DERIVADOS DE HIDROQUINONA DISUSTITUIDOS EN 2,5 O 2,6 CON AL MENOS UN GRUPO CARBOXI, SULFO O AMIDO ÚTILES COMO MEDICAMENTOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se relaciona en general con derivados de hidroquinona novedosos, su preparación y con métodos de tratamiento de trastornos mediante la administración de esos compuestos a un animal de sangre caliente en necesidad de los mismos. La presente invención también se relaciona con compuestos que son útiles en la prevención y/o tratamiento de trastornos autoinmunes, inmunológicos, reumatológicos, vasculares, trastornos oftalmológicos, trastornos fibróticos, trastornos metabólicos y gastrointestinales, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, trastornos asociados con neoplasmas y cáncer, trastornos asociadas con hormonas y trastornos inmunológicos resultantes de enfermedades infecciosas virales y bacterianas y complicaciones de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Algunos derivados a base de hidroquinona como por ejemplo, derivados de ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico y específicamente dobesilato, etamsilato y persilato de calcio se conocen en el estado de la técnica como agentes activos para el tratamiento de la disfunción sexual masculina y otros

trastornos vasculares de origen endotelial, tanto solos como en combinación con otros agentes. Por ejemplo, la Patente Estadunidense No. 6,147,112 describe un método para el uso de derivados de ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico, preferiblemente dobesilato, etamsilato y persilato de calcio. El dobesilato de calcio o sulfonato de calcio de hidroquinona, con el nombre químico de sal de calcio de ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico, se vende como Dexium (Delalande) y Doxium (Carrion) y un proceso para su preparación se describe en la Patente Estadunidense No. 3,509,207.

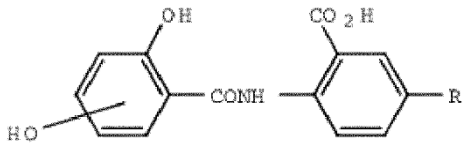
Existen muchos fármacos que contienen grupos fenol o catecol que sufren de metabolismo prematuro en el grupo hidroxi durante la absorción después de la administración oral. Los esfuerzos anteriores para proteger los grupos hidroxi generalmente no han sido exitosos puesto que los grupos protectores empleados o son demasiado lábiles (O = COR o O = CR) o demasiado estables (CH_3). De este modo un objetivo de la presente invención es proporcionar derivados novedosos de hidroquinonas, sus sales y formulaciones farmacéuticamente aceptables. Esos derivados de hidroquinona novedosos tienen propiedades antifibróticas, antiinflamatorias y antiangiogénicas particularmente potentes.

La publicación internacional WO2018160618A1 revela

ciertas hidroquinonas sustituidas, 1,4-quinonas, catecoles, 1,2-quinonas, antraquinonas y antrahidroquinonas para usarse como mediadores redox en tecnologías emergentes, celdas de combustible mediadas o baterías de flujo de mediador orgánico.

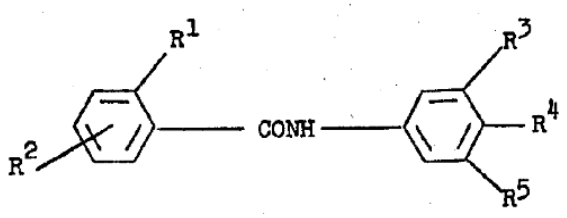
Richter et al, en Synthesis, 1976, 1976(3), 192-194 describe Bis-N-arilcarbamatos y 2,5-Dihidroxi-3,6-bis[N-arilcarboxamido]-1,4-benzoquinonas y su preparación a partir de 2,5-Dihidroxi-1,4-benzoquinona e Isocianatos de Arilo.

La publicación japonesa JP 51026839A revela Benzanilidas I (R = H, OH) como poseedoras de actividades intertubercular, analgésica, antinflamatoria y de excreción de ácido úrico:



Benzanilidas I

La patente estadunidense 3,973,038 otorgada también revela compuestos de benzoilanilina que tienen la fórmula general:



donde (R_1 = OH, aciloxi; R_2 = H, OH, alquilo inferior, halo, aciloxi; R_3 = Cl, Br, alquilo inferior; R_4 = OH, NH_2, alcoxi inferior, aciloxi; R_5 = H, halo, CO_2H, alquilo inferior, aciloxi) que tienen propiedades de inhibición enzimática *in vivo*, en particular, histamina desacetilasa y xantina oxidasa.

Sin embargo ninguno de los documentos del estado de la técnica describe la clase novedosa de compuestos derivados de hidroquinona de la presente invención, los cuales son particularmente útiles para la prevención y/o tratamiento de una variedad de enfermedades incluyendo trastornos autoinmunes, inmunológicos, reumatológicos, vasculares, trastornos oftalmológicos, trastornos fibróticos, trastornos metabólicos y gastrointestinales, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, trastornos asociados con neoplasmas y cáncer, trastornos asociadas con hormonas y trastornos inmunológicos resultantes de enfermedades infecciosas virales y bacterianas y complicaciones de las mismas.

La invención también se relaciona con el tratamiento, prevención y reducción de trastornos metabólicos, como la diabetes y obesidad. Cuando los niveles de glucosa en sangre se elevan posprandialmente, se secreta insulina y se estimulan las células de los tejidos

periféricos (musculo esqueléticos y grasa) para tomar activamente la glucosa de la sangre como fuente de energía. La pérdida de la homeostasis de la glucosa como resultado de la falla de la secreción o acción de la insulina típicamente resulta en trastornos metabólicos como la diabetes, la cual puede ser codesencadenada o exacerbada adicionalmente por la obesidad. Debido a que esas condiciones con frecuencia son fatales, se requieren estrategias para restablecer la eliminación adecuada de glucosa. Los trastornos metabólicos, particularmente los trastornos reguladores de la glucosa y lípidos, se están volviendo cada vez más predominantes a medida que las poblaciones en la era de los países industrializados y estilos de vida sedentarios se vuelven más comunes. Esos trastornos con frecuencia están interrelacionados y con frecuencia son predictores o resultados unos de otros.

Por ejemplo, la diabetes es causada por una combinación de resistencia a la insulina y secreción defectuosa de insulina por las células β pancreáticas. Los individuos con resistencia a la insulina con frecuencia tienen obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión, intolerancia a la glucosa y un estado protrombítico (Síndrome metabólico). De manera correspondiente, los individuos obesos en su conjunto están en mayor riesgo de adquirir resistencia a la insulina. La ruptura de una vía metabólica en

consecuencia puede desencadenar innumerables trastornos como hiperlipidemia obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico e hipertensión los cuales pueden a su vez desencadenar disfunción metabólica adicional que resultan en problemas sistémicos y colocan a los individuos en riesgo de complicaciones adicionales y morbilidad prematura. Los niveles de glucosa y lípidos son regulados en parte por el hígado el cual juega un papel en síntesis, almacenamiento, transformación y degradación de glucosa, proteínas y lípidos. Una enfermedad o traumatismo puede reducir considerablemente la capacidad del hígado para llevar a cabo esas actividades normales. En consecuencia, la mayoría de las manifestaciones clínicas de la disfunción hepática derivadas de daño celular y deterioro de las capacidades normales del hígado. La disfunción hepática puede resultar de condiciones genéticas, trastornos inflamatorios, toxinas como drogas y alcohol, trastornos inmunológicos, trastornos vasculares o condiciones metabólicas. Independientemente de la causa, el daño hepático puede tener un efecto sistémico sobre la función de los procesos metabólicos y la regulación de glucosa en sangre y niveles de lípidos en suero, exacerbando los estados de enfermedades crónicas y conduciendo al incremento del riesgo de más enfermedades y morbilidad. Los niveles reducidos y elevados de glucosa en sangre desencadenan ambos, respuestas

hormonales diseñadas para restablecer la homeostasis de la glucosa. La glucosa baja en sangre desencadena la liberación de glucagón de las células α pancreáticas. La glucosa alta en sangre la desencadena la liberación de insulina de células β pancreáticas. La ACTH y hormonas del crecimiento liberadas de la pituitaria, actúan para incrementar la glucosa en sangre inhibiendo la absorción por tejidos extrahepáticos. Los glucocorticoides también actúan para incrementar los niveles de glucosa en sangre inhibiendo la absorción de glucosa. El cortisol, el glucocorticoide principal liberado de la corteza adrenal, se secreta en respuesta al incremento de ACTH en circulación. La hormona de la médula suprarrenal, epinefrina, estimula la producción de glucosa activando la glucogenólisis en respuesta a estímulos estresantes, trastornos metabólicos que llevan a cabo el metabolismo de glucosa y lípidos y como la hiperlipidemia obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico e hipertensión tienen consecuencias a largo plazo sobre la salud que conducen a condiciones crónicas incluyendo enfermedad cardiovascular y morbilidad prematura. Esos trastornos metabólicos y cardiovasculares podrían estar interrelacionados agravándose o provocándose entre sí y generando mecanismos de retroalimentación que son difíciles de interrumpir. Los tratamientos farmacéuticos actuales para los trastornos metabólicos y cardiovasculares incluyen

combinaciones de fármacos para reducir los lípidos, fármacos hipoglucémicos, agentes antihipertensivos, dieta y ejercicio. Sin embargo, los regímenes terapéuticos complicados pueden causar problemas de polimedicación de incremento de los efectos secundarios, interacciones fármaco-fármaco, falta de compromiso y aumento de los errores de medicación. Por lo tanto, existe una necesidad apremiante e insatisfecha en la técnica de identificar nuevos compuestos, formulaciones y métodos para tratar de forma segura y eficaz los trastornos metabólicos y cardiovasculares y las condiciones asociadas con los trastornos metabólicos.

Los ejemplos de condiciones metabólicas incluyen, pero no se limitan a, dolor, cicatrización de heridas, fiebre, condiciones neuroinflamatorias y neurodegenerativas, inflamación, producción de calor, homeotermia, degradación de glicéridos, glucólisis, ciclo de Krebs, fermentación, fotosíntesis, tasa metabólica, tensión biótica y abiótica, secreciones, tensión oxidativa, tensión, crecimiento neoplásico, condiciones de la piel, condiciones cardiovasculares, condiciones neuroinflamatorias y neurodegenerativas, trastornos mentales y conductuales. Esos procesos o condiciones pueden ocurrir en una célula, grupo de células o un organismo entero.

Los progresos recientes en la medicina molecular han conducido a ciertas mejoras en el diagnóstico y

tratamiento de las enfermedades neoplásicas. A pesar de este éxito parcial, esas patologías siguen siendo un desafío considerable. Para ciertos tipos de cánceres, la terapia actual en algunos casos falla por varias razones. Por un lado, está la resistencia inherente de las células tumorales, su capacidad de mutación constante y evasión de la terapia, por otro lado, está también la heterogeneidad del ambiente tumoral. Se mostró que los tumores del mismo tipo difieren ampliamente altamente para sujetos individuales desde el punto de vista de su perfil genómico, lo cual indica la necesidad de la llamada terapia "personal". Un problema aún más grande es la heterogeneidad de las mutaciones en el mismo tumor como ha sido mostrado recientemente para tumores renales y puede esperarse está situación para otros tipos de tumores también. Por esta razón, es necesario buscar nuevos enfoques y puntos de intervención invariables comunes para todas o la mayoría de las células malignas en el tumor y que afectan preferiblemente las funciones esenciales en las células cancerosas. Parece ser que ese punto de intervención podría ser a nivel metabólico, digamos por ejemplo la mitocondria, es decir organelos que son fundamentales para la generación de la energía necesaria para todos los procesos fisiológicos, así como patofisiológicos en las células. Aunque las células tumorales usan, en gran parte, la llamada glucólisis aeróbica para la generación de energía, la

respiración mitocondrial (es decir, consumo de oxígeno ligado a la formación de ATP) es inherente a la mayoría (si no es que todos) los tipos de tumores. En consecuencia existe una necesidad no satisfecha e irresistible en el estado de la técnica de identificar nuevos compuestos, formulaciones y métodos para tratar esos trastornos neoplásicos de manera segura y efectiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona derivados de hidroquinona novedosos, procesos novedosos de preparación e intermediarios clave novedosos. La presente invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de esos derivados de hidroquinona y excipientes farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona además un método de tratamiento y/o prevención de la patología angiogénica (vascular), inflamatoria y/o fibrótica, puesto que tienen efectos antifibróticos, antiinflamatorios y antiangiogénicos. La presente invención por lo tanto, finalmente proporciona un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno incluyendo trastornos inmunológicos/reumatológicos/vasculares, trastornos oftalmológicos, trastornos fibróticos, trastornos metabólicos y gastrointestinales, trastornos asociados con neoplasmas y cáncer que comprende administrar a un sujeto en necesidad una

dosis terapéuticamente efectiva de los compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención como se describió anteriormente. En particular, la presente invención proporciona un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno autoinmune, inmunológico, reumatológico, vascular, trastornos oftalmológicos, trastornos fibróticos, trastornos metabólicos y gastrointestinales, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, trastornos asociados con neoplasmas y cáncer, trastornos asociadas con hormonas y trastornos inmunológicos resultantes de enfermedades infecciosas virales y bacterianas y complicaciones de las mismas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: (A) Imágenes de inmunofluorescencia confocal de permeabilidad vascular evaluada por fuga de tinte azul Evans en montajes retinales completos en un ratón representativo de cada grupo. Las flechas indican la ubicación de la extravasación. Barras de escala, 30 µm. (B) Cuantificación de la fuga vascular evaluando el número de extravasaciones por campo (0.44 mm^2). El efecto las gotas para los ojos de Ia-007a fue significativo reduciendo la fuga vascular al mismo nivel que ocurre en el grupo de control no diabético. *$p < 0.01$ en comparación con los otros grupos.

Figura 2: (A) El puntaje de Schmidt es la evaluación de la eficacia de los compuestos sobre la base de

los cuatro criterios de evaluación histopatológica que describen lesión pancreática sobre la base de los siguientes puntajes (número entre paréntesis) para los cuatro parámetros, (a) Edema Intersticial edema con puntajes de (0) Ninguno (1) Interlobular (2) Lóbulo involucrado (3) Isla aislada similar a células acinares. (b) Infiltración inflamatoria = Infiltración de leucocitos con puntajes de (0) Ninguno, (1) < 20%, (2) 20%-50%, (3) > 50%. (c) Necrosis parenquimal = Necrosis de células acinares con puntajes de (0) Ninguno, (1) < 5%, (2) 5%-20%, (3) > 20%. (d) Hemorragia con puntajes de (0) Ninguno, (1) 1-2 puntos, (2) 3-5 puntos, (3) > 5 puntos. El puntaje de Schmidt más alto = 10 es el inducido por el tratamiento con cerulina + tratamiento con vehículo y el puntaje más bajo = 0 es en animales no inducidos. El puntaje de Schmidt es el total de los puntajes a+b+c+d y **** significa la diferencia estadísticamente significativa con el grupo inducido con cerulina como se muestra en la Figura 2. Todos los productos muestran puntajes de Schmidt mejorados comparados con los animales de control con cerulina.

Figuras 3A-D: Las Figuras 3A-B representa una lista de enfermedades con las citocinas principales involucradas en las enfermedades seleccionadas (Akdis M. et al, *J* Allergy Clin Immunol 2016; 138:984-1010) y la Figura 3C representa parte de los resultados de la búsqueda de citocinas y genes

clasificados por puntajes y que probablemente están involucrados en la enfermedad seleccionada dados como un ejemplo “retinopatía diabética” después de la búsqueda en https://www.targetvalidation.org/. En la Figura 3D, la búsqueda se efectuó usando VEGFA como la citocina para encontrar una lista de enfermedades donde se menciona al VEGFA. Solo parte de las enfermedades donde el VEGFA está involucrados se representan en la Figura 3D. ref: Open Targets Platform: new developments and updates two years on. Denise Carvalho et al (Nucleic Acids Research, Volume 47, Issue D1, 08 January 2019, D1056-D1065, https://doi.org/10.1093/nar/gky1133).

Figura 4 (A-D): Representa una tabla que lista las condiciones y rendimientos de compuestos del tipo Ia-Id como se describe en los Ejemplos 1.1 a 1.4. Rendimiento total calculado a partir del material de partida ácido 2,5-dihidroxitereftálico.

Figura 5 (A-C): Representa una tabla que lista las condiciones y rendimientos de compuestos del tipo IIa-IIc como se describe en los Ejemplos 1.5 a 1.7.

Figura 6: Representa una tabla que lista las condiciones y rendimientos de compuestos del tipo IIIa y IIIb como se describe en los Ejemplos 1.8 y 1.9.

Figura 7: Representa una tabla que lista las condiciones y rendimientos de compuestos del tipo IIIc como

se describe en el Ejemplo 1.10.

Figura 8: Es una tabla que lista los procedimientos de desprotección como se describe en el Ejemplo 1.12 con relación a los compuestos del tipo V.

Figura 9: Muestra los niveles de glucosa en sangre en ayunas (promedio ± desviación estándar de todos los animales) en el modelo de diabetes inducido por STZ en todos los animales de cada grupo muestreado después del día 0 antes de la dosificación y después de 7 y 14 días dosificando diariamente por las rutas intravenosas u os.

Figura 10: Muestra la aceleración de la cicatrización de heridas en el modelo de diabetes inducida por STZ en 3 animales por grupo muestreado después de 7 días dosificando diariamente por las rutas intravenosas u os.

Figura 11: La Figura 11A muestra imágenes representativas de fibrosis pulmonar el día 21 de tratamiento; (A1) no inducida (sano); A2, inducida con Bleomicina con tratamiento con vehículo; A3, inducida con Bleomicina con tratamiento con pirfenidona 100 mg/kg; A4, inducida con Bleomicina con tratamiento con IVc-059a. La Figura 11B muestra el puntaje de sano, inducida con Bleomicina inducida sin tratar contra pirfenidona contra IVc-059a.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En la presente se describen compuestos novedosos

útiles para el tratamiento de sujetos que padecen de una enfermedad, trastorno o disfunción. Los ejemplos de esas enfermedades, trastornos o disfunciones incluyen sin limitación trastornos autoinmunes, metabólicos, inflamatorios, degenerativos y neoplásicos, en particular patologías inflamatorias, enfermedades angiogénicas y/o trastornos fibróticos como retinopatía diabética, nefropatía diabética, espondilitis anquilosante, pancreatitis crónica, fibrosis hepática, fibrosis renal, así como enfermedades metabólicas causadas por disfunciones pancreáticas.

En lo sucesivo, a menos que se especifique otra cosa, la colección de enfermedades, trastornos o disfunciones que pueden tratarse utilizando los compuestos novedosos descritos en la presente se denominan colectivamente "condiciones médicas". El término "sujeto", como se usa en la presente, comprende cualquiera y todos los organismos e incluye el término "paciente". Un sujeto a tratar de acuerdo a los métodos descritos en la presente puede ser uno que haya sido diagnosticado por un facultativo médico como si padeciera de una condición médica. El diagnóstico puede realizarse por cualquier medio adecuado. Un experto en el estado de la técnica comprenderá que un sujeto a tratar de acuerdo con la presente descripción podría haber sido sometido una prueba estándar para diagnosticar las condiciones médicas. Como es conocido por el experto en el

estado de la técnica, las características clínicas de las condiciones médicas del tipo descritas en la presente varían de acuerdo a los mecanismos patológicos.

En la presente "tratar" se refiere a utilizar los compuestos descritos para propósitos terapéuticos. El tratamiento terapéutico puede administrarse, por ejemplo, a un sujeto que padece de la condición médica para mejorar o estabilizar la condición del sujeto. En consecuencia, en las reivindicaciones y modalidades descritas en la presente, tratar se refiere a un sujeto sometido para propósitos terapéuticos, a las metodologías descritas en la presente.

Los profármacos como se usa en la presente se refieren a cualquier estrategia de profármaco amplia. Por ejemplo, las estrategias de profármaco fueron reconocidas formalmente por Adrian Albert en 1958 (Albert, A. Chemical aspects of selective toxicity. Nature, 1958, 182, 421-422) pero comenzaron a principios del siglo pasado como es ejemplificado por la metanamina, fenacetina y prontosil. Los profármacos generalmente son moléculas con poca o ninguna actividad farmacológica pero que tienen una responsabilidad estructural incorporada, ya sea por casualidad o por diseño, que permite la bioconversión *in vivo* en el fármaco activo. La conversión puede ocurrir a través de un proceso químico o enzimático o una combinación de los dos. Las moléculas activas con frecuencia están asociadas con propiedades

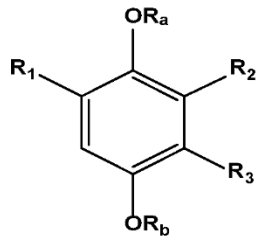
fisiológicas indeseables que crean desafíos considerables para entrega al blanco biológico apropiado. Los profármacos pueden mejorar la inestabilidad metabólica que se atribuye típicamente al metabolismo hepático. De manera similar el metabolismo intestinal indeseable de los fármacos puede ser superado por estrategias de profármaco selectivas. Esta inestabilidad puede reducir considerablemente la cantidad total de un fármaco que alcance la circulación sistémica y su objetivo. Los profármacos pueden usarse para proteger fármacos activos contra este efecto del primer paso enmascarando un grupo funcional metabólicamente lábil pero farmacológicamente esencial, como un fenol, para evitar el metabolismo rápido.

Los profármacos obtenidos a través de modificaciones estructurales se diseñan para influenciar las propiedades fisicoquímicas inherentes de una molécula para permitir su liberación o entrega. Esos desarrollos no siempre se integran en el diseño de nuevas moléculas en la fase de descubrimiento. Con frecuencia la optimización análoga, el camino preferido a seguir. La implementación temprana de una estrategia de profármacos puede resultar en un desarrollo clínico más rápido y, finalmente, la comercialización de un producto farmacéutico.

Pueden aplicarse muchas estrategias de profármacos para influenciar la lipofilicidad de un fármaco original. La

lipofilicidad de los fármacos ha sido mejorada enmascarando sus funcionalidades polares e ionizadas por promotores de hidrocarburo de cadena corta. Los grupos hidrofílicos hidroxilo, carboxilo, fosfato o amina y otros cargados negativa o positivamente han sido convertidos exitosamente a derivados de ésteres de alquilo o arilo o N-acilo más lipofílicos, los cuales de hidrolizan rápidamente de nuevo a los fármacos originales en el cuerpo por esterasas o peptidasas ubicuas.

La presente invención proporciona en consecuencia un compuesto de Fórmula (I):



Fórmula I

donde:

R_a, R_b = H, acilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, arilo de C_6-$C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo de C_1-C_7NHCO, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6 o alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo

R_1 = $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$ o $CONH$-R_{10};

R_2 y R_3 son H o R_5, con la condición de que cuando

uno de R_2 y R_3 es R_5, el otro es H y cuando uno de R_2 y R_3 es H, el otro es R_5;

R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_5 = R_6, R_7 o R_8;

R_6 = $CONH\text{-}R_9$, $CONHCOR_9$, $CONH(CH_2)_n\text{-}R_9$ o $CONHCH(COOR_4)(CH_2)_kR_9$, heteroarilo-$R_9$ donde k = 0-4;

R_7 = benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N] o flúor;

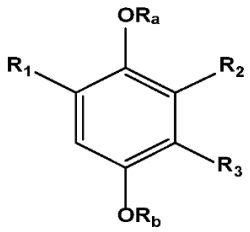
R_8 = $(CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$;

X = O, S, SO_2, NH, NAc o $N(CH_2)_qR_9$;

R_9 = arilo o heteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, SO_3H, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N], flúor, C = O, $NHCO\text{-}R_{10}$; R_{10} = arilo o heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, SO_3H, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N], flúor;

donde el arilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 6 a 14 átomos de carbono, seleccionado de entre el grupo fenilo, naftilo, bifenilo; y el heteroarilo R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 1 a 14 átomos de carbono y uno más nitrógenos; y n, m, p y q son independientemente 1-4.

La presente invención proporciona además un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde:

R_a, R_b = H, acilo de C_1-$_4$, arilalquilo de C_{1-4}, arilo de C_6-$C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo de C_1-C_7NHCO, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6 o alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo

R_1 = $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$ o $CONH$-R_{10};

R_2 y R_3 son H o R_5, con la condición de que cuando uno de R_2 y R_3 es R_5, el otro es H y cuando uno de R_2 y R_3 es H, el otro es R_5;

R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-

C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

$R_5 = R_6$ o R_7,

R_6 = $CONH-R_9$, $CONHCOR_9$, $CONH(CH_2)_n-R_9$ o $CONHCH(COOR_4)(CH_2)_kR_9$; donde k = 0-4;

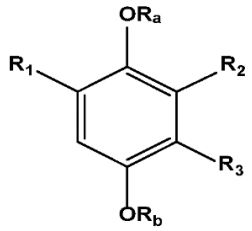
R_7 = benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N] o flúor;

R_9 = arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, SO_3H, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N], flúor, C = O o $NHCO-R_{10}$;

R_{10} = arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, SO_3H, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N] o flúor; donde el arilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 6 a 14 átomos de carbono, seleccionado de entre fenilo, naftilo, bifenilo; y el heteroarilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 1 a 14 átomos de carbono y uno más nitrógenos; y n, es independientemente 1-4.

La presente invención también proporciona un

compuesto de fórmula (I):



(I)

donde:

R_a, R_b = H, acilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, arilo de C_6-$C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo de C_1-C_7NHCO, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6 o alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo

R_1 = $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$ o $CONH$-R_{10};

R_2 y R_3 son H o R_5, con la condición de que cuando uno de R_2 y R_3 es R_5, el otro es H y cuando uno de R_2 y R_3 es H, el otro es R_5;

R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_5 = R_8

R_8 = $(CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$;

X = O, S, SO_2, NH, NAc o $N(CH_2)_qR_9$;

R_9 = arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, SO_3H, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N], flúor, C = O o NHCO-R_{10};

R_{10} = arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, SO_3H, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N], flúor;

donde el arilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 6 a 14 átomos de carbono, seleccionado de entre el grupo fenilo, naftilo, bifenilo; donde el heteroarilo R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 1 a 14 átomos de carbono y uno más nitrógenos; y n, m, p y q son independientemente 1-4.

La expresión "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificado que contiene de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 12 átomos de carbono, especialmente de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) átomos de carbono, por ejemplo un metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo o ter-butilo. Además, el término alquilo se refiere a grupos en los cuales uno o más átomos de hidrógeno han sido reemplazados por un átomo de halógeno (preferiblemente F o Cl) como, por

ejemplo, a 2,2,2-tricloroetilo o un grupo trifluorometilo.

La expresión "acilo" se refiere a los grupos (alquilo)-C(O)-, (arilo)-C(O)-, (heteroarilo)-C(O)-, (heteroalquilo)-C(O)- y (heterocicloalquilo)-C(O)-, donde el grupo está unido a la estructura principal a través de la funcionalidad carbonilo. En algunas modalidades, es un radical acilo de C_1-C_4 el cual se refiere al número total de átomos de la cadena o el anillo de la porción del alquilo, arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo del grupo aciloxi más el carbono del carbonilo del acilo, es decir otros tres átomos del anillo o de la cadena más carbonilo.

La expresión "arilo" se refiere a un grupo aromático que contiene uno o más anillos que contienen de 6 a 14 átomos de carbono en el anillo, preferiblemente de 6 a 10 (especialmente 6) átomos de carbono en el anillo.

La expresión "aralquilo" o "arilalquilo de C_1-C_4" se refiere a grupos que contienen ambos de arilo y también grupos alquilo, alquenilo, alquinilo y/o cicloalquilo de acuerdo con las definiciones anteriores, pero no se limitan a bencilo, 2-feniletilo, 3-fenilpropilo y 2-naft-2-iletilo. Un grupo aralquilo preferiblemente contiene uno o dos sistemas de anillos aromáticos (1 o 2 anillos) que contienen de 6 a 10 átomos de carbono y uno o dos grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo que contienen de 1 o 2 a 6 átomos de carbono y/o un grupo cicloalquilo que contiene 5 o 6 átomos de carbono en el

anillo.

La expresión “heteroarilo” se refiere a un grupo aromático que contiene uno o más anillos que contienen de 5 a 14 átomos en el anillo, preferiblemente de 5 a 10 (especialmente 5 o 6 o 9 o 10) átomos en el anillo y contiene uno o más (preferiblemente 1, 2, 3 o 4) átomos de oxígeno, nitrógeno, fósforo o azufre en el anillo (preferiblemente O, S o N). Los ejemplos son los grupos piridilo (por ejemplo, 4-piridilo), imidazolilo (por ejemplo, 2-imidazolilo), fenilpirrolilo (por ejemplo, 3-fenilpirrolilo), tiazolilo, isotiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo oxadiazolilo, tiadiazolilo, indolilo, indazolilo, tetrazolilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, indazolilo, indolilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzotiazolilo, piridazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, purinilo, carbazolilo, acridinilo, pirimidilo, 2,3-bifurilo, pirazolilo (por ejemplo 3-pirazolilo) e isoquinolinilo.

La expresión “benzoheteroarilo” o “benzoheteroaromático” se refiere a anillos bicíclicos que comprenden un anillo de fenilo fusionado a un anillo aromático monocíclico. Los ejemplos de benzoheteroarilo incluyen bencisoxazolilo, benzoxazolilo, bencisotiazolilo, benzotiazolilo, bencimidazolilo, benzofurilo, benzotienilo

(incluyendo S-óxido y dióxido), quinolilo, isoquinolilo, indazolilo, indolilo y similares.

El término "azol" se refiere a un grupo heteroarilo de 5 miembros que tiene un átomo de nitrógeno y entre 0 y 3 heteroátomos adicionales en el anillo seleccionados de N, O o S. El imidazol oxazol, tiazol y tetrazol son los grupos azol representativos.

La expresión "cicloalquilo" se refiere a un grupo cíclico saturado parcialmente insaturado (por ejemplo, un grupo cicloalquenilo) que contiene uno o más anillos (preferiblemente 1 o 2) y contiene de 3 a 14 átomos de carbono en el anillo, preferiblemente de 3 a 10 (especialmente 3, 4, 5, 6 o 7) átomos de carbono en el anillo. Los ejemplos específicos de grupos cicloalquilo son un grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo.

La expresión "opcionalmente sustituido" se refiere a grupos en los cuales al menos uno u opcionalmente dos, tres o más átomos de hidrógeno podrían haber sido reemplazados por átomos de flúor, cloro, bromo, yodo o por grupos OH, = O, SH, = S, NH_2, = NOH, N_3 o NO_2. Esta expresión se refiere además a grupos que pueden estar sustituidos por al menos uno, dos, tres o más grupos alquilo de C_1-C_{10}, alquenilo de C_2-C_{10}, alquinilo de C_2-C_{10}, heteroalquilo, cicloalquilo de C_3-C_{18}, heterocicloalquilo de C_2-C_{17}, alquilcicloalquilo de C_4-C_{20}, heteroalquilcicloalquilo de C_2-C_{19}, arilo de C_6-C_{18},

heteroarilo de C_1-C_{17}, aralquilo de C_7-C_{20} o heteroaralquilo de C_2-C_{19} no sustituidos. Esta expresión se refiere especialmente además a grupos que pueden estar sustituidos por uno, dos, tres o más grupos alquilo de C_1-C_6, alquenilo de C_2-C_6, alquinilo de C_2-C_6, heteroalquilo de C_1-C_6, cicloalquilo de C_3-C_{10}, heterocicloalquilo de C_2-C_9, alquilcicloalquilo de C_7-C_{12}, heteroalquilcicloalquilo de C_2-C_{11}, arilo de C_6-C_{10}, heteroarilo de C_1-C_9, aralquilo de C_7-C_{12} o heteroaralquilo de C_2-C_{11} no sustituidos.

De acuerdo con una modalidad preferida, todos los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquilcicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, aralquilo y heteroaralquilo descritos en la presente pueden estar opcionalmente sustituidos.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I), donde:

(A)

R_a, R_b = H, acilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, arilo de C_6-$C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo de C_1-C_7NHCO, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6 o alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo,

R_1 = $COOR_4$; R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6

funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_6 = CONH-R_9;

o

(B)

R_a, R_b = H, acilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, arilo de C_6-C_{10}CO, HOOC$(CH_2)_n$CO, alquilo de C_1-C_7NHCO, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6 o alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo,

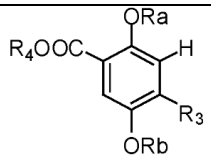
R_1 = $COOR_4$; R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

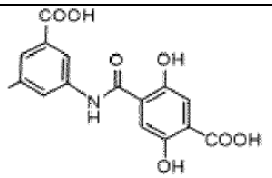
R_3 = H; R_2 = R_5; y

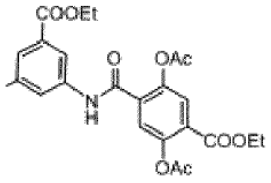
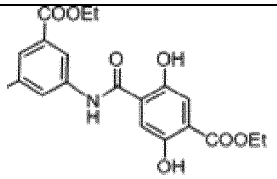
R_5 = R_6 = CONH-R_9.

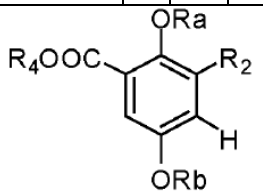
En una primera modalidad, la presente invención incluye en consecuencia compuestos de acuerdo con la Tabla 1:

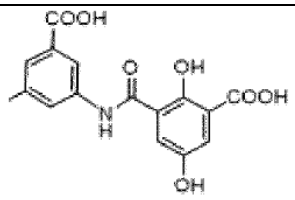
Tabla 1

A.	 R3 = R5 = CONHR9				
No. de Compuesto	**Nombres químicos del compuesto**	**Ra**	**Rb**	**R4**	**R9**
Ia-001a	Ácido 4-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-carboxifenilo
Ia-001a-Tz	Ácido 4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenil-aminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
Ia-001c	Ácido 2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	2-sulfofenilo
Ia-002a	Ácido 4-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-carboxifenilo
Ia-002a-Tz	Ácido 4-(3-(1H-tetrazol-5-il)fenil-aminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
Ia-002c	Ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	3-sulfofenilo
Ia-003a	Ácido 4-(4-carboxifenil-aminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxifenilo
Ia-003a-Tz	Ácido 4-(4-(1H-tetrazol-5-il)fenil-aminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
Ia-003c	Ácido 2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	4-sulfofenilo
Ia-004a	Ácido 4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenilo
Ia-005a	Ácido 4-(4-carboxi-3-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenilo
Ia-056a	Ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
Ia-006a	Ácido 4-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenilo

Ib-010a	Ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboxibenzoilamino)benzoico	H	H	H	
Ia-011a	Ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	H	H	H	2,3-dicarboxifenilo
Ia-012a	Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico	H	H	H	2,5-dicarboxifenilo
Ia-013a	Compuesto 36: Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	H	H	H	2,6-dicarboxifenilo
Ia-014a	Compuesto 38: Ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	H	H	H	3,4-dicarboxifenilo
Ia-015a	Ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	H	H	H	3,5-dicarboxifenilo
Ia-016a	Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	3-carboxipiridin-2-ilo
Ia-017a	Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	H	H	H	4-carboxipiridin-2-ilo
Ia-018a	Ácido 6-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	5-carboxipiridin-2-ilo
Ia-019a	Ácido 6-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	6-carboxipiridin-2-ilo
Ia-020a	Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico	H	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-ilo
Ia-021a	Ácido 6-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico	H	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-ilo
Ia-022a	Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico	H	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-ilo
Ia-023a	Ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	H	H	H	4-carboxipiridin-3-ilo
Ia-024a	Ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	5-carboxipiridin-3-ilo
Ia-025a	Ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	6-carboxipiridin-3-ilo
Ia-026a	Ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo

Ia-027a	Ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico	H	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-ilo
Ia-028a	Ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	3-carboxipiridin-4-ilo
Ia-029a	Ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
Ia-032a	Ácido 4-(4-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-(carboximetil)fenilo
Ia-033a	Ácido 4-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-(carboximetil)fenilo
Ia-033a-HyP	Ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenilo
Ia-034a	Ácido 4-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-(carboximetil)fenilo
Ia-001a-E2-A2	etil 4-(2-(etoxicarbonil)fenilaminocarbonil)-2,5-diacetoxi benzoato	Ac	Ac	Et	2-(etoxicarbonil)fenilo
Ia-001a-E2	etil 4-(2-(etoxicarbonil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato	H	H	Et	2-(etoxicarbonil)fenilo
Ia-001a-Tz-E1-A2	etil 4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-diacetoxi benzoato	Ac	Ac	Et	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
Ia-001a-Tz-E1	etil 4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato	H	H	Et	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
Ia-004a-E2	etil 2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilaminocarbonil)benzoato	H	H	Et	4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilo
Ib-010a-E3-A4	etil 3,5-bis(2,5-diacetoxi-4-etoxicarbonilbenzoilamino)benzoato	Ac	Ac	Et	
Ib-010a- E3	etil 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-etoxicarbonilbenzoilamino)benzoato	H	H	Et	
Ia-023a-E2	etil 3-(4-(etoxicarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotinato	H	H	Et	4-etoxicarbonilpiridin-3-ilo
Ia-056a-E2	Compuesto 390: etil 4-(4-etoxicarbonil-2,5-	H	H	Et	4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilo

	dihidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato				
B.	 **R2 = R5 = CONHR9**				
IIa-001a	Ácido 3-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-carboxifenilo
IIa-001a-Tz	Ácido 3-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
IIa-001c	Ácido 2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	2-sulfofenilo
IIa-002a	Ácido 3-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-carboxifenilo
IIa-002a-Tz	Ácido 3-(3-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
IIa-002c	Ácido 2,5-dihidroxi-3-(3-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	3-sulfofenilo
IIa-003a	Ácido 3-(4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxifenilo
IIa-003a-Tz	Ácido 3-(4-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
IIa-003c	Ácido 2,5-dihidroxi-3-(4-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	4-sulfofenilo
IIa-004a	Ácido 3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenilo
IIa-005a	Ácido 3-(4-carboxi-3-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxi-3 -hidroxifenilo
IIa-006a	Ácido 3-(2-carboxi-4-	H	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenilo

	hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico				
IIb-010a	Ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-3-carboxibenzoilamino)benzoico	H	H	H	
IIa-011a	Ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	H	H	H	2,3-dicarboxifenilo
IIa-012a	Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico	H	H	H	2,5-dicarboxifenilo
IIa-013a	Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	H	H	H	2,6-dicarboxifenilo
IIa-014a	Ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	H	H	H	3,4-dicarboxifenilo
IIa-015a	Ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	H	H	H	Ácido 3,5-dicarboxílico
IIa-016a	Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	3-carboxipiridin-2-ilo
IIa-017a	Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	H	H	H	4-carboxipiridin-2-il
IIa-018a	Ácido 6-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	5-carboxipiridin-2-ilo
IIa-019a	Ácido 6-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	6-carboxipiridin-2-ilo
IIa-020a	Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico	H	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-ilo
IIa-021a	Ácido 6-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico	H	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-ilo
IIa-022a	Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico	H	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-ilo
IIa-023a	Ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	H	H	H	4-carboxipiridin-3-ilo

IIa-024a	Ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	5-carboxipiridin-3-ilo
IIa-025a	Ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	6-carboxipiridin-3-ilo
IIa-026a	Ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
IIa-027a	Ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico	H	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-ilo
IIa-028a	Ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	3-carboxipiridin-4-ilo
IIa-029a	Compuesto 172: Ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;	H	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
IIa-032a	Ácido 3-(4-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-(carboximetil)fenilo
IIa-033a	Ácido 3-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-(carboximetil)fenilo
IIa-033a-Hyp	Ácido 2,5-dihidroxi-3-(3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenilo
IIa-034a	Ácido 3-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-(carboximetil)fenilo
IIa-001aTz-E1	3-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo	H	H	Et	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
IIa-034a- E2	3-(2-(etoxicarbonilmetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo	H	H	Et	2-(2-etoxicarbonilmetil)fenilo

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I), donde:

(A)

R_a, R_b = H;

R_1 = SO_3H;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

$R_5 = R_6 = CONH-R_9$;

o

(B)

R_a, R_b = H;

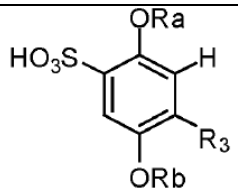
$R_1 = SO_3H$;

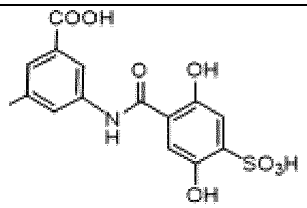
R_3 = H; $R_2 = R_5$; y

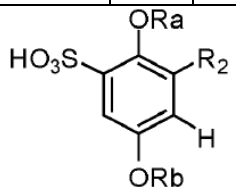
$R_5 = R_6 = CONH-R_9$.

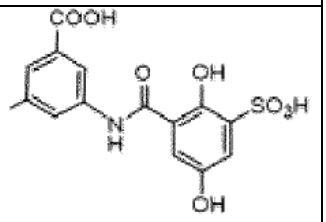
En una segunda modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 2:

Tabla 2

A.	 **R3 = R5 = CONHR9**			
No. de Compuesto	**Nombres químicos del compuesto**	**Ra**	**Rb**	**R9**
Ia-001b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	2-carboxifenilo
Ia-001d	Ácido 2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	2-sulfofenilo
Ia-002b	Ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	3-carboxifenilo
Ia-002d	Ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	3-sulfofenilo
Ia-003b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	4-carboxifenilo
Ia-003d	Ácido 2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	4-sulfofenilo

Ia-004b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenilo
Ia-005b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	4-carboxi-3 -hidroxifenilo
Ia-006b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-5-hidroxibenzoico	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenilo
Ib-010b	Ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	
Ia-011b	Ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)ftálico	H	H	2,3-dicarboxifenilo
Ia-012b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)tereftálico	H	H	2,5-dicarboxifenilo
Ia-013b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isoftálico	H	H	2,6-dicarboxifenilo
Ia-014b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)ftálico	H	H	3,4-dicarboxifenilo
Ia-015b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isoftálico	H	H	3,5-dicarboxifenilo
Ia-016b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	3-carboxipiridin-2-ilo
Ia-017b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isonicotínico	H	H	4-carboxipiridin-2-ilo
Ia-018b	Ácido 6-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	5-carboxipiridin-2-ilo
Ia-019b	Ácido 6-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico	H	H	6-carboxipiridin-2-ilo
Ia-020b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-5-fluoronicotínico	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-ilo
Ia-021b	Ácido 6-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-ilo
Ia-022b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)piridin-	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-ilo

	3,5-dicarboxílico			
Ia-023b	Ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isonicotínico	H	H	4-carboxipiridin-3-ilo
Ia-024b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	5-carboxipiridin-3-ilo
Ia-025b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico	H	H	6-carboxipiridin-3-ilo
Ia-026a	Ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
Ia-027b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-2-fluoroisonicotínico	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-ilo
Ia-028b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	3-carboxipiridin-4-ilo
Ia-029b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
Ia-032b	Ácido (4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	4-(carboximetil)fenilo
Ia-033b	Ácido (3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	3-(carboximetil)fenilo
Ia-034b	Ácido (2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	2-(carboximetil)fenilo
B	 **R2 = R5 = CONHR9**			
IIa-001b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)benzoico	H	H	2-carboxifenilo
IIa-001d	Ácido 2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	2-sulfofenilo
IIa-002b	Ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)benzoico	H	H	3-carboxifenilo

IIa-002d	Ácido 2,5-dihidroxi-3-(3-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	3-sulfofenilo
IIa-003b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)benzoico	H	H	4-carboxifenilo
IIa-003d	Ácido 2,5-dihidroxi-3-(4-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	4-sulfofenilo
IIa-004b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenilo
IIa-005b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico;	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenilo
IIa-006b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-5-hidroxibenzoico	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenilo
IIb-010b	Ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	
IIa-011b	Ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)ftálico;	H	H	2,3-dicarboxifenilo
IIa-012b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)tereftálico	H	H	2,5-dicarboxifenilo
IIa-013b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isoftálico	H	H	2,6-dicarboxifenilo
IIa-014b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)ftálico	H	H	3,4-dicarboxifenilo
IIa-015b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isoftálico	H	H	3,5-dicarboxifenilo
IIa-016b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	3-carboxipiridin-2-ilo
IIa-017b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isonicotínico	H	H	4-carboxipiridin-2-ilo
IIa-018b	Ácido 6-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	5-carboxipiridin-2-ilo
IIa-019b	Ácido 6-(2,5-dihidroxi-3-	H	H	6-carboxipiridin-2-ilo

	sulfobenzamido)picolínico			
IIa-020b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-5-fluoronicotínico	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-ilo
IIa-021b	Ácido 6-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico;	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-ilo
IIa-022b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-ilo
IIa-023b	Ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isonicotínico	H	H	4-carboxipiridin-3-ilo
IIa-024b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	5-carboxipiridin-3-ilo
IIa-025b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico	H	H	6-carboxipiridin-3-ilo
IIa-026b	Ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
IIa-027b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-2-fluoroisonicotínico	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-ilo
IIa-028b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	3-carboxipiridin-4-ilo
IIa-029b	Compuesto 173: Ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
IIa-032b	Ácido (4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	4-(carboximetil)fenilo
IIa-033b	Ácido (3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	3-(carboximetil)fenilo
IIa-034b	Ácido (2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	2-(carboximetil)fenilo

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I), donde:

(A)

R_a, R_b = H;

R_1 = $(CH_2)_nCOOR_4$; R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_6 = CONH-R_9;

o

(B)

R_a, R_b = H;

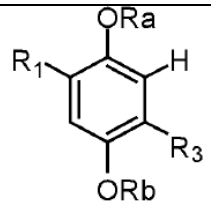
R_1 = $(CH_2)_nCOOR_4$; R_t = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

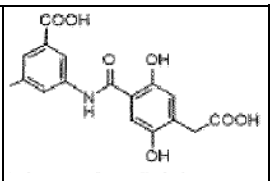
R_3 = H; R_2 = R_5; y

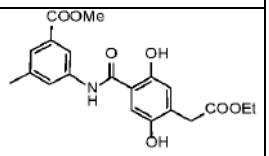
R_5 = R_6 = CONH-R_9.

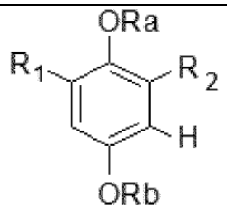
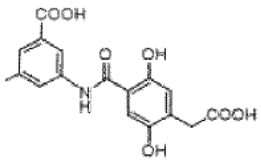
En una tercera modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 3:

Tabla 3

A.	 **R3 = R5 = R6 = CONH-R9**				
Compuesto No.	**Nombres químicos del compuesto**	**R1**	**Ra**	**Rb**	**R9**
IIIa-001a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico	CH_2COOH	H	H	2-carboxifenilo
IIIa-001a-Tz	Ácido (2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5dihidroxifenil)acético	CH_2COOH	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
IIIa-001c	Ácido (2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	2-sulfofenilo
IIIa-002a	Ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico;	CH_2COOH	H	H	3-carboxifenilo
IIIa-002c	Ácido (2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético;	CH_2COOH	H	H	3-sulfofenilo
IIIa-003a	Ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico;	CH_2COOH	H	H	4-carboxifenilo
IIIa-003c	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético;	CH_2COOH	H	H	4-sulfofenilo
IIIa-004a	Compuesto 216: Ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	CH_2COOH	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenilo
IIIa-005a	Ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	CH_2COOH	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenilo
IIIa-006a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxibenzoico	CH_2COOH	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenilo

IIIb-010a	Ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboximetilbenzoilamino)benzoico	CH_2COOH	H	H	
IIIa-011a	Ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	CH_2COOH	H	H	2,3-dicarboxifenilo
IIIa-012a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico	CH_2COOH	H	H	2,5-dicarboxifenilo
IIIa-013a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	CH_2COOH	H	H	2,6-dicarboxifenilo
IIIa-014a	Ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	CH_2COOH	H	H	3,4-dicarboxifenilo
IIIa-015a	Ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	CH_2COOH	H	H	3,5-dicarboxifenilo
IIIa-016a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH_2COOH	H	H	3-carboxipiridin-2-ilo
IIIa-017a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	CH_2COOH	H	H	4-carboxipiridin-2-ilo
IIIa-018a	Ácido 6-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH_2COOH	H	H	5-carboxipiridin-2-ilo
IIIa-019a	Ácido 6-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH_2COOH	H	H	6-carboxipiridin-2-ilo
IIIa-020a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico	CH_2COOH	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-ilo
IIIa-021a	Ácido 6-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico	CH_2COOH	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-ilo
IIIa-022a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico	CH_2COOH	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-ilo
IIIa-023a	Ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico;	CH_2COOH	H	H	4-carboxipiridin-3-ilo

IIIa-024a	Ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH_2COOH	H	H	5-carboxipiridin-3-ilo
IIIa-025a	Ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH_2COOH	H	H	6-carboxipiridin-3-ilo
IIIa-026a	Ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH_2COOH	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
IIIa-027a	Ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico	CH_2COOH	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-ilo
IIIa-028a	Ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;	CH_2COOH	H	H	3-carboxipiridin-4-ilo
IIIa-029a	Ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;	CH_2COOH	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
IIIa-032a	Ácido (4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	4-(carboximetil)fenilo
IIIa-033a	Ácido (3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	3-(carboximetil)fenilo
IIIa-034a	Ácido (2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	2-(carboximetil)fenilo
IIIa-001a-E2	2-(4-(etoxicarbonilmetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoato de metilo	CH_2COOEt	H	H	2-(metoxicarbonil)fenilo
IIIa-001aTz-E1	Compuesto 383: (4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acetato de etilo;	CH_2COOEt	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
IIIa-015a-E3	dietil 5-(4-(etoxicarbonilmetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isoftalato	CH_2COOEt	H	H	3,5- dietoxicarbonilfenilo
IIIb-010a-E3	3,5-bis(4-(etoxicarbonilmetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoato de metilo	CH_2COOEt	H	H	

B	 **R2 = R5 = R6 = CONHR9**				
IVa-001a	Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico	CH_2COOH	H	H	2-carboxifenilo
IVa-001c	Ácido (2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	2-sulfofenilo
IVa-002a	Ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico	CH_2COOH	H	H	3-carboxifenilo
IVa-002c	Ácido (2,5-dihidroxi-3-(3-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	3-sulfofenilo
IVa-003a	Ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico	CH_2COOH	H	H	4-carboxifenilo
IVa-003c	Ácido (2,5-dihidroxi-3-(4-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	4-sulfofenilo
IVa-004a	Ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	CH_2COOH	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenilo
IVa-005a	Ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	CH_2COOH	H	H	4-carboxi-3 -hidroxifenilo
IVa-006a	Compuesto 295: Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxibenzoico;	CH_2COOH	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenilo
IVb-010a	Ácido 3,5-Bis(2,5-dihidroxi-3-carboximetilbenzoilamino)benzoico	CH_2COOH	H	H	
IVa-011a	Ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	CH_2COOH	H	H	2,3-dicarboxifenilo
IVa-012a	Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-	CH_2COOH	H	H	2,5-dicarboxifenilo

	dihidroxibenzamido)tereftálico				
IVa-013a	Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	CH_2COOH	H	H	2,6-dicarboxifenilo
IVa-014a	Ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	CH_2COOH	H	H	3,4-dicarboxifenilo
IVa-015a	Ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	CH_2COOH	H	H	3,5-dicarboxifenilo
IVa-016a	Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH_2COOH	H	H	3-carboxipiridin-2-ilo
IVa-017a	Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	CH_2COOH	H	H	4-carboxipiridin-2-ilo
IVa-018a	Ácido 6-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH_2COOH	H	H	5-carboxipiridin-2-ilo
IVa-019a	Ácido 6-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH_2COOH	H	H	6-carboxipiridin-2-ilo
IVa-020a	Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico	CH_2COOH	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-ilo
IVa-021a	Ácido 6-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico	CH_2COOH	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-ilo
IVa-022a	Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico	CH_2COOH	H	H	3,5-dicarboxipiridin- 2-ilo
IVa-023a	Ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	CH_2COOH	H	H	4-carboxipiridin-3-ilo
IVa-024a	Ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH_2COOH	H	H	5-carboxipiridin-3-ilo
IVa-025a	Ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH_2COOH	H	H	6-carboxipiridin-3-ilo
IVa-026a	Ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH_2COOH	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
IVa-027a	Ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-	CH_2COOH	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-

	dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico				3-ilo
IVa-028a	Ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH_2COOH	H	H	3-carboxipiridin-4-ilo
IVa-029a	Ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH_2COOH	H	H	2-carboxipiridin-3-ilo
IVa-032a	Ácido (4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	4-(carboximetil)fenilo
IVa-033a	Ácido (3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	3-(carboximetil)fenilo
IVa-034a	Ácido (2 -(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH_2COOH	H	H	2-(carboximetil)fenilo

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I), donde:

(A)

R_a, R_b = H, acilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, arilo de C_6-$C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo de C_1-C_7NHCO, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloxi de metilo de C_1-C_6 o alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo;

R_1 = CONH-R_{10}; R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} funcionalizado *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-

1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_6 = CONH-R_9;

o

(B)

R_a, R_b = H, acilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, arilo de C_6-$C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo de C_1-C_7NHCO, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6 o alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo;

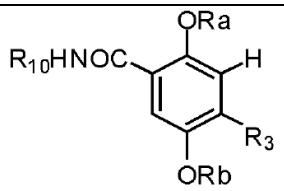
R_1 = CONH-R_{10}; R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

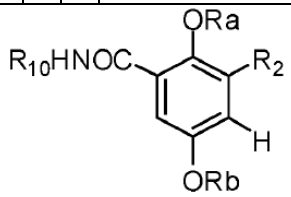
R_3 = H; R_2 = R_5; y

R_5 = R_6 = CONH-R_9

En una cuarta modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 4:

Tabla 4

A.	 **R3 = R5 = R6 = CONH-R9**				
No. de Compuesto	**Nombres químicos del compuesto**	**Ra**	**Rb**	**R10**	**R9**
Ic-001a-Tz/1-004a	Ácido 5-(4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenilo	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
Ic-001a-Tz(2)	N_1,N_4-bis(2-(1H-tetrazol-5-il)fenil)-2,5-dihidroxitereftalamida	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
Ic-007a	Ácido 5-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenilo	3-carboxi-4-hidroxifenilo
Ic-007b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico	H	H	4-hidroxi-3-sulfonilfenilo	4-hidroxi-3- sulfonilfenilo
Ic-008a	Ácido 4-(4-(4-carboxi-3-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenilo	4-carboxi-3-hidroxifenilo
Ic-008b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-(3-hidroxi-4-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico	H	H	3-hidroxi-4-sulfonilfenilo	3-hidroxi-4-sulfonilfenilo
Ic-009a	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-carboxifenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibenzoico	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenilo	2-carboxi-4-hidroxifenilo
Ic-009b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-	H	H	4-hidroxi-2-sulfofenilo	4-hidroxi-2-sulfofenilo

	5-hidroxibencenosulfónico				
Ib-001a-Tz/1-004a-E1	5-(4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoato de metilo;	H	H	4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilo	2-(1H-tetrazol-5-il)fenilo
Ic-007a-E2-A4	5-(2,5-diacetoxi-4-(4-acetoxi-3-(metoxicarbonil)fenilaminocarbonil)benzamido)-2-acetoxibenzoato de metilo;	Ac	Ac	4-acetoxi-3-(metoxicarbonil)fenilo	4-acetoxi-3-(metoxicarbonil)fenilo
Ic-007a-E2	5-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibenzoato de metilo;	H	H	4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilo	4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilo
Ic-007a-pive2	1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etil5-[[4-[[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxi-fenil]carbamoil]-2,5-dihidroxi-benzoil]amino]-2-hidroxibenzoato	H	H	3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxifenilo	3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxifenilo
Ic-009a-E2	2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-(metoxicarbonil)fenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibenzoato de metilo	H	H	4-hidroxi-2-(metoxicarbonil)fenilo	4-hidroxi-2-(metoxicarbonil)fenilo
B	 **R2 = R5 = R6 = CONH-R9**				
IIc-007a	Ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenilo	3-carboxi-4- hidroxifenilo
IIc-007b	Ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-(4-hidroxi-3-	H	H	4-hidroxi-3-sulfofenilo	4-hidroxi-3-sulfofenilo

	sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico				
IIc-008a	Ácido 4-(3-(3-hidroxi-4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-hidroxi-4-carboxifenilo	3-hidroxi-4-carboxifenilo
IIc-008b	Ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-(3-hidroxi-4-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico	H	H	3-hidroxi-4-sulfofenilo	3-hidroxi-4-sulfofenilo
IIc-009a	Ácido 2-(3-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxilbenzoico	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenilo	2-carboxi-4-hidroxifenilo
IIc-009b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-(4-hidroxi-2-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibencenosulfónico	H	H	4-hidroxi-2-sulfofenilo	4-hidroxi-2-sulfofenilo

Preferiblemente, la presente invención proporciona compuestos derivados de hidroquinona de fórmula (I), donde:

(A)

R_a, R_b = H;

R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_6 = $CONHCOR_9$;

o

(B)

R_a, R_b = H;

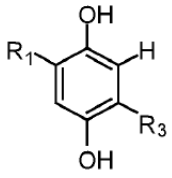
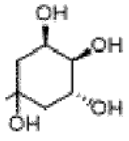
R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; R_t = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

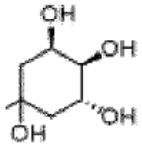
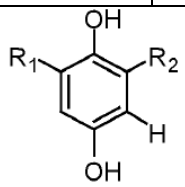
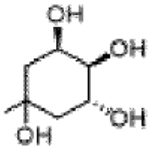
R_3 = H; R_2 = R_5; y

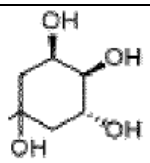
R_5 = R_6 = $CONHCOR_9$.

En una quinta modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 5:

Tabla 5

A.	 **R3 = R5 = R6 = CONHCOR9**		
No. de Compuesto	**Nombres químicos del compuesto**	**R1**	**R9**
Ia-040a	N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)-4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	
Ia-041a	N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)-4-carboxi-2,5-	COOH	2,5-dihidroxi-4-carboxifenilo

	dihidroxibenzamida		
Ia-042a	N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)-4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	2,5-dihidroxi-3-carboxifenilo
Ia-043a	N-(3,4-dihidroxibenzoil)-4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	3,4-dihidroxifenilo
Ia-044a	N-(3,5-dihidroxibenzoil)-4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	3,5-dihidroxifenilo
IIIa-040a	N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)-3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	
IIIa-041a	N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)-3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	2,5-dihidroxi-4-carboxifenilo
IIIa-042a	N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)-3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	2,5-dihidroxi-3-carboxifenilo
IIIa-043a	N-(3,4-dihidroxibenzoil)-3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	3,4-dihidroxifenilo
IIIa-044a	N-(3,5-dihidroxibenzoil)-3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	3,5-dihidroxifenilo
B	 **R2 = R5 = R6 = CONHCOR9**		
IIa-040a	N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)-4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	
IIa-041a	N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)-4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	2,5-dihidroxi-4-carboxifenilo
IIa-042a	N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)-4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	2,5-dihidroxi-3-carboxifenilo
IIa-043a	N-(3,4-dihidroxibenzoil)-4-carboximetil-2,5-	COOH	3,4-dihidroxifenilo

	dihidroxibenzamida		
IIa-044a	N-(3,5-dihidroxibenzoil)-4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	3,5-dihidroxifenilo
IVa-040a	N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)-3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	
IVa-041a	N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)-3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	2,5-dihidroxi-4-carboxifenilo
IVa-042a	N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)-3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	2,5-dihidroxi-3-carboxifenilo
IVa-043a	N-(3,4-dihidroxibenzoil)-3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	3,4-dihidroxifenilo
IVa-044a	N-(3,5-dihidroxibenzoil)-3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH_2COOH	3,5-dihidroxifenilo

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I), donde

(A)

R_a, R_b = H;

R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_6 = $CONH(CH_2)_n$-R_9;

o

(B)

R_a, R_b = H;

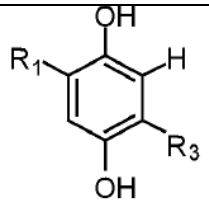
R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; R_t = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

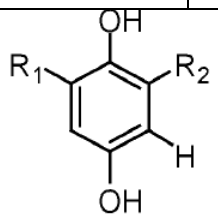
R_3 = H; R_2 = R_5; y

R_5 = R_6 = $CONH(CH_2)_n$-R_9.

En una sexta modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 6:

Tabla 6

A.	 **R3 = R5 = R6 = $CONH(CH_2)_n$-R_9**			
No. de Compuesto	**Nombres químicos del compuesto**	**R1**	**n**	**R9**
Ia-035a	Ácido 4-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	1	3,4-dihidroxifenilo
Ia-035a-2	Ácido 4-(2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	2	3,4-dihidroxifenilo
Ia-037a	Ácido 4-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	1	3,5-dihidroxifenilo

Ia-038a	Ácido 4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	1	4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enilo
Ia-039a	Ácido 2,5-dihidroxi-4-((3,4,5-trihidroxiciclohexil)metilaminocarbonil)benzoico	COOH	1	3,4,5-trihidroxiciclohexilo
Ia-053a	Ácido 4-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	1	2-carboxifenilo
Ia-054a	Ácido 4-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	1	3-carboxifenilo
Ia-055a	Ácido 4-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	1	4-carboxifenilo
IIIa-035a	Ácido 3-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH_2COOH	1	3,4-dihidroxifenilo
IIIa-037a	Ácido 3-(2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH_2COOH	1	3,5-dihidroxifenilo
IIIa-038a	Ácido 3-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH_2COOH	1	4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enilo)
IIIa-039a	Ácido 3-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH_2COOH	1	3,4,5-trihidroxiciclohexilo
IIIa-053a	Ácido 2,5-dihidroxi-3-((3,4,5-trihidroxiciclohexil)metilaminocarbonil)benzoico	CH_2COOH	1	2-carboxifenilo
IIIa-054a	3 Ácido-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH_2COOH	1	3-carboxifenilo
IIIa-055a	Ácido 3-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH_2COOH	1	4-carboxifenilo
B	 **R2 = R5 = R6 = CONH(CH2)n-R9**			
IIa-035a	Ácido 3-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	1	3,4-dihidroxifenilo

IIa-035a-2	Ácido (4-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	2	3,4-dihidroxifenilo
IIa-037a	Ácido (4-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	3,5-dihidroxifenilo
IIa-038a	Ácido (4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enilo
IIa-039a	Compuesto 191: Ácido (2,5-dihidroxi-4-((3,4,5-trihidroxiciclohexil)metilaminocarbonil)fenil)acético	COOH	1	3,4,5-trihidroxiciclohexilo
IIa-053a	Ácido (4-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	2-carboxifenilo
IIa-054a	Ácido (4-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	3-carboxifenilo
IIa-055a	Ácido (4-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	4-carboxifenilo
IVa-035a	Ácido (3-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH_2COOH	1	3,4-dihidroxifenilo
IVa-037a	Ácido (3-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH_2COOH	1	3,5-dihidroxifenilo
IVa-038a	Ácido (3-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH_2COOH	1	4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enilo
IVa-039a	Ácido (2,5-dihidroxi-3-((3,4,5-trihidroxiciclohexil)metilcarbonilamino)fenil)acético	CH_2COOH	1	3,4,5-trihidroxiciclohexilo
IVa-053a	Ácido (3-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH_2COOH	1	2-carboxifenilo
IVa-054a	Ácido (3-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH_2COOH	1	3-carboxifenilo
IVa-055a	Ácido (3-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH_2COOH	1	4-carboxifenilo

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I), donde: R_a, R_b = H;

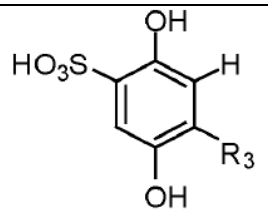
R_1 = SO_3H;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_6 = $CONH(CH_2)_n$-R_9.

De acuerdo con una séptima modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 7 más abajo:

Tabla 7



R3 = R5 = $CONH(CH_2)_n$-R_9

No. de Compuesto	Nombres químicos del compuesto	N	R9
Ia-053b	Ácido 2-((2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)metil)benzoico	1	2-carboxifenil
Ia-054b	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)metil)benzoico	1	3-carboxifenil
Ia-055b	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)metil)benzoico	1	4-carboxifenil

Preferiblemente, la presente invención se relaciona con un compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I) donde:

(A)

R_a, R_b = H;

R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6,

N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_6 = $CONHCH(COOR_4)(CH_2)_k$-R_9;

o

(B)

R_a, R_b = H;

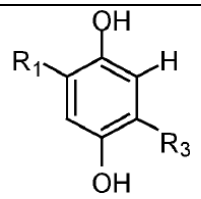
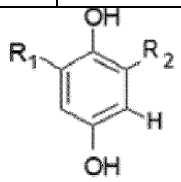
R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_3 = H; R_2 = R_5; y

R_5 = R_6 = $CONHCH(COOR_4)(CH_2)_k$-R_9.

De acuerdo con una octava modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 8 más abajo:

Tabla 8

A.	 $R_3 = R_5 = R_6 = CONHCH(COOR_4)(CH_2)_kR_9$				
No. de Compuesto	**Nombres químicos del compuesto**	**R1**	**R4**	**k**	**R9**
Ia-035a-3	Ácido 4-(1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	1	3,4-dihidroxifenilo
Ia-036a	Ácido 4-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	0	3,4-dihidroxifenilo
IIIa-036a	Ácido 3-(1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH_2COOH	H	0	3,4-dihidroxifenilo
B	 $R_2 = R_5 = R_6 = CONHCH(COOR_4)(CH_2)_kR_9$				
IIa-035a-3	Ácido 3-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	1	3,4-dihidroxifenilo
IIa-036a	Ácido (4-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	H	0	3,4-dihidroxifenilo
IVa-036a	Ácido (3-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH_2COOH	H	0	3,4-dihidroxifenilo

En una modalidad específica, la presente invención proporciona a compuestos derivados de hidroquinona de fórmula

(I), donde

(A)

R_a, R_b = H;

R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$ o $CONH-R_{10}$;

R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado. pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloxi de metilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi-1-etilo de C_1-C_6 u (oxodioxolil)metilo;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_6 = heteroarilo-R_9;

o

(B)

R_a, R_b = H;

R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$ o $CONH-R_{10}$;

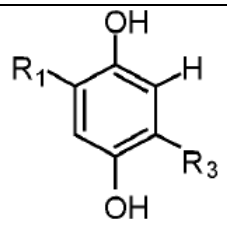
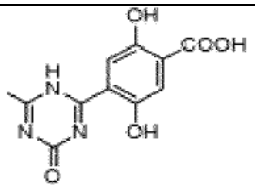
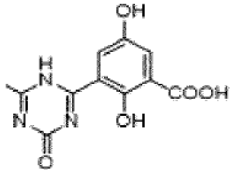
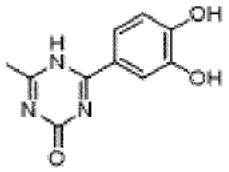
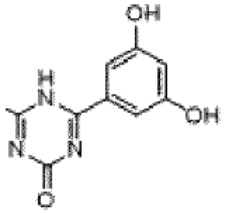
R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi-1-etilo de C_1-C_6 u (oxodioxolil)metilo;

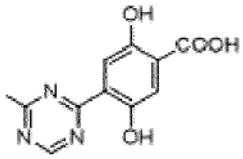
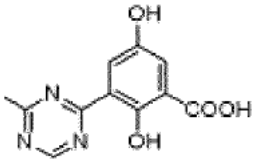
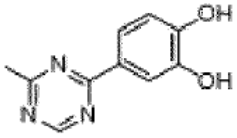
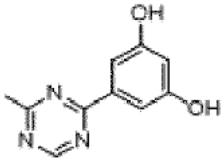
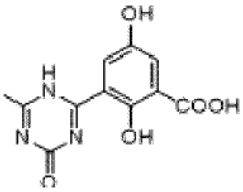
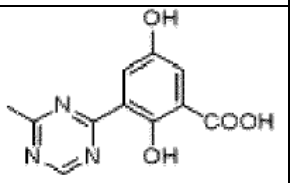
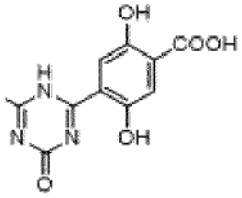
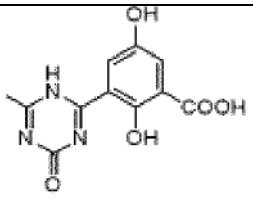
R_3 = H; R_2 = R_5; y

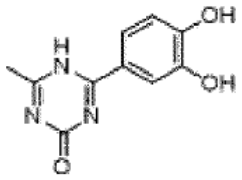
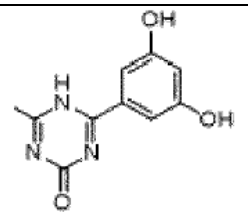
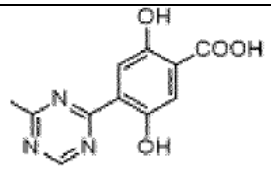
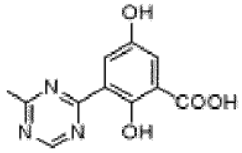
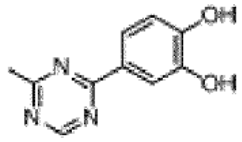
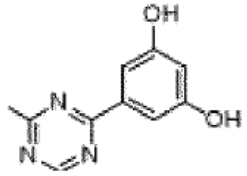
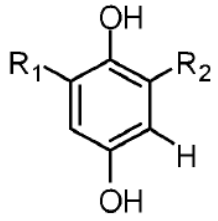
R_5 = R_6 = heteroarilo-R_9.

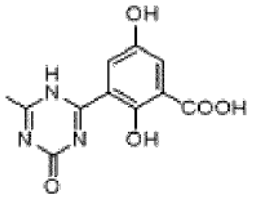
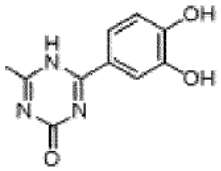
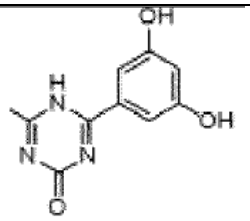
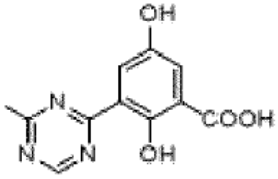
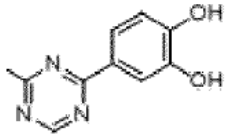
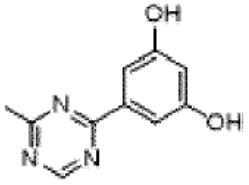
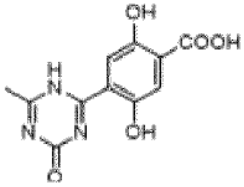
De acuerdo con una novena modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 9:

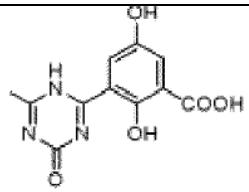
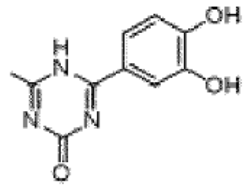
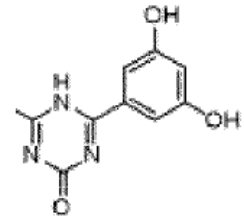
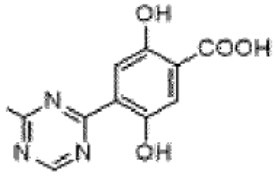
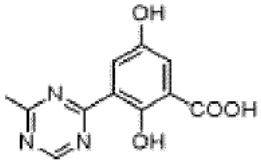
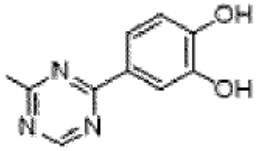
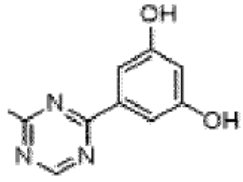
Tabla 9

A.	 **R3 = R5 = R6 = heteroaril-R9**		
No. de Compuesto	**Nombres químicos del compuesto**	**R1**	**heteroarilo-R9**
Ia-045a	4,6-bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	COOH	
Ia-046a	4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-6-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	COOH	
Ia-047a	4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-6-(3,4-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	COOH	
Ia-048a	4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-6-(3,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	COOH	

Ia-049a	4,6-bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	COOH	
Ia-050a	2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	COOH	
Ia-051a	2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,4-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	COOH	
Ia-052a	2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	COOH	
IIa-046a	4,6-bis(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	COOH	
IIa-050a	4-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-6-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	COOH	
IIIa-045a	4-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-6-(3,4-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	CH_2COOH	
IIIa-046a	4-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-6-(3,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	CH_2COOH	

IIIa-047a	4,6-bis(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	
IIIa-048a	2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	
IIIa-049a	2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,4-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	
IIIa-050a	2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	
IIIa-051a	2-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,4-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	
IIIa-052a	2-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	
B	 **R2 = R5 = R6 = heteroarilo-R9**		

IIa-045a	4-(4-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-6-(3,4-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	COOH	
IIa-047a	4-(4-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-6-(3,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	COOH	
IIa-048a	2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(4-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	COOH	
IIa-049a	2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(4-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	COOH	
IIa-051a	2-(4-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,4-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	COOH	
IIa-052a	2-(4-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	COOH	
IVa-045a	4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-6-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	CH_2COOH	

IVa-046a	4-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-6-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	CH_2COOH	
IVa-047a	4-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-6-(3,4-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	CH_2COOH	
IVa-048a	4-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-6-(3,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazin-2-ona	CH_2COOH	
IVa-049a	2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	
IVa-050a	2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-4-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	
IVa-051a	2-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,4-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	
IVa-052a	2-(3-carboximetil-2,5-dihidroxifenil)-4-(3,5-dihidroxifenil)-1,3,5-triazina	CH_2COOH	

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I), donde:

(A)

R_a, R_B = H;

R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$, $CONH-R_{10}$;

R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi-1-etilo de C_1-C_6 u (oxodioxolil)metilo;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_7 = benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N] o flúor;

o

(B)

R_a, R_b = H;

R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$ o $CONH-R_{10}$;

R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi-1-etilo de

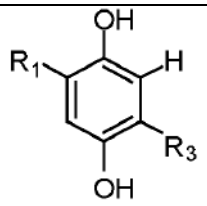
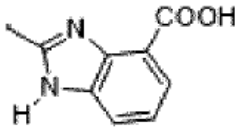
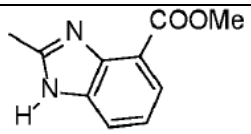
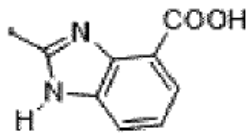
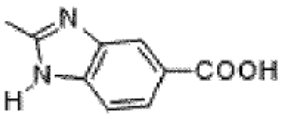
C_1-C_6 u (oxodioxolil)metilo;

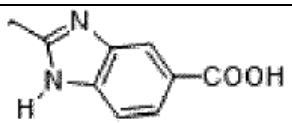
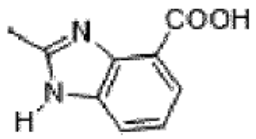
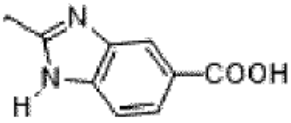
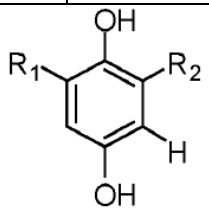
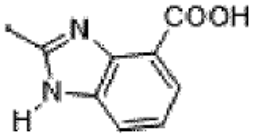
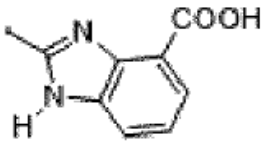
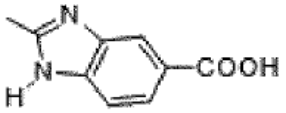
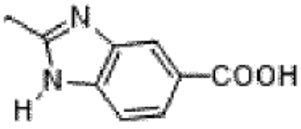
R_3 = H; R_2 = R_5; y

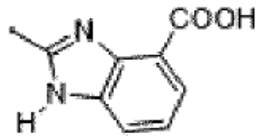
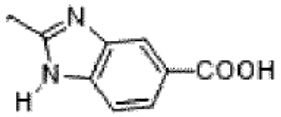
R_5 = R_7 = benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4, azoles [heterociclos de 5 miembros que contienen N] o flúor.

