

COMPUESTOS DE BENZALDEHÍDO CON EFECTOS
DESESTABILIZADORES DIRECTOS DE POLÍMEROS PARA TRATAR LA
ANEMIA FALCIFORME

5 **REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

La presente solicitud reivindica prioridad del documento USSN 63/423.167 presentado el 7 de noviembre de 2022, y al documento USSN 63/442.824 presentado el 2 de febrero de 2023, y el contenido completo de los mismos se incorpora en el presente documento por referencia.

10 **DECLARACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO SUBVENCIONADOS FEDERALMENTE**

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de los números de contrato HL156158, HL154864 y MD009124 otorgados por los National Institutes of Health. El gobierno de Estados Unidos tiene determinados
15 derechos sobre la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La invención se refiere en general a compuestos que presentan una mayor actividad y seguridad para el tratamiento de la anemia falciforme (AF). En
20 particular, los compuestos son aldehídos aromáticos que presentan efectos desestabilizadores de polímeros muy potentes.

Descripción de la técnica relacionada

La función de la hemoglobina (Hb) es transportar oxígeno por la sangre y liberarlo a los tejidos equilibrándose entre dos estados alostéricos: un estado
25 tenso (T), que presenta una baja afinidad por el oxígeno, y un estado relajado (R), que presenta una gran afinidad por el oxígeno. La anemia falciforme (AF) es un trastorno hematológico hereditario y se produce como resultado de la sustitución de β Glu6 por β Val6 en la Hb, formando Hb falciforme (HbS). Bajo hipoxia o baja tensión de oxígeno (O_2), lo que conduce a un aumento de la
30 concentración de Hb desoxigenada (estado T) de baja afinidad, la HbS se polimeriza en fibras largas, rígidas e insolubles que dan como resultado la falciformación de glóbulos rojos (GR). El polímero que se inicia por la interacción primaria que implica a β Val6 se estabiliza por varios otros contactos secundarios entre las moléculas de HbS. La falciformación inducida por la hipoxia provoca
35 efectos fisiopatológicos secundarios, p. ej. adhesión de los GR al endotelio

5 tisular, estrés oxidativo/daño, hemólisis (ruptura) de los GR, inflamación, vasoclusión, deterioro del flujo sanguíneo microvascular y disminución de la biodisponibilidad vascular de óxido nítrico, que acaban provocando una morbilidad grave, tal como crisis dolorosas, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, hipertensión pulmonar y mortalidad prematura. Antes de la reciente aprobación por la FDA de Voxelotor (Oxbryta), los únicos fármacos orales aprobados para tratar la AF fueron hidroxurea (HU) y L-glutamina (Endari™). La HU induce la expresión de γ -globina para formar Hb fetal (HbF), que puede inhibir directamente la polimerización de la HbS y la falciformación de los GR. Sin embargo, no todos los pacientes responden a la HU y las respuestas pueden ser limitadas. La HU también puede causar mielosupresión, un efecto adverso potencialmente mortal. Mientras que la L-glutamina puede tener propiedades antioxidantes que pueden reducir la frecuencia de las crisis de dolor, la eficacia es limitada y el fármaco se utiliza raramente. Se necesitan urgentemente fármacos orales más eficaces, especialmente ante la importante morbilidad, mortalidad, disparidades en la atención sanitaria y carga para la salud pública impuesta por la AF.

Los aldehídos aromáticos, tal como Voxelotor, se unen a la hendidura α de la Hb y desplazan el equilibrio alostérico al estado R de alta afinidad de la HbS, que no se polimeriza. Los moduladores alostéricos tienen un beneficio clínico para los pacientes con AF. En la fase III del ensayo HOPE, Voxelotor redujo los marcadores de hemólisis y mejoró la anemia al aumentar las concentraciones de Hb en al menos 1 g/dl en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, los efectos clínicos modificadores de la enfermedad de Voxelotor fueron modestos, con signos persistentes de inflamación crónica y hemólisis. Por ejemplo, no se observó una reducción significativa de los eventos vaso-oclusivos. El principal impacto fisiológico de la modulación alostérica es la dilución de la HbS; los tetrámeros oxigenados de HbS unidos a fármacos no pueden incorporarse a polímeros y, por tanto, hay menos tetrámeros de Hb disponibles para polimerizarse. Sin embargo, la magnitud del beneficio clínico de la dilución de HbS es limitada, y los pacientes en tratamiento con Voxelotor tienen importantes secuelas residuales de la enfermedad que repercuten en la calidad de vida y la longevidad. Es más, los efectos farmacodinámicos del fármaco sobre los estados alostéricos de la Hb son directamente limitantes de la dosis, ya que un mayor aumento de la afinidad por O_2 de la Hb limitaría la liberación de O_2 a

los tejidos y, eventualmente, induciría signos clínicos de hipoxia tisular. Los fármacos que pueden inhibir directamente la polimerización de la HbS pueden tener más beneficios modificadores de la enfermedad. Por ejemplo, es bien conocido que los individuos con una rara afección coheredada en la que los niveles de HbF permanecen por encima del 25 % en la edad adulta no tienen prácticamente ninguna enfermedad clínica. La HbF interfiere con importantes contactos laterales para desestabilizar directamente la polimerización. De forma similar, los individuos con una rara variante de Hb coheredada, Hb Stanleyville, también tienen un fenotipo clínico benigno prácticamente sin enfermedad debido a una mutación de la lisina en la superficie de la hélice αF de la HbS que interrumpe los contactos estabilizadores de los polímeros.

