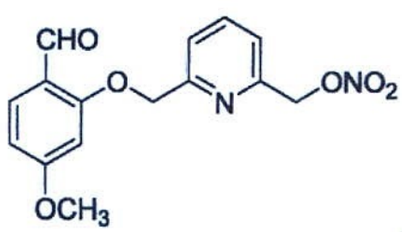
44. El método según la reivindicación 43, en el que el compuesto es



45. El método según la reivindicación 43, en el que el compuesto es



46. El método según la reivindicación 43, en el que el compuesto es



47. El método según la reivindicación 43, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto.

48. El método según la reivindicación 43, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto.

49. El método según la reivindicación 43, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto.

50. El método según la reivindicación 43, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 100 mg del compuesto.
51. El método según la reivindicación 43, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg del compuesto.
52. El método según la reivindicación 43, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto.
53. El método según la reivindicación 43, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto.
54. El método según la reivindicación 43, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto.
55. El método según la reivindicación 43, en el que el sujeto se administra desde aproximadamente 500 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.
56. El método según la reivindicación 43, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 1,000 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.
57. El método según la reivindicación 43, en el que se administra al sujeto de aproximadamente 5,000 mg a aproximadamente 10.000 mg del compuesto.

-/-

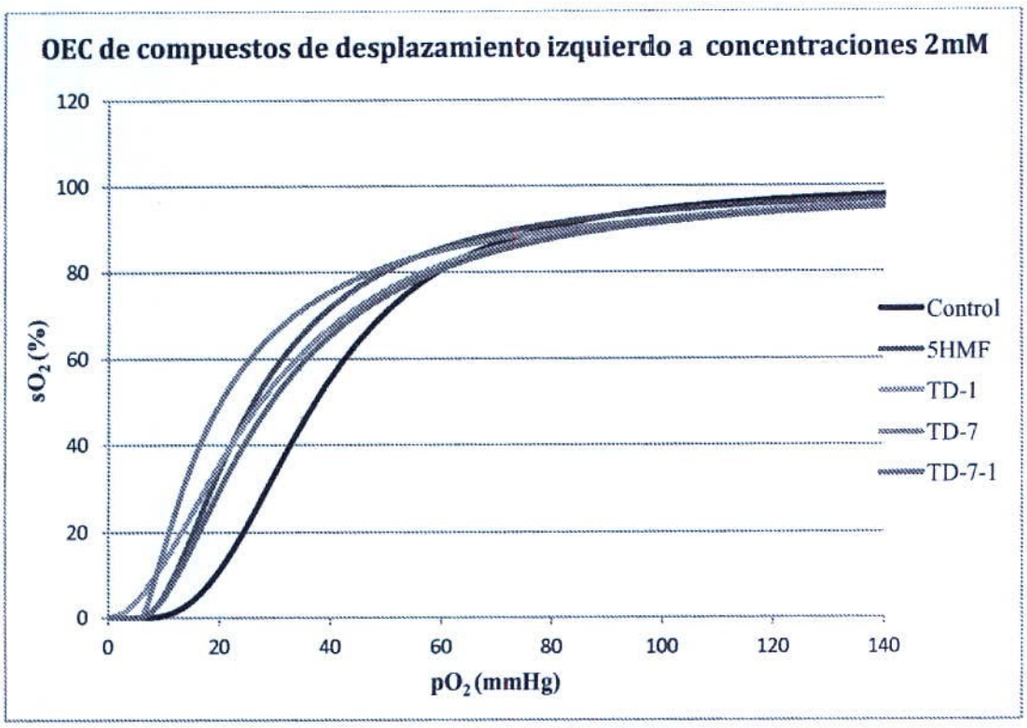

OEC de compuestos de desplazamiento izquierdo a concentraciones 2mM
120
100
80
60
40
20
0
sO_2 (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
pO_2 (mmHg)
Control
5HMF
TD-1
TD-7
TD-7-1

FIG. 1

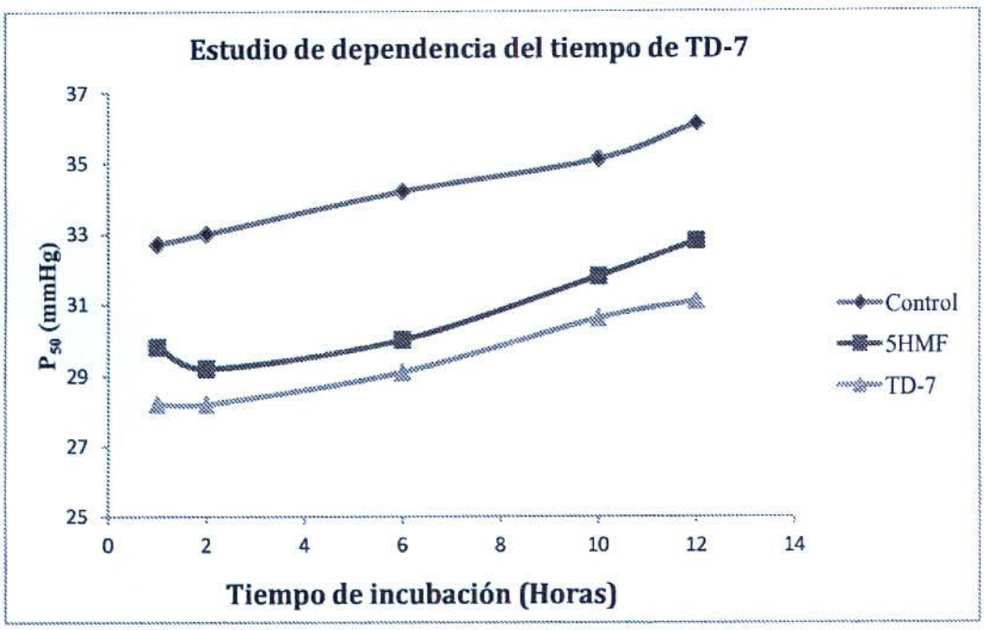

Estudio de dependencia del tiempo de TD-7
37
35
33
31
29
27
25
P_{50} (mmHg)
0
2
4
6
8
10
12
14
Tiempo de incubación (Horas)
Control
5HMF
TD-7

FIG. 2

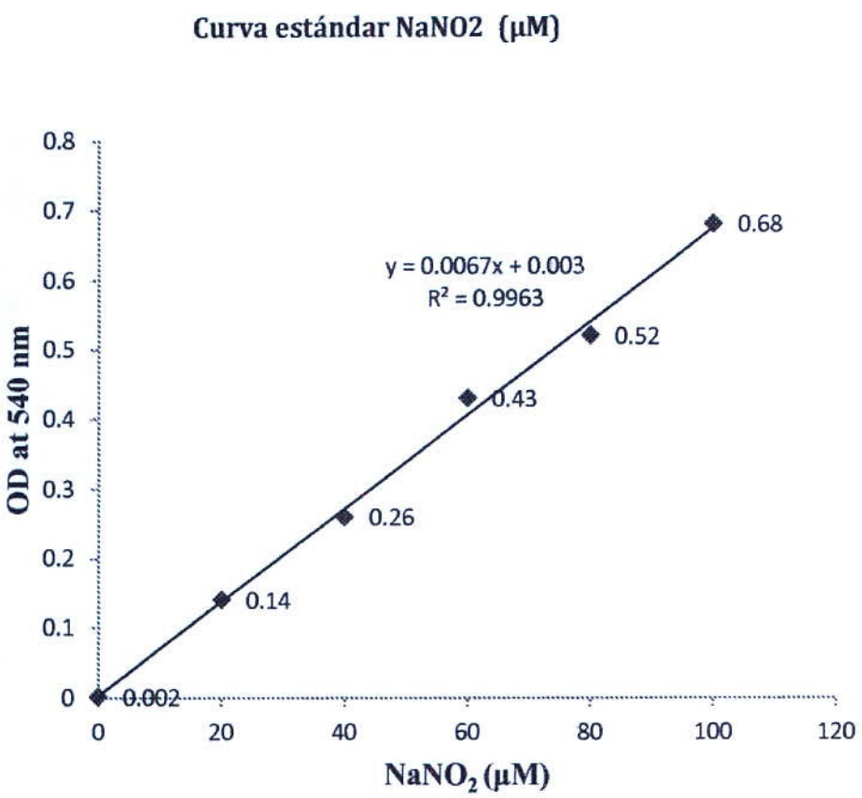

Curva estándar NaNO2 (µM)
OD at 540 nm
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
y = 0.0067x + 0.003
R² = 0.9963
0.68
0.52
0.43
0.26
0.14
0.002
0
20
40
60
80
100
120
NaNO2 (µM)

FIG. 3

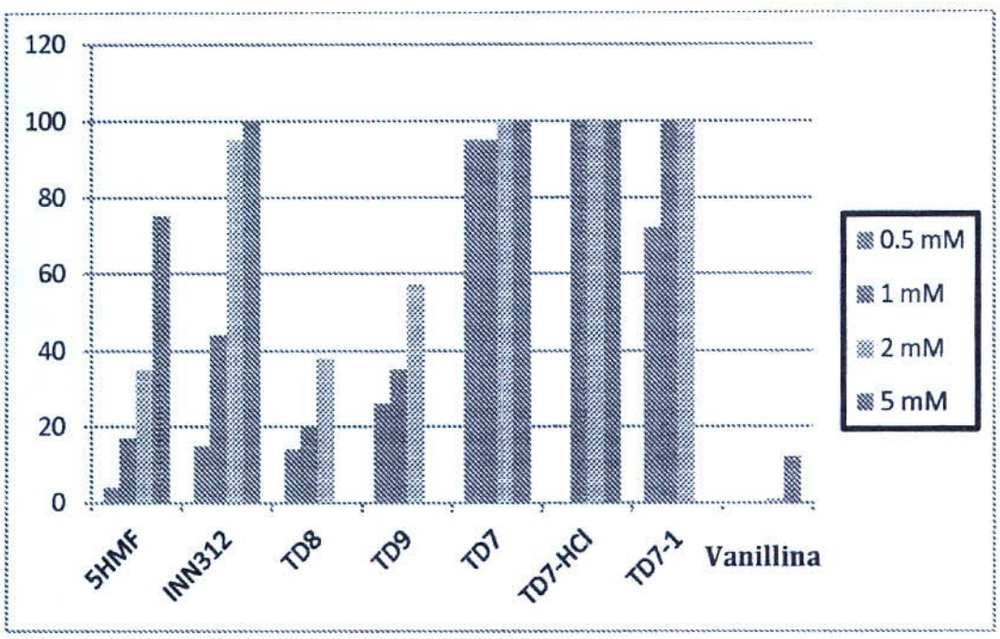

120
100
80
60
40
20
0
5HMF
INN312
TD8
TD9
TD7
TD7-HCl
TD7-1
Vanillina
0.5 mM
1 mM
2 mM
5 mM

FIG. 4

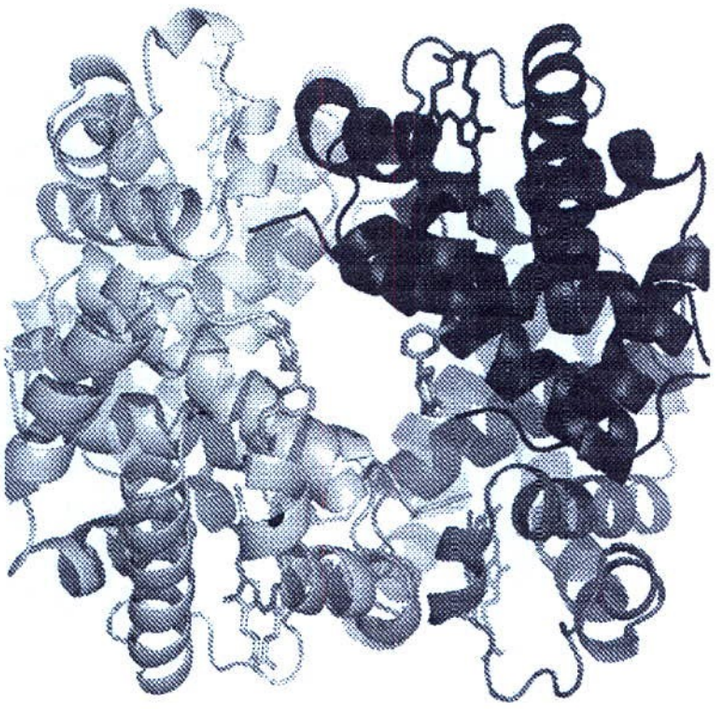


FIG. 5A

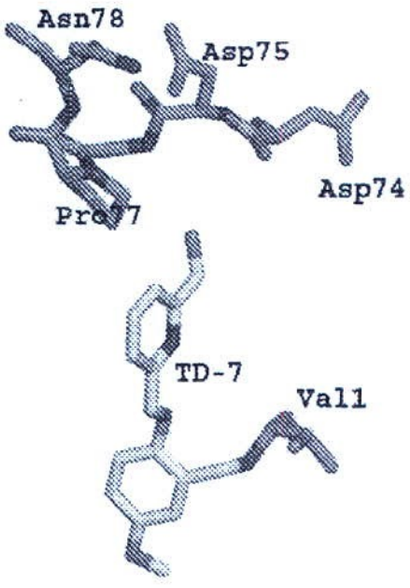


FIG. 5B

PATENTE DE INVENCIÓN

DERIVADOS DE ÉSTER DE NITRATOS DE ALDEHÍDOS AROMÁTICOS CON MÚLTIPLES PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD DE CÉLULAS FALCIFORMES