De acuerdo con una décima modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 10:

Tabla 10

A.	 **R3 = R5 = R7**		
No. de Compuesto	**Nombres químicos del compuesto**	**R1**	**R3**
Id-030a	Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico	COOH	
Id-030a-E2	2-(4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxilato de metilo	COOEt	
Id-030b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico	SO_3H	
Id-031a	Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico	COOH	

Id-031b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico	SO_3H	
IIId-030a	Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico	CH_2COOH	
IIId-031a	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico	CH_2COOH	
B	 **R2 = R5 = R7**		
IId-030a	Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico	COOH	
IId-030b	Ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico	SO_3H	
IId-031a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico	COOH	
IId-030a	Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico	SO_3H	

IVd-030a	Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico	CH_2COOH	
IVd-031a	Ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico	CH_2COOH	

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I), donde: (A)

R_a, R_b = H, acilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, arilo de C_6-$C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo de C_1-C_7NHCO, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6 o alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo

R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$ o $CONH$-R_{10};

R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

R_2 = H; R_3 = R_5; y

R_5 = R_8 = $(CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$;

donde X = O, S, SO_2, NH, NAc o $N(CH_2)_qR_9$;

o

(B)

R_a, R_b = H, acilo de C_1-$_4$, arilalquilo de C_{1-4}, arilo de C_6-$C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo de C_1-C_7NHCO, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6 o alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo

R_1 = $COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H, $(CH_2)_nSO_3H$ o $CONH$-R_{10};

R_4 = H, alquilo de C_{1-4}, arilalquilo de C_{1-4}, alquilo de C_1-C_6 incluyendo morfolino-alquilo de C_1-C_6 funcionalizado, pirrolidino-alquilo de C_1-C_6, N-metilpiperazino-alquilo de C_1-C_6, arilo de C_6-C_{10} incluyendo *o*-metoxifenilo (éster de guayacol), aciloximetilo de C_1-C_6, aciloxi de C_1-C_6-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_6, alcoxicarboniloxi de C_1-C_6-1-etilo u (oxodioxolil)metilo;

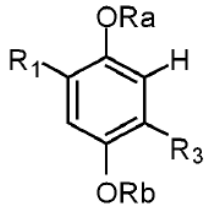
R_3 = H; R_2 = R_5; y

R_5 = R_8 = $(CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$;

donde X = O, S, SO_2, NH, NAc o $N(CH_2)_qR_9$.

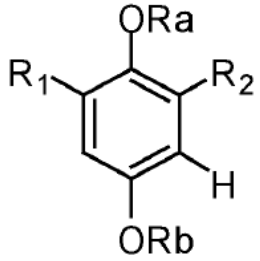
De acuerdo con una décima primera modalidad, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con la Tabla 11:

Tabla 11

A.	 **R3 = $(CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$**

No.	Nombres químicos del compuesto	R1	Ra	Rb	m	X	p	R9
IIIc-056a	bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOH	H	H	1	NH	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-056b	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO_3H	H	H	1	NH	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-056c	Compuesto 267: Ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	NH	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenilo
IIIc-056d	bis(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)amina	SO_3H	H	H	1	NH	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IIIc-057a	N,N-bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	COOH	H	H	1	$NH(COCH_3)$	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-057b	N-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)-N-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	SO_3H	H	H	1	$NH(COCH_3)$	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-057c	N-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)-N-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	COOH	H	H	1	$NH(COCH_3)$	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenilo
IIIc-057d	N,N-bis(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)acetamida	SO_3H	H	H	1	$NH(COCH_3)$	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IIIc-058a	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	S	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-058b	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO_3H	H	H	1	S	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-058c	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-	COOH	H	H	1	S	1	2,5-dihidroxi-3-

	sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico							sulfofenilo
IIIc-058d	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico;	SO_3H	H	H	1	S	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IIIc-059a	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	H	H	1	SO_2	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-059b	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;	SO_3H	H	H	1	SO_2	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-059c	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	SO_2	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenilo
IIIc-059d	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO_3H	H	H	1	SO_2	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IIIc-060a	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	O	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-060b	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico;	SO_3H	H	H	1	O	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IIIc-060c	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	O	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenilo
IIIc-060d	Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO_3H	H	H	1	O	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IIIc-061a	tris(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOH	H	H	1	$N(CH_2)qR_9$ q = 1: R_9 = 4-carboxi-	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenilo

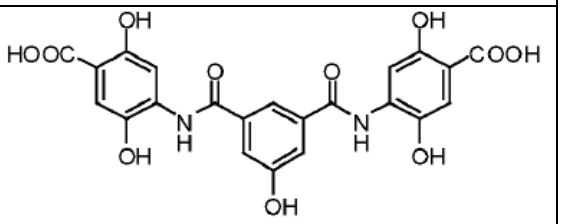
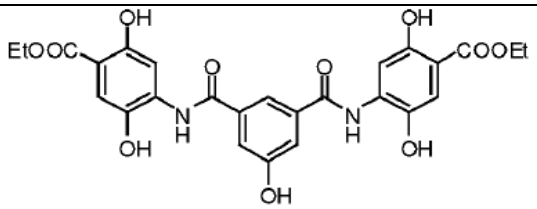
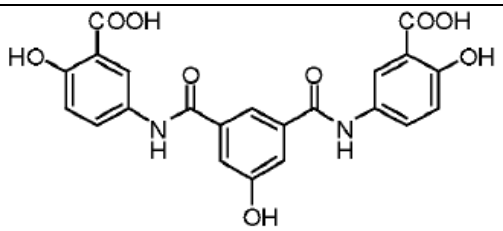
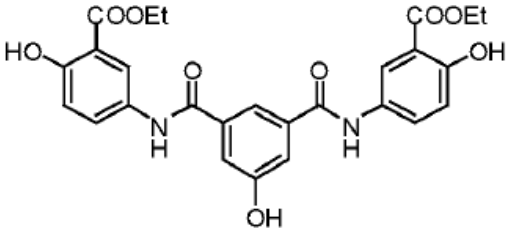
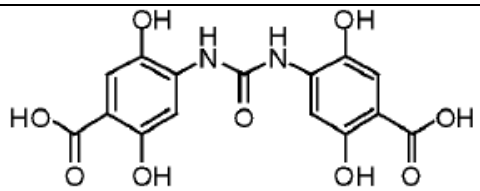
						2,5-dihidroxifenilo		
IIIc-061a-E3	tris(4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOEt	H	H		$(CH_2)qR9$ q = 1: R_9 = 4-etoxicarboxi-2,5-dihidroxifenilo	1	4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilo
B	 $R2 = (CH_2)_mX(CH_2)_nR_9$							
IVc-056a	bis(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOH	H	H	1	NH	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-056b	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO_3H	H	H	1	NH	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-056c	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	NH	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenilo
IVc-056d	bis(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)amina	SO_3H	H	H	1	NH	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IVc-057a	N,N-bis(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	COOH	H	H	1	$NH(COCH_3)$	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-057b	N-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)-N-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	SO_3H	H	H	1	$NH(COCH_3)$	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-057c	N-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)-N-(3-carboxi-	COOH	H	H	1	$NH(COCH_3)$	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenilo

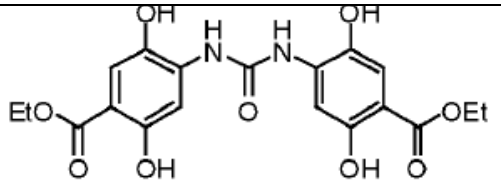
	2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida							
IVc-057d	N,N-bis(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)acetamida	SO_3H	H	H	1	$NH(COCH_3)$	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IVc-058a	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	S	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-058b	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO_3H	H	H	1	S	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-058c	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	S	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenilo
IVc-058d	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO_3H	H	H	1	S	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IVc-059a	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	SO_2	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-059b	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO_3H	H	H	1	SO_2	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-059c	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	SO_2	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenilo
IVc-059d	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO_3H	H	H	1	SO_2	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IVc-060a	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	O	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-060b	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-	SO_3H	H	H	1	O	1	3-carboxi-2,5-

	sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico							dihidroxifenilo
IVc-060c	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	O	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenilo
IVc-060d	Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO_3H	H	H	1	O	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenilo
IVc-061a	tris(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOH	H	H	1	$N(CH_2)qR_9$ q = 1: R_9 = 3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenilo
IVc-059a-E2-A4	3-((2,5-diacetoxi-3-metoxicarbonilfenil)metilsulfonil metil)-2,5-diacetoxibenzoato de metilo	COOMe	Ac	Ac	1	SO_2	1	2,5-diacetoxi-3-(metoxicarbonil)fenilo
IVc-059a-E2	3-((2,5-dihidroxi-3-metoxicarbonilfenil)metilsulfonil metil)-2,5-hidroxibenzoato de metilo	COOMe	H	H	1	SO_2	1	2,5-dihidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilo
IVc-059a-mpe2	2-morfolinoetil-3-((2,5-dihidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil)metilsulfonilmetil)-2,5-hidroxibenzoato	COOR R = 2-morfolinoetilo	H	H	1	SO_2	1	2,5-dihidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenilo
IVc-061a-E3	tris(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOEt	H	H	1	$N(CH_2)qR_9$ q = 1: R_9 = 3-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilo	1	3-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilo

De acuerdo con otra modalidad más, la presente invención incluye compuestos de acuerdo con

Tabla 12:

No. de Compuesto	Nombres químicos del compuesto	Estructuras
V-001a	Ácido 4-(3-(2,5-dihidroxi-4-carboxifenilcarbamoil)-5-hidroxibenzamido)-2,5-dihidroxibenzoico	
V-001a dietiléster	Ácido etil éster 4-(3-(4-(etoxicarbonil)-2,5-dihidroxifenilcarbamoil)-5-hidroxibenzamido)-2,5-dihidroxibenzoico	
V-002a	Ácido 2-hidroxi-5-(3-hidroxi-5-(4-hidroxi-3-carboxifenilcarbamoil)benzamido)benzoico	
V-002a dietiléster	Ácido etil éster 5-(3-(3-etoxicarbonil)-4-hidroxifenilcarbamoil)-5-hidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	
V-003a	4,4'-carbonilbis(azandiil)bis(ácido 2,5-dihidroxibenzoico)	

V-003a dietiléster	4,4'-carbonilbis(azandiil)bis(2,5-dihidroxibenzoato) de dietilo	

La presente invención también se relaciona con un proceso para la preparación del compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I), el cual comprende:

Paso (a): Acoplamiento del ácido carboxílico derivado de hidroquinona, protegido en las funciones fenólicas, con una anilina portadora de diversos grupos funcionales, por medio del cloruro de acilo correspondiente o usando un agente de acoplamiento de amida como TCFH en presencia de NMI;

Paso (b): Desprotección de las funciones éster típicamente por una reacción de saponificación; y

Paso (c): Desprotección de las funciones fenólicas típicamente por hidrogenación catalítica.

o, alternativamente,

Paso (d): Reducción del ácido carboxílico derivado de hidroquinona, protegido en las funciones fenólicas, para producir un alcohol bencílico

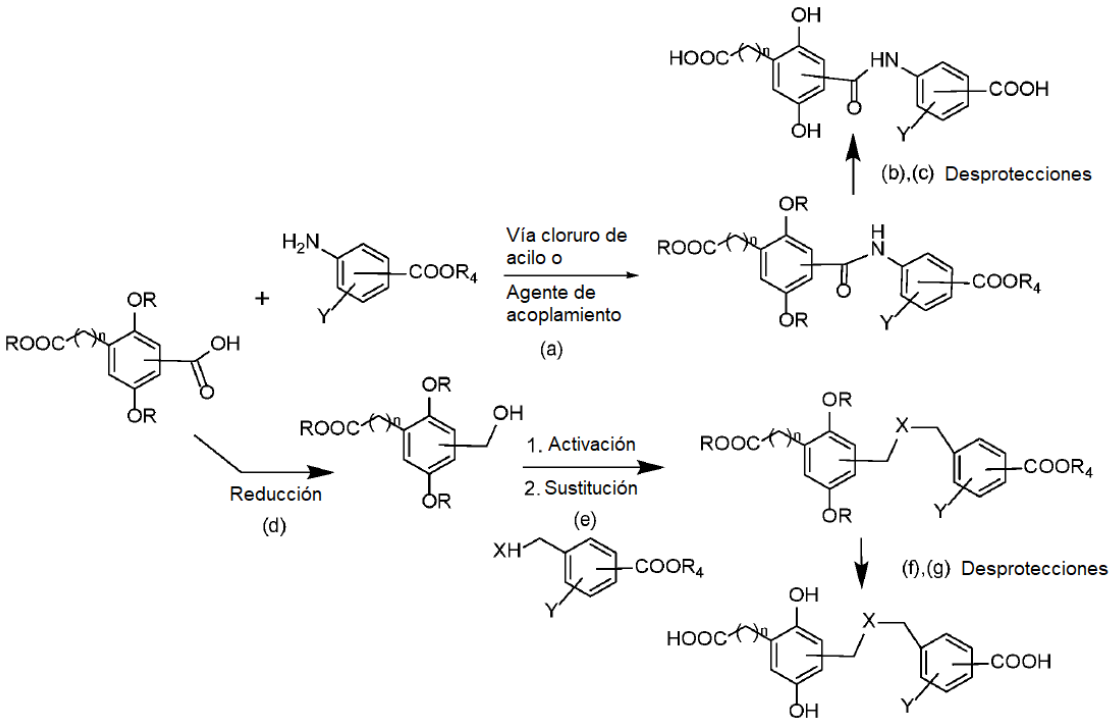
(e) Activación de la función de alcohol bencílico y sustitución con un nucleófilo bencílico (alcohol, tiol, amina primaria o secundaria) portador de diversos grupos funcionales;

(f) Desprotecciones de las funciones éster

típicamente por una reacción de saponificación; y

(g) Desprotección de las funciones fenólicas típicamente por hidrogenación catalítica.

El proceso se representa esquemáticamente más abajo:



Los compuestos derivados de hidroquinona de la presente invención pueden estar presentes como formas ópticamente activas (estereoisómeros), isómeros E/Z, enantiómeros, racematos, diastereoisómeros de los mismos e hidratos y solvatos de los mismos. Los solvatos de los compuestos se usan debido a la atracción mutua entre las moléculas del compuesto y el solvente inerte. Los solvatos por ejemplo monohidratos, dihidratos o alcoholatos.

Los derivados de hidroquinona de la presente invención también pueden estar presentes como sales farmacéuticamente aceptables, donde los derivados de hidroquinona originales se modifican preparando sales ácidas y básicas de los mismos.

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, sales de ácido mineral u orgánico de residuos básicos, como aminas; y sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos, como ácidos carboxílicos y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir sales no tóxicas o sales de amonio cuaternario convencionales las cuales son adecuadas para todas las rutas de administración de los compuestos, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, las sales convencionales no tóxicas incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos, como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y sales preparadas a partir de ácidos orgánicos como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroxileico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxi-benzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, trifluoroacético y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables se describen

por cationes y aniones "Pharmaceutical salts: A summary on doses of salt formers from the Orange Book. Saal C, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, 49, 614-623. A manera de ejemplos de cationes, podemos citar al aluminio, arginina, benzatina, calcio, cloroprocaína, colina, dietanolamina, dietilamina, etanolamina, etilendiamina, lisina, magnesio, histidina, litio, meglumina, potasio, procaína, sodio, trietilamina, zinc, a manera de ejemplos de aniones, podemos citar acetato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, besilato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, decanoato, edetato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolato, hexanoato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, octanoato, oleato, pamoato, pantotenato, fosfato, poligalacturonato, propionato, salicilato, estearato, acetato, succinato, sulfato, tartrato, teoclato, tosilato. De manera alternativa, pueden usarse zwitteriones como sales como los aminoácidos libres de arginina o lisina como contraiones catiónicos y glutamato o aspartato como contraiones aniónicos. Péptidos cortos (de 2 a 20 aminoácidos) como unidades repetidas de Arginina o Lisina y sus combinaciones con otros aminoácidos neutros. Estos péptidos catiónicos que penetran en las células (CPP) pueden usarse como potenciadores para la penetración de fármacos en

células.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos útiles en la presente invención pueden sintetizarse por ejemplo a partir del compuesto original que contiene una fracción básica o ácida y por procedimientos químicos convencionales. Generalmente, las sales pueden prepararse haciendo reaccionar el ácido libre o las formas básicas de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un solvente orgánico o en una mezcla de los dos; En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia, se presentan listas de sales adecuadas.

Las dosis adecuadas de acuerdo con la invención y como se describe en la presente en las diferentes modalidades pueden variar dependiendo de la condición, edad y especie del sujeto y pueden ser determinadas fácilmente por aquellos expertos en el estado de la técnica. Las dosis diarias totales empleadas en medicina veterinaria y humana estará convenientemente en el intervalo de 0.01-2000 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0.1-1000 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 1-100 mg/kg y estas pueden administrarse como dosis únicas o divididas y además, el límite superior

también puede excederse cuando se encuentra que esto está indicado. Esa dosis puede ajustarse a los requerimientos individuales en cada caso incluyendo los compuestos específicos que estén siendo administrados, la ruta de administración, la condición que esté siendo tratada, así como el paciente que esté siendo tratado. Sin embargo, los compuestos también pueden administrase como preparaciones de depósito (implantes, formulaciones de liberación lenta, etc.) semanalmente, mensualmente o a intervalos aún más prolongados. En esos casos la dosis puede ser mucho mayor que la dosis diaria y puede adaptarse a la forma de administración, el peso corporal y la indicación concreta. La dosis apropiada puede determinarse realizando pruebas modelo convencionales, preferiblemente modelos animales. En general, en el caso de la administración oral o parenteral a humanos adultos con un peso de aproximadamente 70 kg, una dosis diaria de aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 10.000 mg, preferiblemente de aproximadamente 200 mg hasta aproximadamente 1000 mg, podría ser apropiada, aunque el límite superior puede excederse cuando se indique. Debe comprenderse que la dosis terapéuticamente efectiva anterior no necesariamente es el resultado de una sola administración y usualmente son el riesgo de la administración de una pluralidad de dosis unitarias. Esas dosis unitarias pueden comprender a su vez porciones de una dosis diaria o semanal y

en consecuencia, la dosis terapéuticamente efectiva se determina durante el periodo de tratamiento (contacto). Por ejemplo, para la administración oral, la dosis diaria puede ser de aproximadamente 0.04 hasta aproximadamente 1.0 mg/kg de peso corporal, de manera más preferiblemente de aproximadamente 0.04 hasta aproximadamente 0.20 mg/kg/día, más preferiblemente todavía de aproximadamente 0.05 hasta aproximadamente 0.15 mg/kg/día y de manera más preferible aproximadamente 0.1 mg/kg de peso corporal. En general, la cantidad de sustancia activa administrada puede variar sobre un intervalo relativamente amplio para alcanzar y preferiblemente mantener, la concentración en plasma deseada. Las formas de dosis unitaria del ingrediente activo pueden contener de aproximadamente 0.1 miligramos hasta aproximadamente 15 miligramos del mismo. Una forma de dosis unitaria preferida contiene de aproximadamente de 0.1 hasta aproximadamente 1 miligramo de agente y puede administrarse de 2 a 5 veces por día. Sin embargo, deberá notarse que también se contemplan otras rutas alternativas como la infusión continua a una velocidad diseñada para mantener la concentración en plasma descrita anteriormente. La duración de un tratamiento particular también puede variar, dependiendo de la severidad de la enfermedad, si el tratamiento está destinado a una manifestación aguda o para propósitos profilácticos y consideraciones similares.

Típicamente la administración dura un periodo de tiempo de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 14 días, siendo usual un curso de tiempo de 7 días.

Los cursos (ciclos) de administración pueden repetirse a intervalos mensuales o las dosis unitarias parenterales pueden proporcionarse a intervalos semanales. Las dosis unitarias orales pueden administrarse a intervalos de uno a varios días para proporcionar la dosis terapéuticamente efectiva determinada. La dosis apropiada de los compuestos de la invención dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, de la severidad y curso de la enfermedad o si el agente se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, de la historia médica del paciente y de la respuesta a los compuestos y de los criterios del médico responsable. La determinación de la dosis o ruta apropiada de administración está claramente dentro de las capacidades de un médico actual. Los experimentos con animales proporcionan una guía confiable para la determinación de la dosis o ruta de administración apropiada está claramente dentro de las capacidades de un médico actual. Los experimentos con animales proporcionan una guía confiable para la determinación de la dosis efectiva para terapia humana. El escalamiento entre especies de la dosis efectiva puede llevarse a cabo siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of

interespecie scaling in toxicokinetics", in Toxicokinetics and New Drug Development, editors Yacobi et al., Pergamon Press, New York, 1989, pp. 42-96.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto derivado de hidroquinona de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o un profármaco o estereoisómero del mismo y (ii) un excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los excipientes farmacéuticos de acuerdo con la presente invención pueden seleccionarse del grupo que consiste de excipientes convencionales, como pero sin limitarse a solubilizantes, aglutinantes, rellenos, desintegrantes, lubricantes, modificadores del pH, mejoradores de la infiltración, modificadores de la liberación, conservadores, agentes de recubrimiento, portadores, agentes enmascarantes del sabor y combinaciones de los mismos.

La composición farmacéutica de los compuestos de la presente invención con uno o más componentes farmacéuticos, puede formularse con los excipientes como medicinas liquidas, medicinas sólidas o semisólidas y/o medicinas gaseosas.

Cuando están presentes en formulaciones sólidas, pueden incluir sin ninguna limitación, gránulos, pellets, tabletas, cápsulas, polvos, películas, pastillas para chupar,

tabletas triturables, tabletas solubles, tabletas desintegrantes, tabletas dispersables, tabletas recubiertas con una película y formatos de liberación controlada, sostenida, extendida o modificada de cualquiera de los formatos sólidos mencionados anteriormente. Esas formulaciones también pueden estar en forma de liberación inmediata, liberación retardada o liberación modificada. Además, las composiciones de liberación inmediata pueden ser preparaciones convencionales, dispersables, masticables, que se disuelven en la boca o de fusión instantánea y composiciones de liberación modificada que pueden comprender sustancias hidrofílicas o hidrofóbicas o combinaciones de sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas, que controlan la velocidad de liberación para formar sistemas de matriz o deposito o combinación de matriz y deposito.

Las composiciones pueden prepararse usando cualquiera de una o más de las técnicas como mezclado directo, granulación en seco, granulación en húmedo, homogeneización, molienda, micronización, extrusión y esferonización. Las composiciones pueden presentarse como no recubiertas, recubiertas con película, recubiertas con azúcar, recubiertas con polvo, de recubrimiento entérico y recubiertas de liberación modificada. Cuando están presentes en formulaciones líquidas, pueden incluir sin ninguna limitación, cualquier forma líquida como soluciones,

suspensiones, nanosuspensiones, dispersiones, coloides, emulsiones, lociones, cremas, ungüentos, tinturas y composiciones secadas por congelación. Cuando están presentes en formulaciones gaseosas, pueden incluir sin ninguna limitación, polvo molido o mezcla molida, polvo micronizado o mezcla, nanosuspensiones, aerosoles, aerosoles, gotas, neblinas, soluciones nebulizadas o suspensiones y/o vapores atomizados.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden comprender además cualquier aditivo como vehículos, agentes aglutinantes, perfumes, agentes saborizantes, edulcorantes, colorantes, antisépticos, antioxidantes, agentes estabilizantes y tensoactivos, si se desea.

Las composiciones farmacéuticas y compuestos de acuerdo con la presente invención pueden formularse para la administración vía rutas enterales, como rutas orales; rutas parenterales vía inyecciones como inyecciones intravenosa, subcutánea, intraocular, intramuscular o intraperitoneal; rutas tópicas, como rutas orales, rutas mucosas o transmucosas, incluyendo rutas sublingual/bucal; así como rutas pulmonar, nasal, intranasal, intrabronquial, intrapulmonar. Las rutas de administración ocular incluyen la administración ocular tópica, administración intraocular, intravítrea o retrobulbar.

Las formulaciones preferidas de los compuestos de acuerdo con la presente invención comprenden formulaciones líquidas orales, formulaciones oculares y formulaciones intravenosas e intraperitoneales.

Las formulaciones líquidas orales son formatos en solución y suspensión para la administración oral de fármacos comunes, convenientes y se consideran seguras. Pueden usarse para liberar cantidades relativamente grandes de fármaco y con frecuencia se usan para la población pediátrica y para aquellos que experimentan dificultades para tragar tabletas o cápsulas. La introducción vía el tracto gastrointestinal proporciona la disolución rápida y absorción del fármaco, sin embargo, debe considerarse la tolerancia e interacción con otros materiales en el tracto. Las propiedades del ingrediente farmacéuticamente activo (API) pueden conducir por sí mismas a ser formuladas en soluciones orales de base acuosa simples; sin embargo, cuando los API son pobremente solubles, las formulaciones necesitan diseñarse alrededor de la molécula para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad. La introducción de tensoactivo, solventes, amortiguadores y aceites incrementa la solubilidad y reduce la precipitación la degradación y/o interacción con los fluidos gástricos. Donde se requieran suspensiones, a menudo se reduce y controla el tamaño de partícula para aumentar la solubilidad, infiltración del fármaco y finalmente la absorción del

fármaco. A medida que progresa el desarrollo de la formulación, se introducen conservadores y sabores para permitir la comodidad del paciente e idoneidad de la vida de anaquel.

Las formulaciones oculares son formulaciones oftálmicas proporcionadas directamente al ojo y a menudo están en formatos en solución o suspensión. La administración al ojo evita el metabolismo por el tracto gastrointestinal y puede usarse para fármacos que son pobremente absorbidos cuando se proporcionan oralmente. Las gotas para ojos son estériles e isotónicas con un pH nominal de 4-8 para evitar la irritación del ojo. Los excipientes incluyendo los agentes solubilizantes, agentes quelantes, polímeros, tensoactivos, aumentadores de la infiltración y ciclodextrinas, se agregan a la formulación para mejorar la estabilidad, modificar la viscosidad o incrementar la solubilidad, permeabilidad y biodisponibilidad de fármacos pobremente solubles.

Las formulaciones intravenosas permiten la absorción rápida después de la liberación parenteral del fármaco de toda la dosis que alcanza el sistema del paciente para una respuesta inmediata. Este modo de introducción evita el metabolismo por el tracto gastrointestinal y puede usarse para fármacos que son pobremente absorbidos cuando se proporcionan oralmente. Las inyecciones son típicamente soluciones acuosas estériles, isotónicas y se diseñan para no

inducir dolor en la administración. Para fármacos poco solubles, las formulaciones se modifican con cosolventes orgánicos, tensoactivos y amortiguadores para incrementar la solubilidad con las formulaciones en nanosuspensión siendo también aceptables. Para aquellas moléculas que son inestables en solución, las formulaciones pueden liofilizarse para dilución en el punto de uso.

La presente invención también proporciona equipos, que comprenden una composición que comprenden una dosis terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la presente invención o las formulaciones de los mismos, así como un dispositivo de liberación para la administración de la composición o formulación y que comprenden además un inserto de paquete que incorpora instrucciones manuales para el uso.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente, el ingrediente activo de acuerdo con la invención puede mezclarse con un portador adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con las técnicas de composición farmacéutica convencionales. Los portadores farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones de la presente abarcan cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, como una solución salina amortiguada con fosfato, agua y emulsiones, como emulsiones aceite/agua o agua/aceite y varios tipos de agentes

humectantes. Las composiciones pueden contener adicionalmente excipientes farmacéuticos sólidos como almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche descremada en polvo y similares. Los excipientes líquidos y semisólidos pueden seleccionarse de glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, agua, etanol y varios aceites, incluyendo aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de ajonjolí, etc. Los portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables, incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y glicoles. Para ejemplos de portadores, estabilizadores y adyuvantes, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, edited by E. W. Martin (Mack Publishing Company, 18th ed., 1990).

Las composiciones también pueden incluir solubilizantes y conservadores. Los ejemplos de solventes farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición de la presente pueden encontrarse en libros de referencia como el Handbook of Pharmaceutical Excipients (Ninth Edition, Pharmaceutical Press, London and American Pharmacists Association, Washington, 2020), Aulton's Pharmaceutics, The Design and Manufacture of Medicines. (Fifth edition, Editors: Kevin Tailor and Michael Aulton,

Elsevier, 2017), "Ullmann's Enciclopedia of Industrial Chemistry, 6th Ed." (various editors, 1989-1998, Marcel Dekker) y en “Pharmaceutical Dosedad Forms and Drug Delivery Systems" (ANSEL et al., 1994 et 2011, WILLIAMS & WILKINS). Los ejemplos no limitantes de solventes farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la presente composición incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol (también conocido como 1,2-dihidroxipropano, 2-hidroxipropanol, metil etilen glicol, metil glicol o propano-1,2-diol), etanol, metanol, propanol, isopropanol, butanol, glicerol, polietilenglicol (PEG), glicol, Cremophor EL o cualquier forma de aceite de ricino polietoxilado, dipropilenglicol, dimetil isosorbida, carbonato de propileno, N-metilpirrolidona, glicofurol, tetraetilenglicol, ésteres de ácido graso de propilenglicol y mezclas de los mismos.

Los compuestos de acuerdo con la invención han demostrado efectos antifibróticos, antiinflamatorios y antiangiogénicos. Varias enfermedades listadas en la presente pueden involucrar no únicamente uno sino a dos o aún tres objetivos. Las categorías de enfermedad muestran patobiología angiogénica (vascular), inflamatoria y/o fibrótica predominante.

En algunas modalidades la presente invención está dirigida a profármacos de los compuestos de acuerdo con la presente invención. Los beneficios de esos profármacos se

obtienen por métodos conocidos por un experto en el estado de la técnica, por ejemplo agregando los grupos funcionales escindibles apropiados que generarían, por ejemplo, una mejor solubilidad acuosa para la liberación parenteral o para la liberación oral.

Los profármacos para moléculas de la invención que exhiben propiedades muy polares y cargadas son especialmente preferidos puesto que esos grupos funcionales pueden influenciar positivamente la permeabilidad pasiva a través de las membranas biológicas. Los obstáculos principales para los fármacos polares y cargados es su pobre permeabilidad de la membrana, que a menudo conduce a una absorción oral baja y variable y a una baja biodisponibilidad oral. Además, la absorción oral de fármacos polares y cargados a menudo se asocia con variabilidad sustancial entre especies. Los fármacos pobremente permeables también tienen bajos niveles de exposición en órganos objetivo específicos aun después de la administración tópica. Mejorar la permeabilidad de la membrana ha sido una de las áreas más fructíferas de la investigación de profármacos a la fecha. Se han desarrollado diferentes estrategias de profármaco para fármacos de acuerdo a la invención para superar las barreras de la ruta tópica sobre el ojo, barreras de la mucosa oral, efectos de transportadores u otros usos tópicos.

Las estrategias de profármacos fueron reconocidas

formalmente por Adrian Albert en 1958 (Albert, A. Chemical aspects of selective toxicity. Nature, 1958, 182, 421-422) pero comenzaron en la parte inicial del siglo pasado, como es ejemplificado por la metanamina, fenacetina y prontosil. Los profármacos son moléculas con poca o ninguna actividad farmacológica, pero tienen una labilidad estructural implícita, ya sea por cambio o por diseño, que permite la bioconversión *in vivo* en el fármaco activo. La conversión puede ocurrir a través de un proceso químico o enzimático o una combinación de los dos. Las moléculas activas a menudo se asocian con propiedades fisicoquímicas indeseables que crean desafíos considerables para su liberación al objetivo biológico apropiado.

Los profármacos obtenidos a través de modificaciones estructurales del fármaco se diseñan para influenciar las propiedades fisicoquímicas inherentes de una molécula para permitir su liberación o distribución. Esos desarrollos no siempre se integran al diseño de nuevas moléculas en la fase de descubrimiento. Con frecuencia, la optimización análoga es la vía más preferida hacia adelante. La implementación de una estrategia de profármaco temprana puede resultar en desarrollo clínico más rápido y finalmente, la comercialización de un producto farmacéutico.

Las estrategias de profármacos para los grupos funcionales más comunes en fármacos originales se describen

en Rautio J, 2018 (Jarkko Rautio et al, Nature Reviews Drug Discovery, 2018, 17, 559-587). Esta revisión describe el papel en la expansión de los profármacos en el diseño y desarrollo contemporáneo de fármacos y las estrategias de profármacos para la mayoría de los grupos funcionales en los fármacos originales.

Los beneficios de los profármacos se obtienen agregando los grupos funcionales escindibles apropiados que generarían, por ejemplo, una mejor solubilidad acuosa para la liberación parenteral o para la liberación oral. Por otro lado, para moléculas muy polares o cargadas, esos grupos funcionales pueden influenciar positivamente en la permeabilidad pasiva a través de membranas biológicas. Los obstáculos principales para fármacos polares y cargados es su pobre permeabilidad de la membrana, lo cual a menudo conduce a una absorción oral baja y variable y a una baja biodisponibilidad oral.

Además, la absorción oral de los fármacos polares y cargados a menudo se asocia con variabilidad sustancial entre espacies. Los fármacos pobremente permeables también tienen bajos niveles de exposición en órganos objetivo específicos aún después de la administración tópica. La mejora de la permeabilidad de la membrana ha sido una de las áreas más fructíferas de la investigación de los profármacos a la fecha. Pueden aplicarse muchas estrategias de profármacos

para influenciar la lipofilicidad de un fármaco original. La lipofilicidad de los fármacos ha mejorado enmascarando sus funcionalidades polares ionizadas por entidades de hidrocarburos de cadena corta. Los grupos hidroxilo, carboxilo, fosfato o amina hidrofílicos y otros cargados negativa o positivamente han sido convertidos exitosamente a ésteres de alquilo o arilo o derivados de N-acilo más lipofílicos, los cuales se hidrolizan rápidamente de nuevo a los fármacos originales en el cuerpo por esterasas o peptidasas ubicuas.

La mayoría de los profármacos lipofílicos se han desarrollado para mejorar la permeabilidad de la membrana y absorción oral. La misma estrategia de profármaco puede aplicarse para mejorar la administración tópica de fármacos originales que son absorbidos a través de la piel o el ojo. Durante la administración tópica en el ojo, el profármaco penetra fácilmente en la córnea después de la instilación, donde se hidroliza predominantemente por la carboxilesterasa ocular. Los profármacos también pueden explotar el transporte mediado por el portador. Esos transportadores son proteínas de membrana que juegan un papel importante en el control de la entrada y salida de nutrientes endógenos polares cruciales. Su especificidad no se limita a sustratos endógenos y fármacos que tienen una semejanza estructural cercana a sustratos endógenos, también pueden ser llevados a

través de las membranas celulares por transportadores. El transporte mediado por el portador es particularmente importante para fármacos polares y cargados, puesto que tienen difusión pasiva despreciable a través de las membranas biológicas. Los profármacos que pueden tomar ventaja de mecanismos de transporte mediados por el portador ofrecen objetivos intrigantes en el diseño de fármacos. De manera similar, los profármacos pueden producir estabilidad metabólica mejorada.

Los profármacos pueden mejorar la inestabilidad metabólica la cual típicamente es atribuida al metabolismo hepático. De manera similar, el metabolismo intestinal indeseable de los fármacos puede ser superado por estrategias de profármacos selectivas. Esta estabilidad puede reducir considerablemente en gran medida la cantidad total de un fármaco que alcanza la circulación sistémica y su objetivo. Los profármacos pueden usarse para proteger fármacos activos de este efecto del primer paso enmascarando un grupo funcional metabólicamente lábil pero farmacológicamente esencial, como un fenol, para evitar el metabolismo rápido.

Para resolver el problema de niveles en plasma insuficientes y prolongar la duración de la acción, los fármacos usualmente son controlados por formulaciones, como suspensiones y matrices poliméricas, que controlan la liberación del fármaco y evitan los efectos pico y prolongan

sus acciones. Los profármacos pueden usarse para lograr la liberación controlada de un fármaco activo modificando su solubilidad acuosa y propiedades de disolución en una forma que afecte la velocidad de liberación del fármaco activo, la velocidad de absorción o su distribución en tejidos.

Los profármacos han sido especialmente útiles en el desarrollo de varias inyecciones de depósito de liberación sostenida, subcutáneas o intramusculares, las cuales mantienen los niveles terapéuticos en plasma de un fármaco original por semanas a meses. Esos profármacos son típicamente ésteres de ácido graso, como decanoatos, palmitatos, enantatos, cipionatos o valeratos, que se formulan en un vehículo a base de aceite, lo cual resulta en la liberación lenta del profármaco y en consecuencia, modula la disposición del fármaco original. La alta lipofilicidad de esos profármacos también resulta en la unión a las proteínas de la sangre y tejidos, lo cual retarda la conversión enzimática y en consecuencia resulta en la lenta aparición de un fármaco activo en la circulación sistémica.

La mejor focalización y los menores efectos secundarios a menudo se logran con profármacos dirigidos o focalizados escindidos en un ambiente ácido de un tejido tumoral, en endosomas o lisosomas con un profármaco lábil ácido. Un enfoque similar se logra también usando enzimas específicas del sitio y el profármaco es predominantemente

escindido en el órgano o tejido deseado donde la enzima está en la concentración más alta. Para fármacos cargados, la escisión intracelular conduce a una alta concentración celular del fármaco cargado negativamente o positivamente que permanece confinado en la célula objetivo.

Se han desarrollado estrategias de profármaco diferentes para los fármacos de acuerdo a la invención para superar las barreras de la ruta tópica en el ojo, barreras de mucosas orales, efectos del transportador u otros usos tópicos.

Los fármacos de acuerdo con la invención son grupos polares cargados. El problema a resolver depende de la ruta de administración y la necesidad de una duración prolongada o corta de la acción del fármaco. Los ejemplos de profármacos que son escindidos por tejidos de ratón, así como humanos y esterasas en sangre han sido sintetizados exitosamente.

Los compuestos de la invención contienen funciones carboxílicas y grupos fenol. Puede considerarse una amplia diversidad de profármacos derivados de esas funciones: por ejemplo, los ácidos carboxílicos han sido convertidos muy frecuentemente en ésteres: alquil ésteres simples (cadenas de metilo, etilo, isopropilo y más largas), alquil ésteres funcionalizados como morfolinoalquil ésteres, pirrolidinoalquil ésteres, N-metilpiperazino-alquil ésteres, también aril ésteres como ésteres derivados del guayacol;

ésteres de acetal mezclados como aciloximetil (o 1-etil) o alcoxicarboniloximetil (o 1-etil) ésteres y (oxodioxolil)metil ésteres también son funciones de profármaco eficientes para ácidos carboxílicos. Se ha usado una diversidad de ésteres y éteres funcionalizados como profármacos basados en fenol: ésteres alifáticos simples, ésteres aromáticos, semiésteres de ácidos dicarboxílicos, ésteres de aminoácido, ésteres de carbamato, monoésteres de fosfato, fosfonooximetil éteres, aciloximetil (o 1-etil) éteres, alcoxicarboniloximetil (o 1-etil) éteres, aminoaciloximetil éteres y similares.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno autoinmune, inmunológico, reumatológico, trastornos vasculares, trastornos oftalmológicos, trastornos fibróticos, trastornos metabólicos o gastrointestinales, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, trastornos asociados con neoplasmas y cáncer, enfermedades relacionadas con hormonas y trastornos inmunológicos resultantes de enfermedades infecciosas virales y bacterianas y complicaciones de las mismas, que comprende administrar a un sujeto en necesidad una dosis terapéuticamente efectiva de los compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención como se describió anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas y métodos de

acuerdo con la invención son particularmente adecuados para un sujeto que es un humano o un sujeto animal no humano.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser enfermedades objetivo sobre la base de sus perfiles de citocina individuales como se describe en los BIODATOS proporcionados para varios compuestos (Véanse las Figuras 3A-D). El siguiente sitio en la red Open Targets Platform (URL: https://www.targetvalidation.org/, Denise Carvalho et al, Nucleic Acids Research, Volume 47, Issue D1, 08 January 2019, D1056-D1065, https://doi.org/10.1093/nar/gky1133) da una imagen completa basada en la información bibliográfica actual y puede buscarse por enfermedad o citocina.

Dos ejemplos típicos: (a) la búsqueda específica por enfermedad para retinopatía diabética conduce a las siguientes citocinas descritas con una alta correlación con la enfermedad (Figura 3C). Las tres citocinas principales son, como ejemplo, para la búsqueda de la retinopatía diabética, indican el puntaje de VEGFA = 1 (factor del crecimiento endotelial vascular A), puntaje de HFE = 1 (regulador homeostático de hierro) y puntaje de TNF = 0.86 (factor de la necrosis tumoral) y (b) búsqueda de VEGFA: conduce a enfermedad del sistema nervioso, enfermedad vascular, enfermedad del ojo, retinopatía y varias otras enfermedades mostradas en la Figura 3D.

Para ilustrar la potencia de los compuestos sobre

un grupo pequeño de citocinas inflamatorias, se evaluaron los efectos de los compuestos en sangre humana completa (Ejemplo 3.6) y sus valores de CI_{50} sobre la inhibición de la inflamación inducida por LPS. (Tabla 13, en µM).

Tabla 13:

Compuesto	GM-CSF	IFNγ	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-18	IL-21	IL-33	TGFbeta	TNFα	TNFβ
Ia-001a	100	30.5	34.4	94.3	100	100	1.24	5.63	100	1.5	26.4	0.1	14.7	100	100	19.3	100	0.02	13.20
Ia-001a-Tz	100	100	100	7.99	100	100	0.75	8.63	26.1	32.4	32.1	0.11	46.5	100	100	23.6	100	0.63	53.00
Ia-001a-Tz/004a	3.4	0.61	100	4.91	100	100	3.04	8.48	19.5	12.2	1.5	0.02	2.4	46.6	0.3	1.67	100	0.002	3.02
Ic-001a-Tz2	100	1.38	100	9.45	100	100	0.52	9.13	100	29.1	0.12	0.31	0.15	33.9	32	0.23	100	0.1	0.41
Ia-001c	100	0.44	100	12.8	100	100	0.95	46.9	1.9	0.44	86.1	0.09	89.7	100	100	100	100	0.05	29.70
Ia-003a-Tz	100	2.95	100	43	100	100	1.41	3.62	6.94	1.26	89.6	0.07	83.9	100	1.49	72.2	100	0.18	55.00
Ic-007a	100	1.44	100	100	100	100	0.09	27.1	12.5	0.49	30.1	0.04	22.9	100	1.9	18.4	100	0.27	6.52
Ib-010a	100	2.22	33.3	2.74	100	100	1.02	11.58	100	0.27	100	0.42	100	100	67.8	31.3	100	0.31	49.30
Ib-010a-E3	100	2.79	100	36.2	100	100	0.24	26.8	100	0.84	33	0.52	34.2	100	100	20	100	0.98	38.20
Ia-015a	2.76	100	100	7.08	100	100	0.77	1.47	5.27	0.12	0.15	0.05	0.15	100	57.2	0.24	100	0.17	0.30
IIc-007a	26	0.11	100	12.8	100	100	0.05	2.14	17.9	3.37	0.25	0.01	0.26	100	9.41	0.18	100	0.03	0.29
IIc-009a	100	0.54	100	19.6	100	100	0.27	18.9	11.31	100	0.13	0.001	0.13	2.95	8.01	0.29	100	0.11	6.94
IIa-053a	100	1.04	100	1.67	100	100	2.2	1.41	100	0.27	29.9	100	28.8	100	100	12.1	100	0.02	91.50
IIIa-001aTz	100	18.9	100	100	100	100	1.98	3.01	7.78	0.48	0.15	0.17	0.16	27.7	3	0.14	100	0.31	0.23
IIIa-013a	27.8	0.15	100	57.1	100	100	3.55	11.9	37.3	0.5	0.37	0.15	0.41	100	1.63	1.11	100	0.51	0.89
IIIc-057a	100	0.9	16.2	24.2	100	100	0.19	11.1	100	0.73	4.73	1.32	5.06	100	1.56	2.93	100	0.15	1.58
IIIc-061a	31.2	2.48	100	100	100	100	0.18	8.85	17.9	37.2	0.31	0.04	0.32	32.4	6.38	0.31	100	0.03	0.81
IVc-058a	100	10.6	27.5	3.82	100	100	0.21	31.1	16.4	4.23	55.9	0.1	86.8	100	3.2	33.9	100	0.18	59.30
IVc-059a	100	4.34	38.6	21.2	100	100	0.11	0.4	1.31	42	100	0.16	100	100	1.87	27.5	100	0.16	0.33
IVc-059a-E2-A4	1.83	3.5	14.1	10.4	100	100	0.99	2.9	16.8	51.4	18.7	0.02	25.8	100	100	23.2	100	0.3	19.40

Los trastornos

inmunológicos/reumatológicos/vasculares pueden incluir, por ejemplo, peritonitis, enfermedad de Kawasaki (KD), arteritis de Takayasu (TA), poliangitis microscópica (MP), arteritis de células gigantes (ACG), síndrome antifosfolipídico (SAF), enfermedad de Behçet (BD), granulomatosis con poliangitis (GPA) o granulomatosis de Wegener (WG), granulomatosis eosinofílica con poliangitis, síndrome de Churg-Strauss (EGPA) y rosácea (RO).

Los trastornos reumatológicos en particular afectan los tendones de las articulaciones, ligamentos y huesos con dolor, pérdida de movimiento e inflamación. Esos incluyen muchos tipos de artritis como osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR), lupus, espondiloartropatías: espondilitis anquilosante (AS) y artritis psoriásica (PsA), síndrome de Sjögren, gota, esclerodermia, artritis infecciosa, artritis idiopática juvenil, polimialgia reumática.

La peritonitis es una inflamación del peritoneo usualmente debida a una infección bacteriana o fúngica. Hay dos tipos de peritonitis. El primer tipo es la peritonitis espontánea que puede desarrollarse como una complicación de una enfermedad hepática, como la cirrosis o enfermedad renal. La peritonitis secundaria puede resultar de perforación del abdomen o como una complicación de otras condiciones médicas. La peritonitis sin tratar puede conducir a infección severa, potencialmente amenazante de la vida.

La Enfermedad de Kawasaki causa inflamación en las paredes de las arterias de tamaño medio a través del cuerpo. Afecta principalmente a niños. La inflamación tiende a afectar las arterias coronarias, las cuales suministran sangre al músculo cardíaco. La enfermedad de Kawasaki algunas veces es denominada síndrome del nodo linfático mucocutáneo debido a que también afecta los nodos linfáticos que se inflaman durante una infección, la piel y las membranas mucosas dentro de la boca, la nariz y garganta.

La Arteritis de Takayasu es un tipo raro de vasculitis, un grupo de trastornos que causan la inflamación de los vasos sanguíneos. En la arteritis de Takayasu, la inflamación daña la aorta y sus ramas principales. La enfermedad puede conducir a arterias estrechadas o bloqueadas o a aneurisma. La arteritis de Takayasu puede conducir también a dolor de brazo o pecho, presión sanguínea alta y eventualmente insuficiencia cardíaca o ataque fulminante. Son necesarios medicamentos para controlar la inflamación en las arterias y prevenir complicaciones.

La granulomatosis con poliangitis es un trastorno poco común que causa inflamación de los vasos sanguíneos en la nariz, senos paranasales, garganta, pulmones y riñones. Anteriormente llamada granulomatosis de Wegener, esta condición es una de un grupo de trastornos de los vasos sanguíneos llamados vasculitis. Esta retarda el flujo

sanguíneo hacia algunos órganos. Los tejidos afectados pueden desarrollar áreas de inflamación denominadas granulomas, que puede afectar el funcionamiento de esos órganos. Sin tratamiento, la condición puede ser fatal.

La arteritis de células gigantes es una inflamación del revestimiento de las arterias. Con mayor frecuencia, afecta las arterias en la cabeza, especialmente en las sienes. Por esta razón, la arteritis de células gigantes algunas veces se denomina arteritis temporal. La arteritis de células gigantes a menudo causa cefaleas, sensibilidad del cuero cabelludo, dolor de mandíbula y problemas de visión. Sin tratar, puede conducir a ceguera.

El síndrome antifosfolipídico ocurre cuando el sistema inmune crea erróneamente anticuerpos que hacen que la sangre sea mucho más propensa a coagular. Esto puede causar coágulos de sangre peligrosos en las piernas, riñones, pulmones y cerebro. En mujeres embarazadas, el síndrome antifosfolipídico también puede resultar en aborto espontaneo y muerte fetal. No existe cura para el síndrome antifosfolipídico. Los medicamentos disponibles únicamente pueden reducir el riesgo de coágulos sanguíneos. La enfermedad de Behçet, también llamado síndrome de Behçet, es un trastorno raro que causa inflamación de los vasos sanguíneos. La enfermedad puede conducir a numerosos signos y síntomas que pueden parecer no relacionados en primera

instancia. Pueden incluir llagas en la boca, inflamación de los ojos, salpullido y lesiones en la piel y llagas genitales. El tratamiento actual puede ayudar a reducir los síntomas de la enfermedad de Behçet y prevenir complicaciones serias, como la ceguera. El síndrome de Churg-Strauss es un trastorno marcado por la inflamación de los vasos sanguíneos. Esta inflamación puede restringir el flujo sanguíneo a órganos y tejidos, algunas veces dañándolos permanentemente. Esta condición también se conoce como granulomatosis eosinofílica con poliangitis (EGPA). El asma es el signo más común del síndrome de Churg-Strauss. El trastorno también puede causar otros problemas, como fiebre del heno, sarpullido, sangrado gastrointestinal y dolor y entumecimiento en manos y pies. El síndrome de Churg-Strauss no tiene cura. Los medicamentos actuales incluyen esteroides y otros fármacos poderosamente inmunosupresores para ayudar a controlar los síntomas.

La rosácea es una condición común de la piel que causa enrojecimiento y vasos sanguíneos visibles en la cara. También puede producir bultos pequeños, rojos y llenos de pus. Esos signos y síntomas pueden estallar por semanas a meses y entonces desaparecer por un tiempo. La rosácea puede confundirse con el acné, otros problemas de la piel o rubor natural. No existe cura para la rosácea, pero el tratamiento puede controlar y reducir los signos y síntomas. La

osteoartritis es la forma más común de la artritis que afecta a millones de gente en todo el mundo. Esta ocurre cuando el cartílago protector se debilita con el tiempo. Aunque la osteoartritis puede dañar cualquier articulación, el trastorno más comúnmente afecta las articulaciones en las manos, rodillas, cadera y columna. Los síntomas de la osteoartritis pueden ser usualmente manejados, aunque el daño a las articulaciones no puede revertirse.

El lupus es una enfermedad autoinmune. Esta hace que el sistema inmune produzca proteínas llamadas autoanticuerpos que atacan tejidos y órganos propios, incluyendo los riñones. La nefritis lúpica es una complicación frecuente en personas que tienen lupus eritematoso sistémico (comúnmente conocido como lupus). La nefritis lúpica ocurre cuando los autoanticuerpos del lupus afectan estructuras de los riñones. Esto puede causar inflamación renal y puede conducir a sangre en la orina, proteína en la orina, presión sanguínea alta, función renal deteriorada o aún insuficiencia renal.

La escleroderma es un grupo de enfermedades raras que involucran el endurecimiento y estiramiento de la piel y tejidos conectivos. Existen muchos tipos diferentes de escleroderma. En algunas personas, la escleroderma afecta únicamente la piel. Pero en muchas personas, la escleroderma también daña estructuras más allá de la piel, como vasos

sanguíneos, órganos internos y el tracto digestivo (escleroderma sistémica), no existe cura para la escleroderma.

El síndrome de Sjögren es un trastorno del sistema inmune identificado por sus dos síntomas más comunes: ojo seco y boca seca. La condición con frecuencia acompaña otros trastornos del sistema inmune, como artritis reumatoide y el lupus. En el síndrome de Sjögren, las membranas mucosas y glándulas que secretan humedad de los ojos y la boca usualmente se ven afectadas primero, resultando en la disminución de lágrimas y saliva.

La artritis infecciosa o séptica es una infección dolorosa en una articulación que puede provenir de gérmenes que se desplazan a través del flujo sanguíneo desde otra parte del cuerpo. La artritis séptica puede ocurrir cuando una lesión penetrante, como una mordedura de un animal o trauma, libera gérmenes directamente en la articulación. Las personas que tienen articulaciones artificiales también están en riesgo de artritis séptica. Las rodillas son más comúnmente afectadas, pero la artritis séptica también puede afectar las caderas, hombros y otras articulaciones. La infección puede dañar rápida y severamente el cartílago y hueso dentro de la articulación, de modo que el tratamiento expedito es crucial.

La artritis idiopática juvenil, anteriormente

conocida como artritis reumatoide juvenil, es el tipo más común de artritis en niños de menos de 16 años. La artritis idiopática juvenil puede causar dolor, hinchazón y rigidez permanente de las articulaciones. Algunos niños pueden experimentar síntomas solo por unos cuantos meses, mientras que otros tienen síntomas por muchos años. Algunos tipos de artritis idiopática juvenil pueden causar complicaciones serias, como problemas de crecimiento, daño articular e inflamación de los ojos.

La polimialgia reumática es un trastorno inflamatorio que causa dolor y rigidez muscular, especialmente en los hombros y cadera. Los signos y síntomas de la polimialgia reumática usualmente comienzan rápidamente y empeoran en la mañana. La mayoría de las personas que desarrollan polimialgia reumática son de más de 65 años de edad. Esta enfermedad está relacionada con otra condición inflamatoria llamada arteritis de células gigantes.

Los trastornos oftálmicos pueden incluir por ejemplo y sin limitaciones, degeneración macular relacionada con la edad (AMD o ARMD, formas seca y húmeda), pterigión (PTE), retinopatía diabética (DR), edema macular diabético (DME), enfermedad Stargardt (SD), vitreorretinopatía proliferativa (PVR), síndrome del ojo seco (DYS), endoftalmitis, coriorretinopatía serosa central (CSC), retinosis pigmentosa (RP), glaucoma y glaucoma asociado con

complicaciones y uveítis (UVE).

La degeneración macular húmeda es un trastorno crónico del ojo que causa visión borrosa o un punto ciego en el campo visual. Esta generalmente es causada por vasos sanguíneos anormales que funden líquido o sangre hacia la mácula. La mácula es la parte de la retina responsable de la visión central. La degeneración macular húmeda es uno de los dos tipos de degeneración macular relacionada con la edad. El tipo húmedo siempre comienza como el tipo seco. La degeneración macular seca es más común y menos severa. También causa visión borrosa o visión central reducida, debido a adelgazamiento de la mácula. La degeneración macular seca puede desarrollarse primero en uno o ambos ojos y entonces afectar ambos ojos. La pérdida de visión es típicamente central, pero se retiene la visión periférica.

La retinopatía diabética es una complicación de la diabetes que afecta al ojo. Esta es causada por daño a los vasos sanguíneos de la retina. En primer lugar, la retinopatía diabética puede causar síntomas o solo problemas de visión leves. Eventualmente, causa ceguera. La condición puede desarrollarse en cualquiera de las diabetes tipo 1 o tipo 2. La EMD es una complicación seria del ojo que ocurre cuando se proyectan microaneurismas desde las paredes de los vasos, fugando o rezumando fluido o sangre hacia la retina, causando por lo tanto edema en la mácula. La enfermedad de

Stargardt es una enfermedad del ojo que causa pérdida de visión en niños y adultos jóvenes. Es una enfermedad heredada y de este modo se pasa a los hijos de sus padres. La enfermedad de Stargardt es una forma de degeneración macular y con frecuencia se denomina degeneración macular juvenil.

La PVR es una enfermedad que se desarrolla como una complicación del desprendimiento retinal regmatógeno. La PVR ocurre en aproximadamente 8-10% de los pacientes sometidos a cirugía primaria por desprendimiento retinal y previene la reparación quirúrgica exitosa del desprendimiento retinal regmatógeno. La PVR puede tratarse con cirugía para retraer la retina desprendida, pero el resultado visual de la cirugía es muy pobre.

La enfermedad del ojo seco es una condición común que ocurre cuando las lágrimas no son capaces de proporcionar la lubricación adecuada de los ojos. Las lágrimas pueden ser inadecuadas e inestables por muchas razones. Por ejemplo, los ojos secos pueden ocurrir si no produce suficientes lágrimas o si produce lágrimas de pobre calidad. Esta inestabilidad de la lágrima conduce a inflamación y daño a la superficie del ojo.

La endoftalmitis es una inflamación del interior del ojo que ocurre después de la inyección o cirugía del ojo. Los signos son típicamente: visión borrosa u otros cambios en la visión, dolor de ojos, enrojecimiento de los ojos,

sensibilidad del ojo a la luz o lagrimeo.

La retinitis pigmentosa (RP) es un grupo de trastornos genéticos raros que involucran una degradación y pérdida de células en la retina, la cual es el tejido sensible a la luz que reviste la parte posterior del ojo. Los síntomas comunes incluyen dificultad para ver en la noche y pérdida de la visión lateral (periférica).

El glaucoma es un grupo de condiciones del ojo que dañan el nervio óptico, la salud del cual es vital para la buena visión. Este daño a menudo es causado por una presión del ojo anormalmente alta. El glaucoma es una de las causas de ceguera que conducen a ceguera para personas de más de 60 años de edad. Puede ocurrir en cualquier edad, pero es más común en adultos más viejos. Muchas formas del glaucoma no tienen signos de advertencia. De este modo el efecto es gradual sin cambio en la visión hasta que la condición está en una etapa avanzada.

La uveítis es una forma de inflamación del ojo. Esta afecta la capa media del tejido en la pared del ojo o úvea. Los signos de advertencia de la uveítis a menudo aparecen súbitamente y empeoran rápidamente. Ellos incluyen enrojecimiento de los ojos, dolor y visión borrosa. Las posibles causas de la uveítis son infección, lesión o una enfermedad autoinmune o inflamatoria. La uveítis puede ser seria, conduciendo a la pérdida permanente de la visión.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención también pueden usarse en un método de tratamiento y/o prevención de la enfermedad neurodegenerativa retinal seleccionada del grupo que consiste de retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma y retinitis pigmentosa.

Las enfermedades neurodegenerativas retinales se refieren a condiciones retinales caracterizadas por pérdida neuronal progresiva. La retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad y retinosis pigmentosa se consideran enfermedades retinales en las cuales la neurodegeneración juega un papel esencial.

De acuerdo con esta modalidad preferida, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden combinarse con otros agentes activos para mejorar la eficacia terapéutica de la condición a ser tratada y particularmente con inhibidor de dipeptidil peptidasa-4 (DPPIV) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para usarse en el tratamiento tópico y/o prevención de enfermedades neurodegenerativa retinal. El inhibidor de DPPIV puede seleccionarse del grupo que consiste de sitagliptina, saxagliptina, vildagliptina, linagliptina, anagliptina, teneligliptina, alogliptina, trelagliptina, gemigliptina, omarigliptina, sus sales farmacéuticamente aceptables y mezclas de las mismas.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención también pueden combinarse de manera ventajosa con un tratamiento anti-VEGF para reducir el número de inyecciones intraoculares de anticuerpo anti-VEGF necesarias para los pacientes. La administración a los pacientes que tienen enfermedades neurodegenerativas retinales, como por ejemplo retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, retarda el progreso de esas enfermedades y reduce la farmacoterapia anti-VEGF que necesitan los pacientes.

Los trastornos fibróticos pueden incluir por ejemplo y sin ninguna limitación, fibrosis quística, fibrosis retroperitoneal, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis y enfisema pulmonar combinado (CPFE), fibrosis angiocéntrica eosinofílica, fibrosis intestinal, fibrosis ovárica, fibrosis sistémica nefrogénica, fibrosis submucosa oral (OSMF) y fibrosis hepática.

La fibrosis quística (FQ) es un trastorno hereditario que causa daño severo a los pulmones, sistema digestivo y otros órganos en el cuerpo. Afecta a las células que producen mucosa, sudor y jugos digestivos. En lugar de actuar como lubricantes, las secreciones obstruyen los tubos, conductos y pasajes, especialmente en los pulmones y el páncreas.

La fibrosis pulmonar es una enfermedad que ocurre cuando el tejido pulmonar se daña y cicatriza. Este tejido

grueso, rígido y hace más difícil que los pulmones trabajen apropiadamente. La cicatrización asociada con la fibrosis pulmonar puede ser causada por una multitud de factores. El daño pulmonar causado por la fibrosis pulmonar no puede ser reparado, pero los medicamentos y terapias pueden ayudar algunas veces a facilitar los síntomas y mejorar la calidad de vida.

El enfisema es una condición pulmonar que causa dificultad de la respiración. Están dañados y con el tiempo, las paredes internas de los alvéolos se debilitan y rompen, creando espacios de aire más grandes en lugar de muchos pequeños. Esto reduce el área superficial de los pulmones y a su vez, la cantidad de oxígeno que alcanza el flujo sanguíneo. Los alvéolos dañados no funcionan apropiadamente, conduciendo a que el aire viejo quede atrapado y sin dejar espacio para que entre aire fresco rico en oxígeno.

Los trastornos metabólicos y gastrointestinales pueden incluir, por ejemplo y sin ninguna limitación, complicaciones inducidas por la diabetes: retinopatía diabética (DN), retinopatía diabética (DR), cardiomiopatía diabética (DCDM) o úlceras del pie diabético (DFU). Las enfermedades hepáticas pueden incluir enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), hepatosis esteática no alcohólica (NASH), colangitis biliar primaria (PBC), fibrosis o cirrosis hepática (HF), enfermedad del intestino

inflamatorio (IBD): colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, fibrosis intestinal. Además de la retinopatía diabética, otras enfermedades renales pueden incluir enfermedad del riñón poliquístico (PKD), enfermedad renal crónica (ERC), la fibrosis sistémica nefrogénica (NSF) y pancreatitis (aguda y crónica).

La nefropatía diabética es una complicación seria relacionada con el riñón de la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. También llamada enfermedad renal diabética. Aproximadamente 25% de las personas con diabetes eventualmente desarrollan enfermedad renal. La nefropatía diabética afecta la capacidad del riñón para efectuar su trabajo usual de remover productos residuales y fluido extra del cuerpo. Durante muchos años, la condición daña lentamente el sistema de filtración delicado del riñón y puede progresar hasta falla en el riñón, también llamada enfermedad renal en etapa final. La falla o insuficiencia renal es una condición que amenaza la vida.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es un término sombrilla para una gama de condiciones del hígado que afectan a personas que beben poco o no beben alcohol. Como el nombre lo sugiere, la característica principal de la NAFLD es mucha grasa almacenada en las células del hígado. La forma más común de la enfermedad hepática crónica. Algunos individuos con NAFLD pueden

desarrollar esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), una forma agresiva de la enfermedad del hígado graso, que es marcada por inflamación del hígado y puede progresar a cicatrización avanzada (cirrosis) y falla hepática. Este daño es similar al daño causado por el alto consumo de alcohol.

La colangitis biliar primaria es una enfermedad autoinmune crónica en la cual los conductos biliares en el hígado son destruidos lentamente. Cuando los ductos biliares son dañados, la bilis puede regresar al hígado y algunas veces conducir a cirrosis irreversible. Una combinación de factores genéticos y ambientales desencadena la enfermedad.

La IBD describe trastornos que involucran inflamación crónica del tracto digestivo. Los tipos de IBD incluyen colitis ulcerativa, la cual involucra úlceras a lo largo del revestimiento superficial del colon y recto, así como enfermedad de Crohn, la cual se caracteriza por inflamación del revestimiento del tracto digestivo, el cual a menudo puede involucrar las capas más profundas del tracto digestivo. Tanto ambas de la colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn usualmente se caracterizan por diarrea, sangrado rectal, dolor abdominal, fatiga, pérdida de peso y algunas veces conducen a complicaciones que amenazan la vida.

Los neoplasmas y los trastornos asociados con el cáncer pueden incluir, por ejemplo, sin ninguna limitación, cáncer de pancreático: principalmente carcinoma fibrótico, de

células renales, fibrosis inducida por radiación, mielofibrosis primaria, desmoplasia, fibrosarcoma, carcinoma hepatocelular, retinoblastoma, linfoma intraocular y melanoma (desmoplásico, conjuntival, uveal).

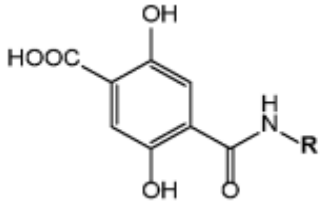
La invención también se relaciona con el tratamiento, prevención y reducción de enfermedades virales a través de la unión a sitios de unión de sulfato de heparán de proteínas de virus. Los compuestos de acuerdo con la invención interactúan con la región de unión de sulfato de heparán de factores del crecimiento (FGF, VEGF y otros factores del crecimiento) y receptores de factores del crecimiento (FGFR, VEGFR y otros). Se conocen muchos virus que interactúan con células de mamífero usando su afinidad a porciones de sulfato de heparán unidas a membranas celulares. Los virus que portan sobre su superficie dominios de unión de sulfato de heparán de proteínas (HS) usan la afinidad de HS como una de las puertas de entrada principales para aproximarse e infectar células y unirse al sulfato de heparán unido a las células. Cuando se unen a virus HS, son capaces de infectar células usando varios mecanismos de invasión específicos para cada virus. La fuerte interacción de los compuestos de acuerdo con la invención con el dominio de unión de heparán de proteínas y proteínas virales específicamente es la prevención de la infección viral de las células sanguíneas, vasos sanguíneos del revestimiento de las

células endoteliales y órganos, así como células de la superficie epitelial presentes en la boca, mucosa nasal y pulmones y también en el tracto gastrointestinal. Se conocen varias especies de virus con alta afinidad por sulfatos de heparán como pero sin limitarse al virus sincitial respiratorio, metapneumovirus humano, influenza (H1N1 y similar), rinovirus humano (HRV), virus rinosincitial (RV), virus del Chikunguña, coronavirus como CoV, SARS-CoV, MERS-Cov, COVID-19 (SARS-CoV-2 y sus variantes). El HS es un cofactor necesario para la infección por SARS-CoV-2. El HS interactúa con el dominio de unión del receptor de la glicoproteína del pico del SARSCoV-2, adyacente a ACE2, modificando la estructura del pico a una conformación abierta para facilitar la unión de ACE2. Las enfermedades infecciosas virales y bacterianas también pueden incluir choque séptico, inflamación en el ojo como endoftalmitis debida a cirugía o infección.

EJEMPLOS

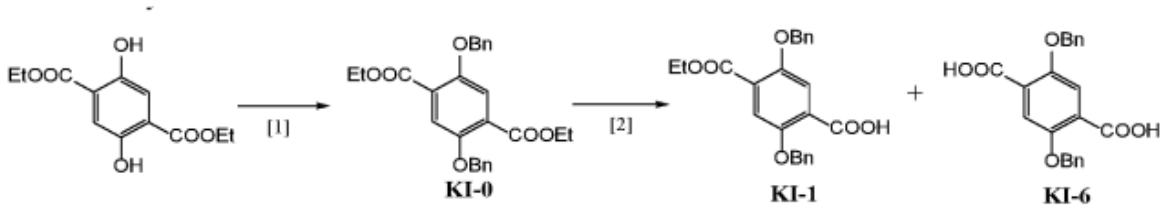
EJEMPLO 1: Síntesis de los compuestos e intermediarios

Ejemplo 1.1: Moléculas del tipo Ia: Monoamidas, ejemplos



SÍNTESIS DE PRECURSORES

Esquema de reacción 1. Intermediarios Sintéticos **KI-1** y **KI-6**



Procedimientos:

Síntesis de **KI-1** y **KI-6** (pasos [1],[2])

2,5-bis(benciloxi)tereftalato de dietilo **(KI-0) (Paso [1]).** Se agregó en porciones carbonato de potasio-malla 325 (326.1 g, 2.4 mol) a una solución agitada de 2,5-dihidroxitereftalato de dietilo (200.0 g, 0.79 mol) en DMF (800.0 mL) a temperatura ambiente durante 15 min. Entonces se agregó por goteo bromuro de bencilo (280.0 mL, 2.4 mol) al matraz de reacción durante 30 min. y la mezcla resultante se calentó a 100°C por 2 h, resultando en la formación de un precipitado espeso de color crema. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (2 L). La suspensión resultante se agitó por 30 min, entonces se filtró. El material sólido se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (2 × 200 mL). El sólido se suspendió entonces en etanol (400 mL), se filtró y secó en el horno al vacío para dar el producto deseado como un sólido blanco

(341.0 g, 0.785 mol, 99.8%).

UPLC-MS (método ácido,, 2 min): t. a. = 1.36 min, sin ionización observada, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.51-7.44 (m, 6H), 7.44-7.36 (m, 4H), 7.36-7.28 (m, 2H), 5.17 (s, 4H), 4.29 (c, J = 7.1 Hz, 4H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

***Ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)-benzoico (KI-1) y ácido 2,5-bis(benciloxi)tereftálico* (KI-6) (paso [2])**

Se agregó rápidamente una solución de hidróxido de potasio (14.2 g, 0.25 mol) en agua (200.0 mL) a una solución de 2,5-bis(benciloxi)tereftalato de dietilo (100 g, 0.23 mol) en 1,4-dioxano (1 L) y la mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El solvente se removió *in vacuo*, resultando en la formación de una lechada blanca. El producto crudo se suspendió en EtOH (500 mL) y filtró y el sólido recolectado se secó en un horno al vacío para dar 2,5-bis(benciloxi)tereftalato de dietilo puro (23.0 g, 0.053 mol, 23%).

UPLC-MS (método ácido,, 2 min): t. a. = 1.36 min, sin ionización observada, área de pico 98%.

El filtrado etanólico se concentró para dar un aceite. Se agregó acetato de etilo (500 mL) para formar un precipitado el cual se filtró y lavó con acetato de etilo (200 mL) para dar ácido 2,5-bis(benciloxi)tereftálico (**KI-6**)

como un sólido blanco (18.9 g, 0.042 mol, 18%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.22 min, *m/z* 377.1 $[M-H]^-$, área de pico 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.52-7.45 (m, 4H), 7.41-7.33 (m, 4H), 7.33-7.26 (m, 4H), 5.13 (s, 4H).

El filtrado se lavó con una solución acuosa saturada de carbonato de sodio (200 mL), ácido clorhídrico acuoso 1 M (500 mL) y salmuera (500 mL), entonces se secó (Na_2SO_4), filtró y concentró hasta sequedad para dar ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**KI-1**) como un sólido blanco (53 g, 0.130 mol, 57.0%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.22 min, *m/z* 405.3 $[M-H]^-$, área de pico 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.52-7.27 (m, 13H), 5.17 (s, 4H), 4.28 (c, J = 7.1 Hz, 2H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

PROTOCOLO A GRAN ESCALA PARA LA SÍNTESIS DE KI-1

Un recipiente revestido de 10 L se cargó con 2,5-bis(benciloxi)tereftalato de dietilo (500.00 g, 1.15 mol), 1,4-dioxano (2.5 L), hidróxido de potasio (71.00 g, 1.26 mol) y agua (500 mL). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El análisis LCMS mostró que la reacción estaba a la mitad de su finalización, mostrando también el subproducto (diácido) y material de partida (diéster) en la relación de (diéster:monoácido:diácido = 28:58:14). (diácido: 4.44 t. a., monoácido: 5.08 t. a.,

diéster: 5.68 t. a.). En esta etapa el solvente se removió *in vacuo*. El producto crudo se retiró en una mezcla de etanol:agua 2:1 (3 L), en un recipiente revestido de 10 L, se agitó durante la noche y filtró para dar:

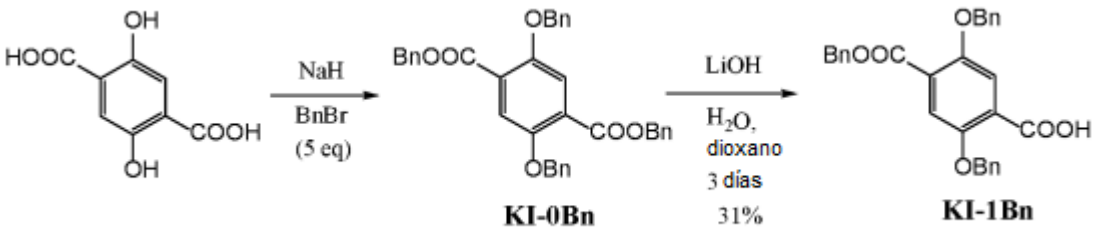
Sólido: (diéster:monoácido:diácido = 86:12:2, 110.00 g, sólido incoloro)

Filtrados: (diéster:monoácido:diácido = 3:63:34)

Los filtrados se concentraron *in vacuo* para dar un aceite. Este aceite se retiró en acetato de etilo (2.5 L), se agitó durante la noche en un recipiente revestido de 10 L y se filtró para dar un sólido blanco (150.00 g). Sólido: (diéster:monoácido:diácido = trazas: 40:60).

Los filtrados se recolectaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (100 mL), solución de ácido clorhídrico 1 N (200 mL) y salmuera (200 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se filtraron. El solvente se removió bajo presión reducida para dar el producto deseado, ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**KI-1**), como un sólido blanco, el cual se secó en el horno al vacío a 50°C por 48 h (225.00 g, 49% de rendimiento) (los rendimientos varían entre 49-65%).

Esquema de reacción 2: Intermediario Sintético **KI-1Bn**



Procedimiento:

Síntesis de **KI-1Bn:**

***Ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(benciloxicarbonil)-benzoico* (KI-1Bn).** A una solución de ácido 2,5-dihidroxitereftálico (1.97 g, 10 mmol) en DMF (20 mL) a 0°C se agregó hidruro de sodio (2.0 g, 50 mmol) bajo agitación, entonces bencilo de bromuro (5.95 mL, 50 mmol, 5 eq) por goteo durante 5 min. y la mezcla resultante se mantuvo a temperatura ambiente, por 2 h. La mezcla se calentó entonces a 60°C por 18 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató continuamente con MeOH (5 mL). La mezcla se concentró bajo presión reducida y el material residual se coevaporó con heptano (3x). El residuo se retiró en DCM (30 mL), la fase orgánica se lavó con HCl 1 M (25 mL), la capa acuosa separada se extrajo con DCM (3 x 30 mL) y las fases orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$) y concentraron. El producto crudo sólido se recristalizó de EtOH (~30 mL) para dar **KI-0Bn** puro (2.286 g, 41%). Se agregó una muestra de KI-0Bn (282 mg, 0.5 mmol) a una mezcla de 1,4-dioxano (10 mL) e hidróxido de litio hidratado (22 mg, 0.52

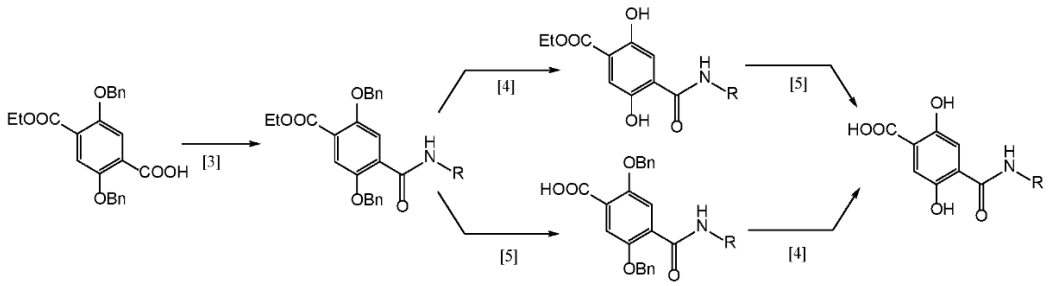
mmol) y la mezcla se calentó a 80°C por 3 d. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se retiró en AcOEt (30 mL) y la solución se lavó con HCl 1 M (2 mL). La fase orgánica se secó y concentró y el residuo se sometió a cromatografía en columna para dar el monoéster **KI-1Bn** contaminado por aproximadamente 16% de diéster **KI-0Bn.**

KI-0Bn: ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.51 (s, 2H), 7.36-7.30 (m, 20H), 5.34 (s, 4H), 5.11 (s, 4H).