Hasta la fecha se han descubierto varios aldehídos aromáticos que actúan directamente sobre la HbS para inhibir la polimerización. Estos compuestos generalmente han comprendido un benzaldehído con una segunda estructura de anillo (piridina o benceno) conectada al benzaldehído a través de un puente metoxi orto al grupo aldehído. El puente metoxi en posición orto respecto al grupo aldehído del benzaldehído permite que la segunda estructura de anillo se extienda hacia la boca de la hendidura α para establecer interacciones con residuos situados en la superficie de la hélice αF de la HbS. Los compuestos que establecen fuertes interacciones con residuos clave de la hélice αF pueden desestabilizar los polímeros de HbS al perturbar importantes contactos secundarios estabilizadores. Un ejemplo de un compuesto descubierto previamente es INN-310 (SAJ-310), que contiene un *meta* metoxi al aldehído en el anillo de benzaldehído y ningún sustituyente en el anillo de piridina. INN-310 solo mostró efectos desestabilizadores de polímeros muy débiles *in vitro*, probablemente debido a interacciones limitadas con los residuos de la hélice αF , y además, presentaron propiedades farmacocinéticas subóptimas *in vivo*. Otros ejemplos de compuestos desestabilizadores de polímeros muy potentes con propiedades farmacocinéticas mejoradas incluyen VZHE-039 y PP-14. En lugar de un *meta* metoxi como con INN-310, VZHE-039 y PP-14 contienen un *orto* hidroxilo en el benzaldehído que forma una interacción intramolecular que estabiliza y protege al aldehído del rápido metabolismo oxidativo. Tanto VZHE-039 como PP-14 incorporan también adicionalmente un sustituyente químico en el segundo anillo que puede establecer fuertes enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas con la hélice αF ; como se esperaba, estas interacciones

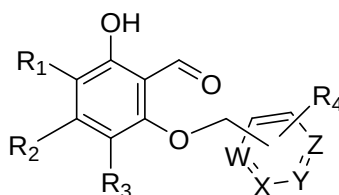
mejoraron significativamente la potencia de los efectos desestabilizadores de los polímeros. Sin embargo, hasta este punto, la adición de sustituyentes químicos en el segundo anillo también ha introducido inconvenientes importantes que han impedido que cualquier compuesto se convierta en un candidato viable a fármaco humano. Los sustituyentes del segundo anillo han demostrado ser especies cargadas introducidas (ácido carboxílico) metabólicamente lábiles (carboxiléster o carboxilamida), que pueden haber reducido la permeabilidad de la membrana, o haber sido hepatotóxicas (metilhidroxilo). Hasta la fecha se han probado cientos de compuestos que contienen diferentes clases de sustituyentes químicos añadidos al segundo anillo para dirigirse a la hélice α F. No obstante, todavía no se había descubierto ningún compuesto que fuera a la vez un potente desestabilizador de polímeros y capaz de alcanzar de forma segura y fiable los niveles terapéuticos de fármaco necesarios para el tratamiento oral crónico de la AF.

Existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos agentes antifalciformación no tóxicos que tengan efectos desestabilizadores de polímeros más potentes y sostenidos, presenten una larga duración de acción farmacológica y tengan una biodisponibilidad oral aceptable para ser administrados como fármacos orales.

SUMARIO DE LA INVENCION

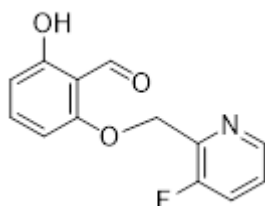
Otras características y ventajas de la presente invención se expondrán en la descripción de la invención que sigue, y, en parte, se desprenderán de la descripción o podrá conocerse mediante la práctica de la invención. La invención se logrará y alcanzará por las composiciones y métodos señalados particularmente en la descripción escrita y las reivindicaciones de la misma.

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un compuesto que tenga una fórmula

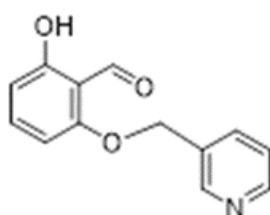


en donde W, X, Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente C o N, con la condición de que al menos uno de W, X, Y, y Z es N, y R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son cada uno iguales o diferentes y de manera independiente F, Cl o H y sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de los mismos.

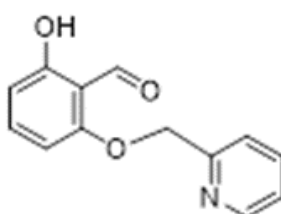
En algunos aspectos, el compuesto es



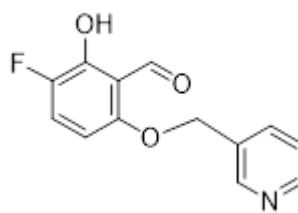
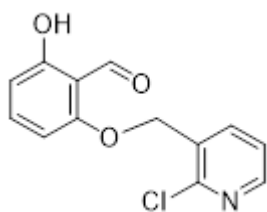
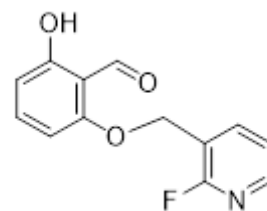
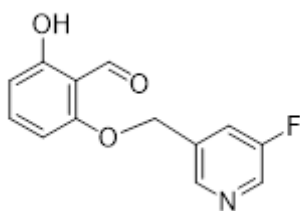
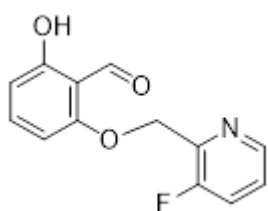
En otros aspectos, el compuesto es