RESUMEN

La invención proporciona nuevos compuestos de aldehído aromáticos que tienen mayor potencia en el aumento de la afinidad de la Hb por el oxígeno, mayor potencia para la prevención de formación de células falciformes y propiedades farmacológicas adicionales que mejoran otros síntomas de la drepanocitosis (SCD). La invención proporciona además métodos para el tratamiento de la SCD proporcionando un sujeto que tiene la SCD con un compuesto de acuerdo con la invención.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
26 February 2015 (26.02.2015)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2015/027067 A2

(51) International Patent Classification:
C07D 213/30 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2014/052099

(22) International Filing Date:
21 August 2014 (21.08.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/869,162 23 August 2013 (23.08.2013) US

(71) Applicant: **VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY** [US/US]; 800 E. Leigh St., Suite 3000, Richmond, VA 23298-0568 (US).

(72) Inventors: **SAFO, Martin**; 3300 Pemberton Creek Court, Richmond, VA 23233 (US). **VENITZ, Jurgen**; 222 W Brook Run Drive, Richmond, VA 23238-6208 (US). **DANSO-DANQUAH, Richmond**; 12032 Courtyard Glen Place, Henrico, VA 23233 (US). **DESPANDE, Tanvi**; 30 Parkin St, Baltimore, MD 21201 (US). **ZHANG, Yan**; 11060 Old Millrace Terrace, Glen Allen, VA 23059 (US).

(74) Agent: **KEOWN, Wayne, A.**; Verrill Dana LLP, One Portland Square, Portland, ME 04112 (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: ESTER NITRATES DERIVATIVES OF AROMATIC ALDEHYDES WITH MULTIPLE PHARMALOGIC PROPERTIES TO TREAT SICKLE CELL DISEASE

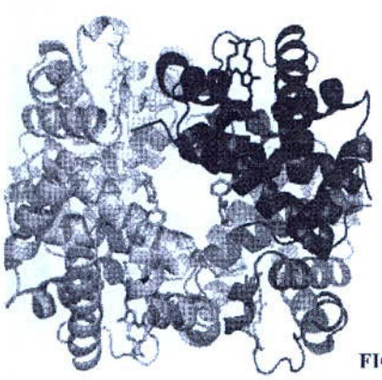


FIG. 5A

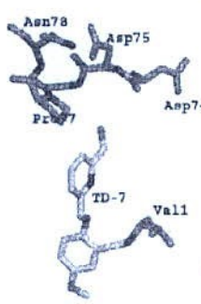


FIG. 5B

(57) Abstract: The invention provides new aromatic aldehyde compounds that have greater potency in increasing the affinity of Hb for oxygen, greater potency for preventing sickling, and additional pharmacologic properties that ameliorate other symptoms of SCD. The invention further provides methods for treating SCD by providing a subject having SCD with a compound according to the invention.

WO 2015/027067 A2

WO 2015/027067 A2

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

WO 2015/027067 PCT/US2014/052099

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICATION FOR UNITED STATES LETTERS PATENT

FOR

ESTER NITRATES DERIVATIVES OF AROMATIC ALDEHYDES WITH MULTIPLE PHARMALOGIC PROPERTIES TO TREAT SICKLE CELL DISEASE

BY

Martin K. Safo
Richmond Danso-Danquah
Yan Zhang
Tanvi Despande
and
Jurgen Venitz

ASSIGNEE: VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY

ESTER NITRATES DERIVATIVES OF AROMATIC ALDEHYDES WITH MULTIPLE PHARMALOGIC PROPERTIES TO TREAT SICKLE CELL DISEASE

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the invention

The invention relates to aromatic aldehydes and their use in the treatment of Sickle Cell Disease.

Summary of the related art

Sickle cell disease (SCD) is the consequence of substitution of Glu by Val in the 6th position of the β-globin chain of hemoglobin (Hb) resulting in the formation of sickle Hb (HbS). Intracellular polymerization of deoxygenated sickle Hb into long, rigid and insoluble fibres causes the pathophysiology associated with SCD; facilitating a cascade of adverse events that include decreased nitric oxide (NO) bioavailability, endothelial cell activation, compensatory vasoconstriction, increase in neutrophil count, adhesion of red blood cells (RBCs) to tissue endothelium, vaso-occlusionand impaired microvascular blood flow. The clinical condition is characterized by chronic hemolytic anemia, frequent and severe painful crises, and multi-system pathology that impact nearly every organ.

Individuals with SCD have shown significant levels of pro-inflammatory cytokines, such as TNF-α which can trigger the painful vaso-occlusive crises and lead to the emergence of infectious and inflammatory episodes. TNF-α also stimulates production of free radicals and other inflammatory mediators, such as IL-1 and PGE2, and induce changes in coagulant and anticoagulant properties. Individuals with SCD have also shown decreased NO physiological levels in vascular endothelium that have also been linked to hemolysis, inflammation, vaso-occlusion and multiple organ stress. Produced naturally by the vascular endothelium, NO provides favorable microvasculature effects (i.e., dilation and increased blood flow), and also possesses anti-inflammatory properties.

Hydroxyurea (HU) is the only drug approved for treating SCD. When metabolized in vivo it releases NO which is responsible for inducing gamma globin expression and the formation of fetal Hb (HbF). Several NO-donor compounds, such as S-nitrosocysteine, detaNONOate and thalidomides have also been shown to increase gamma-globin expression. HbF is able to prevent RBC sickling by inhibiting HbS polymerization. The NO also has a direct

positive vasodilation and anti-inflammation effects, as well as inhibition of platelet aggregation; reducing the severity and duration of vaso-occlusive crises. Nonetheless, it has been reported that HU treatment stimulates the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-1A, IL-1B, etc., counteracting the beneficial effects of the drug.

Delivery of oxygen to tissues is partly influenced by the affinity of Hb for oxygen. In normal circulation, oxygen is increasingly released in the following order - in larger vessels, at the arterioles, and at the capillaries. However, in patients with SCD, the existing compensatory low oxygen affinity (P_{50} = 32±2 mm Hg; normal P_{50} = 26±2 mm Hg), paradoxically causes more oxygen to be released at the arteries and arterioles. Vasoconstriction, which occurs at the arterioles to counteract this process, exacerbates the untoward cell sickling, vaso-occlusion, and inefficient tissue oxygenation at the capillaries. Several aromatic aldehydes, such as vitamin B6 (pyridoxal), vanillin, pyridyl derivatives of vanillin (INN compounds), 12C79 and 5-HMF have been studied that show promise in preventing tissue hypoxia by increasing the oxygen affinity of sickle Hb and ensuring availability of more oxygen at the capillaries. Some of these compounds also stereospecifically inhibit polymer formation. 5HMF, a non-toxic by-product of sugar metabolism is currently being studied by NIH/Baxter for treating SCD.

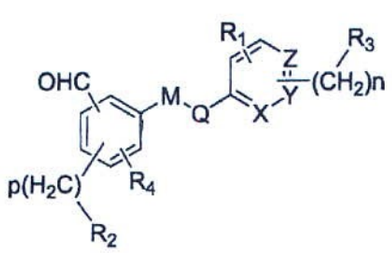
There is a need for new compounds that have greater potency in increasing the affinity of Hb for oxygen, greater potency for preventing sickling, and additional pharmacologic properties that ameliorate other symptoms of SCD.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to aromatic aldehydes and their use in the treatment of Sickle Cell Disease. The invention provides new compounds that have greater potency in increasing the affinity of Hb for oxygen, greater potency for preventing sickling, and additional pharmacologic properties that ameliorate other symptoms of SCD. The invention further provides methods for treating SCD by providing a subject having SCD with a compound according to the invention.

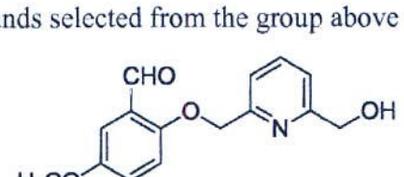
In a first aspect, the invention provides new anti-sickling aromatic aldehydes that have greater potency for increasing the affinity of hemoglobin (Hb), and especially sickle cell Hb (scHb) and/ or reducing the ability of scHb to polymerize, thus reducing the sickling of sickle red blood cells.

Compounds according to the invention have the formula:

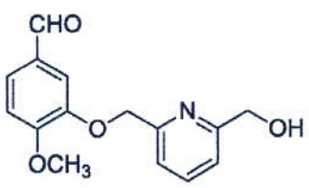


wherein R1 and R4 are the same or different and are H, OH, alkyl, alkoxy, halogen, aryl or O-aryl; and M and Q are different and are O or $(CH_2)q$; and R2 and R3 are the same or different and are H or OH; and X or Y or Z are the same or different and are C or N; and n is 0-5; and p is 0-5; and q is 0-5; with the proviso that when M is O, then either n is 1-5 or R1 is not H; and salts thereof.

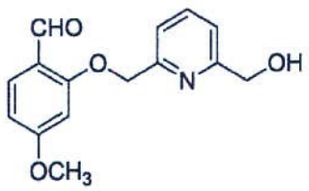
Representative compounds selected from the group above include:



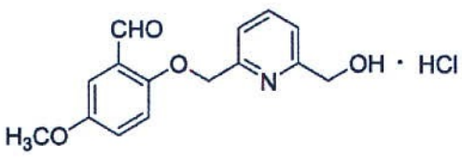
TD-7,



TD-8

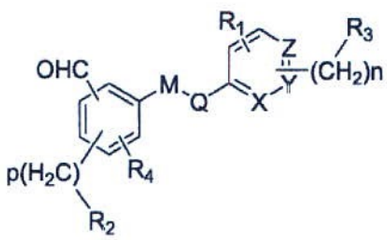


TD-9 and

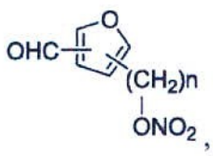


TD-7 HCl.

In a second aspect, the invention provides new aromatic aldehydes that are metabolized to produce NO_2 and anti-sickling aromatic aldehydes. Compounds according to this aspect have a structure selected from:



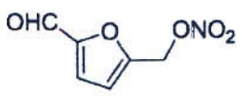
and



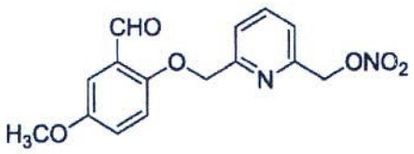
wherein R1 and R4 are the same or different and are H, OH, alkyl, alkoxy, halogen, aryl or O-aryl; and M and Q are different and are O or $(CH_2)q$; and R2 and R3 are the same and are ONO_2 or different with either as ONO_2 and the other as H or OH; and X or Y or Z are the same or

different and are C or N; and n is 0-5; and p is 0-5; and q is 0-5; and salts thereof. In some embodiments, R1 is H; and M is O; and R2 is H; and R3 is ONO_2; and p is 0.