KI-1Bn: ^{1}H RMN (250 MHz, $CDCl_3$): δ 7.86 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.41-7.30 (m, 20H), 5.36 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 5.16 (s, 2H).

SÍNTESIS DE MONOAMIDAS

Esquema de reacción 3. Síntesis de Monoamidas **Ia**



Procedimiento general A para Acoplamiento de Amida [3A]

➢ Acoplamiento *vía* cloruro de acilo, de **KI-1** o **KI-6**

Reacción Modelo (Ia-013a)

2-(2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)-benzoilamino)isoftalato de dimetilo. Se disolvió ácido 2,5-

bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**KI-1**, 1.1 g, 2.8 mmol) en cloruro de tionilo (6 mL) y la mezcla resultante se agitó por 5 min. Se agregaron unas cuantas gotas de DMF y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 18 h. Se removió el exceso de cloruro de tionilo *in vacuo* y el residuo se codestiló con tolueno (3 × 20 mL) para dar el cloruro de acilo. Se agregó rápidamente una solución de cloruro de acilo en DCM (10 mL) a una solución de amina (2-aminoisoftalato de dimetilo, 210 mg, 3.1 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (0.53 mL, 3.045 mmol) en DCM (10 mL) a temperatura ambiente y la reacción se agitó por 18 h. La reacción se diluyó con DCM (70 mL) y se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 M (100 mL), agua (100 mL), se secó (Na_2SO_4), filtró y concentró para dar el producto crudo, el cual se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo (0 a 25%) en iso-hexano para dar el producto deseado como un sólido blanco (1.24 g, 2.075 mmol, 75%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.37 min; *m/z* = 598.2 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.60 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.59 -7.23 (m, 12H), 5.49 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.28 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.71 (s, 6H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

Procedimiento general B para Acoplamiento de Amida

[3B]

➢ Acoplamiento usando un agente de condensación, de **KI-1** o **KI-6**

Reacción Modelo (Ia-001a)

2-(2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoilamino)benzoato de metilo. Se agregó 1-metilimidazol (13.0 mL, 163 mmol) a una mezcla de ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**KI-1**, 12.95 g, 32 mmol) y antranilato de metilo (5.729 g, 38 mmol, 1.190 eq) en MeCN (150 mL) a temperatura ambiente. Se agregó en porciones hexafluorofosfato de cloro-N,N,N',N'-tetrametilformamidinio (TCFH) (10.728 g, 0.038 mol) durante 30 min. y la mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató con ácido clorhídrico acuoso 1 M (700 mL). La suspensión resultante se agitó por 10 min, entonces se filtró. El material sólido se lavó con agua (2 x 200 mL). El sólido se suspendió entonces en etanol (200 mL), se filtró, se lavó con éter (100 mL) y se secó en el horno al vacío para dar el producto deseado como un sólido blanco (14.7 g, 27 mmol, 86%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.43 min; *m/z* = 540.2 $[M+H]^+$, área de pico > 99%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.87 (s, 1H), 8.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.81 - 7.61 (m, 2H), 7.59 - 7.12 (m, 12H), 5.41 (s, 2H), 5.20 (s, 2H),

4.28 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

Procedimientos Generales de Desprotección [4], [5]

Saponificación

Reacción modelo (Ia-013a)

Ácido 2-(2,5-bis(benciloxi)-4-carboxibenzoilamino)-isoftálico. Se agregó la solución de hidróxido de litio (42 mg, 1 mmol) en agua (4 mL) a la solución de 2-(2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoilamino)isoftalato de dimetilo (100 mg, 0.167 mmol) en THF (6 mL) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 18 h. Se agregó LiOH adicional (6 eq) en agua (4 mL) a la mezcla de reacción la cual se agitó por 23 h adicionales. Después de la finalización, se agregó agua (50 mL) a la reacción y la mezcla se lavó con acetato de etilo (50 mL). La capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico acuoso 1 M a pH = 2 y se extrajo con acetato de etilo (2X 50 mL). Las capas orgánicas se recolectaron, se secaron (Na_2SO_4), filtraron y concentraron para dar el compuesto del título como un sólido blanco (82 mg, 0.151 mmol, 91%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.02 min; *m/z* = 542.1 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.18 (s, 2H), 11.74 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.58 -7.43 (m, 5H), 7.40 -7.24 (m, 7H), 5.47 (s, 2H), 5.14 (s, 2H).

Desbencilación

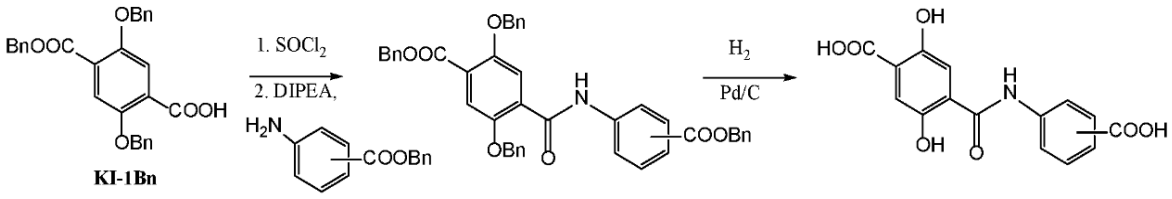
Reacción modelo (Ia-013a)

***Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-carboxibenzoilamino)-isoftálico* (Ia-013a).** Se agregó Pd/C (94 mg, 10%) a una solución de ácido 2-(2,5-bis(benciloxi)-4-carboxibenzoilamino)isoftálico (0.94 g, 1.74 mmol) en una mezcla 10:30 mezcla de EtOH y DCM. La mezcla se colocó bajo hidrógeno a presión atmosférica a temperatura ambiente y se agitó por 18 h. Después de la finalización, la mezcla se filtró a través de Celite, la cual se lavó con DCM y MeOH. Los filtrados y lavados se combinaron y concentraron bajo presión reducida para dar el producto deseado **Ia-013a** como un sólido amarillo (644 mg, 1.69 mmol, 98%).

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.91 min; *m/z* = 362.0 $[M+H]^+$, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (DMSO-d_6) δ: 13.11 (s, 2H), 11.70 (s, 1H), 11.13 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H).

Esquema de reacción 4a. Síntesis de Monoamidas **Ia** de **KI-1Bn**



Procedimiento general de KI-1Bn

➢ Acoplamiento *vía* cloruro de acilo

Reacción Modelo: síntesis de Ia-032a

4-(2,5-bis(benciloxi)-4-(benciloxicarbonil)-benzoilamino)fenilacetato de bencilo. A una solución de **KI-1Bn** (233 mg, 84% de pureza) en DCM (10 mL) se agregó $SOCl_2$ (1.8 mL, 60 eq) y la mezcla se calentó a 50°C por 3h. Se evaporaron los solventes y el residuo se coevaporó con tolueno (3 x 10 mL), para dar el cloruro de acilo crudo (237 mg, 99%). Este material se disolvió en DCM (3 mL) y se agregó diisopropiletilamina (0.08 mL, 1.15 eq), seguido por una solución de 4-aminofenilacetato de bencilo (92 mg, 0.95 eq) en DCM (3 mL). El volumen de reacción final fue 10 mL. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, por 18 h. La mezcla se diluyó con DCM (15 mL), se lavó con cloruro de amonio acuoso (12 mL). La fase acuosa separada se extrajo con DCM (2 x 2 mL), las fases orgánicas se combinaron, se secaron ($MgSO_4$) y concentraron. El producto crudo se sometió a cromatografía en columna (Pet. Et./DCM 1:1 entonces gradiente hasta 100% DCM) para dar una primera fracción de KI-0Bn puro y una segunda fracción que contiene el producto deseado puro (237 mg, 86%, corregido para la pureza de KI-1Bn).

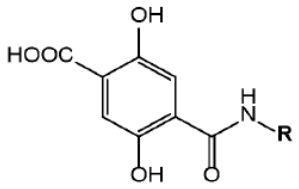
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 10.10 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.53-7.30 (m, 20H), 7.22-7.13 (AB amplio, 4H), 5.39, 5.22, 5.21, 5.12 (4s, 4x 2H), 3.61 (s, 2H).

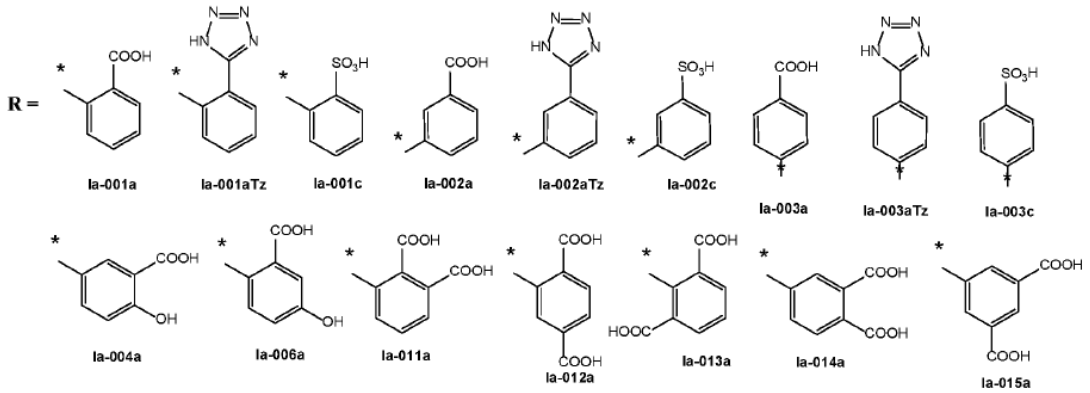
Ácido 4-(4-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-

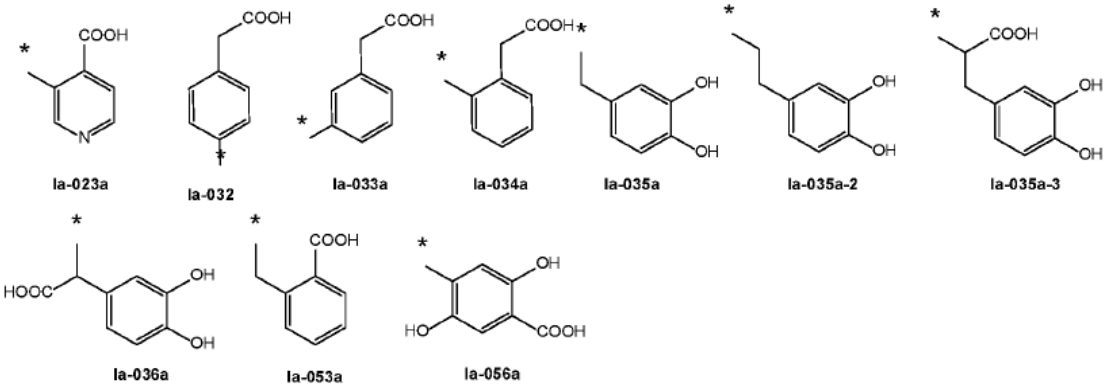
dihidroxibenzoico **(Ia-032a).** A una solución de precursor preparado anteriormente (225 mg, 0.33 mmol) en DCM (20 mL) se agregó 5% de Pd sobre carbono (72 mg), seguido por EtOH (20 mL). El matraz se enjuagó con Ar (3x) entonces se llenó con hidrógeno (presión atmosférica) y la mezcla se agitó por 2 h a temperatura ambiente. El catalizador se removió por filtración sobre un filtro millipore, se evaporó el filtrado y el residuo se secó para dar el producto **Ia-032a** como un sólido amarillo claro (107 mg, 99%).

^{1}H RMN (250 MHz, DMSO-d_6): δ 12.28 (amplio, 1H), 10.92 (s, 1H), 10.44 (s, 1H), 7.65 (d amplio, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.25 (d amplio, 2H), 3.55 (s, 2H).

Como ejemplos:







De las condiciones y rendimientos: Véanse las Figuras 4A-D

1) Ácido 4-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-001a**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.95 minutos, *m/z* = 316 $[M-H]^-$, área de pico > 97%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.22 (s, 1H), 10.85 (s, 1H), 8.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.71 - 7.56 (m, 1H), 7.41 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}NO_7$: 318.06083, encontrado: 318.06080.

Biodatos: **Ia-001a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 41; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 39; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 7.3; CI_{50} de la inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 2.25; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 48; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.355; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 44.3; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50}

de IFNγ [µM] = 30.5; CI_{50} de IL-1β [µM] = 34.4; CI_{50} de IL-2 [µM] = 94.3; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 1.24; CI_{50} de IL-9 [µM] = 5.63; CI_{50} de IL-10 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 1.5; CI_{50} de IL-13 [µM] = 26.4; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.1; CI_{50} de IL-17F [µM] = 14.7; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-33 [µM] = 19.3; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNFα [µM] = 0.02; CI_{50} de TNFβ [µM] = 13.2.

Dietil éster:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.39 minutos, *m/z* = 372.2 $[M-H]^-$, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.96 (s, 1H), 11.05 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.57 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.65 (ddd, *J* = 8.7, 7.3, 1.7 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.25 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 4.35 (m, 4H), 1.33 (m, 6H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{19}H_{20}NO_7$: 374.12342, encontrado: 374.12354.

Biodatos: **Ia-001a-E2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 9.2; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 123; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 1.25; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 51.47; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 2.58; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 50.5.

2) Ácido 4-(2-(1H-tetrazol-5-il)-

fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-001aTz:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.17 min; *m/z* = 342.0 $[M+H]^+$, área de pico > 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.60 (s, 1H), 10.90 (s, 2H), 8.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.61 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.50 - 7.32 (m, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}N_5O_5$: 342.08329, encontrado: 342.08318.

Biodatos: **Ia-001a-Tz**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 6.2; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 20; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 17; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.23; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 54.33; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.54; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 69.75; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = > 100; CI_{50} de IL-1β[µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 7.99; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.75; CI_{50} de IL-9 [µM] = 8.63; CI_{50} de IL-10 [µM] = 26.1; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 32.4; CI_{50} de IL-13 [µM] = 32.1; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.11; CI50 de IL-17F [µM] = 46.5; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-33 [µM] = 23.6; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNFα [µM] = 0.63; CI_{50} de TNFβ [µM] = 53.

Etil éster:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.08

minutos, *m/z* = 370.1 $[M+H]^+$, área de pico > 97%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.48 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.62 (ddd, *J* = 8.6, 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.42 - 7.34 (m, 2H), 4.37 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{17}H_{16}N_5O_5$: 370.11460, encontrado: 370.11458.

Biodatos: **Ia-001a-Tz-E1**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 3.8; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 75.97; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 98.88.

Etil éster diacetato:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.57 minutos, *m/z* = 454.1 $[M+H]^+$, área de pico > 97%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.23 (s, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.64 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.43 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 4.32 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{21}H_{20}N_5O_7$: 454.13572, encontrado: 454.13542.

Biodatos: **Ia-001a-Tz-E1-A2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 60;

CI_{50} de FGF-2 [µM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 49.85; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 98.2.

3) Ácido 2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico, compuesto **Ia-001c**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.73 min; *m/z* = 352.0 $[M-H]^-$, área de pico > 99%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.54 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.42 - 7.28 (m, 3H), 7.12 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{14}H_{12}NO_8S$: 354.02781, encontrado: 354.02754.

Biodatos: **Ia-001c**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 21; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 13; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 100; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 3.31; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 40.36; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 2.4; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 31.33; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = 0.44; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 12.8; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.95; CI_{50} de IL-9 [µM] = 46.9; CI50 de IL-10 [µM] = 1.9; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 0.44; CI_{50} de IL-13 [µM] = 86.1; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.09; CI_{50} de IL-

17F [µM] = 89.7; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-33 [µM] = > 100; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNFα [µM] = 0.05; CI_{50} de TNF β [µM] = 29.7.

4) Ácido 4-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-002a:**

^{1}H-RMN (250 MHZ, DMSO-d_6) δ ~13 (v amplio, 1H), 10.82 (s amplio, 1H), 10.60 (s amplio, 1H), 8.38 (s, 1H) 7.92 (d, 1H), 7.71 (d, 1H), 7.49 (t, 1H), 7.39 (s, 2H).

Biodatos: **1a-002a:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 20; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 59; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 71; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 5.7; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 42.1; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.312; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 27.92.

5) Ácido 4-(3-(1H-tetrazol-5-il)-fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-002aTz:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.13 min; *m/z* = 342.0 $[M+H]^+$, área de pico > 99%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.81 (s, 1H), 10.67 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.91 - 7.84 (m, 1H), 7.79 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}N_5O_5$: 342.08329, encontrado: 342.08317.

Biodatos: **Ia-002a-Tz:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 10; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 53; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 57; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 66.61; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.86; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 38.5.

6) Ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)benzoico, compuesto **Ia-002c:**

^{1}H-RMN (250 MHZ, DMSO-d_6) δ 11.04 (s, 1H), 10.53 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.69 (d, 1H), 7.43 (s, 2H) y 7.40 - 7.28 (m, 2H).

Biodatos: **Ia-002c:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 14; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 150; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 150; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 38.9; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.405; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 1.87.

7) Ácido 4-(4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-003a:**

^{1}H-RMN (250 MHz, DMSO-d_6) δ 12.8 (amplio, 1H), 10.73 (s, 1H), 10.68 (s, 1H), 7.94 (AB de d, 2H), 7.84 (AB de d, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.34 (s, 1H).

HRMS (AX033)

Biodatos: **Ia-003a:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 12; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 34; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 150; CI_{50} de

inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 44.4; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.414; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 39.1.

8) Ácido 4-(4-(1H-tetrazol-5-il)-fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-003aTz:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.79 min; *m/z* = 342.0 $[M+H]^+$, área de pico > 97%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.77 (s, 1H), 10.70 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.37 (s, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}N_5O_5$: 342.08329, encontrado: 342.08326.

Biodatos: **Ia-003a-Tz**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 6.7; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 45; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 13; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 6.4; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 62.21; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 2.49; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 30.33; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = 2.95; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 43; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 1.41; CI_{50} de IL-9 [µM] = 3.62; CI_{50} de IL-10 [µM] = 6.94; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 1.26; CI_{50} de IL-13 [µM] = 89.6; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.07; CI_{50} de IL-17F

[µM] = 83.9; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = 1.49; CI_{50} de IL-33 [µM] = 72.2; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNFα [µM] = 0.18; CI_{50} de TNF β [µM] = 55.

9) Ácido 2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)benzoico, compuesto **Ia-003c:**

^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.90 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 7.66 (AB de d, 2H), 7.58 (AB de d, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.39 (S, 1H).

Biodatos: **Ia-003c:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 35; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 150; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 150; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.4; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = N. D.; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM]-; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = N. D.

10) Ácido 4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-004a:**

UPLC-MS (método ácido, 6.5 min): t. a. = 1.40 min; *m/z* = 332.0 $[M-H]^-$, área de pico > 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.94 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.20 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.9, 2.8 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}NO_8$: 334.05574, encontrado: 334.05572.

Biodatos: **Ia-004a:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 32; CI_{50} de

FGF-2 [µM] = 15; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 28; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 7.7; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 64.61; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 28.38.

Etil metil éster:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.16 minutos, *m/z* = 376.1 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.90 (s, 1H), 10.50 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.26 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 8.9, 2.8 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.37 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{18}NO_8$: 376.10269, encontrado: 376.10259.

Biodatos: **Ia-004a-E2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 35; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 36; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 6.1; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 85.34; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 97.65.

11) Ácido 4-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-006a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.81 min; *m/z* = 334.0 $[M+H]^+$, área de pico > 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.33 (s, 1H), 11.86 (s, 1H), 10.90 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 8.39 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.03 (dd, J = 9.0, 3.0 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}NO_8$: 334.05574, encontrado: 334.05562.

Biodatos: **Ia-006a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 89; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 224; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 100; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 11.8; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 60.56; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.2; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 25.33.

12) Ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico, compuesto Ia-011a:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.69 min; m/z = 360.1 $[M-H]^-$, área de pico > 89%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.46 (s, 2H), 11.37 (s, 1H), 10.97 (s, 1H), 8.33 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 7.57 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.44 (s, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362.05065, encontrado: 362.05036.

Biodatos: **Ia-011a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 35; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 110; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 57.71; CI_{50} de inhibición de PMN

ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 42.32.

13) Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico, compuesto **Ia-012a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.12 min; *m/z* = 362.1 $[M+H]^+$, área de pico > 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.41 (s amplio, 2H), 12.29 (s, 1H), 10.94 (s, 1H), 9.26 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.73 (dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 7.42 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362.05065, encontrado: 362.05046.

Biodatos: **Ia-012a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 38; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 36; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 30; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 59.52; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.85; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 28.5.

14) Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico, compuesto **Ia-013a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.91 min; *m/z* = 362.0 $[M+H]^+$, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.11 (s, 2H), 11.70 (s, 1H), 11.13 (s, 1H), 7.97 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.38 (t, J = 7.7 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362.05065, encontrado: 362.05041.

Biodatos: **Ia-013a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 29; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 18; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 17; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 38.52; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 2.38; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 27.67.

15) Ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico, compuesto **Ia-014a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.98 min; *m/z* = 362.1 $[M+H]^+$, área de pico > 94%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.76 (s, 1H), 10.70 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.94 - 7.84 (m, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.30 (s, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362.05065, encontrado: 362.05047.

Biodatos: **Ia-014a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 20; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 20; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 88; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 61.3; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 9.667.

16) Ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico, compuesto **Ia-015a**:

^1H RMN (250 MHz, DMSO-d_6) δ 10.74 (s, 1H), 8.56 (d

estrecho, 2H), 8.22 (t estrecho, 1H), 7.41 (s, 1H) y 7.37 (s, 1H).

Biodatos: **Ia-015a:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 20; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 9.3; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 19; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.15; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 43.8; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.387; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 17.38; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = 2.76; CI_{50} de IFNγ [µM] = > 100; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 7.08; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.77; CI_{50} de IL-9 [µM] = 1.47; CI_{50} de IL-10 [µM] = 5.27; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 0.12; CI_{50} de IL-13 [µM] = 0.15; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.05; CI_{50} de IL-17F [µM] = 0.15; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = 57.2; CI_{50} de IL-33 [µM] = 0.24; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNFα [µM] = 0.17; CI_{50} de TNF β [µM] = 0.3.

17) Ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico, compuesto **Ia-023a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.63 min; *m/z* = 319.1 $[M+H]^+$, área de pico > 93%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.17 (s, 1H), 11.03 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 8.46 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.43 (s, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{14}H_{11}N_2O_7$: 319.05608, encontrado: 319.05610.

Biodatos: **Ia-023a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 63; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 143; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 61.95; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 13.37.

Dietil éster:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.87 minutos, *m/z* = 375.1 $[M+H]^+$, área de pico > 98%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.79 (s, 1H), 11.23 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 9.68 (s, 1H), 8.50 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 5.1, 0.7 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 4.46 - 4.27 (m, 4H), 1.41 - 1.25 (m, 6H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{19}N_2O_7$: 375.11867, encontrado: 375.11867.

Biodatos: **Ia-023a-E2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 76; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 141; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 6.6; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 69.47; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 34.

18) Ácido 4-(4(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-032a**:

^1H RMN (250 MHz, DMSO-d_6): δ 12.28 (amplio, 1H), 10.92 (s, 1H), 10.44 (s, 1H), 7.65 (d amplio, 2H), 7.41 (s,

1H), 7.38 (s, 1H), 7.25 (d amplio, 2H), 3.55 (s, 2H).

Biodatos: **Ia-032a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 91; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = N. D.; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = N. D.; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM]-; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = N. D.

19) Ácido 4-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-033a**:

UPLC-MS (método ácido, 6.5 min): t. a. = 1.71 min; *m/z* = 332.1 $[M+H]^+$, área de pico > 99%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.89 (s, 1H), 10.46 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.59 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.03 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.57 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332.07647, encontrado: 332.07644.

Biodatos: **Ia-033a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 60; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 165; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 281; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 57.73; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.32; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 38.

20) Ácido 4-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-034a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.82 min;

m/z = 332.1 $[M+H]^+$, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.78 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.63 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332.07648, encontrado: 332.07641.

Biodatos: **Ia-034a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 79; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 14; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 102; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 49.07; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 2.28; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 15.

21) Ácido 4-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-035a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.02 min; *m/z* = 320.1 $[M+H]^+$, área de pico > 91%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.56 (s, 1H), 9.21 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.72 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{14}NO_7$: 320.07648, encontrado: 320.07650.

Biodatos: **Ia-035a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 20; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 71; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de

inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 36; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 75.13; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.41; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 27.

22) Ácido 4-(2-(3,4-dihidroxifenil)-etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-035a-2:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.77 min; *m/z* = 332.0 $[M-H]^-$, área de pico > 99%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.50 (s, 1H), 8.85 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.67 -6.60 (m, 2H), 6.48 (dd, *J* = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 3.44 (c, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.67 (dd, *J* = 8.6, 6.0 Hz, 2H).d 11.56 (s, 1H), 9.21 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.72 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{16}NO_7$: 334.09213, encontrado: 334.09242.

Biodatos: **Ia-035a-2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 10; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 65; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 109; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 10; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 58.81; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.1; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 21.5.

23) Ácido 4-(1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)-etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-035a-3**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.70 min; *m/z* = 376.0 $[M-H]^-$, área de pico > 99%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.90 (s, 1H), 11.11 (s, 1H), 8.98 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.73 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.61 (dd, *J* = 5.1, 2.9 Hz, 2H), 6.47 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 3.01 (dd, *J* = 13.9, 4.9 Hz, 1H), 2.96 - 2.84 (m, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{17}H_{16}NO_9$: 378.08196, encontrado: 378.08195.

Biodatos: **Ia-035a-3**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 34; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 207; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 198; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 10; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 79.62; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.66; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 22.

24) Ácido 4-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-036a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.62 min; *m/z* = 362.1 $[M-H]^-$, área de pico > 92%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.00 (s, 1H), 9.32 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 7.40 (s, 1H),

7.34 (s, 1H), 6.81 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.75 - 6.64 (m, 2H), 5.29 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_9$: 364.06630, encontrado: 364.06615.

Biodatos: **Ia-036a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 37; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 123; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 1.6; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 87.17; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 30.77.

25) Ácido 4-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-053a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.08 min; *m/z* = 332.0 $[M+H]^+$, área de pico > 97%.

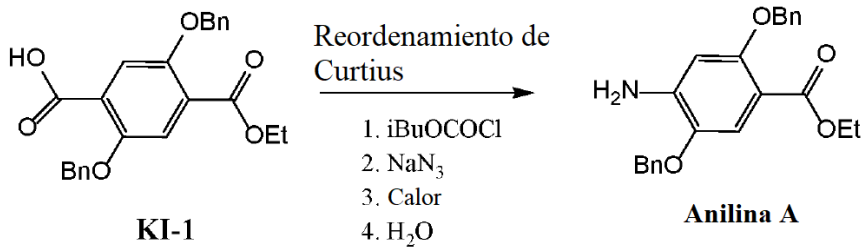
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.09 (s, 1H), 11.19 (s, 1H), 9.34 - 9.27 (m, 1H), 7.91 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.39 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 4.82 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332.07648, encontrado: 332.07622.

Biodatos: **Ia-053a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 150; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 124; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 210; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 52.92; CI_{50} de inhibición de PMN

ROS [µM] = 2.5; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 18.67.

Esquema de reacción 4b. Síntesis de 4-amino-2,5-dibenciloxibenzoato de etilo (anilina A)



Protocolo: síntesis de Anilina A

4-amino-2,5-dibenciloxibenzoato de etilo (Anilina A). A una solución enfriada (baño de hielo) de **ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (KI-1)** (2.0 g, 4.9 mmol) y Et_3N (1.6 mL, 11.3 mmol) en THF (25 mL) bajo una atmósfera inerte (N_2), se agregó lentamente DPPA (1.1 mL, 5.2 mmol). La mezcla se calentó lentamente a t. a. y se agitó a esta temperatura por 3 h. Entonces se agregó agua (8 mL) y la mezcla de reacción se calentó a 70°C por 2 h. La mezcla de reacción se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio (250 mL) y se agitó por 5 min. antes de extraer con EtOAc (3 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y concentraron bajo presión reducida para dar un aceite incoloro. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna (iso-Hexano/EtOAc 1:0 entonces en gradiente hasta 30% EtOAc) para

dar el compuesto del título **Anilina A** (1.0 g, 53%) como un sólido blanco mate.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.26 min; *m/z* = 378.2 $[M+H]^+$, área de pico 94%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.54 - 7.46 (m, 4H), 7.44 -7.36 (m, 4H), 7.35 -7.25 (m, 3H), 6.46 (s, 1H), 5.65 (s, NH_2), 5.06 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.16 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

26) Ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-056a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.90 min; *m/z* = 348.0 $[M-H]^-$, área de pico 97%.

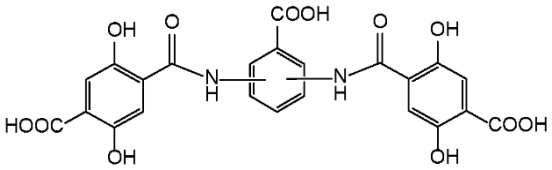
1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.28 (s amplio, 1H), 11.26 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.26 (s, 1H).

Dietil éster:

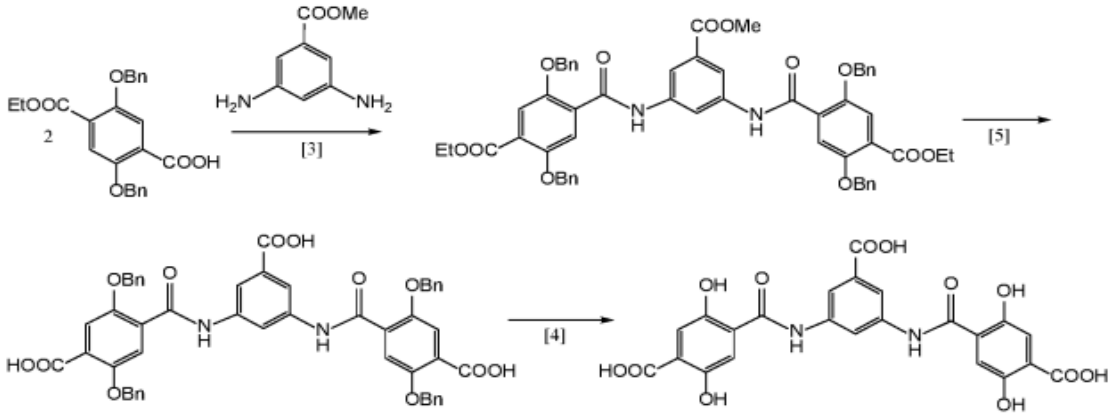
UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.86 min; *m/z* = 404.2 $[M-H]^-$, área de pico 92%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.48 (s amplio, 1H), 11.32 (s amplio, 1H), 10.28 (s, 1H), 10.07 (s amplio, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 4.46 - 4.27 (m, 4H), 1.46 - 1.12 (m, 6H).

Ejemplo 1.2 - Moléculas del tipo Ib: Diamidas a partir de diaminas, 1 ejemplo

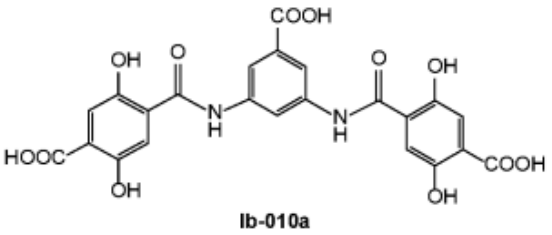


Esquema de reacción 5. Síntesis de Diamidas del tipo **Ib**



Procedimientos Sintéticos: véanse los procedimientos generales, pasos [3], [4], [5]

Ejemplo:



Ib-010a

Para las condiciones y rendimientos: Véanse las Figuras 4A-D

27) Ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboxibenzoilamino)benzoico, compuesto **Ib-010a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.98 min;

m/z = 511.0 [M-H]', área de pico > 93%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.81 (s, 2H), 10.65 (s, 2H), 8.38 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 2.3 Hz, 4H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{23}H_{17}N_2O_{12}$: 513.07760, encontrado: 513.07736,

Biodatos: **Ib-010a**: CI_{50} de FGF-1 [μM] = 14; CI_{50} de FGF-2 [μM] = 3.8; CI_{50} de VEGF-A1 [μM] = 15; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [μM] = 1.6; PMN ROS [inhibición a 0.3 μM [%] = 71.84; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [μM] = 1.06; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 1.5; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [μM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [μM] = 2.22; CI_{50} de IL-1β [μM] = 33.3; CI_{50} de IL-2 [μM] = 2.74; CI_{50} de IL-4 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [μM] = 1.02; CI_{50} de IL-9 [μM] = 11.58; CI_{50} de IL-10 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-12p70 [μM] = 0.27; CI_{50} de IL-13 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-17A [μM] = 0.42; CI_{50} de IL-17F [μM] = > 100; CI_{50} de IL-18 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [μM] = 67.8; CI_{50} de IL-33 [μM] = 31.3; CI_{50} de TGFβ [μM] = > 100; CI_{50} de TNFα [μM] = 0.31; CI_{50} de TNF β [μM] = 49.3.

Trietil éster:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.29 minutos, *m/z* = 597.1 $[M+H]^+$, área de pico > 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.80 (s, 2H), 10.68 (s, 2H), 9.95 (s, 2H), 8.40 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 2.0

Hz, 2H), 7.42 (s, 2H), 7.39 (s, 2H), 4.42 -4.33 (m, 6H), 1.38 - 1.33 (m, 9H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{29}H_{29}N_2O_{12}$: 597.17150, encontrado: 597.17131.

Biodatos: **Ib-010a-E3**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 26; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 226; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.09; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 36.41; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 6.52; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 79.5; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = 2.79; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 36.2; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.24; CI_{50} de IL-9 [µM] = 26.8; CI_{50} de IL-10 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 0.84; CI_{50} de IL-13 [µM] = 33; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.52; CI_{50} de IL-17F [µM] = 34.2; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-33 [µM] = 20; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNFα [µM] = 0.98; CI_{50} de TNF β [µM] = 38.2.

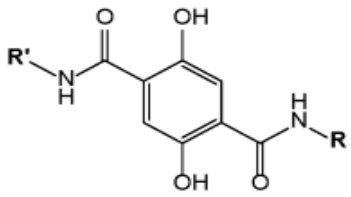
Tetraacetato de trietil éster:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.19 minutos, *m/z* = 782.1 $[M+NH_4]^+$, área de pico 91%.

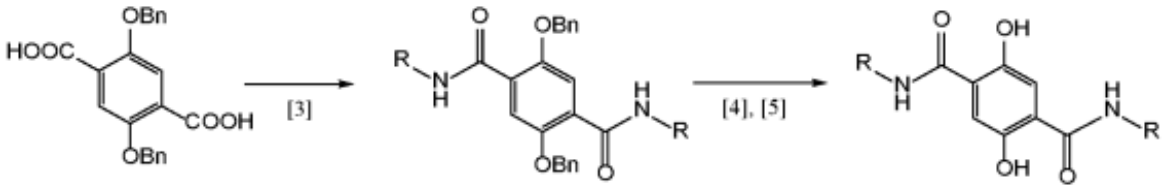
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.84 (s, 2H), 8.40 (m, 1H), 8.08 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.80 (s, 2H), 7.63 (s, 2H), 4.45 - 4.22 (m, 6H), 2.32 (s, 6H), 2.23 (s, 6H), 1.38 - 1.27 (m, 9H).

Biodatos: **Ib-010a-E3-A4:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.54; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 54.86; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.49; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 96.

Ejemplo 1.3. - Moléculas del tipo Ic: Diamidas a partir de diácidos, 4 ejemplos

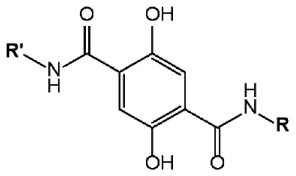


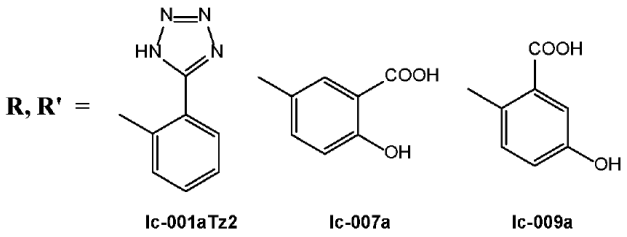
Esquema de reacción 6. Síntesis de Amidas del tipo **Ic** con R = R'



Procedimientos: véanse los procedimientos generales de **KI-6** [3], [4], [5]

Ejemplos:





Para las condiciones y rendimientos: Véanse las Figuras 4A-D

28) N_1,N_4-bis(2-(1H-tetrazol-5-il)fenil)-2,5-dihidroxitereftalamida, compuesto **Ic-001aTz2**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.97 min; *m/z* = 485.1 $[M+H]^+$, área de pico > 97%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.53 (s, 1H), 10.98 (s, 1H), 8.49 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.62 (ddd, *J* = 8.7, 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.37 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{22}H_{17}N_{10}O_4$: 485.14287, encontrado: 485.17274.

Biodatos: **Ic-001aTz2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 70; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 45; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 2.2; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 60.64; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 97.15; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = 1.38; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 9.45; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de

IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.52; CI_{50} de IL-9 [µM] = 9.13; CI_{50} de IL-10 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 29.1; CI_{50} de IL-13 [µM] = 0.12; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.31; CI_{50} de IL-17F [µM] = 0.15; CI_{50} de IL-18 [µM] = 33.9; CI_{50} de IL-21 [µM] = 32; CI_{50} de IL-33 [µM] = 0.23; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNFα [µM] = 0.1; CI_{50} de TNF β [µM] = 0.41.

29) Ácido 5-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico, compuesto **Ic-007a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.80 min; *m/z* = 469.1 $[M+H]^+$, área de pico > 91%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.08 (s, 2H), 7.65 (s, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.30 - 6.89 (m, 5H), 6.79 (d, J = 8.8 Hz, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) δ 172.1, 165.2, 158.3, 150.1, 130.2, 129.2 (CH), 122.8, 122.6 (CH), 117.7 (CH), 117.3 (CH), 113.3.

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{22}H_{17}N_2O_{10}$: 469.08777, encontrado: 469.08739.

Biodatos: **Ic-007a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 13; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 5.4; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 3.2; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.09; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 57.99; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 2.7; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 57.5; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50}

de IFNγ [µM] = 1.44; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.09; CI_{50} de IL-9 [µM] = 27.1; CI_{50} de IL-10 [µM] = 12.5; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 0.49; CI_{50} de IL-13 [µM] = 30.1; CI50 de IL-17A [µM] = 0.04; CI_{50} de IL-17F [µM] = 22.9; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = 1.9; CI_{50} de IL-33 [µM] = 18.4; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNFα [µM] = 0.27; CI_{50} de TNF β [µM] = 6.52.

Dimetil éster:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.13 minutos, *m/z* = 497.0 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.08 (s, 2H), 10.48 (s, 2H), 10.38 (s, 2H), 8.27 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 7.89 - 7.74 (m, 2H), 7.56 (s, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.93 (s, 6H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{24}H_{21}N_2O_{10}$: 497.11907, encontrado: 497.11874.

Biodatos: **Ic-007a-E2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 23; CI50 de FGF-2 [µM] = 49; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.25; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 21.33; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 7.9; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 2

Síntesis alternativa a gran escala de Ic-007a

a) Metil éster de ácido 5-(4-(3-metoxicarbonil-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dibenciloxibenzamido)-2-

hidroxibenzoico

Un matraz de brida de 5 L se cargó con ácido 2,5-bis(benciloxi)tereftálico (KI-6, 141.00 g, 0.373 mol), cloruro de benciltrietilamonio (850 mg, 3.73 mmol, 0.01 eq) y cloroformo (2.5 L). Entonces se equipó con una entrada de nitrógeno, termómetro, salida del embudo de goteo de compensación de presión a una botella vacía de Dreschel y burbujeador de hidróxido de sodio. La solución agitada se calentó a 55°C y se agregó por goteo cloruro de tionilo (59 mL, 0.802 mol, 2.15 eq) durante un periodo de 40 min. La solución se mantuvo a 55°C por 6h, entonces se dejó enfriar a temperatura ambiente durante la noche. Se sonicó una alícuota en etanol por 5 min., entonces en etanol se analizó por análisis LCMS, el cual mostró únicamente dietiléster. La mezcla se transfirió a dos matraces de fondo redondo y los volátiles se removieron *in vacuo*; el cloruro de ácido se hizo azeótropo con tolueno (800 mL en cada matraz). Un recipiente revestido de 10 L se cargó con 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (137.00 g, 0.819 mol, 2.2 eq) y diclorometano (2.5 L, 18 vol); la solución se enfrió a 15°C. El cloruro de ácido se retiró en diclorometano (2.5 L, 18 vol) y se agregó a la reacción agitada. La reacción forma inmediatamente grandes cantidades de sólido y la agitación se vuelve difícil; también la reacción desprende calor a 30°C. Sin embargo, con agitación prolongada la mezcla se convierte en una suspensión

rosa/púrpura. La mezcla se agitó a 25°C durante 72h. La suspensión se filtró, se lavó con diclorometano (2 L, 14 vol) y el sólido resultante se secó en un horno al vacío para dar 240.00 g de producto (94% de rendimiento).

b) Ácido 5-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico, Ic-007a

Saponificación: Un matraz de fondo redondo de 3 bocas se cargó con **metil éster de ácido 5-(4-(3-metoxicarbonil-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dibenciloxibenzamido)-2-hidroxibenzoico** recién molido (150.00 g, 0.22 mol) e isopropanol (1.5 L, 10 vol). La mezcla se calentó a 50°C y se agregaron hidróxido de tetrabutilamonio (444 mL, 0.67 mol, 3 eq) y agua (1.1 L, 7 vol). Después de 1 h quedaron algunos sólidos, de modo que se agregaron 60 mL adicionales de solución de hidróxido de tetrabutilamonio junto con agua (120 mL), la mezcla se agitó a 50°C por 6 h, entonces se dejó enfriar a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó hidróxido de tetrabutilamonio adicional (80 mL) y la mezcla se agitó adicionalmente a 60°C por 1 h hasta que no quedaron sólidos. *Hidrogenólisis*: La reacción se desgasificó (3 ciclos con N_2), entonces se agregó el catalizador (30.00 g, 10% Pd sobre C) como una lechada en agua (100 mL). La reacción se desgasificó adicionalmente (3 ciclos con N_2, 2 con H_2) y se colocó bajo H_2 (presión de

globo) a 50°C durante la noche. La reacción se recargó con hidrógeno y se mantuvo a 50°C por 4 h adicionales tiempo después del cual el análisis de LCMS mostró una reacción completa. La mezcla de reacción se desgasificó (3 ciclos con N_2), se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó con agua tibia/isopropanol (1 L, 1:1, 60°C). El volumen se redujo a ~1.2 L *in vacuo*. La mezcla se transfirió a un matraz de brida de 5 L con agua (~3 L). El matraz se equipó con un agitador en la parte superior (del tipo de ancla grande) y se acidificó con ácido clorhídrico (35%). Durante la adición se formó un precipitado pesado. La mezcla se calentó a 55°C por 6 h, entonces se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 72 h. La mezcla se filtró y el sólido se suspendió en HCl acuoso 1 M (3 L) y se calentó a 50°C por 3 h, antes dejar enfriar a t. a. durante la noche. La mezcla se filtró, se lavó con HCl acuoso 1 M (2 L), agua (1.5 L) y acetona (1 L). El sólido se secó en el horno al vacío para dar 100.00 g de producto aún contaminado por ~5 mol% de sal de tetrabutilamonio (RMN). Este sólido se agitó con ácido clorhídrico acuoso 1 M (3 L) a 70°C por 8 h, entonces se dejó enfriar a t. a. durante la noche. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó en el horno al vacío. La cantidad de tetrabutilamonio se redujo a ~0.62 mol%. (85.90 g, 82% de rendimiento) (polvo marrón).

30) Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-

carboxifenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibenzoico, compuesto **Ic-009a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.85 min; *m/z* = 469.0 $[M+H]^+$, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.31 (s, 2H), 11.93 (s, 2H), 10.85 (s, 2H), 9.64 (s, 2H), 8.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.55 (s, 2H), 7.39 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.03 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 2H).

HRMS: calculado para $C_{22}H_{17}N_2O_{10}$: 469.08777, encontrado: 469.08755.

Biodatos: **Ic-009a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 32; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 202; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 208; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 72.85; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 72.21.

Dimetil éster:

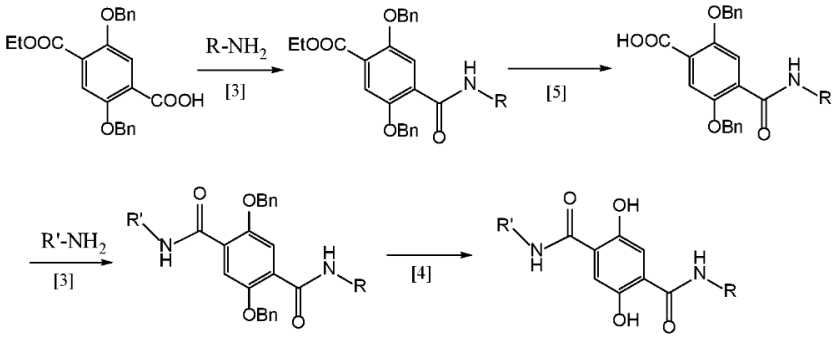
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.03 minutos, *m/z* = 497.1 $[M+H]^+$, área de pico > 92%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.69 (s, 2H), 11.01 (s, 2H), 9.75 (s, 2H), 8.36 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.62 (s, 2H), 7.37 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 2H), 3.87 (s, 6H).

HRMS: calculado para $C_{24}H_{21}N_2O_{10}$: 497.11907, encontrado: 497.11913.

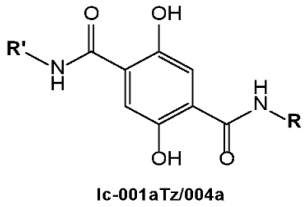
Biodatos: **Ic-009a-E2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 23; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 30; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.02; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 24.12; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 41.05.

Esquema de reacción 7. Síntesis de Amidas del tipo **Ic** con R ≠ R'

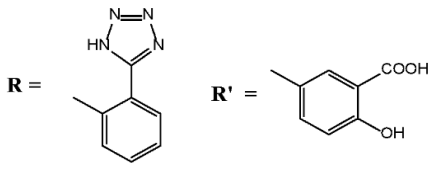


Procedimientos Sintéticos: Véase el procedimiento general de **KI-1**.

Ejemplo:



Ic-001aTz/004a



Para condiciones y rendimientos: Véanse las Figuras 4A-D

31) Ácido 5-(4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico, compuesto **Ic-001aTz/004a:**

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.92 (s, 1H), 10.42 (s, 1H), 8.47 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.98-7.88 (m, 1H), 7.76 (dd, J = 8.9, 2.8 Hz, 1H), 7.63-7.56 (m, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.37 (td, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 8.9 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{22}H_{17}N_6O_7$: 477.11532, encontrado: 477.11475.

Biodatos: **Ic-001a-Tz/004a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 19; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 87; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 25; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 2.6; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 82.83; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 96.99; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = 3.4; CI_{50} de IFNγ [µM] = 0.61; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 4.91; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 3.04; CI_{50} de IL-9 [µM] = 8.48; CI_{50} de IL-10 [µM] = 19.5; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 12.2; CI_{50} de IL-13 [µM] = 1.5; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.02; CI_{50} de IL-17F [µM] = 2.4; CI_{50} de IL-18 [µM] = 46.6; CI_{50} de IL-21 [µM] = 0.3; CI_{50} de IL-33 [µM] = 1.67; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNFα [µM] = 0.002; CI_{50} de TNF β [µM] = 3.02.

Metil éster:

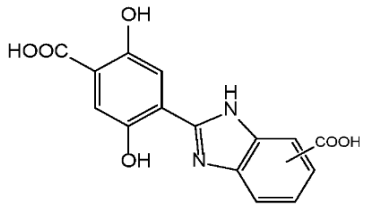
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.06 minutos, *m/z* = 491.1 $[M+H]^+$, área de pico > 89%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.55 (s, 1H), 10.90 (s, 1H), 10.45 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.47 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 7.63 (ddd, *J* = 8.7, 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.38 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.93 (s, 4H).

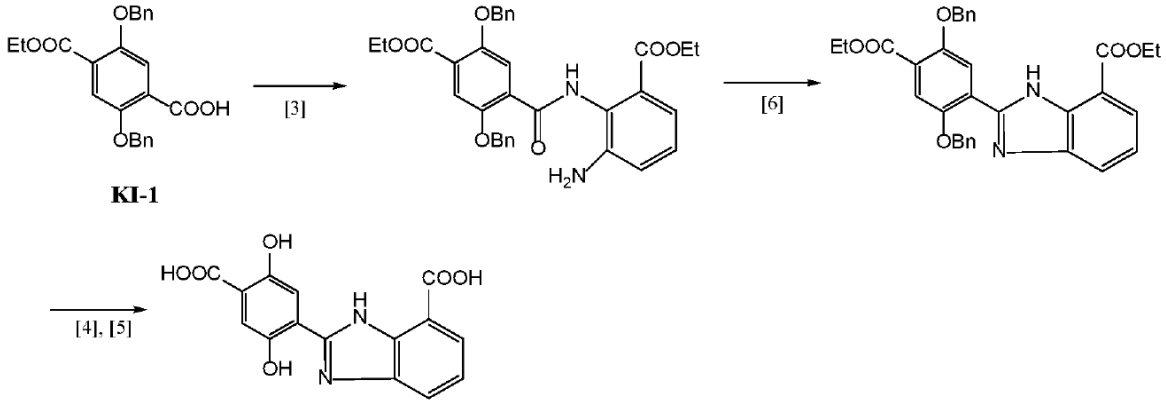
HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{23}H_{19}N_6O_7$: 491.13097, encontrado: 491.13071.

Biodatos: **Ic-001a-Tz/004a-E1**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 104; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 35; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.1; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 73.97; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 97.56.

Ejemplo 1.4. Moléculas del tipo Id: Bencimidazol-enlazado, 1 ejemplo



Esquema de reacción 8. Síntesis de compuestos del tipo **Id**

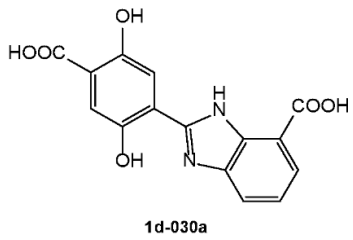


KI-1

Procedimiento sintético: Véase el procedimiento general de **KI-1**[3], [4], [5]

Paso de ciclización: Véanse las Figuras 4A-D

Ejemplo:



1d-030a

32) Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico, compuesto **Id-030a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.99 min; *m/z* = 313.1 $[M-H]^-$, área de pico > 97%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.68 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H).

Biodatos - inestable en DMSO

Etil metil éster:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 2.09

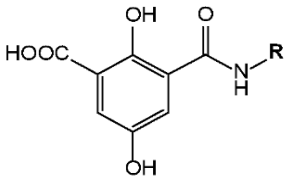
minutos, *m/z* = 357.1 $[M+H]^+$, área de pico > 89%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6 + D_2O 10%) δ 7.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.90 - 7.83 (m, 2H), 7.44-7.36 (m, 2H), 4.35 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{17}N_2O_6$: 357.10811, encontrado: 357.10827.

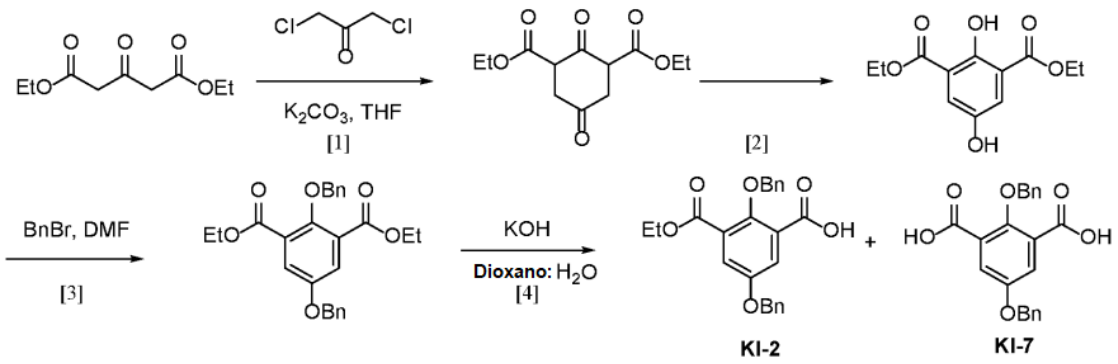
Biodatos: **Id-030a-E2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 115; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.33; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 0; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 43.

Ejemplo 1.5: Moléculas del tipo IIa: Monoamidas, 16 ejemplos



SÍNTESIS DE PRECURSORES

Esquema de reacción 9a. Síntesis de Intermediarios **KI-2** y **KI-7**



Procedimientos:

Síntesis de **KI-2** y **KI-7**

2,6-di(etoxicarbonil)ciclohexan-1,4-diona [Paso 1][Ref: Rodriguez et al. Synth. Comm. 28 (1998) 2259-69]: se agregó por goteo 1,3-dicloroacetona (12.5 g, 0.1 mol) en THF (500 mL) durante un periodo de 30 min, a una suspensión de 1,3-acetonadicarboxilato de dietilo (18 mL, 0.1 mol) y carbonato de potasio-malla 325 (21.5 g, 0.15 mol) en THF (1 L) a temperatura de reflujo. Después de 2 h, la reacción finalizó y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y entonces se filtró a través de Celite®; el residuo sólido se lavó con THF (200 mL), el solvente se removió entonces bajo presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea en columna (Hexanos/EtOAc de 0 a 20%) para dar el compuesto del título (9.3 g, 37% de rendimiento).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.01 min; *m/z* = 257.1 $[M+H]^-$, área de pico > 74%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) Mezcla compleja de enol e isómeros cis/trans δ 12.10 (s), 4.23 (c, *J* = 7.1 Hz), 4.11 (m), 3.85-3.77 (m), 3.70 (s), 3.10 - 2.89 (m), 2.89 - 2.80 (m), 2.62 - 2.58 (m), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz), 1.22 - 1.15 (m, 9H).

2,5-dihidroxiisoftalato de dietilo [Paso 2]: [Protocolo tomado de Zhong et al.: Chem Eur. J. 25 (2019)

8177-8169]: A una solución agitada de 2,6-di(etoxicarbonil)-ciclohexan-1,4-diona (5.0 g, 20 mmol) en AcOH (17 mL) a temperatura ambiente se agregó NBS (3.5 g, 20 mmol) en porciones durante 30 min. Después de 20 minutos adicionales, la reacción se extinguió mediante la adición de agua (100 mL). El producto deseado se separó como un sólido. Después de la filtración y secado, el compuesto del título se aisló como un sólido blanco (4.6 g, 93% de rendimiento).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.00 min; *m/z* = 253.1 $[M-H]^-$, área de pico > 90%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.85 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 7.39 (s, 2H), 4.32 (c, J = 7.1 Hz, 4H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

2,5-bis(benciloxi)isoftalato de dietilo [Paso 3]: A una suspensión de 2,5-dihidroxiisoftalato de dietilo (19.0 g, 75 mmol) y carbonato de potasio-malla 325 (82.6 g, 598 mmol) en DMF (83 mL) se agregó por goteo bromuro de bencilo (43.0 mL, 362 mmol) durante 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente el solvente se removió bajo presión reducida.

Entonces se agregó agua (500 mL) al residuo. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 250 mL), las capas orgánicas reunidas se lavaron con salmuera (300 mL), se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y entonces se concentraron bajo presión reducida. El material crudo se purificó por cromatografía

instantánea en columna (Hexanos/EtOAc de 0 a 15%) para dar el compuesto del título (29.4 g, 90% de rendimiento).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.38 min; *m/z* = 435.2 $[M+H]^+$, área de pico > 90%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.50 (s, 2H), 7.49 - 7.45 (m, 2H), 7.44 - 7.37 (m, 5H), 7.37 - 7.29 (m, 3H), 5.17 (s, 2H), 4.95 (s, 2H), 4.26 (c, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

Ácido 2,5-bis(benciloxi)-3-(etoxicarbonil)benzoico (KI-2) [Paso 4]: Una solución de hidróxido de potasio (4.4 g, 79 mmol) en agua (66 mL) se agregó rápidamente a una solución de 2,5-bis(benciloxi)isoftalato de dietilo (31.3 g, 72 mmol) en 1,4-dioxano (430 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 1.5 h. El 1,4-dioxano se removió bajo presión reducida, entonces se agregó una solución acuosa saturada de Na_2CO_3 (1 L), la capa acuosa se extrajo con EtOAc (3x 500 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y el solvente se removió *in vacuo*. El residuo se purificó por filtración sobre una Almohadilla de Sílice usando Hexanos/EtOAc (1/1) entonces EtOAc (1% v/v AcOH) como eluyente para dar dos fracciones diferentes:

El material de partida: 2,5-bis(benciloxi)isoftalato de dietilo (20.4 g, 65% de rendimiento).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.38 min;

m/z = 435.2 $[M+H]^+$, área de pico > 78%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.50 (s, 2H), 7.49 - 7.45 (m, 2H), 7.44 - 7.37 (m, 5H), 7.37 - 7.29 (m, 3H), 5.17 (s, 2H), 4.95 (s, 2H), 4.26 (c, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

El producto deseado, ácido 2,5-bis(benciloxi)-3-(etoxicarbonil)benzoico como un sólido blanco esponjoso, (**KI-2**) (3.5 g, 12% de rendimiento).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.22 min; *m/z* = 405.1 $[M-H]^-$, área de pico > 90%.

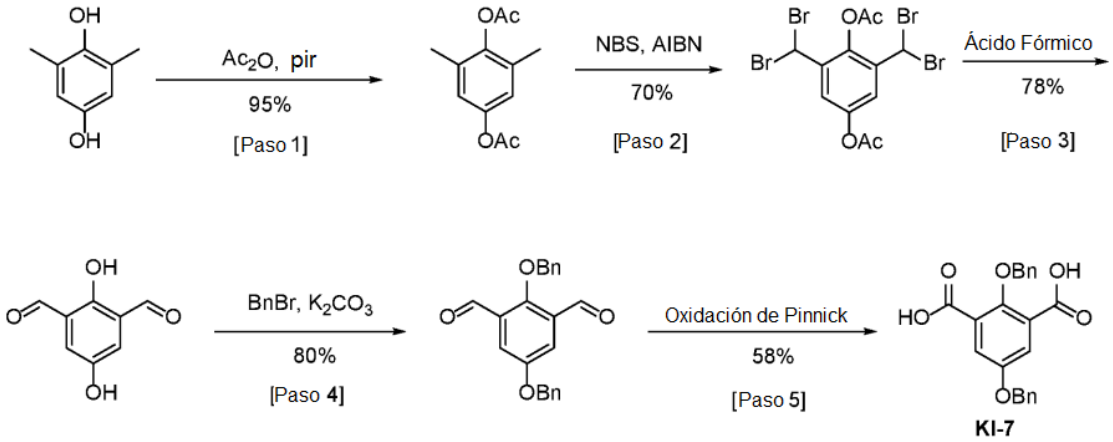
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.30 (s, 1H), 7.48 (t, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.46 - 7.42 (m, 5H), 7.39 (m, 3H), 7.37 - 7.31 (m, 2H), 5.17 (s, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.25 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

La solución acuosa saturada original de Na_2CO_3 se acidificó entonces a pH~7 usando ácido clorhídrico concentrado. Entonces se extrajo con EtOAc (2 x 500 mL), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y concentró bajo presión reducida para dar una mezcla de **KI-2** y **KI-7** (3.0 g, 11% de rendimiento).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.00 min; *m/z* = 377.1 $[M-H]^-$, área de pico 25%, t. a. = 1.22 min; *m/z* = 405.1 $[M-H]^-$, área de pico 56%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.23 (s, 2H), 7.52 - 7.29 (m, 12H), 5.17 (s, 2H), 4.97 (s, 2H).

Esquema de reacción 9b: Síntesis alternativa de **KI-7**



Diacetato de 2,6-dimetil-1,4-fenileno [Paso 1]: A una solución agitada de 2,6-dimetilhidroquinona (5.0 g, 36 mmol) en piridina (10 mL), se agregó rápidamente anhídrido acético (10 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente por 18 h. Entonces se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo se disolvió con EtOAc (250 mL) y posteriormente se lavó con una solución acuosa de ácido clorhídrico (1 M, 250 mL), una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (250 mL) y agua (250 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y el solvente se removió *in vacuo*, para dar el compuesto del título (7.4 g, 92%) como un sólido blanco.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.07 min; *m/z* = 240.2 $[M+NH]^+$, área de pico > 90%

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 6.88 (H_{Ar}, 2H), 2.37 - 2.30 (m, 3H), 2.27 - 2.21 (m, 3H), 2.12 - 2.02 (m, 6H).

Diacetato de 2,6-bis(dibromometil)-1,4-fenileno

[Paso 2]: A una solución agitada de diacetato de **2,6-dimetil-1,4-fenileno** (6.34 g, 29 mmol) en 1,2-dicloroetano (130 mL) se agregó secuencialmente 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) (0.93 g, 6 mmol) y *N*-bromosuccinimida (NBS) (25.39 g, 143 mmol). La solución se agitó bajo reflujo por 24 h. Se agregaron 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) (0.93 g, 6 mmol) y *N*-bromosuccinimida (NBS) (5.08 g, 28.6 mmol) adicional y la mezcla de reacción se agitó bajo reflujo por otras 24 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el residuo sólido se removió por filtración y se lavó con DCM (250 mL). El filtrado se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (250 mL), una solución acuosa de ácido clorhídrico (1 M, 250 mL) y salmuera (250 mL). La capa orgánica se secó entonces con sulfato de sodio, se filtró y concentró bajo presión reducida para dar el compuesto del título (9.38 g, 61%) como un aceite anaranjado.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.23 min; *m/z* = 553.1 $[M+NH]^+$, área de pico > 88%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.69 (s, 2H), 7.31 (s, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

2,5-dihidroxiisoftalaldehído [Paso 3]: A una solución agitada de **diacetato de 2,6-bis(dibromometil)-1,4-fenileno** (3.89 g, 7.23 mmol) en ácido fórmico (50 mL) se agregó agua (5 mL). La mezcla se agitó bajo reflujo por 18 h. La mezcla de reacción se vertió lentamente entonces en

bicarbonato de sodio acuoso saturado (300 mL). El precipitado formado se aisló entonces por filtración para dar el compuesto del título (0.94 g, 78%) como un sólido marrón.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.74 min; *m/z* = 165.0 $[M-H]^-$, área de pico > 98%.

2,5-bis(benciloxi)isoftalaldehído [Paso 4]: carbonato de potasio-malla 325 (2.34 g, 17.0 mmol) se agregó a una solución agitada de **2,5-dihidroxiisoftalaldehído** (0.94 g, 5.7 mmol) en DMF (6 mL) a temperatura ambiente. Entonces se agregó bromuro de bencilo (2.0 mL, 17.0 mmol) al matraz de reacción y la mezcla resultante se calentó a 100°C por 18 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (100 mL). La suspensión resultante se agitó por 30 min, entonces se filtró. El material sólido se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (2 x 50 mL). El sólido se trituró entonces con etanol (5 mL), se secó por succión para dar el producto deseado como un sólido marrón (1.58 g, 68%)

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.28 min, sin ionización observada, área de pico 78%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.14 (s, 2H), 7.63 (s, 2H), 7.53 - 7.28 (m, 10H), 5.23 (s, 2H), 5.21 (s, 2H).

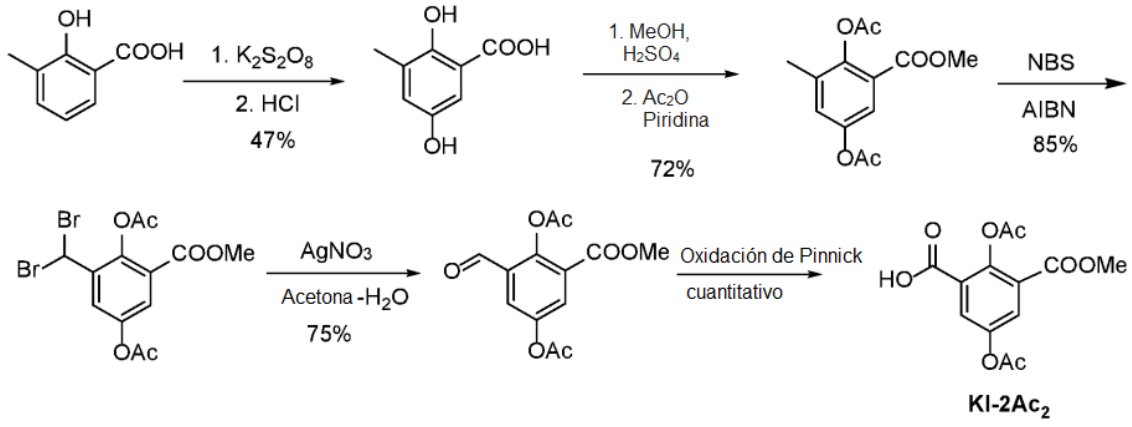
Ácido 2,5-bis(benciloxi)isoftálico (KI-7) [Paso 5]: Se disolvió **2,5-bis(benciloxi)isoftalaldehído** (1.58 g, 4.5

mmol) en una solución de 2-metil-2-buteno en THF (2.0 M, 25 mL). Entonces se agregó una solución de clorito de sodio (5.1 g, 45.0 mmol) y fosfato dihidrógeno de potasio (4.6 g, 33.8 mmol) en agua (25 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 18 h. La mezcla de reacción se vertió entonces en una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (400 mL). La capa acuosa se lavó con EtOAc (3 x 100 mL) seguido por acidificación con ácido clorhídrico concentrado (pH~1). La capa acuosa se extrajo entonces con DCM (2 x 150 mL) y Et_2O (2 x 200 mL), la capa orgánica reunida se secó con sulfato de sodio, se filtró y concentró bajo presión reducida. El residuo se trituró entonces con *n*-pentano (3 x 50 mL) para dar el compuesto del título **KI-7** como un sólido blanco (0.98 g, 58%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.03 min, *m/z* = 379.1 $[M+H]^+$, área de pico > 96%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.23 (s, 2H), 7.57 - 7.28 (m, 12H), 5.17 (s, 2H), 4.97 (s, 2H).

Esquema de reacción 9c: Síntesis de **KI-2Ac$_2$**



KI-2Ac$_2$

2,5-diacetoxi-3-metilbenzoato de metilo. Se oxidó ácido 3-metilsalisílico con persulfato cómo se reporta en Nudenberg et al (J. Org. Chem. **1943**, 8, 500-508). Se disolvió ácido 3-metilsalisílico (15.0 g, 98.6 mmol) en una solución de hidróxido de sodio (15.0 g, 375 mmol, 3.8 eq.) en agua (37.5 mL). La solución marrón claro se enfrió a 20°C y se trató, mientras se agitaba, con 7.75 mL porciones de 40% hidróxido de sodio y porciones de 33.8 mL de soluciones de persulfato de potasio al 10%, comenzando con el hidróxido, a una velocidad a la que se mantuvo una temperatura de 30-35°C y se agregaron hasta diez porciones de cada una. Después de finalizada la adición, se continuó agitando por 1 h, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 16-20 h y entonces se agregó HCl concentrado hasta azul a Congo. El ácido 3-metilsalicílico sin reaccionar separado en este punto como un sólido y se removió por filtración. El filtrado se extrajo varias veces con éter (5x50 mL) para recuperar el resto del ácido 3-metilsalicílico. La solución acuosa se trató entonces con HCl concentrado (100 mL) y entonces se mantuvo a reflujo por 2 h para descomponer el monosulfato de intermediario. La solución caliente se dejó enfriar a t. a. y el sólido cristalino casi negro que precipitó se filtró, se lavó con agua y se secó. La extracción del filtrado acuoso con éter dio un lote adicional de **ácido 2,5-dihidroxi-3-metilbenzoico** como un sólido marrón (total: 7.71 g, 47%). Pf

212-214°C; ^{1}H RMN (250 MHz, DMSO): δ 10.94 (s amplio, 1H), 7.00 (dd, *J* = 3.0 y 0.75, 1H$_{ar}$), 6.86 (dd, *J* = 3.0 y 0.75, 1H$_{ar}$), 2.12 (s, 3H).

Esterificación. Se agregó cuidadosamente ácido sulfúrico concentrado (0.7 mL) a 0°C y bajo nitrógeno a una solución de ácido 2,5-dihidroxi-3-metilbenzoico (2.05 g, 12.2 mmol) en MeOH (7 mL). La mezcla de reacción se agitó entonces por 6 h a 100°C. Después de enfriar a t. a., el solvente se removió bajo presión reducida. El producto crudo obtenido se disolvió en acetato de etilo (50 mL) y la solución se lavó con agua (20 mL), $NaHCO_3$ ac. al 10%(20 mL), HCl ac. al 5% (20 mL) y salmuera (20 mL) y se secó entonces ($MgSO_4$). Después de filtrar, la capa orgánica se concentró *in vacuo* para dar el residuo el cual se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 9/1) para dar **2,5-dihidroxi-3-metilbenzoato de metilo** como un sólido blanco (370 mg, 75%). Pf 101-103°C; ^{1}H RMN (250 MHz, $CDCI_3$): δ 10.56 (d, *J* = 0.50 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 3.25 y 0.50 Hz, 1H$_{ar}$), 6.90 (dt, *J* = 3.00 y 0.50 Hz, 1H$_{ar}$), 4.45 (s, 3H), 2.24 (s, 3H); HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculado para $C_9H_{11}O_4$ $[M+H]^+$: 183.0652; encontrado 183.0651.

Acetilación. Se agregó anhídrido acético (10 mL) en exceso a una solución de 2,5-dihidroxi-3-metil-benzoato de metilo (4.43 g, 24.3 mmol) en piridina (10 mL) bajo argón. Después de agitar 12 h a t. a., la piridina y el anhídrido

acético se eliminaron por coevaporación con tolueno (25 mL) bajo presión reducida. El producto crudo se disolvió entonces en acetato de etilo (15 mL) y la solución se lavó sucesivamente con HCl acuosos al 2% (5 mL), $NaHCO_3$ acuoso saturado (5 mL) y salmuera (5 mL). La fase orgánica se secó ($MgSO_4$) y el solvente se evaporó bajo presión reducida. El aceite incoloro obtenido se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 8/2) para dar el producto del título acetilado (2,5-acetoxi-3-metil-benzoato de metilo) como un sólido blanco (6.25 g, 97%). Pf 69-71°C; ^{1}H RMN (250 MHz, $CDCl_3$): δ 7.58 (dd, *J* = 3.00 y 0.50 Hz, $1H_{ar}$), 7.18 (dd, *J* = 3.00 y 0.75 Hz, $1H_{ar}$), 3.85 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.22 (s, 3H); HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculado para $C_{13}H_{18}NO_6$ $[M+NH_4]^+$: 284.1129; encontrado 284.1128.

2,5-diacetoxi-3-dibromometilbenzoato de metilo. Una solución de 2,5-acetoxi-3-metil-benzoato de metilo (2.15 g, 8.08 mmol), N-bromosuccinimida (2.87 mg, 16.2 mmol, 2.0 eq.) y azobisisobutironitrilo (AIBN, 27.0 mg, 0.162 mmol, 0.02 eq.) en tetracloruro de carbono (45 mL) se mantuvo a reflujo por aproximadamente 12 h hasta que flotó un sólido blanco sobre la superficie. Después de enfriar, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró entonces bajo presión reducida. El aceite incoloro obtenido se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de

etilo = 9/1) para dar el producto dibromado como un sólido blanco (3.29 g, 84%). Pf 117-119°C; ^{1}H RMN (250 MHz, $CDCl_3$): δ 7.86 (d, *J* = 2.75 Hz, $1H_{ar}$), 7.78 (d, *J* = 2.75 Hz, $1H_{ar}$), 6.81 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.33 (s, 3H); HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculado para $C_{13}H_{12}Br_2NaO_6$ $[M+Na]^+$: 444.8893; encontrado 444.8896.

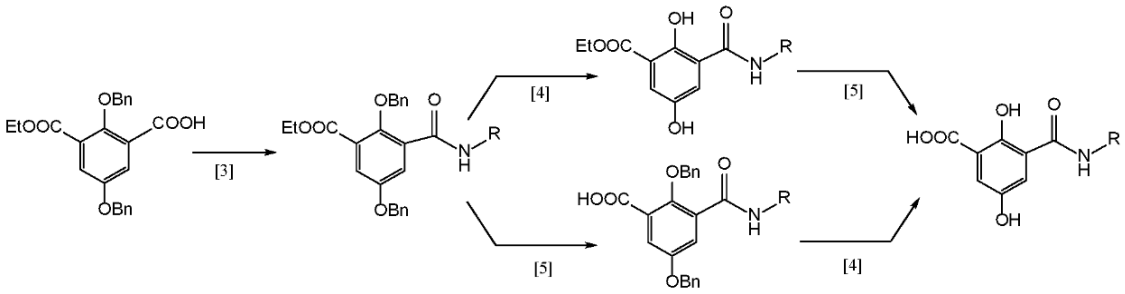
2,5-diacetoxi-3-formilbenzoato de metilo. Una solución de 2,5-diacetoxi-3-dibromo-metilbenzoato de metilo (2.30 g, 5.42 mmol) y nitrato de plata (2.29 g, 13.5 mmol, 2.5 eq.) en una mezcla acetona-H_2O (4.7: 1, 40 mL) se agitó a t. a. y en la oscuridad durante 12 h. La mezcla se filtró entonces y el filtrado se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 mL), se secaron ($MgSO_4$) y concentraron bajo presión reducida. El aceite incoloro obtenido se purificó en consecuencia por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 9/1) para dar el aldehído como un sólido amarillo (1.14 g, 75%). Pf 102-104°C; ^{1}H RMN (250 MHz, $CDCl_3$): δ 10.17 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 3.00 Hz, $1H_{ar}$), 7.82 (d, *J* = 3.00 Hz, $1H_{ar}$), 3.90 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.34 (s, 3H).

Monometil éster de ácido 2,5-diacetoxiisoftálico (KI-2Ac$_2$). Una solución de hidrógeno fosfato de sodio (1.35 g, 9.81 mmol, 2.5 eq.) en agua (3.5 mL) se agregó por goteo a una solución de 2,5-diacetoxi-3-formilbenzoato de metilo

(1.10 g, 3.93 mmol) en DMSO (14 mL). La mezcla y entonces se enfrió a 0°C y se agregó lentamente una solución de clorito de sodio (1.06 g, 9.34 mmol, 2.4 eq.) en agua (3.5 mL). Después de agitar 72 h a t. a., la mezcla se extinguió con $NaHCO_3$ acuoso saturado (10 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 mL). La fase acuosa se acidificó entonces con HCl 1 M a pH = 1 y se extrajo acetato de etilo (2 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 mL), se secaron ($MgSO_4$) y concentraron bajo presión reducida. El aceite anaranjado obtenido se usó en el siguiente paso sin ninguna purificación.