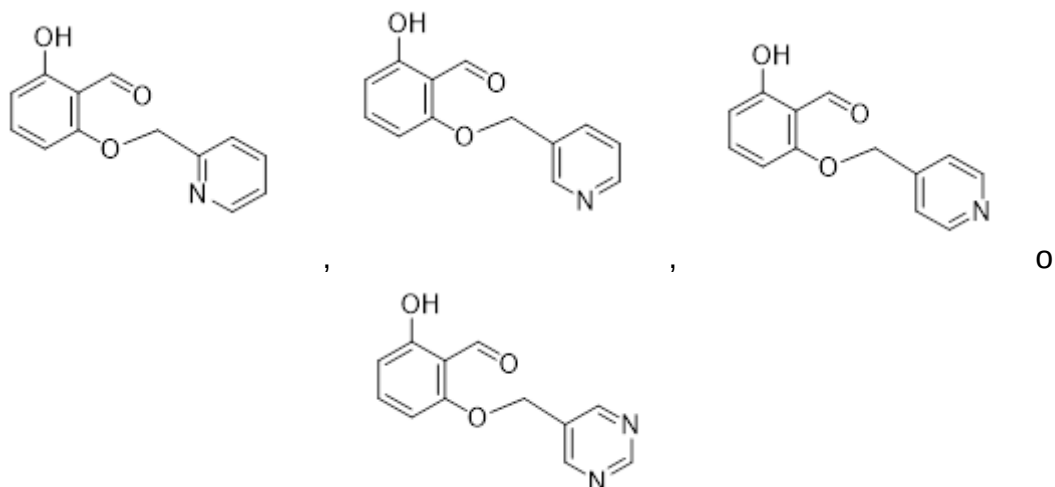
5 En más aspectos, el compuesto es



En otros aspectos adicionales, al menos uno de R_1 , R_2 , R_3 , y R_4 es independientemente F o Cl. En aspectos adicionales, el compuesto es

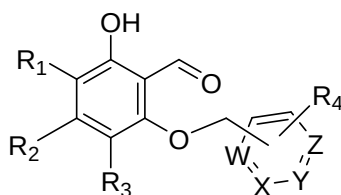


En aspectos alternativos, el compuesto es



También se proporciona un método para prevenir o tratar uno o más
 5 síntomas o afecciones de la anemia falciforme (AF) en un sujeto que lo necesite,
 que comprende

administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un
 compuesto que tenga una fórmula



10 en donde W, X, Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente
 C o N, con la condición de que al menos uno de W, X, Y, y Z es N; y R₁, R₂, R₃
 y R₄ son cada uno iguales o diferentes y de manera independiente F, Cl o H. En
 algunos aspectos, uno o más síntomas o afecciones se seleccionan del grupo
 que consiste en la falciformación de los glóbulos rojos (GR), adhesión de los GR
 15 al endotelio tisular, estrés oxidativo y/o daños, hemólisis de los GR, inflamación,
 vasoclusión, deterioro del flujo sanguíneo microvascular, accidente
 cerebrovascular, dolor y muerte. En más aspectos, la etapa de administración se
 realiza por vía oral.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 **Figura 1.** Falciformación en función del tiempo en condiciones de anoxia.

Figura 2. Desplazamiento de p50 dependiente de la ocupación en sangre
 humana no falciforme.

Figura 3A-3G. Estructura cristalina de la Hb en la conformación R2 en complejo con dos moléculas de los Compuestos 1, 2, 5 y 8 unidas en la hendidura α . Estructura de VZHE039 mostrada con fines comparativos. La Hb se muestra como un dibujo; Compuesto 1, 2, 5 y 8 en bastones; residuos de hélice F en bastones; y las moléculas de agua como esferas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

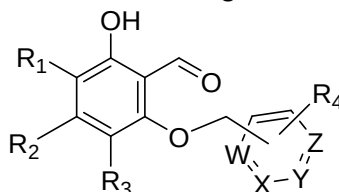
En el presente documento se divulgan compuestos de benzaldehído que, inesperadamente, demuestran una desestabilización potente y sostenida de polímeros, adicionalmente a la modulación alostérica para aumentar la afinidad de la HbS por el oxígeno, a pesar de que no tiene ningún sustituyente químico en el segundo anillo (piridina o benceno) para establecer interacciones directas con los residuos de la hélice α F de la HbS. Estos compuestos carecen de carboxiléster, carboxilamida, metilhidroxilo, o un farmacóforo similar en el segundo anillo que pueda establecer interacciones de enlace de hidrógeno con residuos superficiales de la hélice α F. Sin embargo, inesperadamente, estos compuestos establecen interacciones muy fuertes con los residuos de la hélice α F, que pueden ser totalmente hidrófobas directamente a través de una piridina, o alternativamente a través de un nitrógeno de pirimidina o triazina, o incluso totalmente hidrófobas a través de un anillo de benceno. Incluso más sorprendentemente, los efectos directos de desestabilización de polímeros de algunos compuestos de este grupo son los más potentes observados hasta la fecha, con inhibición sostenida de la falciformación de los GR *in vitro* durante más de 150 minutos. Los resultados son inesperados porque los compuestos descubiertos anteriormente, p. ej., INN-310, sin sustituyentes químicos adicionales en el segundo anillo para interactuar con la hélice α F demostraron solo efectos muy débiles de desestabilización de polímeros, lo que se supone que se debe a la falta de interacciones entre enlaces de hidrógeno. Por tanto, resultó sorprendente que los compuestos de la presente invención no solo fueran potentes, sino los más potentes descubiertos hasta la fecha. El resultado inesperado parece ser consecuencia de cambios en la orientación de los compuestos en la hendidura α de la Hb con la adición del *orto* hidroxilo en el anillo de benzaldehído para sustituir el *meta* metoxi de INN-310. Esto, fortuitamente, colocó a la segunda estructura anular en posición de establecer sus propias interacciones fuertes con los residuos de la hélice α F sin necesidad de ningún sustituyente químico. Es decir, el cambio del *orto* hidroxilo por un