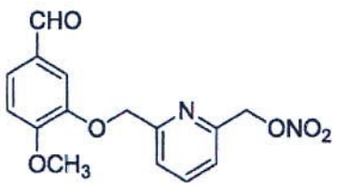
Representative compounds selected from the group above include:



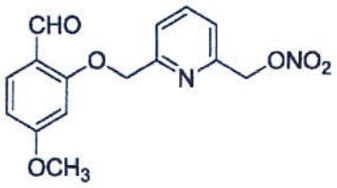
TD-1,



TD7-1,



TD8-1 and



TD9-1.

In a third aspect, the invention provides methods for treating a subject having sickle cell disease (SCD), comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of one or more compound selected from the compounds according to the first or second aspect of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows results of oxygen equilibrium curve studies for 5-HMF and compounds TD-7, TD-7-1, TD-8, TD-8-1, TD-9 and TD-9-1.

Figure 2 shows the effect of incubation time on Hb affinity for O_2 with whole blood for 5-HMF and compound TD-7.

Figure 3 shows results of a NO release study for compounds TD-1, TD-7-1, TD-8-1 and TD-9-1.

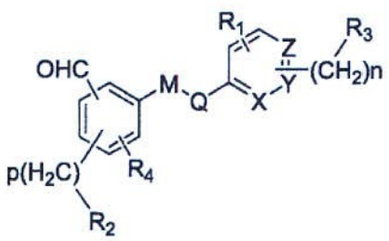
Figure 4 shows inhibition of sickling of SS cells by test compounds under 4% O_2 at 37 °C for 5 h.

Fig. 5A shows binding of TD-7 (green) in deoxyHb. Fig. 5B shows a close view of TD-7 (yellow) interaction with the αF helix of the protein (green)

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

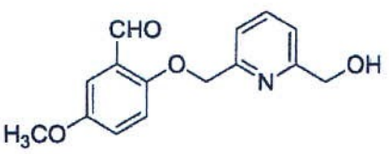
The invention relates to aromatic aldehydes and their use in the treatment of Sickle Cell Disease. The invention provides new compounds that have greater potency in increasing the affinity of Hb for oxygen, greater potency for preventing sickling, and additional pharmacologic properties that ameliorate other symptoms of SCD. The invention further provides methods for treating SCD by providing a subject having SCD with a compound according to the invention.

In a first aspect, the invention provides new anti-sickling aromatic aldehydes that have greater potency for increasing the affinity of hemoglobin (Hb), and especially sickle cell Hb (scHb) and/ or reducing the ability of scHb to polymerize, thus reducing the sickling of sickle cell red blood cells. Compounds according to the invention have the formula:

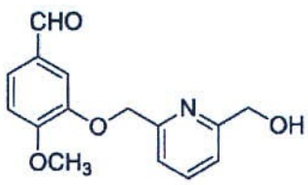


wherein R1 and R4 are the same or different and are H, OH, alkyl, alkoxy, halogen, aryl or O-aryl; and M and Q are different and are O or $(CH_2)q$; and R2 and R3 are the same or different and are H or OH; and X or Y or Z are the same or different and are C or N; and n is 0-5; and p is 0-5; and q is 0-5; with the proviso that when M is O, then either n is 1-5 or R1 is not H; and salts thereof.

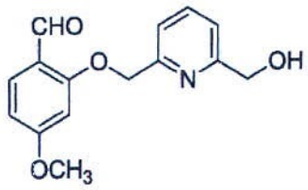
Representative compounds selected from the group above include:



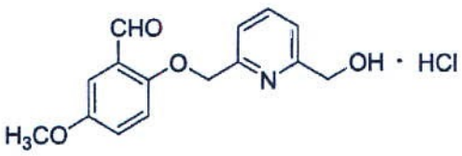
TD-7,



TD-8

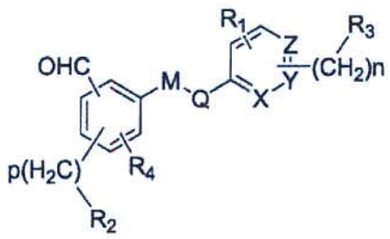


TD-9 and

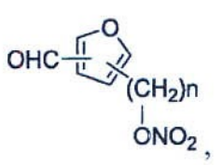


TD-7 HCl.

In a second aspect, the invention provides new aromatic aldehydes that are metabolized to produce NO_2 and anti-sickling aromatic aldehydes. Compounds according to this aspect have a structure selected from:

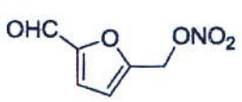


and

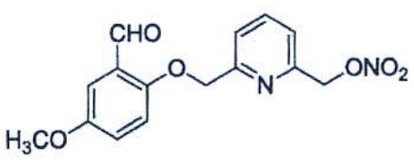


wherein R1 and R4 are the same or different and are H, OH, alkyl, alkoxy, halogen, aryl or O-aryl; and M and Q are different and are O or $(CH_2)q$; and R2 and R3 are the same and are ONO_2 or different with either as ONO_2 and the other as H or OH; and X or Y or Z are the same or different and are C or N; and n is 0-5; and p is 0-5; and q is 0-5; and salts thereof. In some embodiments, R1 is H; and M is O; and R2 is H; and R3 is ONO_2; and p is 0; and salts thereof.

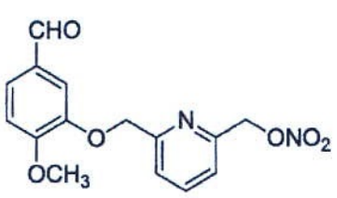
Representative compounds selected from the group above include:



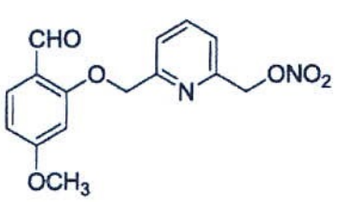
TD-1,



TD7-1,



TD8-1 and



TD9-1.

In a third aspect, the invention provides methods for treating a subject having sickle cell disease (SCD), comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of one or more compound selected from the compounds according to the first or second aspect of the invention.

In some embodiments the subject is administered from about 20 mg to about 500 mg of the compound. In some embodiments the subject is administered from about 20 mg to about 300 mg of the compound. In some embodiments the subject is administered from about 20 mg to about 200 mg of the compound. In some embodiments the subject is administered from about 20 mg to about 100 mg of the compound. In some embodiments the subject is administered from about 20 mg to about 50 mg of the compound.

In some embodiments the subject is administered from about 100 mg to about 500 mg of the compound. In some embodiments the subject is administered from about 100 mg to about 300 mg of the compound. In some embodiments the subject is administered from about 100 mg to about 200 mg of the compound.

In some embodiments the subject is administered from about 200 mg to about 500 mg of the compound. In some embodiments the subject is administered from about 200 mg to about 300 mg of the compound.

In some embodiments the subject is administered from about 500 mg to about 10,000 mg of the compound. In some embodiments the subject is administered from about 1,000 mg to about 10,000 mg of the compound. In some embodiments the subject is administered from about 5,000 mg to about 10,000 mg of the compound.

Administration of the compounds can be by any suitable route, including, without limitation, parenteral, oral, sublingual, transdermal, topical, intranasal, inhalation, intratracheal, or intrarectal. In some preferred embodiments, administration is orally, by injection, or by inhalation.

The compounds used in the present invention may be present in any suitable diluent (including water), carrier or excipient.

The compounds used in the method of the present invention may form salts which are also within the scope of this invention. The term "salt(s)", as employed herein, denotes acidic and/or

basic salts formed with inorganic and/or organic acids and bases. Pharmaceutically acceptable (i.e., non-toxic, exhibiting minimal or no undesired toxicological effects, physiologically acceptable) salts are preferred.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable salts" is intended to mean salts that retain the desired biological activity of the compounds and exhibit minimal or no undesired toxicological effects. Examples of such salts include, but are not limited to, salts formed with inorganic acids (for example, hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, phosphoric acid, nitric acid, and the like), and salts formed with organic acids such as acetic acid, oxalic acid, tartaric acid, succinic acid, malic acid, ascorbic acid, benzoic acid, tannic acid, palmoic acid, alginic acid, polyglutamic acid, naphthalenesulfonic acid, naphthalenedisulfonic acid, methanesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid and polygalacturonic acid. Other salts include pharmaceutically acceptable quaternary salts known by those skilled in the art, which specifically include the quaternary ammonium salt of the formula --NR+Z--, wherein R is hydrogen, alkyl, or benzyl, and Z is a counterion, including chloride, bromide, iodide, --O-alkyl, toluenesulfonate, methylsulfonate, sulfonate, phosphate, or carboxylate (such as benzoate, succinate, acetate, glycolate, maleate, malate, citrate, tartrate, ascorbate, benzoate, cinnamoate, mandeloate, benzyloate, and diphenylacetate).

A "therapeutically effective amount" is an amount sufficient to alleviate or eliminate signs or symptoms of the disease.

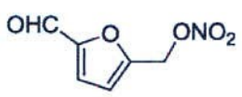
Without wishing to be bound by theory, we have determined the binding of TD-7 in deoxyHb to help elucidate its antisickling activity. Two molecules of TD-7 bind in a symmetry-related fashion at the α-cleft of the Hb, the aldehydes forming Schiff-base interaction with the two α-subunits N-terminal Val1 nitrogens (Fig. 5A). Formation of the Schiff-base disposes the methoxy-pyridine-methoxyl substituent group toward the mouth of the central water cavity, where the hydroxyl of the methoxyl makes hydrogen-bond interactions with the amide nitrogen and oxygen atoms of αAsp75 and αAsp74, respectively (Fig. 5B); both residues located on the αF-helix. These interactions appear to perturb the αF-helix, as well as result in a significant conformational change in the side-chain of αAsn78. The αF-helix residue, Asn78 has been implicated in stabilizing the Hb S fiber, and the Hb variant, Stanelyville (αAsn78 ↔ αLsy78) is known to inhibit Hb S polymerization and RBS sickling.[20] Thus, not only does TD-7 increase the oxygen affinity of Hb by binding at the α-cleft and restraining the two α-subunits from

transitioning from the oxyHb to the deoxy Hb conformation as previously described for 5HMF; based on the structure it seems that the improved potency of TD-7 is also in part due to increased perturbation of the αF-helix that leads to increased destabilization of the αF-helix mediated polymer contact.

The following examples are provided to further illustrate certain preferred embodiments of the invention and are not intended to be construed as limiting the scope of the invention.

Synthesis Example 1

5-Nitrooxymethyl furfural (TD-1):

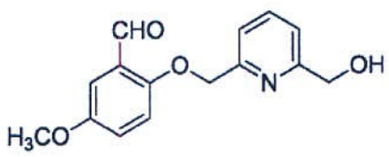


Compound TD-1 was prepared according to literature procedure for a similar compound. (Gavrila, A.; Andersen, L.; Skrydstrup, T., *Tetrahedron Lett.* **2005,** *46*, 6205-6207.)

Trifluoroacetic anhydride (5.5 mL, 2 mmol) was added to a suspension of lithium nitrate (2.7 g, 2 mmol) in anhydrous CH_3CN (30 mL) at 20 °C. The reaction mixture was stirred until clear (30 min) and cooled to 0 °C (ice-bath). Sodium carbonate (4.2 g, 2 mmol) and 5-(hydroxymethyl) furfural (2.5 g, 1 mmol) were added together and the reaction mixture was allowed to stir for 7 h at 0 °C (ice-bath). The reaction mixture was poured into an ice-cold solution of saturated $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc (2 x 10 mL). The combined organic portion was washed with brine (10 mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to yield a crude product. The crude residue was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 2:1) to afford 2.9 g (85%) of **TD-1** as a colorless viscous oil: IR (KBr, cm^{-1}): 1678 (C=O), 1631, 1276 (NO_2), 845 (ON); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 5.48 (s, 2H, CH_2), 6.73 (d, J = 3.5 Hz, 1H, ArH), 7.25 (d, J = 3.6, 1H, ArH), 9.68 (s, 1H, CHO); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 177.9, 153.4, 151.5, 120.9, 114.5, 65.4. Anal. Calcd for ($C_6H_5NO_5$) C, 42.12; H, 2.95; N, 8.19. Found: C, 42.02; H, 2.86; N, 8.26. The purity of the compound was checked by HPLC and was found to be 98.8% pure.