SÍNTESIS DE MONOAMIDAS

Esquema de reacción 10. Síntesis de Monoamidas **IIa**

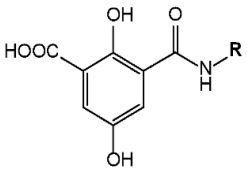


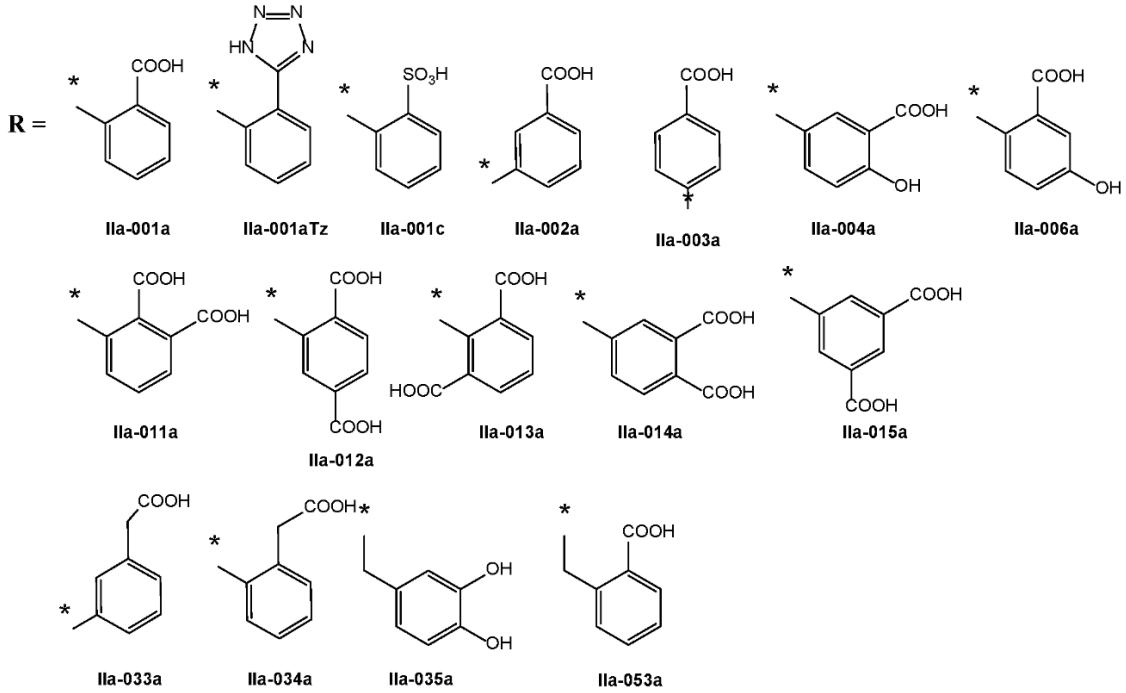
Protocolos: Síntesis de Monoamidas

Acoplamiento de Amida y Procedimientos de Desprotección

Véanse **los Procedimientos Generales de KI-1** y **KI-6** pasos [3], [4], [5], mismos procedimientos de **KI-2, KI-2Ac₂** y **KI-7**

Ejemplos





Para las condiciones y rendimientos: Véase la Tabla 2 (Figuras 5A-C)

33) Ácido 3-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIa-001a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.86 min; *m/z* = 318.0 $[M+H]^+$, área de pico > 92%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.49 (s, 1H), 12.16 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.70 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.70-7.51 (m, 2H), 7.42 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.20 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}NO_7$: 318.06083,

encontrado: 318.06082.

Biodatos: **IIa-001a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 8.6; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 11; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 150; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 30.5; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.408; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 36.24.

34) Ácido 3-(2-(1H-tetrazol-5-il)-fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIa-001aTz:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.71 min; *m/z* = 342.1 $[M+H]^+$, área de pico > 99%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.40 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.72 - 7.51 (m, 2H), 7.51 - 7.26 (m, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}N_5O_5$: 342.08329, encontrado: 342.08317.

Biodatos: **IIa-001a-Tz**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 9.8; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 187; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 74.15; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 24.18.

Etil éster

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.46 min;

m/z = 370.1 $[M+H]^+$, área de pico > 92%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.51 (s, 1H), 11.37 (s, 1H), 9.63 (s, 1H), 8.47 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.92 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.66-7.57 (m, 2H), 7.43 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.38 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 4.40 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H),

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{17}H_{16}N_5O_5$: 370.11460, encontrado: 370.11444.

Biodatos: **IIa-001aTz-E1**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 42; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 68.86; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 81.94

35) Ácido 2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico, compuesto **IIa-001c**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.63 min; *m/z* = 354.0 $[M+H]^+$, área de pico > 80%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.18 (s, 1H), 9.48 (s, 1H), 8.34 - 8.27 (m, 1H), 7.72 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.41 - 7.31 (m, 2H), 7.08 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{14}H_{12}NO_8S$: 354.02781, encontrado: 354.02781.

Biodatos: **IIa-001c**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50}

de FGF-2 [µM] = 71; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 283; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 72.62; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 43.53.

36) Ácido 3-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIa-002a:**

^{1}H RMN (250 MHz, CD_3OD): δ 8.37 (t, 1H), 7.93 (d amplio, 1H), 7.81 (d amplio, 1H), 7.76 (d, 1H), 7.52 (d, 1H), 7.48 (t, 1H).

HRMS (ESI-): $[M-H]^-$, calculado para $C_{15}H_{10}NO_7$: 316.0461, encontrado: 318.0463.

Biodatos: **IIa-002a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 19; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 131; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 150; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 43.3; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.299; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 17.39.

37) Ácido 3-(4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico amida, compuesto **IIa-003a:**

^{1}H RMN (250 MHz, CD_3OD): δ 8.06 (BB' de AA'BB', 2H), 7.85 (AA' de AA'BB', 2H), 7.75 (d, 1H), 7.58 (d, 1H).

HRMS (ESI-): calculado para $C_{15}H_{10}NO_7$ $[M-H]^-$: 316.0461; encontrado 316.0462.

Biodatos: **IIa-003a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 22; CI_{50} de

FGF-2 [µM] = 13; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 150; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 2.5; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 59.3; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 35.27.

38) Ácido 3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIa-004a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.76 min; *m/z* = 334.0 $[M+H]^+$, área de pico > 99%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 14.02 (s amplio, 1H), 11.07 (s amplio, 1H), 10.32 (s, 1H), 9.47 (s amplio, 1H), 8.27 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}NO_8$: 334.05574, encontrado: 334.05571.

Biodatos: **IIa-004a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 47; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 33; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 63.5; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.002; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 36.

39) Ácido 3-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto

IIa-006a:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.65 min; *m/z* = 334.0 $[M+H]^+$, área de pico > 99%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.36 (s, 1H), 11.83 (s, 1H), 9.62 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 8.47 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 9.1, 3.0 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}NO_8$: 334.05574, encontrado: 334.05548.

Biodatos: **IIa-006a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 43; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 121; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 2.9; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 84.29; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 20.29.

40) Ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico, compuesto **IIa-011a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.72 min; *m/z* = 360.1 $[M-H]^-$, área de pico > 77%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.83 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.43 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.63 - 7.53 (m, 2H), 7.46 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H),

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362.05066, encontrado: 362.05045,

Biodatos: **IIa-011a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 141; CI_{50}

de FGF-2 [µM] = 123; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 58.1; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.18; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 26.

41) Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico, compuesto **IIa-012a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.73 min; *m/z* = 362.0 [M+H], área de pico > 97%.

^{1}H RMN (DMSO-d_6) δ: 13.81 (s, 1H), 13.34 (s, 1H), 12.23 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 9.30 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H),

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362.05066, encontrado: 362.05046,

Biodatos: **IIa-012a:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 150; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 150; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 32; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 3.31; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 44.8; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.313; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 7.5.

42) Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico, compuesto **IIa-013a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.68 min; *m/z* = 362.0 $[M+H]^+$, área de pico > 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.12 (s amplio, 3H), 11.71 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.66 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.35 (t, J = 7.8 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362.05066, encontrado: 362.05047.

Biodatos: **IIa-013a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 137; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 12; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 34; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 57.68; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 2.54; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 15.75.

43) Ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico, compuesto **IIa-014a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.63 min; m/z = 362.1 $[M+H]^+$, área de pico > 88%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.80 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 8.01 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.45 - 7.33 (m, 2H),

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362.05066, encontrado: 362.05048.

Biodatos: **IIa-014a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 40; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 61; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 91; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 17.6; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 73.94; CI_{50} de inhibición de PMN

ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 21.5.

44) Ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico, compuesto **IIa-015a**:

^{1}H RMN (250 MHz, CD_3OD): δ 8.60 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 8.44 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 3.2 Hz, 1).

HRMS (ESI+): *m/z* calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$ $[M+H]^+$: 362.0507; encontrado 362.0505 [LM-163].

Biodatos: **IIa-015a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 125; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = N. D.; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = N. D.; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = N. D.

45) Ácido (3-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIa-033a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.78 min; *m/z* = 330.1 $[M-H]^-$, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.40 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 7.66 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.63-7.57 (m, 1H), 7.45 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.05 - 6.95 (m, 1H), 3.56 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332.07648, encontrado: 332.07644,

Biodatos: **IIa-033a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 35; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 32; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 4.9; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 50.64; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.914; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 11.75.

46) Ácido 3-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIa-034a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.74 min; *m/z* = 332.0 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.48 (s, 1H), 10.65 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.33-7.26 (m, 2H), 7.13 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332.07648, encontrado: 332.07653.

Biodatos: **IIa-034a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 22; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 5.7; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 86; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 69.2; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 26.58.

Dietil éster

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.12 min; *m/z* = 388.1 $[M+H]^+$, área de pico > 99%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.81 (s, 1H), 9.58 (s, 1H), 7.77 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 7.36 - 7.31 (m, 2H), 7.20 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 4.39 (c, J = 7.1 Hz, 2H), 4.05 (c, J = 7.1 Hz, 2H), 3.77 (s, 2H), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.13 (t, J = 7.1 Hz, 3H). HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{20}H_{22}NO_7$: 388.13907, encontrado: 388.13887.

Biodatos: **IIa-034a-E2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 164; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 68.73; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 11.86.

47) Ácido 3-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIa-035a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.69 min; m/z = 318.0 $[M-H]^-$, área de pico > 99%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.38 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 7.55 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 6.74 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 4.34 (d, J = 5.7 Hz, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{14}NO_7$: 320.07647, encontrado: 320.07625.

Biodatos: **IIa-035a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 16; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 61; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 45; CI_{50} de inhibición

de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.52; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 76.99; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 36.67.

48) Ácido 3-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIa-053a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.08 min; *m/z* = 332.0 $[M+H]^+$, área de pico > 97%.

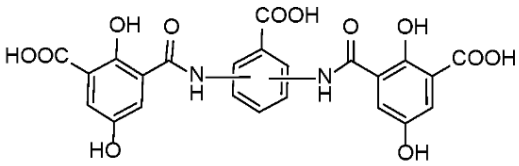
^1H RMN (DMSO-d_6) δ: 13.13 (s amplio, 1H), 12.73 (s amplio, 1H), 9.40 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 7.91 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.65 - 7.29 (m, 5H), 4.80 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332.07648, encontrado: 332.07626.

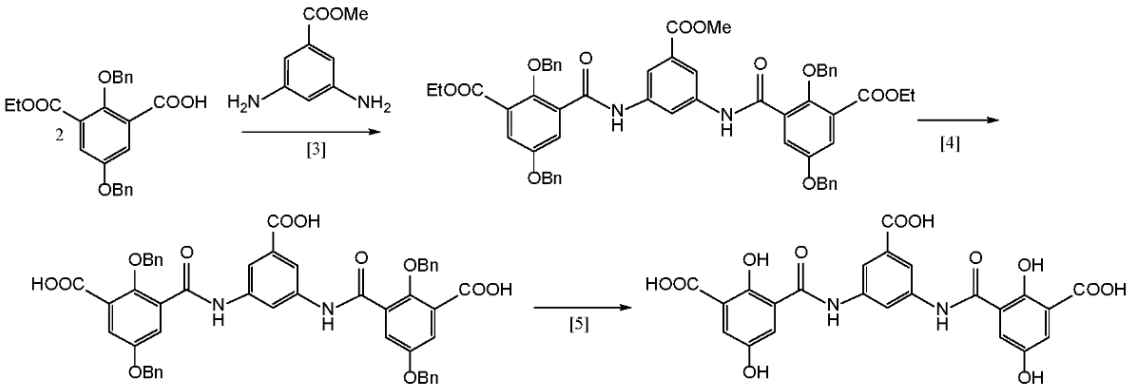
Biodatos: **IIa-053a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 84; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 18; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 37; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.27; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 63.13; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.62; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 20; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = 1.04; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 1.67; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 2.2; CI_{50} de IL-9 [µM] = 1.41; CI_{50} de IL-10 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 0.27; CI_{50} de IL-13 [µM] = 29.9; CI_{50} de IL-17A [µM] = > 100; CI_{50} de IL-17F [µM] = 28.8; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] =

> 100; CI_{50} de IL-33 [µM] = 12.1; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNF α [µM] = 0.02; CI_{50} de TNF β [µM] = 91.5.

Ejemplo 1.6. Moléculas del tipo IIb: Diamidas a partir de diaminas, 1 ejemplo

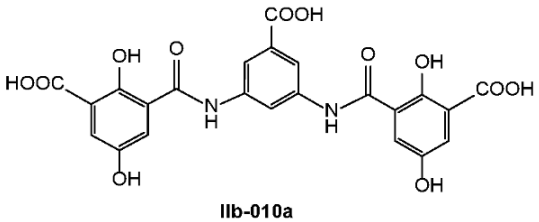


Esquema de reacción 11. Síntesis de Diamidas del tipo **IIb**



Procedimiento: véase el procedimiento general de **KI-1** [3], [4], [5]

Por ejemplo:



IIb-010a

Para las condiciones y rendimientos: Véase la Tabla 2 (Figuras 5A-C)

49) Ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-3-

carboxibenzoilamino)benzoico, compuesto **IIb-010a:**

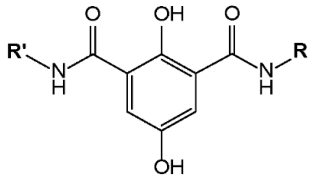
UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.98 min; *m/z* = 511.1 $[M-H]^-$, área de pico > 93%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.81 (s, 2H), 10.65 (s, 2H), 8.38 (m, 1H), 8.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 2.3 Hz, 4H).

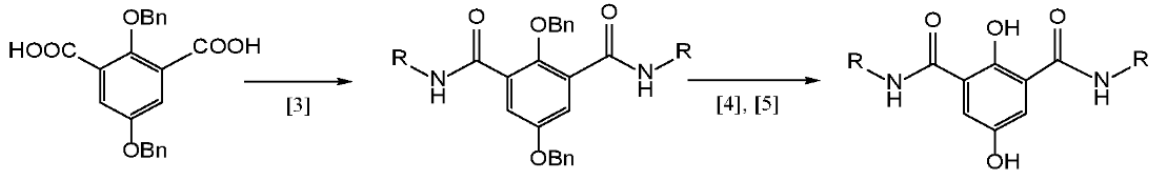
HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{23}H_{17}N_2O_{12}$: 513.07760, encontrado: 513.07774.

Biodatos: **IIb-010a:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 102; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 28; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 81.87; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 59.84.

Ejemplo 1.7. Moléculas del tipo IIc: Diamidas a partir de diácidos, 2 ejemplos



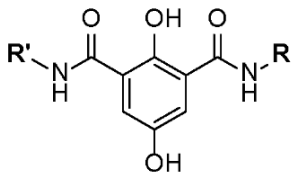
Esquema de reacción 12. Síntesis de Amidas del tipo **IIc** con R = R'

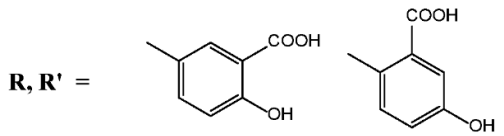


Procedimiento: véase el procedimiento general de

KI-6 [3], [4], [5]

Como ejemplos





IIc-007a **IIc-009a**

Para las condiciones y rendimientos: Véase la Tabla 2 (Figuras 5A-C)

50) Ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico, compuesto **IIc-007a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.20 min; *m/z* = 469.1 $[M+H]^+$, área de pico > 91%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.41 (s, 2H), 9.51 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 7.79 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 2H), 7.58 (s, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H),

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) δ 172.1, 166.1, 158.3, 152.0, 149.4, 130.2, 129.5 (CH), 122.8 (CH), 120.3, 119.8 (CH), 117.7 (CH). 113.0.

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{22}H_{17}N_2O_{10}$: 469.08777, encontrado: 469.08803.

Biodatos: **IIc-007a**: CI_{50} de FGF-1 [μM] = 11; CI_{50} de

FGF-2 [µM] = 91; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 8.2; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.44; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 93.04; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 64.61 ; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = 26; CI_{50} de IFNγ [µM] = 0.11; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 12.8; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.05; CI_{50} de IL-9 [µM] = 2.14; CI_{50} de IL-10 [µM] = 17.9; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 3.37; CI_{50} de IL-13 [µM] = 0.25; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.01; CI_{50} de IL-17F [µM] = 0.26; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = 9.41; CI_{50} de IL-33 [µM] = 0.18; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNF α [µM] = 0.03; CI_{50} de TNF β [µM] = 0.29.

Síntesis Alternativa a Gran Escala de IIc-007a

Ácido 2,5-dibenciloxiisoftálico (KI-7)

A un recipiente revestido de 5 L se cargó 2,5-dibenciloxiisoftalaldehído (Esquema de reacción 9b) (300 g, 866 mmol), resorcinol (286 g, 2.60 mol), KH_2PO_4 (354 g, 2.60 mol), acetona (1.5 L) y agua (516 mL). La lechada se agitó a 15-25°C. Se cargó una solución de 80% de $NaClO_2$ (294 g, 2.60 mol) en agua (1 L) a 15-30°C durante 90 minutos (exotérmica). Después de finalizar la adición, la reacción se agitó a 15-25°C por 1 hr. Se cargó una solución de 85% de H_3PO_4 (85 mL, 1.24 mol) en agua (1175 mL) [~1 M] durante 10 minutos a T <

30°C (exotérmica) dando un precipitado. El lote se enfrió a 0-5°C y se filtró. Los sólidos se lavaron con agua (3 x 1.2 L) y se secaron en horno (50°C) para dar 325.6 g de diácido **KI-7**. HPLC: 98.9%; RMN > 95%. Rendimiento corregido (90.6%).

Metil éster de ácido 5-(3-(3-metoxicarbonil-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dibenciloxibenzamido)-2-hidroxibenzoico. A un recipiente revestido de 2 L se cargó diácido **KI-7** (80 g, 211 mmol), HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) (176.8 g, 466 mmol) y THF (560 mL). El lote se agitó a 15-25°C y se cargó N-metilimidazol (50.6 mL, 635 mmol). Después de 30 min, se cargó 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (77.8 g, 466 mmol) y la reacción se agitó a 25°C durante la noche. Se cargó agua (1.2 L) y el lote se agitó a 20°C por 30 min. El lote se filtró, se lavó con agua (2 x 480 mL) entonces MeCN (320 mL). El sólido resultante (236 g) se cargó nuevamente al recipiente junto con MeCN (800 mL). La lechada se calentó a 50°C por 40 min. y entonces se enfrió a 20°C. El lote se filtró y lavó con MeCN (320 mL). El análisis de RMN del sólido (156 g) no indicó TMU, HOBt, NMI o HBTU. El material se secó a 50°C durante la noche para dar 125 g de diamida. HPLC: 98.2%. RMN: > 97%. Rendimiento: 88%.

Ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dibenciloxibenzamido)-2-hidroxibenzoico. A un recipiente revestido de 2 L se cargó la diamida anterior (110 g, 163

mmol), THF (550 mL) y agua (1100 mL). El lote se agitó a 15-25°C y se cargó KOH al 85% (32.2 g, 488 mmol) (exotérmica menor). La solución se calentó a 50°C por 4 h y entonces se enfrió a 20°C y se agitó durante la noche. Entonces se cargó AcOH acuoso 6 M (550 mL, 3.3 mol) durante 30 min. a 15-25°C. Después de finalizar la adición, el lote se agitó por 30 min. y entonces se filtró. Los sólidos se lavaron con agua (3 x 550 mL) entonces se secaron en horno a 50°C. Esto dio 102 g libres de ácido. HPLC: 98.9% (0.3% de monoamida, 0.19% de monoácido). RMN: > 97%. Rendimiento: 97%.

Ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico IIc-007a. A un recipiente revestido de 2 L bajo N_2 se cargó 10% de Pd/C (10 g, 50% húmedo, tipo 87 L) seguido por el diácido anterior (100 g, 154 mmol), AcOH (5 mL, 88 mmol) y THF (1200 mL). El lote se agitó entonces rociado con H_2 y se calentó a 40°C por 2 hr. El lote se roció con N_2 y entonces de filtró (GF/F). El recipiente se enjuagó con THF (300 mL) y el enjuague se usó para lavar el catalizador sobre el filtro. El filtrado se cargó al recipiente y el volumen se ajustó a 2 L con THF (400 mL). La solución se calentó a 30°C, se cargó SPM32 (10 g) y el lote se agitó a 30°C durante la noche. El SPM32 se filtró y lavó con THF (200 mL). El solvente se removió *in vacuo* para dar un sólido amarillo claro (110 g). El análisis de RMN indicó 28% de THF. El material se suspendió en EtOH (1 L) a

20°C por 2 hr y entonces de filtró. Los sólidos se lavaron con EtOH (400 mL) y se secaron en horno a 60°C durante la noche. La RMN indicó 8.7% de EtOH, sin THF. El material se secó adicionalmente a 80°C por 4 noches para dar 66.5 g IIc-007a como un sólido blanco mate con un rendimiento en de 92%. HPLC: 99.5% (0.31% de monoamida). RMN: 4.6% de EtOH, sin THF. Pd por ICP-OES: < 2ppm.

Solvato de IIc-007a-THF: La concentración del filtrado de THF da un sólido amarillo, que contiene típicamente 25-30% de THF por RMN, el cual no pudo removerse a través de secado, indicando un solvato no estequiométrico. Se calentó una pequeña muestra del solvato de THF (1.45 g) a 50°C en THF (10 mL) por 1 hr, se enfrió a TA y se aisló, lavando con 3 mL de THF. Esto dio 1.13 g de **IIc-007a-THF**. RMN: 27% THF. HPLC: 99.6% (0.1% de monoamida). El aislamiento del solvato de THF por filtración conduce a un incremento en la pureza y una purga efectiva de la impureza mayor (monoamida, **IIa-004a**) de 0.7% a 0.1%. Rendimiento de recuperación: 78%. Solubilidad del solvato de THF en THF calculada como ~25 mg/mL a 20°C.

Se efectuaron ensayos de solvatación sobre el material en acetona, EtOH y EtOAc. Cada lote se calentó por 1 hr a 50°C en 20 volúmenes de solvente, entonces se aisló a TA y se secó en horno (60°C). Se eligió etanol como el solvente de desolvatación debido al bajo nivel de EtOH incorporado en

el producto después de secar y la excelente purga de THF del sistema. El paso de desolvatación se efectuó sobre 12.1 g de producto (25% THF). Se cargó EtOH al material (a 20 volúmenes) y el lote se agitó a TA durante la noche. Se filtró una muestra y esto indicó la solvatación exitosa a TA. Rendimiento total: 8.67 g. HPLC: 99.4%. RMN: > 97% (0.8% EtOH). El XRPD indicó un alto grado de cristalinidad del producto aislado. El producto **IIc-007a** también forma solvatos de DMSO (DMSO: producto en una relación 3:2).

51) Ácido 2-(3-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxilbenzoico, compuesto **IIc-009a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.79 min; *m/z* = 469.1 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

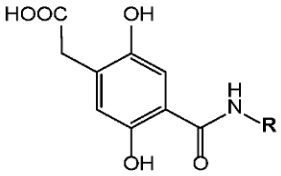
^{1}H RMN (400 MHz, DMF-d_7) δ 10.11 (s, 1H), 10.01 (s, 2H), 8.71 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.01 (s, 2H), 7.82 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{22}H_{17}N_2O_{10}$: 469.08777, encontrado: 469.08714.

Biodatos: **IIc-009a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 30; CI_{50} de FGF-2 [µM] = N. D.; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 182; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 1.7; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 75.31; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 53.15; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM]

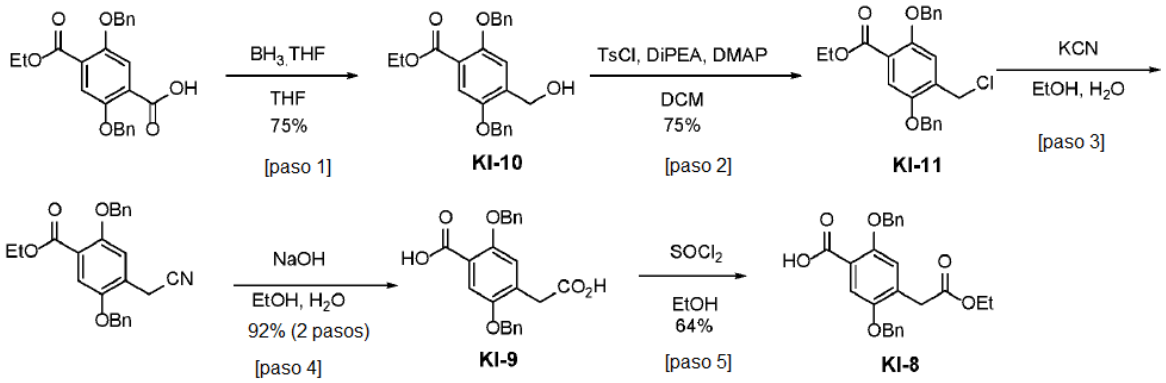
= > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = 0.54; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 19.6; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.27; CI_{50} de IL-9 [µM] = 18.9; CI_{50} de IL-10 [µM] = 11.31; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-13 [µM] = 0.13; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.001; CI_{50} de IL-17F [µM] = 0.13; CI_{50} de IL-18 [µM] = 2.95; CI_{50} de IL-21 [µM] = 8.01; CI_{50} de IL-33 [µM] = 0.29; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNF α [µM] = 0.11; CI_{50} de TNF β [µM] = 6.94.

Ejemplo 1.8: Moléculas del tipo IIIa: Monoamidas, 4 ejemplos



Síntesis de Precursores

Esquema de reacción 13. Intermediarios Sintéticos: **KI-8** y **KI-9** de **KI-1**



Protocolos Sintéticos

Intermediarios **KI-8** y **KI-9** (por medio de **KI-10** y **KI-11**)

2,5-bis(benciloxi)-4-(hidroximetil)benzoato de etilo (KI-10) [Paso 1]: A una solución enfriada a -20°C de **KI-1** (62.3 g, 153 mmol) en THF (700 mL) bajo flujo positivo de gas inerte (N_2) se agregó lentamente una solución preenfriada de BH_3. THF (615.0 mL, 615 mmol) (a -10°C). La adición se efectuó de tal manera que la temperatura interna de la reacción nunca excedió de -15°C. La reacción se calentó ligeramente, no permitiendo que la temperatura interna exceda de -7°C. La mezcla se mantuvo a esta temperatura por 2.5 h. La mezcla de reacción se vertió entonces en hielo/agua (8 L). Las mezclas blancas turbias obtenidas se dejaron agitar a temperatura ambiente, por 2 h y la suspensión blanca residual se filtró a través de un embudo fritado (Porosidad 3). El sólido blanco así obtenido se secó adicionalmente en horno al vacío a 40°C durante la noche, para dar 2,5-bis(benciloxi)-4-(hidroximetil)benzoato de etilo (**KI-10**) (60.5 g, 97% de rendimiento) como un sólido blanco.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.25 min; *m/z* = 391.2 $[M-H]^-$, área de pico > 68%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.54 - 7.48 (m, 2H), 7.48 - 7.43 (m, 2H), 7.43 - 7.35 (m, 4H), 7.35 - 7.27 (m, 4H), 5.28 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.58 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.25 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.26 (t,

J = 7.1 Hz, 3H).

De manera alternativa el intermediario **KI-10** puede obtenerse a partir de **KI-1** por medio de un anhídrido mezclado (tratamiento de **KI-1** con isobutilcloroformiato en THF en presencia de trietilamina) seguido por reducción del anhídrido mezclado con borohidruro de sodio en THF (rendimientos 85-90%, escala de 150 g).

2,5-bis(benciloxi)-4-(clorometil)benzoato de etilo (KI-11) [Paso 2]: Se agregó lentamente cloruro de tosilo (17.0 g, 70 mmol) a una solución enfriada (baño de hielo) de **KI-10** (25.0 g, 64 mmol), DIPEA (12.2 mL, 70 mmol) y DMAP (0.778 g, 6 mmol) en DCM (260 mL). La mezcla de reacción se agitó a 60°C por 30 h, después de lo cual la reacción se juzgó completa. Se agregó DCM (100 mL) y la capa orgánica se separó, lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (4 x 50 mL), agua (2 x 50 mL) y salmuera (50 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto crudo se sometió a cromatografía en columna (Hexanos/EtOAc 0-20%) para dar 2,5-bis(benciloxi)-4-(clorometil)benzoato de etilo (**KI-11**) (23.5 g, 75%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.39 min; *m/z* = sin iones, área de pico > 84%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.54 - 7.44 (m, 4H), 7.43 - 7.36 (m, 6H), 7.36-7.28 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.26 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.25 (t, *J* =

7.1 Hz, 3H).

De manera alternativa el intermediario **KI-11** puede obtenerse tratando **KI-10** con cloruro de tionilo (1.14 equiv) en diclorometano a -10°C, la evaporación del solvente y precipitación de heptano (rendimiento 90%, escala de 300 g).

2,5-bis(benciloxi)-4-(cianometil)benzoato de etilo [Paso 3]: A suspensión de **KI-11** (7.5 g, 18.2 mmol) en una mezcla de EtOH (90 mL) y H_2O (45 mL) se trató con cianuro de potasio (1.8 g, 27.4 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 75°C y se agitó a esta temperatura por 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (500 mL) y se extrajo con EtOAc (2 x 200 mL), Las fases orgánicas combinadas se lavaron entonces con salmuera (200 mL), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y concentraron *in vacuo*. El producto crudo se aisló como una mezcla de 2,5-bis(benciloxi)-4-(cianometil)benzoato de etilo y ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(cianometil)benzoico (7.1 g), el producto se usó en el siguiente paso sin purificación adicional.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.30 min; *m/z* = 402.2 $[M+H]^+$, área de pico > 65% y t. a. = 1.15 min; *m/z* = 374.1 $[M+H]^+$, área de pico > 8%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.56 - 7.27 (m, 12H), 5.19 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.26 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

Ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(carboximetil)benzoico

(KI-9) [Paso 4]: A una suspensión de 2,5-bis(benciloxi)-4-(cianometil)benzoato de etilo (7.1 g, 13.2 mmol) en EtOH (20 mL) se agregó una solución de hidróxido de sodio (8.5 g, 212.5 mmol) en agua (50 mL) y la mezcla de reacción se agitó bajo reflujo por 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (100 mL) y la solución resultante se lavó con EtOAc (2 x 100 mL), la capa orgánica así obtenida se extrajo con agua (100 mL) y todas las capas orgánicas se reunieron. Entonces la capa acuosa se acidificó a pH ~3 con una solución acuosa saturada de ácido cítrico, el precipitado formado se filtró y secó bajo presión reducida. El sólido se secó adicionalmente en un horno al vacío a 40°C durante la noche para dar ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(carboximetil)benzoico (**KI-9**) (6.4 g, 92% de rendimiento) como un sólido amarillento.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.07 min; *m/z* = 393.2 $[M+H]^+$, área de pico > 74%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.46 (s, 2H), 7.55 - 7.27 (m, 11H), 7.19 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 3.61 (s, 2H).

Ácido 2,5-Bis(benciloxi)-4-(2-etoxicarbonilmetil)benzoico (KI-8) [Paso 5]: El **KI-9** (5.5 g, 14.0 mmol) se suspendió en EtOH (30 mL) y la suspensión se trató con cloruro de tionilo (0.52 mL, 7.1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 24 h. Entonces, la mezcla de reacción se vertió en una solución

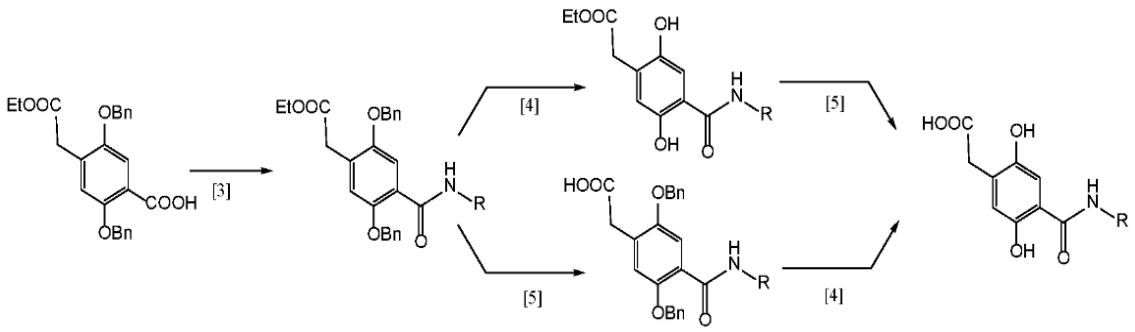
saturada de bicarbonato de sodio (1 L), conduciendo a una suspensión blanca. El sólido se aisló por filtración y se trituró adicionalmente con Et_2O (2 x 20 mL). El sólido se secó adicionalmente en un horno al vacío durante la noche para dar ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(2-etoxicarbonilmetil)benzoico **(KI-8)** (4.2 g, 64%) como un sólido blanco.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.23 min; *m/z* = 419.3 $[M-H]^-$, área de pico > 79%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.68 (s amplio, 1H), 7.58 - 7.27 (m, 11H), 7.19 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.01 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.66 (s, 2H), 1.11 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

Síntesis de Monoamidas

Esquema de reacción 14. Síntesis de Monoamidas **IIIa**



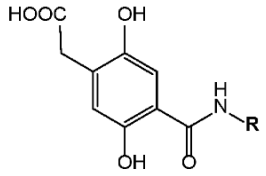
Protocolos Sintéticos

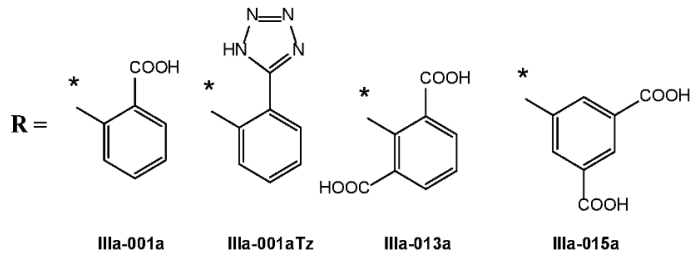
Acoplamiento de Amida y Procedimientos de Desprotección:

Véanse los Procedimientos Generales de **KI-1** y **KI-6**

pasos [3], [4], [5]

Ejemplos





Para las condiciones y rendimientos: Véase la Tabla 3 (Figura 6)

52) Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico, compuesto **IIIa-001a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.89 min; *m/z* = 332.1 $[M+H]^+$, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.38 (s, 1H), 12.17 (s, 1H), 10.67 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 8.64 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 8.00 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.62 (ddd, *J* = 8.7, 7.3, 1.7 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.19 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 3.49 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332.07648, encontrado: 332.07666.

Biodatos: **IIIa-001a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 62; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 10; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 32; CI_{50} de

inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 74.79; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 30.4.

Etil metil éster

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.14 min; *m/z* = 374.2 $[M+H]^+$, área de pico > 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.91 (s, 1H), 10.78 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.60 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 7.97 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.64 (ddd, *J* = 8.7, 7.3, 1.7 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.26 - 7.18 (m, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.08 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.56 (s, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{19}H_{20}NO_7$: 374.12342, encontrado: 374.12333.

Biodatos: **IIIa-001a-E2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 33; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 43; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 69.66; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 44.46.

53) Ácido (2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético, compuesto **IIIa-001aTz**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 0.87 min; *m/z* = 356.1 [M+H], área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.22 (s, 1H), 11.43 (s, 1H), 10.74 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.46 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.60 (td, J = 8.6, 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.39 - 7.30 (m, 2H), 6.80 (s, 1H), 3.48 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}N_5O_5$: 356.09894, encontrado: 356.09889.

Biodatos: **IIIa-001aTz**: CI_{50} de FGF-1 [μM] = 51; CI_{50} de FGF-2 [μM] = 14; CI_{50} de VEGF-A1 [μM] = 12; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [μM] = 0.71; PMN ROS [inhibición a 0.3 μM [%] = 69.35; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [μM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 39.74; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [μM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [μM] = 18.9; CI_{50} de IL-1β [μM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-4 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [μM] = 1.98; CI_{50} de IL-9 [μM] = 3.01; CI_{50} de IL-10 [μM] = 7.78; CI_{50} de IL-12p70 [μM] = 0.48; CI_{50} de IL-13 [μM] = 0.15; CI_{50} de IL-17A [μM] = 0.17; CI_{50} de IL-17F [μM] = 0.16; CI_{50} de IL-18 [μM] = 27.7; CI_{50} de IL-21 [μM] = 3; CI_{50} de IL-33 [μM] = 0.14; CI_{50} de TGFβ [μM] = > 100; CI_{50} de TNF α [μM] = 0.31; CI_{50} de TNF β [μM] = 0.23.

Etil éster:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.56 min; m/z = 384.2 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.34 (s, 1H), 10.73 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.45 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 7.85 (dd,

J = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.61 (ddd, *J* = 8.7, 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.39 - 7.30 (m, 2H), 6.80 (s, 1H), 4.08 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.56 (s, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{18}N_5CO_5$: 384.13024, encontrado: 384.12999.

Biodatos: **IIIa-001aTz-E1**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.32; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 70.03; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 91.76.

54) Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico, compuesto **IIIa-013a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.82 min; *m/z* = 376.0 $[M+H]^+$, área de pico > 89%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.67 - 11.48 (m, 3H), 10.82 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.36 (s, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 3.48 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{17}H_{14}NO_9$: 376.06630, encontrado: 376.06638.

Biodatos: **IIIa-013a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 17; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 31; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 43; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 1.3; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 76.55; CI_{50} de inhibición de PMN

ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 30.667; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = 27.8; CI_{50} de IFNγ [µM] = 0.15; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = 57.1; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 3.55; CI_{50} de IL-9 [µM] = 11.9; CI_{50} de IL-10 [µM] = 37.3; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 0.5; CI_{50} de IL-13 [µM] = 0.37; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.15; CI_{50} de IL-17F [µM] = 0.41; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = 1.63; CI_{50} de IL-33 [µM] = 1.11; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNF α [µM] = 0.51; CI_{50} de TNF β [µM] = 0.89.

55) Ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico, compuesto **IIIa-015a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.93 min; *m/z* = 376.0 $[M+H]^+$, área de pico > 96%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6 + 10% D_2O) δ 8.34 (s, 2H), 8.18 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 3.39 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{17}H_{14}NO_9$: 376.06630, encontrado: 376.06665.

Biodatos: **IIIa-015a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 16; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 114; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 202; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.89; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 78.76; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 12.13.

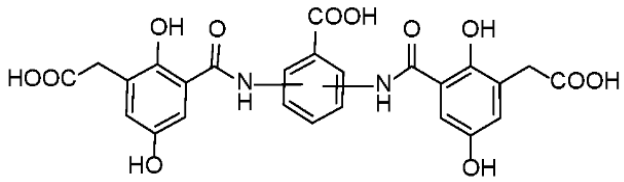
Etil dimetil éster

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.69 min; *m/z* = 432.1 $[M+H]^+$, área de pico > 97%.

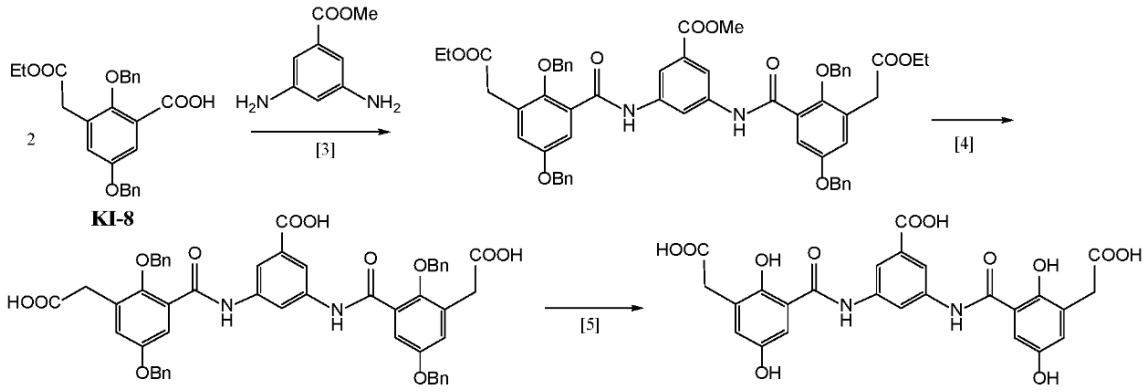
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.23 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.23 - 8.21 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.08 (c, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.91 (s, 6H), 3.58 (s, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{21}H_{22}NO_9$: 432.12891, encontrado: 432.02903.

Biodatos: **IIIa-015a-E3**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = N. D.; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 191; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 87; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 7.2; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 91.37; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 61.22.

Ejemplo 1.9. Moléculas del tipo IIIb: Diamidas a partir de diaminas, 1 ejemplo

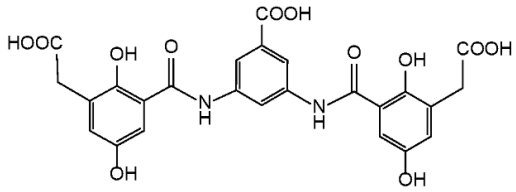


Esquema de reacción 15. Síntesis de Diamidas del tipo **IIIb**



Procedimiento: Véase el procedimiento general de **KI-1** pasos [3], [4], [5]

Por ejemplo:



IIIb-010a

Para las condiciones y rendimientos: Véase la Tabla 3 (Figura 6)

56) Ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboximetilbenzoilamino)benzoico, compuesto **IIIb-010a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.08 min; *m/z* = 539.2.1 $[M-H]^-$, área de pico 80%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.85 (s amplio, 2H), 10.57 (s amplio, 2H), 9.20 (s, 2H), 8.26 (m, 1H), 8.09 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.36 (s, 2H), 6.82 (s, 2H), 3.50 (s, 4H).

HRMS: [M+H]+, calculado para $C_{23}H_{17}N_2O_{12}$: 513.07760, encontrado: 513.07774.

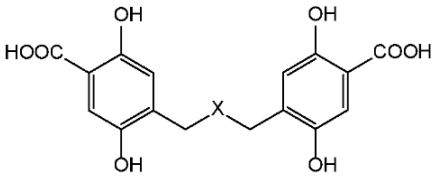
Trietil éster

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 1.81 min; *m/z* = 623.3 $[M-H]^-$, área de pico 94%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.87 (s, 2H), 10.65 (s, 2H), 9.23 (s, 2H), 8.31 - 8.28 (m, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.35 (s, 2H), 6.81 (s, 2H), 4.35 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.08 (c, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.58 (s, 4H), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

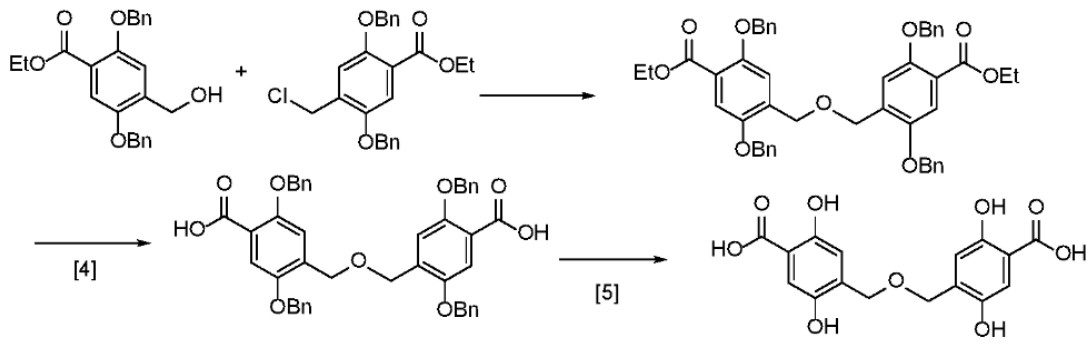
Biodatos: **IIIb-010a-E3**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.65; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = N. D.; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 0.

Ejemplo 1.10: MOLÉCULAS DEL TIPO IIIc. Dímeros, 6 ejemplos



Esquemas y Procedimientos Sintéticos

Esquema de reacción 16: X = O



Procedimiento sintético

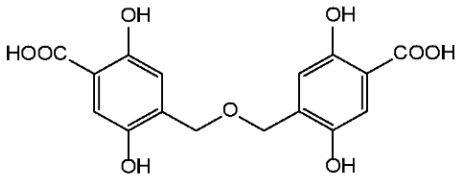
Formación del enlace éter de ***KI-10*** *y* ***KI-11***

2,5-bibenciloxi-4-[(2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenil)metoximetil]benzoato de etilo [Paso 1]: A una solución de **KI-11** (340 mg, 0.83 mmol) y **KI-10** (250 mg, 0.64 mmol) en DMF (6 mL), enfriada en un baño de hielo, se agregó en porciones hidruro de sodio (76 mg, 1.9 mmol). Después de 1 h, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (50 mL) y el material se extrajo con EtOAc (3 x 30 mL), la fase orgánica se lavó adicionalmente con agua (2 x 50 mL) y salmuera (50 mL), se secó con sulfato de sodio y concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea en columna (Hexanos/EtOAc de 0 a 20%) para dar el compuesto del título (161 mg, 33% de rendimiento) como un sólido marrón.

Procedimientos de desprotección:

Véanse los procedimientos generales [4], [5]

Como ejemplos



IIIb-060a

Para las condiciones y rendimientos: Véase la Tabla 4 (desprotecciones) (Figura 7)

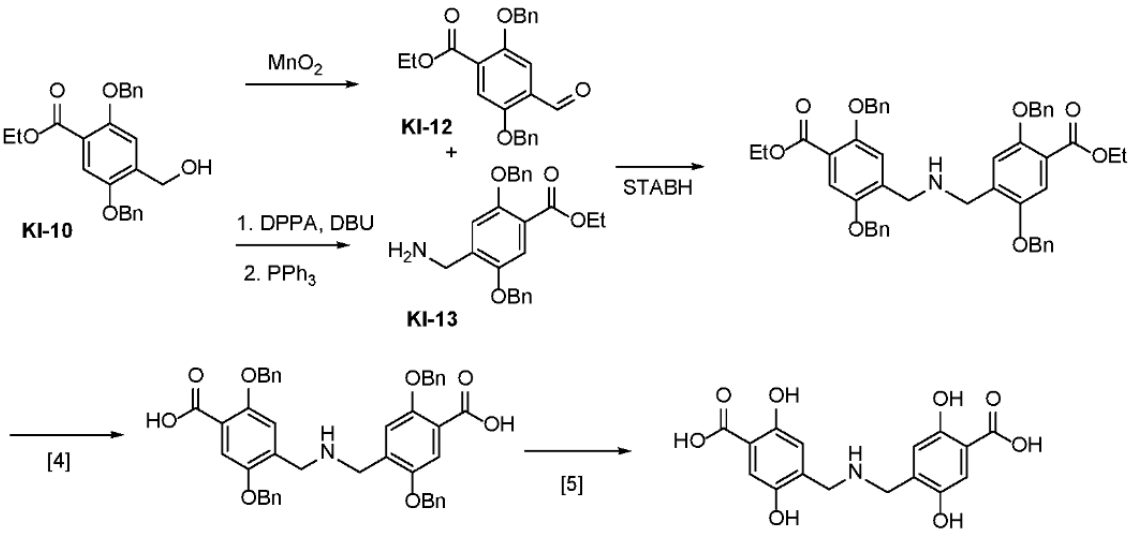
57) Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)-metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIIc-060a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.94 min; *m/z* = 349.1 $[M-H]^-$, área de pico > 90%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.20 (s, 2H), 6.92 (s, 2H), 4.56 (s, 4H),

Biodatos: **IIIc-060a:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 51; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 114; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 1.3; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 86.84; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 41.38.

Esquema de reacción 17: X = NH



Procedimiento sintético

Formación de enlace amina de ***KI-12*** *y* ***KI-13*** *vía* ***KI-10*** *y* ***KI-11***

2,5-bis(benciloxi)-4-formilbenzoato de etilo (KI-12): A una solución de **KI-10** (3.4 g, 8.6 mmol) en diclorometano (50 mL) se agregó dióxido de manganeso (4.5 g, 51.9 mmol). La suspensión resultante se agitó bajo reflujo por 4 h. La reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite® y el sólido se lavó con diclorometano (300 mL), el solvente se removió entonces bajo presión reducida para dar el compuesto del título (3.2 g, 94% de rendimiento) como un sólido amarillento.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.33 min; *m/z* = sin iones, área de pico > 93%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.39 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.54-7.26 (m, 11H), 5.28 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.30 (c,

J = 7.1 Hz, 2H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

4-(azidometil)-2,5-bis(benciloxi)benzoato de etilo: A una suspensión de **KI-10** (3.0 g, 7.6 mmol) y 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) (1.5 mL. 9.9 mmol) en tolueno (30 mL) se agregó difenil fosforil azida (DPPA) (2 mL, 9.1 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 18 h. Se agregó una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1 M (200 mL) y el producto se extrajo con EtOAc (3 x 100 mL), las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 50 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna (Hexanos/EtOAc 0 al 20%) para dar el compuesto del título (3.1 g, 98%) como un aceite incoloro que se convirtió en un sólido blanco con el tiempo.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.37 min; *m/z* = 390.2, $[M+H-N_2]^+$, área de pico > 93%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.53 - 7.46 (m, 4H), 7.44 - 7.26 (m, 8H), 5.16 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.26 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

4-(aminometil)-2,5-bis(benciloxi)benzoato de etilo (KI-13): A una solución de 4-(azidometil)-2,5-bis(benciloxi)benzoato de etilo (2.8 g, 6.7 mmol) en THF (60 mL) y agua (6 mL) se agregó trifenilfosfina unida a polímero (4.7 g, cargando ~3 mmol/g) y la mezcla resultante se dejó

agitar a temperatura ambiente por 18 h. La resina se removió por filtración y se lavó con agua (100 mL) y EtOAc (2 x 100 mL). Se separaron las fases y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc (100 mL), las capas orgánicas reunidas se lavaron con salmuera (200 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y concentraron para dar el compuesto del título (**KI-13**) (1.8 g, 70% de rendimiento) como un sólido blanco.

UPLC-MS (método básico, 2 min): t. a. = 1.20 min; *m/z* = 392.2, $[M+H]^+$, área de pico > 93%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.60 - 7.22 (m, 12H), 5.14 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.24 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

2,5-dibenciloxi-4-[(2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenil)metilaminometil]benzoato de etilo: Se disolvieron **KI-12** (500 mg, 1.3 mmol) y **KI-13** (641 mg, 1.6 mmol) en DCM (35 mL) seguido por la adición de tamices moleculares activados (10 perlas). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 5 h. Entonces se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (654 mg, 3.1 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 18 h. Se agregó DCM (25 mL), la mezcla de reacción se decantó en un embudo de separación y se lavó con agua (50 mL), se secó con sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna

(Hexanos/EtOAc de 0 a 50%) para dar el compuesto del título (631 mg, 64% de rendimiento) como un aceite incoloro que se volvió sólido con el tiempo.

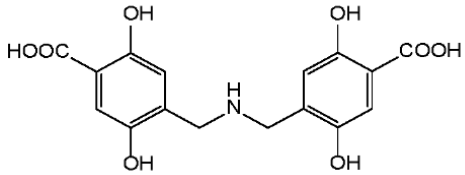
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.37 min; *m/z* = 766.3, $[M+H]^+$, área de pico > 92%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.47 - 7.42 (m, 4H), 7.38 - 7.25 (m, 20H), 5.08 (s, 4H), 5.04 (s, 4H), 4.25 (c, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.76 (s, 4H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

Procedimientos de desprotección: Véanse los procedimientos generales [4], [5]

Para las condiciones y rendimientos: Véase la Figura 7.

Como ejemplos



58) bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina, compuesto **IIIc-056a:**

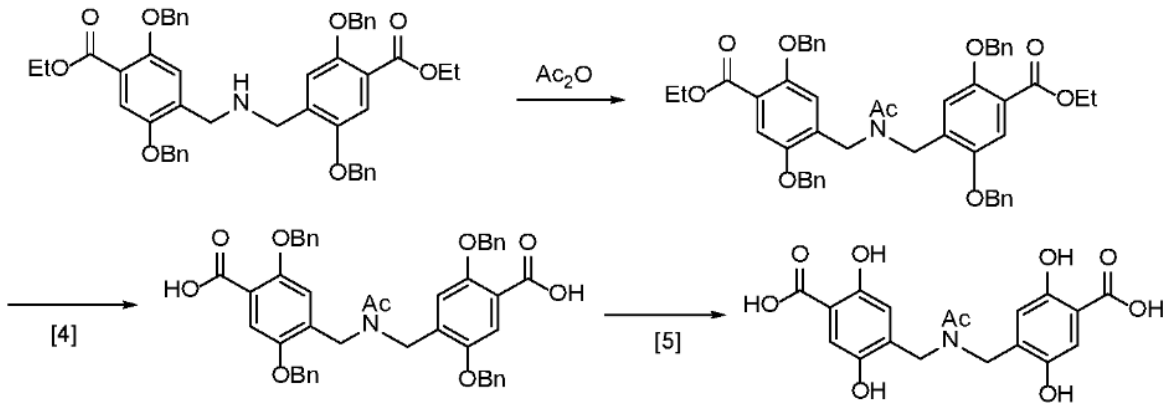
UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.57 min; *m/z* = 350.0 $[M+H]^+$, área de pico > 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.97 (s, 2H), 9.08 (s, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.02 (s, 2H), 4.11 (s, 4H). HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{16}NO_8$: 350.08704, encontrado: 350.08706.

Biodatos: **IIIc-056a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 35; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de

inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = N. D.; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 90.07; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 35.

Esquema de reacción 18: X = NAc



Procedimiento sintético

N,N-bis-[2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenilmetil]acetamida: A una solución de N,N-bis-[2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenilmetil]amina (300 mg, 0.39 mmol) y piridina (0.2 mL, 2.4 mmol) en DCM (6 mL), bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó anhídrido acético (0.2 mL, 2.1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 1 h y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna (Hexanos/EtOAc, de 0 a 50 %) para dar el compuesto del título (316 mg, 92% de rendimiento) como un aceite incoloro.

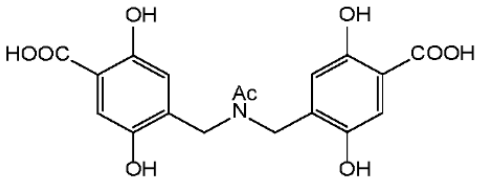
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t. a. = 1.44 min; *m/z* = 808.2 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.49 - 7.17 (m, 22H), 6.92 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.03 (s, 2H), 5.00 (s, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.46 (s, 4H), 4.31-4.16 (m, 4H), 1.96 (s, 3H), 1.28-1.20 (m, 6H).

Procedimientos de desprotección:

Véanse los procedimientos generales [4], [5]

Como ejemplos



Para las condiciones y rendimientos: Véase la Figura 7 (desprotecciones)

59) N,N-bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)-acetamida, compuesto **IIIc-057a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t. a. = 0.84 min; *m/z* = 392.1 $[M+H]^+$, área de pico > 99%.

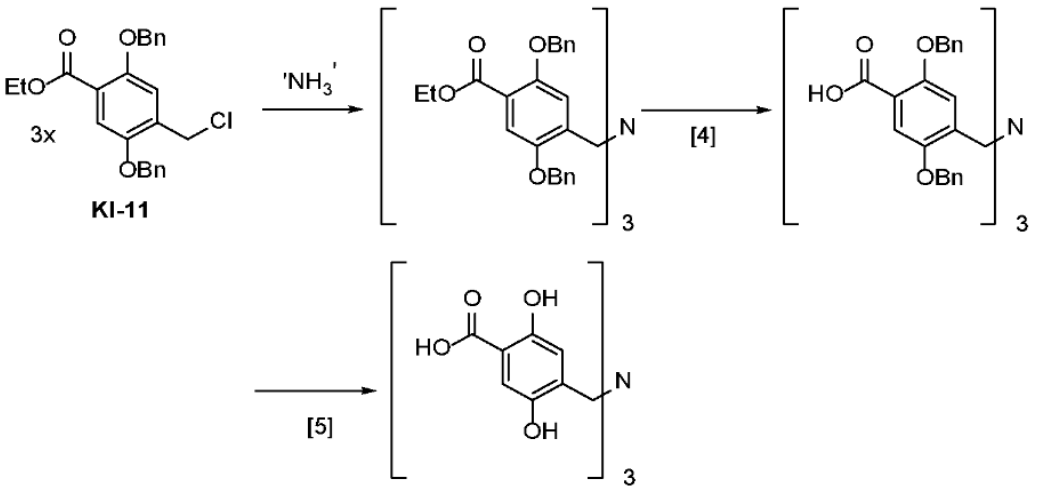
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.50 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.39 (s, 2H), 2.11 (s, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{18}NO_9$: 392.09761, encontrado: 392.09766

Biodatos: **IIIc-057a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 87; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 77; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 38; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.2; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 90.34; CI_{50} de inhibición de PMN

ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 40.04; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = 0.9; CI_{50} de IL-1β [µM] = 16.2; CI_{50} de IL-2 [µM] = 24.2; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.19; CI_{50} de IL-9 [µM] = 11.1; CI_{50} de IL-10 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 0.73; CI_{50} de IL-13 [µM] = 4.73; CI_{50} de IL-17A [µM] = 1.32; CI_{50} de IL-17F [µM] = 5.06; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = 1.56; CI_{50} de IL-33 [µM] = 2.93; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNF α [µM] = 0.15; CI_{50} de TNF β [µM] = 1.58.

Esquema de reacción 19: X = $NCH_2C_6H_3(OH)_2COOH$



Procedimiento sintético

*Formación de amina terciaria a partir de **KI-11** y NH_3*

tris(4-etoxicarbonil-2,5-dibenciloxifenilmetil)amina: Un tubo sellado se cargó con **KI-**

11 (32.5 g, 79 mmol), yoduro de sodio (0.79 g, 5 mmol), una solución de amoniaco en MeOH (7 N) (38 mL, 264 mmol) y EtOAc (80 mL). El tubo se selló entonces y la mezcla de reacción se calentó a 60°C por 24 h. Después de 24 h, se consumió el material de partida (**KI-11**) y la mezcla de reacción contenía el producto deseado pero también estructuras monoméricas y diméricas. Se agregó agua (100 mL) y la mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 100 mL), la capa orgánica reunida se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en EtOAc (165 mL) y se agregaron **KI-11** (2.5 g, 6 mmol), yoduro de sodio (0.79 g, 5 mmol), DIPEA (10 mL, 58 mmol) y la solución resultante se calentó a 60°C. Después de 18 h, se agregó agua (100 mL) y la mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 100 mL), la capa orgánica reunida se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por recristalización usando EtOH/EtOAc 95/5 (20 mL) como solvente para dar el compuesto del título (15.0 g, 50%) como cristales blancos.

UPLC-MS (método básico, 2 min): t. a. = 1.71 min; *m/z* = 1140.3 $[M+H]^+$, área de pico > 99%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 6.56 - 6.49 (m, 12H), 6.48 - 6.38 (m, 24H), 4.22 (s, 6H), 4.04 (s, 6H), 3.42 (c, *J* = 7.1 Hz, 6H), 3.00 (s, 6H), 0.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 9H).

De manera alternativa, el producto puede

purificarse *vía* cromatografía instantánea en columna en gel de sílice: escala, hasta 270 g; Instrumento: Combiflash Torrent; cartucho: RediSep Column, 3 kg de sílice; tipo de carga: Producto crudo disuelto en 1 L de heptano:tolueno (1:1). Elución con acetato de etilo/heptano. Detección: UV-240 nm

Procedimientos de desprotección: Véanse los procedimientos generales [4], [5]

Para las condiciones y rendimientos: Véase la Figura 7 (desprotecciones)

Procedimientos de desprotección a gran escala alternativos:

Saponificación. tris(4-etoxicarbonil-2,5-dibenciloxifenilmetil)amina (95.00 g, 0.083 mol), se agregaron hidróxido de sodio (40.00 g, 0.99 mol), agua (570 mL) y tetrahidrofurano (1.9 L) a un matraz de fondo redondo de 5 L. La mezcla de reacción se calentó, usando un bloque de temperatura, a 80°C (la temperatura de reflujo fue 65°C) por 48 h y entonces se agitó a temperatura ambiente por 24 h. Los solventes se removieron entonces *in vacuo*. Se recolectó el material crudo y se diluyó adicionalmente con agua (2.85 L). En otro matraz de 10 L, una mezcla de ácido acético (180 mL) y agua (950 mL) se agitó a t. a. La mezcla del producto crudo en agua se agregó a la mezcla de ácido acético durante un periodo de 30 min. mientras se agitaba con un agitador en la

parte superior y precipitaba un sólido color crema. La mezcla de reacción se agitó por 1 h adicional y el sólido se aisló después de la filtración; el pH del licor madre fue 4.2. El sólido aislado se agitó con agua (1425 mL) por 1 h y entonces se filtró. El pH del licor madre fue 4.5. El sólido recuperado se agitó con más agua (1425 mL) por 1 h y entonces se filtró; el pH del licor madre fue 4.5. El sólido anterior se agitó con acetona (950 mL) por 1 h y se filtró. El sólido color crema se secó en el horno al vacío a 50°C por 48 h antes del análisis (82.00 g, 93% de rendimiento) (los rendimientos varían entre 90-95%).

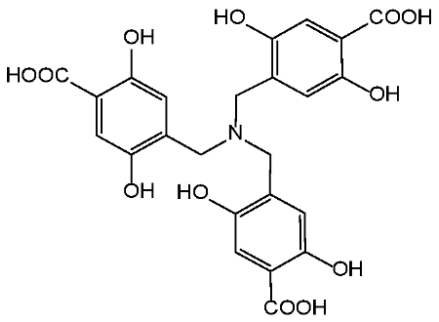
Nota: El pH es un parámetro crítico durante los lavados para mantener el producto en forma de ácido libre y remover el exceso de ácido acético del producto.

pH ideal: de 4.2 a 4.5 (el contenido final de sodio varía de 2 ppm - 20 ppm).

Hidrogenólisis y Aislamiento. Se cargaron tris(4-carboxi-2,5-dibenciloxifenilmetil)amina (58.00 g, 54.00 mmol, 1 eq) y tetrahidrofurano (1160 mL) en un matraz de fondo redondo de 2 L. La mezcla se desgasificó con nitrógeno, entonces se enjuagó con un ciclo de hidrógeno/vacío 4-5 veces. Se agregó paladio sobre carbono (JM 10% 424 Pd/C, 70 g, 15% de carga) a la mezcla de reacción y se agitó a 25°C por 5-6 h. La reacción se desgasificó entonces y el catalizador se removió por filtración a través de una

almohadilla de Celite, la cual se lavó con tetrahidrofurano (3 x 1160 mL). Finalmente, los filtrados se concentraron bajo presión reducida. El producto crudo sólido se recolectó, se agitó con heptano (1160 mL) y filtró para dar un sólido gris, el cual se secó en el horno al vacío a 50°C durante la noche (32.50 g, > 100% de rendimiento sobre una base cruda). El material crudo recolectado se disolvió en etanol (325 mL) y se calentó a 60°C (solución clara). Entonces, se agregó lentamente agua (325 mL) a 60°C (manteniendo la temperatura al menos a 50°C durante la adición) durante un periodo de 15-20 min. En esta etapa se observó un líquido turbio. La mezcla de reacción turbia se agitó a temperatura de reflujo por 30 min.

Después de este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente por otros 30 min. Se aisló el sólido precipitado después de la filtración y se lavó con una mezcla 1:1 de etanol:agua (66 mL). El sólido se secó en el horno al vacío a 50°C por al menos 72 h antes del análisis, para dar el producto deseado **IIIc-061a** (22.00 g, 76% de rendimiento) (el rendimiento varía entre 65-75%). LCMS: > 95%, RMN: > 95% de pureza.



tris(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina,

compuesto **IIIc-061a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min.): t. a. = 0.74 min.; *m/z* = 516.0 $[M+H]^+$, área de pico > 86%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.27 (s, 3H), 6.83 (s, 3H), 4.33 (s, 6H).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) δ 172.0, 154.3, 148.3, 134, 117.8 (CH), 114.9 (CH), 112.4, 53.6 (CH_2). HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{24}H_{22}NO_{12}$: 516.11365, encontrado: 516.11389.

Biodatos: **IIIc-061a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 9; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 7.6; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 21; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 4.3; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 92.5; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 58.69; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = 31.2; CI_{50} de IFNγ [µM] = 2.48; CI_{50} de IL-1β [µM] = > 100; CI_{50} de IL-2 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.18; CI_{50} de IL-9 [µM] = 8.85; CI_{50} de IL-10 [µM] = 17.9; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 37.2; CI_{50} de IL-13 [µM] = 0.31; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.04; CI_{50} de IL-17F [µM] = 0.32; CI_{50} de IL-18 [µM] = 32.4; CI_{50} de IL-21 [µM] = 6.38; CI_{50} de IL-33 [µM] = 0.31; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNF α [µM] = 0.03; CI_{50} de TNF β [µM] = 0.81.

Trietil éster

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.05 min.;

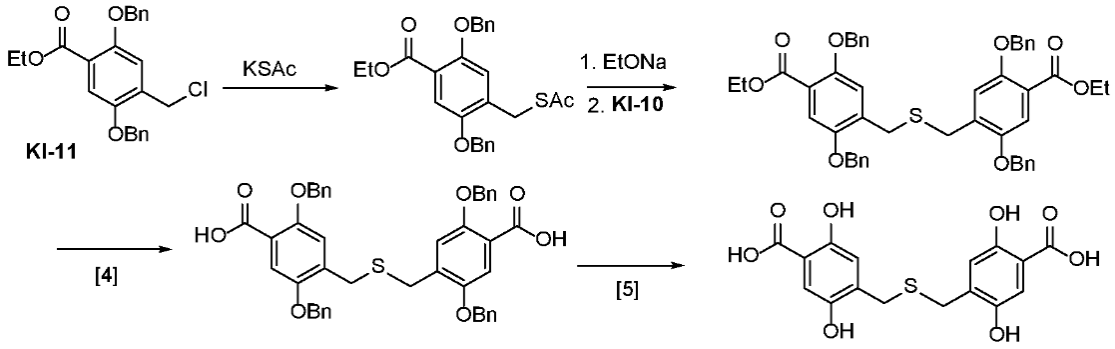
m/z = 600.2 $[M+H]^+$, área de pico > 82%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.02 (s, 3H), 9.54 (s, 3H), 7.17 (s, 3H), 7.00 (s, 3H), 4.33 (c, *J* = 7.1 Hz, 6H), 3.59 (s, 6H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 9H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{30}H_{34}NO_{12}$: 600.20755, encontrado: 600.20790.

Biodatos: **IIIc-061a-E3**: CI_{50} de FGF-1 [μM] = 200; CI_{50} de FGF-2 [μM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [μM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [μM] = 0.34; PMN ROS [inhibición a 0.3 μM [%] = N. D.; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [μM] = N. D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 10.4.

Esquema de reacción 20: X = S



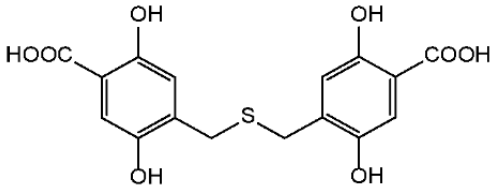
Procedimientos sintéticos

Formación del enlace tioéter de ***KI-11***

Véase el **Esquema de reacción 21**. Mismas condiciones para crear el enlace tioéter.

Procedimientos de desprotección: Véanse los procedimientos generales [4], [5]

Como ejemplos



Para las condiciones y rendimientos: Véase la Figura 7 (desprotecciones)

60) Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIIc-058a:**

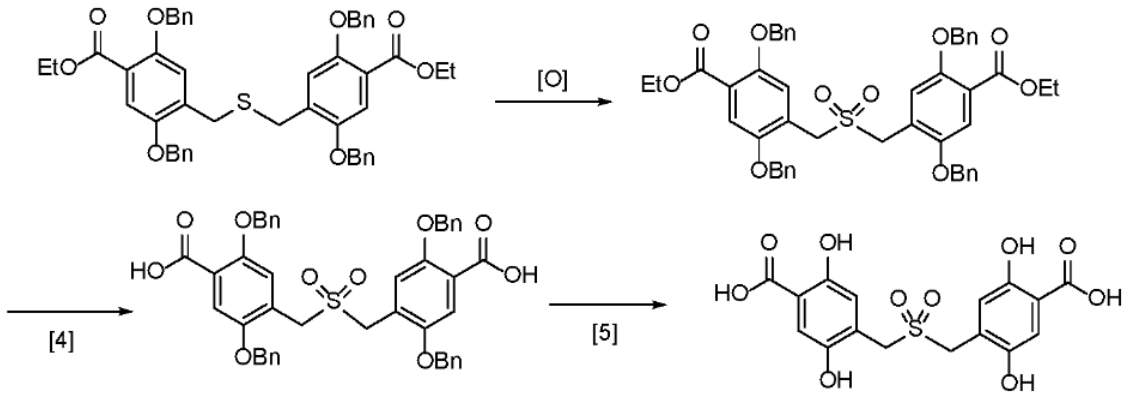
UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.84 min.; *m/z* = 365.1 $[M-H]^-$, área de pico > 79%.

^{1}H RMN (400 MHz, Metanol-d_4) δ 7.25 (s, 2H), 6.83 (s, 2H), 3.69 (s, 4H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{15}O_8S$: 367.04822, encontrado: 367.04768,

Biodatos: **IIIc-058a:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 12; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 12; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 124; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.29; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 61.22; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1.17; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 23.

Esquema de reacción 21: X = SO_2



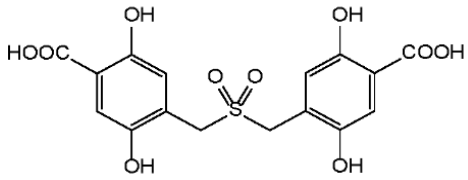
Procedimientos sintéticos

Oxidación del enlace tioéter

Véase la preparación de **IVc-059a:** mismas condiciones de oxidación.

Procedimientos de desprotección: Véanse los procedimientos generales [4], [5]

Como ejemplos



Para las condiciones y rendimientos: Véase la Figura 7 (desprotecciones)

61) Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IIIc-059a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.72 min.; *m/z* = 397.1 $[M-H]^-$, área de pico > 97%.

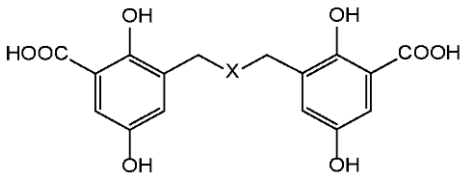
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.94 (s amplio, 2H),

10.63 (s amplio, 2H), 9.71 (s, 2H), 7.27 (s, 2H), 6.91 (s, 2H), 4.44 (s, 4H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{15}O_{10}S$: 399.03804, encontrado: 399.03768

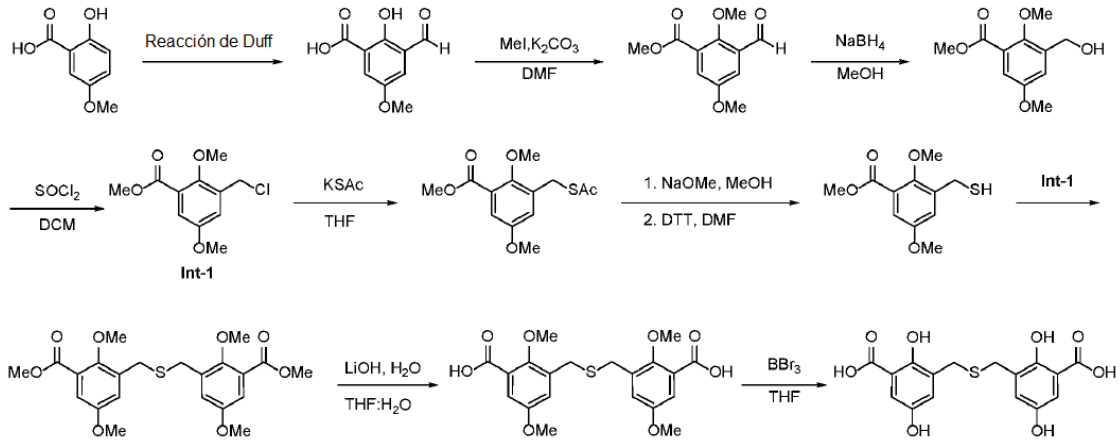
Biodatos: **IIIc-059a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 47; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 50; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 3.61; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 66.39; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 1; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 14.67.

Ejemplo 1.11: Compuestos del tipo IVc



Esquema de reacción 22: X= S

Síntesis *vía* dimetil éter



Procedimientos sintéticos

Síntesis de ácido 5-O-metil gentísico

Ácido 3-formil-2-hidroxi-5-metoxibenzoico. Se agregó hexametilentetraamina (40.019 g, 0.285 mol) a la mezcla de ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (24.0 g, 0.143 mol) en ácido trifluoroacético (190.0 mL). La reacción se mantuvo a reflujo por 18 h. Después de la finalización, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agregó una solución de ácido clorhídrico 2 M (700 mL) a la mezcla la cual se agitó a temperatura ambiente por 24 h. Se filtró el precipitado, se lavó con agua (500 mL) y se secó en el horno al vacío para dar ácido 3-formil-2-hidroxi-5-metoxibenzoico como un sólido amarillo pálido (21.30 g, 0.11 mol, 77.0%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.69 min.; *m/z* = 195.1 $[M-H]^-$, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.36 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H).

3-formil-2,5-dimetoxibenzoato de metilo. Se agregó yoduro de metilo (6.7 mL, 0.107 mol) a una mezcla de ácido 3-formil-2-hidroxi-5-metoxibenzoico (10.0 g, 0.05 mol) y carbonato de potasio-malla 325 (28.18 g, 0.20 mol) en DMF (100.0 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 18 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con agua fría (400 mL) resultando en la formación de un precipitado. La suspensión resultante se agitó por 10 min., entonces se filtró y se secó en el horno

al vacío para dar 3-formil-2,5-dimetoxibenzoato de metilo como un sólido amarillo (8.90 g, 0.04 mol, 78.0%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.95 min.; *m/z* = 225.1 $[M+H]^+$, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.27 (s, 1H), 7.55 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 3H).

3-(hidroximetil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo. Se agregó lentamente borohidruro de sodio (16.198 g, 0.428 mol) a una solución de 3-formil-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (48.0 g, 0.214 mol) en MeOH (900 mL) a 0°C y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 15 min. El solvente se removió *in vacuo* y el residuo se disolvió en DCM (200 mL) entonces se lavó con agua (200 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y concentró hasta sequedad para dar 3-(hidroximetil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo como un sólido blanco (45.6 g, 0.20 mol, 95.0%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.84 min.; sin ionización, área de pico > 98%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.20 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.24 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.68 (s, 3H).

3-(clorometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo. Se agregó por goteo cloruro de metilo (17.2 mL, 0.235 mol) a una

solución de 3-(hidroximetil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (45.60 g, 0.20 mol) durante 30 min. a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó por 18 h a temperatura ambiente. Después de finalizar, la mezcla de reacción se lavó con una solución acuosa saturada de carbonato de sodio (3 x 500 mL) y salmuera (500 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y concentró hasta sequedad para dar 3-(clorometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo como un sólido marrón (49.1 g, 0.18 mol, 90%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.10 min.; sin ionización, área de pico > 92%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.29 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 53 Hz, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.76 (s, 3H).