halógeno eliminó por completo los efectos desestabilizadores de polímeros del compuesto. En retrospectiva, esto explica también la menor potencia *in vitro* de TD-7, un análogo de VZHE-039, con *meta* metoxi en lugar de *orto* hidroxí en el benzaldehído similar a INN-310. Los residuos superficiales de la hélice α F de la HbS son importantes para estabilizar los polímeros mediante interacciones secundarias con la HbS adyacente. Es conocido y aceptado que la HbS variante Stanleyville, con una mutación de coinherencia en la superficie de la hélice α F (α Asn78 $\leftrightarrow$ α Lsy78), tiene una polimerización limitada. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se cree que los compuestos de la presente invención interactúan con la hélice α F localizada en la superficie de la HbS, y esta interacción conduce a la inhibición estereoespecífica de la formación de polímeros por la HbS. Dicho de otro modo, la unión de estos ligandos a la hélice α F induce un cambio de conformación, perturba la hélice α F y anula las interacciones entre HbS, debilitando de este modo el polímero y previniendo la falciformación. Aunque antes se creía que las fracciones de enlaces de hidrógeno, tal como un éster o una amida, metilhidroxilo, o un grupo sulfato o fosfato cargado, en los compuestos fue necesario establecer una fuerte interacción para producir el efecto farmacodinámico deseado, la presente invención divulga que se pueden establecer interacciones altamente potentes con compuestos a través de interacciones totalmente mediadas por agua o hidrófobas por sí solas. Además de la sorprendente potencia, los compuestos de este grupo también carecen de los inconvenientes negativos de otros compuestos anteriores con una fracción adicional en el segundo anillo, tal como VZHE-039 y PP-14; se ha observado que los compuestos tienen una rápida partición en los GR, buena biodisponibilidad oral, farmacocinética impresionante, y ningún signo de toxicidad. En algunas versiones de estos compuestos, uno o más halógenos sustituyen al hidrógeno en la estructura del benzaldehído o del segundo anillo; estos halógenos no interactúan con los residuos de la hélice α F, pero en cambio tienen el potencial de modificar la ruta metabólica de los compuestos limitando las interacciones con las enzimas metabólicas y/o eliminando intermediarios metabólicos potencialmente tóxicos.

Los compuestos divulgados en el presente documento son benzaldehídos con un segundo anillo (p. ej., piridina, pirimidina, etc.) que interactúa directamente con la hélice α F de la hemoglobina falciforme (HbS) sin ningún grupo donante/aceptor directo de enlaces de hidrógeno o sustituyente (p. ej.,

grupos éster, amida, hidroxilo, sulfato o fosfato). La unión del compuesto a la hélice αF de la HbS previene o disminuye la interacción entre las moléculas de HbS y, por tanto, previene la falciformación de glóbulos rojos (GR).

Los compuestos tienen una fórmula genérica I:



5

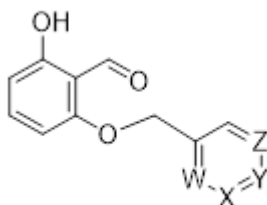
en donde:

en donde W, X, Y, y Z son iguales o diferentes y son independientemente C o N, con la condición de que al menos uno de W, X, Y, y Z es un N, y R_1 , R_2 , R_3 , y R_4 son iguales o diferentes e independientemente halógeno o H.

10

Los halógenos de ejemplo incluyen, aunque no de forma limitativa, F y Cl.

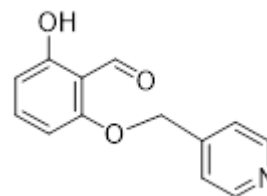
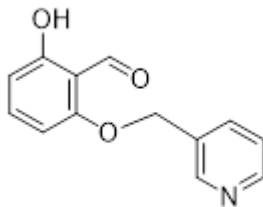
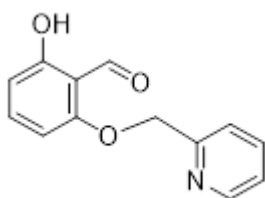
Los compuestos de ejemplo incluyen, aunque no de forma limitativa, los que tienen una fórmula



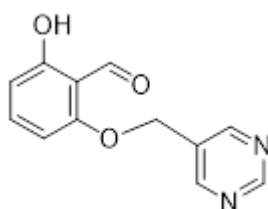
15

en donde W, X, Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente C o N, y al menos uno de W, X, Y, y Z es N.

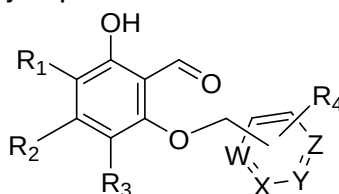
Los compuestos de este tipo incluyen, aunque no de forma limitativa:



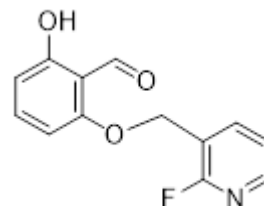
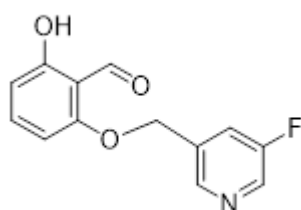
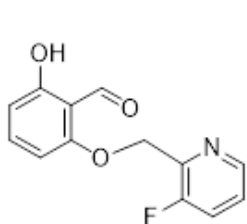
y



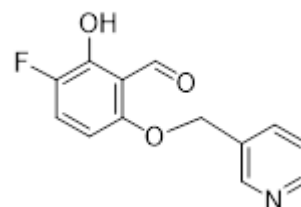
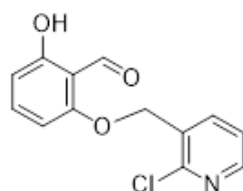
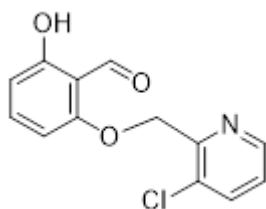
Los compuestos de ejemplo adicionales tienen la fórmula general



en donde W, X, Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente
 5 C o N, y al menos uno de W, X, Y, y Z es N; R₁, R₂, R₃, y R₄ son iguales o diferentes e independientemente halógeno o H, y al menos uno de R₁, R₂, R₃ y R₄ es halógeno. Los halógenos de ejemplo incluyen, aunque no de forma limitativa, F y Cl. Entre los ejemplos de estos compuestos adicionales se incluyen, pero sin limitación, los siguientes



10

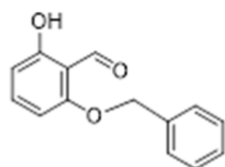


15

También se incluyen las sales farmacéuticamente aceptables y los
 profármacos orales de los compuestos. Entre los ejemplos de fracciones
 promotoras adecuadas para un profármaco oral se incluyen, aunque no de forma
 limitativa, las tiazolidinas, en donde la fracción promotora sustituye al aldehído
 para formar un profármaco oral.