Synthesis Example 2

2-((6-(Hydroxymethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-5-methoxybenzaldehyde (TD-7):

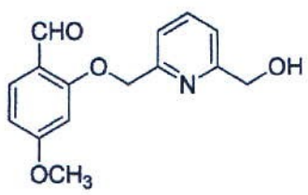


Compound TD-7 was prepared according to literature procedure for a similar compound. (Nnamani, I. N.; Joshi, G. S.; Danso-Danquah, R.; Abdulmalik, O.; Asakura, T.; Abraham, D. J.; Safo, M. K., *Chem. Biodivers.* **2008,** *5*, 1762-1769.)

A mixture of 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (0.20 mL, 1.5 mmol), 6-(bromomethyl)-2-pyridinemethanol (0.30 g, 1.5 mmol), and K_2CO_3 (0.25 g, 1.8 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) was allowed to stir at room temperature for 12 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc (20 mL), washed with H_2O (2 x 20 mL), brine (2 x 10mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to yield a crude product. The residue was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 1:1) to yield 0.32g (78%) of **TD-7** as a yellow-colored solid: mp 84-85 °C; IR (KBr, cm^{-1}): 3396 (O-H), 1678 (C=O); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 3.51 (s, 1H, OH), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 4.79 (s, 2H, CH_2), 5.29 (s, 2H, CH_2), 6.99 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.09-7.13 (dd, J = 9.0, 3.2 Hz, 1H, ArH), 7.21 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, J = 3.2 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.74 (t, 1H, ArH), 10.58 (s, 1H, CHO); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 189.24, 158.80, 155.61, 154.17, 154.17, 137.66, 125.56, 123.40, 119.84, 119.64, 114.92, 110.917, 71.65, 64.02, 55.86. MS (ESI) *m/z* found 274.15 $(M + H)^+$, 296.14 $(M + Na)^+$. The purity of the compound was checked by HPLC and was found to be 97.8% pure.

Synthesis Example 3

2-((6-(Hydroxymethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde (TD-9):

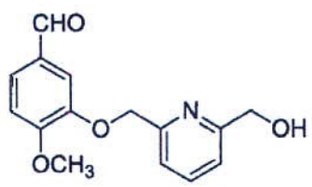


Compound TD-9 was prepared according to literature procedure for a similar compound. (Nnamani, I. N.; Joshi, G. S.; Danso-Danquah, R.; Abdulmalik, O.; Asakura, T.; Abraham, D. J.; Safo, M. K., *Chem. Biodivers.* **2008,** *5*, 1762-1769.)

A mixture of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (113 mg, 0.74 mmol), 6-(bromomethyl)-2-pyridinemethanol (150 mg, 0.74 mmol), and K_2CO_3 (123 mg, 0.90 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc (20 mL), washed with H_2O (2 x 20 mL), brine (2 x 10mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to yield a crude product. The crude was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 1:1) to yield 190 mg (94%) of **TD-9** as a yellow-colored solid: mp 104-105 °C; IR (KBr, cm^{-1}): 3153 (O-H), 1599 (C=O); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 3.58 (s, 1H, OH), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 4.78 (d, 2H, CH_2), 5.30 (s, 2H, CH_2), 6.53 (d, J = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.60 (d, J = 2.16 Hz, 1H, ArH), 7.22 (d, J = 7.68 Hz, 2H, ArH), 7.47 (d, J = 7.76 Hz, 2H, ArH), 7.76 (t, 1H, ArH), 7.85 (d, J = 8.64 Hz, 1H, ArH), 10.43 (s, 1H, CHO); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 166.16, 162.27, 158.67, 155.51, 137.74, 131.04, 119.85, 119.69, 118.1, 106.68, 99.16, 70.85, 63.87, 55.66. MS (ESI) *m/z* found 274.11 $(M + H)^+$, 296.09 $(M + Na)^+$. The purity of the compound was checked by HPLC and was found to be 96.9% pure.

Synthesis Example 4

3-((6-(Hydroxymethyl)pyridine-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde (TD-8):

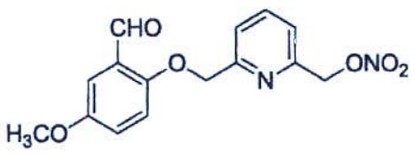


Compound TD-8 was prepared according to literature procedure for a similar compound. (Nnamani, I. N.; Joshi, G. S.; Danso-Danquah, R.; Abdulmalik, O.; Asakura, T.; Abraham, D. J.; Safo, M. K., *Chem. Biodivers.* **2008,** *5*, 1762-1769.)

A mixture of 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (200 mg, 1.0 mmol), 6-(bromomethyl)-2-pyridinemethanol (152 mg, 1.0 mmol), and potassium carbonate (165 mg, 1.2 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc (20 mL), washed with H_2O (2 x 20 mL), brine (2 x 10mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to yield a crude product. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 1:1) to yield 220 mg (80%) of **TD-8** as a white-colored solid: mp 120-121 °C; IR (KBr, cm^{-1}): 3176 (O-H), 1681 (C=O); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 3.65 (s, 1H, OH), 4.00 (s, 3H, OCH_3), 4.78 (d, 2H, CH_2), 5.32 (d, 2H, CH_2), 7.03 (d, J = 8.72 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, J = 7.68 Hz, 1H, ArH), 7.44-7.51 (m, 3H, ArH), 7.71 (t, 1H, ArH); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 190.66, 155.53, 154.95, 137.54, 130.11, 126.88, 119.99, 119.60, 111.92, 110.98, 158.79, 71.40, 63.90, 56.22. MS (ESI) *m/z* found 274.11 $(M + H)^+$, 296.09 $(M + Na)^+$. The purity of the compound was checked by HPLC and was found to be 99.5% pure.

Synthesis Example 5

(6-((2-Formyl-4-methoxyphenoxy)methyl)pyridin-2-yl)methyl nitrate (TD-7-1)

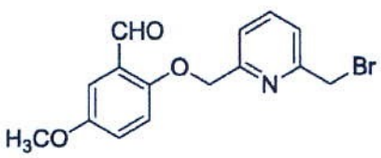


Compound TD-7-1 was prepared according to literature procedure for a similar compound. (Fotopoulou, T.; Iliodromitis, E. K.; Koufaki, M.; Tsotinis, A.; Zoga, A.; Gizas, V.; Pyriochou, A.; Papapetropoulos, A.; Andreadou, I.; Kremastinos, D. T., *Bioorg. Med. Chem.* **2008,** *16*, 4523-4531.)

Silver nitrate (76 mg, 0.45 mmol) was added to a solution of 2-((6-(bromomethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-5-methoxybenzaldehyde (100 mg, 0.3 mmol) in anhydrous CH_3CN (5 mL). The reaction mixture was allowed to stir at 80 °C for 2 h. The reaction mixture was filtered through celite and washed with CH_2Cl_2 (15 mL), and evaporated under reduced pressure to yield a crude product. The crude residue was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 5:1) to yield 80 mg (83.78%) of **TD-7-1** as a white-colored solid: mp 92-93 °C; IR (KBr, cm^{-1}): 1664 (C=O), 1632 (NO_2), 1274 (NO_2), 872 (ON); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 3.81 (s, 3H, OCH_3), 5.28 (d, 2H, CH_2), 5.56 (s, 2H, CH_2), 6.98 (d, J = 9.08Hz, 1H, ArH), 7.10-7.13 (dd, J = 9.08, 3.28 Hz, 1H, ArH), 7.33-7.37 (dd, J = 8.4, 3.24 Hz, 2H, ArH), 7.53 (d, J = 7.84 Hz, 1H, ArH), 7.80 (t, 1H, ArH), 10.57 (s, 1H, CHO); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 189.18, 157.08, 155.20, 154.20, 152.50, 138.05, 125.52, 123.38, 121.27, 121.19, 114.85, 111.00, 74.15, 71.51, 55.85. MS (ESI) *m/z* found 319.09 $(M + H)^+$, 341.07 $(M + Na)^+$. The purity of the compound was checked by HPLC and was found to be 94.5% pure.

Synthesis Example 6

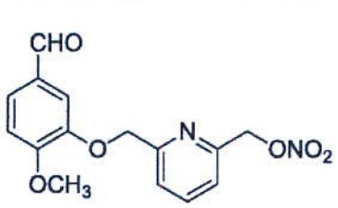
2-((6-(Bromomethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-5-methoxybenzaldehyde:



2-((6-(Bromomethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-5-methoxybenzaldehyde, a precursor for the synthesis of TD-7-1 was prepared according to literature procedure for a similar procedure. (Fotopoulou, T.; Iliodromitis, E. K.; Koufaki, M.; Tsotinis, A.; Zoga, A.; Gizas, V.; Pyriochou, A.; Papapetropoulos, A.; Andreadou, I.; Kremastinos, D. T., *Bioorg. Med. Chem.* **2008,** *16*, 4523-4531.). Triphenylphosphine (140 mg, 0.6 mmol) and tetrabromomethane (180 mg, 0.6 mmol) was added to a solution of 2-((6-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-5-methoxybenzaldehyde (100 mg, 0.4 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (6 mL). The reaction mixture was allowed to stir for 2 h at room temperature. The reaction mixture was neutralized with saturated $NaHCO_3$ at 0 °C (ice-bath) and extracted with EtOAc (10 mL). The organic portion was washed with brine (2 x 10 mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to yield a crude product. The crude was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 5:1) to yield 100 mg (74.6%) as a yellow – colored solid: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 3.81 (s, 3H, OCH_3), 4.56 (s, 2H, CH_2), 5.28 (d, 2H, CH_2), 6.98 (d, J = 9.08 Hz, 1H, ArH), 7.10 – 7.13 (dd, J = 9.08, 3.28 Hz, 1H, ArH), 7.33 – 7.37 (dd, J = 8.4, 3.24 Hz, 2H, ArH), 7.53 (d, J = 7.84 Hz, 1H, ArH), 7.80 (t, 1H, ArH), 10.58 (s, 1H, CHO). The following compound was used for the synthesis of TD-7-1.

Synthesis Example 7

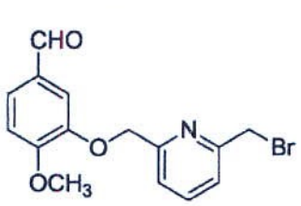
(6-((5-Formyl-2-methoxyphenoxy)methyl)pyridin-2-yl)methyl nitrate (TD-8-1)



Compound TD-8-1 was prepared according to literature procedure for a similar compound. (Fotopoulou, T.; Iliodromitis, E. K.; Koufaki, M.; Tsotinis, A.; Zoga, A.; Gizas, V.; Pyriochou, A.; Papapetropoulos, A.; Andreadou, I.; Kremastinos, D. T., *Bioorg. Med. Chem.* **2008,** *16*, 4523-4531.). Silver nitrate (76 mg, 0.45 mmol) was added to a solution of 3-((6-(bromomethyl)pyridine-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde (100 mg, 0.3 mmol) in anhydrous CH_3CN (5 mL). The reaction mixture was allowed to stir at 80 °C for 2 h. The reaction mixture was filtered through celite and washed with CH_2Cl_2 (15 mL) and evaporated under reduced pressure to yield a crude product. The crude was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 5:1) to yield 94 mg (98%) of **TD-8-1** as a yellow-colored solid: mp 43-44 °C; IR (KBr, cm^{-1}): 1683 (C=O), 1632 (NO_2), 850 (ON); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 3.99 (s, 3H, OCH_3), 5.31 (s, 2H, CH_2), 5.57 (s, 2H, CH_2), 7.02 (d, J = 8.24 Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, J = 7.68 Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, J = 2.16 Hz, 1H, ArH), 7.49-7.52 (dd, J = 8.2, 1.76 Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, J = 7.76 Hz, 1H, ArH), 9.82 (s, 1H, CHO); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 190.56, 157.157, 155.01, 152.01, 152.47, 148.42, 137.91, 130.20, 126.78, 121.34, 121.00, 112.24, 111.08, 74.27, 71.43, 56.24. MS (ESI) *m/z* found 341.08 $(M + Na)^+$. The purity of the compound was checked by HPLC and was found to be 96.9% pure.