3-(acetiltiometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo. Se agregó tioacetato de potasio (15.54 g, 0.136 mol) a una solución de 3-(clorometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (22.20 g, 0.091 mol) en THF (500.0 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 75°C por 18 h. Después de finalizar, el solvente se removió bajo presión reducida para dar un residuo oleoso rojo el cual se trató con una solución saturada de salmuera (500 mL), entonces se extrajo con dietil éter (2 x 250 mL). Las fases orgánicas se combinaron, secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y concentraron hasta sequedad para dar 3-(acetiltiometil)-2,5-

dimetoxibenzoato de metilo como un sólido marrón (25.50 g, 0.09 mol, 99%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.10 min.; sin ionización, área de pico > 92%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.12 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.35 (s, 3H).

3-(mercaptometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo. A una solución de 3-(acetiltiometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (25.5 g, 89.68 mmol) en metanol seco (800 mL) se agregó por goteo a 0°C, una solución de metanolato de sodio (5.81 g, 107.62 mmol) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 45 min. antes de enfriarse con resina de intercambio iónico Dowex X8(H^+) y se agitó por 15 min. Después de filtrar, el solvente se evaporó bajo presión reducida para dar el producto crudo como un aceite marrón (el cual contenía el producto deseado y el compuesto disulfuro correspondiente en una relación 2:1). El residuo se disolvió en DMF (400.0 mL) y se trató con ditiotreitol (DTT) (33.95 g, 0.26 mol) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a 75°C por 18 h. Después de finalizar de la conversión del disulfuro a tiol, el solvente se evaporó. El residuo resultante se disolvió en DCM (1 L), se lavó con salmuera (7 x 500 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y concentró hasta sequedad para dar 3-

(mercaptometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo homogéneo como un aceite marrón (21.40 g, 88.32 mmol, 99%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.05 min.; *m/z* = 243.1 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.19 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.93 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H).

Dimetil 3,3'-(tiobis(metilen))bis(2,5-dimetoxibenzoato). Se agregó trietilamina (19.0 mL, 136.61 mmol) a una solución de 3-(mercaptometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (21.40 g, 88.32 mmol) y 3-(clorometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (22.69 g, 92.74 mmol) bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se agitó a temperatura ambiente por 18 h. Después de finalizar, el solvente se removió bajo vacío para dar un residuo oleoso marrón el cual se trató con agua (1 L), se extrajo entonces con dietil éter (3 x 500 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (5 x 250 mL), se secaron sobre Na_2SO, se filtraron y concentraron hasta sequedad para dar el producto crudo como un aceite marrón, el cual se purificó por cromatografía en gel de sílice: se realizó la elución con un gradiente de acetato de etilo (de 0 a 20%) en iso-hexano para dar dimetil 3,3'-(tiobis(metilen))bis(2,5-dimetoxibenzoato) como un sólido marrón (29.9 g, 66.37 mmol,

76%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.22 min.; *m/z* = 451.2 $[M+H]^+$, área de pico > 92%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.12-7.08 (m, 4H), 3.83 (s, 6H), 3.76 (s, 4H), 3.73 (s, 6H), 3.67 (s, 6H).

3,3'-(tiobis(metilen))bis(ácido 2,5-dimetoxibenzoico). Se agregó una solución de hidróxido de litio monohidratado (1.0 g, 23.83 mmol) en agua (30.0 mL) a una solución de dimetil 3,3'-(tiobis(metilen))bis(2,5-dimetoxibenzoato) (2.0 g, 4.44 mmol) en THF (100.0 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente por 48 h. Después de finalizar, se agregó agua (100 mL) a la reacción y la mezcla se lavó con acetato de etilo (100 mL). La capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico acuoso 1 M a pH = 2 y se extrajo con acetato de etilo (3 X 100 mL). Las capas orgánicas se recolectaron, se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y concentraron para dar 3,3'-(tiobis(metilen))bis(ácido 2,5-dimetoxibenzoico) como un sólido marrón (1.91 g, 4.11 mmol, 93%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.93 min.; *m/z* = 421.1 $[M-H]^-$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.96 (s, 2H), 7.10 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H), 3.76 (s, 4H), 3.73 (s, 6H), 3.69 (s, 6H).

Ácido 3-[(2,5-dihidroxi-3-

carboxifenil)metiltiometil]-2,5-dihidroxibenzoico. A una solución de tioéter anterior (5.0 g, 0.01 mol) en DCM (200.0 mL) se agregó lentamente una solución 1 M de tribromoborano en DCM (100.7 mL, 0.101 mol) a 0°C y la mezcla de reacción se mantuvo a reflujo por 48 h. Después de este tiempo, el sólido se filtró, se lavó con DCM (500 mL) y entonces se suspendió en una solución de 1 M ácido clorhídrico (50 mL). La mezcla resultante se mantuvo a reflujo por 2 h. La suspensión marrón resultante se filtró y secó para dar el producto crudo, el cual se purificó por cromatografía en columna en fase inversa (25 g, MeCN:H_2O de 5% a 95% sobre 12 CV) para dar ácido 2,5-dihidroxi-3-[(2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)-metiltiometil]benzoico como un sólido blanco (1.1 g, 0.003 mol, 26%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.70 min.; *m/z* = 365.1 $[M-H]^-$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.86 (s, 2H), 11.09 (s, 2H), 9.14 (s, 2H), 7.08 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 3.65 (s, 4H).

Ejemplo:

62) Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)-metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IVc-058a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.70 min.; *m/z* = 365.1 $[M-H]^-$, área de pico > 95%.

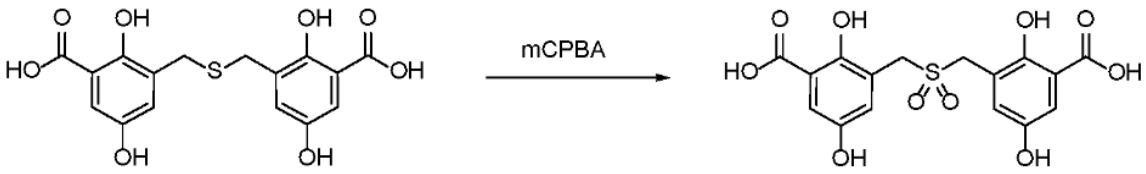
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.86 (s, 2H), 11.09 (s,

2H), 9.14 (s, 2H), 7.08 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 3.65 (s, 4H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{15}O_8S$: 367.04822, encontrado: 367.04734.

Biodatos: **IVc-058a**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 36; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 4.9; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 83; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 0.53; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 77.04; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.29; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 43.5; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = 10.6; CI_{50} de IL-1β [µM] = 27.5; CI_{50} de IL-2 [µM] = 3.82; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.21; CI_{50} de IL-9 [µM] = 31.1; CI_{50} de IL-10 [µM] = 16.4; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 4.23; CI_{50} de IL-13 [µM] = 55.9; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.1; CI_{50} de IL-17F [µM] = 86.8; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = 3.2; CI_{50} de IL-33 [µM] = 33.9; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNF α [µM] = 0.18; CI_{50} de TNF β [µM] = 59.3.

Esquema de reacción 23: X = SO_2



*Síntesis del compuesto **IVc-058a***

Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico. A una

solución de tioéter **IVc-058a** (4.25 g, 9.28 mmol) en DMF (20.0 mL) se agregó lentamente una solución de 3-clorobenceno-1-carboperoxiácido (grado de pureza mCPBA ≤ 77%, 5.80 g, 25.88 mmol) en DMF (20.0 mL). La mezcla de reacción se agitó por 18 h a temperatura ambiente. El producto crudo se sometió a purificación por HPLC (véanse las condiciones generales) para dar un sólido blanco (3.20 g) el cual se trituró con HCl 1 M (50 mL) para dar el producto deseado como un sólido blanco (2.55 g, 6.40 mmol, 56%).

UPLC-MS (método ácido, 4 min.): t. a. = 0.68 min.; *m/z* = 397.1 $[M-H]^-$, área de pico > 95%.

63) Ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **IVc-059a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min.): t. a. = 0.68 min.; *m/z* = 397.1 $[M-H]^-$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.24 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 7.21 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 4.44 (s, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) δ 172.4, 153.4, 149.2, 117.4, 116.1 (CH), 113.3 (CH), 53.6 (CH_2). HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{15}O_{10}S$: 399.03804, encontrado: 399.03775.

Biodatos: **IVc-059a:** CI_{50} de FGF-1 [µM] = 6.7; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 2.7; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 12; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 4.8; PMN ROS

[inhibición a 0.3 µM [%] = 74; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 0.147; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 10; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [µM] = > 100; CI_{50} de IFNγ [µM] = 4.34; CI_{50} de IL-1β [µM] = 38.6; CI_{50} de IL-2 [µM] = 21.2; CI_{50} de IL-4 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [µM] = 0.11; CI_{50} de IL-9 [µM] = 0.4; CI_{50} de IL-10 [µM] = 1.31; CI_{50} de IL-12p70 [µM] = 42; CI_{50} de IL-13 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-17A [µM] = 0.16; CI_{50} de IL-17F [µM] = > 100; CI_{50} de IL-18 [µM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [µM] = 1.87; CI_{50} de IL-33 [µM] = 27.5; CI_{50} de TGFβ [µM] = > 100; CI_{50} de TNF α [µM] = 0.16; CI_{50} de TNF β [µM] = 0.33.

Dimetil éster

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.94 min.; *m/z* = 427.1 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.28 (s, 2H), 9.43 (s, 2H), 7.21 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 4.47 (s, 4H), 3.91 (s, 6H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{19}O_{10}S$: 427.06934, encontrado: 427.06942.

Biodatos: **IVc-059a-E2**: CI_{50} de FGF-1 [µM] = 78; CI_{50} de FGF-2 [µM] = 94; CI_{50} de VEGF-A1 [µM] = 200; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [µM] = 2.7; PMN ROS [inhibición a 0.3 µM [%] = 45.67; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [µM] = 2.64; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 50.5.

Tetraacetato de dimetil éster

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.05 min.; *m/z* = 593.1 $[M-H]^-$, área de pico > 95%.

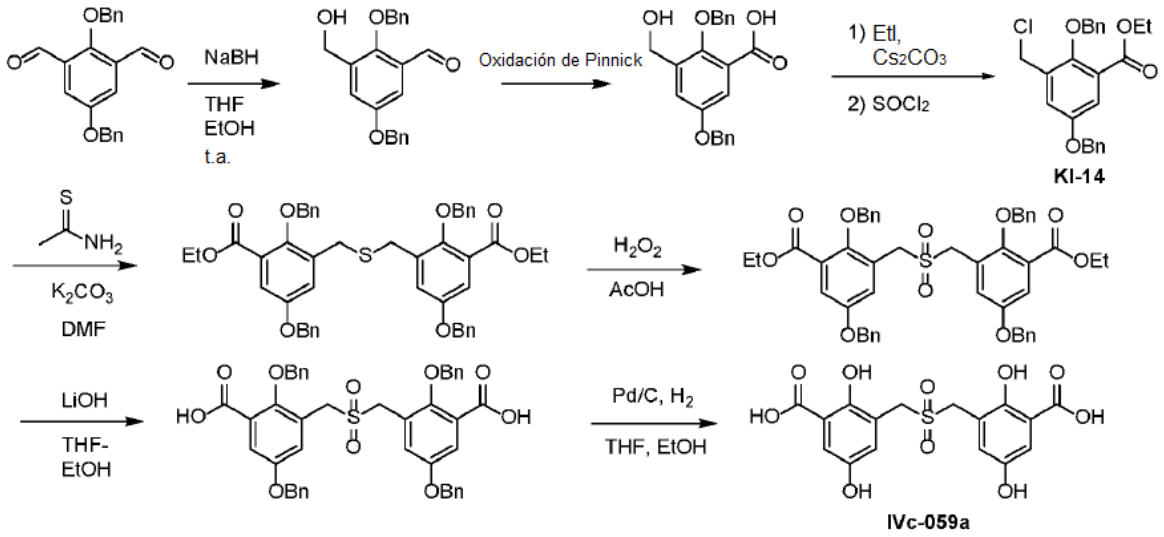
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.75 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 4.65 (s, 4H), 3.81 (s, 6H), 2.31 (s, 6H), 2.23 (s, 6H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{26}H_{27}O_{14}S$: 595.11160, encontrado: 595.11149.

Biodatos: **IVc-059a-E2-A4**: CI_{50} de FGF-1 [μM] = 54; CI_{50} de FGF-2 [μM] = 200; CI_{50} de VEGF-A1 [μM] = 25; CI_{50} de inhibición de la fosforilación por VEGFR [μM] = ND; PMN ROS [inhibición a 0.3 μM [%] = 29.17; CI_{50} de inhibición de PMN ROS [μM] = 4.13; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 87.5; Sangre Completa: CI_{50} de GM-CSF [μM] = 1.83; CI_{50} de IFNγ [μM] = 3.5; CI_{50} de IL-1β [μM] = 14.1; CI_{50} de IL-2 [μM] = 10.4; CI_{50} de IL-4 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-5 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-6 [μM] = 0.99; CI_{50} de IL-9 [μM] = 2.9; CI_{50} de IL-10 [μM] = 16.8; CI_{50} de IL-12p70 [μM] = 51.4; CI_{50} de IL-13 [μM] = 18.7; CI_{50} de IL-17A [μM] = 0.02; CI_{50} de IL-17F [μM] = 25.8; CI_{50} de IL-18 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-21 [μM] = > 100; CI_{50} de IL-33 [μM] = 23.2; CI_{50} de TGFβ [μM] = > 100; CI_{50} de TNF α [μM] = 0.3; CI_{50} de TNF β [μM] = 19.4

Síntesis escalable alternativa de IVc-059a

Esquema de reacción 24: síntesis de IVc-059a a partir de 2,5-dibenciloxiftalaldehído



2,5-Bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzaldehído

[Paso 1]: Se disolvió 2,5-bis(benciloxi)-isoftalaldehído (25.0 g, 72.1 mmol) (véase el Esquema de reacción 9b) en THF (150 mL) y se agregó EtOH (15 mL). Una solución marrón se mantuvo bajo flujo positivo de nitrógeno y se agitó a t. a. por 10 min. entonces se agregó por porciones $NaBH_4$ sólido (695 mg, 18.37 mmol) durante 20 min., no se permitió que la temperatura interna de la reacción excediera de 25°C (se usó baño de agua). La mezcla de reacción se dejó agitar a t. a. por 30 min. entonces se agregó $NaBH_4$ adicional cada 15 min. hasta completar la conversión del material de partida (total: 107 mg, en dos porciones). La mezcla de reacción se vertió entonces en agua (1.2 L) y se agitó por 20 min. Entonces el precipitado marrón aislado se aisló por filtración y el sólido obtenido se secó adicionalmente en el horno al vacío a 40°C hasta masa constante para dar el compuesto del título

(22.9 g, 76% de rendimiento corregido) como un aceite marrón. El perfil de RMN mostró 83% de producto deseado, 15% de **dio** sobrerreducido, 2% de material de partida, el material se llevó al siguiente paso sin purificación adicional.

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.19 min., 86%, *m/z* = 347.2 $[M-H]^-$.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.11 (s, 1H), 7.52-7.28 (m, 11H), 7.19 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.34 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.60 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H).

Ácido 2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzoico [Paso 2]: 2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzaldehído (44.3 g, 103 mmol, 81% de pureza) y KH_2PO_4 (25.9 g, 190 mmol) se disolvieron en acetona (440 mL) y agua (130 mL). Se agregó resorcinol (21.0 g, 191 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a t. a. por 10 min. Se agregó lentamente una solución de clorito de sodio (21.5 g, 191 mmol) en agua (60 mL) durante 30 min., sin permitir que la temperatura interna superara 25°C. La mezcla de reacción se agitó a t. a. por 3 h y se agregó una solución acuosa de H_3PO_4 2 M (95 mL). La mezcla se agitó por 20 min. y se enfrió a 6°C con un baño de hielo antes de filtrarla. El sólido se lavó adicionalmente con agua hasta que el pH del filtrado fue ~6. El sólido obtenido se suspendió en agua (aprox. 300 mL) y se agregó una solución de NaOH (17 g, 412 mmol) en agua (200 mL) previamente enfriada (5-10°C). La suspensión se agitó a t. a.

por 30 min. antes de filtrarla sobre un embudo sinterizado. El sólido aislado se lavó adicionalmente con NaOH acuoso 1 M (2 x 50 mL) y agua (50 mL). El licor alcalino se acidificó entonces usando una solución acuosa de HCl 6 N previamente enfriada (5-10°C) hasta pH ~1. La suspensión resultante se agitó magnéticamente por 20 min. antes de filtrarla, el sólido obtenido se secó adicionalmente en el horno al vacío a 40°C hasta masa constante para dar el compuesto del título como un sólido amarillo parduzco claro (34.8 g, 88%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.06 min., 99%, *m/z* = 363.2 $[M-H]^-$.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.02 (s, 1H), 7.51-7.31 (m, 10H), 7.28 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.88 (s, 2H), 4.53 (s, 2H).

2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzoato de etilo [Paso 3]: Se suspendieron ácido 2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroxi-metil)benzoico (32.5 g, 89.3 mmol) y Cs_2CO_3 (32.3 g, 99.2 mmol) en DMF (200 mL) y se agregó yoduro de etilo (9.0 mL, 112 mmol) a la mezcla de reacción. Después de agitar a t. a. por 3 h la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de NH_4Cl (1 L) y se agregó NaCl sólido (~30 g). Después de agitar por 10 min., el material se extrajo con EtOAc (2 x 500 mL). La capa orgánica reunida se lavó con salmuera (2 x 500 mL), se secó con sulfato de sodio, se filtró y concentró bajo presión reducida para dar un residuo

oleoso marrón (42.0 g, material crudo, 89.3 mmol). El material crudo se llevó al siguiente paso sin purificación adicional.

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.24 min., 93%, *m/z* = ionización débil.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.51 - 7.32 (m, 10H), 7.31 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.24 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.54 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.26 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

2,5-bis(benciloxi)-3-(clorometil)benzoato de etilo (KI-14) [Paso 4]: Se disolvió 2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzoato de etilo (42 g de material crudo del paso anterior, 89.3 mmol) en DCM (200 mL) bajo una atmósfera inerte (N_2), entonces se agregó $SOCl_2$ (9.8 mL, 133.9 mmol) a 0°C (baño de hielo) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta t. a. Después de 2 h los volátiles se removieron bajo presión reducida, seguido por destilación azeotrópica usando tolueno (3 x 100 mL) conduciendo a un aceite semisólido marrón (38.0 g, material crudo, 89.3 mmol).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.40 min., 91%, *m/z* = ionización débil.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.54 - 7.26 (m, 12H), 5.14 (s, 2H), 4.95 (s, 2H), 4.71 (s, 2H), 4.28 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.28 - 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

bis(2,5-dibenciloxi-3-

etoxicarbonilfenilmetil)sulfuro [Paso 5]: A una solución de **KI-14** (38.0 g, material crudo, 89.3 mmol) en DMF (420 mL) se agregó tioacetamida (8.4 g, 111.8 mmol) seguido por la adición de K_2CO_3-Malla 325 (16.7 g, 120.8 mmol). La reacción se calentó a 45°C por 48 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente seguido por la adición de tioacetamida (2.5 g, 33.3 mmol) y K_2CO_3-Malla 325 (5.0 g, 36.1 mmol) y se agitó adicionalmente a 45°C por 18 h para completar la reacción. La mezcla de reacción se vertió en agua (4 L). La mezcla de reacción se agitó por 20 min. antes de la adición de EtOAc (2 L) seguido por NaCl sólido (~60 g). Se separaron las fases seguido por extracción adicional usando EtOAc (1.5 L). La capa orgánica reunida se lavó con salmuera (1.5 L), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y concentró bajo presión reducida para dar el compuesto del título crudo (39.8 g, 44.6 mmol) como un aceite marrón el cual se usó en el siguiente paso sin purificación.

UPLCMS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.57 min., *m/z* = 800.5 $[M+NH_4]^+$, área de pico 77%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.46 - 7.17 (m, 24H), 5.05 (s, 4H), 4.83 (s, 4H), 4.23 (c, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.73 (s, 4H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

bis(2,5-dibenciloxi-3-etoxicarbonilfenilmetil)sulfona [Paso 6]: A una solución de bis(2,5-dibenciloxi-3-etoxicarbonilfenilmetil)sulfuro (39.8

g, material crudo, 44.6 mmol) en ácido acético (850 mL) se agregó lentamente una solución de peróxido de hidrógeno al 30% en peso (50 mL, 490 mmol). La reacción se agitó a t. a. por 18 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo/agua (5 L) y se agitó a temperatura ambiente por 30 min. seguido por la adición de EtOAc (2 L) y NaCl sólido (~40 g). Después de la separación de las fases, la capa acuosa se extrajo una vez más con EtOAc (1 L). La capa orgánica reunida se lavó con salmuera (1.5 L), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y concentró bajo presión reducida para dar un sólido marrón. El sólido se suspendió en MTBE (250 mL) y se agitó magnéticamente por 30 min. seguido por filtración y trituración adicional con MTBE (150 mL) para dar el compuesto del título (23.56 g, 28.9 mmol, 64% de rendimiento durante 4 pasos).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.48 min.; *m/z* = 832.5 $[M+NH_4]^+$, área de pico 96%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.50 - 7.24 (m, 24H), 5.08 (s, 4H), 4.85 (s, 4H), 4.50 (s, 4H), 4.26 (c, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.25 - 1.17 (m, 6H).

bis(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenilmetil)sulfona

[Paso 7]: Se agregó una solución de hidróxido de litio (9.7 g, 233 mmol) en agua (100 mL) a una solución de bis(2,5-dibenciloxi-3-etoxicarbonilfenilmetil)sulfona (33.3 g, 38.8 mmol) en THF (350 mL) y la mezcla resultante se agitó a reflujo por 18 h. Después de ese tiempo, la mayoría del THF

se removió bajo presión reducida conduciendo a una suspensión blanca. Tras la adición de agua (3 L) y solución acuosa de hidróxido de sodio (1 M, 1 L) la mezcla permanece en suspensión. La suspensión se agitó a t. a. por 18 h y la capa acuosa se acidificó a pH ~1 mediante la adición de solución acuosa de ácido clorhídrico 6 M y el sólido resultante se recolectó por filtración y se lavó con agua, hasta que los licores fueron neutros, el sólido blanco así obtenido se secó adicionalmente en el horno al vacío a 40°C hasta masa constante para dar el compuesto del título como un sólido blanco (29.4 g, 38.7 mmol, 99%).

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.39 min.; *m/z* = 757.1 $[M-H]^-$, área de pico 100%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.23 (s, 2H), 7.47 - 7.25 (m, 24H), 5.08 (s, 4H), 4.88 (s, 4H), 4.48 (s, 4H).

bis(2,5-dihidroxi-3-carboxifenilmetil)sulfona [Paso 8], **IVc-059a:** A una suspensión de bis(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenilmetil)sulfona (10.08 g, 13.28 mmol) en EtOH (140 mL) y THF (140 mL) se agregó paladio sobre carbón (20% en peso, 2 g) como una suspensión en agua (20 mL). Después de varios ciclos de vacío/hidrógeno la mezcla se mantuvo bajo una atmósfera de H_2 a 25°C y se agitó por 20 h. Después de finalizar, la mezcla se filtró a través de Celite® usando THF. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar un sólido blanco mate. El residuo se suspendió entonces en

acetonitrilo (100 mL) y se calentó a reflujo bajo agitación magnética, la mezcla se enfrió entonces a -5°C antes de filtrarla y lavarla adicionalmente con acetonitrilo frío. El producto se secó adicionalmente en el horno al vacío a 40°C hasta masa constante para dar el producto deseado como un sólido blanco (5.35 g, 12.78 mmol, 96%).

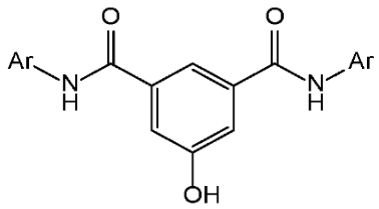
UPLC-MS (método ácido, 4 min.): t. a. = 0.67 min.; *m/z* = 397.1 $[M-H]^-$, área de pico 100%.

Datos de RMN: véase más arriba.

<u>Ejemplo 1.12 - Moléculas del tipo V</u>: Compuestos de referencia

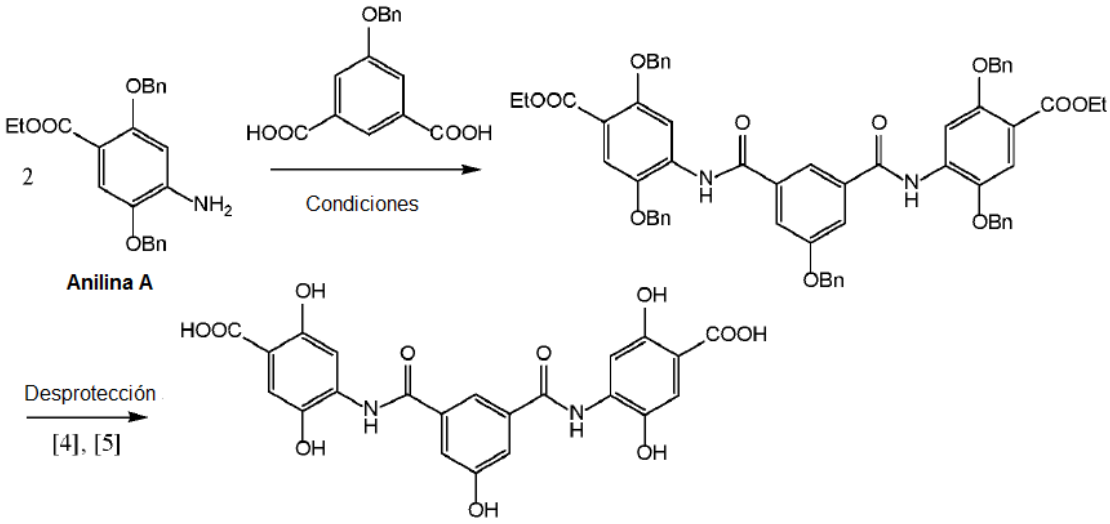
Diamidas derivadas de ácido 5-hidroxiisoftálico

2 ejemplos



Esquemas y Procedimientos Sintéticos

Esquema de reacción 25: síntesis de V-001ª



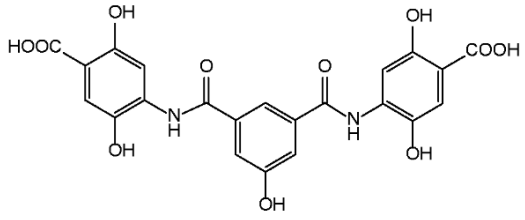
Formación del enlace amida

Véase el procedimiento general B para el Acoplamiento de Amida [3B] usando anilina A (2 moles) o 5-aminosalicilato de metilo

Procedimientos de desprotección: Véanse los procedimientos generales [4], [5]

Para los detalles véase la Figura 8

Como ejemplos



V-001a

64) bis-N-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)amida de ácido 5-hidroxiisoftálico (V-001a)

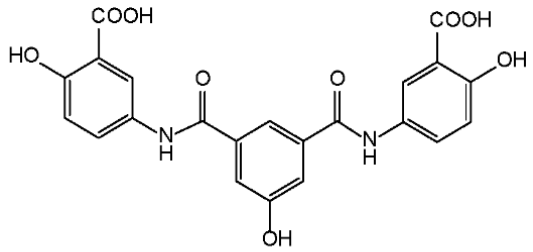
UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 0.72 min.; *m/z* = 483.0 $[M+H]^+$, área de pico > 95%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.28 (s, 1H), 9.83 (s, 2H), 9.48 (s, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.68 (s, 2H), 7.52 (d, J = 1.5 Hz, 2H), 7.30 (s, 2H).

Dietil éster

UPLC-MS (método ácido, 2 min.): t. a. = 1.09 min.; m/z = 539.2 $[M-H]^-$, área de pico 94%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.23 (s, 2H), 9.92 (s, 2H), 9.49 (s, 2H), 7.91 (s, 1H), 7.73 (s, 2H), 7.51 (d, J = 1.5 Hz, 2H), 7.32 (s, 2H), 4.35 (c, J = 7.1 Hz, 4H), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 6H).



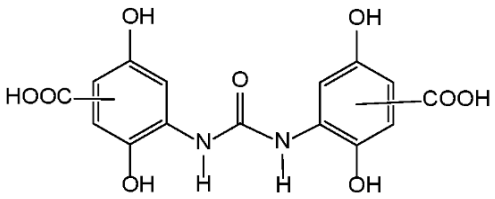
V-002a

65) bis-N-(3-carboxi-4-hidroxifenil)amida de ácido 5-hidroxiisoftálico (V-002a)

UPLC-MS (método ácido, 4 min.): t. a. = 1.00 min.; m/z = 451.1 $[M-H]^-$, área de pico 97%.

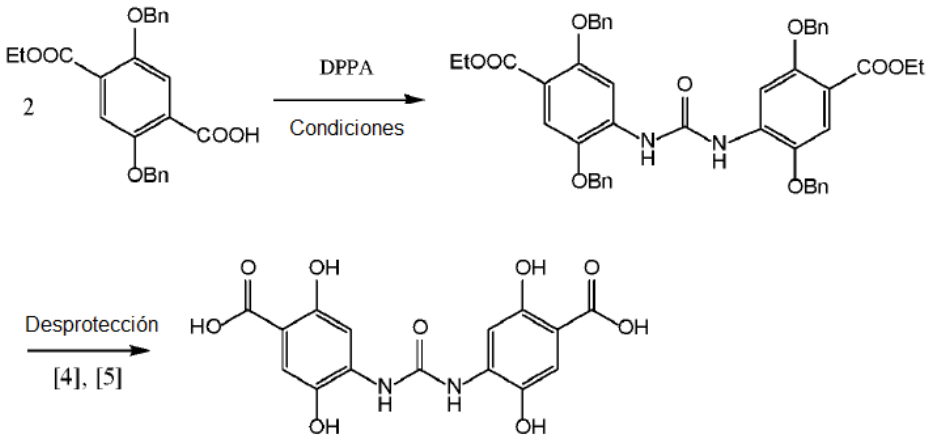
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.31 (s, 2H), 10.11 (s, 1H), 8.28 (d, J = 2.7 Hz, 2H), 7.98 (m, 1H), 7.89 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 1.5 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 9.0 Hz, 2H).

Unidades de Ácido Gentísico Enlazadas a Urea - 1 ejemplo



Esquema de Reacción y Procedimientos Sintéticos

Esquema de reacción 26: síntesis de V-003a



Formación del enlace urea

Procedimiento de **KI-1**:

N,N'-bis(2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenil)urea.

A una solución enfriada (baño de hielo) de ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**KI-1**) (2.0 g, 4.9 mmol) y Et_3N (1.6 mL, 11.3 mmol) en THF (25 mL) bajo una atmósfera inerte (N_2), se agregó lentamente DPPA (1.1 mL, 5.2 mmol). La mezcla se calentó lentamente a t. a. y se agitó a esta temperatura por 3 h. Entonces se agregó tBuOH (8 mL) y la mezcla de reacción se agitó a t. a. por 18 h. El perfil de reacción mostró una mayoría de producto enlazado a urea en

lugar de la Boc-anilina deseada. La mezcla se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio (250 mL) y se agitó por 5 min. antes de extraer con EtOAc (3 x 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y concentraron bajo presión reducida para dar un aceite incoloro. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna (iso-Hexano/EtOAc 1:0 entonces en gradiente hasta 30% EtOAc) para dar el compuesto del título (1.1 g, 56%) como un sólido blanco mate.

UPLC-MS (método básico, 2 min.): t. a. = 1.50 min.; *m/z* = 781.2 $[M+H]^+$, área de pico 85%.

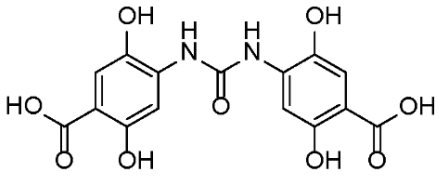
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.49 (s, 2H), 8.18 (s, 2H), 7.58 - 7.45 (m, 8H), 7.43 - 7.35 (m, 8H), 7.35 - 7.28 (m, 6H), 5.27 (s, 4H), 5.11 (s, 4H), 4.22 (c, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

Procedimientos de desprotección: Véanse los procedimientos generales [4], [5]

Para los detalles véase la Figura 8

Por ejemplo

66) N,N′-bis(2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)urea (V-003a)



V-003a

UPLC-MS (método ácido, 4 min.): t. a. = 0.90 min.; *m/z* = 363.1 $[M-H]^-$, área de pico 93%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.36 (s, 2H), 10.86 (s, 2H), 9.64 (s, 2H), 9.48 (s, 2H), 7.77 (s, 2H), 7.17 (s, 2H).

Dietil éster

UPLC-MS (método ácido, 4 min.): t. a. = 1.79 min.; *m/z* = 419.2 $[M-H]^-$, área de pico 97%.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.26 (s, 2H), 9.74 (s, 2H), 9.53 (s, 2H), 7.81 (s, 2H), 7.20 (s, 2H), 4.32 (c, J = 7.1 Hz, 4H), 1.33 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

Ejemplo 1.13: Formación de sales

a) Sólidos.

Protocolo general: las sales se obtuvieron como sólidos agregando el número apropiado de equivalentes de base a soluciones o suspensiones de los compuestos deseados en agua, sonicando hasta la disolución completa y ajustando el pH si era necesario a valores entre 7.0 y 7.4 mediante la adición de HCl acuoso o exceso de base, liofilizando entonces la solución. De manera alternativa podrían obtenerse varias sales por disolución en DMSO seguida por precipitación con EtOH (**IIc-007a**). Los sólidos se generaron a partir de las siguientes bases: hidróxido de sodio, dietilamina (DEA), lisina (Lys), meglumina (Meg), trietanolamina (TEA).

Como ejemplos:

Las sales de sodio y dietilamonio (DEA) de **Ic-007a,**

IIc-007a, IIIc-061a como sólidos se obtuvieron de acuerdo al protocolo general sin ajustar el pH.

- Solubilidades aproximadas en agua:

Ic-007a-DEA2: < 10 mg/mL

Ic-007a-DEA3: > 20 mg/mL

IIc-007a-DEA1: > 10 mg/mL

IIc-007a-DEA2: > 20 mg/mL

IIIc-061a-DEA3: > 25 mg/mL

- Estabilidad de los ácidos libres y las sales como sólidos:

Los ácidos libres **Ic-007a, IIc-007a, IIIc-061a** y las siguientes sales **Ic-007a-**DEA2, **IIc-007a-**DEA2, **IIIc-061a-**DEA3 fueron estables como sólidos por hasta 56 d a temperaturas de 4°C, 20°C y 40°C; la sal **Ic-007a-**DEA3 fue estable a las mismas temperaturas por hasta 36 d.

b) **Soluciones**

Protocolo general: Las sales se obtuvieron **como soluciones** agregando el número apropiado de equivalentes de base a soluciones o suspensiones de los compuestos deseados en agua, sonicando hasta disolución completa, ajustando el pH si era necesario a valores entre 7.0 y 7.4 mediante la adición de HCl acuoso o exceso de base. Se investigaron las siguientes bases: etilamina, trietilamina, etilendiamina, dietanolamina, trietanolamina, colina, meglumina, lisina y arginina.

Como ejemplos:

Sales de Ic-007a:

Las sales solubles se obtuvieron con meglumina, lisina y dietanolamina después de agitar la mezcla por 2 d a 40°C. Se obtuvo una forma sólida de la sal **Ic-007a-**Lys2 de DMSO por precipitación con etanol. La sal fue estable como una solución en agua por al menos 7 d a temperatura ambiente.

Sales de IIc-007a:

Sal de DEA1: a escala pequeña, la sal de mono-dietilamonio se obtuvo por el procedimiento general sin ajustar el pH. Solubilidad: 17.4 mg/mL contra 1.8 mg/mL para el diácido original

Proceso a gran escala y caracterización:

A **IIc-007a** (20 g, 42.7 mmol) se cargó EtOH (200 mL). La reacción se agitó a TA para dar una lechada. Se cargó DEA (4.4 mL, 42.7 mmol) y la reacción se calentó a 50°C por 2 h. El lote se enfrió a TA y se filtraron los sólidos. La torta de filtro se lavó con EtOH (50 mL) y se secó en horno a 40°C para dar 21.5 g de sal de mono-DEA como un sólido amarillo en un rendimiento del 98%. RMN: 1.6% de EtOH, 1.04 eq de DEA. HPLC: 99.6%.

Los datos en estado sólido de la sal de mono-DEA de **IIc-007a** mostraron un patrón cristalino claro en el análisis XRPD. Las trazas de TGA mostraron una pérdida de una cantidad menor de EtOH < 120°C indicando que el EtOH puede secarse a

60-80°C. Una vez observada la pérdida de DEA (13.5% en peso teórico para la sal 1:1) asociada con la endoterma de fusión en la DSC (pico a 273.8°C), seguida por una fusión de la forma de ácido libre.

Sal de DEA2, pH ajustado: obtenida por el procedimiento general con ajuste del pH (se requirieron 0.51 equivalentes adicionales de Et_2NH para alcanzar el pH = 7.25). La sal en solución exhibe degradación clara después de 21 d a 40°C y degradación extensa después de 24 h a 80°C.

Sal de DEA2, sin pH ajustado: obtenida por el procedimiento general sin ajuste del pH. pH de la solución = 5.87. La sal en solución no exhibió degradación después de 21 d a 4°C, 20°C y 40°C.

Sal de Lys2, sin pH ajustado: obtenida por el procedimiento general usando 2 equivalentes de L-lisina. pH de la solución = 5.74.

NOTA: por analogía con la bis (N-metil)amida de ácido 2-hidroxiisoftálico (pKa del fenol = 6.81), el grupo 2-OH del núcleo de bis-amida isoftálica de **IIc-007a** es notablemente ácido y su ionización conduce a la degradación de la molécula. Este efecto no se observa para **Ic-007a** (pKa observado de las funciones fenólicas en el intervalo de 9.8-10.0). En consecuencia, es importante no ajustar el pH de soluciones de sales dicatiónicas de **IIc-007a**.

Sales de IIIc-061a:

Sal de DEA3, pH ajustado: obtenida por el procedimiento general usando 3 equivalentes de Et_2NH con ajuste del pH (se requirieron 0.8 equivalentes adicionales de HCl (0.5 M) para alcanzar el pH final = 7.22). La sal en solución no exhibió degradación después de 21 d a 4°C, 20°C y ligera degradación a 40°C después de 33 d.

Sal de Meg3, pH ajustado: obtenida por el procedimiento general usando 3 equivalentes de meglumina con ajuste del pH para alcanzar el pH final = 7.22 (HCl 0.5 M). La sal en solución no exhibió degradación después de 21 d a 4°C, 20°C y 40°C después de 14 d.

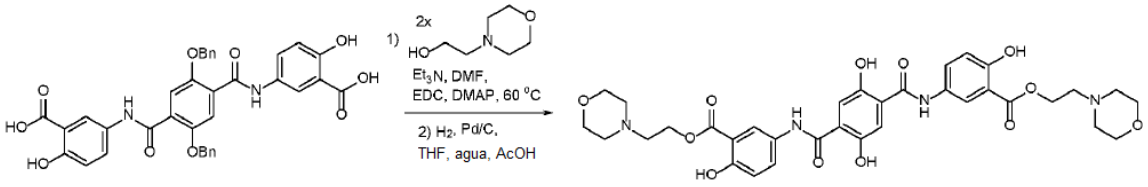
Sales de IVc-059a,

Sal de DEA2, pH ajustado: obtenida por el procedimiento general con el ajuste del pH (se requirieron 0.32 equivalentes adicionales de Et_2NH para alcanzar el pH = 7.3). La sal en solución exhibe estabilidad después de 26 d a 4°C, 20°C y 40°C.

Ejemplo 1.14: Profármacos

<u>Profármacos de Ic-007a</u>

1) 5-[[2,5-dihidroxi-4-[[4-hidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil]carbamoil]benzoil]amino]-2-hidroxibenzoato de 2-morfolinoetilo (Ic-007a-mpe2)



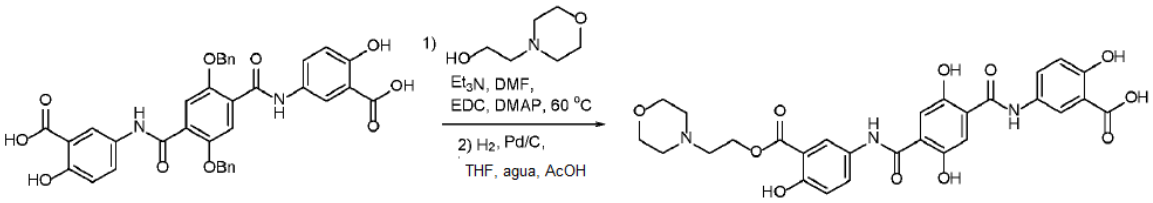
Esterificación. Una suspensión de ácido 5-[[2,5-dibenciloxi-4-[(3-carboxi-4-hidroxifenil)carbamoil]-benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (130 mg, 0.2 mmol) en N,N-dimetilformamida (4 mL) se agitó a temperatura ambiente. Se agregó N,N-dimetilpiridin-4-amina (49 mg, 0.4 mmol) y una solución de 2-morfolinoetanol (53 mg, 0.4 mmol) en N,N-dimetilformamida (0.5 mL). Se agregó clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (115 mg, 0.6 mmol) y la mezcla de reacción se calentó en un reactor de microondas a 60°C por 1.5 horas. Se filtró la mezcla de reacción, el filtrado se diluyó con tetrahidrofurano y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 0-40% de metanol en diclorometano para dar el producto del título como un sólido blanco (80 mg, 45%). LCMS (*m/z*) [M+H] 875.1.

Hidrogenólisis: Se preparó una solución del diéster obtenido anteriormente (80 mg, 0.092 mmol) en tetrahidrofurano (12 mL) y agua (4 mL) y se agregó 10% de paladio sobre carbono (50 mg, pasta al 10%). La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno por 17 horas. El catalizador se removió por filtración y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por HPLC preparativa en fase inversa sobre una columna C18 usando un gradiente de 10-97% (acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico):(agua + 0.1% de ácido fórmico). El residuo se trituró con dietil éter y se

secó bajo vacío para dar el producto del título **Ic-007a-mpe2** como un sólido amarillo (22 mg, 35%).

^{1}H RMN (DMSO-d_6 ppm) δ 11.16 - 11.00 (s amplio, 1H), 10.46 (s, 1H), 10.45 - 10.15 (s amplio, 1H), 8.25 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.77 (dd, J = 9.0, 2.7Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.01 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.46 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.62 - 3.56 (m, 4H), 2.77 - 2.69 (m, 2H), 2.56 - 2.50 (m, 4H, parcialmente oscurecido por el pico de DMSO). LCMS (*m/z*) [M+H] 695.0.

2) Ácido 5-[[2,5-dihidroxi-4-[[4-hidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil]carbamoil]benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (Ic-007a-mpe1)



Esterificación. Una solución de ácido 5-[[2,5-dibenciloxi-4-[(3-carboxi-4-hidroxi-fenil)-carbamoil]benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (324 mg, 0.5 mmol) y trietilamina (101 mg, 0.15 mL, 1 mmol) en N,N-dimetilformamida (7 mL) se agitó a temperatura ambiente. Se agregó una solución de 2-morfolinoetanol (66 mg, 0.5 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 mL) y N,N-dimetilpiridin-4-amina (122 mg, 1 mmol). Se agregó clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (115 mg, 0.6 mmol) y la

mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 2 horas y entonces se calentó en un horno de microondas a 60°C por 4 horas. Se repitió la reacción a una escala similar y se combinaron las mezclas de reacción. Se evaporó el solvente y el residuo se trituró con dietil éter para dar una mezcla del mono y diéster (230 mg). LCMS (*m/z*) [M+H] 762.0 (monoéster).

Hidrogenólisis. La mezcla de mono y diéster (230 mg) obtenida anteriormente se disolvió en acético ácido (10 mL), tetrahidrofurano (15 mL) y se le agregó agua (5 mL) y 10% de paladio sobre carbono (150 mg, pasta al 10%). La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno por 16 horas. El catalizador se removió por filtración y se evaporó el solvente para dar una goma amarilla (140 mg). El residuo se purificó por HPLC preparativa en fase inversa sobre una columna C18 usando un gradiente de 10-70% (acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico):(agua + 0.1% de ácido fórmico). El residuo se trituró con dietil éter y se secó bajo vacío para dar el monoéster del título **Ic-007a-mpe1** como un sólido amarillo (11 mg).

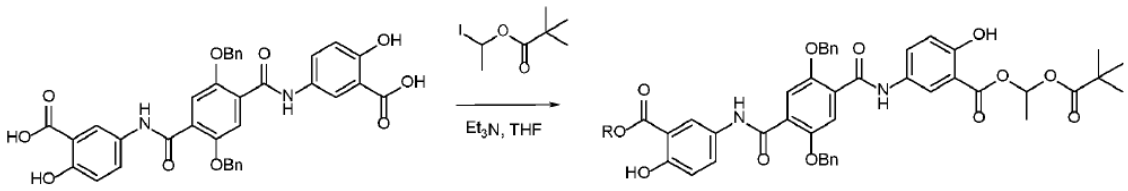
^{1}H RMN (DMSO-d_6 ppm) δ 11.33 - 11.29 (s amplio, 1H), 11.13 - 10.08 (s amplio, 1H), 10.50 - 10.44 (s amplio, 2H), 10.36 - 10.30 (s amplio, 1H), 8.25 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.06 - 8.02 (m, 1H), 7.78 (dd, J = 9.0, 2.4Hz, 1H), 7.69 - 7.60 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.01 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.50-4.45 (m, 2H), 3.65 - 3.55 (m, 4H), 2.81 -

2.71 (m, 2H), 2.60 - 2.50 (m, 4H, parcialmente oscurecido por el pico de DMSO). LCMS (*m/z*) [M+H] 582.0.

3) 5-[[4-[[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxi-fenil]carbamoil]-2,5-dihidroxi-benzoil]amino]-2-hidroxibenzoato de 1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etilo (Ic-007a-pive2)

Y

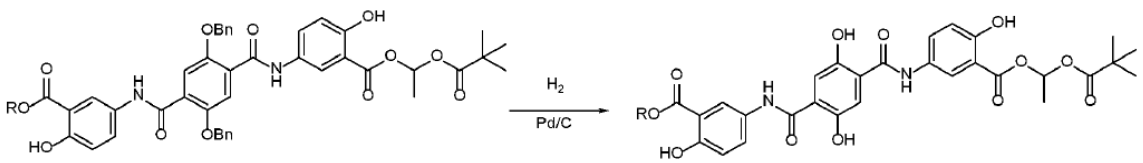
4) Ácido 5-[[4-[[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxi-fenil]carbamoil]-2,5-dihidroxi-benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (Ic-007a-pive1)



(mezcla de mono y diésteres)

Esterificación. Una solución de ácido 5-[[2,5-dibenciloxi-4-[(3-carboxi-4-hidroxi-fenil)carbamoil]benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (324 mg, 0.5 mmol) y trietilamina (152 mg, 0.21 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 mL) se agitó a 0°C y se agregó 2,2-dimetilpropanoato de 1-yodoetilo (572 mg, 2 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente por 24 horas. La

dimetilformamida se evaporó y el residuo se repartió entre diclorometano y metabisulfito de sodio acuoso. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se evaporó para dar una mezcla 1:1 del mono y diéster (187 mg). Se repitió la reacción y se combinaron las mezclas de ésteres 1:1. LCMS (*m/z*) [M+H] 777.0 (monoéster) y 905.1 (diéster).



(mezcla de mono y diésteres) (mezcla de mono y diésteres)

Hidrogenólisis

La mezcla de mono y diésteres (320 mg) obtenida anteriormente se disolvió en tetrahidrofurano (50 mL) y agua (5 mL) y se agregó 10% de paladio sobre carbono (300 mg, pasta al 10%). La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno por 20 horas. El catalizador se removió por filtración y el solvente se evaporó. La LCMS indicó que únicamente se había alcanzado una desprotección parcial. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (36 mL) y agua (6 mL) y se agregó 10% de paladio sobre carbono (600 mg, pasta al 10%). La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno por 22 horas. El catalizador se removió por filtración y el solvente se evaporó. El residuo se purificó por HPLC preparativa en fase inversa sobre una columna C18 usando un gradiente de 40-97% (acetonitrilo +

0.1% de ácido fórmico):(agua + 0.1% de ácido fórmico). Los residuos se trituraron con dietil éter y se secaron bajo vacío para dar los productos del título:

Diéster (**Ic-007a-pive2**): sólido amarillo (60 mg). ^{1}H RMN (DMSO-d_6 ppm) δ 11.05 (s, 1H), 10.46 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 8.18 (s amplio, 1H), 7.83 - 7.77 (m, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.05 - 6.96 (m, 2H), 1.58 (d, J = 5.5 Hz, 3H), 1.17 (s, 9H). LCMS (*m/z*) [M+H] 724.9.

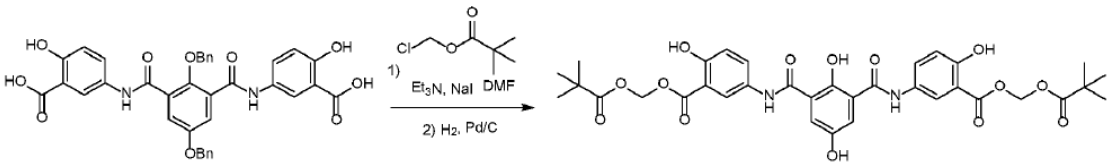
Biodatos: $T_{1/2}$ (plasma de ratón): 62.2 min. (éster escindido; 65% remanente después de 1 h); $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 min.

Monoéster (**Ic-007a-pive1**): sólido amarillo (35 mg). ^{1}H RMN (DMSO-d_6 ppm) δ 11.13 (s, 1H), 11.06 (s, 1H), 10.46 (s, 1H), 10.42 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 8.21 - 8.18 (m, 2H), 8.78 - 8.72 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.03 - 6.92 (m, 3H), 1.58 (d, J = 5.5 Hz, 3H), 1.17 (s, 9H). LCMS (*m/z*) [M+H] 596.9.

Biodatos: $T_{1/2}$ (plasma de ratón): 44.6 min. (éster escindido; 49% remanente después de 1 h); $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 min.

Profármacos de IIc-007a

1) 5-[[3-[[3-(2,2-dimetilpropanoiloximetoxicarbonil)-4-hidroxi-fenil]-carbamoil]-2,5-dihidroxi-benzoil]amino]-2-hidroxibenzoato de 2,2-dimetilpropanoiloximetilo (IIc-007a-pivm2)

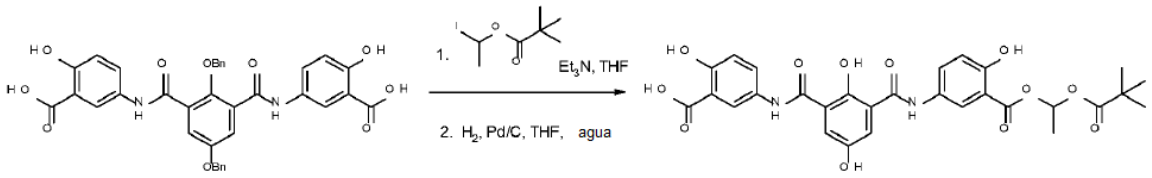


Esterificación. Se preparó una solución de ácido 5-[[2,5-dibenciloxi-3-[(3-carboxi-4-hidroxi-fenil)carbamoil]benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (280 mg, 0.432 mmol) en N,N-dimetil formamida y se agregó clorometil 2,2-dimetilpropanoato (137 µL, 0.95 mmol), seguido por trietilamina (167 µL, 1.2 mmol)) y yoduro de sodio (143 mg, 0.95 mmol). La solución agitada se calentó a 50°C por 18 horas. La solución se enfrió entonces y se repartió entre solución saturada de cloruro de amonio y acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía sobre una columna de sílice usando un gradiente de 100% de *iso*-hexano a 50% de acetato de etilo, 50% de *iso*-hexano para dar el diéster como una goma incolora (192 mg, 51%). LCMS (*m/z*) [M+H] 876.9.

Hidrogenólisis: Se preparó una solución del diéster obtenido anteriormente (192 mg, 0.219 mmol) en tetrahidrofurano (4.5 mL) y se agregó a una suspensión agitada de 10% de paladio sobre carbono (40 mg, 0.04 mmol) en agua (1.5 mL). La mezcla de reacción agitada se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno por 18 horas. Se filtró la reacción para remover el catalizador y la solución se evaporó

para dar un sólido crema (142 mg). El sólido se purificó por HPLC sobre una columna C18 usando un gradiente de 60% de acetonitrilo, 40% de agua a 100% de acetonitrilo (0.1% de ácido fórmico) para dar el diéster del título **IIc-007a-pivm2** como un sólido blanco (75 mg, 49%). ^{1}H RMN (DMSO-d_6 ppm) δ 13.03 (s amplio, 1H), 10.43 (s amplio, 2H), 10.16 (s, 2H), 9.52 (s amplio, 1H), 8.17 (d, *J* = 2.7Hz, 2H), 82 (dd, *J* = 8.9Hz, 2.7Hz, 2H), 7.55 (s, 2H) .02 (d, *J* = 8.9Hz, 2H), 5.98 (s, 4H), 1.17 (s, 18H). LCMS (*m/z*) [M-H] 694.9.

2) Ácido 5-[[3-[[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxi-fenil]carbamoil]-2,5-dihidroxi-benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (IIc-007a-pive1)



Esterificación. Una solución de ácido 5-[[2,5-dibenciloxi-3-[(3-carboxi-4-hidroxi-fenil)carbamoil]benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (324 mg, 0.5 mmol) y trietilamina (101 mg, 0.14 mL, 1.0 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 mL) se agitó a 0°C. Se agregó 2,2-dimetilpropanoato de 1-yodoetilo (154 mg, 0.6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 21 horas. Se agregó trietilamina adicional (0.14 mL, 1.0 mmol) y

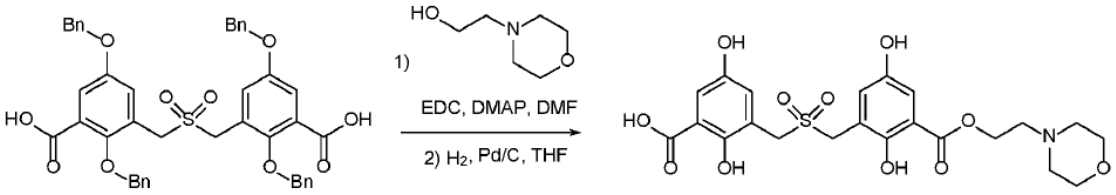
2,2-dimetilpropanoato de 1-yodoetilo (154 mg, 0.6 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a t. a. por 1 hora. El solvente se evaporó. El residuo se repartió entre diclorometano y solución de metabisulfito de sodio. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera y se secaron pasando la solución a través de una frita hidrofóbica. El filtrado se evaporó para dar una mezcla de mono y diésteres. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 5-100% de acetato de etilo en iso-hexanos seguido por 10% de metanol en diclorometano para dar el monoéster como un sólido amarillo (121 mg). LCMS (*m/z*) [M+H] 777.

Hidrogenólisis. Se agitó una solución de monoéster obtenido anteriormente (121 mg, 0.15 mmol) en tetrahidrofurano (16 mL) y agua (4 mL) que contiene 10% de paladio sobre carbono (250 mg, pasta al 10%) bajo una atmósfera de nitrógeno por 18 horas. El catalizador se removió por filtración y el solvente se evaporó. El residuo se purificó por HPLC preparativa en fase inversa usando un gradiente de 40-97% (acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico):(agua + 0.1% de ácido fórmico) para dar el monoéster **IIc-007a-pive1** como un sólido amarillo (34 mg). ^{1}H RMN (DMSO-d_6 ppm) δ 13.15 (s amplio, 1H), 10.47 (s amplio, 2H), 10.18 (s, 1H), 9.47 (s amplio, 1H), 8.21 (d, *J* = 3 Hz 1H), 8.17 (d, *J* = 3 Hz 1H), 7.82 (dd, *J* = 9, 3 Hz 1H), 7.78 (dd, *J* = 9, 3 Hz 1H), 7.59 - 7.55 (m, 2H), 7.03 (d, *J* = 9 Hz 1H), 6.99 (c,

J = 5.4 Hz 1H), 7.96 (d, *J* = 9 Hz 1H), 1.58 (d, *J* = 5.4 Hz, 3H), 1.17 (s, 9H). LCMS (*m/z*) [M-H] 595.1.

Profármacos de IVc-059a

1) Ácido 2,5-dihidroxi-3-[[2,5-hidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil]metilsulfonilmetil]benzoico (IVc-059a-mpe1)



Esterificación. Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil]benzoico (300 mg, 0.40 mmol) y 2-morfolinoetanol (53 mg, 0.40 mmol) en N,N-dimetilformamida (93 mL) y se agregaron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 93 mg, 0.48 mmol) y N,N-dimetilpiridin-4-amina (10 mg, 0.08 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 18 horas. La solución resultante se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó por HPLC sobre una columna C18 usando un gradiente de 30% de acetonitrilo, 70% de agua a 100% de acetonitrilo (0.1% de ácido fórmico) para dar el morfolinoetil éster como una goma incolora (111 mg, 32%). LCMS (*m/z*) [M+H] 872.1.

Hidrogenólisis. Una solución del monoéster anterior (111 mg, 0.127 mmol) en tetrahidrofurano (3 mL) se agregó una

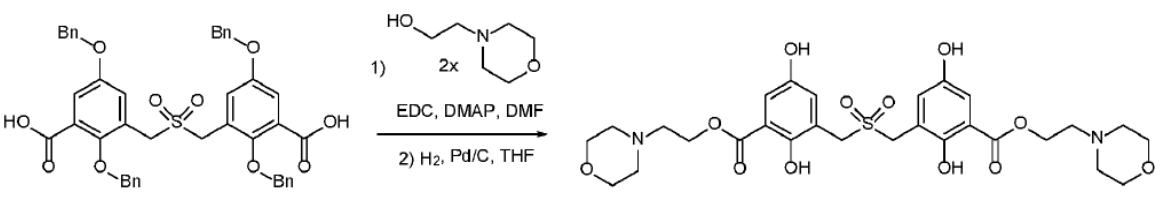
suspensión agitada de 10% de paladio sobre carbono (20 mg, 0.019 mmol) en agua (1 mL). La mezcla de reacción agitada se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno por 18 horas.

La reacción se filtró para remover el catalizador y la solución se evaporó para dar un sólido marrón. El sólido se purificó por HPLC sobre una columna C18 usando un gradiente de 10% de acetonitrilo, 90% de agua a 60% de acetonitrilo, 40% de agua (0.1% de ácido fórmico) para dar un sólido blanco (20.5 mg). El sólido se trituró con dietil éter y se secó bajo vacío para dar el producto del título **IVc-059a-mpe1** como un sólido blanco (5 mg, 8%).

^{1}H RMN (DMSO-d_6 ppm) δ 10.33 (s amplio, 1H), 9.30 (s, 1H) 8.92 (s, 1H), 7.08 - 7.15 (m, 3H), 6.91 (d, J = 3.1Hz, 1H), 4.40 (t, J = 5.0Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.65 - 3.72 (m, 4H), 3.05 (t, J = 5.0Hz, 2H), 2.78 - 2.87 (m, 4H). LCMS (m/z) [M+H] 511.9.

Biodatos: estable hasta 60 min. en plasma de ratón.

2) 2-morfolinoetil éster de ácido 2,5-dihidroxi-3-[[2,5-hidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil]metilsulfonilmetil]benzoico (IVc-059a-mpe2)



Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil]benzoico (69 mg, 0.091 mmol) y 2-morfolinoetanol (25 mg, 0.19 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 mL) y se agregaron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (42 mg, 0.48 mmol) y N,N-dimetilpiridin-4-amina (5 mg, 0.04 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 18 horas. La solución resultante se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía sobre una columna de sílice usando 10% de metanol, 90% de diclorometano para dar el producto del título como una goma incolora (58 mg, 65%). LCMS (*m/z*) [M+H] 985.0.

Se preparó una solución del diéster obtenido anteriormente (58 mg, 0.059 mmol) en tetrahidrofurano (1.5 mL) y se agregó a una suspensión agitada de 10% de paladio sobre carbono (5 mg, 0.005 mmol) en agua (0.5 mL). La mezcla de reacción agitada se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno por 18 horas. La reacción se filtró para remover el catalizador y la solución se evaporó para dar un sólido marrón. El sólido se purificó por HPLC sobre una columna C18 usando un gradiente de 10% de acetonitrilo, 90% de agua a 60% de acetonitrilo, 40% de agua (0.1% de ácido fórmico) para dar un sólido blanco (13.7 mg).

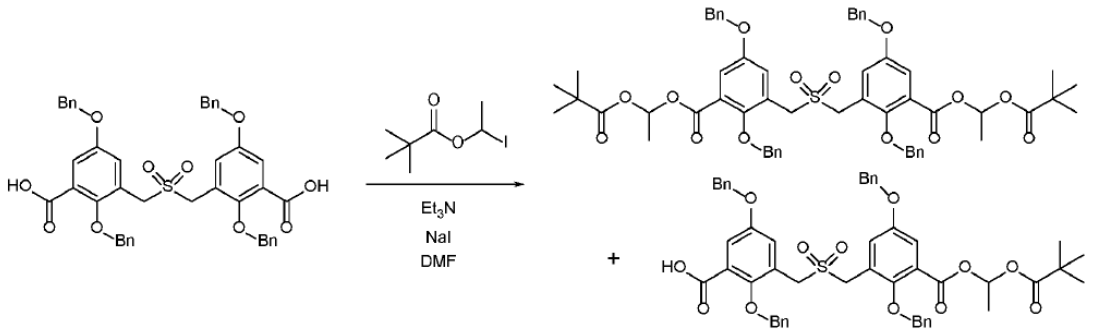
El sólido se trituró con dietil éter y se secó bajo vacío para dar el producto del título **IVc-059a-mpe2** como un

sólido blanco (9.1 mg, 25%).

^{1}H RMN (CD_3OD ppm) δ 8.34 (s amplio, 2H), 7.32 (d, *J* = 3.1Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 3.1Hz, 2H), 4.52 (t, *J* = 5.5Hz, 4H), 4.45 (s, 4H), 3.68 - 3.73 (m, 8H), 2.83 (t, *J* = 5.5Hz, 4H), 2.58 - 2.65 (m, 8H). LCMS (*m/z*) [M+H] 625.0.

Biodatos: estable hasta 60 min. en plasma de ratón; $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 min.

3) 1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etil éster de ácido 3-[[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-2,5-dihidroxi-fenil]metilsulfonilmetil]-2,5-dihidroxibenzoico (IVc-059a-pive2)

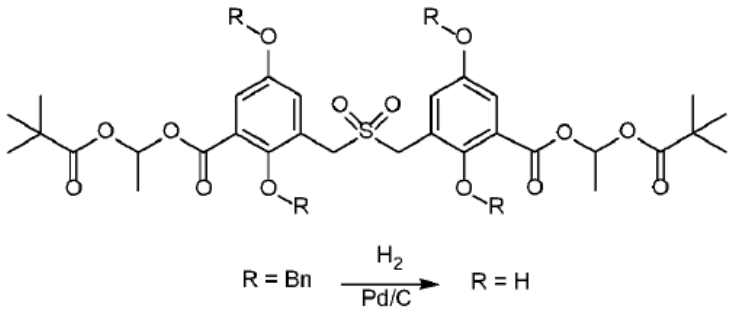


Esterificación. Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxi-fenil)metilsulfonilmetil]benzoico (200 mg, 0.263 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (5 mL) y se agregaron trietilamina (88 µL, 0.63 mmol), yoduro de sodio (8 mg, 0.053 mmol) y 2,2-dimetilpropanoato de 1-yodoetilo crudo (aproximadamente 4.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 18 horas. La solución resultante se

evaporó hasta un volumen pequeño y el residuo se repartió entre diclorometano y solución de tiosulfato de sodio. La capa orgánica se filtró a través de una frita hidrofóbica y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía sobre una columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 100% de iso-hexano a 50:50 acetato de etilo/iso-hexano para dar el diéster como una goma incolora (110 mg, 41%). LCMS (*m/z*) [M+Na] 1037.0.

También se aisló el monoéster de la misma columna como una goma incolora (90 mg, 40%). LCMS (*m/z*) [M+Na] 909.6.

Hidrogenólisis:



Se agregó una solución del diéster aislado anteriormente (110 mg, 0.108 mmol) en tetrahidrofurano (3 mL) a una suspensión agitada de 10% de paladio sobre carbono (20 mg, 0.02 mmol) en agua (1 mL). La mezcla de reacción agitada se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno por 48 horas. La mezcla de reacción se filtró para remover el catalizador, la solución se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía sobre una columna de sílice eluyendo con un

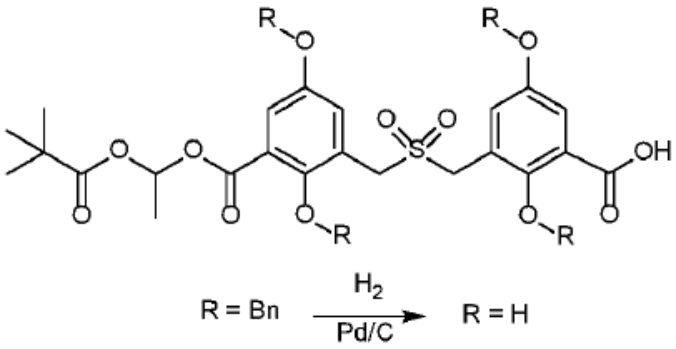
gradiente de 100% de diclorometano a 10% de metanol, 90% de diclorometano para dar el producto del título **IVc-059a-pive2** como un sólido crema (55 mg, 78%).

^{1}H RMN ($CDCl_3$ ppm) δ 10.55 (s, 2H), 7.24 - 7.28 (m, 2H), 7.14 - 7.18 (m, 2H), 7.05 (c, *J* = 5.4Hz, 2H), 6.18 (s amplio, 2H), 4.30 - 4.50 (m, 4H), 1.60 (d, *J* = 5.4Hz, 6H), 1.21 (s, 18H). LCMS (*m/z*) [M-H] 653.9.

Biodatos: hidrolizado rápidamente en plasma de ratón y humano.

4) Ácido 3-[[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-2,5-dihidroxi-fenil]metilsulfonilmetil]-2,5-dihidroxibenzoico (IVc-059a-pive1)

Hidrogenólisis:



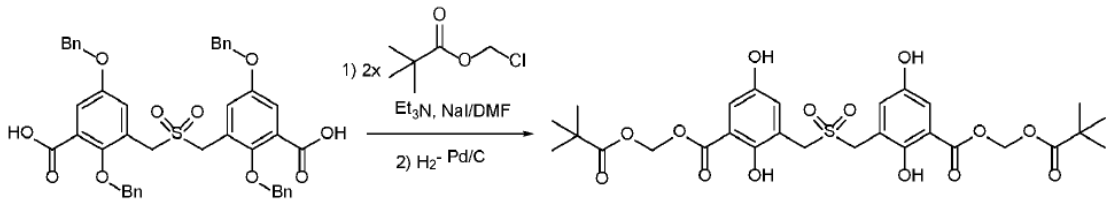
Se agregó una solución del monoéster aislado anteriormente (90 mg, 0.104 mmol) en tetrahidrofurano (3 mL) a una suspensión agitada de 10% de paladio sobre carbono (20 mg, 0.02 mmol) en agua (1 mL). La mezcla de reacción agitada

se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno por 48 horas. La reacción se filtró para remover el catalizador, la solución se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía sobre una columna de sílice eluyendo con un gradiente de 100% de diclorometano a 20% de metanol, 80% de diclorometano para dar el producto del título **IVc-059a-pive1** como un sólido crema (22.5 mg, 43%).

^{1}H RMN (CD_3OD ppm) δ 7.39 (d, *J* = 3.1Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 3.1Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 3.1Hz, 1H), 7.05 (c, *J* = 5 4Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 3.1Hz, 1H), 4.40 - 4.45 (m, 4H), 1.61 (d, *J* = 5.4Hz, 3H), 1.21 (s, 9H). LCMS (*m/z*) [M-H] 524.9.

Biodatos: hidrolizado rápidamente en plasma de ratón.

5) 2,5-dihidroxi-3-[[2,5-dihidroxi-3-(2,2-dimetilpropanoiloximetoxicarbonil)fenil]metilsulfonilmetil] benzoato de 2,2-dimetilpropanoiloximetilo (IVc-059a-pivm2)



Esterificación. Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxi-fenil)metilsulfonilmetil]benzoico (100 mg, 0.131 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (1 mL) y se agregó clorometil 2,2-dimetilpropanoato (91 µL. 0.631 mmol) seguido por

trietilamina (110 µL, 0.789 mmol) y yoduro de sodio (87 mg, 0.579 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50°C por 6.5 horas. La solución resultante se evaporó y el residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía sobre una columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 100% de iso-hexano a 50% acetato de etilo, 50% de iso-hexano para dar el producto de diéster como una goma incolora (85 mg, 66%). LCMS (*m/z*) [M+Na] 1010.0.

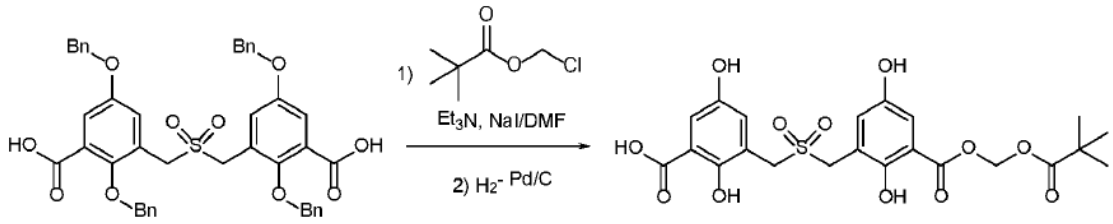
Hidrogenólisis: Se agregó una solución del diéster obtenido anteriormente (85 mg, 0.086 mmol) en tetrahidrofurano (3 mL) a una suspensión agitada de 10% de paladio sobre carbono (20 mg, 0.02 mmol) en agua (1 mL). La mezcla de reacción agitada se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno por 18 horas. La reacción se filtró para remover el catalizador, la solución se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía sobre una columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 100% de iso-hexano a 60% de acetato de etilo, 40% de iso-hexano para dar el diéster **IVc-059a-pivm2** como un sólido blanco (31 mg, 57%).

^{1}H RMN ($CDCl_3$ ppm) δ 7.29 (d, *J* = 2.9Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 2.9Hz, 2H), 5.97 (s, 4H), 4.42 (s, 4H), 1.22 (s, 18H). LCMS (*m/z*) [M-H] 624.8.

Biodatos: hidrolizado rápidamente en plasma de

ratón, $T_{1/2}$ = 14.1 min.; $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 min.

6) Ácido 2,5-dihidroxi-3-[[2,5-dihidroxi-3-(2,2-dimetilpropanoiloximetoxicarbonil)fenil]metil-sulfonilmetil]benzoico (IVc-059a-pivm1)



Esterificación: Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil]benzoico (300 mg, 0.395 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (3 mL) y se agregó clorometil 2,2-dimetilpropanoato (57 µL, 0.395 mmol) seguido por trietilamina (68 µL, 0.489 mmol) y yoduro de sodio (129 mg, 0.870 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50°C por 4 horas. La solución resultante se enfrió y entonces se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía sobre una columna de sílice eluyendo con un gradiente de 20% de acetato de etilo, 80% de iso-hexano a 80% de acetato de etilo, 20% de iso-hexano para dar el producto del monoéster como un sólido blanco (121 mg, 35%). LCMS (*m/z*) [M-H] 871.0.

Hidrogenólisis: Se agregó una solución de monoéster obtenido anteriormente (121 mg, 0.138 mmol) en tetrahidrofurano (3 mL) a una suspensión agitada de 10% de paladio sobre carbono (20 mg, 0.02 mmol) en agua (1 mL). La

mezcla de reacción agitada se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno por 48 horas. La reacción se filtró para remover el catalizador, la solución se evaporó y el residuo se purificó por HPLC sobre una columna C18 eluyendo con un gradiente de 30% de acetonitrilo, 70% de agua a 100% de acetonitrilo (0.1% de ácido fórmico) para dar el monoéster **IVc-059a-pivm1** como un sólido blanco (30 mg, 42%).

^{1}H RMN (CD_3OD ppm) δ 7.34 (d, J = 3.0Hz, 1H), 7.27 (d, J = 3.1Hz, 1H), 7.20 (d, J = 3.1Hz, 1H), 7.08 (d, J = 3.0Hz, 1H), 6.01 (s, 2H), 4.45 (s, 4H), 1.22 (s, 9H). LCMS (m/z) [M-H] 510.9.

Biodatos: hidrolizado rápidamente en plasma de ratón, $T_{1/2}$ = 6.7 min.; $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 min.

EJEMPLO 2: Métodos Experimentales Generales

Espectroscopía de RMN

Los espectros de ^{1}H RMN se registraron a 400 MHz en un espectrómetro Bruker Advance III RMN. Las muestras se prepararon en cloroformo deuterado ($CDCl_3$) o dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) y los datos sin procesar se procesaron usando el software Mnova NMR. Los espectros de masas de alta resolución se registraron con un espectrómetro de masas de resolución ultra alta MaXis ESI qTOF

Análisis de UPLC-MS

El análisis de UPLC-MS se llevó a cabo en un sistema Waters Acquity UPLC que consiste de un Acquity I-

Class Sample Manager-FL, Acquity I-Class Binary Solvent Manager y Acquity I-Class UPFC Column Manager. La detección de UV se efectuó usando un detector Acquity I-Class UPFC PDA (barrido de 210-400 nm), mientras que la detección de masas se logró usando un detector Acquity QDa (barrido de masas de 100-1250 Da; modos positivo y negativo simultáneamente). Se usó una columna Waters Acquity UPFC BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 mm) para lograr la separación de los analitos.

Las muestras se prepararon disolviendo (con o sin sonicación) en 1 mL de una mezcla 1:1 (v/v) de MeCN en H_2O. Las soluciones resultantes se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0.45 µm antes de someterse a análisis. Todos los solventes (incluyendo el ácido fórmico funcionalizado y solución de amoníaco al 36%) usadas se usaron como grado HPFC.

Se usaron cuatro métodos analíticos diferentes para este trabajo, los detalles de los cuales se presentan más abajo. *Ensayo ácido (2 min)*: 0.1% v/v de Ácido Fórmico en agua [Eluyente A]; 0.1% v/v de Ácido Fórmico en MeCN [Eluyente B]; Velocidad de flujo de 0.8 mL/min; volumen de inyección de 2 µL y tiempo de equilibrio de 1.5 minutos entre muestras.

Tabla 14:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0.00	95	5
0.25	95	5

1.25	5	95
1.55	5	95
1.65	95	5
2.00	95	5

Ensayo ácido (4 min): 0.1% v/v de Ácido fórmico en agua [Eluyente A]; 0.1% v/v de Ácido fórmico en MeCN [Eluyente B]; Velocidad de flujo de 0.8 mL/min; volumen de inyección de 2 µL y tiempo de equilibrio de 1.5 minutos entre muestras.

Tabla 15:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0.00	95	5
0.25	95	5
2.75	5	95
3.25	5	95
3.35	95	5
4.00	95	5

Ensayo ácido (6.5 min): formiato de amonio 10 mM + 0.1% v/v de Ácido fórmico [Eluyente A]; 0.1% v/v de Ácido fórmico en MeCN [Eluyente B]; Velocidad de flujo de 0.6 mL/min; volumen de inyección de 2 µL.