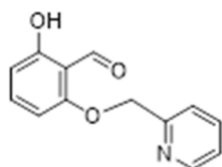
COMPUESTOS DE EJEMPLO

Los compuestos de ejemplo de la invención incluyen, aunque no de forma limitativa:



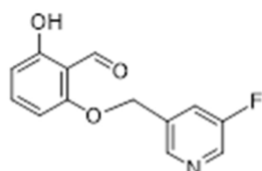
2-(benciloxi)-6-hidroxibenzaldehído

("Referencia A" en la Tabla 1),



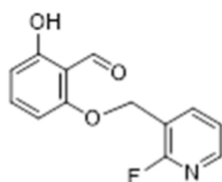
2-hidroxi-6-(piridin-2-ilmetoxi)benzaldehído

("Comp. 2" en la Tabla 1),



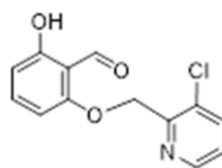
2-((5-fluoropiridin-3-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído

("Comp. 4" en la Tabla 1),

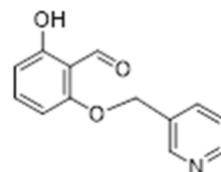


2-((2-fluoropiridin-3-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído

("Comp. 6" en la Tabla 1),

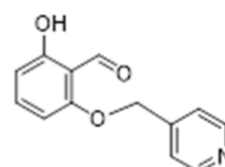


2-((3-cloropiridin-2-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído



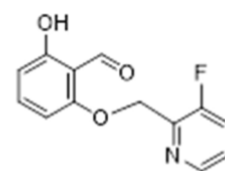
2-hidroxi-6-(piridin-3-ilmetoxi)benzaldehído

("Comp. 1" en la Tabla 1),



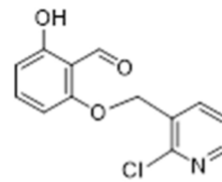
2-hidroxi-6-(piridin-4-ilmetoxi)benzaldehído

("Comp. 3" en la Tabla 1)



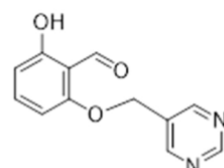
2-((3-fluoropiridin-2-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído

("Comp. 5" en la Tabla 1),



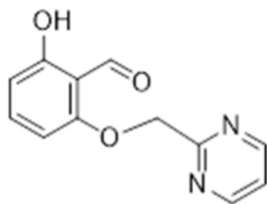
2-((2-cloropiridin-3-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído

("Comp. 7" en la Tabla 1),



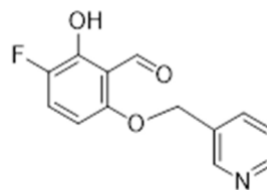
2-hidroxi-6-(pirimidin-5-ilmetoxi)benzaldehído

("Comp. 8" en la Tabla 1),



2-hidroxi-6-(pirimidin-2-ilmetoxi)benzaldehído

("Comp. 10" en la Tabla 1),



3-fluoro-2-hidroxi-6-(piridin-3-ilmetoxi)benzaldehído

("Comp. 11" en la Tabla 1),

("Comp. 12" en la Tabla 1).

Estos compuestos se particionan rápidamente en los GR para unirse a las aminas de valina N-terminal en la hendidura α de la HbS a través de una interacción de base de Schiff entre la fracción aldehído y el nitrógeno N-terminal α Val1 de la hemoglobina en estado relajado. En cuanto al mecanismo, la interacción de base de Schiff estabiliza el estado relajado, lo que da como resultado un aumento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y, en consecuencia, la actividad antifalciformación. Como todos los aldehídos, la fracción aldehídica de los compuestos es susceptible de metabolizarse rápidamente, p. ej. por la aldehído oxidasa, en el derivado carboxilato inactivo que potencialmente podría acortar la duración del efecto farmacológico de los compuestos. Consecuentemente, el agente antifalciformación de aldehído aromático 5-HMF fue abandonado en los estudios clínicos en humanos debido a su responsabilidad metabólica. En algún aspecto, el grupo aldehído de los compuestos presentados en el presente documento está protegido mediante un enlace intramolecular con el *orto* hidroxilo adyacente. El *orto* hidroxilo también posiciona serendípicamente el segundo anillo para interactuar con la hélice F.

SALES FARMACÉUTICAMENTE ACEPTABLES

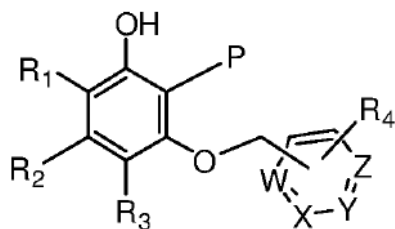
También se incluyen las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos. Algunos ejemplos de dichas sales incluyen, pero sin limitación, sales formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico (HCl), ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares), y sales formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmoico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido poligalacturónico. Otras sales incluyen sales

cuaternarias farmacéuticamente aceptables conocidas por los expertos en la materia, que incluyen específicamente la sal de amonio cuaternario de fórmula --NR⁺Z⁻-, en donde R es hidrógeno, alquilo o bencilo, y Z es un contraión, incluyendo cloruro, bromuro, yoduro, --O-alquilo, toluenosulfonato, metilsulfonato, sulfonato, fosfato o carboxilato (tal como benzoato, succinato, acetato, glicolato, maleato, malato, citrato, tartrato, ascorbato, benzoato, cinamoato, mandelato, benciloato y difenilacetato).

PROFÁRMACOS ORALES

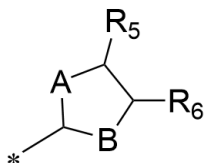
También se incluyen los profármacos orales de los compuestos. Pueden usarse profármacos orales, por ejemplo, para mejorar la formulación oral y/o la biodisponibilidad oral o mejorar las características de absorción y la tolerabilidad gastrointestinal. Ejemplos de tales profármacos incluyen, pero sin limitación, profármacos formados mediante la sustitución del grupo aldehído por una fracción promotora, tal como la tiazolidina, imina, acetal, hemiacetal, éster o alcohol.