Synthesis Example 8

3-((6-(Bromomethyl)pyridine-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde:

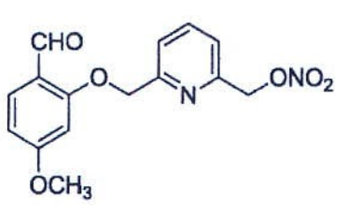


3-((6-(Bromomethyl)pyridine-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde, a precursor for the synthesis of TD-8-1 was prepared according to literature procedure for a similar procedure. (Fotopoulou, T.; Iliodromitis, E. K.; Koufaki, M.; Tsotinis, A.; Zoga, A.; Gizas, V.; Pyriochou, A.; Papapetropoulos, A.; Andreadou, I.; Kremastinos, D. T., *Bioorg. Med. Chem.* **2008,** *16*, 4523-4531.).

Triphenylphosphine (140 mg, 0.6 mmol) and tetrabromomethane (180 mg, 0.6 mmol) was added to a solution of 3-((6-(hydroxymethyl)pyridine-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde (100 mg, 0.4 mmolin anhydrous CH_2Cl_2 (6 mL). The mixture was allowed to stir for 2 h at room temperature. The reaction mixture was neutralized with saturated $NaHCO_3$ at 0 °C (ice-bath) and extracted with EtOAc (10 mL). The organic portion was washed with brine (2 x 10 mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to yield a crude product. The crude was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 5:1) to yield 76 mg (56.5%) as a yellow-colored solid: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$-d_1): δ 3.99 (s, 3H, OCH_3), 4.56 (s, 2H, CH_2), 5.31 (s, 2H, CH_2), 7.02 (d, J = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.49 (d, J = 1.84 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, J = 1.76 Hz, 1H, ArH), 7.72 (t, 1H, ArH), 9.82 (s, 1H, CHO). The following compound was used for the synthesis of TD-8-1.

Synthesis Example 9

(6-((2-Formyl-5-methoxyphenoxy)methyl)pyridin-2-yl)methyl nitrate (TD-9-1)

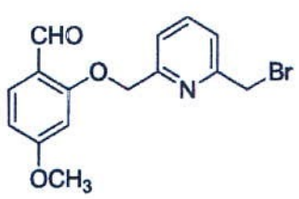


Compound TD-9-1 was prepared according to literature procedure for a similar compound. (Fotopoulou, T.; Iliodromitis, E. K.; Koufaki, M.; Tsotinis, A.; Zoga, A.; Gizas, V.; Pyriochou, A.; Papapetropoulos, A.; Andreadou, I.; Kremastinos, D. T., *Bioorg. Med. Chem.* **2008,** *16*, 4523-4531.).

Silver nitrate (76 mg, 0.5 mmol) was added to a solution of 2-((6-(bromomethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde (100 mg, 0.3 mmol) in anhydrous CH_3CN (5 mL). The reaction mixture was allowed to stir at 80 °C for 2 h. The reaction mixture was filtered through celite and washed with CH_2Cl_2 (15 mL) and evaporated under reduced pressure to yield a crude

product. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 5:1) to yield 53 mg (56%) of **TD-9-1** as a white – colored solid: mp 70-71 °C; IR (KBr, cm^{-1}): 1677 (C=O), 1285 (NO_2), 871 (ON); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$-d_1): δ 3.85 (s, 3H, OCH_3), 5.29 (s, 2H, CH_2), 5.56 (s, 2H, CH_2), 6.52 (d, J = 2.16 Hz, 1H, ArH), 6.58-6.61 (m, 1H, ArH), 7.34 (d, J = 7.68 Hz, 1H, ArH), 7.58 (d, J = 7.88 Hz, 1H, ArH), 7.79-7.85 (m, 2H, ArH), 10.42 (s, 1H, CHO); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 166.19, 163.05, 158.71, 155.53, 138.15, 131.18, 121.31, 121.28, 118.15, 106.95, 99.07, 74.14, 70.80, 55.68. MS (ESI) *m/z* found 341.08 $(M + Na)^+$. The purity of the compound was checked by HPLC and was found to be 99.8% pure.

2-((6-(Bromomethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde:



2-((6-(Bromomethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde, a precursor for the synthesis of TD-9-1 was prepared according to literature procedure for a similar procedure. (Fotopoulou, T.; Iliodromitis, E. K.; Koufaki, M.; Tsotinis, A.; Zoga, A.; Gizas, V.; Pyriochou, A.; Papapetropoulos, A.; Andreadou, I.; Kremastinos, D. T., *Bioorg. Med. Chem.* **2008,** *16*, 4523-4531.)

Triphenylphosphine (140 mg, 0.6 mmol) and tetrabromomethane (180 mg, 0.6 mmol) was added to a solution of 2-((6-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl)methoxy)-4-methoxybenzaldehyde (100 mg, 0.4 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (6 mL). The mixture was allowed to stir for 2 h at room temperature. The reaction mixture was neutralized with saturated $NaHCO_3$ at 0 °C (ice-bath) and extracted with EtOAc (10 mL). The organic portion was washed with brine (2 x 10 mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to yield a crude product. The product was purified by column chromatography (petroleum ether/EtOAc; 5:1) to yield 100 mg (75%) as a yellow-colored solid: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 3.85 (s, 3H, OCH_3), 4.56 (s, 2H, CH_2), 5.30 (s, 2H, CH_2), 6.53 (d, J = 2.16 Hz, 1H, ArH), 6.57-6.59 (m, 1H, ArH), 7.40 (d, J = 7.72 Hz, 1H, ArH), 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.76 (t, 1H, ArH), 7.84 (t, J = 8.68 Hz, 1H, ArH), 10.43 (s, 1H, CHO). The resulting compound was used for the synthesis of TD-9-1.

Synthesis Example 10

TD-7 hydrochloric salt

A solution of 1.0 M HCl (5 mL) in diethyl ether was added in a drop-wise fashion to a stirring solution of TD-7 (200 mg) in absolute ethanol (3 mL), resulting in precipitation of the hydrochloride salt of TD-7. Ethyl ether (10 mL) was added to the mixture to completely precipitate all the HCl salt. The compound was filtered by vacuum filtration, washed with more ether and further dried under vacuum. The yield obtained was 88%.

Biological Example 1

Oxygen equilibrium curve (OEC) studies

Studies were performed on compounds TD-7, TD-7-1, TD-8, TD-8-1, TD-9 and TD-9-1 using 100 mM stock solution in DMSO and normal whole blood (AA). TD-7, TD-8 and TD-9 are compounds with a hydroxymethyl group on the pyridine ring, while TD-7-1, TD-8-1 and TD-9-1 are the respective nitrate ester derivatives. The whole blood samples had hematocrit values ranging from 29-36%, and cell-free purified Hb of 10-12 g/dL in the absence or presence of effectors solubilized in DMSO at 2mM or in some cases with varying compound concentration. The blood samples were incubated in an IL 237 tonometer (*Instrumentation Laboratories, Inc.*, Lexington, MA) for about 5-7 min at 37 °C against a gas mixture containing O_2 concentrations of 0.804%, 2.935% and 5.528% and allowed to equilibrate at O_2 tensions of 6, 20 and 40 mmHg. After equilibration, the sample was removed *via* syringe and aspirated into a *ABL 700 series* table top automated blood gas analyzer (*Radiometer America, Inc.*, Westlake, OH) to determine total hemoglobin (tHb), hematocrit (Hct), pH, pCO_2, partial pressure of oxygen (pO_2), and the Hb oxygen saturation values (sO_2). Similar procedures were followed for concentration and time dependence studies. The measured values of pO_2 and sO_2 at each oxygen saturation level were then subjected to a non-linear regression analysis using the program Scientist (*Micromath,* Salt Lake City, UT) with the following equation:

$$sO_2\% = 100 \times \frac{pO_2^N \text{mmHg}}{P_{50}^N(\text{mmHg}) + pO_2^N(\text{mmHg})}$$

This equation was used to calculate P_{50} and Hill coefficient (N) values. Corresponding control experiments without the test compound ($P_{50control}$) but containing DMSO were also performed.

5HMF is known to exhibit optimal left-shifting activity between 1 to 2 h when incubated with whole blood necessitating the use of 1.5 h for the incubation time for our studies. The results are shown in Table **1** and Figure **1**. The most potent left-shifter was TD-7 with a ΔP_{50} shift of -17.0 mmHg, more potent than the positive control, 5HMF (ΔP_{50} of -11.1 mmHg).

Table 1. Effects of left-shifting compounds on Hb affinity for O_2 with normal whole blood.

Compound	Concentration (mM)	P_{50} (mmHg)	N[a]	ΔP_{50}[b] (mmHg)
5HMF	2	$20.2 \pm 2.0^{c\dagger}$	$1.8 \pm 0.1^{c\dagger}$	-11.1
TD-7	0.1	30.1^{d*}	2.5^{d*}	-0.5
	0.5	25.9^{d*}	2.1^{d*}	-4.7
	1	23.2^{d*}	1.7^{d*}	-7.4
	2	$14.3 \pm 4.3^{c\dagger}$	$1.3 \pm 0.3^{c\dagger}$	-17.0
TD-8	2	$25.9 \pm 2.5^{c\dagger}$	$1.9 \pm 0.1^{c\dagger}$	-5.4
TD-9	2	$21.1 \pm 1.2^{c\dagger}$	$1.6 \pm 0.3^{c\dagger}$	-10.2
TD-1	2	$27.4 \pm 2.3^{c\dagger}$	$1.9 \pm 0.1^{c\dagger}$	-3.9
TD-7-1	2	$23.4 \pm 1.6^{c\dagger}$	$1.7 \pm 0.1^{c\dagger}$	-7.9
TD-8-1	2	$30.8^{d\dagger}$	$2.1^{d\dagger}$	-0.5
TD-9-1	2	$28.6^{d\dagger}$	$1.9^{d\dagger}$	-2.7

[a]Hill coefficient; [b]ΔP_{50} is (P_{50} (control)–P_{50} (sample)) expressed in mmHg; [c]measurements were conducted in $n \geq 3$; [d]measurements were conducted in $n < 3$

Biological Example 2

Blood collection and purification of hemoglobin

Hemoglobin was prepared from centrifuging human blood at 2500 rpms for 20 min at 4 °C. The supernatant solution, debris and plasma were discarded from the centrifuge bottles, leaving behind RBCs. The RBCs were washed thrice with an excess volume of 0.9% NaCl, and once with 1.0% NaCl, each time centrifuging and discarding the supernatant solution. The RBCs

were pooled together into a chilled flask and hemolyzed to free Hb by adding 1-2 volume excess of 50 mM Tris buffer, pH 8.6 (containing EDTA). The mixture was allowed to stand in ice for 30 min with occasional stirring. The Hb solution was centrifuged at 10,000 rpm for 2 h at 4 °C. The supernatant Hb solution was pooled into a chilled flask and NaCl (40-60 mg/mL Hb solution) was slowly added with stirring. Hemoglobin solution was centrifuged at 10,000 rpm for 2 h at 4 °C to remove any cell stroma remnants. The clear supernatant Hb solution was pooled into a chilled flask and the "syrupy" pellet was discarded. Hemoglobin solution was dialyzed against 50 mM Tris buffer, pH 8.6 (containing EDTA) at 4 °C to remove NaCl and/or other low molecular weight impurities. Strips of standard cellulose dialysis tubing that had been washed 3-4 times and boiled for 10 min in deionized water were used for dialysis. The dialyzed Hb was further purified by ion-exchange chromatography using DEAE sephacel to exclude 2,3-DPG. The resin was equilibrated with 50 mM Tris buffer, pH 8.6, and the Hb solution was run through the column with 50 mM Tris buffer, pH 8.6 (containing EDTA). The pooled fractions were concentrated with an Amicon stirred cell (Amicon, Model 402), to a final HbA concentration of about 80-120 mg/mL. Concentrated HbA was stored at -80 °C.

Biological Example 3

OEC study with compounds TD-1, TD-7, TD-7-1, TD-8 and TD-9 with normal cell-free Hb

As a result of the low left-shifting activities of TD-8 and TD-9, as well as the nitrate ester derivatives, we further evaluated the activity of the compounds TD-1, TD-7, TD-7-1, TD-8, and TD-9 using cell-free Hb (devoid of any proteins, enzymes, plasma and cell membranes) to determine whether plasma protein or RBC membrane could have any effect on compound biological activity. Previous studies have shown limited effect of plasma protein and RBC membrane on 5HMF activity. The same tonometry procedure used on whole blood was used with the cell-free hemoglobin using 2mM compound and 12 mg/mL of Hb. The results are shown in Table **2.**

Table 2. Effects of left-shifting compounds on Hb affinity for O_2 with cell-free Hb.