Tabla 16:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0.00	95	5
0.50	95	5
4.00	5	95
4.50	5	95
4.52	95	5

6.50	95	5

Ensayo básico (2 min): 0.1% de amoniaco en agua [Eluyente A]; 0.1% de amoniaco en MeCN [Eluyente B]; Velocidad de flujo de 0.8 mL/min; volumen de inyección de 2 µL y tiempo de equilibrio de 1.5 minutos entre muestras.

Tabla 17:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0.00	95	5
0.25	95	5
1.25	5	95
1.55	5	95
1.65	95	5
2.00	95	5

Ensayo básico (4 min): 0.1% de amoniaco en agua [Eluyente A]; 0.1% de amoniaco en MeCN [Eluyente B]; Velocidad de flujo de 0.8 mL/min; volumen de inyección de 2 µL y tiempo de equilibrio de 1.5 minutos entre muestras.

Tabla 18:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0.00	95	5
0.25	95	5
2.75	5	95
3.25	5	95
3.35	95	5
4.00	95	5

Ensayo básico (6.5 min): bicarbonato de amonio a 10 mM + 0.1% v/v 35% de solución de amoniaco [Eluyente A]; 0.1%

v/v de ácido fórmico en MeCN [Eluyente B]; Velocidad de flujo de 0.6 mL/min; volumen de inyección de 2 µL.

Tabla 19:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0.00	95	5
0.50	95	5
4.00	5	95
4.50	5	95
4.52	95	5
6.50	95	5

Purificación por HPLC preparativa

La HPLC preparativa se efectuó usando el sistema de autopurificación de Waters con columna XBridge Prep C18 (19 x 150 mm). El sistema Waters consistía de un Waters 2545 Binary Prep Pump, un Waters 2767 Sample Manedadr, un Waters SFO Column Organiser, un Waters 2998 DAD, un Waters 515 Make up Pump y un espectrómetro de masas Acquity QDa

El sistema de purificación fue controlado por el software MassLynx (versión 4.2) con módulo de Inicio de Sesión de Acceso Abierto.

Las fases móviles consistieron de (A) Formato de Amonio a 10 mM (+ 0.1% v/v de ácido fórmico) y (B) acetonitrilo (+ 0.1% v/v de ácido fórmico).

Las muestras se prepararon disolviendo en 10% v/v de agua en DMSO para dar una concentración de ~150 mg/mL. Se cargó un volumen de 320 mL de la muestra preparada sobre la

columna y se purificó usando gradiente de elución a temperatura ambiente con una velocidad de flujo de 25 mL/min. Hubo un equilibrio de 1.5 minutos entre inyecciones.

Tabla 20: Gradiente:

Tiempo (min)	% (A)
0.0	95
0.5	95
14.5	0
17.4	0
17.5	95
18.0	95

EJEMPLO 3: Métodos de Detección *In Vitro*

Ejemplo 3.1: Método de inhibición *in vitro* de FGF1, FGF2 y VEGF-A en Células HUVEC

El objetivo de este método *in vitro* es evaluar los efectos de compuestos sobre el brote de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) inducido por FGF-2, FGF-1 o VEGF-A en el ensayo de angiogénesis celular basado en esferoides. Antes de agregar los factores del crecimiento a las células, se preincubaron con el compuesto. El sunitinib se probó como control (sin preincubación).

El control con sunitinib inhibió el brote de HUVEC inducido por FGF-2, FGF-1 y VEGF-A como se esperaba. Los valores de CI_{50} determinados para los compuestos probados se expresan en micro M [µM] y los valores para la inhibición del crecimiento (brote) inducido por FGF-1, FGF2 y VEGF-A se

listan después de cada compuesto en los ejemplos después de la caracterización química.

La prueba de brote se efectuó en los compuestos disueltos en DMSO para alcanzar soluciones patrón concentradas 100 veces y disueltas en medio de cultivo. El sunitinib como compuesto de referencia fue proporcionado por ProQinase GmbH. Los factores del crecimiento se compraron de rhFGF básico (FGF-2), Peprotech, New Jersey, USA, # 100-18C, Lote # 0415571; rhFGF ácido (FGF-1), Peprotech, New Jersey, USA, #100-17A, Lote # 031207; hVEGF-A165 (ProQinase GmbH, Freiburg, Alemania; 05.02.2010) se usaron para la estimulación del crecimiento de células HUVEC.

Sistema de prueba: Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) reunidas de donadores se almacenaron congeladas con 70% de medio, 20% de FCS, 10% de DMSO a aproximadamente 1 x 10^6 células/ampolleta. Se usaron células HUVEC, células endoteliales primarias de vena umbilical humana (PromoCell, Heidelberg, Alemania), después de 3 a 4 pases. La morfología de las células son adherentes, crecen como guijarros con una monocapa y se cultivaron en medio de crecimiento o basal de células endoteliales (ECGM /ECBM, PromoCell). El subcultivo se dividió 1:3; cada 3-5 días, se sembró a aproximadamente 1 x 10^4 células/cm^2 y se incubó a 37°C con 5% de CO_2 con un tiempo duplicado de 24-48 horas

Dilución de los compuestos de prueba: Se prepararon

soluciones concentradas 100x (en lo concerniente a las concentraciones de ensayo finales) de cada compuesto de prueba con el solvente apropiado (en DMSO o en agua). Esas soluciones de compuesto 100x se diluyeron adicionalmente en medio de crecimiento y basal y de células endoteliales (ECBM) 1:7.5 para obtener una solución concentrada 13.33x. Posteriormente se mezclaron 75 µL de la solución 13.33x con 25 µL de estímulo concentrado 40x (disuelto en ECBM), resultando en una mezcla de estímulo/compuesto concentrado 10x. Esta mezcla (100 µL) se incubó por 30 min. a 37°C y entonces se agregó a 900 µL de gel, que contenía los esferoides de HUVEC (resultando en la concentración de ensayo final).

Método de prueba: los experimentos fueron una modificación del protocolo publicado originalmente (Korff and Augustin: *J* Cell Sci 112: 3249-58, 1999). De manera breve, los esferoides se prepararon de acuerdo a lo descrito (Korff and Augustin: *J* Cell Biol 143: 1341-52, 1998) pipeteando 400 HUVEC en un goteo colgante sobre discos de plástico para permitir la agregación de esferoides durante la noche. Entonces se sembraron 50 esferoides de HUVEC en 0.9 mL de gel de colágeno y se pipetearon en pozos individuales de una placa de 24 pozos para permitir la polimerización. Los compuestos de prueba se preincubaron con factores de crecimiento (concentración final de FGF-1, FGF-2 o VEGF-A de

25 ng/mL) en una solución concentrada 10 veces y posteriormente, se agregaron 100 µL de esta solución en la parte superior del gel polimerizado. Todos los compuestos se diluyeron en solvente (DMSO o agua) como patrones 100x (lo cual significa que se prepararon patrones 100x de cada concentración de ensayo final en solvente). Posteriormente, esos patrones se diluyeron adicionalmente en medio (resultando en los patrones 13.33x de cada concentración ensayo final) con las concentraciones finales probadas: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 y 1.56 x 10^{-6} M). Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas y se fijaron agregando PFA al 4% (Roth, Karlsruhe, Alemania).

Cuantificación de la inhibición del factor del crecimiento: La intensidad del brote de esferoides de HUVEC tratados con el factor del crecimiento y los inhibidores se cuantificaron por medio de un sistema de análisis de imágenes que determina la longitud acumulativa de brote por esferoides (CSL). Las imágenes de esferoides individuales se tomaron usando un microscopio invertido y el software de imágenes digitales NIS-Elements BR 3.0 (Nikon). Posteriormente, las imágenes de los esferoides se cargaron a la página principal de la compañía Wimasis para el análisis de las imágenes. La longitud acumulativa de brote de cada esferoide se determinó usando la herramienta de análisis de imágenes WimSprout. Se analizó la media de la longitud acumulativa de brote de 10

esferoides seleccionados aleatoriamente como un punto de datos individual. Para la determinación de la CI_{50}, los datos sin procesar se convirtieron en porcentaje de brotes de HUVEC con relación al control con solvente (que contiene el estímulo), que se ajustó a 100% y el control basal (sin estimulación), que se fijó en 0%. Los valores de CI_{50} se determinaron usando el software GraphPad Prism 5 con la restricción de inferior a 0 y superior a 100 usando un ajuste de curva de regresión no lineal con pendiente variable de la cuesta.

Resultados: Se evaluó la relación de respuesta a la dosis sobre el brote de células endoteliales inducido por factor del crecimiento para todos los compuestos. Los valores de CI_{50} se determinaron usando parámetros estándar sobre la base de la señal del control con solvente como restricción superior (brote del 100% de HUVEC) y la señal del control basal como restricción inferior (0%). Los valores de CI_{50} respectivos para cada compuesto sobre FGF1, FGF2 y VEGFA se resumieron debajo de cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo BIODATOS.

Ejemplo 3.2: Método de adhesión de neutrófilos *in vitro* bajo condiciones estáticas

Los neutrófilos humanos obtenidos de capas leucocitarias de donadores sanos se suspendieron a 3 x 10^6/mL en amortiguador de adhesión (PBS que contenía 1 mM de

$CaCl_2/MgCl_2$ y 10% FCS, pH 7.2). Los neutrófilos se preincubaron por 30 min. a 37°C con 40 µM y 80 µM de los compuestos.

Los ensayos de adhesión se efectuaron en portaobjetos de vidrio de 18 pozos recubiertos por 18 h a 4°C con fibrinógeno humano (20 µg/pozo en PBS sin endotoxina); se agregaron 20 µL de suspensión celular a cada pozo y se estimuló por 1 min. a 37°C con 5 µL de fMLP a una concentración final de 1 nM. Después de lavar, las células adherentes se fijaron en glutaraldehído al 1.5% en PBS y se contaron por enumeración auxiliada por computadora. El análisis estadístico se efectuó calculando la media y la desviación estándar (DE); la importancia se calculó por la prueba de no apareada. Todos los análisis estadísticos se efectuaron usando el GraphPad Prism 6 (Software GraphPad).

La inhibición respectiva de la adhesión neutrófilos expresada en [%] para cada compuesto se resumió bajo cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo de BIODATOS.

Ejemplo 3.3: Prueba *in vitro* sobre la inhibición de la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) en neutrófilos humanos

La NADPH oxidasa, localizada en la membrana plasmática y en las membranas de gránulos específicos, produce aniones de superóxido de otros ROS, como peróxido de

hidrógeno, oxígeno singulete, hipoclorito y radicales hidroxilo activos. Los ROS se liberan hacia el medio circundante o en un organelo subcelular encerrado por la membrana. Un método rápido y sensible para medir la generación de esos metabolitos es la quimioluminiscencia (CL). La técnica de CL amplificada por isoluminol, es muy sensible y ampliamente usada para estudiar las ráfagas respiratorias (principalmente producción extracelular de ROS) inducida en los neutrófilos.

Los neutrófilos humanos se aislaron de capas leucocitarias que se obtuvieron de donadores sanos. Los neutrófilos aislados (3 X 10^6/mL) se suspendieron en Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS) con Calcio y Magnesio. Los neutrófilos se preincubaron con los compuestos a diferentes concentraciones (0.1, 0.3, 1, 3 y 10 µM) por 30 min. a 37°C. Las placas de cultivo celular negras de 96 pozos se recubrieron con fibrinógeno humano (0.25 mg/mL en PBS) y se incubaron durante la noche a 4°C o 2 hr a 37°C. Entonces, las placas se lavaron con PBS sin endotoxina. Los neutrófilos se incubaron (cebaron) con TNF-α (20 ng/mL) por 10 minutos a 37°C. Después de eso se agregaron 75 µL de suspensión celular y 75 µL de (solución de Isoluminol + HRP) a cada pozo. La quimioluminiscencia se registró (cada 25 seg. por 250 seg.) después de la activación con fMLP (1 µM) usando un Multilabel Reader victor3 (Perkin Elmer, EE.UU.). Los valores de fondo,

definidos como los valores medios de la quimioluminiscencia del isoluminol diluido en HBSS, se sustrajeron de todas las lecturas (CPS, conteos por segundo). Los ensayos se efectuaron por duplicado o triplicado.

Los resultados obtenidos del ensayo de CL amplificado con isoluminol revelaron que los compuestos redujeron fuertemente el nivel de ROS en una forma dependiente de la concentración en PMN estimuladas con fMLP + TNF-α.

La inhibición de ROS de PMN a 0.3 µM expresada en [%] y la CI_{50} de [µM] se resumieron bajo cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo de BIODATOS.

Ejemplo 3.4: Método de producción *in vitro* de citocina inflamatoria de neutrófilos humanos y monocitos humanos

Los neutrófilos y monocitos se aislaron de capas leucocitarias de donadores sanos, bajo condiciones libres de endotoxina. De manera breve, las capas leucocitarias se estratificaron sobre gradiente de Ficoll-Paque PLUS y entonces se centrifugaron a 400 x g por 30 min. a temperatura ambiente. Entonces, se recolectaron los neutrófilos y se sometieron a sedimentación con dextran seguida por lisis hipotónica para remover los eritrocitos. Los monocitos se aislaron en su lugar de PBMC, después de la centrifugación sobre gradientes de Percoll. Los neutrófilos y monocitos

humanos se suspendieron a 5 x 10^6/mL y 2.5 x 10^6/mL, respectivamente, en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS bajo en endotoxina al (< 0.5 EU/mL; de BioWhittaker-Lonza, Basilea, Suiza) y entonces se revistieron en placas de cultivo tisular de 24 pozos a 37°C, atmósfera de 5% de CO_2, en presencia o ausencia de concentraciones diferentes (20-40 µM) de los compuestos. Después de 1 h de tratamiento con los fármacos, los monocitos se estimularon con 0.1 µg/mL, mientras que los neutrófilos con 1 µg/mL de LPS ultrapuros de la cepa de *E. coli* 0111:B4 (InvivoGen). Después de 6 h de estimulación con LPS, los neutrófilos y monocitos se recolectaron y centrifugaron a 300 x g por 5 min. Los sobrenadantes libres de células se congelaron inmediatamente a -80°C.

Las concentraciones de citocinas en sobrenadantes libres de células se midieron por equipos de ELISA disponibles comercialmente, específicos para humanos: CXCL8, IL-6, TNF-α (Mabtech, Suecia). Los límites de detección de esos ELISA fueron: 4 pg/mL para CXCL8, 10 pg/mL para IL-6 y 4 pg/mL para TNF-α.

El análisis estadístico se efectuó calculando la media y la desviación estándar (DE); la importancia se calculó por la prueba t no apareada. Todos los análisis estadísticos se efectuaron usando el GraphPad Prism 6 (Software GraphPad).

Los valores de citocinas se expresaron en ng/mL para cada compuesto y se resumen para cada compuesto más abajo su caracterización química en el párrafo de BIODATOS.

Ejemplo 3.5: Método de inhibición *in vitro* por compuestos de fosforilación inducida por VEGF-165 del Receptor de VEGF sobre células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) primarias

Cultivo celular: Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) primarias se cultivaron de manera rutinaria en matraces o discos prerrecubiertos con gelatina al 0.1%, después del pase 6. El efecto de los compuestos solo a concentraciones diferentes (0, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µM) sobre la viabilidad celular se evaluó por medio del equipo CCK-8 usando un Tecan Microplate Reader (Genios). Para medir el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular inducida por VEGF, las HUVEC (1 x 10^4 células/pozos) se trataron con VEGF (25 ng/mL) premezclado con varias concentraciones de compuestos (0, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µM) en medio de cultivo sin suero y factores del crecimiento (medio de inanición) por 24 h y 48 h. Los compuestos en este intervalo de concentración no afectaron la viabilidad celular.

Los anticuerpos primarios de conejo para VEGFR-2, p-Tyr1175 se adquirieron de Cell Signaling Technology (Leiden, Los Países Bajos). El Equipo de ELISA de Emparedado

Phosfo-VEGFR-2 (Tyr1175) fue de Cell Signaling Technology.

Las HUVEC se preincubaron con compuestos a 0, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µM por 60 min. con tres pasos de lavado subsecuentes con medio tibio antes de la estimulación con VEGF 165 (25 ng/mL) por 2 min. El análisis Wéstern blot se efectuó usando anticuerpo anti-fosfo-VEGFR-2 y se usó VEGFR-2 total como un control de carga después de la separación en membrana.

Los resultados de la inhibición de la fosforilación de VEGFR-2 se expresaron como CI_{50} en micro M [µM] contra control de HUVEC tratadas con VEGF sin compuesto inhibidor.

La CI_{50} respectiva expresada en valores de [µM] para cada compuesto se resume debajo de cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo de BIODATOS.

Ejemplo 3.6: Inhibición de la liberación de citocina *in vitro* por compuestos después de la inducción por LPS sobre sangre completa humana

El objetivo de este método *in vitro* es evaluar los efectos de los compuestos sobre la liberación de un panel de citocinas de sangre completa de reacción inflamatoria inducida por lipopolisacárido (LPS). La sangre completa se incubó con compuestos por 1 h antes de la inducción por LPS. Los niveles de citocina en sangre se midieron usando un panel múltiple basado en FACS.

Se listaron los valores de CI_{50} determinados para

los compuestos de prueba expresados en micro M [µM] y los valores para la inhibición de citocinas para cada compuesto.

El efecto de la liberación de citocinas después de la inducción por LPS se efectuó en los compuestos disueltos en DMSO o H_2O para alcanzar soluciones patrón concentradas 10 veces y disueltos en medios de cultivo.

Sistema de prueba: Se removió la sangre completa de un solo donador (en tubos recubiertos con litio heparina; BD Vacutainer; 367886) y se diluyó 1:5 con RPMI 1640 (Thermo Fisher, 61870036). Dentro del muestreo de 30 minutos, la sangre se incubó con los compuestos por 1 h antes de la estimulación por LPS (0111:B4-Sigma L4391; concentración final de 10 ng/mL). La estimulación continuó bajo condiciones de cultivo celular estándar (37°C con 5% de CO_2) durante la noche (18 h), después de lo cual las placas se centrifugaron y el sobrenadante se removió y congeló a -80°C hasta usarse para los análisis.

Dilución de los compuestos de prueba: Se prepararon soluciones concentradas 10x (en lo concerniente a las concentraciones de ensayo finales) de cada compuesto de prueba con el solvente apropiado (en DMSO o en agua). Estas soluciones de compuesta de 10x (10 µL) se agregaron entonces a 90 µL de sangre completa prediluida (sangre completa: RPMI 1640, 1:5) resultado en la concentración de ensayo final.

Método de prueba: La sangre completa diluida (80

µL) se preincubó con los compuestos (10 µL) para dar las concentraciones de ensayo finales de 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 y 0.1 x 10^{-6} M. La sangre se incubó a 37°C con 5% de CO_2 por 1 h. El LPS se diluyó en medios de cultivo celular hasta una concentración de 110 ng/mL; se agregaron 10 µL a la sangre completa para dar una concentración final de 10 ng/mL. Las placas se incubaron a 37°C por 18 h. Las placas se centrifugaron a 3,000 RPM por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se removió y congeló a -80°C hasta que se llevó a cabo el análisis por FACS.

La liberación de citocinas se midió usando un sistema múltiple adaptado (ELISA Genie) según las instrucciones del fabricante. Las muestras preparadas se ensayaron en un citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher).

Cuantificación de la inhibición de la liberación de citocina: se ensayaron estándares de concentración conocida como parte del panel de citocina para permitir la cuantificación de cada concentración de citocina en cada muestra. Esto se llevó a cabo usando el software FCAP Array v3.0. Para la determinación de la CI_{50}, los datos sin procesar se convirtieron en concentración en porcentaje con relación al control con solvente, el cual se fijó en 100%. Los valores de CI_{50} se determinaron usando el software GraphPad Prism 8 con la restricción de inferior a 0 y superior a 100 usando un

ajuste de curva de regresión no lineal con pendiente de cuesta variable.

Resultados: Se evaluó la relación de la respuesta a la dosis sobre la liberación de citocinas después de la respuesta inflamatoria por inducción con LPS en sangre completa para todos los compuestos. Se determinaron los valores de CI_{50} de cada compuesto para un panel de citocinas (GM-CSF, IFN-gamma, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-21, IL-22, IL-33, TGF-beta, TNF-alfa, TNF-beta). Las CI_{50} de las citocinas respectivas expresadas en valores de [µM] para cada compuesto se resumieron debajo de cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo de BIODATOS y también en la Tabla 13.

EJEMPLO 4: Formulaciones de Compuestos

Ejemplo 4.1: Formulaciones Orales del compuesto Ic-007a

Se desarrollaron cinco formulaciones y se revisaron por su idoneidad. Esas fueron ambas suspensiones y soluciones cuyos detalles se proporcionan en la siguiente Tabla.

Tabla 21: Detalles de formulación para la suspensión y soluciones del compuesto Ic-007a

	Suspensión A	**Solución D**	**Solución A**	**Solución B**	**Solución C**
Componente	Cantidad (%)				

API	1% p/v (10 mg/mL)	0.1% p/v (1 mg/mL)	1% p/v (10 mg/mL)	1% p/v (10 mg/mL)	1% p/v (10 mg/mL)
DMSO	5% v/v	5% v/v	5% v/v	5% v/v	5% v/v
PEG 400	10% v/v	10% v/v	10% v/v	10% v/v	10% v/v
Solutol HS15	10% p/v	10% p/v	10% p/v	10% p/v	10% p/v
Hidróxido de Sodio 1 M	n/a	n/a	Hasta pH 6	Hasta pH 8	Hasta pH 9
Agua	hasta 100%	hasta 100%	hasta 100%	hasta 100%	hasta 100%

Preparación: Suspensión A y Solución D:

Método ejemplar para 100 mL (escalar según sea apropiado para el volumen final requerido). La solución patrón se preparó midiéndose 5 mL de DMSO en un recipiente limpio. Se pesó la cantidad correcta de compuesto Ic-007a y se agregó gradualmente la solución de DMSO con mezclado en un agitador, vórtice o sonicador. El Solutol se fundió en un baño de agua a 60°C en un recipiente limpio y seco. Puesto que el Solutol solidifica a temperatura ambiente, el Solutol fundido se mantuvo en un baño de agua a 60°C durante la preparación de la formulación. Se agregaron 10 g (10% p/v) de Solutol fundido en un recipiente caliente marcado de manera adecuada (hasta el volumen final de 100 mL). Se agregaron 10 mL de PEG 400 al Solutol en el recipiente de 100 mL caliente. La solución patrón de fármaco en DMSO se agregó a la mezcla de Solutol y PEG400 y el contenido se mezcló instantáneamente y se agregaron 35 mL de agua desionizada y se mezcló en un baño a 40°C con agitación intermitente para disolver las

partículas grandes. La formulación se enfrió a temperatura ambiente y se llevó hasta un volumen final de 100 mL con agua desionizada.

Preparación de las Soluciones A, B y C:

Método ejemplar para 100 mL (escalar según sea apropiado para el volumen final requerido). Se preparó una solución patrón de solvente midiendo 5 mL de DMSO en un recipiente limpio. Se pesó 1 g de compuesto Ic-007a y se agregó gradualmente a la solución de DMSO mezclando en un agitador, vórtice o sonicador si se requiere). El Solutol se fundió en un baño de agua a 60°C en un recipiente limpio y seco. Puesto que el Solutol solidifica a temperatura ambiente, el Solutol fundido se mantuvo en un baño de agua a 60°C durante la preparación de la formulación. Se pesaron 10 g (10% en p/v) de Solutol fundido en un recipiente caliente marcado de manera adecuada (hasta un volumen final de 100 mL). Se agregaron 10 mL de PEG 400 al Solutol en el recipiente de 100 mL caliente. La solución patrón de fármaco en DMSO se agregó al recipiente marcado de la mezcla de Solutol y PEG 400 y el contenido se mezcló instantáneamente. Se agregaron 35 mL de agua desionizada y se mezcló el contenido y se colocó en un baño a 40°C con agitación intermitente para disolver las partículas grandes. La formulación se enfrió a temperatura ambiente y se ajustó adicionalmente el pH de la formulación usando solución de

hidróxido de sodio (NaOH) 1 M hasta pH 6, 7, 8 y 9. Las formulaciones iniciales se hicieron a una escala de 1 mL y tenían un pH inicial de 4.3. Se agregó un volumen de 3 µL de NaOH 1 M para alcanzar el pH 6 (Solución A), 22 µL para pH 8 (Solución B) y 43 µL para pH 9 (Solución C). Esas formulaciones se dosificaron inmediatamente después de la preparación.

Se encontró que la formulación en suspensión de 10 mg/mL y la formulación en solución de 1 mg/mL eran físicamente estables durante dos semanas a temperatura ambiente.

Ejemplo 4.2: Formulaciones orales del compuesto Ia-001a-Tz

El compuesto Ia-001a-Tz se preparó como una solución oral de 10 mg/mL en las formulaciones con la composición de vehículo mostrada en la Tabla más abajo.

El vehículo fue un portador o medio inerte usado como solvente (o diluyente) en el cual se formuló y administró el agente medicamente activo.

Tabla 22: Detalles de formulación para la formulación oral de compuestos Ia-001aTz.

Vehículo	Composición
A	40% de PEG400, 10% de Transcutol, 10% de Solutol HS15, 40% de agua tipo1
B	40% de PEG400, 10% de Transcutol, 10% de Solutol HS15, 40% de solución acuosa que comprende 0.5% de HPMC 606
C	40% de PEG400, 10% de Transcutol, 10% de Solutol HS15, 40% de solución acuosa que

	comprende 0.5% de Kollidon VA 64
D	40% de PEG400, 10% de Transcutol, 10% de Cremophor RH40, 40% de agua tipo1
E	40% de PEG400, 10% de Transcutol, 10% de Vitamina E TPGS, 40% de agua tipo1
F	40% de PEG400, 10% de Transcutol, 5%de Solutol HS15, 45% de agua tipo1
G	40% de PEG400, 10% de Transcutol, 5% de Solutol HS15, 45% de solución acuosa que comprende 1% de Kollidon VA 64

Método de preparación

Para preparar una solución de 10 mg/g, se pesaron exactamente 10 mg del compuesto en un frasco y se agregó directamente 1 mL de vehículo en el API y se agitó para dar una solución.

Preparación de los vehículos

Formulación A: se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 mL. Se agregó 1 g de Transcutol y los componentes se mezclaron agitando. A esto, se agregó 1 g de Solutol HS15, seguido por 4 g de agua tipo 1. La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los compuestos.

Formulación B: se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 mL. Se agregó 1 g de Transcutol y los componentes se mezclaron agitando. A esto se agregó 1 g de Solutol HS15. La solución acuosa de HPMC 606 se preparó pesando 50 mg de HPMC 606 en un frasco de vidrio limpio. A esto, se agregaron 9.95 g de agua tipo 1. Los componentes se agitaron por 1 h a

temperatura ambiente para asegurar el mezclado adecuado. Entonces se agregaron 4 g de solución acuosa que comprendía 0.5% de HPMC 606 a la solución de PEG400, Transcutol y Solutol HS15. La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Formulación C: se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 mL. Se agregó 1 g de Transcutol y los componentes se mezclaron agitando. A esto se agregó 1 g de Solutol HS15. Entonces se preparó la solución acuosa de 0.5% de Kollidon VA64 pesando 50 mg de Kollidon VA64 en un frasco de vidrio limpio. A esto, se agregaron 9.95 g de agua tipo 1. Los componentes se agitaron por 1 h a temperatura ambiente para asegurar el mezclado adecuado. Entonces se agregaron 4 g de solución acuosa que comprendía Kollidon VA64 a la solución de PEG400, Transcutol y Solutol HS15. La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación D: se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 mL. Se agregó 1 g de Transcutol y los componentes se mezclaron agitando. A esto, se agregó 1 g de Cremophor RH40, seguido por 4 g de agua tipo 1. La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran

todos los componentes.

Formulación E: se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 mL. Se agregó 1 g de Transcutol y los componentes se mezclaron agitando. A esto, se agregó 1 g de Vitamina E TPGS, seguido por 4 g de agua tipo 1. La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los compuestos se disolvieran.

Formulación F: se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 mL. Se agregó 1 g de Transcutol y los componentes se mezclaron agitando. A esto, se agregaron 0.5 g de Solutol HS15, seguido por 4.5 g de agua tipo 1. La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Formulación G: se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 mL. Se agregó 1 g de Transcutol y los componentes se mezclaron agitando. A esto se le agregaron 0.5 g de Solutol HS15. La solución acuosa de 1% de Kollidon VA64 se preparó pesando 100 mg de Kollidon VA64 en un frasco de vidrio limpio. A esto, se agregaron 9.9 g de agua tipo 1. Los componentes se agitaron por 1 h a temperatura ambiente para asegurar el mezclado adecuado. Entonces se agregaron 4.5 g de la solución acuosa que comprendía Kollidon VA64 a la solución

de PEG400, Transcutol y Solutol HS15. La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Ejemplo 4.3. Formulaciones orales de compuesto IIc-007a, IVc-059a, IIIc-061a

Los compuestos IIc-007a, IVc-059a, IIIc-061a se prepararon como formulaciones orales usando los componentes detallados en la siguiente Tabla.

Tabla 23: Detalles de la formulación oral para la formulación oral de los compuestos IIc-007a, IVc-059a, IIIc-061a

Componente	Cantidad (% en p/p)	
	Formulación 1	Formulación 2
PEG 400	40.0	31.0
Transcutol HP	3.5	10.0
Meglumina	4.0	4.0
Cremophor RH 40	12.5	15.0
DMSO	5.0	5.0
Solución acuosa de SLS al 15%	35.0	35.0

Preparación de la solución acuosa de SLS al 15% a escala de 50 mL:

Se pesaron exactamente 7.5 g de SLS en un matraz volumétrico de 50 mL. Se agregó agua hasta el volumen de 50 mL y se agitó hasta lograr la solubilización completa.

Preparación de los vehículos de formulación:

Formulación 1: se prepararon 100 g de vehículo

pesando 40 g de PEG 400 (40.0%) en un vaso de precipitados de plástico. 3.5 g de Transcutol (3.5%), 12.5 g de Cremophor RH40 (12.5%), 4.0 g de Meglumina (4.0%), 5 g de DMSO (5.0%) y 35 g de solución acuosa de SLS al 15% (35.0%, 5.25% de SLS final). La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Formulación 2: se prepararon 100 g de vehículo pesando 40 g de PEG 400 (40.0%) en un vaso de precipitados de plástico. 10.0 g de Transcutol (10.0%), 15.0 g de Cremophor RH40 (15.0%), 4.0 g de Meglumina (4.0%), 5 g de DMSO (5.0%) y 35 g de solución acuosa de SLS al 15% (35.0%, 5.25% de SLS final). La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

El vehículo se agregó directamente a cada compuesto antes de agitar y sonicar por 10 minutos. Si se requería, el pH de la formulación se ajustó con hidróxido de sodio 1 M o ácido clorhídrico 1 M hasta alcanzar el intervalo de pH adecuado para la dosificación oral. Las soluciones de IIc-007a se prepararon a concentraciones de hasta e incluyendo 70 mg/mL. Las soluciones de IIIc-061a se prepararon a concentraciones de hasta e incluyendo 40 mg/mL. Las soluciones de IVc-059a se prepararon a concentraciones de hasta e incluyendo 150 mg/mL.

Ejemplo 4.4: Formulaciones intravenosas (IV)

Los compuestos Ia-001a, Ia-001a-Tz, Ia-001a-Tz/004a, Ic-007a, Ib-010a, IVc-059a, IIIc-061a se prepararon como formulaciones intravenosas.

Los detalles de formulación proporcionados en la Tabla 24 se usaron para la administración IV en los diferentes modelos preclínicos *in vivo*. Las soluciones de cada compuesto se prepararon ajustando el pH con solución de hidróxido de sodio hasta que se obtuvo una solución.

Tabla 24: Composición de la formulación IV

Componente	**Cantidad** (%)
Sustancia farmacéutica API	1% en p/v
DMSO	5% en v/v
PEG 400	10% en v/v
Solutol HS15	10% en p/v
Hidróxido de sodio 1 M	c. s.
Solución salina al 0.9%	Hasta 100%

Método de preparación:

Método ejemplar para 10 mL (escalar según sea apropiado para el volumen final requerido). El solvente patrón se preparó midiendo 0.5 mL de DMSO en un recipiente limpio. Se pesaron 100 mg de cada compuesto y se agregaron gradualmente a la solución de DMSO mezclando en un agitador, agitando y sonicando si se requería). El Solutol se fundió en un baño de agua a 60°C en un recipiente limpio y seco. Puesto que el Solutol solidifica a temperatura ambiente, el Solutol

fundido se mantuvo en un baño de agua a 60°C durante la preparación de la formulación. Se pesó 1 g (10% en p/v) de Solutol fundido en un recipiente caliente marcado de manera adecuada (hasta el volumen final de 10 mL). Se agregó 1 mL de PEG 400 al Solutol en el recipiente caliente de 10 mL. La solución patrón de fármaco en DMSO se agregó al recipiente marcado la mezcla de Solutol y PEG 400 y el contenido se mezcló instantáneamente. Se agregó una solución salina al 0.9%* hasta alcanzar el 85% del volumen objetivo y el contenido se mezcló en un baño a 40°C con agitación intermitente para disolver las partículas grandes. La formulación se enfrió a temperatura ambiente, se llevó al volumen final objetivo (10 mL) con solución salina al 0.9%* y el pH de la formulación se ajustó usando solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M hasta pH 7.4. Las formulaciones se filtraron usando un filtro de 0.2 µm en un frasco estéril dentro de una campana biológica clase II. Las formulaciones se usaron para dosificar en animales.

* Para algunos compuestos, la solución salina al 0.9% se sustituyó por solución de PBS pH 7.4.

Ejemplo 4.5: Formulaciones intravenosa (IV) e intraperitoneal (IP)

Los Compuestos Ic-007a, IIc-007a, IVc-059a, IIIc-061a se prepararon como formulaciones para administración intravenosa e intraperitoneal. Las formulaciones contenían

agua y dietilamina en equivalentes molares de cada compuesto correspondiente como se detalla en la Tabla 25. Esas formulaciones se usaron para administración IV e IP en diferentes modelos preclínicos *in vivo*.

Método de preparación:

Método ejemplar para 1 mL (escalar según sea apropiado para el volumen final requerido). Se pesaron exactamente 10 mg de cada compuesto en un frasco limpio. Se agregó la cantidad correspondiente de dietilamina al frasco. Se agregó agua para llevar hasta el volumen de 1 mL. El contenido se agitó o sonicó para formar una solución. Donde era necesario, el pH de la solución se alteró usando ácido clorhídrico 1 M para llevar este a un intervalo adecuado para la dosificación IV o IP.

Tabla 25: Equivalentes molares de dietilamina requeridos para los compuestos en las formulaciones IV e IP.

Compuesto	Ic-007a	IIc-007a	IIIc-061a	IVc-059a
Equivalente molar de dietilamina requerida	2.0	2.0	3.1	2.0
Dietilamina requerida para preparar 1 mL de formulación IV	44 µL	44 µL	62 µL	51.9 µL

Ejemplo 4.6: Formulaciones oculares

Se presentaron varios compuestos de acuerdo con la presente invención para el desarrollo de la formulación en un formato ocular. Los compuestos, su concentración y forma final se proporcionan en la siguiente Tabla 26.

Tabla 26: Formulaciones oculares

Compuestos	**Concentración** (% en p/v)	**suspensión/solución**
IVc-059a	5 mg/mL (0.5)	Solución
Ia-001a-Tz/004a	5 mg/mL (0.5)	Solución
Ia-001a-Tz	10 mg/mL (1.0)	Solución
IIIc-061a	10 mg/mL (1.0)	Solución
Ia-001a	10 mg/mL (1.0)	Solución
Ic-007a	5 mg/mL (0.5)	Suspensión
Ib-010a	10 mg/mL (1.0)	Suspensión

Composición: La composición de la formulación se detalla en la siguiente Tabla 27. La concentración de los API y su formato resultante variaron.

Tabla 27: Composición de la formulación ocular.

Componente	**Cantidad** (%)
Sustancia farmacéutica API	Véanse las Tablas más arriba
Kolliphor EL	5% en p/v
Povidona	0.5% en p/v
HPMC	0.5% en p/v
Polisorbato 80	0.1% en v/v
Amortiguador de PBS pH 7.4 (ajuste del pH con NaOH 1 M)	Hasta el volumen

Método de preparación:

Para aquellos compuestos que crearon soluciones, se siguió el siguiente método de preparación:

Se pesó un total de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó y agregó gradualmente la cantidad correcta de compuesto al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30°C

ayudó a mezclar el fármaco en la preparación de Kolliphor. En un recipiente separado, se preparó una solución acuosa de HPMC al 0.5% en p/v, povidona al 0.5% en p/v y polisorbato 80 al 0.1% en amortiguador de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) pH 7.4. Se agregó un volumen de 600 µL de la solución acuosa a Kolliphor EL y el fármaco mientras se mezclaba y agitó inmediatamente. El pH se ajustó a 7.4 usando NaOH 1 M en la formulación mientras se mezclaba. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa. La formulación se filtró usando un filtro de 0.2 µm en un frasco estéril en una campana biológica Clase II. Las formulaciones están listas para dosificar.

Para los compuestos que crean suspensiones, se siguió el siguiente método de preparación: Se pesó una cantidad de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó y se agregó gradualmente la cantidad correcta de los diferentes compuestos al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30°C ayudó a mezclar el fármaco en el Kolliphor. En un recipiente separado, se preparó una solución acuosa de HPMC al 0.5% en p/v, povidona al 0.5% en p/v y polisorbato 80 al 0.1% en amortiguador de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) pH 7.4. La solución acuosa se filtró usando un filtro de 0.22 µm. Se agregó un volumen de 600 µL de la solución acuosa al Kolliphor y el fármaco mientras se mezclaba y entonces se

agitó inmediatamente. El pH se ajustó a 7.4 usando NaOH 1 M filtrado con mezclado continuo la formulación. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa. Las formulaciones se sonicaron antes de dosificar para permitir que los flóculos se rompieran y dispersaran.

Formulación ocular de los compuestos Ic-007a. IIc-007a

Tabla 28: Composición de la formulación ocular con Ic-007a y IIc-007a.

	1	2
Componentes	Cantidad (%)	
Ic-007a	0.5% en p/v (5 mg/mL)	-
IIc-007a	-	0.5% en p/v (5 mg/mL)
Kolliphor EL	5% en p/v	5% en p/v
Povidona	0.5% en p/v	0.5% en p/v
HPMC	0.5% en p/v	0.5% en p/v
Polisorbato 80	0.1% en v/v	0.1% en v/v
Amortiguador de PBS pH 7.4 (ajuste del pH con NaOH 0.5 M)	Hasta el volumen	Hasta el volumen

Método de preparación:

Se pesó un total de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó y agregó gradualmente la cantidad correcta de compuesto al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30°C ayudó a mezclar el fármaco en la preparación de Kolliphor. En un recipiente separado, se preparó una solución acuosa de HPMC al 0.5% en p/v, povidona al 0.5% en p/v y polisorbato 80

al 0.1% en amortiguador de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) pH 7.4. Se agregó un volumen de 600 µL de la solución acuosa al Kolliphor EL y el fármaco mientras se mezclaba y se agitó inmediatamente. El pH se ajustó a 7.4 usando NaOH 1 M en la formulación mientras se mezclaba. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa. La formulación se filtró usando un filtro de 0.2 µm en un frasco estéril dentro de una campana biológica Clase II.

Solución de compuesto IIc-007a: Se pesó un total de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó y agregó gradualmente la cantidad correcta de compuesto (concentración objetivo 5 mg/mL) al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30°C ayudó a mezclar el fármaco en la preparación de Kolliphor. En un recipiente separado se preparó una solución acuosa de HPMC al 0.5% en p/v, povidona al 0.5% en p/v y polisorbato 80 al 0.1% en amortiguador de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) pH 7.4. Se agregó un volumen de 600 µL de la solución acuosa al Kolliphor EL y el fármaco mientras se mezclaba se agitó inmediatamente. El pH se ajustó a 7.4 usando NaOH 0.5 M en la formulación mientras se mezclaba. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa. La formulación se filtró usando un filtro de 0.2 µm en un frasco estéril dentro de una campana biológica Clase

II. Las formulaciones están listas para la dosificación. Antes del uso, las soluciones de compuesto IIc-007a se agitaron por 2 minutos y se usaron dentro de 10 minutos.

*puede observarse una apariencia de estructura gel/coloidal pero esta se redispersó después de agitar.

Suspensión de compuesto Ic-007a: Se pesó un total de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó y agregó gradualmente la cantidad correcta de compuesto (concentración objetivo de 5 mg/mL) al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30°C ayudó a mezclar el fármaco en la preparación de Kolliphor. En un recipiente separado, se preparó una solución acuosa de HPMC al 0.5% en p/v, povidona al 0.5% en p/v y polisorbato 80 al 0.1% en amortiguador de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) pH 7.4.

La solución acuosa se filtró usando un filtro de 0.22 µm. Se agregó un volumen de 600 µL de la solución acuosa al Kolliphor EL y el fármaco mientras se mezclaba y se agitó inmediatamente. El pH se ajustó a 7.4 usando NaOH 0.5 M en la formulación mientras se mezclaba. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa.

Antes de usar, la suspensión del compuesto Ic-007a se sonicó para romper los flóculos/agregados usando el siguiente protocolo: una caja de Petri/vaso de precipitados pequeños se llenó con agua dentro de un sonicador. El frasco

se colocó dentro del vaso de precipitados/caja de Petri y se sonicó por 10 minutos a 40°C. Después de 10 minutos, el frasco se removió y agitó durante 2 minutos y se sonicó nuevamente por 10 minutos. El proceso se repitió por un total de 50 minutos.

Formulaciones oculares de IIc-007a

La composición de los vehículos y concentración de compuestos se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29: Composiciones de las formulaciones A, B y C

Formulación	Composición	Concentración IIc-007a
A	0.4% en p/p de TRIS 0.5% en p/p de HPMC 0.5% en p/p de PVP K30 0.1% en p/p de tween 80 en H_2O	5 mg/g
B	0.4% en p/p TRIS 5% en p/p de cremophor EL en H_2O	5 mg/g
C	5% en p/p de cremophor EL 1.2% en p/p PVP K90 0.9% en p/p de TRIS en H_2O	10 mg/g
D	Dietilamina al 0.3% en p/v de: en H_2O	10 mg/g

Para preparar una solución de 10 mg/g, se pesaron exactamente 10 mg del compuesto en un frasco y se agregó directamente 1 mL de vehículo sobre el API y se agitó para

dar una solución.

Para preparar una solución de 5 mg/g, se pesaron exactamente 5 mg del compuesto en un frasco y se agregó directamente 1 mL de vehículo sobre el API y se agitó con para dar una solución.

Preparación de los vehículos

Formulación A: Se prepararon 50 g de vehículo pesando 0.25 g de HPMC (0.5% en p/p) dentro de un frasco de vidrio de Duran de 100 mL. Entonces se agregaron 49.25 g de agua tipo 1 a la botella seguido por 0.200 g de TRIS (0.4% en p/p), 50 mg de Tween 80 (0.1% en p/p) y 0.25 g de PVP K30 (0.5% en p/p). La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Formulación B: Se prepararon 50 g de vehículo pesando 2.5 g de cremophor EL (5% en p/p) dentro de un frasco de vidrio de Duran de 100 mL. Entonces se agregaron 47.3 g de agua tipo 1 a la botella seguido de 200 mg de TRIS (0.4% en p/p).

Formulación C: Se prepararon 50 g de vehículo pesando 2.5 g de cremophor EL (5% en p/p) dentro de un frasco de vidrio de Duran de 100 mL. Entonces se agregaron 46.45 g de agua tipo 1 a la botella seguido de 450 mg de TRIS (0.9% en p/p) y 600 mg de PVP K90 (1.2% en p/p). La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se

disolvieran todos los componentes.

Formulación D:

Dietilamina al 0.3% en p/v: Se prepararon 9.9 g de vehículo de dietilamina agregando 9869 µL de agua tipo 1 en una botella de vidrio de 14 mL. Entonces se agregaron al frasco 44.2 µL (31.3 mg) de dietilamina usando una pipeta. La solución se dejó agitando 5 minutos para asegurar la homogeneidad.

Formulaciones orales de IVc-059a

La composición de vehículos y concentración de compuesto se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30: Composiciones de las formulaciones A, B y C

Formulación	Composición	Concentración IVc-059a
A	5% en p/p de cremophor EL 1.2% en p/p de PVP K90 0.9% en p/p de TRIS en H_2O	10 mg/g
B	Dietilamina al 0.3% en p/v: en H_2O pH ajustado con dietilamina	10 mg/g
C	0.5% en p/p de HPMC, 0.5% en p/p de PVP K30, 0.1% en p/p de tween 80 en PBS pH ajustado con NaOH	10 mg/g

Para preparar una solución de 10 mg/g, se pesaron exactamente 10 mg del compuesto en un frasco y se agregó

directamente 1 mL de vehículo sobre el API y se agitó para dar una solución.

Preparación de los vehículos

Formulación A: se prepararon 50 g de vehículo pesando 2.5 g de cremophor EL (5% en p/p) dentro de un frasco de vidrio de Duran de 100 mL. Entonces se agregaron 46.45 g de agua tipo 1 a la botella seguido por 450 mg de TRIS (0.9% en p/p) y 600 mg de PVP K90 (1.2% en p/p). La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Formulación B: Dietilamina al 0.3% en p/p: Se prepararon 9.9 g de vehículo de dietilamina agregando 9869 µL de agua tipo 1 en un frasco de vidrio de 14 mL. Entonces se agregaron 44.2 µL (31.3 mg) de dietilamina al frasco usando una pipeta. La solución se dejó agitando 5 minutos para asegurar la homogeneidad.

Formulación C: Se prepararon 50 g de vehículo pesando 49.45 g de PBS (método de preparación más abajo) dentro de un frasco de vidrio de Duran de 100 mL. Sucesivamente, se agregaron 250 mg de HPMC (0.5% en p/p), 250 mg de PVP K30 (0.5% en p/p) y 50 µL (pipeta de desplazamiento de líquidos) de tween 80 (0.1% en p/p) a una botella de vidrio. La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Preparación de PBS: Se pesaron exactamente 799.1 mg de NaCl, 21.6 mg de KCl, 24.9 mg de KH_2PO_4, 180.4 mg de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ y se disolvieron en 100 mL de agua tipo 1. El pH de la solución fue 7.6.

Formulaciones oculares de Ic-007a y IIc-007a

Los compuestos se formularon como soluciones en los vehículos mostrados en la Tabla 31.

Tabla 31: composiciones de las formulaciones A, B, C y D

Componente	Cantidad (% en p/p)			
	Vehículo A	Vehículo B	Vehículo C	Vehículo D
Cremophor EL	5.0	5.0	5.0	5.0
PEG 400	0	0	0.4	0
TRIS	0.9	0.9	0.9	0.9
Meglumina	0	0	0	1.0
Kolliphor RH40	0	0.2	0.2	0.2
Agua	94.1	93.9	93.5	92.9

Preparación del vehículo a escala de 50 g

Vehículo A: Se prepararon 50 g de vehículo agregando 0.45 g de TRIS (0.9% en p/p) y 2.5 g de Cremophor EL (5.0% en p/p) a 47.05 g de agua (94.1% en p/p). La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Vehículo B: Se prepararon 50 g de vehículo agregando 0.45 g de TRIS (0.9% en p/p), 2.5 g de Cremophor EL (5.0% en p/p) seguido por 0.1 g de Kolliphor RH40 (0.2% en p/p) a 46.95 de agua (93.9% en p/p). La mezcla se dejó agitar

por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Vehículo C: Se prepararon 50 g de vehículo agregando 0.45 g de TRIS (0.9% en p/p), 2.5 g de Cremophor EL (5.0% en p/p) seguido por 0.1 g de Kolliphor RH40 (0.2% en p/p) y 0.2 g de PEG400 a 46.75 de agua (93.5% en p/p). La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

Vehículo D: Se prepararon 50 g de vehículo agregando 0.45 g de TRIS (0.9% en p/p), 0.5 g de meglumina (1.0% en p/p), 2.5 g de Cremophor EL (5.0% en p/p) seguido por 0.1 g de Kolliphor RH40 (0.2% en p/p) a 46.45 de agua (92.9% en p/p). La mezcla se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente para permitir que se disolvieran todos los componentes.

El vehículo se agregó directamente al API para crear las concentraciones listadas en la Tabla 32. La muestra se agitó y sonicó hasta que se obtuvo una solución.

Tabla 32: Concentración del compuesto en las formulaciones usando los vehículos A, B, C y D

	Concentración de API (mg/mL)			
	Vehículo A	Vehículo B	Vehículo C	Vehículo D
Ic-007a	10	10	10	20
IIc-007a	10	10	10	20

Para preparar una solución de 10 mg/g, se pesaron exactamente 10 mg del compuesto en un frasco y se agregó

directamente 1 mL de vehículo sobre el API y se agitó para dar una solución.

Para preparar una solución de 20 mg/g, se pesaron exactamente 20 mg del compuesto en un frasco y se agregó directamente 1 mL de vehículo sobre el API y se agitó para dar una solución.

EJEMPLO 5: Actividad terapéutica de los compuestos

Ejemplo 5.1: Tratamiento y/o prevención de la pancreatitis aguda

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se evaluó en un modelo murino de pancreatitis aguda. Se obtuvieron muestras de tejido para permitir el análisis posterior en vida de parámetros de la pancreatitis. También se obtuvieron muestras de plasma para evaluar los niveles de exposición del animal después de la administración de los compuestos.

Animales: Se usó un total de 70 ratones Balb/c hembra con una edad de 8-10 semanas pesando aproximadamente 20-25 g para el estudio (Charles River). Después de 7 días de aclimatación, se asignaron a grupos diferentes. Los ratones se alojaron en jaulas IVC (hasta 5 ratones por jaula) con los ratones individuales identificados por marcas en la cola. Las jaulas, lechos y agua se sanitizaron antes del uso. A los animales se les proporcionó lecho de enriquecimiento de mazorcas de maíz para proporcionar material de

enriquecimiento ambiental y anidación. Todos los animales tuvieron acceso libre a dieta comercial certificada estándar y agua. Las salas de retención de animales se mantuvieron como sigue - temperatura ambiente a 20-24°C, humedad a 30-70% y un ciclo de luz/oscuridad usado de 12 h. Aunque los animales usados en este estudio eran inmunocompetentes, la preparación de las soluciones de dosificación y dosificación/pesaje de los animales se llevó a cabo en un gabinete de seguridad estéril.

Sustancia y Formulación de Prueba: en un primer experimento, los compuestos Ia-001a, Ia-001aTz, Ic-001aTz/004a, Ic-007a, Ib-010a, IIIc-061a, IVc-059a se espesaron y solubilizaron en DMSO. La formulación final fue en 5% de DMSO, 10% de Solutol, 10% de PEG400, 75% de Solución salina al 0.9% y pH ajustado a 7 con solución de NaOH 0.5 M.

En un segundo experimento, los compuestos Ic-001aTz2, IIc-007a, IIIa-001aTz, IIIc-061a, IIIc-061a-E3, IVc-059a se espesaron y solubilizaron en DMSO. La formulación final es en 5% de DMSO, 10% de Solutol, 10% de PEG400, 75% de Solución salina al 0.9% y pH ajustado a 7 con solución de NaOH 0.5 M. Para la dosificación por os (PO) el IVc-059a se formuló en agua. Las soluciones de fármaco se formularon el día de la dosificación.

Los propósitos de este estudio fueron evaluar la eficacia de los compuestos en un modelo de pancreatitis aguda

(14 días), generar muestras de tejido para permitir el análisis posterior en vida de los parámetros de la pancreatitis y generar cuatro muestras de plasma para evaluar los niveles de exposición del animal después de la primera y segunda inyección obtenidas de muestras de sangre tomadas 1 h y 24 h después de la primera y última inyección.

Diseño del Estudio: en el primer día de estudio los animales se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento, asegurando una distribución igual de peso corporal. Los ratones (excepto el grupo de control negativo) se trataron con los compuestos de prueba dados 5 minutos antes de la dosificación de caeruleina, seguido por la inyección con caeruleina a 2 µg/kg vía la ruta intraperitoneal (IP) diariamente durante el estudio.

Tabla 33: Primer experimento.

Grupo	No. de Animales	Agente	Nivel de dosis; Ruta
1	3	Control negativo (no inducido)	Vehículo (tbc); IV
2	3	Control negativo (inducido)	Vehículo (tbc); IV
3	8	Pirfenidona	40 mg/kg; IV
4	8	Ia-001a	15 mg/kg; IV
5	8	Ia-001aTz	15 mg/kg; IV
6	8	Ic-001aTz/004a	15 mg/kg; IV
7	8	Ic-007a	15 mg/kg; IV
8	8	Ib-010a	150 mg/kg; PO
9	8	IIIc-061a	15 mg/kg; IV
10	8	IVc-059a	150 mg/kg; PO

Tabla 34: Segundo experimento.

Grupo	No. de Animales	Compuestos	Nivel de dosis; Ruta
1	3	Control negativo (no inducido)	Vehículo (tbc); IV
2	3	Control negativo (inducido)	Vehículo (tbc); IV
3	8	Pirfenidona	40 mg/kg; IV
4	8	Ic-001aTz2	15 mg/kg; IV
5	8	IIc-007a	15 mg/kg; IV
6	8	IIIa-001aTz	15 mg/kg; IV
7	8	IIIc-061a	15 mg/kg; IV
8	8	IIIc-061a-E3	150 mg/kg; PO
9	8	IVc-059a	15 mg/kg; IV
10	8	IVc-059a	150 mg/kg; PO

El tratamiento de los compuestos de prueba se proporcionó 5 antes de la dosificación caeruleina.

Tabla 35: Programa de estudio.

Tiempo (días)	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
Compuesto I.V.	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Sacrificio
Caeruleina I.P.	1ro	2do	3ro	4to	5to	6to	7mo	8vo	9no	10mo	11ro	12do	13ro	14to	
Muestreo de sangre para PK	T0 + 1h T0 + 24h													T12+24 h T l3+ 1 h	
Análisis del órgano															Páncreas

Observaciones en Serie

Peso corporal: el peso corporal de todos los ratones en el estudio se midió y registró diariamente; esta información se usó para calcular la dosis precisa para cada animal.

Signos y síntomas generales: los ratones se observaron diariamente y cualquier signo de tensión o cambio de la condición general, por ejemplo, se notaron pelaje

estrellado, falta de movimiento, dificultad para respirar.

Muestreo y análisis posteriores en vida: a los tiempos indicados anteriormente se tomaron muestras de sangre completa (60 µL) de la vena lateral de la cola en tubos recubiertos con K2-EDTA. Las muestras de plasma se prepararon y almacenaron congeladas a -20°C. Las muestras de plasma se enviaron al proveedor de bioanálisis del cliente Eurofins (FR) para la cuantificación del compuesto.

Muestreo Terminal: antes de finalizar se pesaron los animales. Los animales para el estudio terminal se sacrificaron vía inhalación de CO_2. Se tomó una muestra de sangre terminal vía punción cardiaca y se preparó el plasma. Se midieron las actividades de Lipasa y Amilasa vía ELISA usando equipos de ELISA disponibles comercialmente. El plasma restante se almacenó para los análisis futuros de citocina. El tejido de páncreas se disecó y pesó y una sección (50 µg) se congeló instantáneamente y se analizó para la cuantificación del compuesto en la muestra de páncreas. Una sección (50 µg) se procesó para la medición de la actividad de MPO, los niveles de IL-33 y TGF-B vía ELISA. El resto se fijó en formalina y se incrustó en cera de parafina. Se llevó a cabo la tinción con H Y E y se llevó a cabo en la sección evaluada usando el sistema de puntaje estándar de Schmidt, examinando: edema, infiltración inflamatoria, necrosis parenquimal, hemorragia. Se llevó a cabo la tinción con

Tricromo de Masson y el área cubierta por tejido fibrótico se cuantificó digitalmente usando el software QuPath. Las muestras de suero terminales se usaron para evaluar la química sanguínea usando una pinza IdeXX CHEM15 y LYTE4 (4 animales por grupo de tratamiento).

Resultados de la Pancreatitis Aguda después de 15 días de tratamiento IV

Evaluación de la histopatológica del daño pancreático basado en 4 criterios: Edema, Infiltración inflamatoria, Necrosis parenquimal, Hemorragia y calificada como se describe más abajo.

Tabla 36: Niveles de puntaje basados en 4 criterios

Elemento	**Niveles de Puntaje**			
	0	1	2	3
Edema intersticial	Ninguno	Interlobular	Lóbulo involucrado	Isla aislada como células acinares
Infiltración leucocitaria	Ninguno	< 20%	20% - 50%	> 50%
Necrosis de células acinares	Ninguno	< 5%	5% - 20%	> 20%
Hemorragia	Ninguno	1-2 puntos	3-5 puntos	> 5 puntos

Tabla 37: Niveles de puntaje de los resultados para grupos de animales

	Resumen del puntaje			
	Edema intersticial	Infiltración leucocitaria	Necrosis de células acinares	Hemorragia
Puntaje	1	2	3	4
Control negativo	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0

(no inducido)				
Control negativo (inducido con caeruleina)	2-3-3	3-3-3	2-2-3	2-2-2
Ia-001a (inducido con caeruleina)	1-1-1-1-1-2-2	3-3-3-3-3-3-3	0-1-1-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-2
Ia-001aTz (inducido con caeruleina)	1-1-1-1-2-2-2-2	2-3-3-3-3-3-3-3	0-0-0-0-1-1-1-1	0-1-1-1-1-1-1-1
Ic-001aTz/004a (inducido con caeruleina)	1-1-1-1-2-2-2-3	1-3-3-3-3-3-3-3	1-1-1-1-2-2-2-2	1-1-1-1-1-1-1-1
Ic-007a (inducido con caeruleina)	1-1-1-1-1-1-1-1	3-3-3-3-3-3-3-3	1-1-1-1-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-1-1
Ib-010a (inducido con caeruleina)	1-1-1-1-2-2-2-2	3-3-3-3-3-3-3-3	1-1-1-1-1-1-1-1	0-0-1-1-1-1-1-1
IIIc-061a (inducido con caeruleina)	1-1-1-1-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-1-1	0-0-0-0-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-1-1
IVc-059a (inducido con caeruleina)	1-1-1-1-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-1-1	0-0-1-1-1-1-2-2	1-1-1-1-1-1-1-1
Pirfenidona (inducido con caeruleina)	1-1-1-1-1-1-1-1	2-2-2-2-2-2-2-2	0-0-1-1-1-1-1-1	0-0-0-0-1-1-1-1

Puntaje de Schmidt

El puntaje de Schmidt es la evaluación de la eficacia de los compuestos basada en los cuatro criterios

histopatológicos como se describe en la tabla más abajo. Orden de los compuestos con el incremento del puntaje de Schmidt (el puntaje más alto = 10 es inducido con caeruleina + tratamiento con vehículo y el puntaje = 0 es animales no inducidos). La gráfica del puntaje de Schmidt para los compuestos en la Figura 2 para todos los productos muestra un puntaje de Schmidt mejorado en comparación con los animales de control con caeruleina.

Tabla 38: Puntaje de Schmidt y tabla de cuatro parámetros

Compuesto de prueba	Edema intersticial	Infiltración leucocitaria	Necrosis de células acinares	Hemorragia	Puntaje de Schmidt (H Y E)	
No inducido + vehículo	0	0	0	0	**0**	Borde apical intacto Acinos sanos con abundancia de gránulos secretores Sin signos de necrosis Sin signos de edema Sin signos de hemorragia
Inducido + IIIc-061a	1.0	1.0	0.5	1.0	**3.5**	Edema leve observado Hemorragia leve observada Necrosis de células acinares leve observada Infiltración leucocitaria leve observada Morfología de islote normal observada A diferencia de otros grupos de tratamiento, las áreas tuvieron patología total relativamente normal sin embargo se observó edema leve
Inducido + IVc-059a	1.0	1.0	1.0	1.0	**4.0**	Menos edema leve observado Menos hemorragia leve observada Necrosis de células acinares leve observada Infiltración leucocitaria leve observada Algo de hiperplasia del islote pancreático observada Disrupción a la región basófila
Inducido + Pirfenidona	1.0	2.0	0.8	0.4	**4.1**	Edema leve observado Hemorragia leve observada Necrosis de células acinares leve observada Infiltración leucocitaria observada Morfología de islote normal observada en áreas
Inducido + Ib-001aTz	1.5	2.9	0.6	0.9	**5.9**	Edema observado a través del páncreas Hemorragia leve observada Necrosis de células acinares leve observada Infiltración leucocitaria a través Morfología de islote anormal observada (trazas) Disrupción hacia la región basófila

Inducido + Ic-007a	1.0	3.0	1.0	1.0	**6.0**	Edema leve observado Hemorragia leve observada Necrosis de células acinares leve observada Infiltración leucocitaria observada Disrupción hacia la región basófila
Inducido + Ib-010a	1.5	3.0	1.0	0.8	**6.3**	Edema observado a través del páncreas y dentro de las células acinares Hemorragia leve observada Necrosis de células acinares leve observada Infiltración leucocitaria observada Disrupción hacia la región basófila
Inducido + Ia-001a	1.3	3.0	0.9	1.1	**6.3**	Edema observado a través del páncreas Hemorragia observada Necrosis de células acinares leve observada Infiltración leucocitaria a través Morfología de islote anormal observada Disrupción hacia la región basófila
Inducido + Ic-001aTz/004a	1.6	2.8	1.5	1.0	**6.9**	Edema observado a través del páncreas Hemorragia leve observada Necrosis de células acinares observada Infiltración leucocitaria a través Disrupción hacia la región basófila
Inducido + vehículo	2.7	3.0	2.3	2.0	**10.0**	Edema observado a través del páncreas Hemorragia leve observada Necrosis de células acinares observada Infiltración leucocitaria a través Disrupción hacia la región basófila

Como se muestra en las Tablas más abajo, todos los compuestos Ia-001a, Ia-001aTz, Ic-001aTz/004a, Ic-007a, Ib-010a, IIIc-061a, IVc-059a mostraron una disminución significativa en los niveles de IL33 en tejido pancreático en comparación con el grupo "inducido". Los niveles de TGF-B disminuyeron significativamente para Ic-007a, Ib-010a, IIIc-061a, IVc-059a. Los puntajes globales de Schmidt mejoraron especialmente para todos los compuestos pero especialmente para los compuestos IIIc-061a, IVc-059a.

Las Tablas 39 y 40 muestran a continuación las concentraciones de MPO en Páncreas terminal en muestras de tejido pancreático, concentraciones de IL33 en tejido y concentraciones de TGF-B.

Tabla 39:

Compuestos de Prueba	BW terminal medio (% de inicial)	Peso medio del páncreas terminal (g)	Actividad de MPO del páncreas	Nivel de IL33 en el páncreas	Valor de p contra inducido	Nivel de TGF-B en el páncreas	Valor de p contra inducido
Vehículo	93.8	0.148	2.81	76 ± 19	---	184 ± 107	---
Ia-001a	90.3	0.083	3.76	330 ± 162	0.017	592 ± 358	0.984
Ia-001aTz	89.1	0.084	2.68	154 ± 49	0.000	507 ± 289	0.663
Ic-001aTz/004a	93.5	0.104	2.15	180 ± 54	0.000	369 ± 195	0.113
Ic-007a	91.2	0.109	1.65	147 ± 47	0.000	188 ± 77	0.000
Ib-010a	91	0.091	1.83	157 ± 70	0.000	219 ± 140	0.00035
IIIc-061a	91.4	0.086	2.13	177 ± 80	0.000	295 ± 146	0.015
IVc-059a	93.3	0.09	2.88	86 ± 23	0.000	231 ± 199	0.020
Pirfenidona	97.6	0.136	1.26	78 ± 23	0.000	289 ± 170	0.024
Inducido	93.8	0.148	2.81	628 ± 57	0.000	592 ± 358	0.015

Tabla 40:

Compuestos de Prueba	Nivel de amilasa en suero	Nivel de lipasa en suero	Nivel de IL33 en suero	Nivel de TGF-B en suero	Solución salina/PBS para la formulación	Puntaje de Schmidt (H Y E)
Vehículo	43.69	11.66	37.22	10.88	-	1.0
Ia-001a	34.07	6.72	39.52	8.69	Solución salina	6.3
Ia-001aTz	35.35	8.57	37.02	8.69	Solución salina	5.9
Ic-001aTz/004a	36.51	8.21	35.43	8.99	PBS	69
Ic-007a	34.86	9.28	34.93	6.17	PBS	6.0
Ib-010a	37.46	9.06	35.36	6.87	PBS	6.3
IIIc-061a	38.38	9.79	33.72	4.65	Solución salina	3.5
IVc-059a	38.56	10.21	46.54	5.69	Solución salina	4.0
Pirfenidona	37.71	7.65	39.16	5.5	-	4.1
Inducido	43.69	11.66	37.22	10.88		10.0

En un segundo experimento los compuestos Ic-001a-TZ(2), IIc-007a, Ia-015a, IIIc-061a, IVc-059a se evaluaron a 15 mg/kg en el mismo modelo usando pirfenidona 100 mg/kg como el control positivo.

Tabla 41: Resultados

Grupos (ruta y dosis mg/kg)	Amilasa mU/mL	Lipasa mU/mL	MPO U/mg	IL-33 ng/mL	TGF-B ng/mL	Puntaje de Schmidt	Tinción de tricromo (% de área de fibrosis)
No inducido	25.887 ± 0.63	3.216 ± 0.212	1.37 ± 0.39	88 ± 37	355 ± 67	11.3 ± 0.6	0.33 ± 0.168
Inducido	60.858 ± 7.088	9.027 ± 1.33	2.66 ± 0.28	719 ± 97	1292 ± 263	5.9 ± 1.3	5.313 ± 2.089
Pirfenidona (100 mg/kg)	45.171 ± 6.008	4.541 ± 1.457	1.68 ± 0.44	226 ± 151	578 ± 230	8 ± 1	1.277 ± 0.888
Ic-001a-Tz(2) (IV, 15 mg/kg)	50.912 ± 5.074	8.305 ± 3.036	2.63 ± 0.63	493 ± 126	696 ± 448	3.9 ± 0.8	1.366 ± 0.562
IIc-007a (IV, 15 mg/kg)	45.325 ± 6.579	6.481 ± 2.908	2.74 ± 0.76	340 ± 211	500 ± 195	8.3 ± 1.6	1.821 ± 1.12
Ia-015a (IV, 15 mg/kg)	51.669 ± 12.029	5.31 ± 2.219	2.68 ± 0.6	398 ± 148	547 ± 373	4.6 ± 0.8	1.704 ± 1.621
IIc-061a (IV, 15 mg/kg)	40.889 ± 6.556	5.038 ± 0.874	1.72 ± 0.21	240 ± 119	514 ± 227	10.9 ± 1.6	0.714 ± 0.452
IVc-059a (IV, 15 mg/kg)	41.149 ± 5.42	4.324 ± 1.121	1.813 ± 0.405	215 ± 84	403 ± 84	10.63 ± 2.33	1.048 ± 0.449

Amilasa: Todos los compuestos probados, excepto el Ia-015a, resultaron en niveles de actividad de amilasa significativamente más bajos que en los controles tratados con vehículo inducidos, sin embargo, los niveles no alcanzaron los de los animales no inducidos.

Lipasa: La actividad de lipasa en suero fue mayor en animales inducidos y tratados con vehículo que en los animales no inducidos. El tratamiento con el control positivo pirfenidona, Ia-015a, IIIc-061a y IVc-059a resultaron en una actividad de lipasa significativamente más baja que en

animales tratados con vehículo.

Mieloperoxidasa (MPO): la actividad de MPO en tejido pancreático de animales inducidos y tratados con vehículo fue significativamente mayor que la de los animales no inducidos, indicativo de pancreatitis. El tratamiento con control positivo pirfenidona, IIIc-061a y IVc-059a resultó en niveles de actividad de MPO que fueron significativamente más bajos que los de los controles tratados con vehículo inducidos.

IL-33 y TGF-B: Todos los tratamientos, excepto por IIIc-061a y IVc-059a dosificados PO, resultaron en niveles de IL-33 en páncreas que fueron más bajos que los de los controles tratados con vehículo inducidos. Como con los niveles de TGF-B en suero resultaron en niveles de TGF-B significativamente más bajos que los de los controles tratados con vehículo inducidos.

Los criterios de puntaje de Schmidt usados clínicamente basados en edema intersticial, infiltración leucocitaria, necrosis celular acinar y hemorragia se usaron para evaluar secciones de tejido pancreático teñido con H y E. Todos los compuestos probados resultaron en puntajes de Schmidt significativamente más bajos que los de los controles tratados con vehículo inducidos, con IIIc-061a (IV) y IVc-059a (IV) que tienen puntajes más bajos que el control positivo son pirfenidona.

Tinción de fibrosis: Se usó un equipo de tinción disponible comercialmente (Abcam; ab150686, Tinción de Tricromo) para teñir secciones de tejido de páncreas para colágeno. Se usó el software de imágenes digitales QuPath para cuantificar el área del porcentaje del área cubierta por la tinción de colágeno (azul). Todos los compuestos probados resultaron en áreas significativamente menores de tinción con tricromo que los controles inducidos tratados con vehículo.

Ejemplo 5.2: Tratamiento y/o prevención del cáncer Pancreático y de Riñón:

El objetivo de este estudio fue evaluar preclínicamente el estudio de eficacia terapéutica *in vivo* de compuestos de acuerdo con la presente invención para el tratamiento del modelo singénico (Pan02) de cáncer pancreático murino subcutáneamente en ratones C57BL/6 hembra y modelo singénico de cáncer de riñón (Renca) en ratones hembra BALB/c hembra.

Animales: ratones C57BL/6 hembra (para el modelo Pan02); ratones BALB/c hembra (Para el modelo Renca), 6-8 semanas, > 17 g, hasta 5 ratones por jaula.

Tratamiento modelo Pan02 y grupos: compuestos Ia-001a-Tz, Ic-007a, Ib-010a, IVc-059a, IIc-007a diariamente por 5 días/semana por dos semanas vía inyección de bolo IV a una dosis de 15 mg/kg.

Tratamiento modelo Renca y grupos: compuestos Ia-

001a-Tz, Ic-007a, Ib-010a, IVc-059a, IIc-007a diariamente por 7 días/semana por tres semanas vía inyección de bolo IV a una dosis de 15 mg/kg.

Cultivo celular: las células de tumor de Renca se mantuvieron *in vitro* con medio de DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Las células en fase de crecimiento exponencial se cosecharon y cuantificaron por medio del contador celular antes de la inoculación del tumor.

Cultivo celular: las células de tumor de Renca se mantuvieron *in vitro* con medio de RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Las células en fase de crecimiento exponencial se cosecharon y cuantificaron por medio del contador celular antes de la inoculación del tumor.

Inoculación del tumor para el modelo Renca: cada ratón se inoculó subcutáneamente en la región del flanco posterior derecho con células tumorales Renca (1×10^6) en 0.1 mL de PBS para el desarrollo del tumor.

Inoculación del tumor para el modelo Pan02: cada ratón se inoculó subcutáneamente en la región del flanco frontal derecho con células tumorales Pan02 (3×10^6) en 0.1 mL de PBS para el desarrollo del tumor.

Distribución Aleatoria: La distribución aleatoria comenzó cuando el tamaño medio del tumor alcanza

aproximadamente 100 (80 - 110) mm^3. Para ambos modelos, se incluyeron 48 ratones en el estudio. Todos los animales se asignaron aleatoriamente a 6 grupos de estudio. La distribución aleatoria se efectuó sobre la base del método de "Distribución apareada" usando el método de múltiples tareas (software StudyDirector™, versión 3.1.399.19). La fecha de distribución aleatoria se denotó como el día 0.

Observación y Recolección de Datos: Después de la inoculación de las células tumorales, se verificó diariamente la morbilidad y mortalidad de los animales. Durante el monitoreo de rutina, se verificó cualquier efecto del crecimiento del tumor y tratamientos sobre el comportamiento, como la movilidad, consumo de alimentos y agua, ganancia/pérdida de peso corporal (los pesos corporales se midieron dos veces por semana después de la distribución aleatoria), apretura de los ojos/pelo y cualquier otra anormalidad e los animales. Se registró en detalle la mortalidad y signos clínicos observados para los animales individuales. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana después de la distribución aleatoria en dos dimensiones usando un calibrador y los volúmenes se expresaron en mm^3 usando la fórmula: "V = (L x W x W)/2, donde V es el volumen del tumor, L es la longitud del tumor (la dimensión más larga del tumor) y W es el ancho del tumor (la dimensión del tumor más larga perpendicular a L). Los

pesos tumorales se midieron al final del estudio. La dosificación, así como las mediciones del tumor y peso corporal se realizaron en un Gabinete de Flujo Laminar.

Puntos finales del estudio: Inhibición del crecimiento tumoral (TGI): el % de TGI se usó como una indicación de la actividad antitumoral y se expresó como: TGI (%) = 100*(1-T/C) T y C donde el volumen medio del tumor (o peso) de los grupos tratados y de control, respectivamente, en un día dado.

El análisis estadístico de la diferencia en el volumen medio del tumor entre los grupos se realizó usando uno de los métodos más abajo:

Uso de los datos recolectados el último día de la dosificación/observación para cada grupo individual sin importar la fecha de terminación individual diversa.

Uso de los datos recolectados el día cuando el volumen medio del tumor de los grupos con vehículo alcanza los puntos finales humanos de modo que pueda derivarse el TGI para todos/la mayoría de los ratones inscritos en el estudio.

Uso de los datos recolectados el día cuando cualquiera de los grupos tratados o de control terminó aún si los grupos restantes son tratados como programados.

Diferencia en AUC (ΔAUC) = El análisis estadístico se efectuó con un modelo de regresión de efectos lineal mezclado.

Finalización del estudio: La eficacia del estudio se efectuó por 3 semanas.

Análisis estadístico: Para comparar los volúmenes tumorales de diferentes grupos en un día previamente especificado, en primer lugar, se usó la prueba de Bartlett para verificar la suposición de homogeneidad de varianza a través de todos los grupos. Cuando el valor p de la prueba de Bartlett es ≥ 0.05, se usó una ANOVA de una vía para probar la calidad total de las medias a través de todos los grupos.

Si el valor p del ANOVA de una vía es < 0.05, se efectuaron la prueba post hoc efectuando las pruebas HSD (diferencia significativa honesta) de Tukey para todas las comparaciones por pares y se efectuaron pruebas de Dunnett para comparar cada grupo de tratamiento con el grupo con vehículo. Cuando el valor p de la prueba de Bartlett es < 0.05, se usó la prueba de Kruskal-Wallis para probar la igualdad total de las medianas entre todos los grupos. Si el valor de p, de la prueba de Kruskal-Wallis es < 0.05, se efectuaron las pruebas post hoc efectuando la prueba no paramétrica de Conover para todas las comparaciones por pares o para comparar cada grupo de tratamiento con el grupo con vehículo, ambas con el ajuste en un solo paso del valor de p. Todos los análisis estadísticos se efectuaron en un lenguaje R-a y ambiente para cálculos y gráficos estadísticos (versión 3.3.1). Todas las pruebas son de dos lados a menos que se

especifique otra cosa y los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

Resultados

Tabla 42: Actividad antitumoral de los artículos de prueba con datos recolectados el día 13

Grupo	**Tratamiento**	**Volumen tumoral ± DEM (mm^3)**	**TGI** (%)
Control	Vehículo, 5 µL/g, I.V., QD*5 por 2 semanas	187.91 ± 11.19(8)	-
Compuesto IVc-059a	IVc-059a, 15 mg/kg, 5 µL/g, I.V., QD*5 por 2 semanas	148.49 ± 7.05(8)	20.98%

Tabla 43: Análisis estadístico del volumen tumoral con datos recolectados el día 13

Prueba	Valores de p	Nivel de importancia
Prueba de homogeneidad de varianza y normalidad		
Prueba de Bartlett	2.76E-05	***
Prueba de igualdad total entre grupos		
Prueba de Kruskal-Wallis	0.00965	**
Prueba de igualdad entre grupos individuales (Prueba de comparación de muchos a uno no paramétrica de Conover)		
Grupo de control contra Compuesto IVc-059a	0.0226	•

Resumen de resultados

En este estudio, se evaluó la eficacia terapéutica *in vivo* del compuesto de prueba IVc-059a para el tratamiento del modelo singénico de cáncer pancreático murino (Pan02) subcutáneo en ratones C57BL/6 hembra. El compuesto IVc-059a, administrado a 15 mg/kg I.V. suprimió significativamente el crecimiento del tumor, con un valor de TGI de 20.98% ($P < 0.05$).