En algunos aspectos, los compuestos se administrarán como profármacos que incluyen, aunque no de forma limitativa, los siguientes:



en donde W, X, Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente C o N, con la condición de que al menos uno de W, X, Y, y Z es N, y R₁, R₂, R₃ y R₄ son cada uno iguales o diferentes y de manera independiente F, Cl o H, y P es una fracción promotora, tal como una tiazolidina, imina, acetal, hemiacetal, éster o alcohol.

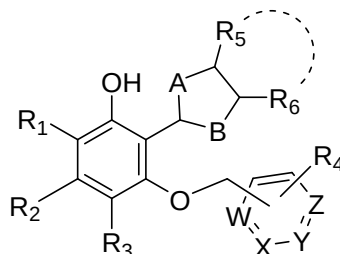
En algunos aspectos, la fracción promotora (P) es



en donde A y B son iguales o diferentes e independientemente O, NH, S, OCH₂, NHCH₂, o SCH₂; y R₅ y R₆ son iguales o diferentes e independientemente COOH, COOR₇, CH₂OH, COCH₃ o -(CH₂)_nCH₃ donde n = 0-5 y R₇ es alquilo, arilo de heterocíclico; y donde el enlace marcado con * se une directamente a un

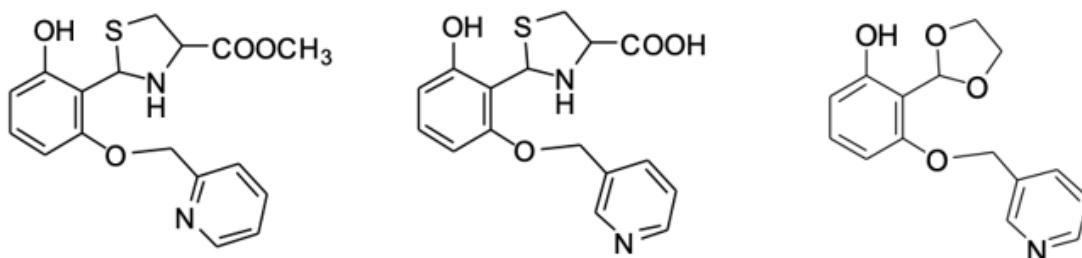
carbono del anillo bencénico.

En algunas realizaciones R_5 y R_6 pueden formar un anillo juntos como sigue:

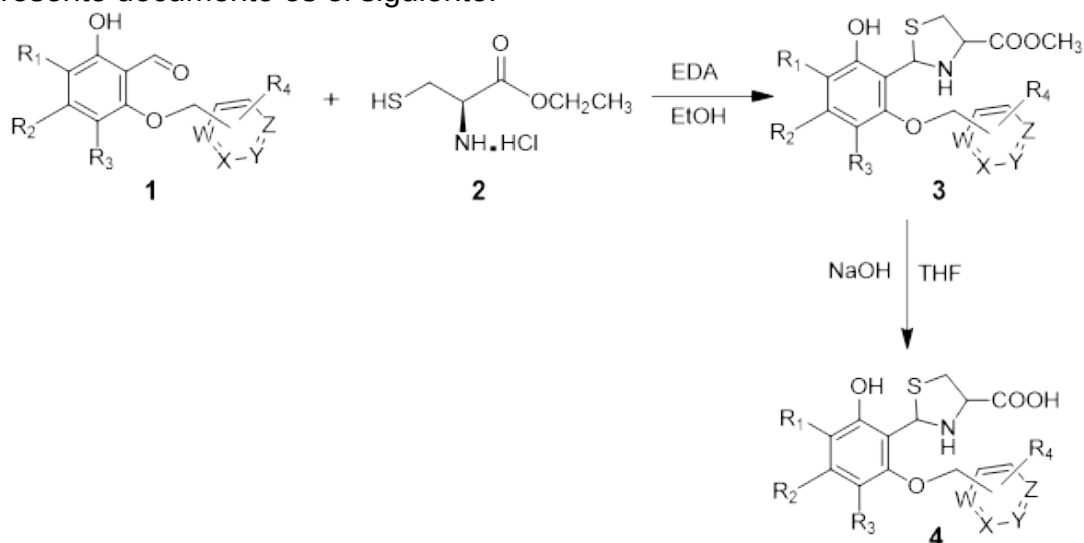


5 en donde la estructura del anillo es un anillo de 3 a 8 miembros con o sin sustitución.

En algunos aspectos, el compuesto puede administrarse como profármaco, incluyendo, aunque no de forma limitativa, los siguientes:



10 Un ejemplo de esquema para fabricar un profármaco divulgado en el presente documento es el siguiente:



15 en donde W, X, Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente C o N, con la condición de que al menos uno de W, X, Y, y Z es N, y R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son cada uno iguales o diferentes y de manera independiente F, Cl o H.

Una síntesis típica implicará la condensación del benzaldehído, **1** con éster etílico de L-cisteína equimolar, **2** en presencia de clorhidrato de N-etildiisopropilamina (EDA) o trietilamina (NET₃) para producir el profármaco éster etílico, **3**. La hidrólisis del grupo protector éster etílico de **3** con hidróxido de sodio producirá el profármaco ácido, **4**.