Compound	P_{50} (mmHg)	N[a]	ΔP_{50}[b] (mmHg)
Control	12.5	2.6	-
5HMF	8.3	2.0	-4.2
TD-7	7.6	1.8	-4.9
TD-8	7.6	1.9	-4.9
TD-9	6.8	1.7	-5.7
TD-1	8.4	2.0	-4.1
TD-7-1	7.7	2.1	-3.9

[a]Hill coefficient; [b]ΔP_{50} is (P_{50} (control)–P_{50} (sample)) expressed in mmHg; measurements were conducted in n = 1.

Unlike the results obtained from the whole blood study (Table **1**), the results depicted in Table **2** show that all compounds exhibit significant left-shift in the OEC with cell-free Hb. TD-8 which barely shifted the OEC with whole blood now shows comparable shift as TD-7 with cell-free Hb. Also, TD-9 appears to be an even more potent left-shifter in cell-free Hb than TD-7, which was opposite to what was observed with whole blood. Although the nitrate esters still show less left-shift compared to the parent compounds, there is still significant improvement in their left-shifting potency with cell-free Hb. This observation suggests that the functional activities of both TD-8 and TD-9 are significantly affected by RBC membrane permeability issues and/or plasma protein binding resulting in their reduced allosteric activities.

Biological Example 4

Time-dependent OEC studies with TD-7

This study shows time-dependent left-shifting effect of TD-7 compared to 5HMF. All samples were pre-incubated with whole blood (Hct ~ 34%) with the specified compounds 0.5 mM concentrations for the specified time. The control experiment without test compound (P_{50} (control)) contains the same concentration of DMSO used to solubilize the test solution (P_{50} (sample)). The results are shown in Table **3** and Figure **2.**

Table 3. Effect of incubation time on Hb affinity for O_2 with whole blood for left-shifting compounds.

Compound	Incubation Time (Hours)	P_{50} (mmHg)	N[a]	ΔP_{50}[b] (mmHg)
Control	1	32.7 ± 0.2	2.5 ± 0.1	-
	2	33.0 ± 0.4	2.5 ± 0.1	-
	4	33.1 ± 0.6	2.5 ± 0.1	-
	6	34.2 ± 0.3	2.5 ± 0.1	-
	10	35.1 ± 0.3	2.5 ± 0.1	-
	12	36.1 ± 0.4	2.4 ± 0.1	-
5HMF	1	29.8 ± 0.2	2.2 ± 0.1	-2.9
	2	29.2 ± 0.3	2.2 ± 0.1	-3.8
	4	29.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	-3.9
	6	30.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	-4.2
	10	31.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	-3.3
	12	32.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	-3.3

Compound	Incubation Time (Hours)	P_{50} (mmHg)	N	ΔP_{50} (mmHg)
TD-7	1	28.2 ± 0.9	2.2 ± 0.2	-4.5
	2	28.2 ± 0.8	2.1 ± 0.1	-4.8
	4	28.8 ± 0.6	2.1 ± 0.1	-4.3
	6	29.1 ± 0.6	2.0 ± 0.2	-5.1
	10	30.6 ± 1.0	2.0 ± 0.1	-4.5
	12	31.1 ± 0.7	2.0 ± 0.2	-5.0

[a]Hill coefficient; [b]ΔP_{50} is (P_{50} (control)–P_{50} (sample)) expressed in mmHg;

[c]measurements were conducted in $n \geq 3$;. The P_{50} values of control were found to increase consistently, with incubation. While the P_{50} values for 5HMF seem to return to baseline after 6 h, there was no recovery for TD-7 even after 12 h suggesting TD-7 will have a longer sustained effect (Figure **2**).

Biological Example 5

NO release study for compounds TD-1, TD-7-1, TD-8-1 and TD-9-1

Griess assay was performed on the left-shifting nitrate ester compounds (TD-1, TD-7-1, TD-8-1, and TD-9-1) to measure the release of NO. Griess assay is a colorimetric assay, used for detection of NO in the form of nitrite ions (NO_2^-). NO released in solution is highly unstable, with a half-life of 1 to 30 s. It gets rapidly oxidized to NO_2^- which is detected by the Griess reagent. In this method, NO_2^- first reacts with the sulfanilamide present in the reagent to form a transient diazonium salt. This diazonium salt further reacts with *N*-naphthyl-ethylenediamine (NED) to form a stable azo compound which possesses an intense purple color. The absorbance of the azo compound was measured at 540 nm and was found to be directly proportional to the NO_2^- concentration in the sample. Sodium nitrite ($NaNO_2$) was used as a standard for the Griess assay. $NaNO_2$ samples in deionized water were prepared of concentrations within the linear range of the assay (1 – 100 μM). The samples were incubated for 30 min at 37 °C, after which Griess reagent was added and absorbance was measured at 540 nm. The measured absorbances were used to obtain a standard curve (Figure **3**). For the measurement of NO_2^- release for all the test compounds (TD-1, TD-7-1, TD-8-1 and TD-9-1), the absorbances were extrapolated from the standard $NaNO_2$ curve.

In this assay, a solution of the test compound (1 mL of a 2 mM solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)) was mixed thoroughly with a freshly prepared solution of L-cysteine (1 mL of a 36 mM solution in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4), and incubated at 37 °C, for 1 and 16 h under anaerobic conditions. After exposure to air for 10 min at 25 °C, an aliquot of the Griess reagent (1 mL) [freshly prepared by mixing equal volumes of 1.0% sulfanilamide (prepared and stored in aqueous 5% phosphoric acid) and 0.1% *N*-naphthylethylenediamine dihydrochloride in water] was added to an equal volume (1 mL) of each incubation solution after mixing. After 10 min, absorbance was measured at 540 nm using a Hewlett Packard (Agilent) 8453 UV-visible Spectroscopy. $NaNO_2$ solutions of 1-100 μM concentrations were used to prepare a standard nitrite curve of absorbance (nm) versus concentration (μM). The NO released (quantitated as NO_2^- release in μM) was calculated from the standard nitrite curve by extrapolation of the absorbance. Presence of NO_2^- shows formation of a pink color, the intensity

of which is directly proportional to the amount of NO_2^- present in the mixture. Table **4** represents NO_2^- release for compounds TD-1, TD-7-1, TD-8-1 and TD-9-1.

Table 4.
Absorbance and NO_2^- release values for Compounds **TD-1, TD-7-1, TD-8-1** and **TD-9-1.**

Incubation Time (Hours)	NO_2^- release[a] (μM) after 1 hour	NO_2^- release[a] (μM) after 16 hours
TD-1	4.02	11.93
TD-7-1	7.61	59.25
TD-8-1	21.94	102.54
TD-9-1	20.45	78.66

[a]The NO_2^- release (μM) was calculated from the standard $NaNO_2$ curve by extrapolating the absorbance (nm) of the test compounds against the concentration (μM) of $NaNO_2$.

All four compounds (TD-1, TD-7-1, TD-8-1 and TD-9-1) exhibited significant nitric oxide release (4.0 – 21.9 μM range at 1 h and 59 – 102.5 μM range at 16 h) upon incubation in the presence of L-cysteine. The NO release after 16 h incubation was found to be 3-10 fold higher than 1 h incubation. From Table **4**, it can be interpreted that for all the compounds, the NO release in the form of NO_2^- is found to increase with time, with TD-1 showing the least release, while TD-8-1 showed the most release.

Biological Example 6

***In vitro* RBC anti-sickling studies with compounds 5HMF, TD-1, TD-7 and TD-7-1**

In vitro RBC morphological (anti-sickling) analysis was conducted at the Children's Hospital of Philadelphia (by Drs. Toshio Asakura and Osheiza Abdulmalik). The anti-sickling effects of 5HMF, TD-7 HCl, TD-7, TD-1, and TD-7-1 were studied by incubating suspensions of SS cells in the absence or presence of three different concentrations of the effectors in the presence of air for 1 h at 37 °C followed by incubation under 4% oxygen at 37°C for 5 h. All samples were pre-incubated for 1 h with various compounds and then incubated under 4% O_2 for 5 h. Hb had a hematocrit of 30%. Table **5** represents the concentrations of the effectors along with the % inhibition of sickling cells. The hemolysates that had been prepared from SS cells after

incubation with test compounds were also subjected to cation-exchange HPLC as previously reported (Abdulmalik et al., 2005). Table 5 shows the effect of the various concentrations of the test compounds on the amount of modified Hb S which reflects Schiff-base adduct formation between the aromatic aldehyde and the protein.

Table 5. Effects of various concentrations of compounds on inhibition of SS cell sickling.

Compound	Concentration (mM)	Inhibition of sickled cells (%)
5HMF	0.5	4
	1.0	17
	2.0	35
	5.0	75
TD-7 HCl salt	1.0	100
	2.0	100
	5.0	100
TD-7	0.5	95
	1.0	95
	2.0	100
	5.0	100
TD-8	0.5	14
	1.0	20
	2.0	38
TD-9	0.5	26
	1.0	35
	2.0	57
TD-7-1	0.5	72
	1.0	100
	2.0	100

The anti-sickling effects of 5HMF, TD-7, TD-7 HCl salt, TD-1, and TD-7-1 were studied and the results shown in Table 5 and Figure 4 (% inhibition). In the absence of test compounds, about 95% of the Hb underwent sickling in 5 h. In the presence of the positive control, 5HMF, the percentage of the sickled cells decreased in a dose-dependent manner with 4, 17, 35 and 75% inhibition at 0.5 mM, 1 mM, 2 mM and 5 mM concentration, respectively. In comparison, TD-1, the nitrate ester analog of 5HMF showed only a modest decrease in the anti-sickling effect (Not shown in Table). This observation may be partly related to poor RBC membrane passage. Remarkably TD-7, either the free base or HCl salt, showed a very potent anti-sickling effect, as much as 95% inhibition at 0.5 mM concentration. A plateau effect was observed as the concentration of TD-7 was increased. The water soluble HCl salt of TD-7 interestingly barely showed any antisickling effect at 0.5 mM, but remarkably inhibited 100% sickling at 1.0 mM showing a plateau with increasing drug concentration. INN-312, the second-generation positive control, also decreased the percent of sickled cells in a dose-dependent manner but at 0.5 mM it only inhibited sickling to 15% compared to the 95% by TD-7. TD-7-1, the ester nitrate of TD-7 although preventing RBC sickling, hemolyzed the RBC at higher drug concentrations. Also, it seems to swell/hydrate the RBC due to possible intracellular uptake of water which could be beneficial to counteract the rigidity of sickle cells. TD-8 and TD-9 were not as potent as the TD-7 analog, only inhibiting 38 and 57% RBC sickling, respectively at 2 mM. In comparison, vanillin which is the parent scaffold for the INN and TD compounds only inhibited 12% RBC sickling at 5 mM.

References

1 Wishner, B. C.; Ward, K. B.; Lattman, E. E.; Love, W. E. Crystal structure of sickle-cell deoxyhemoglobin at 5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1975,** *98*, 179-194.

2 Vekilov, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: Is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br. J. Haematol* **2007,** *139*, 173-184.

3 Abdulmalik, O.; Safo, M. K.; Chen, Q.; Yang, J.; Brugnara, C.; Ohene-Frempong, K.; Abraham, D. J.; Asakura, T. 5-Hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *Br. J. Haematol.* **2005,** *128*, 552-561.

4 Nnamani, I. N.; Joshi, G. S.; Danso-Danquah, R.; Abdulmalik, O.; Asakura, T.; Abraham, D. J.; Safo, M. K. Pyridyl derivatives of benzaldehyde as potential antisickling agents. *Chem. Biodivers.* **2008,** *5*, 1762-1769.

5 Abdulmalik, O.; Safo, M. K.; Chen, Q.; Yang, J.; Brugnara, C.; Ohene-Frempong, K.; Abraham, D. J.; Asakura, T. 5-Hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *Br. J. Haematol.* **2005,** *128*, 552-561.