Tabla 44: % de inhibición medio del modelo Pan02 de volumen tumoral

Día	0	3	6	9	13
IVc-059a	-0.11%	19.86%	18.64%	18.49%	20.98%

% de Inhibición medio = (media(NaCl de Control)-media(Tratado con Cpd))/media(NaCl de Control) * 100%

Tabla 45: % de inhibición medio del modelo Renca de volumen tumoral

Día	0	3	6	9	13	16
IVc-059a	0.05%	-0.90%	5.02%	14.83%	23.07%	19.42%

Ejemplo 5.3: Tratamiento y/o prevención de la Retinopatía Diabética (DR)

Modelo animal: Se usó el modelo de ratón db/db y se comparó con ratones db/+ como un control no diabético. El ratón db/db tenía una mutación en el gen del receptor de leptina y fue un modelo para diabetes tipo 2 inducida por obesidad. Bogdanov et al. PLoS One, 2014, 9, e97302 reportan que los ratones db/db reproducen las características del proceso neurodegenerativo que ocurre en el ojo diabético humano. Además, este modelo desarrolló anormalidades microvasculares tempranas (fuga vascular) inducida por diabetes (Hernández et al. Diabetes 2016, 65, 172-187; Hernández et al. Diabetología 2017, 60, 2285-2298). Por lo tanto, este modelo se consideró como un modelo apropiado para probar la eficacia de los compuestos de la presente invención para el tratamiento de las etapas iniciales de la retinopatía

diabética (DR).

Se probó el efecto de gotas para ojos que contenían Ia-007a sobre la fuga vascular inducida por diabetes en el modelo de ratón db/db. Los ratones, db/db (BKS.Cg-Dock7m +/+ Leprdb/J) y ratones no diabéticos (db/+) de 8 semanas de edad se compraron de Charles River Laboratories. (Calco, Italia).

Los animales tuvieron acceso libre a alimento *ad libitum* (ENVIGO Global Diet Complete Feed for Rodents, Mucedola, Milán, Italia) y agua filtrada. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura (20°C) y humedad (60%) estrictas. Además, tuvieron ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12 h.

Estudio de intervención: Cuando los ratones db/db tenían una edad de 10 semanas, se les administraron aleatoriamente gotas para ojos con Ia-007a o gotas para ojos con vehículo directamente en la superficie superior de la córnea de cada ojo usando una jeringa. A cada ojo se administró una gota (5 µL) de Ia-007a (5 mg/mL) o vehículo (5 µL de cloruro de sodio al 0.9%) dos veces al día por 14 días. El día 15 los ojos de los animales se instilaron con una gota de Ia-007a o vehículo aproximadamente una hora antes de la necropsia. Todos los experimentos se efectuaron de acuerdo con los principios de la Comunidad Europea (86/609/CEE).

La permeabilidad de la vasculatura retinal se examinó *ex vivo* evaluando la fuga de albúmina de los vasos

sanguíneos hacia la retina usando el método de albúmina y azul de Evans. Para este propósito, cuatro animales por grupo se inyectaron intraperitonealmente con una solución de azul de Evans (E2129 SIGMA, Saint Louis, Missouri, EE. UU.) (5 mg/mL disueltos en PBS pH 7.4). Después de la inyección, los animales se tornaron azules, confirmando la absorción y distribución del tinte. Después de 2 h, los ratones se sacrificaron por eutanasia por dislocación cervical y se enuclearon los ojos. Las retinas de cada animal se aislaron, pesaron y protegieron rápidamente de la luz. Se obtuvieron portaobjetos montados planos y cubreobjetos con una gota del medio de montaje reactivo antidecoloración Prolong Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Oregón, EE. UU.). Se adquirieron las imágenes digitales de diferentes campos aleatorios de todas las retinas usando un microscopio de barrido de láser confocal (FV1000; Olympus, Hamburgo, Alemania) a ×60 usando la línea láser de 561 nm y cada imagen se registró con una intensidad de haz idéntica a un tamaño de 1024 píxeles x 1024 píxeles. Para el análisis cuantitativo del azul de Evans unido a albúmina, se contó el número de extravasaciones por campo de 0.44 mm^2. Este análisis fue efectuado por investigadores que desconocían el tratamiento recibido por los ratones.

Resultados

La concentración de glucosa en sangre y peso

corporal al final del tratamiento fueron similares en los ratones db/db tratados con gotas para ojos de Ia-007a a diferencia de los ratones db/db tratados con vehículo. Se identificaron ubicaciones extravasculares de azul de Evans en la retina de ratones diabéticos (Figura 1, flechas blancas). El tratamiento tópico con Ia-007a fue capaz de reducir significativamente el número de extravasaciones por campo, previniendo de este modo la fuga vascular debida a la disrupción de la barrera sanguínea retinal.

Ejemplo 5.4: Tratamiento y/o prevención de la peritonitis

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se evaluó usando modelos murinos de peritonitis inducida por tioglicolato como se describe en Cook AD et al. (J Immunol. 2003;171(9):4816-4823) y Tsai JM et al. (Blood Adv. 2019;3(18):2713-2721. doi: 10.1182/bloodadvances.2018024026). Ratones C57BL/6J se inyectaron intraperitonealmente (i. p.) con 1 mL de compuestos a 50 mg/kg 1 h antes de la inducción de la peritonitis. La peritonitis se indujo entonces con 1 mL de caldo de tioglicolato estéril al 4% (p/vol) o PBS como control. Después de 3 h, los ratones fueron se anestesiaron por la inyección i. p. con una solución de PBS que contenía 5 mg/mL de ketamina y 1 mg/mL de xilazina y las cavidades peritoneales se lavaron con 5 mL de HBSS 1X libre de Ca^{2+}/Mg^{2+}

estéril enfriado en hielo que contienen EDTA 2 mM. Las células de exudado peritoneal (PEC) se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min. a 4°C y los eritrocitos se lisaron. Las PEC se lavaron, se resuspendieron en PBS al 10% PBS, se incubaron con anti-CD16/CD32 y bloqueadores mIgG FcR y entonces se tiñeron con anticuerpos conjugados de manera fluorescente para caracterizar los leucocitos que migraron (anti-CD45, anti-CD11b, anti-Ly6G, anti-CD8a, anti-CD4, anti-CD3). La viabilidad celular se midió por exclusión de 7-AAD. Los especímenes se adquirieron por citometría de flujo usando el Analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec) y analizaron usando el software FlowJo.

Animales: cuatro ratones C57BL/6J por grupo para cada compuesto contra cuatro ratones tratados con vehículo.

Tratamiento con los compuestos: 50 mg/kg vía inyección i. p. de los compuestos

-Ic-007a: Volumen inyectado: 68.5 µL de compuesto Ic-007a en DMSO (1.375 mg) + 431.5 µL de PBS (volumen total de 500 µL, 5.87 mM) ratón aproximadamente de 28 g.

-IIc-007a: Volumen inyectado: 67.25 µL de compuesto en DMSO (1.345 mg) + 431.5 µL de PBS (volumen total de 500 µL, 5.74 mM) ratón aproximadamente de 27 g.

-IIIc-061a: Volumen inyectado: 58.75 µL de compuesto en DMSO (1.175 mg) + 441.25 µL de PBS (volumen total de 500 µL, 4.56 mM) ratón aproximadamente de 23.5 g.

-IVc-059a: Volumen inyectado: 52.25 µL de compuesto en DMSO (1.045 mg) + 447.75 mL de PBS (volumen total de 500 µL, 5.25 mM) ratón aproximadamente de 20.9 g.

El tratamiento con los productos Ic-007a, IIc-007a, IIIc-061a, IVc-059a se efectuó 60 min. antes de la peritonitis inducida por tioglicolato. La lectura se efectuó 1 h después de la inyección de tioglicolato.

Método de lectura: citometría de flujo para caracterizar los leucocitos que migraron usando anti-CD45, anti-CD11b, anti-Ly6G, anti-CD8a, anti-CD4, anti-CD3.

Resultados y análisis estadístico: Los resultados se analizaron usando el software FlowJo. Los datos se mostraron como la media ± DEM. Se usó una la prueba t de Student de dos colas usando un nivel de importancia de 0.05 para el análisis estadístico.

Resultados

Tabla 46: Ejemplo de datos para el compuesto Ic-007a

Conteos celulares	Ratones tratados con vehículo	Ratones tratados con C76/24	% de reducción
Leucocitos (células CD45+)	60.8×10^4 ($\pm$ 10.8×10^4)	31.3×10^4 ($\pm$ 6.66×10^4)	48%
PMN (células CD11b-Ly6G doblemente +)	10.4×10^4 ($\pm$ 7.75×10^4)	2.03×10^4 ($\pm$ 0.36×10^4)	80%
linfocitos CD4+	1.58×10^4 ($\pm$ 0.54×10^4)	1.03×10^4 ($\pm$ 0.15×10^4)	35%

linfocitos CD8+	1.86 x 10^4 (± 0.59 x 10^4)	0.54 x 10^4 (± 0.15 x 10^4)	71%

Tabla 47: resumen de resultados para los cuatro compuestos

Lectura	Ratones tratados con C20 sobre % de reducción de ratones tratados con vehículo			
Conteos celulares	Ic-007a	IIc-007a	IIIc-061a	IVc-059a
Leucocitos (células CD45+)	48.0%	11.8%	-2.4%	4.0%
PMN (células CD11b-Ly6G doblemente +)	80.0%	27.3%	-8.3%	-13.0%
linfocitos CD4+	35.0%	40.0%	42.9%	6.0%
linfocitos CD8+	71.0%	20.0%	33.3%	23.0%

El compuesto Ic-007a tuvo el efecto antiinflamatorio más fuerte y disminuyó el reclutamiento de leucocitos (48%), con un efecto muy fuerte sobre PMN (80%), los linfocitos CD8+ (71%) y linfocitos CD4+ (35%).

Ejemplo 5.5: Tratamiento y/o prevención de la miocardiopatía diabética

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se probó usando el modelo murino de miocardiopatía diabética descritos por Li C et al. (Cardiovasc Diabetol. 2019; 18(1): 15. Publicado el 2 de febrero de 2019. doi: 10.1186/s12933-019-0816-2).

Procedimiento y tratamiento con fármaco de los animales: Treinta ratones KK-Ay de 8 semanas de edad (modelo de diabetes genética tipo 2) y ratones C57BL/6J se alojaron

en jaulas (4-6 por jaula) con acceso libre a las cajas de bebida/alimento. Los ratones se alojaron en una sala mantenida a 24°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h.

Los ratones del modelo de diabetes tipo 2 se alimentaron con una dieta alta en grasa. La glucosa en sangre se midió diariamente. Los ratones con concentración de glucosa en sangre mayor de 15 mM (200 mg/dL) por 2 semanas consecutivas se usaron para los siguientes experimentos. Posteriormente, los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos (15 por grupo) y se criaron por 8 semanas. Los grupos incluyen los grupos de control: (1) ratones C57BL/6J sanos sin tratamiento; (2) ratones KK-Ay con diabetes de tipo 2 sin tratamiento; y (3) ratones KK-Ay con diabetes de tipo 2 tratados con los compuestos de la presente invención.

Evaluación ecocardiográfica: La medición ecocardiográfica se efectuó antes de la intervención experimental y al final del período de estudio. Se usó una ecocardiografía en modo M equipada con un sistema transductor de arreglo lineal de 17.5 MHz (Vevo 2100™ High Resolution Imaging System; Visual Sonics). Se evaluaron la frecuencia cardiaca (HR) y las siguientes variables estructurales: dimensión ventricular izquierda interna en la diástole (LVIDD), dimensión ventricular izquierda interna en la sístole (LVIDS), espesor septal interventricular en la sístole (IVSs) y en la diástole (IVSd) y espesor de pared

posterior del LV en la sístole (LVPWs) y la diástole (LVPWd). La masa del LV se calculó usando la formula [(LVIDd + LVPWd + IVSd)^3-(LVIDd)^3 × 1.04 × 0.8 + 0.6]. La función LV se evalúo por los siguientes parámetros incluyendo el acortamiento funcional (FS), fracción de eyección (FE) y relación de E/A. Todas las evaluaciones fueron realizadas por un solo investigador ciego a los grupos experimentales.

Concentración de hidroxiprolina en el miocardio: Se midió la concentración de hidroxiprolina en el miocardio del ventrículo izquierdo para estimar el contenido de colágeno en el miocárdico. Las mediciones se efectuaron con un espectrofotómetro usando el equipo comercial (BioVision, Mountain View, CA, EE. UU.) de acuerdo al protocolo del fabricante.

Detección de lípidos, glucosa, insulina en suero y niveles HbA1c: Al final del estudio, los ratones se anestesiaron por inhalación de 3% de isopentano en aire. Los especímenes de sangre en ayunas se recolectan en tubos comerciales que contenían litio heparina como anticoagulante vía la vena sublingual de cada animal y se centrifugan por 6 min. a 3000 rpm/min. El plasma se mantuvo en un tubo plano y se almacenó a -20°C hasta el análisis. Se determinaron las concentraciones en plasma de colesterol total (TC), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) y colesterol de lipoproteínas de alta

densidad (HDL-C) por métodos espectrofotométricos. Los niveles de glucosa en sangre se midieron usando un glucómetro (ACCU-CHEK, Roche, EE. UU.). Después de un ayuno durante la noche, se determinaron los niveles de insulina y proinsulina en ayunas usando equipos de ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) de insulina y proinsulina de ratón, respectivamente. (Nanjing Jiancheng Biotech, China). También se retuvo sangre para la medición de HbA1c por un equipo cromatográfico-espectrofotométrico de intercambio iónico (Biosystems, España).

Evaluación de la tensión oxidativa en tejido cardíaco: Los animales se sacrificaron por eutanasia y los corazones se removieron y enjuagaron de manera retrógrada con una solución de Krebs-Ringer (NaCl 115 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, $CaCl_2$ 1.25 mM y glucosa 11 mM) al final del estudio. La temperatura de la solución de perfusión se mantuvo en 37°C. Entonces se pesaron los corazones y los tejidos cardíacos se homogeneizaron sobre hielo en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) fría a pH 7.4, que contenía EDTA 1 mM. Los homogeneizados se centrifugaron en solución salina fría por 10 min. a 7000 rpm/min. La concentración de proteína del sobrenadante se determinó por medio del equipo de albúmina de suero bovino como estándar. Los sobrenadantes se usaron para el análisis del nivel de hidroperóxido de lípidos y los niveles de

glutatión peroxidasa (GSH-Px), superóxido dismutasa (SOD) y malondialdehído (MDA). Las mediciones se efectuaron por medio de un espectrofotómetro usando equipos comerciales (Solarbio, China) de acuerdo a los protocolos del fabricante. El nivel de hidroperóxido en lípidos se expresó como nmol/mg de proteína. Los niveles de GSH-Px, SOD y MDA se expresaron como µmol/mg de proteína, nmol/mg de proteína y mmol/mg de proteína, respectivamente. El nivel de expresión de NOX4 se midió por Western blotting. Se usaron anticuerpos anti-Nox4 monoclonales de ratón (1:1000, Abcam) y secundario conjugado con peroxidasa de rábano (CWBIO). Se usó β-actina (1:1000, Abcam) como referencia.

Análisis histológico e inmunohistoquímico: Los tejidos cardíacos se fijaron en paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfato 0.1 M por 48 h, se deshidrataron e incrustaron en parafina, se cortaron a un espesor de 4 µm y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. Se usó tinción con tricromo de Masson para evaluar el grado de fibrosis en el músculo cardíaco.

Para la recuperación de antígeno, los portaobjetos desparafinados se mantuvieron en una solución de citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) por 10 min. a 100°C. Esos cortes o secciones se incubaron entonces en peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena y se incubaron con anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de

ratón para TGF-β1, colágeno I y colágeno III; Abcam) por 1.5 h, seguido por el anticuerpo secundario correspondiente por 2.5 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se lavaron en PBS tres veces y se incubaron en solución de diaminobencidina al 0.02% por 2-8 min. Después de contrateñir con hematoxilina, los portaobjetos se lavaron brevemente, se montaron con resina y se observaron en el microscopio de luz.

Análisis de las vías de Nrf2/ARE y TGF-β/SMAD por Western blotting: El protocolo Western blotting se describe en nuestro estudio anterior. De manera breve, el tejido del miocárdico se lisa en amortiguador RIPA enfriado en hielo (cloruro de sodio 150 mM, dodecilsulfato de sodio al 0.1% (SDS), desoxicolato de sodio al 0.5%, NP-40 al 1.0%, PMSF 1 mM y 50 mM de Tris, pH 8.0) para la extracción de proteína total. La concentración de proteína total se cuantificó por medio de un Equipo de Ensayo de Proteína BCA (Medchem Express, EE. UU.). Se separaron cantidades iguales de proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con 12% de SDS. Entonces, la proteína se transfirió del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno. Después de bloquear con leche descremada al 5%, la membrana se incubó durante la noche en anticuerpo primario (Nrf2, HO-1, TGF-β1, p-Smad2, Smad2, p-Smad3, Smad3, Smad7, α-SMA 1:1000, Abcam). Las bandas se detectaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (CWBIO) específico. Se usó β-actina

(1:1000, Abcam) como referencia de la proteína celular total.

Ejemplo 5.6: Tratamiento y/o prevención de la diabetes y la cicatrización de heridas diabéticas

Se usaron modelos murinos de diabéticos usando estreptozotocina (diabetes inducida por STZ) para evaluar la eficacia de los compuestos de la presente invención para la cicatrización de heridas diabéticas y generar muestras de tejido para permitir el análisis posterior en vida de tejido de piel.

Animales: se implantaron un total de 104 ratones CD-1 hembra con edades de 5-7 semanas con un peso aproximado de 25 - 30 g. Esos se compraron en Charles River y se aclimataron por 7 días después del arribo.

Alojamiento de los animales: Los ratones se alojaron en jaulas IVC (hasta 5 ratones por jaula) con los ratones individuales identificados por marcas en la cola. Las jaulas, lecho y agua se sanitizaron antes del uso. A los animales se les proporcionó un lecho de enriquecimiento con mazorcas de maíz para enriquecimiento ambiental y material de anidación. Cada jaula se etiquetó claramente con una tarjeta que indicaba el número de animales, sexo, cepa, DOB, número de estudio y fecha de inicio y tratamiento. Las jaulas se cambiaron una vez a la semana con alimento y agua remplazada cuando fuese necesario.

La sala de alojamiento de los animales se mantuvo

como sigue - temperatura ambiente a 20-24°C, humedad a 30-70% y un ciclo de luz/oscuridad usada de 12 h.

Técnica y dosificación aséptica: Aunque los animales para ser usados en este estudio son inmunocompetentes, la preparación de las soluciones de dosificación y dosificación/pesaje de los animales se llevaron a cabo en un gabinete de bioseguridad estéril. Dosificación IV: Los compuestos se formularon en 5% de DMSO: 10% de Solutol: 10% de PEG400: 75% de PBS y pH ajustado a 7 con solución de NaOH 5 M. Dosificación PO: la formulación es en agua.

Las soluciones de fármaco se formularon el día de la dosificación y cualquier remanente al final de la dosificación se almacenó a -20°C.

Diseño del Estudio: A los ratones (excepto el grupo de control negativo) se inyectaron con STZ (55 mg/kg; IP) diariamente por 5 días consecutivos. Los ratones se privaron de alimento por 6 horas antes de la inyección. Una semana después de completar la inducción, se monitorearon los niveles de glucosa y los ratones con niveles de menos de 15 mmol/L (280 mg/gL) se removieron del estudio puesto que no habían desarrollado la severidad de diabetes ideal. Se tomaron imágenes de las heridas (Días 0). Los animales se trataron y se tomaron imágenes cada 2 días hasta el día 14 (cuando las heridas de ratones no diabéticos de control

cicatrizaron). Las imágenes de las heridas se evaluaron digitalmente por el área de la herida y porcentaje de cierre contra el tiempo graficado gráficamente.

Tabla 48:

Grupo	No. de Animales	Compuestos probados	Nivel de dosis; Ruta
1	3 (3)	Control negativo (no inducido)	Vehículo IV
2	3 (3)	Control negativo (inducido)	Vehículo IV
3	8 (3)	Pirfenidona	250 mg/kg; PO
4	8 (3)	Ia-001a	15 mg/kg; IV
5	8 (3)	Ia-001aTZ	15 mg/kg; IV
7	8 (3)	Ib-010a	15 mg/kg; IV
8	8 (3)	IIIc-061a	15 mg/kg; IV
9	8 (3)	IVc-059a	15 mg/kg; IV
10	8 (3)	IVc-059a	150 mg/kg; PO

El tratamiento continuará por 2 semanas (14 días). Los números de animal entre corchetes se dosificaron por 7 días, entonces se muestrearon por el análisis de DP a mitad del estudio.

Tabla 49: programa de estudio

Tiempo (Semanas)	S1	S2	S3	S4	S5
STZ	Dosis (5 días)	---			
Prueba		Glucosa en sangre	Glucosa en sangre	Glucosa en sangre Imagen de la herida inmediatamente después de la imagen cada 2 días	Glucosa en sangre Imagen de la herida cada 2 días
Compuesto	---	---	---	Dosis IV, diariamente	Dosis IV, diariamente

				Dosis PO, diariamente	Dosis PO, diariamente
Órgano				3 animales por grupo muestreados después de 7 de la dosificación. Tejido de piel muestreado	

Observaciones en serie

Peso corporal: el peso corporal de todos los ratones en el estudio se midió y registró diariamente; esa información se usó para calcular la dosificación precisa para cada animal.

Signos y síntomas generales: los ratones se observaron diariamente y cualquier signo de tensión o cambios en la condición general, por ejemplo, se notaron pelaje estrellado, falta de movimiento, dificultad de respiración.

Muestreo a la mitad del estudio: después de 7 días de dosificación, se sacrificaron 3 animales por grupo y se removió tejido de herida y se dividió en 2 secciones (A) y (B):

(A) La primera sección es FFPE y se tiño con lo siguiente: H y E, Tricromo de Masson, CD31, TGF-β.

(B) La segunda sección se homogenizó y se usó para los siguientes ELISA: niveles de SOD, GTPx, Catalasa, TNF-α, IL-6, TGF-β.

Finalización: Los animales en estudio terminal se sacrificaron vía inhalación de CO_2. Antes de la finalización, los animales se pesaron. *Finalización Temprana*: La

finalización temprana de un animal se efectuó si se midió una pérdida de ≥ 20% en peso y para cualquier animal comprometido que muestre signos y síntomas críticos o incapacidad para comer/beber.

Resultados:

Glucosa en sangre: La inducción con STZ resultó en un incremento significativo en la glucosa en sangre en comparación con controles con vehículo no inducidos. El tratamiento con Ia-001a, IIIc-061a y IVc-059a IV resultó en una reducción significativa en los niveles en sangre en comparación con los controles con vehículo inducidos. Después de 7 días, ya todos los compuestos exhibieron algún grado de aceleración de la cicatrización de heridas en el modelo de diabetes inducida por STZ (Figura 10, 3 animales por grupo muestreados después de 7 días de la dosificación). Se muestreó tejido de piel.

Ejemplo 5.7: Tratamiento y/o prevención de las úlceras del pie diabético

Los compuestos de las presentes invenciones se probaron usando un modelo de rata de úlceras diabéticas de acuerdo a lo descrito por Zhang Y et al. (J Diabetes Res. 2016, 2016, 5782904. doi: 10.1155/2016/5782904).

La cicatrización de heridas en la piel y otros tejidos mucosos involucra una secuencia compleja de eventos que incluyen el caso de coagulación, inflamación aguda y

crónica, reepitelialización, formación de tejido de granulación, contracción de la herida y remodelación de tejido conectivo. Sin embargo, varias condiciones genéticas y adquiridas, como el envejecimiento, malnutrición (por ejemplo, deficiencia de vitamina C y proteína), infección, hipoxia y enfermedades genéticas como el síndrome de Ehlers-Danlos, pueden perjudicar el proceso reparativo. Entre estas condiciones, la diabetes mellitus es una causa más común de deterioro o falta de cicatrización de heridas. Como un ejemplo, la importancia clínica de la hiperglucemia a largo plazo es resaltada por datos alarmantes que muestran que el 85% de las úlceras del pie diabético que no cicatrizan finalmente requieren amputación. La "vía hacia una herida crónica", como es delineado por los autores de un estudio reciente, se enfoca sobre la inflamación prolongada o crónica caracterizada por activación de macrófagos (así como la acumulación de neutrófilos) que resulta en niveles elevados de citocinas proinflamatorias, especies de oxígeno reactivas, metaloproteinasas de la matriz (MMP) y otras proteinasas neutras (por ejemplo, elastasa). En consecuencia, acoplado con una eficiencia de inhibidores de proteinasa endógena, todo conduce a "degradación excesiva de la matriz, degradación de los factores del crecimiento y epitelialización deteriorada".

En el primer experimento, quince ratas Sprague-

Dawley macho adultas (con un peso corporal de 300-325 g, Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, MA) se inyectaron a través de la vena de la cola con amortiguador de solución salina 10 mM pH 4.5 (controles no diabéticos, NDC) o la misma solución que contenía estreptozotocina (STZ; ENZO Life Sciences, Inc., Plymouth Meeting, PA; 70 mg/kg de peso corporal) para inducir diabetes tipo I. Las ratas se distribuyeron entonces en cinco grupos experimentales descritos más abajo (n = 3 ratas/grupo). A todas las ratas se dio acceso limitado a alimento y agua. Dentro de 48 horas, las ratas inyectadas con STZ exhibieron niveles de glucosa severamente elevados en su orina. Tres semanas después de inducir la diabetes, se afeitó la piel de la espalda de todas las ratas y se efectuó una serie de seis heridas estándar por rata, cada una de 6 mm de diámetro, usando un trépano quirúrgico. Los siguientes cinco grupos experimentales se establecieron (en este experimento inicial, el tratamiento en todos los grupos fue por siete días; un estudio a largo plazo se describe más abajo en el experimento 3): ratas control no diabéticas (NDC) por aplicación tópica diaria de jalea de petrolato blanco (“vehículo”); ratas diabéticas (grupo D) tratadas tópicamente diariamente con únicamente vehículo; ratas diabéticas tratadas con los compuestos probados.

Al final de este período de tiempo, las seis

heridas circulares por rata se evaluaron clínicamente midiendo con un calibrador el diámetro de las heridas en milímetros, se recolectaron muestras de sangre, las ratas se sacrificaron y disecaron muestras de piel para la evaluación histológica/histoquímica y bioquímica como se describe más abajo.

El día siete después de crear las heridas estandarizadas, todos los animales se anestesiaron, se recolectaron muestras de sangre para glucosa en sangre (One Touch Ultra Glucometer; Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ) y mediciones de HbA1c (Bayer A1CNow Selfcheck, Sunnyvale, CA) y, después se completaron los procedimientos de más abajo, las ratas se sacrificaron por inhalación de CO_2.

Se tomaron fotografías para mediciones clínicas para evaluar el cierre de heridas (18 heridas por grupo experimental). El porcentaje de reducción de la superficie de la herida se calculó midiendo el diámetro (en milímetros) de cada herida antes y después del protocolo de tratamiento.

Se extirparon tejidos de herida el día 7 de dos sitios por rata y se reunieron para análisis bioquímico. Cada grupo de tejido se homogeneizó, se extrajo a 4°C con urea 5 M en amortiguador de Tris-HCl 50 mM (pH 7.8) que contenía NaCl 0.2 M y $CaCl_2$ 5 mM durante la noche y entonces se centrifugó por 1 hora a 11,000 x g, como lo describimos previamente. Los sobrenadantes se dializaron contra amortiguador de Tris-HCl,

NaCl y $CaCl_2$ y las proteinasas se purificaron parcialmente por sulfato de amonio agregadas al 60% de saturación. Las proteinasas precipitadas se analizaron por ELISA por colagenasas MMP-8 (Sigma-Aldrich Life Sciences Inc., St. Louis, MO) y MMP-13 (TSZ Scientific LLC, Framingham, MA).

Se tomaron biopsias de dos sitios de herida, incluyendo tejido circundante sin heridas y se fijó en formalina amortiguada neutra al 10% por 24 horas y entonces se transfirieron a etanol al 50% antes de la recaudación, deshidratación, limpieza con xileno, incrustación en parafina y corte. Cortes o secciones de 5 micrómetros se tiñeron con H y E y Tricromo de Masson y se midió histomorfométricamente la distancia entre los márgenes de la herida usando un micrómetro ocular calibrado y se confirmó el análisis de las imágenes. Las últimas dos heridas por rata se disecaron, hidrolizaron y analizaron por hidroxiprolina como se describe más abajo.

Al final de los protocolos de tratamiento de 14 días y 30 días, las mediciones físicas e histológicas y evaluaciones histoquímicas son las mismas que aquellas descritas anteriormente para el experimento de 7 días. Además, para los tres períodos de tiempo, las muestras de tejido de las biopsias de punzón de 6 mm se hidrolizaron dos veces en NaOH 2 N a 120°C por 1 hora cada una. Entonces de analizaron alícuotas de 50 µL de hidrolizados de tejido de

piel por hidroxiprolina, un aminoácido esencial encontrado únicamente en el colágeno.

Ejemplo 5.8: Tratamiento y/o prevención de la retinopatía diabética y nefropatía diabética.

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se evaluó usando el modelo de ratón diabético usando la cepa de ratón DBA/2 con inducción de diabetes por STZ y seguimiento de la retinopatía diabética y daño al riñón. Cinco semanas después de la inducción de diabetes vía la inyección de una baja dosis de STZ por 5 días consecutivos, la relación de albúmina:Cr en la orina es 424 veces en comparación con 36.9 para controles con edad similar.

Para el tratamiento de la nefropatía diabética, los ratones DBA/2 se indujeron con STZ (dosis baja por 5 días consecutivos). Una semana después de completar la inducción, se midieron los niveles de glucosa y los ratones con niveles de menos de 15 mmol/L (280 mg/0.1 L) se removieron del estudio puesto que no habían desarrollado diabetes de severidad suficiente para dar como resultado daño renal. Los niveles de glucosa se monitorearon semanalmente y 5 semanas después de la inducción con STZ se llevó a cabo la evaluación bioquímica del daño renal midiendo los niveles de albúmina y creatinina en orina y confirmando que estaban dentro del intervalo deseado. Después de completar exitosamente esta

etapa, los animales fueron asignados a grupos de tratamiento.

El tratamiento se efectuó por cuatro semanas (dosificación IV) con evaluación semanal de los niveles de glucosa en sangre y albúmina/creatinina en orina. Después de finalizar el período de tratamiento de los animales, se tomaron las siguientes muestras:

- Sangre para la medición de glucosa y Nitrógeno Urea en Sangre (BUN)

- Sangre para la medición de creatinina en suero

- Orina para la relación final de albúmina/creatinina.

- Se extirparon los riñones y FFPE: se llevó a cabo la tinción con Rojo Picro-Sirius, Tricromo de Masson y H y E para identificar áreas de fibrosis, junto con evidencia de Esclerosis mesangial, Hialinosis arteriolar, Engrosamiento de la Membrana Basal Glomerular (GBM)

Para evaluar el efecto del compuesto sobre la retinopatía diabética, se tomaron imágenes semanales de los animales vía la Cámara Fundus. Inmediatamente antes del sacrificio, a los animales se les inyectó FITC-dextran vía la vena de la cola. Durante el muestreo, se muestrearon los ojos y se fijaron en formalina. Se prepararon montajes planoretinales y se examinaron de manera fluorescente observando los efectos del compuesto sobre la vasculatura y fuga de los vasos (indicada por una alta tinción de fondo).

Grupos animales (n = 8 ratones por grupo):

Tabla 50:

Grupo	No. de Animales	Compuesto
1	3	Control Negativo (no-inducido)
2	3	Control Positivo (Inducido)
3	8	Captopril 50 mg/kg
4	8	Ia-001a 15 mg/kg I.V.
5	8	Ia-001aTZ 15 mg/kg I.V.
6	8	Ic-007a 15 mg/kg I.V.
7	8	Ib-010a 15 mg/kg I.V.
8	8	IIIc-061a 15 mg/kg I.V.
9	8	IVc-059a 15 mg/kg I.V.
10	8	IVc-059a 150 mg/kg P.O.

El tratamiento continuo por 4 semanas (28 días) con medición semanal de glucosa en sangre y albumina/creatinina en orina.

Sacrificio después de la última dosificación del compuesto (agente), órgano y muestro de sangre.

Tabla 51: programa de estudio

Tiempo (Semanas)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	Fin con el sacrificio en S9
STZ	Dosis (5 días)	---	----	---	---	---	---	---	---	---
Prueba		Glucosa en sangre	Glucosa en sangre		Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina
Compuesto	---	---	---	---	---	Dosis IV, diariamente	Dosis IV, diariamente	Dosis IV, diariamente	Dosis IV, diariamente	---

Órgano										Sangre (Plasma) Riñones Ojos

Observaciones en serie

Peso corporal: Se midió el peso corporal de todos los ratones en el estudio y se registró diariamente; esta información se usó para calcular la dosificación precisa para cada animal.

Signos y síntomas generales: Los ratones se observaron diariamente y se notó cualquier signo de tensión o cambios de la condición general, por ejemplo, pelaje estrellado, falta de movimiento, dificultad para respirar.

Muestreo y análisis posterior en vida

• Inmediatamente antes del muestreo terminal, 4 animales por grupo se inyectaron con FITC-dextran para la evaluación del montaje plano retinal.

• Muestreo terminal:

o Se tomaron muestras de sangre terminal vía punción cardíaca y plasma/suero preparado de cada animal.

■ Glucosa en sangre medida

■ Creatinina en suero medida

■ BUN medida

■ ALB/CREATININA en orina

■ ELISAs para CRP, TNF-α, IL-6 y TGF-β

■ Los plasmas restantes se almacenaron para análisis de citocina

o Se recolectó y pesó tejido de riñón

■ Un riñón se congeló inmediatamente para el posible bioanálisis u otros análisis.

■ Un riñón se fijó en formalina y se incrustó en cera de parafina.

• Tinción con H y E y Tricromo de Masson para la detección de

o Esclerosis Mesangial y glomeruloesclerosis,

o Hialinosis arteriolar

o Engrosamiento de GBM

o Tejido de ojo para ser FFPE

■ El otro ojo (4 por grupo de tratamiento) se usó para el análisis del montaje plano retinal para medir el patrón vascular

■ Área cubierta por vasos

■ Valoración de la fuga vascular

Finalización: Los animales en estudio terminal se sacrificaron vía inhalación de CO_2. Antes de la finalización, los animales se pesaron.

Resultados: los compuestos Ia-001a, IIIc-061 y IVc-059a redujeron significativamente el nivel de glucosa en sangre en la cepa de ratón DBA/2 con inducción de diabetes por STZ como se muestra en la Figura 9 (se muestra una y dos semanas).

Ejemplo 5.9: Tratamiento y/o prevención de la

enfermedad de Behçet (BD)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se probó usando el modelo murino de enfermedad de Behçet de acuerdo a lo descrito por ZHENG et al. (Acta Derm Venereol 2015; 95: 952-958).

La enfermedad de Behçet es un trastorno crónico, recurrente, multisistémico e inflamatorio que afecta principalmente a la mucosa oral y urogenital y al tracto uveal. Aunque la etiología y patogénesis de la enfermedad de Behçet se desconoce, se han propuesto numerosas etiologías, incluyendo factores ambientales, infecciosos e inmunológicos; una base autoinmune, caracterizada por complejos inmunes en circulación y activación del complemento, ha ganado cada vez más aceptación. Para probar y comprender la inmunopatogénesis de la enfermedad de Behçet, se desarrollaron modelos animales basados en contaminantes ambientales, péptidos derivados de proteínas de choque térmico bacteriano y humano e inyecciones de virus. El uso de esos modelos animales por separado y/o conjuntamente permite una investigación más efectiva en la enfermedad de Behçet.

Recientemente se han desarrollado modelos animales para encontrar opciones de tratamiento eficientes y seguras. La activación de los neutrófilos es uno de los aspectos de la inmunopatogénesis de la BD. Los neutrófilos tienen un papel central en las respuestas inmunes innatas. Puesto que las

lesiones típicas de la BD como la foliculitis pustular, reacciones de patergia e hipopión tienen infiltraciones significativas de neutrófilos, se han investigado las funciones y estado de activación de los neutrófilos. Existen reportes conflictivos de las producciones de superóxido incrementada, normal o basal disminuida y estimulada por fMLP, fagocitosis, quimiotaxis y adhesión endotelial de los neutrófilos en la BD. En presunto modelo de transgénico HLA mic para la BD, la única anormalidad observada es el incremento de la liberación de superóxido en respuesta a fMLP. También están presentes altas respuestas de superóxido también en pacientes HLA-B51+ y controles sanos en el mismo estudio.

El modelo de ratón como el de la enfermedad de Behçet se desarrolló inoculando a HSV tipo 1 que creció en células Vero en ratones macho de 4-5 semanas de edad del Instituto de Investigación del Cáncer (ICR). De manera breve, los lóbulos de las orejas de ratones experimentales se rayaron con una aguja y se inocularon dos veces el virus, con un intervalo de 10 días. Los ratones infectados se observaron por 16 semanas después de la inoculación final. Los ratones inoculados con HSV que presentan al menos 2 síntomas similares a Behçet se usaron como modelo de ratón similar a BD (n = 5). Ambos ratones infectados con ICR (n = 2) e inoculados con HSV, pero son ratones asintomáticos.

Ejemplo 5.10: Tratamiento y/o prevención de la Uveítis (UVE)

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se probó usando modelos animales de uveítis autoinmune incluyendo Uveítis inducida por endotoxinas (EIU) en rata de acuerdo a lo descrito por Fruchon S et al. (Molecules. 2013;18(8):9305-9316. Publicado el 5 de agosto de 2013. doi: 10.3390/molecules18089305). Este modelo se considera un modelo clínicamente relevante para la uveítis anterior humana. Consiste en la administración sistémica de lipopolisacárido (LPS) que resulta en una respuesta inflamatoria aguda en los segmentos anterior y posterior del ojo con ruptura de la barrera ocular sanguínea e infiltración de células inflamatorias. Los signos clínicos de la EIU reflejan los cambios observados en la enfermedad humana. El efecto terapéutico de los compuestos de la invención se probó de este modo en el modelo de EIU en ratas, en comparación con el "estándar de oro" de dexametasona.

Animales: Se inscribieron solo animales con signos no visibles de defectos oculares. Los animales se examinaron durante el período previo a la prueba y se prestó atención particular a los ojos. Se mantuvieron en observación por una semana antes de la experimentación. Los animales se alojaron individualmente en jaulas estándar y tuvieron acceso libre a alimento y agua de la llave.

Estudio de Tolerancia Ocular: El estudio consistió de tres grupos de tres ratas Sprague-Dawley macho. El día 0, los animales se pesaron, se anestesiaron y se les administró una sola inyección intravítrea de 5 µL en ambos ojos. El primer grupo recibe el vehículo salino (NaCl al 0.9%) y los otros grupos reciben diferentes dosis de los compuestos de la presente invención. Cada animal se evaluó entonces por observación clínica y exámenes de los ojos. Los exámenes oculares incluyen fundoscopia, examen lámpara de hendidura (SLE) de la córnea usando tinte de fluoresceína que permite el puntaje de McDonald-Shadduck. El sistema de puntaje de McDonald-Shadduck aborda los parámetros conjuntivales (congestión, hinchazón y descarga), ráfaga acuosa (intensidad del fenómeno de Tyndall) como evidencia presuntiva de ruptura de la barrera hematoacuosa; inyección de los vasos secundario y terciario en el iris; turbidez, área relativa de la misma, neovascularización e integridad epitelial (marcado con fluoresceína) de la córnea; integridad de la lente. Después del examen ocular final, todos los animales son sacrificados. Los ojos se recolectaron en la necropsia, se fijaron en solución de Davidson modificada por 12 h, seguido por formalina amortiguada neutra al 10% y se procesaron para histología. Las secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina se evaluaron a través de microscopía de luz por un patólogo veterinario ampliamente certificado.

Modelo de Rata de Uveítis Inducida por Endotoxina (EIU): Treinta y seis ratas macho albinas de Lewis se dividieron aleatoriamente en seis grupos de seis animales cada uno. La EIU se indujo inyectando la almohadilla de la pata 100 µL de solución salina estéril libre de pirógenos que contenía: 200 µg de LPS (lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium*, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Francia). Los animales se trataron inmediatamente antes de la inducción por EIU inyectando intravítreamente 5 µL en ambos ojos de solución salina (NaCl al 0.9%) que no contenía ingrediente activo o con los compuestos probados o 20 µg de dexametasona. Los animales se examinaron con una lámpara de ranura (SLE) a las 24 h, es decir, el pico clínico de la enfermedad en este modelo. La intensidad de la inflamación ocular clínica se calificó sobre una escala de 0 a 5 para cada ojo. El grado 0 indica ausencia de inflamación. El grado 1 indica la presencia de una vasodilatación mínima del iris y la conjuntiva, pero sin observación de ráfagas o células en la cámara anterior (CA). El grado 2 indica la presencia de dilatación moderada de vasos en el iris y la conjuntiva, pero sin ráfaga o células evidentes en la CA. El grado 3 indica la presencia de dilatación intensa de los vasos del iris, ráfaga y menos de diez células por campo de lámpara de ranura en la CA. El grado 4 indica la presencia de signos clínicos más severos que el grado 3, con más de diez células por campo de

ranura de lámpara en la CA, con o sin la formación de un hipopión. El grado 5 indica la presencia de reacción inflamatoria intensa, formación de fibrina en la CA y reclusión total de la pupila. Al final del experimento, es decir, 24 h después del desafío con LPS, las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital (30 mg/kg) y entonces se sacrifican con una dosis letal de pentobarbital.

Medición de las Concentraciones de Citocina en Fluidos Oculares: Se retiró el humor acuoso y vítreo de ambos ojos de cada animal después del sacrificio. Las cantidades de citocinas proinflamatorias TNFα, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-17 e IFNγ así como citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 se determinaron por análisis múltiples.

Medición de las Concentraciones de Citocina en Suero: Se recolectaron los sueros de los tres grupos de ratas (vehículo de solución salina, 10 µg de compuesto y dexametasona) al final del experimento y se almacenaron a -80°C. Se usaron para la determinación simultánea de los niveles de cinco citocinas (IFNγ, TNFα, IL-2, IL-4 e IL-10) con el Arreglo Cartométrico de Perlas (rat CBA Flex set, BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.) sobre un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las cantidades de cada una de las citocinas se analizaron con relación a curvas estándar

usando el software de Arreglo FCAP (BD Biosciences).

Ejemplo 5.11: Tratamiento y/o prevención de polineuropatía sensorial motora diabética y neuropatía diabética

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se probó usando modelos de rata de neuropatía periférica diabética (Kambiz S. et al. (PLoS One. 2015;10(6):e0131144]; PLoS One.2015; 10(5):e0126892. Publicado el 18 de mayo de 2015. doi:10.1371/journal.pone.0126892).

Animales: Se compraron ratas hembra WAG/RijHsd (n = 27, 10 semanas de edad, con un peso de 130-150 gramos) de Charles River (l'Arbresle, Francia). Los animales se alojaron en pares en cajas encapuchadas a temperatura ambiente en un programa de luz/oscuridad de 12 horas y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

Inducción de diabetes: Se indujo diabetes en 21 ratas por medio de una sola inyección intraperitoneal de STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a una dosis de 65 mg/kg de peso corporal en amortiguador de citrato de sodio 0.05 mol/L, pH 4.5, como se describió anteriormente. Las ratas se asignaron aleatoriamente en 3 grupos: A, B y C (n = 7 en cada grupo). Después de la inducción de la diabetes, el grupo A se sacrificó 4 semanas después, el grupo B 6 semanas después y el grupo C 8 semanas después. El grupo de control

consistió de 6 ratas que recibieron una sola inyección intraperitoneal con un volumen igual de vehículo sin STZ. Las ratas de control se siguieron por 8 semanas. La glucosa en sangre se midió de la sangre de la vena de la cola por medio de un glucómetro (OneTouch, LifeScan, Milpitas, California, EE. UU.). La diabetes se diagnosticó en ratas, cuando los niveles de glucosa en sangre son mayores de 20 mmol/L durante las 4 semanas después de la inducción de diabetes.

Flujo de sangre y oxigenación de la piel de la planta de las patas traseras: Se usó un sistema combinado de flujometría láser Doppler y espectrofotometría (02C, LEA Medizintechnik, Giessen, Alemania), para medir de manera no invasiva el flujo sanguíneo y saturación de oxígeno de las patas traseras plantares glabras. En ambas ratas diabéticas y de control el porcentaje de saturación de oxígeno y la cantidad de flujo en sangre se midió a las 4, 6 y 8 semanas.

Velocidad de recalentamiento después de la exposición al frío: La temperatura de la piel se evaluó usando la cámara de video digital infrarroja integrada (320 × 240 píxeles) por el sistema de adquisición de datos de 1 Hz (ThermaCAM Researcher 2001 HS; FLIR Systems, Berchem, Bélgica) y todos los datos se recolectaron continuamente por medio de una computadora portátil. La distancia entre la cámara y la pata trasera es de 13 cm ± 2 cm. El tamaño de píxel de los registros de temperatura es de 0.8 x 0.8 mm. La

temperatura de la piel de toda la pata trasera plantar se registró mientras el animal estaba inmovilizado después de colocar el animal en una placa a 14°C por 5 segundos. La temperatura mínima de las patas traseras plantares se exportó a archivos de texto usando el ThermaCAM Researcher Pro (versión 2001-HS; FLIR Systems, Wilsonville, Oregón, EE. UU.). El área de interés se seleccionó trazando una línea rodeando todas las patas traseras plantares. La velocidad de recalentamiento promedio se demostró como el incremento en la temperatura de la piel por 120 segundos.

Sensibilidad térmica: Para determinar la ocurrencia de hipersensibilidad térmica, se efectuaron pruebas en placa fría y caliente como se describió anteriormente. De manera breve, las ratas se colocaron en una cámara de extremos abiertos con paredes claras con una temperatura superficial de 5°C (placa fría) o 50°C (placa caliente). Esos experimentos se efectuaron el día separado para prevenir interferencia. Se observó el tiempo hasta que se retiró o lamia la pata trasera.

Prueba de Von Frey: En la prueba de Von Frey, usada para determinar el umbral de sensibilidad mecánica para la nocicepción, cada rata se colocó en una cámara con piso de malla de metal. Entonces, se aplicaron pelos de Von Frey, que van de 2 a 300 gramos, 5 veces y se registraron como positivos cuando se observó un mínimo de 3 movimientos de las

patas (la respuesta de retiro reflejo del animal), como se describió anteriormente. El grupo de control sirvió como el grupo de referencia.

Electromiografía (EMG): Se evaluó la inervación de los axones motores en músculos registrando las amplitudes en pico-pico CMAP evocadas y latencias de los músculos gastrocnemios en los grupos diabéticos y animales de control. Las amplitudes pico-pico CMAP y latencias se registraron y promediaron sobre un lote de 20 respuestas. Las amplitudes promedio en cada grupo de diabetes se compararon con el grupo de control. La MNCV se calculó como la distancia del electrodo estimulante al electrodo de registro (mm)/latencia (ms).

Preparación del tejido: Después de 4, 6 u 8 semanas, los animales se sacrifican por una sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg ip). Para cada rata, se disecó la piel plantar de la pata trasera y se fijó directamente por inmersión en paraformaldehído lisina-peryodato (PLP) al 2% por 24 horas a 4°C. La piel se procesó adicionalmente y se incrustó en gelatina como se describió anteriormente. Finalmente, la piel incrustada se seccionó a 40 µm con un micrótomo de congelación y se recolectó en glicerol para el almacenamiento a largo plazo a -20°C.

Se cosechó el tejido del páncreas de las ratas, se fijó en solución de formalina amortiguada neutra al 10% y se

incrustó en parafina. Posteriormente, esos especímenes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E). Cada espécimen se evalúo por medio de un microscopio de campo brillante y se barrió en portaobjetos digitales (serie Nanozoomer 2.0, Hamamatzu, Japón).

Inmunohistoquímica: La inmunohistoquímica de las secciones de piel se efectuó como se describió anteriormente para semicuantificar la densidad de fibras nerviosas sensoriales que inervan la piel y para evaluar la presencia de células endoteliales positivas a CD-31. Las secciones de piel se incubaron por 48 horas en un cóctel de BSA al 2% que contenía anticuerpo primario diluido Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5, 1/10.000, anti-rabbit, Enzo Life Sciences, Nueva York, EE. UU.) o anti-CD31+ (1/5000, anti-conejo, Spring Bioscience, California, EE. UU.) a 4°C. Posteriormente, las secciones o cortes de piel se incubaron con el anticuerpo biotinilado secundario apropiado marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (1/200, Biotina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) por 90 min a TA. Entonces se usó la reacción de 3,-3' diaminobencidina (DAB) para revelar los sitios de unión antigénica de los anticuerpos primarios. Posteriormente, las secciones o cortes se montaron sobre portaobjetos y las secciones teñidas con CD31+ se tiñeron con tionina al 0.05% por 4 minutos, lo cual coloreó los queratinocitos de azul. Finalmente, todas las secciones de piel se deshidrataron

usando etanol absoluto (< 0.01% de metanol), se transfirieron a xileno y se cubrieron con cubre objetos con Permount (Fisher Scientific, Hampton, NH).

Cada sección o corte de piel se barrió en 3 capas de 8 µm cada uno por medio del Nanozoomer 2.0 (serie Nanozoomer 2.0, Hamamatzu, Japón). Cuatro secciones de piel proximales y 4 distales de la pata trasera plantar se cuantificaron por las fibras nerviosas epidérmicas en la parte central de la pata trasera plantar (80.000 μm^2) usando un objetivo de 40x en el software ImedadScope (Aperio ImedadScope v11.1.2.760). Se calcularon las fibras nerviosas marcadas por mm^2 y el espesor epidérmico promedio para cada rata. Se calculó el porcentaje de células CD31 positivas por Leica Cell-D (Olympus, Imaging software for life science microscopy, EE. UU.) en 4 secciones de piel proximales y 4 distales sobre toda la dermis superior de la pata trasera plantar.

Ejemplo 5.12: Tratamiento y/o prevención de la fibrosis intestinal

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se probó usando modelos de rata o murino de acuerdo a lo descrito por Pham BT et al. (Physiol Rep. 2015;3(4):e12323. doi:10.14814/phy2.12323).

Preparación de los núcleos intestinales de rata y ratón: Se usaron ratas Wistar y ratones C57BL/6 macho adultos

en ayunas (Harlan PBC, Zeist, Los Países Bajos). Las ratas y los ratones se alojaron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h en una sala con temperatura y humedad controladas con alimento (Harlan chow no 2018, Horst, Los Países Bajos) y agua *ad libitum*. Se permitió que los animales se aclimataran por al menos siete días antes del inicio del experimento.

Las ratas y ratones se anestesiaron con isoflurano/O_2 (Nicholas Piramal, London, Reino Unido). Se extirparon el yeyuno de rata (aproximadamente 25 cm distales al estómago y 15 cm de longitud) y yeyuno de ratón (aproximadamente 15 cm distales al estómago y 10 cm de longitud) y se preservaron en amortiguador de Krebs-Henseleit (KHB) enfriado sobre hielo suplementado con 25 mm de d-glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania), 25 mm $NaHCO_3$ (Merck), 10 mm de HEPES (MP Biomedicals, Aurora, OH), saturado con carbógeno (O_2 al 95% / CO_2 al 5%) y se ajustó a pH 7.4. El yeyuno se limpió enjuagando con KHB a través del hueco central y posteriormente se dividió en segmentos de 2 cm. Los segmentos se llenaron con solución de agarosa al 3% (p/v) en NaCl al 0.9% a 37°C y se incrustaron en la unidad de incrustación de núcleos de agarosa.

Preparación de núcleos intestinales humanos: Se obtuvo tejido de yeyuno humano sano para investigación de intestino que se resecó de pacientes sometidos a pancreaticoduodenectomía.

El yeyuno sano se preservó en KHB enfriado en hielo hasta el procedimiento de incrustación. Se removió cuidadosamente la submucosa, musculares y serosa de la mucosa dentro de una hora después de la recolección del tejido. La mucosa se dividió en hojas de 0.4 cm × 1 cm. Esas hojas se incrustaron en solución de agarosa al 3% (p/v) en NaCl al 0.9% a 37°C y se insertaron en la unidad de incrustación.

Preparación de PCIS: La PCIS se preparó en KHB enfriado en hielo por medio de la rebanadora de tejido Krumdieck (Alabama Research and Development). Las rebanadas con un peso húmedo de 3-4 mg tenían un espesor estimado de 300-400 µm. Las rebanadas se almacenaron en KHB enfriado con hielo hasta el inicio de los experimentos.

Incubación de las rebanadas intestinales: Las rebanadas se incubaron en placas de 12 pozos para PCIS humano (hPCIS) y PCIS de rata (rPCIS) o en placas de 24 pozos para PCIS de ratón (mPCIS). La hPCIS y la rPCIS se incubaron individualmente en 1.3 mL y mPCIS en 0.5 mL de Medio E de Williams con L-glutamina (Invitrogen, Paisly, Reino Unido) suplementado con 25 mm de glucosa, 50 µg/mL de gentamicina (Invitrogen) y 2.5 µg/mL de anfotericina-B (Invitrogen). Durante la incubación (a 37°C y O_2 al 80% / CO_2 al 5%) en una incubadora (MCO-18M, Sanyo), las placas se agitan horizontalmente a 90 rpm (amplitud de 2 cm). Las rPCIS se incubaron hasta 24 h, las mPCIS y hPCIS se incubaron hasta 72

h, con y sin TGF-β1 humano (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en el intervalo de concentración de 1 a 10 ng/mL. Todas las incubaciones se efectuaron múltiples veces (usando 3-6 rebanadas incubadas individualmente en pozos separados) y se repitieron con intestino de 3 a 16 humanos, ratas o ratones diferentes.

Viabilidad y morfología: La viabilidad se evaluó midiendo el contenido de trifosfato de adenosina (ATP) de las PCIS. De manera breve, después de la incubación, las rebanadas se transfirieron a 1 mL de solución de sonicación (que contenía etanol al 70% y 2 mm de EDTA), se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Para determinar la viabilidad, se midieron los niveles de ATP en el sobrenadante de las muestras sonicadas por 45 seg y se centrifugaron por 2 min a 4°C a 16,000 × g, usando el equipo de bioluminiscencia de ATP (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los valores de ATP (pmol) se normalizaron al contenido de proteína total (µg) de las PCIS estimadas por el método de Lowry (BIO-rad RC DC Protein Assay, Bio Rad, Veenendaal, Los Países Bajos). Para evaluar la morfología, las rebanadas incubadas se fijaron en formalina al 4% y se incrustaron en parafina. Cortaron secciones de 4 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). Las secciones HE se calificaron de acuerdo a un puntaje de Park modificado, que describe la secuencia del desarrollo de daño al tejido en el

intestino después de isquemia y reperfusión. La integridad de siete segmentos del PCIS se calificó sobre una escala de 0 a 3. La viabilidad de la capa del epitelio, estroma, criptas y musculo se calificó por separado siendo 0 si no existe necrosis y 3 si está presente necrosis masiva. Las otras partes de la rebanada intestinal se clasificaron como sigue: Forma del epitelio: 0 = epitelio cúbico, 3 = más de 2/3 de las células son planas, aplanamiento de los vellos: 0 = normal, 3 = más de 2/3 de los vellos están aplanados y la cantidad de edema: 0 = sin edema, 3 = edema severo. Un puntaje máximo de 21 indica daño severo. En muestras humanas, el puntaje morfológico de la mucosa muscularis se determinó en la sección de la "capa muscular". B.T.P., W.T.v.H. y J. N. calcularon el puntaje ciego; se calculó la media de tres puntajes totales.

Expresión génica: La expresión de los genes de fibrosis, es decir, COL1A1, αSMA, HSP47, CTGF, FN2, TGF-β1, PAI-1 y SYN, se determinó por el método de Taqman o SYBRgreen. En hPCIS, la expresión del gen ELA también se midió por el método SYBRgreen.

La fibrosis intestinal es un resultado serio, aunque común en pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). A pesar de los avances en el desarrollo de modalidades de tratamiento novedosas para controlar la inflamación crónica del intestino característica de la IBD, a

la fecha no existen terapias antifibróticas efectivas. Por lo tanto, una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que subyacen a la fibrosis intestinal y la disponibilidad de modelos animales relevantes son críticos para mover esta área de investigación hacia adelante.

IL-17 y mediadores asociados: Las células Th17 definen un subconjunto de células T auxiliares que producen principalmente IL-17A, pero también IL-17F, IL-21 e IL-22 y son cada vez más reconocidas como plasmas importantes en varios trastornos inflamatorios crónicos, incluyendo la IBD (7). IL-17A está implicada en la fibrosis en múltiples órganos, incluyendo el pulmón (8), hígado (9) y corazón (10); estudios recientes también apoyan su papel en el intestino, enlazando las respuestas inmunes de IL-17/Th17 y otros mediadores asociados en la patogénesis de la fibrosis intestinal.

Otros modelos animales de fibrosis intestinal se describen aquí más abajo:

Tabla 52:

CATEGORÍA	MODELO	MODO DE ADMINISTRACIÓN/RESULTADO
Inducida químicamente	DSS	Administrado en agua de beber, causando daño epitelial y permeabilización de la mucosa colónica con inflamación aguda posterior; reciclaje de DSS causa inflamación crónica y por consiguiente fibrosis
	TNBS	La administración de enema colónico de TNBS/etanol daña la barrera epitelial y causa inflamación transmural dependiente de células T; la administración a largo plazo da como resultado fibrosis colónica

Microbiana	PG-PS	La inyección directa en la pared del intestino del seco y delgado induce enterocolitis granulomatosa con fibrosis significativa
	Inyección fecal	La inyección de suspensión fecal directamente en la pared del intestino del colon causa colitis agresiva y fibrosis transmural
	Infección crónica por *Salmonella*	La administración oral después del pretratamiento con estreptomicina causa inflamación de la mucosa colónica y transmural con fibrosis significativa
	Infección por AIEC	La toma de aislado de CD humano de AIEC, NRG857, después del tratamiento previo con estreptomicina causa inflamación íleo-colónica y mediada por Th1, Th17 y Fibrosis
Ratón manipulado genéticamente	TGFβ1-Tg TβRIIΔk-fib-Tg	La administración de enema de esos vectores adenovirales que sobreexpresan TGFβ en el colon conduce a inflamación aguda y crónica, deposición de ECM y engrosamiento de las capas muscularis.
	MCP-1-Tg	La inyección intramural del vector adenoviral que contiene MCP-1 en el recto conduce a inflamación transmural, deposición de colágeno y fibrosis
	Deficiente en IL-10	El agotamiento genético de IL-10 resulta en lesiones inflamatorias transmurales del colon abscesos en la cripta y engrosamiento de la pared intestinal; evidencia de susceptibilidad incrementada al desarrollo de fibrosis posterior a la cirugía en el intestino delgado después de la resección íleo-cecal
Mediada por el sistema inmune	Transferencia de células T	La transferencia de las células T CD4+/CD45RB^{alta} donadora en ratones receptores inmunodeficientes resulta en enfermedad debilitante, colitis y fibrosis leve
Espontánea	SAMP1/sepa de ratón YitFc	Desarrolla ileítis terminal espontánea y fibrosis posterior

Ejemplo 5.13: Tratamiento y/o prevención de la fibrosis ovárica

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se probó usando el modelo murino del síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) descrito por Pala Ş et al. (Drug Des Devel Ther. 2015;9:1761-1766. Publicado el 24 de marzo de 2015. doi:10.2147/DDDT.S75266) para examinar los efectos de los compuestos tratados sobre la

histopatología ovárica, VEGF en suero y niveles de endotelina 1 en el síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) en un escenario experimental.

Animales: Se usaron ratas albinas Wistar hembra, de 22 días de edad y se dividieron aleatoriamente en grupos. Se administraron subcutáneamente 10 UI de hormona estimulante de los folículos en 15 ratas durante 4 días consecutivos, con la inducción de OHSS el día 5 con 30 UI de gonadotropina coriónica humana. El grupo 1 comprende ratas control de 35 días de edad, el grupo 2 comprende ratas con OHSS de 35 días de edad, el grupo 3 comprende ratas con OHSS de 27 días de edad recibiendo los compuestos de prueba por 7 días. Todas las ratas se decapitaron entonces el día 35. Se evaluó VEGF en suero, endotelina 1 y reserva folicular ovárica en todas las ratas.

El hematocrito y mediciones de peso se efectuaron el día 13 y la decapitación se efectuó el día 35 bajo anestesia general por administración intraperitoneal de ketamina (75 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg).

Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas: Se obtuvieron aproximadamente 3 mL de muestra de sangre de cada rata decapitada. Se separaron por centrifugación los sueros de las muestras de sangre a 2,500 rpm por 4 minutos y se mantuvieron a -20°C hasta los ensayos de VEGF y endotelina 1. El VEGF se ensayó usando un equipo de ensayo inmunosorbente

ligado a enzima para VEGF de ratón (ELM-VEGF-001; RayBio, EE. UU.) y la endotelina se midió usando el equipo de endotelina 1 E (EK-023-01; Phoenix Pharmaceuticals, EE. UU.).

Morfología ovárica: Después de la laparotomía se removieron los ovarios y se limpió el tejido adherente en medio de cultivo y se pesaron. El tejido ovárico se fijó con formaldehído al 10% y entonces se cortaron muestras de tejido incrustadas en parafina transversales de 4 µm para la estimación del conteo folicular ovárico medio. Las secciones o cortes se tiñeron con Tricromo de Masson para determinar la OFR bajo el microscopio de luz (Olympus BX-50). Las secciones transversales de 4 µm de espesor se montaron a intervalos de 50 µm sobre portaobjetos de microscopio para evitar el conteo de la misma estructura dos veces, de acuerdo con un método previamente descrito. 12 folículos se clasificaron como primordiales, primarios, secundarios y terciarios. Un folículo atrésico (AF) se define como un folículo que presenta más de diez núcleos picnóticos; para los folículos más pequeños, los criterios para la atresia son un ovocito degenerado de formación de antro precoz o ambos.

Mediciones del resultado principal: Las mediciones del resultado principal son la edad (días), peso (g), hematocrito (%), peso de los ovarios (mg), niveles de VEGF en suero (pg/mL) y endotelina 1 (ng/mL) y conteo total de folículos con determinación de los números de folículos

primordiales, primarios, secundarios y terciarios.

Ejemplo 5.14: Tratamiento y/o prevención del síndrome ovárico poliquístico (SOP)

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se probó usando el modelo animal de hiperfibrosis ovárica inducida por DHEA de acuerdo a lo descrito por Wang D et al. (J Ovarian Res. 2018; 11(1):6. Publicado el 10 de enero de 2018. doi:10.1186/s13048-017-0375-7).

El síndrome del ovario poliquístico (SOP) es un trastorno metabólico y endocrino común con mecanismos patológicos que siguen siendo poco claros. El siguiente estudio investiga la formación de hiperfibrosis ovárica vía la vía de señalización del factor del crecimiento transformador-β (TGF-β) en el modelo de rata de síndrome ovárico poliquístico (SOP) inducido por deshidroepiandrosterona (DHEA).

Animales: Se usaron treinta ratas Sprague-Dawley (SD) hembra, de 21 días de edad, con un peso de ~50 g para este ensayo. Los animales se alojaron en un ambiente especifico libre de patógenos (SPF) con una temperatura de 22 ± 1°C, humedad relativa de 50 ± 1% y ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. Se proporcionó acceso libre a alimento y agua.

Métodos: Treinta ratas Sprague-Dawley hembra se dividieron aleatoriamente en el grupo de Blanco (n = 6),

grupo con Aceite (n = 6) y grupo modelo inducido con Aceite + DHEA (n = 6 + 12). Los grupos modelo se establecieron por inyección subcutánea de DHEA por 35 días consecutivos. Las ratas se dividieron adicionalmente en grupo de vehículos (n = 6) y grupo tratado (n = 6). El tratamiento se proporcionó una vez al día y el tratamiento durara 35 días. Dieciocho días después del tratamiento, se recolectaron raspados vaginales de todas las ratas sobre una base diaria juzgando los tipos de células por 14 días, para determinar sus ciclos de celo diariamente. El día 36, todas las ratas de los grupos de Blanco y tratados con aceite y seis ratas de los grupos modelo inducidos con DHEA se sacrificaron por eutanasia (usando inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 5% en exceso), se recolectó la sangre (de la vena cava superior), se disecaron los ovarios y úteros bilaterales.

Los ovarios se fijaron en paraformaldehído al 4% por 24 h a 4°C y entonces se incrustaron en parafina. El resto de los tejidos se congelaron a -80°C para el análisis mediante Western blotting y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (TA-PCR) adicional.

Las 12 ratas restantes de los grupos modelo inducidos con DHEA se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos adicionales: grupo tratado y grupo de tratamiento con vehículo (grupo de control), seis ratas por grupo. Durante este tratamiento, ya no se proporcionó DHEA a las ratas. El

tratamiento dura 2 semanas, después de las cuales todos los animales son sacrificados por eutanasia y se recolecta la sangre y los ovarios y úteros bilaterales se disecan siguiendo las instrucciones mencionadas anteriormente.

La morfología ovárica, localización y expresión de fibrina y colágeno en ovarios se detectaron usando tinción con H y E, inmunohistoquímica y tinción con rojo Sirio. La proteína y ARN ovárico se examinaron usando Western blot y TA-PCR.

Ciclo de celo: El día 18 después del tratamiento con DHEA, se recolectaron raspados vaginales de todas las ratas. Las muestras se trataron entonces con azul de toluidina por 30 min y posteriormente se examinaron la morfología celular y ciclos bajo el microscopio óptico (Leica Microsystems, Alemania).

Niveles de hormonas en suero: Se recolectaron muestras de sangre de la vena cava superior. El suero se separó inmediatamente y almacenó a -20°C para la determinación adicional de hormonas por ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) (testosterona (T), estradiol (E2), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de los folículos (FSH)) (Equipos de ELISA rata T, E2, LH y FSH, USCN, Wuhan, China).

Ejemplo 5.15: Tratamiento y/o prevención de la colangitis biliar primaria (CBP)

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se evaluó usando el modelo murino de CBP de acuerdo a lo descrito por Hohenester S et al. (Cells. 2020, 9(2), 281. doi: 10.3390/cells9020281).

Las enfermedades hepáticas colestásicas como la colangitis biliar primaria (CBP) o colangitis esclerosante primaria (CSP) son trastornos crónicos progresivos que frecuentemente resultan en cirrosis hepática, con sus complicaciones posteriores. Se considera que las sales biliares hidrofóbicas promueven la fibrosis hepática en la colestasis. Sin embargo, la evidencia de esta hipótesis ampliamente aceptada sigue siendo escasa.

En el establecimiento de los modelos animales de colestasis, por ejemplo, por modificación de Mdr2, la colestasis y fibrosis son ambas secundarias al daño biliar.

Por lo tanto, para probar la contribución específica de la acumulación de sales biliares a la fibrosis hepática en la enfermedad colestásica, se usó el único modelo de colestasis hepatocelular inducible en ratones Atp8b1G308V/G308V alimentados con colato. Se suplementó glicoquenodesoxicolato (GCDCA) para humanizar las sales biliares reunidas, de acuerdo a lo confirmado por HPLC. Se cuantificaron los biomarcadores de colestasis y fibrosis hepática. Se aislaron las células estrelladas hepáticas (HSC) de ratones silvestres estimulados con sales biliares. Se

determinó la proliferación, acumulación celular y deposición de colágeno de HSC. En ratones Atp8b1G308V/G308V colestásicos, la expresión hepática incrementada de ARNm de αSMA y colágeno 1a y deposición de colágeno hepático en exceso indica el desarrollo de fibrosis hepática únicamente después de la suplementación con GCDCA. *In vitro*, los números de miofibroblastos y disposición de colágeno se incrementan después de la incubación con sales biliares hidrofóbicas pero no hidrofílicas y asociados con la activación de EGFR y MEK1/2. Las sales biliares pueden tener efectos pro-fibróticos directos sobre HSC, que involucra putativamente la señalización de EGFR y MEK1/2.

Experimentos con animales: Se usaron animales macho para los estudios *in vivo* a las 8 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y se alojaron en un ambiente enriquecido con acceso *ad libitum* a la dieta y agua.

Bioquímica Sérica y Mediciones de Sales Biliares en Suero: Los niveles en suero de fosfatasa alcalina, bilirrubina y alanina aminotransferasa se cuantificaron de suero fresco en un analizador completamente automatizado respons® 910 (DiaSys, Holzheim, Alemania). Los niveles totales de sales biliares en suero se cuantificaron enzimáticamente usando un equipo de sales biliares totales de Diazyme (Diazyme Laboratories, Poway, CA, EE. UU.) de acuerdo

a las instrucciones del fabricante.

Histología del Hígado, Inmunohistoquímica y Cuantificación de Hidroxiprolina: Se cortaron bloques de parafina en rebanadas de 4 µm de espesor y se montaron sobre portaobjetos del microscopio (Superfrost plus, Thermo Scientific/Menzel, Braunschweig, Alemania). Después de la desparafinización y rehidratación gradual, los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina y eosina de acuerdo a los procedimientos estándar. La inmunohistoquímica se efectuó contra alfa-SMA, usando un anticuerpo monoclonal anti-actina de músculo liso alfa de conejo (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Para la cuantificación del colágeno, los portaobjetos se tiñeron por 1 h con Rojo Directo 80 (Rojo Sirio, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) y se destiñeron dos veces en etanol y una vez en xilol. Para cuantificar el ADN total como un sustituto del número de células, las HSC se incubaron con PicoGreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y se detectaron las señales de fluorescencia con un sistema CytoFluor 4000 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, EE. UU.). La proliferación de HSC se cuantificó usando un equipo de ensayo BrdU (Roche, Penzberg, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para cuantificar el conteo total de células, las HSC, se sembraron en Lab-Tek II Chambers Slides (Nunc, Rochester, NY, EE. UU.), se montaron sobre portaobjetos con cubre objetos con medio de montaje

Vectashield que incluía DAPI (Vector, Burlingame, CA, EE. UU.). Los portaobjetos se barrieron con un Pannoramic Midi Slide Scanner (3DHistech, Budapest, Hungría) y el conteo de los núcleos se efectuó con el software ImedadJ2 sobre todo el portaobjetos (0.7 cm^2).

Cuantificación de colágeno *In Vitro*: Las células se lavaron con PBS y se tiñeron por 1 h con Rojo Sirio al 0.1% en ácido pícrico saturado. Las células se lavaron entonces tres veces con etanol al 100%, el tinte unido se disolvió en metanol/hidróxido de sodio al 50% (50 mmol/L) y la absorción se midió a 540 nm.

Ejemplo 5.16: Tratamiento y/o prevención de la fibrosis o cirrosis hepática (HF)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención para inhibir la inflamación hepática crónica espontánea y fibrosis se evaluó usando los modelos murinos de Fibrosis por Inflamación NOD establecidas (N-IF), de acuerdo a lo descrito por Fransén Pettersson et al. (PLoS One. 2018; 13(9): e0203228. doi: 10.1371/journal.pone.0203228).

Animales: Los ratones N-IF desarrollan espontáneamente inflamación crónica y fibrosis hepática impulsada por células T asesinas naturales transgénicas (NKT)-II receptoras de células T (TCR) generado en ratones inmunodeficientes NOD.Rag2-/-. Varios componentes de la

patología hepática en el ratón N-IF se traslapan con aquellos de las condiciones humanas en las cuales una inflamación crónica progresiva precede al desarrollo de fibrosis. Además, se ha demostrado que la fibrosis que se desarrolla en el hígado de ratón N-IF está asociada con una acumulación de células estrelladas hepáticas que expresan α-SMA. Esas similitudes fenotípicas hacen el modelo de ratón N-IF único comparado con otros modelos de roedor disponibles para fibrosis hepática y proporciona una herramienta novedosa para probar la eficacia de los fármacos antifibróticos candidatos.

Los animales se observaron diariamente por signos de mala salud, se recolectó la orina y se midió la proteína en la orina. Se registraron los pesos del hígado y riñón al momento de la disección. El hígado y riñón disecados de cada animal se fijaron, seccionaron y tiñeron con Rojo Sirio y H y E. Una pieza de cada hígado se usó para las mediciones de hidroxiprolina.

Medición de hidroxiprolina: El contenido de hidroxiprolina en el hígado y bazo se determinó usando el Equipo de Ensayo Colorimétrico de Hidroxiprolina (BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.).

Histología: Después del tratamiento, los ratones se anestesiaron y perfundieron con PBS vía punción intracardíaca. Se pesaron los hígados y bazos y las biopsias de órganos se fijaron en formalina amortiguada neutra al 4%,

se incrustaron en parafina y se seccionaron o cortaron.

Ejemplo 5.17: Tratamiento y/o prevención de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se evaluó usando el modelo murino NASH de acuerdo a lo descrito por Barbara Ulmasov B. et al. {*Hepatology Communications, 2018, 3(2)-https://doi.org/10.1002/hep4.1298*).

Ratones: Ratones hembra C57BL/6J de 5 semanas de edad se alojaron en instalaciones estándar bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclo de luz/oscuridad 12 horas/12 horas con acceso libre a agua.

Modelo de Ratón Deficiente en Colina, L-Aminoácido Definido, Alto en Grasa de NASH: Se obtuvieron 22 dietas deficientes en colina, con aminoácido definido, altas en grasa (CDAHFD)22 de Research Diets (A06071309; New Brunswick, NJ). Esta dieta se formuló como una dieta alta en grasa deficiente en colina que incluye 0.1% de metionina y 45% de Kcal% en grasa (20% de manteca, 25% de aceite de soja). La dieta de control es un alimento para roedores estándar que contiene un 13.6% de calorías de grasa. Partiendo de la edad de 6 semanas, se colocaron 30 ratones en CDAHFD y 30 ratones se colocaron en la dieta estándar. Al final de las 6 semanas, 10 ratones de cada grupo de dieta ayunaron por 5 horas y se sacrifican. Se recolectaron muestras de sangre e hígado. Los

hígados se dividieron en secciones que se fijaron en formalina amortiguada con fosfato al 10%, se congelaron en nitrógeno líquido o se colocaron en una solución de estabilización de ARN para evaluación futura. Los ratones restantes se mantuvieron en las dietas por 4 semanas más para un total de 10 semanas y entonces ayunaron, se sacrifican y se recolectaron muestras.

Análisis bioquímico: El contenido de triglicéridos hepáticos se midió usando el equipo de ensayo colorimétrico de triglicéridos (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los niveles en plasma de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol fueron medidos comercialmente por Advanced Veterinary Laboratory (Saint Louis, MO).