VENTAJAS DE LOS COMPUESTOS

Los compuestos descritos en el presente documento presentan una mejora de la actividad farmacológica, es decir, mayor potencia y/o semividas aumentadas (alargamiento, mayor duración, etc.), y/o biodisponibilidad mejorada en condiciones fisiológicas (p. ej., en circulación en una potencia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces o más mayor, en la sangre, etc.) en comparación con otros compuestos de benzaldehído. Por ejemplo, los compuestos presentan semividas *in vivo* de al menos alrededor de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5 o 12,0 horas, o incluso más, p. ej. de aproximadamente 12 a 60 horas, es decir, de alrededor de 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50 o 60 horas. En algunos aspectos, en comparación con la vainillina o TD-7, los compuestos presentan una potencia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 veces mayor o más en términos de prevenir la falciformación en los GR y/o la formación de polímeros de HbS. En algunos aspectos, en comparación con INN-310 y TD-7, los compuestos presentan una potencia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces o más mayor de efectos desestabilizadores de polímeros o de inhibición directa de la polimerización de la HbS; Voxelotor no demuestra ninguna inhibición directa de la polimerización de la HbS. En algunos aspectos, en comparación con VZHE-039, los compuestos son seguros para ser administrados a niveles sanguíneos clínicamente relevantes sin toxicidad, p. ej., hipertrofia o apoptosis de los hepatocitos. En algunos aspectos, en comparación con PP-14, los compuestos no tienen sustituyentes metabólicamente lábiles que se metabolizan en especies de carga, p. ej. ácido carboxílico, que pueden reducir la permeabilidad de la membrana de los GR. Por tanto, en algunos aspectos, las composiciones que comprenden los compuestos se administran con menor frecuencia y/o a dosis inferiores a las que se requerirían para los compuestos de la técnica anterior, sin embargo, los sujetos que reciben los compuestos experimentan el mismo nivel de efectos beneficiosos o un nivel mayor. En algunos aspectos, las composiciones que comprenden los compuestos pueden administrarse a niveles

clínicamente beneficiosos sin causar toxicidad.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE EJEMPLO UTILIZANDO LOS COMPUESTOS

Los compuestos descritos se usan para tratar o tratar profilácticamente
5 enfermedades o afecciones relacionadas con la AF y otras
enfermedades/condiciones descritas a continuación. Como se utiliza en el
presente documento, "tratar profilácticamente" ("tratamiento profiláctico", "que
trata profilácticamente", etc.) y "prevenir" ("prevención", "que previene", etc.) se
refieren a protegerse de o evitar la aparición de al menos un síntoma de una
10 enfermedad o afección no deseada, tal como al menos un síntoma de AF),
mediante la administración profiláctica de una composición que comprende al
menos un compuesto como se describe en el presente documento, a un sujeto
que lo necesita. En general, "profiláctico" o "profilaxis" se refiere a una reducción
en la probabilidad de que el paciente desarrolle un trastorno o un síntoma de un
15 trastorno. Normalmente, un experto en la materia considera que el sujeto está
en riesgo o es susceptible de desarrollar al menos un síntoma de la enfermedad
o afección no deseada o considera que es probable que desarrolle al menos un
síntoma de la enfermedad/afección en ausencia de intervención médica. En
algunos aspectos, para la "prevención" o el "tratamiento profiláctico", la
20 administración se produce antes de que el sujeto tenga, o se sepa o se confirme
que tiene, síntomas de la enfermedad (afección, trastorno, síndrome, etc; a
menos que se indique de otro modo, estos términos se utilizan indistintamente
en el presente documento). Dicho de otro modo, puede que los síntomas aún no
sean manifiestos u observables, o que se trate de síntomas en "fase inicial".
25 Puede considerarse que el sujeto está en riesgo debido a una variedad de
factores, que incluye, pero sin limitación: predisposición genética; evidencia de
síntomas "tempranos"; pruebas tales como análisis de sangre, etc. En dichos
aspectos, el tratamiento del sujeto puede prevenir los efectos o resultados
nocivos o dañinos de la afección completamente desarrollada. La "prevención"
30 o el "tratamiento profiláctico" de una enfermedad o afección puede implicar la
prevención total de la aparición de síntomas detectables o, como alternativa,
puede implicar la disminución o atenuación del grado, gravedad o duración de al
menos un síntoma de la enfermedad que se produciría de otro modo en ausencia
de las intervenciones médicas proporcionadas en el presente documento.
35 "Tratar" (tratamiento, que trata, etc.) como se utiliza en el presente

documento se refiere a la administración de al menos una composición que comprende un compuesto como se describe en el presente documento, a un sujeto que ya presenta al menos un síntoma de una enfermedad tal como AF. Dicho de otro modo, al menos un parámetro que se sabe que está asociado con la enfermedad se ha medido, detectado, experimentado u observado en el sujeto. Por ejemplo, el síntoma puede ser la fisiopatología primaria de la falciformación de los GR asociada a la anemia falciforme. Además, los compuestos divulgados en el presente documento mejoran varios de los acontecimientos adversos secundarios en cascada de la AF, incluyendo la adhesión de los GR al endotelio tisular, estrés oxidativo, hemólisis de los GR, disminución de la biodisponibilidad vascular de NO, vasoclusión, deterioro del flujo sanguíneo microvascular, aumento de la presión sanguínea, derrames cerebrales y crisis dolorosas, p. ej., debido a la polimerización de los GR. Por ejemplo, los compuestos generalmente realizan uno o más de los siguientes procesos: aumentan la afinidad por el O₂ de la HbS; disminuyen la formación de fibras; reducen la fragilidad mecánica de las células falciformes; reducen la hemólisis de los GR; atenúan la necrosis celular y la apoptosis inducidas por la hipoxia; mejoran la función microvascular (es decir, a partir de las secuelas de la AF o durante la recuperación de un shock hemorrágico); produce beneficios hemodinámicos y de oxigenación durante la hipoxia (p. ej. mantenimiento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca; conservación del flujo sanguíneo microvascular; reducción de las zonas de hipoxia cardíaca y cerebral); reducen el dolor o la frecuencia de las crisis de dolor; disminuyen la lactato deshidrogenasa y/o hemólisis de los GR; reducen la presión arterial diastólica; aumentan los niveles de oxígeno en sangre (S_pO₂) durante la provocación de hipoxia, etc.

El "tratamiento" de una enfermedad implica la disminución o atenuación o en algunos casos, la erradicación completa, de al menos un síntoma de la enfermedad que estaba presente antes o en el momento de la administración de la composición.