6 Abdulmalik, O.; Ghatge, M. S.; Musayev, F. N.; Parikh, A.; Chen, Q.; Yang, J.; Nnamani, I.; Danso-Danquah, R.; Eseonu, D. N.; Asakura, T.; Abraham, D. J.; Venitz, J.; Safo, M. K. Crystallographic analysis of human hemoglobin elucidates the structural basis of the potent and dual antisickling activity of pyridyl derivatives of vanillin. *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **2011,** *67*, 920-928.

7 Parikh, A.; Ghatge, M.; Safo, M; Venitz, J. Comparative pharmacodynamic (PD) profiling of the i*n-vitro* time- and concentration- dependent effects of known, synthetic allosteric effectors of hemoglobin (AEH). Presented at the 2011 American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition, Washington, DC, October 2011.

8 Rees, D. C.; Williams, T. N.; Gladwin, M. T. Sickle-cell disease. *The Lancet* **2010,** *376*, 2018-2031.

9 Sun, K.; Xia, Y. New insights into sickle cell disease: A disease of hypoxia. *Curr. Opin. Hematol.* **2013,** *20*, 215-221.

10 Ricart-Jané, D.; Llobera, M.; López-Tejero, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. *Nitric Oxide* **2002,** *6*, 178-185.

11 Mack, A. K.; Kato, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006,** *38*, 1237-1243.

12 Girgis, R. E.; Qureshi, M. A.; Abrams, J.; Swerdlow, P. Decreased exhaled nitric oxide in sickle cell disease: Relationship with chronic lung involvement. *Am. J. Hematol.* **2003,** *72*, 177-184.

13 Hunter, C. J.; Dejam, A.; Blood, A. B.; Shields, H.; Kim-Shapiro, D. B.; Machado, R. F.; Tarekegn, S.; Mulla, N.; Hopper, A. O.; Schechter, A. N.; Power, G. G.; Gladwin, M. T. Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator. *Nat. Med.* **2004,** *10*, 1122-1127.

14 Weiner D. L.; Hibberd, P. L.; Betit, P.; Cooper, A. B.; Botelho, C. A.; Brugngra, C. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA* **2003,** *289*, 1136-1142.

15 Miller, M. R.; Megson, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* **2007,** *151*, 305-21.

16 de Franceschi, L.; Baron, A.; Scarpa, A.; Adrie, C.; Janin, A.; Barbi, S.; Kister, J.; Rouyer-Fessard, P.; Corrocher, R.; Leboulch, P.; Beuzard, Y. Inhaled nitric oxide protects transgenic sad mice from sickle cell disease–specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. *Blood* **2003,** *102*, 1087-1096.

17 Kahn, M. J.; Maley, J. H.; Lasker, G. F.; Kadowitz, P. J. Updated role of nitric oxide in disorders of erythrocyte function. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* **2013,** *13*, 83-87.

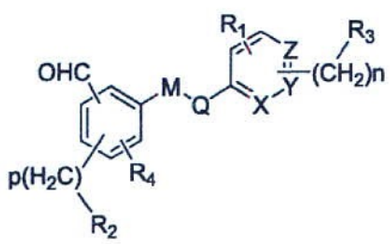
18 Perutz, M. F. Structure and mechanism of haemoglobin. *Br. Med. Bull.* **1976,** *32*, 195-208.

19 Stea, B.; Shaw, E.; Pinter, T.; Hackman, J.; Craig, M.; May, J.; Steffen, R. P.; Suh, J. H. Efaproxiral red blood cell concentration predicts efficacy in patients with brain metastases. *Br. J. Cancer* **2006,** *94*, 1777-1784.

20 Bunn, H.F. & Forget, G. B. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. **1986,** p 462, W. B. Saunders company.

What is claimed is:

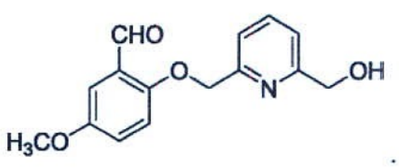
1. A compound of the formula:



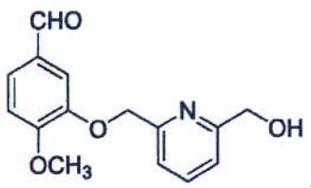
wherein R1 and R4 are the same or different and are H, OH, alkyl, alkoxy, halogen, aryl or O-aryl; and M and Q are different and are O or $(CH_2)q$; and R2 and R3 are the same or different and are H or OH; and X or Y or Z are the same or different and are C or N; and n is 0-5; and p is 0-5; and q is 0-5; with the proviso that when M is O, then either n is 1-5 or R1 is not H; and salts thereof.

2. A compound according to claim 1, wherein R1 is H; and M is O; and R2 is H; and R3 is OH; and p is 0; and salts thereof.

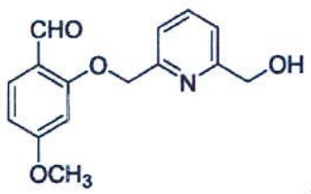
3. A compound having the following structure:



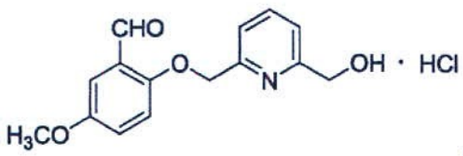
4. A compound having the following structure:



5. A compound having the following structure:

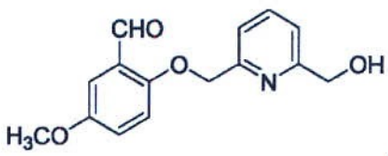


6. A compound having the following structure:

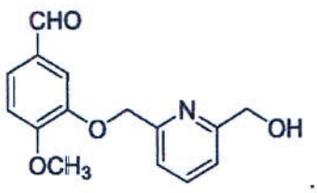


7. A method for treating a subject having sickle cell disease (SCD), comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a compound according to claim 1.

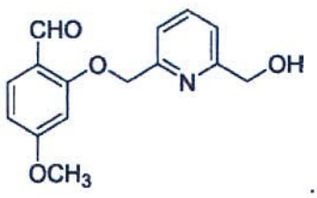
8. The method according to claim 7, wherein the compound is



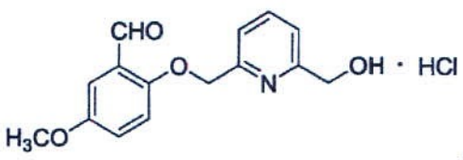
9. The method according to claim 7, wherein the compound is



10. The method according to claim 7, wherein the compound is



11. The method according to claim 7, wherein the compound is



12. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 500 mg of the compound.

13. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 300 mg of the compound.

14. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 200 mg of the compound.

15. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 100 mg of the compound.

16. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 50 mg of the compound.

17. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 100 mg to about 500 mg of the compound.

18. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 100 mg to about 300 mg of the compound.

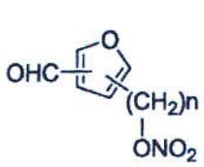
19. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 100 mg to about 200 mg of the compound.

20. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 500 mg to about 10,000 mg of the compound.

21. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 1,000 mg to about 10,000 mg of the compound.

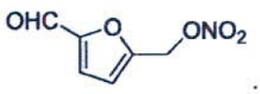
22. The method according to claim 7, wherein the subject is administered from about 5,000 mg to about 10,000 mg of the compound.

23. A compound of the formula:



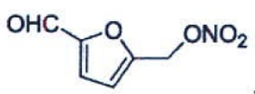
wherein n is 0-5; and salts thereof.

24. A compound according to claim 23, having the following structure:



25. A method for treating a subject having sickle cell disease (SCD), comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a compound according to claim 23.

26. The method according to claim 25, wherein the compound is



27. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 500 mg of the compound.

28. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 300 mg of the compound.

29. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 200 mg of the compound.

30. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 100 mg of the compound.

31. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 50 mg of the compound.

32. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 100 mg to about 500 mg of the compound.

33. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 100 mg to about 300 mg of the compound.

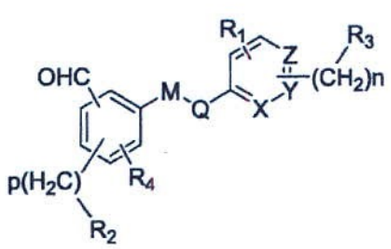
34. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 100 mg to about 200 mg of the compound.

35. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 500 mg to about 10,000 mg of the compound.

36. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 1,000 mg to about 10,000 mg of the compound.

37. The method according to claim 25, wherein the subject is administered from about 5,000 mg to about 10,000 mg of the compound.

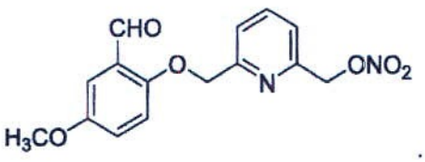
38. A compound of the formula:



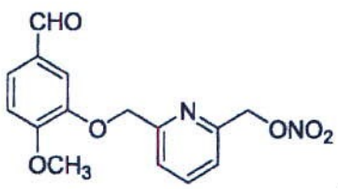
wherein R1 and R4 are the same or different and are H, OH, alkyl, alkoxy, halogen, aryl or O-aryl; and M and Q are different and are O or $(CH_2)q$; and R2 and R3 are the same and are ONO_2 or different with either as ONO_2 and the other as H or OH; and X or Y or Z are the same or different and are C or N; and n is 0-5; and p is 0-5; and q is 0-5; and salts thereof.

39. A compound according to claim 38, wherein R1 is H; and M is O; and R2 is H; and R3 is ONO_2; and p is 0; and salts thereof.

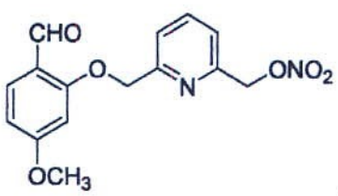
40. A compound according to claim 38, having the following structure:



41. A compound according to claim 38, having the following structure:

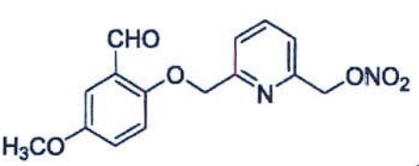


42. A compound according to claim 38, having the following structure:

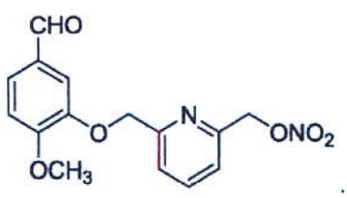


43. A method for treating a subject having sickle cell disease (SCD), comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a compound according to claim 38.

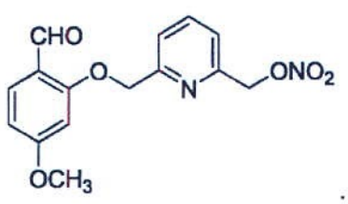
44. The method according to claim 43, wherein the compound is



45. The method according to claim 43, wherein the compound is



46. The method according to claim 43, wherein the compound is



47. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 500 mg of the compound.

48. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 300 mg of the compound.

49. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 200 mg of the compound.

50. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 100 mg of the compound.

51. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 20 mg to about 50 mg of the compound.

52. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 100 mg to about 500 mg of the compound.

53. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 100 mg to about 300 mg of the compound.

54. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 100 mg to about 200 mg of the compound.

55. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 500 mg to about 10,000 mg of the compound.

56. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 1,000 mg to about 10,000 mg of the compound.

57. The method according to claim 43, wherein the subject is administered from about 5,000 mg to about 10,000 mg of the compound.