TA-PCR: Se efectuaron Reacciones en Cadena de la Polimerasa por Transcripción Inversa Cuantitativa en Tiempo Real para calcular los cambios en la abundancia de ARNm.

Histopatología: Las secciones o cortes de hígado fijados en formalina se incrustaron en parafina, cortados a 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) utilizando un protocolo estándar para evaluación microscópica. Para evaluar el contenido de colágeno en hígado, las secciones de hígado incrustadas en parafina se tiñeron con tintes rojo sirio/verde rápido. El rojo sirio se une a todos los tipos de

colágenos, mientras que el verde rápido tiñe proteínas no colagenosas.

Las secciones de hígado se pretrataron para remover parafina y los núcleos se tiñeron usando solución de hematoxilina férrica de Weigert. Después del lavado, los tejidos se tiñeron con rojo sirio al 0.1% (Rojo Directo 80; Sigma, Saint Louis, MO), verde rápido al 0.1% FCF certificado (Sigma) en ácido pícrico saturado por 2 horas. Los portaobjetos se lavaron entonces en agua, se deshidrataron con etanol y xileno y finalmente se montaron en Permaslip (Alban Scientific, Inc., Saint Louis, MO). El grado de acumulación de colágeno se evaluó por análisis morfométrico.

Determinación del Contenido de Hidroxiprolina Hepática: El contenido de hidroxiprolina se determinó como una medida de la cantidad del colágeno total presente en el hígado. Los tejidos hepáticos se homogeneizaron en agua destilada, precipitado con ácido tricloroacético e hidrolizados por 48 horas en HCl 12 N a 105°C. Las muestras se evaporaron y los sedimentos secos se reconstituyeron en agua destilada. Las muestras reconstituidas se centrifugaron por 10 minutos a 13,000 g y los sobrenadantes se diluyeron con HCl 12 N para alcanzar una concentración de HCl 4 N en las muestras finales. El contenido de hidroxiprolina hepática se determinó usando el Ensayo de Hidroxiprolina de Tejido Sensible.

Inmunohistoquímica: Los tejidos de hígado fijados en formalina se pretrataron para remover la parafina por métodos estándar. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó por incubación en peróxido de hidrógeno al 3.3% en metanol por 1 hora a temperatura ambiente.

Detección de Células Apoptóticas en Tejidos Hepáticos: Las células apoptóticas en tejidos hepáticos se identificaron marcando y detectando rupturas de la cadena de ADN por el método de etiquetado de puntas con trifosfato de desoxiuridina mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) usando el equipo de Detección de Peroxidasa ApopTag (Millipore, Temecula, CA). Se contaron las células apoptóticas teñidas con morfología de hepatocito. Para detectar células apoptóticas con morfología de HSC, el tejido de hígado teñido con TUNEL se tiñó posteriormente con el anticuerpo para desmina (un marcador de HSC), excepto que la actividad peroxidasa del anticuerpo secundario se detectó con el equipo de Sustrato de Peroxidasa ImmPACT VIP (Vector Laboratories).

Western Blot: El Western blot se efectuó como se describe usando los siguientes anticuerpos primarios: **anticuerpos** antifosforilados contra homólogo decapentapléjico 3 (p-SMAD3), ab52903, 1:1,000 (Abcam); anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (anti-GAPDH), sc-25778 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX).

Ejemplo 5.18: Tratamiento y/o prevención de la Nefropatía Diabética o Enfermedad Renal Diabética (DN o DKD)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se investigó *in vivo* usando el modelo de ratón de diabetes tipo I (diabetes inducida por STZ).

Modelo animal: Ratas 129/SV macho de 10 semanas de edad (Charles River, Alemania) se mantuvieron en jaulas ventiladas individualmente, recibiendo una dieta estándar con acceso libre a agua de la llave. Ratones 129/SV en pares por peso recibieron 125 mg/kg de peso corporal de STZ (Sigma-Aldrich) en citrato de sodio 50 mM (pH 4.5) o amortiguador de citrato de sodio (grupo de control no diabético) intraperitonealmente el día 1 y 4 para la inducción de hiperglucemia (glucosa > 15 mmol/L). Los ratones no recibieron insulina durante el estudio.

A los ratones diabéticos se les administró placebo (solución salina) por 12 semanas por los compuestos probados. El peso corporal y los niveles de glucosa se midieron cada semana. La HbA1c (Olympus AU400) y Función renal (creatinina en suero) se midieron a las 6 y 12 semanas. La albuminuria se evaluó usando un equipo de ELISA de albúmina de ratón. Se efectuaron estudios de velocidad de conducción nerviosa sensorial (NCV) en ratones anestesiados con isoflurano al 2% en la semana 6 y 12. La NCV sensorial de la cola se determinó

estimulando aproximadamente a lo largo de la cola a una distancia registrada de 3 cm. Para la medición, se usó un tamiz neuronal de Toennies Inc. Después de 12 semanas de seguimiento los ratones se sacrificaron por eutanasia y se efectuó la toracotomía bilateral y laparotomía y los riñones se perfundieron con solución salina enfriada en hielo a través del ventrículo izquierdo.

Inmunohistoquímica: Para la inmunofluorescencia, se procesaron secciones de tejido (2 µm) fijadas en paraformaldehído e incrustadas en parafina. Después de bloquear con suero de conejo al 10%, las secciones de parafina se tiñeron con anticuerpos contra pP38 y F4/80 y con un anticuerpo secundario conjugado a Cy3.

Ejemplo 5.19: Tratamiento y/o prevención de la Nefropatía Diabética, Enfermedad Renal Diabética y Retinopatía Diabética en el modelo diabético inducido con STZ.

Para el estudio se usó un total de 70 ratones CD-1 hembra con edades de 5-7 semanas con un peso de aproximadamente de 25-30 g. Esos se compraron de Charles River, Reino Unido y tuvieron un período de aclimatación de 7 días. Los animales se alojaron en jaulas IVC (hasta 5 por jaula) con los ratones individuales identificados por marcas en la cola. Todos los animales se les permitieron acceso libre a dieta comercial certificada estándar y agua

purificada durante el estudio. La sala de retención se mantuvo bajo condiciones estándar: 18-24°C, humedad de 55-70% y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

Todos los protocolos usados en este estudio han sido aprobados por el Comité de Evaluación Ética y Bienestar Animal y todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo las directrices de las Leyes para Animales (Procedimientos Científicos) 1986.

Los ratones (excepto el grupo de control negativo) fueron inyectados con STZ (55 mg/kg; IP) diariamente por 5 días consecutivos. Los ratones se privaron de alimento por 6 horas antes de la inyección. Una semana después de completar la inducción, se monitorearon los niveles de glucosa y los ratones con niveles menores de 15 mmol/L (280 mg/gL) se retiraron del estudio puesto que no habían desarrollado la severidad de diabetes ideal. Los niveles de glucosa se monitorearon semanalmente y 5 semanas después de la inducción con STZ se llevó a cabo la evaluación bioquímica del daño renal midiendo los niveles de albúmina y creatinina en la orina y confirmando que estaban dentro del intervalo deseado. Después de completar exitosamente esta etapa, los animales se asignaron grupos de tratamiento.

Tabla 53:

Grupo	No. de Animales	Agente	Nivel de dosis; Ruta
1	3	Control Negativo (no inducido)	Vehículo; IV
2	3	Control Negativo (Inducido)	Vehículo; IV

33	8	Ia-001a	15 mg/kg; IV
4	8	Ia-001a-TZ	15 mg/kg; IV
5	8	Ic-001a-Tz/1-004a	15 mg/kg; IV
6	8	Ic-007a	15 mg/kg; IV
7	8	Ib-010a	15 mg/kg; IV
8	8	IIIc-061a	15 mg/kg; IV
9	8	IVc-059a	15 mg/kg; IV
10	8	Captopril	50 mg/kg; PO

El tratamiento continuó por 4 semanas (28 días) con medición semanal de la glucosa en sangre y albúmina/creatinina en orina. Este programa de estudio se detalla más abajo observando semanalmente (semanas 5 a 9) los niveles de glucosa en sangre, relaciones de albúmina creatinina en orina y terminalmente (semana 9) la química sanguínea y citosinas, histología renal y fuga retinal del ojo.

Tabla 54:

Tiempo (Semanas)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Sacrificio al final de la Semana 9
STZ	Diariamente por 5 días	---	----	---	---	---	---	---	---	---
Prueba		Glucosa en Sangre	Glucosa en Sangre		Glucosa en Sangre ALB/CREA en Orina	Glucosa en Sangre ALB/CREA en Orina	Glucosa en Sangre ALB/CREA en Orina	Glucosa en Sangre ALB/CREA en Orina	Glucosa en Sangre ALB/CREA en Orina	Glucosa en Sangre ALB/CREA en Orina
Compuesto	---	---	---	---	---	Dosis IV, diariamente	Dosis IV, diariamente	Dosis IV, diariamente	Dosis IV, diariamente	---
Órgano										Sangre (Plasma) Riñones Ojos

Resultados

Signos Clínicos: Se observó una caída inicial en el peso corporal para muchos grupos de tratamiento, esto puede esperarse y en la mayoría de los casos, el peso corporal se recuperó gradualmente hacia el final del período de dosificación. Los pesos corporales de algunos animales cayeron por debajo del 90% del peso corporal inicial, sin embargo, ningún animal tuvo que ser colocado en descanso de la dosificación.

Glucosa en Sangre: La inducción con STZ dio como resultado un incremento significativo en la glucosa en sangre en comparación con los controles con vehículo no inducidos (Tabla 55). El tratamiento con IVc-059a IV dio como resultado una reducción significativa** de los niveles de glucosa en sangre en comparación con los controles con vehículo inducidos el día 28. El tratamiento con IIIc-061a IV también dio como resultado una reducción de los niveles de glucosa en sangre, sin embargo, estos no alcanzaron una importancia estadística.

Tabla 55: Concentración media de glucosa en sangre el día 0 y el día 28 de ratones ICR-CD1 hembra en un modelo de diabetes inducida por STZ. Los valores mostrados son la media ± DE; n = 3 para los grupos con vehículos no inducidos e inducidos; n = 8 para todos los grupos de tratamiento.

Grupo de Tratamiento	Tratamiento	n	Concentración media el día 0 (mmol/L) (DE)	Concentración Media el día 28 (mmol/L) (DE)	Valor de p comparado con el control con vehículo
1	Control negativo (no inducido)	3	6.7 (0.2)	8.9 (1.8)	n/a
2	Control negativo (Inducido)	3	24.9 (1.8)	33.0 (-)	n/a
3	Ia-001a	8	25.7 (6.3)	31.6 (3.8)	0.7082
4	Ia-001a-TZ	8	24.9 (7.4)	30.8 (6.2)	0.5618
5	Ic-001a-Tz/1-004a	8	25.8 (5.7)	29.6 (7.8)	0.3745
6	Ic-007a	8	25.5 (5.7)	31.1 (4.6)	0.6241
7	Ib-010a	8	25.1 (6.1)	31.1 (3.4)	0.6110
8	IIIc-061a	8	24.8 (6.2)	26.3 (7.8)	0.0775
9	IVc-059a	8	24.3 (6.4)	23.7 (6.6)	0.0159
10	Captopril	8	23.7 (6.9)	32.2 (2.3)	0.8256

Peso del riñón: No hubo diferencia estadística en el peso del riñón húmedo o en el peso del riñón como porcentaje del peso corporal del animal.

Albúmina en Orina:Creatinina (ALB:CRE): La orina se recolectó semanalmente y se reunió para cada grupo de tratamiento. El tratamiento con Ib-010a, IIIc-061a y IVc-059a dio como resultado ALB:CREA reducida (Tabla 56) en el último tratamiento el día 28 antes del sacrificio (semana 9 del programa).

Nitrógeno de Urea en Sangre (BUN): El tratamiento con Ic-007, Ib-010a, IIIc-061a y IVc-059a dio como resultado niveles de nitrógeno de urea en sangre que fueron significativamente menores que los de los controles con

vehículo inducidos.

ELISA: Al final del período de tratamiento se recolectó sangre y se procesó hasta suero. Los niveles en suero de PCR, TGF-β, IL-6 y TNF-α se cuantificaron usando equipos ELISA disponibles comercialmente, los resultados se muestran en la Tabla 56.

CRP en suero: Niveles de CRP en suero en ratones ICR-CD1 hembra en un modelo de diabetes inducida por STZ después de 28 días de tratamiento. Los niveles de CRP en suero se incrementaron significativamente en los animales inducidos con STZ. El tratamiento con Ia-001a, Ia-001aTz y el Captopril de control dio como resultado niveles reducidos significativamente de CRP en suero en comparación con los controles inducidos con vehículo (**p = 0.0074, *p = 0.0304 y **p = 0.0026 respectivamente, ANOVA de una vía, Tabla 56).

TGF-β en suero: Los niveles de TGF-β en suero se elevaron significativamente en los controles inducidos con STZ. El tratamiento con todos los compuestos además de Ic-007a y IIIc-061a dio como resultado niveles de TGF-β que fueron significativamente menores que los de los controles inducidos con vehículo ($p \leq 0.05$; ANOVA de una vía, Tabla 56).

Los niveles de IL-6 en suero se elevaron significativamente en los controles inducidos con STZ. El tratamiento con todos los compuestos además de IVc-059a y el

compuesto de control Captopril dieron como resultado niveles de IL-6 que fueron significativamente menores que los de los controles inducido con vehículo ($p \leq 0.05$; ANOVA de una vía, Tabla 56).

Los niveles de TNF-α en suero se elevaron significativamente en los controles inducidos con STZ. El tratamiento con Ia-001a, Ia-001aTz, Ic-001aTz/1-004a y IIIc-061a dio como resultado niveles de TNF-α que fueron significativamente menores que los de los controles inducidos con vehículo ($p \leq 0.05$; ANOVA de una vía, Tabla 56).

Histología del riñón: Al final del período de dosificación se efectuó la cuantificación de colágeno y los animales fueron sacrificados y los riñones disecados. El tejido se fijó en formalina y se incrustó en cera de parafina y entonces se tiñó con Tricromo de Masson de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El colágeno se cuantificó usando un método publicado por Chen et al., 2017. La cobertura de colágeno se incrementó significativamente en los controles con vehículo inducidos con STZ en comparación con los controles con vehículo no inducidos. El tratamiento con IIIc-061a y IVc-059a dio como resultado la disminución significativa de los niveles de colágeno en comparación con los controles con vehículo inducidos ($p = 0.0210$ y $p = 0.0134$ respectivamente; ANOVA de una vía, Tabla 56).

Puntaje de la enfermedad: El puntaje de la

enfermedad renal se cuantificó tiñendo con H y E de la esclerosis mesangial y glomeruloesclerosis, hialinosis arteriolar y engrosamiento de GBM. Obviamente, el puntaje de la enfermedad se incrementó significativamente en los controles con vehículo inducidos en comparación con los controles con vehículo no inducidos. El tratamiento con todos los compuestos además de Ic-001aTz/1-004a dio como resultado la disminución significativa del puntaje de la enfermedad en comparación con los controles con vehículo inducidos ($p \leq 0.005$; ANOVA de una vía, Tabla 56).

Histología de la retina del ojo: Al final del período de dosificación, inmediatamente antes del muestreo terminal, 4 animales por grupo se inyectaron con FITC-dextran para la evaluación del montaje plano retinal y los animales se sacrificaron y los ojos se disecaron. Los montajes planos retinales se prepararon y sometieron a imagenología usando un microscopio fluorescente (EVOS, Thermo Fisher). El área cubierta por la vasculatura se incrementó significativamente en los controles con vehículo inducidos con STZ en comparación con los controles con vehículo no inducidos. El tratamiento con Ic-007a, IIIc-061a y IVc-059a dio como resultado la disminución significativa de la cobertura por vasculatura en comparación con los controles con vehículo inducidos ($p = 0.0432$, $p = 0.0337$ y $p=0,0131$ respectivamente; ANOVA de una vía, Tabla 56).

Tabla 56: Relación de albúmina y creatinina en orina (ALB:CRE), BUN en sangre, CRP en sangre, TGF-beta en sangre, IL-6 en sangre, TNF-alfa en sangre, Tinción con tricromo (Fibrosis renal), puntaje de la enfermedad y área del ojo el día 28 de tratamiento (semana 9 del programa)

Grupo	Tratamiento de 28 días	n	ALB: CRE	BUN	CRP	TGF-beta	IL-6	TNF-alfa	Tinción con tricromo	Puntaje de la enfermedad	Área del ojo
1	Control negativo (no inducido)	3	1.45	15.8 ± 0.4	3558 ± 106	11.64 ± 0.81	70.56 ± 1.25	261.7 ± 21	0.48 ± 0.4	1 ± 0	6.7 ± 1.2
2	Control negativo (Inducido)	3	37.04	28.6 ± 0.9	6759 ± 993	19.64 ± 1.97	151.4 ± 15.59	389 ± 24	2.63 ± 0.5	11 ± 2	11.2 ± 1
3	Ia-001a	8	35.68	25.1 ± 3.1	4759 ± 1181	15.54 ± 2.8	114.16 ± 29.96	342.3 ± 15.6	1.87 ± 0.65	7 ± 1	9.9 ± 1.9
4	Ia-001a-TZ	8	29.86	25.3 ± 3.1	5191 ± 993	14.76 ± 2.95	112.35 ± 20.01	327 ± 40.7	2.6 ± 0.98	8 ± 3	11.8 ± 1
5	Ic-001a-Tz/1-004a	8	35.10	24.1 ± 4.1	6077 ± 863	15.48 ± 1.73	104.66 ± 22.89	322.8 ± 40.1	2.48 ± 0. 46	9 ± 1	10.7 ± 2.1
6	Ic-007a	8	38.10	21.7 ± 3.0	5707 ± 892	16.66 ± 2.11	109.27 ± 19.03	326.8 ± 63	2.23 ± 0.61	7 ± 1	9.1 ± 1.1
7	Ib-010a	8	24.28	20.5 ± 3.4	5915 ± 1352	13.17 ± 3.11	102.72 ± 25.4	395.6 ± 46.7	1. 97 ± 0.8	6 ± 1	11.8 ± 1
8	IIIc-061a	8	24.12	22.5 ± 4.1	5963 ± 849	17.35 ± 2.0"	117.59 ± 29.21	324.6 ± 43.6	1.54 ± 0. 55	8 ± 1	9.1 ± 1.1
9	IVc-059a	8	18.85	22.5 ± 2.8	5691 ± 1395	13.47 ± 3.33	120.88 ± 23.05	350.2 ± 41.4	1.48 ± 0.73	7 ± 1	8.7 ± 1.2
10	Captopril	8	24.40	28.5 ± 7.6	4534 ± 821	14.55 ± 2.86	125.56 ± 15.75	415 ± 51.7	1.98 ± 0.47	6 ± 1	11.8 ± 1.4

Ejemplo 5.20: Tratamiento y/o prevención de la Enfermedad Renal Poliquística (PKD o PCKD)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se investigó *in vivo* usando modelos de ratón Pcy como es descrito en Lee EC et al. (Común Nacional 10,4148 (2019).

Modelo preclínico: El ratón pcy, un modelo de PKD en roedores genéticamente relevantes tiene una correlación estrecha con la enfermedad humana para usarse en la evaluación de la eficacia del agente novedoso. Este modelo desarrolla PKD asociada con el gen que causa la enfermedad

humana, proporcionando un modelo de roedor trasladable, el cual refleja estrechamente el desarrollo de PKD humana. Este ha sido caracterizado perfectamente por el progreso de la enfermedad y respuesta al tratamiento, proporcionando un alto nivel de confianza para estudios de descubrimiento de fármacos.

Modelo animal: ratón pcy, cepa CD-1-pcy^{Iusm} (CrownBio) que contiene una mutación genética asociada con el mismo gen que causa la nefronoptisis humana tipo 3. Los síntomas y progreso de la enfermedad son enfermedad quística renal que progresa lentamente con quistes que se desarrollan en los tubos recolectores y otros segmentos de la nefrona que se vuelven quísticos a medida que progresa la enfermedad. Los ratones macho y hembra son afectados de manera similar por la enfermedad. Los ratones son de 5 semanas de edad y reciben dieta normal, dieta normal con el vehículo (control negativo), respectivamente el control positivo y los compuestos de prueba, se mezclaron todos con la dieta normal.

Controles: el vehículo usado para los compuestos se usó como control negativo en un grupo de animales y el tolvaptan, un antagonista del receptor de vasopresina 2 (V2), se usó como un control positivo en un grupo de animales.

Lectura y puntos finales: el volumen de quiste y fibrosis en el riñón, incluyendo la verificación histológica, peso del riñón, BUN en suero, concentración del artículo de

prueba en la sangre, peso corporal y consumo de alimento se registraron semanalmente.

Ejemplo 5.21: Tratamiento y/o prevención de la Fibrosis Inducida por Radiación (RIF)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se investigó *in vivo* usando el modelo de RIF en ratón de acuerdo a lo descrito por Ryu SH et al. (Oncotarget. 2016, 7(13), 15554-15565, doi:10.18632/oncotarget.6952).

La fibrosis inducida por radiación (RIF) es una de las complicaciones tardías más comunes de la terapia por radiación. En el modelo de RIF en ratón, se usó un ensayo de contractura de pierna para evaluar la eficacia *in vivo* de los compuestos.

La fibrosis inducida por radiación (RIF) se caracteriza por acumulación excesiva de matriz extracelular en piel y tejido blando y la proliferación de fibroblastos es una de las complicaciones tardías más comunes de la terapia por radiación. También, la RIF es un proceso irreversible hasta la muerte de tejido fibroso y un proceso dinámico relacionado con la remodelación de tejido cicatrizante por miofibroblastos reactivados.

Modelo de RIF en ratón: Se usaron ratones BALB/c hembra para el modelo de RIF en ratón. Bajo anestesia, el miembro trasero derecho de cada ratón recibe dosis de

radiación a 44 Gy (22 Gy × 2 veces por 2 semanas) usando un acelerador lineal. Se usó protección diseñada especialmente para proteger el resto del cuerpo y se aplicaron bolos de 1 cm de espesor sobre la piel para asegurar una dosis de radiación adecuada sobre la superficie de la pata trasera. Después de la irradiación, los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Cada grupo se tratará una vez al día con solución salina (grupo de control) o compuestos (grupo tratado). Los ratones que no recibieron irradiación o fármaco son utilizados como grupo de control negativo.

Para demostrar el efecto antifibrótico de los compuestos en la piel y tejido blanco de patas irradiadas, se midió el espesor epitelial de la superficie de la epidermis hasta la base de la dermis usando tinción con H y E.

Ejemplo 5.22: Tratamiento y/o prevención de Enfermedad de Stargardt (SD)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se investigó *in vivo* usando el modelo de SD en ratón de acuerdo a lo descrito por Fang Y. et al. (Faseb Journal, 2020, DOI: 10.1096/fj.201901784RR).

Animales: Los Ratones Pigmentados Abca4-/- (129S4/SvJae-Abca4tm1Ght) se comprarán de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maina, EE. UU.). Ratones pigmentados de (129S2/SvPas) naturales (WT) (129S2/SvPas) se obtienen de Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). En cada grupo,

la relación macho a hembra es 1:1. Los ratones se crían y alojan en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 h (aproximadamente 50 lux en jaulas) con alimento y agua *ad libitum*.

Iluminación con luz azul (BLI): Ratones Abca4-/- y WT pigmentados de la misma edad (9 meses) se anestesiaron intraperitonealmente con narcosis de tres componentes que comprende 0.05 mg/kg de fentanilo, 5 mg/kg de midazolam y 0.5 mg/kg de medetomidina. Las pupilas se dilataron con una mezcla de tropicamida al 0.5% e clorhidrato de fenilefrina al 2.5%. Se aplicó METHOCEL (Omni Vision, Puchheim, Alemania) a la córnea humedecida. Durante la iluminación con luz, se colocó un portaobjetos de vidrio sobre la córnea del ojo expuesto. El ojo iluminado de cada ratón se expuso a luz azul (longitud de onda: 430-nm) a una intensidad de 50 mW/cm^2 por 15 minutos. El ojo no iluminado como control se cubrió cuidadosamente para protegerlo contra la luz.

Se efectuó una serie de pruebas incluyendo la Tomografía de Coherencia Óptica (OCT), Microscopía de Luz y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), cuantificación de bisretinoides por HPLC, así como electrorretinografía ERG de campo completo antes y después de siete días de la BLI.

Ejemplo 5.23: Tratamiento y/o prevención de la vitreorretinopatía proliferativa (PVR)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se investigó *in vivo* usando

el modelo de PVR en ratón de acuerdo a lo descrito por Hou H et al. (Ophthalmic Res 2018;60:195-204. doi:10.1159/000488492) o por Márkus B. et al. (FEBS Open Bio. 2017;7(8): 1166-1177. Publicado el 29 de junio de 2017. doi:10.1002/2211-5463.12252).

Muestras de animales: Se usó un modelo de PVR de ratón aplicando una inyección intravítrea de una enzima proteolítica, dispasa. Se sabe que este modelo induce actividad glial así como formación de membrana epi y subretinal.

Las hembras silvestres de 4 a 6 meses de edad se anestesiaron con pentobarbital (90 $mg \cdot kg^{-1}$, i. p.) y también recibieron una gota de clorhidrato de procaína al 1% (Novocaína, EGIS, Budapest, Hungría) como la anestesia local y una gota de tropicamida (Mydrum, Chauvin Aubeans, Montpellier, Francia) para la dilatación del iris. Se inyectaron cuatro microlitros de dispasa (Sigma-Aldrich; 0,4 $U \cdot \mu L^{-1}$, disuelto en solución salina fisiológica) intravítreamente en los ojos derechos bajo control estereomicroscópico (Ctrl) usando una pipeta automática. Los animales Ctrl recibieron 4 µL de solución salina fisiológica estéril. Se tomaron imágenes de tomografía coherente óptica del estrato (OCT; Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, EE. UU.) después de la inyección para confirmar la inducción de PVR y se monitoreó el progreso de la enfermedad. Los ratones Ctrl y

tratados con dispasa se sacrificaron el día 14 después de las inyecciones cuando los signos de formación de PVR eran evidentes: presencia de membrana epirretinal y/o desprendimiento de retina tras el examen OCT.

Preparación y purificación de la muestra: Los cuerpos vítreos de los ratones se aislaron después de la remisión con guillotina de la córnea junto con una galería esclerótica usando una cuchilla de bisturí, seguido por la remoción del lente. Después de la solubilización del cuerpo vítreo con amortiguador de lisis (pH 8.5) que contenía 7 m de urea, 30 mm de Tris, 2 m de tiourea y CHAPS al 4%, los lisados se sonicaron en un baño de agua enfriado con hielo por 5 min y se centrifugaron a 16900 g por 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos Eppendorf LoBind y se purificaron por medio del Equipo Ready-Prep 2-D CleanUp (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) de acuerdo al protocolo del fabricante. Brevemente, después de la precipitación y centrifugación, los sedimentos se secaron y resuspendieron en 240 µL de amortiguador de rehidratación que contenía 7 m de urea, 2 m de tiourea, CHAPS al 4 % p/v, ditiotreitol al 1% (DTT), Bio-Lyte al 2% (Bio-Rad) y azul de bromofenol al 0.001% y se usaron inmediatamente para el enfoque isoeléctrico.

Electroforesis en gel 2D: Tres muestras de humor vítreo provenientes de cada grupo se sometieron a 2-DE.

Primero las tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con un IPG (24 cm, pH 4-7; Bio-Rad) se rehidrataron con proteínas de humor vítreo extraídas usando rehidratación pasiva a 20°C durante la noche. Esto es seguido por enfoque isoeléctrico efectuado aplicando 300 V por 3 h, que se incrementó gradualmente a 3500 V en 5 h y entonces se mantuvo a 3500 V por 18 h. Después del enfoque isoeléctrico, las tiras IPG se colocaron inmediatamente a -70°C hasta el equilibrio. Las tiras de IPG se equilibraron por 15 min en amortiguador de equilibrio (500 mm Tris/HCl, pH 8.5, 6 m de urea, SDS al 2%, glicerol al 20%) que contenía DTT al 0.6% y por 15 min en amortiguador de equilibrio que contenía yodoacetamida al 1.2%. En la segunda dimensión, las tiras se colocaron en la parte superior de geles de poliacrilamida al 12% y se cubrieron con agarosa. Usando una Celda Protean Plus Dodeca (Bio-Rad) la electroforesis se llevó a cabo a 100 mA por gel por 24 h hasta que el tinte azul de bromofenol alcanzó el fondo del gel. Los 12 geles se ensayaron juntos bajo las mismas condiciones. Las proteínas se tiñeron usando tinte fluorescente de rutenio II tris(disulfonato de batofenantrolina) preparado internamente y se registraron 25 imágenes de gel usando el Pharos FX Plus Molecular Imager (Bio-Rad). Se analizaron tres réplicas biológicas en todos los casos, las muestras de los grupos Ctrl y tratados con dispasa se procesaron juntas en el mismo día.

Ejemplo 5.24: Tratamiento y/o prevención de la Degeneración Macular Relacionada con la Edad Húmedo y Seco (ARMD o AMD)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se investigó *in vivo* usando el modelo de AMD murina de acuerdo a lo descrito por Matsuda Y et al. (Mol Ther Nucleic Acids. 2019;17:819-828. doi:10.1016/j.omtn.2019.07.018).

Animales: Ratones hembra C57BF/6J obtenidos de Charles River Laboratories, Japón. Se obtuvieron ratas BN macho. Se obtuvieron conejos blancos de Nueva Zelanda macho (NZW) de Kitayama Labes, Japón. Los ratones, ratas y conejos se mantuvieron bajo condiciones especiales libres de patógenos.

Ensayo EMT y Células RPE: células RPE cultivadas a 37°C se sembraron a 1×10^5 células/pozo en placas de cultivo microtituladoras de 96 pozos. Después de la incubación por 24 h, las células se trataron con FGF2 (2 ng/mL) y TGF-β2 (3 ng/mL) con y sin los compuestos de acuerdo a la presente invención por 3 días. Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de los biomarcadores de EMT α-SMA y colágeno tipo I con PCR en tiempo real cuantitativa.

Ensayo del tapón de Matrigel: Se mezclaron 0.5 mL de solución Matrigel Matrix GFR (factor del crecimiento reducido)-PRF (libre de rojo de fenol) (BD Biosciences) con 1

µg de FGF2 y se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho de ratones C57BL/6J hembra (8 semanas, n = 3). Los compuestos de acuerdo con la presente invención se administraron intraperitonealmente y los tapones de Matrigel se removieron y fotografiaron el día 7 después del implante. La graduación de la angiogénesis se determinó por la concentración de hemoglobina en el tapón de Matrigel, usando el método de cianometahemoglobina de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La densidad óptica a valores de 540 nm (DO540) de las muestras se midieron en un lector de microplacas y las concentraciones de hemoglobina se calcularon de acuerdo con estándares de hemoglobina (Sigma-Aldrich).

Modelos de CNV Inducida por Láser en Ratón: Se instilo solución oftálmica Mydrin-P en los ojos de ratones C57BL/6J macho para dilatar las pupilas. Entonces, se realizó la irradiación con láser (longitud de onda, 532 nm; tamaño de punto, 50 µm; tiempo de irradiación, 0.1 s; salida del láser, 120 mW) en 6 sitios del ojo usando una lámpara de ranura (SL-130) y un fotocoagulador láser multicolor (MC-300), evitando los capilares retinales grandes. Inmediatamente después de la inducción de la CNV por irradiación con láser, se administraron los compuestos de acuerdo con la invención y control a través inyección intravítrea. Siete días después de la irradiación con láser, se administró una solución de FITC-

dextran al 4% en la vena de la cola a un volumen de 0.5 mL/animal. De uno a cinco minutos después de la administración de FITC-dextran, los animales se sacrifican por eutanasia por dislocación cervical. Se removieron los globos oculares y se fijaron en amortiguador paraformaldehído de fosfato al 4% por 12-24 h. Se prepararon montajes planos coroideos bajo un microscopio estereoscópico. Se tomaron fotografías de los sitios con CNV usando un microscopio confocal. A través de los experimentos de CNV animal inducida por láser, se confirmó la irradiación exitosa de cada irradiación como la formación de burbujas de aire en el ojo de modelos animales.

CNV Inducida por Láser en Ratas y Modelos de Fibrosis Subretinal: Se empleó la misma técnica en el modelo de rata usando ratas BN macho. Para el modelo CNV, los ajustes láser son tamaño de punto de 80 µm y tiempo de irradiación de 0.05 s a 120 mW en 8 sitios en la retina-coroide. Para el modelo de CNV de fibrosis subretinal, la potencia del láser usada es de 240 mW. Inmediatamente después de la irradiación con láser, se efectuó la inyección intravítrea con los compuestos de control y probados de acuerdo a la presente invención. Para los estudios de CNV de fibrosis subretinal, se usaron (1) vehículo de solución salina y (2) compuestos de la presente invención (15 µg/ojo para una sola inyección o 2 o 3 inyecciones a intervalos de 2

semanas). Después de la irradiación con láser, para los estudios de CNV, se usó el protocolo FITC-dextran como se indicó anteriormente 14 días después de la irradiación con láser, con preparación de ojos enucleados para la microscopía confocal o el montaje plano de coroide. Para los estudios de fibrosis subretinal, después de 6 semanas, los animales se sacrificaron y los ojos enucleados se preparan para estudios histopatológicos para cuantificar la fibrosis subretinal usando microscopía de luz. Los ojos se incrustaron en bloques de parafina y se seccionaron o cortaron y tiñeron con Tricromo de Masson de acuerdo a los métodos de rutina. La fibrosis se graduó de manera ciega por dos o tres investigadores independientes de acuerdo a la siguiente escala: grado 0, ninguna; grado 1, mínima; grado 2, leve; grado 3, moderada; grado 4, severa.

Ejemplo 5.25: Tratamiento y/o prevención del Pterigión (PTE)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se evalúo sobre la angiogénesis coroidal y el crecimiento de pterigión usando un modelo murino neovascular coroidal (CNV), un ensayo de directo de angiogénesis *in vivo* (DIVAA) y un modelo murino de pterigión.

El pterigión es un crecimiento vascular fibroso benigno de la superficie ocular comúnmente asociado con

incomodidad y ojo rojo y a medida que progresa la enfermedad, con frecuencia se relaciona con disminución de la visión (astigmatismo topográfico) y restricción de la movilidad ocular en casos severos. Una amplia variedad de citocinas proinflamatorias inducidas por factores del crecimiento fibrogénico, tensión oxidativa y metilación del ADN, han sido implicadas en la patogénesis del pterigión. Puesto que algunos de esos factores son afectados por la exposición a la luz ultravioleta (UV), la evidencia actual de múltiples fuentes sugiere que los individuos con alta exposición a la luz solar están en mayor riesgo de pterigión. A pesar de la investigación exhaustiva, no existe una comprensión clara de la patogénesis del pterigión, pero uno de los factores más importantes que contribuyen a la patogénesis son los cambios neoplásicos de las células madre del limbo asociadas con la exposición a la luz UV y el posible papel del virus oncogénico (papiloma virus humano).

A la fecha, se describen tres modelos animales para pterigión, usando la inyección de células de pterigión epitelial humano, matriz extracelular exógena o radiación UV difractada en conejos y ratones. Los resultados del modelo de conejo usando luz UV difractada se enfocan sobre la predicción computarizada del tamaño y forma del crecimiento del tejido, sin análisis histológico. El modelo de ratón mostró características histológicas del pterigión humano, sin

embargo, la manipulación de conejos por procedimientos oftalmológicos es más fácil dado que la estructura y tamaño ocular se asemejan más a la de un humano.

Métodos: Los ratones recibieron agua con o sin los compuestos probados. Para la CNV, se determinó el volumen de la lesión neovascular en montajes planos coroides del epitelio pigmentario retinal (RPE) usando microscopía confocal siete días después de la inducción por láser. Para DIVAA, se implantaron cápsulas de silicón que contenían 10,000 células epiteliales de pterigión humano en los flancos de ratones subcutáneamente. Después de once días, se cuantificó la neovascularización (NV) usando espectrofluorometría después de inyectar en la vena de la cola del murino dextran marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se desarrolló un modelo de célula epitelial de pterigión inyectando 10,000 células epiteliales de pterigión humano en el espacio subconjuntival nasal en ratones alopécicos atímicos.

Medicines de los resultados principales: Se usó la prueba t de Student para evaluar los datos de los modelos de CNV y DIVAA y se usaron preparaciones histológicas para evaluar las lesiones de pterigión.

Ejemplo 5.26: Tratamiento y/o prevención de la coriorretinopatía serosa central (CSC)

La eficacia terapéutica de los compuestos de

acuerdo con la presente invención se investigó *in vivo* usando un modelo animal de CSC de acuerdo a lo descrito por Wei-Da Chio, et al., Life Sci J 2019; 16(12):115-126]. ISSN: 1097-8135).

La patogénesis de la coriorretinopatía serosa central (CSC) aún no está completamente comprendida. El involucramiento de corticosteroides no está en disputa, aunque su papel exacto no ha sido aclarado; otras partes del mecanismo que subyace a la CSC se han determinado principalmente por técnicas de formación de imágenes como angiografía con fluoresceína e indocianina verde. Aunque la mayoría de los casos de CSC son autolimitantes, existen cursos severos, así como recurrentes y para esos pacientes solo está disponible un número limitado de opciones de tratamiento: fotocoagulación con láser, con un riesgo de escotoma y neovascularización coroidal y terapia fotodinámica.

Método: El tratamiento se efectuó con ratas SD macho con CSCR. El ojo derecho de los casos se dividió aleatoriamente en 2 grupos (con compuestos de control y probados) que se sometieron a una serie de exámenes incluyendo oftalmoscopia indirecta y barrido de OCT cada semana. Todas las ratas SD se indujeron en el modelo de CSCR primero. Si la CSCR desaparece bajo las imágenes de OCT, el compuesto se considera eficiente.

Ejemplo 5.27: Tratamiento y/o prevención de la Fibrosis Quística (FQ) que afecta a los pulmones, pero también al páncreas, hígado, riñones e intestino

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo a la presente invención se investigó *in vivo* usando modelos murinos de CF de acuerdo a lo descrito por McCarron A et al. (Respir Res. 2018;19(1):54. Publicado el 2 de abril del 2018. doi: 10.1186/s12931-018-0750-y)

En humanos, la enfermedad pulmonar de la fibrosis quística (FQ) se caracteriza por infección crónica, inflamación, remodelación de las aéreas y obstrucción por mucosa. Una falta de manifestaciones pulmonares en los modelos de ratón de CF ha impedido la investigación de la patogénesis de la enfermedad de las vías aéreas, así como el desarrollo y prueba de agentes terapéuticos potenciales. Sin embargo, recientemente, modelos animales de CF generados incluyendo modelos en ratas, hurones y cerdos demuestran una gama de fenotipos de la enfermedad pulmonar bien caracterizados con varios grados de severidad. Están disponibles diferentes fenotipos de vía aérea de modelos animales de CF actualmente disponibles y presentan aplicaciones potenciales de cada modelo en la investigación de la CF relacionada con las vías aéreas. En particular, se han desarrollado alelos mutantes con mutaciones comunes que causan la CF humana comunes (por ejemplo, Phe508del o

Gly551Asp) en la secuencia de CFTR de ratón.

Ejemplo 5.28: Tratamiento y/o prevención de la Fibrosis Pulmonar Idiopática (IPF)

La eficacia terapéutica de los compuestos de acuerdo con la presente invención se investigó *in vivo* usando el modelo animal de IPF de acuerdo a lo descrito por Chen SS et al. (J Thorac Dis. 2017;9(1):96-105. doi:10.21037/jtd.2017.01.22).

La IPF es una enfermedad pulmonar intersticial crónica progresiva con fibrosis pulmonar severa. La etiología de la IPF aún no está clara. Los pacientes usualmente solo sobreviven 2-3 años después de ser diagnosticados con IPF. La incidencia y desarrollo de la IPF está asociada con daño a las células epiteliales, proliferación de fibrocitos, reacciones inflamatorias y deposición de matriz extracelular. La manifestación patológica de la IPF es la neumonía intersticial usual (NIU). Actualmente, la mortalidad en pacientes con IPF es muy alta. Sin embargo, se carece de tratamientos para la IPF. La causa principal de muerte asociada con IPF es la exacerbación aguda de la IPF (AE-IPF), la cual contabiliza más del 50% de las muertes relacionadas con IPF. La mayoría de los pacientes con AE-IPF son incapaces de tolerar la broncoscopia o biopsia de pulmón debido a su condición crítica. La falta de biopsias de AE-IPF limita sustancialmente las investigaciones en la muerte de la AE-

IPF. Los modelos con animales de experimentación que podrían imitar la AE-IPF serían herramientas útiles para estudiar la AE-IPF.

Se usaron modelos animales de IPF con bleomicina (BLM). El modelo de rata de la IPF se desarrolló con una perfusión intratraqueal con BLM. Teóricamente, una segunda perfusión intratraqueal con BLM induciría daño pulmonar adicional en las ratas que ya desarrollan fibrosis pulmonar desde la primera perfusión. La lesión pulmonar adicional puede asemejarse a las características patológicas de la AE-IPF.

Ratas Sprague Dawley (SD) se distribuyeron aleatoriamente en grupos diferentes: un grupo de control tratado con compuestos solos, un grupo modelo de AE-IPF con compuestos + BLM + el grupo con BLM, un grupo modelo de AE-IPF (grupo con cpd + BLM + BLM), un grupo modelo de IPF tratado con los compuestos (grupo con Cpd + BLM), un grupo modelo de IPF (grupo con BLM) y un grupo de control normal sin BLM.

Las ratas en los grupos con BLM + BLM se sometieron a una segunda perfusión con BLM el día 28 después de la primera perfusión con BLM. Las ratas en los otros dos grupos recibieron solución salina como segunda perfusión. Seis ratas en cada grupo se sacrificaron el día 31, el día 35 y día 42 después de la primera perfusión, respectivamente.

Las características patofisiológicas de las ratas en el grupo con BLM + BLM se asemejan a aquellas de los pacientes con AE-IPF y como se describe (Chen SS, J Thorac Dis 2017;9(1):96-105), una segunda perfusión con BLM parece indicar la exacerbación aguda de la fibrosis pulmonar y puede usarse para modelar AE-IPF en ratas. Los efectos de las formulaciones de compuestos en este modelo de rata usando AE-IPF inducida usando una sola y dos perfusiones intratraqueales con bleomicina respectivamente mejoraran los hallazgos histopatológicos (secciones teñidas con H y E y Masson analizadas y calificadas por el daño pulmonar agudo) así como la supervivencia.

Ejemplo 5.29: Fibrosis Pulmonar Inducida por Bleomicina en ratones C57BL/6 con 21 días

Se usó un total de 40 ratones Balb/c macho con edades de 8-10 semanas para el estudio. Esos se compraron de Charles River, Reino Unido y tuvieron un período de aclimatación de 7 días. Los animales se alojaron en jaulas IVC (hasta 5 por jaula) con los ratones individuales identificados por marcas en la cola. A todos los animales se les permitió acceso libre a una dieta comercial certificada estándar y agua purificada durante el estudio. La sala de alojamiento y retención se mantuvo bajo condiciones estándar: 18-24°C, 55-70% de humedad y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

Todos los protocolos usados en este estudio han sido aprobados por el Comité de Evaluación Ética y Bienestar Animal y todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo las directrices de la Ley de para Animales (Procedimientos Científicos) de 1986.

Los ratones fueron anestesiados usando una inyección IP de xilazina y ketamina. Una vez que alcanzó un plano apropiado de anestesia, los animales se instilaron con 1.0 U/kg de sulfato de bleomicina vía la ruta intratraqueal. El volumen total de líquido fue de 50 µL. Los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento como se muestra en la Tabla 57 a continuación:

Tabla 57:

Número de Grupo	Inducción de IT	Tratamiento	Número de Animales	Finalización	Régimen de Dosificación
1	Solución Salina	Vehículo desde el Día 1	6	Día 21	QD (IV)
2	Bleomicina — 1 U/kg el Día 0	Vehículo desde el Día 1	12	Día 21	QD (IV)
3	Bleomicina — 1 U/kg el Día 0	Pirfenidona 100 mg/kg desde el Día 1	12	Día 21	QD (PO)
4	Bleomicina — 1 U/kg el Día 0	IVc-059a 15 mg/kg desde el Día 1	12	Día 21	QD (IV)

La dosificación de IV y control positivo (pirfenidona) se inició 24 horas después de la instilación de bleomicina.

La solución de fármaco se formuló inmediatamente antes de la dosificación. Para una dosis de 15 mg/kg

(suficiente para 12 ratones de 30 g) se pesaron 4.5 mg de compuesto. Se agregaron 75 µL de DMSO (5%) y se mezclaron hasta solubilizar el fármaco. Se agregaron 150 µL de solutol (10%) y se agitó suavemente, se agregaron 150 µL de PEG400 (10%) y se agitó suavemente. Se agregaron 1000 µL de PBS (pH 7) y se midió la matriz para asegurar que se mantuviera el pH 7.0. Se agregó el PBS restante (hasta un total de 1500 µL). El compuesto permaneció en solución.

Muestreo después de la finalización (día de dosificación final): El día del muestro, 2 horas después de la dosis final, los ratones se sacrificaron vía una sobredosis de anestesia. Los animales se muestrearon por lo siguiente:

Suero: Inmediatamente después del sacrificio, la sangre se tomó vía punción cardíaca y se colocó en tubos de Eppendorf. Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente por al menos 20 minutos antes de centrifugar a 6,000 rpm por 5 minutos. Las muestras se almacenaron a -80°C.

Necropsia general: Después de finalizar, se expusieron y observaron los órganos internos. Se anotó cualquier anormalidad.

Pulmones: Los pulmones se inflaron con formalina antes de la resección. De manera breve, se expuso la tráquea del ratón y se hizo una pequeña incisión usando la cuchilla. Se colocó suavemente material de sutura alrededor de la parte

posterior de la tráquea por debajo de la incisión y se ató holgadamente. Se insertó suavemente formalina en los pulmones y la sutura se cerró fuertemente para asegurar la inflación. Los pulmones se colocaron en formalina y se tiñeron con tinción de Tricromo y H y E para el análisis de la deposición de colágeno y progreso de la enfermedad (puntaje de Ashcroft). Una sección de tejido pulmonar se congeló instantáneamente

Puntuación Ashcroft:

0 Pulmón normal

1 Engrosamiento por fibrosis mínimo de los vasos alveolares o bronquiolares

2 Entre mínimo y moderado

3 Engrosamiento moderado de las paredes sin daño obvio a la arquitectura del pulmón

4 Fibrosis entre moderada e incrementada con daño a la estructura del pulmón

5 Fibrosis incrementada con daño definido a la estructura del pulmón y formación de bandas fibrosas o masas fibrosas pequeñas

6 Entre fibrosis incrementada y distorsión severa de la estructura del pulmón

7 Distorsión severa de la estructura y áreas fibrosas grandes; “pulmón de panal”

8 Eliminación fibrosa total del campo

Resultados

Signos Clínicos: No se notaron cambios en el peso corporal y los animales no tuvieron que tener un descanso de la dosificación durante el estudio.

Puntaje de Ashcroft: Los pulmones de cada animal fueron FFPE, seccionados y teñidos con H y E de acuerdo con un protocolo interno. Los portaobjetos se sometieron a formación de imágenes sobre un escáner de portaobjetos Glissando para dar imágenes completas de los portaobjetos. Cada pulmón se calificó usando el sistema de graduación de Ashcroft para medir el grado de inflamación/fibrosis de acuerdo con Hübner et al., 2008. El puntaje fue efectuado en forma ciega. Tanto la pirfenidona a 100 mg/kg como el IVc-059a a 15 mg/kg redujeron la aparición de la fibrosis en el pulmón de ratón ($p = 0.0018$ y 0.0130, respectivamente, ANOVA). El tratamiento con pirfenidona tuvo el mismo efecto sobre la aparición de la fibrosis como el tratamiento con IVc-059a ($p = 0.4441$, prueba T de 2 colas). Las imágenes representativas se muestran en la Figura 11A.

La Figura 11A muestra imágenes representativas de la fibrosis pulmonar en el día 21 del tratamiento: Imágenes Ejemplo de tinción tricromo de tejido conectivo (x20); (A1) no inducido (sano); A2, inducido con Bleomicina con tratamiento con vehículo; A3, inducido con Bleomicina con tratamiento con pirfenidona 100 mg/kg; A4, inducido con

Bleomicina con tratamiento con IVc-059a. La Figura 11B muestra el puntaje de Ashcroft de sanos, inducidos con bleomicina no tratados contra pirfenidona contra IVc-059a.

Un pulmón completo de cada animal se fijó con formalina y se almacenó en etanol al 70%. Esas secciones se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol antes de incrustarse en cera de parafina. Las secciones se cortaron a 5 µM y se colocaron sobre un portaobjetos Superfrost por 2 h. Las secciones se tiñeron usando un equipo disponible comercialmente disponible para tejido conectivo (Abcam ab150686). El porcentaje de área cubierta por la tinción con tricromo se cuantificó usando el software Qupath e Imedad J.

Ejemplo 5.30: Resultados *in vitro* y ADME-Toxicología

Se efectuó una evaluación completa de ADME-toxicología sobre los compuestos Ic-007a, IIc-007a, IIIc-061a y IVc-059a.

Se evalúo el Panel Core QPatch de ensayos de Canal Cardiaco de Iones (CiPA) en Ic-007a, IIc-007a, IIIc-061a y IVc-059a: Se usaron los siguientes tres ensayos para CiPA: Ensayo QPatch CiPA Basado en Células del Canal de Iones de Sodio Humano Nav1.5, Ensayo QPatch CiPA Basado en Células del Canal de Iones de Potasio Humano hERG, Ensayo QPatch CiPA Basado en Células del Canal de Iones de Calcio Humano Cav1.2 (tipo L).

Se evaluó el metabolismo de microsomas de hepatocitos y hepatocitos humanos. Se evaluó un conjunto completo de ensayos de unión, enzimas y ensayos de absorción, así como propiedades de solución, absorción *in vitro*, metabolismo y toxicidad. Se evaluó la toxicidad genética usando AMES* y ensayos de micronúcleos.

*Ames es un ensayo bacteriano para la identificación de compuestos que pueden producir mutación génica y que muestra un alto valor predictivo con pruebas de carcinogenicidad en roedores. En *in vitro*

** En los ensayos de micronúcleo *in vitro* usados para la identificación de compuestos que incluyen daño cromosomal (clastógenos y aneugenos)

Resultados

Los compuestos altamente polares muestran bajo metabolismo en los microsomas hepáticos con vidas medias mayores de 60 min. No se observó efecto tóxico significativo en los hepatocitos observando la viabilidad. La mayoría de los compuestos cargados negativamente se unieron fuertemente a proteínas del plasma. No se observó efecto de genotoxicidad. Los compuestos no muestran efecto significativo sobre las pruebas de fluctuación de Ames* TA100-S9, TA100 + S9, TA1535 - S9, TA1535 + S9, TA1537 - S9, TA1537 + S9, TA98 - S9, TA98 + S9 en la concentración de 5 µM a 0.1 mM. No se observó toxicidad bacteriana en TA100 - S9,

TA1535 - S9, TA1537 - S9, TA98 - S9.

No se observaron efectos en el ensayo de Micronúcleos para el intervalo de concentración evaluado de 8 µM a 1 mM. En el panel CiPA, se usaron tres ensayos basados en células el Ensayo Patch Clamp CiPA Automatizado Basado en Células del Canal de Iones de Calcio Humano Cav1.2 (tipo L), el Ensayo Patch Clamp CiPA Automatizado Basado en Células del Canal de Iones de Potasio Humano de hERG y el Ensayo Patch Clamp CiPA Automatizado Basado en Células del Canal de Iones de Sodio Humano Nav1.5: todos se evaluaron a 3 niveles de concentración y no se observó inhibición significativa entre 0.1 µM y 10 µM.

En un ensayo de panel de seguridad, los compuestos no tuvieron efectos inhibidores muy bajos sobre los siguientes sistemas enzimáticos mostrando un buen perfil de seguridad sobre transportador humano de 5-HT (h) (radioligando antagonista); 5-HT1A (h) (radioligando agonista); 5-HT1B (h) (radioligando antagonista); 5-HT2A (h) (radioligando agonista); 5-HT2B (h) (radioligando agonista); 5-HT3 (h) (radioligando antagonista); A2A (h) (radioligando agonista); acetilcolinesterasa (h); alfa 1A (h) (radioligando antagonista); alfa 2A (h) (radioligando antagonista); AR(h) (radioligando agonista); beta 1 (h) (radioligando agonista); beta 2 (h) (radioligando antagonista); BZD (central) (radioligando agonista); canal de Ca^{2+} (L, sitio de

dihidropiridina) (radioligando antagonista); CB1 (h) (radioligando agonista); CB2 (h) (radioligando agonista); CCK1 (CCKA) (h) (radioligando agonista); D1 (h) (radioligando antagonista); D2S (h) (radioligando agonista); delta (DOP) (h) (radioligando agonista); transportador de dopamina (h) (radioligando antagonista); ETA (h) (radioligando agonista); GR (h) (radioligando agonista); H1 (h) (radioligando antagonista); H2 (h) (radioligando antagonista); kappa (h) (KOP) (radioligando agonista); canal KV (radioligando antagonista); Lck cinasa (h); M1 (h) (radioligando antagonista); M2 (h) (radioligando antagonista); M3 (h) (radioligando antagonista); MAO-A (radioligando antagonista); mu (MOP) (h) (radioligando agonista); N neuronal alfa 4beta 2 (h) (radioligando agonista); canal de Na^+ (sitio 2) (radioligando antagonista); NMDA (radioligando antagonista); transportador de norepinefrina (h) (radioligando antagonista); PDE3A (h); PDE4D2 (h); hERG de canal de potasio (humano)-[3H] dofetilida; V1a (h) (radioligando agonista).

El efecto antiinflamatorio de los compuestos estuvo en línea con la inhibición parcial de enzimas ciclooxigenasas, por ejemplo, Ic-007a, IIc-007a, IIIc-061a y IVc-059a mostraron inhibición parcial de la COX2 (cicloxigenasa-2).

Ejemplo 5.31: Perfilamiento *in vitro* usando BioMap Plus

Se efectuó una serie de ensayos *in vitro* usando ensayos basados en células primarias humanas modelando tejido complejo y biología de la enfermedad de órganos (vasculatura, sistema inmune, piel, pulmón) y biología general de tejido para el perfilamiento fenotípico de compuestos en condiciones que preservan los mecanismos diafonía y la retroalimentación. relevantes para los resultados *in vivo*.

Se evaluaron la potencia, selectividad, seguridad, mecanismo de acción e indicación de enfermedad de los compuestos Ic-007a, IIc-007a, IIIc-061a, IVc-059a a concentraciones de 30 µM, 10 µM, 3.3 µM, 1.1 µM en los siguientes sistemas celulares usando el ensayo celular fenotípico BioMaps Plus (Eurofins-DiscoverX, San Francisco, CA, EE. UU.):

-Células endoteliales venulares para evaluar Enfermedad Cardiovascular, Inflamación Crónica, Asma, Alergia, Enfermedad Autoinmune, Enfermedad Atópica

-PBMC con células endoteliales venulares para evaluar Enfermedad Cardiovascular, Inflamación Crónica, Enfermedad Autoinmune, Inflamación Crónica;

-Células B con PBMC para evaluar Enfermedad Autoinmune, Inflamación;

-Células epiteliales bronquiales para evaluar Inflamación de Pulmón, EPOC

-Células de músculo liso de la arteria coronaria

para evaluar Inflamación Cardiovascular, Restenosis

-Fibroblastos dérmicos para evaluar Fibrosis, Inflamación Crónica, Cicatrización de Heridas, Remodelación de Tejido, Modulación de la Matriz

-Queratinocitos/Fibroblastos dérmicos para evaluar Psoriasis, Dermatitis, Biología de la Piel

-Fibroblastos de pulmón para evaluar Fibrosis, Inflamación Crónica, Remodelación de la Matriz

-Células endoteliales venulares con Macrófagos para evaluar Inflamación Cardiovascular, Restenosis, Inflamación Crónica

BioMpas Más Referencias: Libro: Phenotypic Drug Discovery, Chapter 2 - Development and Validation of Disease Assays for Phenotypic Screening. Ellen L. Berg, Sheril P. Denker and Alison O'Mahony. https://doi.org/10.1039/9781839160721-00020 ISBN 978-1-83916-072-1

Assessing bioactivity-exposure profiles of fruit and vegetable extracts in the BioMAP profiling system. Wetmore BA, Clewell RA, Cholewa B, Parks B, Pendse SN, Black MB, Mansouri K, Haider S, Berg EL, Judson RS, Houck KA, Martin M, Clewell HJ 3rd, Andersen ME, Thomas RS, McMullen PD. Toxicology in Vitro. 2019,54,41-57.

Resultados

El Ic-007a no fue citotóxico a las concentraciones

probadas en este estudio. El Ic-007a fue proliferativo para células T primarias humanas (30 µM) y fibroblastos (30 µM, 10 µM, 3.3 µM, 1.1 µM). El Ic-007a fue activo con 20 lecturas anotadas y los cambios mediados en las actividades de biomarcadores clave se listan en las clasificaciones biológicas y de enfermedades. Principalmente, el Ic-007a tuvo impacto sobre actividades relacionadas con la inflamación (de VCAM-1, sTNFα, MIP-1α, I-TAC, MIG; incrementadas IL-8; IP-10 modulado), actividades inmunomoduladoras (disminuidos, CD40, M-CSF) y actividades de remodelación de tejidos (disminución de Colágeno I, Colágeno IV, TIMP-1, tPA, Colágeno III, PAI-1, uPAR, bFGF).

El IIc-007a no fue citotóxico a las concentraciones probadas en este estudio. El IIc-007a no tuvo ningún efecto antiproliferativo sobre esas células primarias humanas a las concentraciones probadas.

El IIc-007a fue activo con las 12 lecturas anotadas y los cambios mediados en actividades de biomarcadores clave se listaron en las clasificaciones biológicas y de las enfermedades. Principalmente el IIc-007a tuvo impacto sobre actividades relacionadas con la inflamación (sTNFα, MIP-1α disminuidos; IL-8 incrementada; MCP-1 modulado), actividades inmunomoduladoras (sIL-10, sIL-2 disminuidas) y actividades de remodelación de tejidos (Colágeno I, Colágeno IV, Colágeno III, PAI-1 disminuido).

El IIIc-061a no fue citotóxico a las concentraciones probadas en este estudio. El IIIc-061a no tuvo ningún efecto antiproliferativo sobre esas células primarias humanas a las concentraciones probadas. El IIIc-061a fue activo con seis lecturas anotadas y los cambios mediados en actividades de biomarcadores clave fueron listados por las clasificaciones biológicas y de las enfermedades. El IIIc-061a tuvo impacto sobre actividades relacionadas con la inflamación (I-TAC, MIG disminuidos), actividades inmunomoduladores (sIL-17A disminuida) y actividades de remodelación de tejido (Colágeno I, Colágeno III, PAI-1 disminuidos).

El IVc-059a no fue citotóxico a las concentraciones probadas en este estudio. El IVc-059a fue antiproliferativo para células endoteliales primarias humanas (1.1 µM). El IVc-059a fue activo con las tres lecturas anotadas y los cambios mediados en actividades de biomarcadores clave se listaron por medio de las clasificaciones biológicas y de las enfermedades. El IVc-059a tuvo impacto sobre actividades relacionadas con la inflamación (sTNFα disminuido) y actividades inmunomoduladoras (sIL-10, sIL-2 disminuidas).

Ejemplo 5.32: Resultados *in vitro* de células epiteliales del pigmento retinal humano (RPE) ARPE-19 y células endoteliales retinales humanas (HREC)

Los compuestos Ic-007a, IIc-007a, IVc-059a y

bevacizumab (BEVA) se evaluaron por su efecto sobre la perturbación de la barrera retinal sanguínea interna o externa inducida por condiciones diabéticas. Se evaluaron dos concentraciones diferentes de los compuestos 25 µM y 50 µM de Ic-007a, IIc-007a, IVc-059a. Los mecanismos de acción involucrados en el efecto anti-permeabilidad de los tratamientos probados se exploraron evaluando la permeabilidad a dextran fluorescente y la producción de citocinas proinflamatorias usando sus niveles de expresión de ARNm por RT-PCR.

Condiciones de la Barrera Retinal Sanguínea Externa: los cultivos de células epiteliales de pigmento retinal humano (RPE) ARPE-19, como la línea celular RPE humana inmortalizada espontáneamente se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE. UU.). Las células ARPE-19 se cultivaron en condiciones euglucémicas (D-glucosa (D-Glc), 5.5 mmol/L) y condiciones hiperglucémicas (D-glucosa, 25 mmol/L) por 18 días a 37°C bajo 5% (vol./vol.) CO_2 en medio (DMEM/F12) suplementado con 10% (vol./vol.) de FBS (Hyclone; Thermo Fisher Scientific, UT, EE. UU.) y 1% (vol./vol.) de penicilina/estreptomicina (Hyclone; Thermo Fisher Scientific). Se usaron las células ARPE-19 del pase 20 y el medio se cambió cada 3-4 días. Para los estudios de permeabilidad, células ARPE-19 se sembraron a 400,000 células/mL (80,000 células RPE/pozo) en HTS-Transwells de

0.33 cm^2 (Costar; Co min g, NY, EE. UU.). Para PCR en tiempo real, análisis Western Blot e inmunofluorescencia las células se sembraron a 20,000 células/mL.

Condiciones experimentales y tratamientos: además de la condición euglucémica, se probaron dieciocho condiciones diferentes y las células se cultivaron bajo 25 mmol/L D-glucosa:

Condición 1) Las células de control no recibieron ningún tratamiento con D-Glucosa 5 mM

Condición 2) Las células se trataron con medio diabético D-Glucosa 25 mM + vehículo (días 15, 16 y 17 a una aplicación/día) para evaluar su efecto en la prevención del daño celular provocado por el medio diabético.

Condiciones 3, 4, 5, 6, 7, 8) Las células se trataron con D-Glucosa 25 mM y dos concentraciones diferentes de cada producto: Ic-007a (3, 4) 25 µg/mL (= 53 µM) y 50 µg/mL (= 107 µM); IIc-007a (5, 6) 25 µg/mL (= 53 µM) y 50 µg/mL (= 107 µM); IVc-059a (7, 8) 20 µg/mL (= 50 µM) y 40 µg/mL (= 100 µM) por 72 h (días 15, 16 y 17 a una aplicación/día) para evaluar sus efectos citotóxicos potenciales.

Condición 9) Las células se trataron con D-Glucosa 25 mM y bevacizumab (0.2 mg/mL) por 72 h (días 15, 16 y 17 a una aplicación/día) para evaluar sus efectos citotóxicos potenciales.

Condición 10) = Medio diabético; las células se trataron con D-Glucosa 25 mM + IL-1β (10 ng/mL) + TNF-α (25 ng/mL) + VEGF (25 ng/mL), por 48 h (días 16 y 17 a una aplicación/día) para provocar la ruptura de la monocapa.

Condición 11, 12, 13, 14, 15, 16) Las células se trataron con medio diabético (D-Glucosa 25 mM + IL-1b (10 ng/mL) + TNF-α (25 ng/mL) + VEGF (25 ng/mL)) + dos concentraciones de los compuestos novedosos (Ic-007a, IIc-007a y IVc-059a (días 15, 16 y 17 a una aplicación/día) para evaluar su efecto en la prevención del daño celular provocado por el medio diabético.

Condición 17) Las células se trataron con medio diabético (D-Glucosa 25 mM + IL-1β (10 ng/mL) + TNF-α (25 ng/mL) + VEGF (25 ng/mL)) + bevacizumab (0.2 mg/mL) (días 15, 16 y 17 a una aplicación/día) para evaluar su efecto en la prevención del daño celular provocado por el medio diabético.

Medición de la permeabilidad de ARPE-19: La permeabilidad de las células RPE se determinó a los 18 días midiendo los movimientos apical a basolateral de FITC-dextran (40 kDa) (Sigma, St Louis, MI, EE. UU.) siguiendo un procedimiento reportado previamente por Villarroel et al. Exp Eye Res, 2009, 89, 913-920.

Condiciones de la Barrera Retinal Sanguínea Interna: se obtuvieron células endoteliales retinales humanas primarias (HREC) de un frasco de células crioconservadas

compradas de Innoprot (Vizcay, España). Estas células se aislaron de tejido retinal humano de ojos cadavéricos digeridos con 0.1 mg/mL de colagenasa tipo I a 37°C por 1 hora. Entonces, finalmente se seleccionaron las células endoteliales con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo de CD31 (DynaBeads; Dynal, Oslo, Noruega). Las HREC se descongelaron en el laboratorio y se cultivaron en medio basal endotelial (EBM) que contenía D-glucosa 5.5 mM, 5% de FBS (Suero Bovino Fetal) 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y suplemento de ECG (Suplemento de Crecimiento de Células Endoteliales) (Innoprot, Vizcay, España). Se usó fibronectina humana (MerckMillipore, Madrid, España) a 5 µg/mL para la unión celular. Las células en los pasos 2-3 se usarán para los experimentos. Para la experimentación, las HREC se hicieron crecer hasta la confluencia y entonces los cultivo medios de células se cambiaron a medio suplementado con 1% de FBS por 24 h y entonces se expusieron a tratamientos diferentes.

Condiciones/tratamientos: Se usaron las mismas condiciones especificadas para el experimento en células ARPE-19.

Medición de la permeabilidad de HREC: La permeabilidad en monocapas de HREC se obtuvo sobre soportes permeables a 12 x 10^5 células/pozo (24 pozos, filtros PCF, Merk Millipore). Los insertos se incubaron por 48 horas a

37°C en 5% de CO_2-aire para formar la monocapa. Al final, el medio se empobreció en suero 24 h antes de proceder con los tratamientos. La cámara inferior se llenó con 600 µL de medio EBM completo y la cámara superior con 100 µL de suspensión celular en suero agotado (1%).

Para detectar los cambios en la permeabilidad, se agregaron 100 µg/mL de FITC-DEXTRAN fluorescente (Sigma, Madrid, España) al lado superior del inserto. Se leyeron alícuotas de 200 µL de los componentes basales en un SpectraMax Gemini (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/528 nm cada 30 min. Finalmente, la concentración de dextran se determinó por extrapolación de las lecturas de fluorescencia en una curva estándar. Cada condición se probó por triplicado.

Viabilidad y proliferación celular: El conteo y ensayo MTT se efectuaron en HREC para evaluar la viabilidad de las células bajo las condiciones probadas. Se midió la viabilidad y proliferación de HREC. Brevemente, las células se tiñeron con DAPI y se tomaron fotografías (20x) en un microscopio fluorescente invertido con (Olympus iX71 con V-RFL-T Olympus). Los núcleos celulares se contaron con la ayuda del software Imedad J en tres campos diferentes para cada condición. Los experimentos se repitieron tres veces. Además, se usó el ensayo MTT (Sigma, Madrid, España) para evaluar la viabilidad de las células. Brevemente, se

agregaron 10 µL de 5 mg/mL de MTT en PBS a cada pozo después de los tratamientos y se incubó 1 h adicional a 37°C. Se removió el medio y los gránulos de formazán obtenidos se disolvieron en 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se detectó la absorbancia a 562 nm con el lector de placas ELISA (ELx800. Bio-Tek Instruments, VT, EE. UU.). Este ensayo descartó una desviación potencial en los resultados debido a cambios en la proliferación celular entre las diferentes condiciones.

Mecanismos de acción:

- Se evaluaron las citocinas proinflamatorias en células ARPE-19 por RT-PCR y se midió el ARNm para IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-18, VEGF, IL-10, FGF usando el método doble delta CT 2-ΔΔCT con valores de Cts para el gen de interés y la B actina humana endógena para obtener ΔCT; los valores de ARNm se expresaron como cambio relativo con respecto a la condición con D-Gluc 25 mM (ref: Livak KJ, Analysis of Relative Gene Expression Data By Quantitative Real-Time PCR and the 2-ΔΔCT Method, Methods, 2001, 25(4), 402-408, doi 10.1006/meth.2001.1262)

- La producción de ROS se evaluó usando el Ensayo OxiSelect™ Intracellular ROS (Green Fluorescence) de Cell Biolabs (Bionova, Madrid, España). El ensayo emplea la sonda fluorogénica permeable a células de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH-DA) oxidada a 2',7'-

diclorodihidrofluorescina (DCF) altamente fluorescente por ROS celular.

- Se analizó la expresión de endotelina-1, PDGF y VCAM-1 en monocapas de HREC por análisis inmunohistoquímico y por TA-PCR.

- La expresión de TJ (ZO) se analiza en monocapas de ARPE-19 y HREC mediante análisis inmunohistoquímico.

Resultados:

Los resultados de permeabilidad de la barrera retinal sanguínea externa (monocapa ARPE19) y la barrera retinal sanguínea interna (HREC) se muestran en la Tabla 58. Los compuestos Ic-007a, IIc-007a, IVc-059a disminuyeron la permeabilidad de las monocapas externa e interna.

Efecto de los compuestos Ic-007a, IIc-007a, IVc-059a sobre la producción de ROS y TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-18 y VEGF-ARNm en células monocapa ARPE19 expuestas a no diabéticos y medio diabético se muestran en la Tabla 59.

Tabla 58: Permeabilidad de la barrera retinal sanguínea externa y la barrera retinal sanguínea interna usando la fuga de fluorescencia de FITC-Dextran (ng/mL/cm^2).

		ARPEI9	HREC
No.	Condición	% de permeabilidad p < 0.05	% de permeabilidad p < 0.05
1	DMEN HAMS'S F-12 1% 5.5 mM D-Gluc	105.1 ± 34.1	88.3 ± 26.2
2	DMEN HAMS'S F-12 1% 25 mM D-Gluc (#)	94.9 ± 10.3	100.0 ± 15.6
3	(#) + Ic-007a 25 µg/mL	75.2 ± 11.1	126.3 ± 8.3
4	(#) + IIc-007a 25 µg/mL	66.1 ± 4.9	136.3 ± 16.7
5	(#) + IVc-059a 25 µg/mL	70.2 ± 8.8	109.9 ± 24.7
6	(#) + Ic-007a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	107.3 ± 43.9	127.4 ± 2.1

7	(#) + IIc-007a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	113.1 ± 11.4	147.7 ± 17.6
8	(#) + IVc-059a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	112.6 ± 19.8	135.4 ± 6.7
9	(#) + BEVA 0.2 mg/mL	109.5 ± 22.9	127.1 ± 26.2
10	**(#) + VEGF, TNF-α, IL-1β = MEDIO DIABÉTICO**	**159.9 ± 5.0**	**170.0 ± 12.0**
11	(#) + Ic-007a 25 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	103.7 ± 15.7 *	111.6 ± 24.2 *
12	(#) + IIc-007a 25 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	114.7 ± 19.0 *	135.8 ± 16.6 *
13	(#) + IVc-059a 25 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	98.5 ± 36.5 *	124.0 ± 6.3 *
14	(#) + Ic-007a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	127.1 ± 13.5 *	159.0 ± 23.9
15	(#) + IIc-007a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	136.8 ± 13.0 *	145.2 ± 8.8
16	(#) + IVc-059a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	130.4 ± 24.8	115.3 ± 14.7 *
17	(#) + BEVA 0.2 mg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	120.7 ± 30.1	129.0 ± 35.3

*p < 0.05 para la fuga de FITC-dextran medida después de 90 min en [ng/mL/cm^2] en comparación con el medio diabético (D-Glucosa 25 mM + VEGF, TNF-α, IL-1β).

Tabla 59: Producción de ARNm de ROS y TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-18 y VEGF por células monocapa ARPE19 en medio no diabético y diabético.

		ROS	IL-1β	IL-6	TNFα	IL-18	VEGF
No.	Condición	%	R. Q. ARNm	R. Q. ARNm	R. Q. ARNm	R. Q. ARNm	R. Q. ARNm
1	DMEN HAMS'S F-12 1% 5.5 mM D-Gluc	86 ± 12	0.11 ± 0.02	0.93 ± 0.01	0.18 ± 0.16	1.08 ± 0.44	1.60 ± 0.05
2	DMEN HAMS'S F-12 1% 25 mM D-Gluc (#)	100 ± 9	1.02 ± 0.20	1.00 ± 0.03	1.36 ± 0.86	1.04 ± 0.35	1.54 ± 0.32
3	(#) + Ic-007a 25 µg/mL	32 ± 15	0.12 ± 0.01	0.52 ± 0.49	0.27 ± 0.07	0.45 ± 0.18	0.09 ± 0.02
4	(#) + IIc-007a 25 µg/mL	55 ± 6.4	0.74 ± 0.26	0.73 ± 0.00	0.57 ± 0.18	0.75 ± 0.09	0.06 ± 0.01
5	(#) + IVc-059a 25 µg/mL	62 ± 9	0.20 ± 0.05	0.28 ± 0.11	0.27 ± 0.08	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.01
6	(#) + Ic-007a 50 µg/mL	26 ± 4.6	0.15 ± 0.03	0.20 ± 0.07	0.59 ± 0.33	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.03
7	(#) + IIc-007a 50 µg/mL	72 ± 11	0.24 ± 0.11	0.34 ± 0.08	0.45 ± 0.30	0.04 ± 0.00	0.12 ± 0.03
8	(#) + IVc-059a 50 µg/mL	116 ± 12	0.21 ± 0.13	0.28 ± 0.11	0.27 ± 0.10	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.03
9	(#) + BEVA 0.2 mg/mL	110 ± 54	1.46 ± 0.72	0.64 ± 0.34	0.46 ± 0.63	0.09 ± 0.01	1.68 ± 0.83
10	**(#) + VEGF, TNF-α, IL-1β = MEDIO DIABÉTICO**	**145 ± 9.3**	**96.07 ± 48.11**	**65.49 ± 21.16**	**9.13 ± 1.84**	**2.22 ± 0.19**	**2.01 ±0.69**
11	(#) + Ic-007a 25 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	33 ± 4.8 *	12.21 ± 1.46 *	0.52 ± 0.49 *	11.26 ± 0.96	0.02 ± 0.00 *	0.06 ± 0.02 *
12	(#) + IIc-007a 25 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	47 ± 7.6 *	41.03 ± 17.57 *	10.83 ± 6.90 *	6.31 ± 0.06 *	0.07 ± 0.01 *	0.11 ± 0.01 *
13	(#) + IVc-059a 25 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	61 ± 40 *	20.81 ± 5.11 *	5.84 ± 1.13 *	5.39 ± 1.01 *	0.03 ± 0.01 *	0.04 ± 0.00 *

14	(#) + Ic-007a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	27 ± 13 *	10.66 ± 3.01 *	3.28 ± 1.46 *	5.22 ± 3.96	0.02 ± 0.00 *	0.17 ± 0.05 *
15	(#) + IIc-007a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	74 ± 38 *	11.39 ± 6.52 *	1.50 ± 1.19 *	4.24 ± 0.77 *	0.03 ± 0.00 *	0.13 ± 0.02 *
16	(#) + IVc-059a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	159 ± 32	27.76 ± 5.18 *	9.78 ± 2.30 *	3.61 ± 1.82 *	0.01 ± 0.00 *	0.20 ± 0.03 *
17	(#) + BEVA 0.2 mg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	111 ± 50	31.22 ± 12.65 *	32.35 ± 13.48 *	1.37 ± 0.27 *	0.53 ± 0.04 *	3.88 ± 0.68

% de ROS a D-Glucosa 25 mM; R. Q. = Cuantificación Relativa de ARNm para valores de citocinas y factor del crecimiento expresados como cambio relativo con respecto a la condición D-Gluc 25 mM.

* $p < 0.05$ entre D-Glc 25mM + VEGF + TNF-α + IL-1β (medio diabético) y los compuestos Ic-007a, IIc-007a, IVc-059.