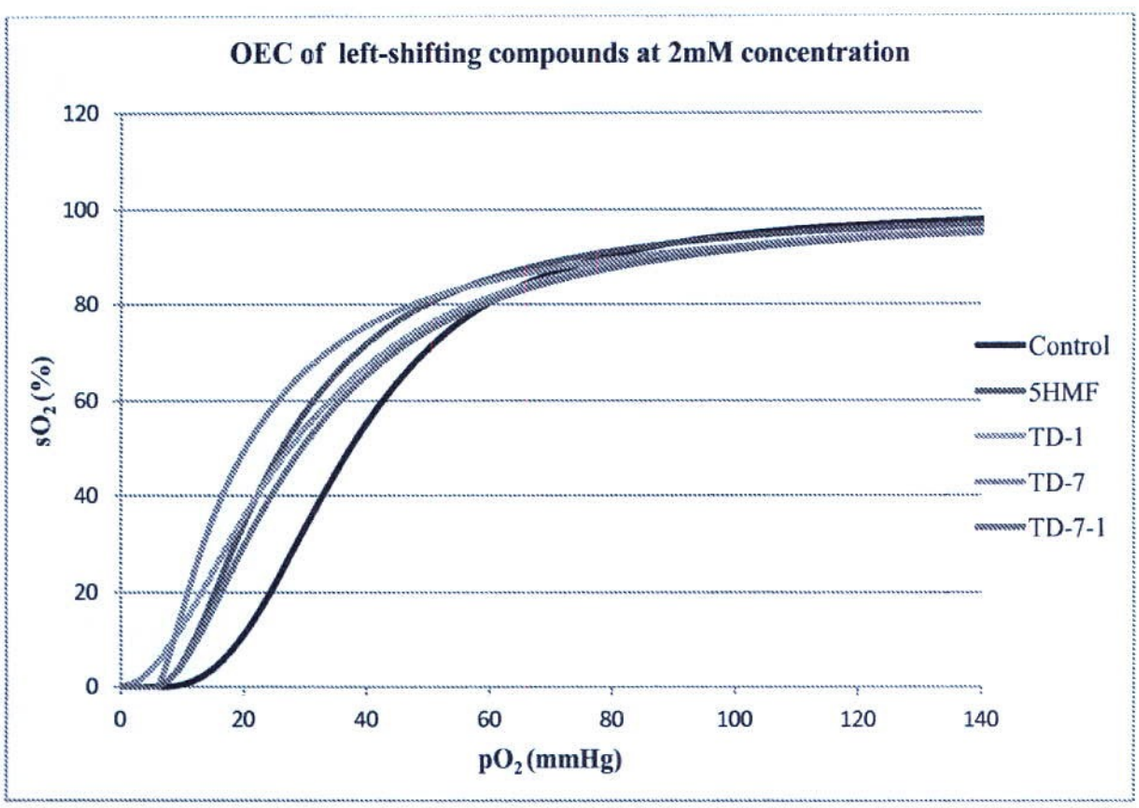

OEC of left-shifting compounds at 2mM concentration
120
100
80
60
40
20
0
sO_2 (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
pO_2 (mmHg)
Control
5HMF
TD-1
TD-7
TD-7-1

FIGURE 1

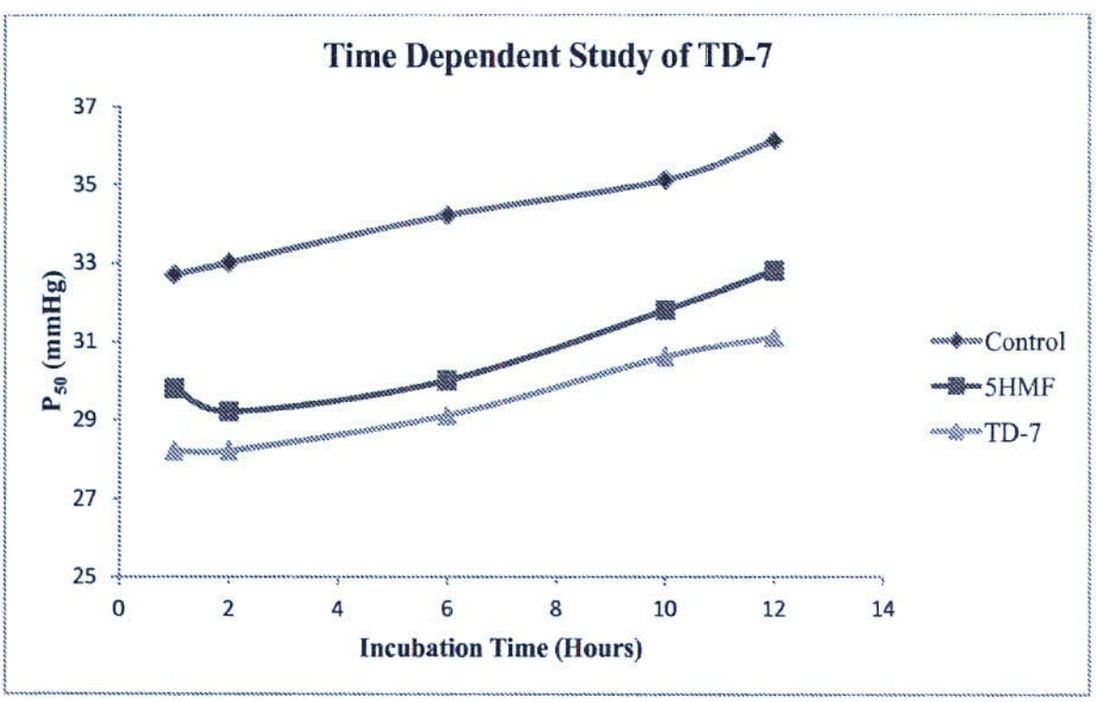

Time Dependent Study of TD-7
37
35
33
31
29
27
25
P_{50} (mmHg)
0
2
4
6
8
10
12
14
Incubation Time (Hours)
Control
5HMF
TD-7

FIGURE 2

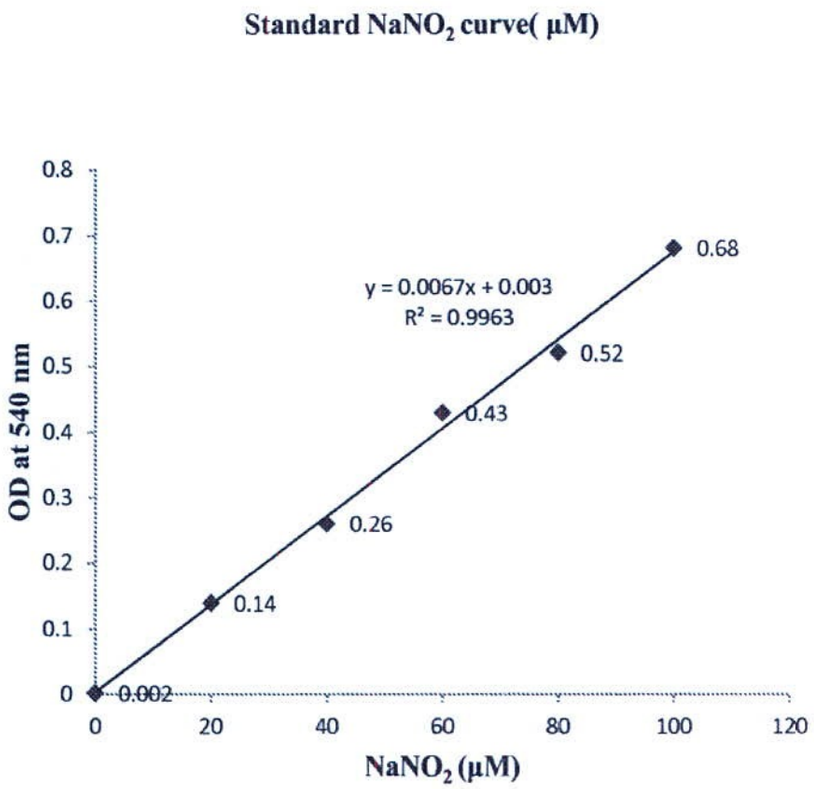

Standard NaNO2 curve(µM)
OD at 540 nm
NaNO2 (µM)
y = 0.0067x + 0.003
R² = 0.9963
0.002
0.14
0.26
0.43
0.52
0.68
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0
20
40
60
80
100
120

FIGURE 3

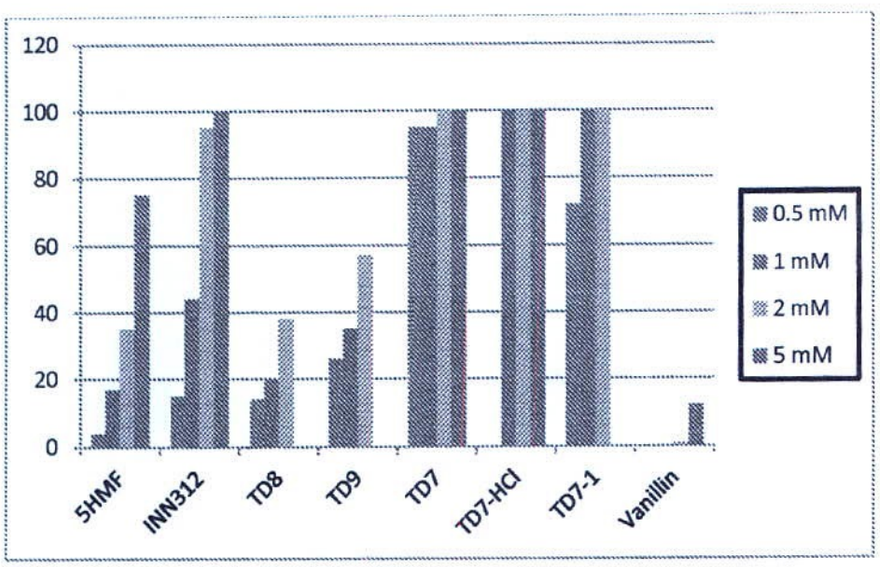

120
100
80
60
40
20
0
5HMF
INN312
TD8
TD9
TD7
TD7-HCl
TD7-1
Vanillin
0.5 mM
1 mM
2 mM
5 mM

FIGURE 4

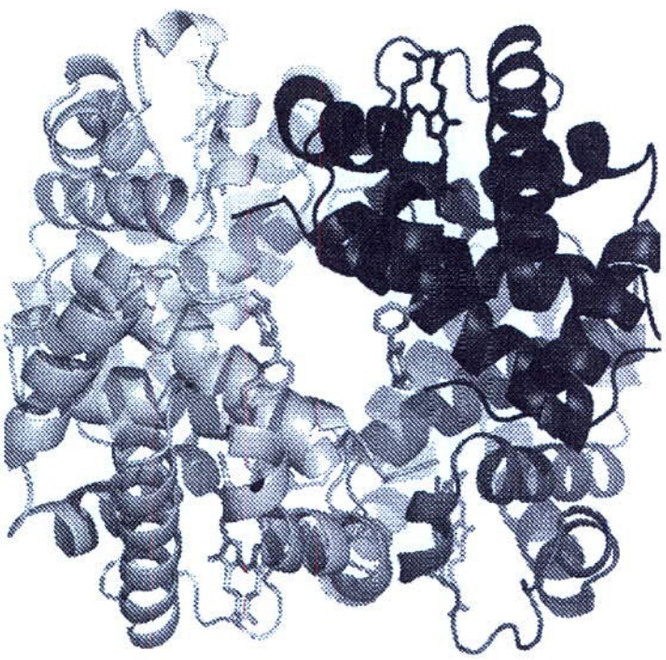


FIG. 5A

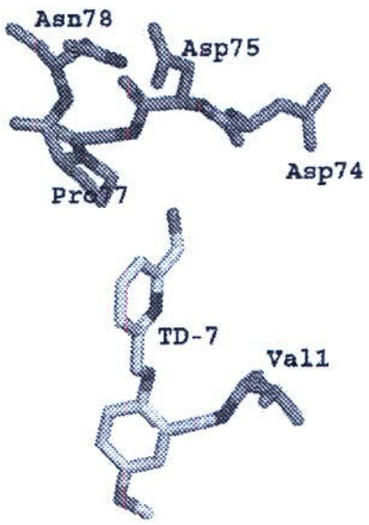


FIG. 5B

100

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0027959

Bogotá D.C., Marzo 22 de 2016 - 14:54:07

RECIBIDO DE : JUAN OSWALDO MARTINEZ MARTINEZ CC 80.843.544

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	764440563	22/03/2016	1.960.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	80.000.00	80.000.00
				$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-**-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 16-072456- -00000-0000
Fecha: 2016-03-22 15:24:17 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~101~~ 102

101

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0027960

Bogotá D.C., Marzo 22 de 2016 - 14:54:07

RECIBIDO DE : JUAN OSWALDO MARTINEZ MARTINEZ CC 80.843.544

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	764440563	22/03/2016	1.960.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
47	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	40.000.00	1.880.000.00
				$1.880.000.00

SON: **UN MILLON OCHOCIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 16-072456- -00000-0000

Fecha: 2016-03-22 15:24:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~101~~ 102

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 16-072456- -00000-0000

Fecha: 2016-03-22 15:24:17 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: ~~101~~ 102

102

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **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 INVENCIÓN 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 ☐