COMPOSICIONES DE EJEMPLO Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

Se proporcionan composiciones en el presente documento que comprenden al menos un compuesto como se describe en el presente documento, y métodos de administración del mismo para tratar, p. ej., AF, hipoxia, etc. La implementación de los métodos generalmente implica identificar a los

pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección descrita en el presente documento (por ejemplo, AF o hipoxia), y administrar una composición como la descrita en el presente documento por una vía apropiada. La dosificación exacta a administrar puede variar dependiendo de la edad, el género, el peso y el estado de salud general del paciente individual, la gravedad de los síntomas de la enfermedad, o de otros tratamientos que esté recibiendo el paciente, así como del grado o de la progresión de la enfermedad que se está tratando y la etiología precisa de la enfermedad. Sin embargo, en general, para la administración a mamíferos (p. ej., seres humanos), se administra una composición suficiente para alcanzar dosis en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg o más por kg de peso corporal por 24 h, p. ej. de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg, 5 a 100, o 10-50 mg por kg de peso corporal por 24 h. En general, una dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 20 a aproximadamente 150 mg por kg de peso corporal por 24 h. La dosis variará con la vía de administración, la biodisponibilidad y la formulación particular que se administre, así como de acuerdo con la naturaleza de la enfermedad que se esté previniendo o tratando.

Las composiciones generalmente se administran en una formulación farmacéuticamente aceptable que incluye excipientes adecuados, elixires, aglutinantes y similares (generalmente denominados "portadores farmacéutica y fisiológicamente aceptables"), que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con los principios activos. Los profármacos o derivados pueden estar presentes en la formulación como sales farmacéuticamente aceptables (p. ej., sales de metales alcalinos tales como sodio, potasio, sales de calcio o litio, amonio, etc.) o como otros complejos. Debe entenderse que las formulaciones farmacéuticamente aceptables incluyen sólidos, semisólidos y líquidos utilizados convencionalmente para preparar sólidos, formas farmacéuticas semisólidas y líquidas tales como comprimidos, cápsulas, líquidos, formas farmacéuticas en aerosol y diferentes formas inyectables (por ejemplo, formas para la administración intravenosa), etc. Los portadores farmacéuticos adecuados incluyen, pero sin limitación, diluyentes o materiales de relleno sólidos inertes, soluciones acuosas estériles y diversos disolventes orgánicos. Los ejemplos de portadores sólidos (diluyentes, excipientes) incluyen lactosa, almidón, agentes disgregantes convencionales, recubrimientos, lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio, ácido esteárico y

éteres de alquilo inferiores de celulosa. Algunos ejemplos de portadores líquidos incluyen, pero sin limitación, diferentes vehículos acuosos o a base de aceite, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, isopropanol, tampón fosfato, jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, polioxietileno, miristato de isopropilo, cocoato de etilo, cocoato de octilo, aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado, parafina, parafina líquida, propilenglicol, celulosas, parabenos, alcohol estearílico, polietilenglicol, miristato de isopropilo, fenoxietanol, y similares, o combinaciones de los mismos. Se puede utilizar agua como portador para la preparación de composiciones que también pueden incluir tampones y agentes convencionales para hacer que la composición sea isotónica. Las formas farmacéuticas orales pueden incluir diferentes espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión, aglutinantes, recubrimientos y similares. La composición de la presente divulgación puede contener cualquier ingrediente adicional, de modo que proporcione la composición en una forma adecuada para la vía de administración prevista. Además, la composición puede contener cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampón del pH y similares. De forma similar, el portador o diluyente puede incluir cualquier material de liberación prolongada conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerina o diestearato de glicerina, solo o mezclado con cera. Otros posibles aditivos y otros materiales (preferentemente los que se consideran generalmente como seguros [GRAS, *Generally Regarded As Safe*]) incluyen: colorantes; aromatizantes; tensioactivos (TWEEN®, ácido oleico, etc.); y disolventes, estabilizantes, aglutinantes o encapsulantes (lactosa, liposomas, etc.). También pueden usarse conservantes tales como metil parabeno o cloruro de benzalconio. Dependiendo de la formulación, se espera que los componentes activos (p. ej. al menos un profármaco o derivado) esté presente a aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 % de la composición y el "portador" vehicular constituirá aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 % de la composición. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden incluir cualquier aditivo o adyuvante farmacéuticamente aceptable adecuado en la medida en que no impida ni interfiera con el(los) efecto(s) terapéutico(s) de la composición. Todavía pueden encontrarse otras formulaciones adecuadas para su uso en la presente divulgación, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 22.^a edición,

Allen, Loyd V., Jr editor (septiembre de 2012); y Akers, Michael J. "Sterile Drug Products: Formulation, Packaging, Manufacturing and Quality"; editorial Informa Healthcare (2010).

Las composiciones (preparaciones) de la presente divulgación se
5 formulan para la administración por cualquiera de los muchos medios adecuados
que son conocidos por los expertos en la materia, que incluye, pero sin limitación:
por vía oral, mediante inyección, por vía rectal, mediante inhalación, por vía
intravaginal, por vía intranasal, por vía tópica, como colirios, por atomizador, por
vía transdérmica, por vía sublingual, por administración por vía rectal y bucal, por
10 inhalación de un aerosol, por administración por microagujas, etc. En algunos
aspectos, el modo de administración es oral, por inyección o por vía intravenosa,
preferentemente por vía oral.

La administración del compuesto de la presente divulgación puede ser
intermitente o a una velocidad gradual o continua, constante o controlada (p. ej.,
15 en una formulación de liberación sostenida que prolonga aún más el tiempo de
biodisponibilidad). Además, el momento del día y la cantidad de veces al día que
la formulación farmacéutica se administra varían y se determinan mejor por parte
de expertos en la materia tales como médicos. En general, los compuestos se
administran al menos una vez al día, y pueden administrarse p. ej., 2, 3, 4 o más
20 veces al día. Durante una crisis, la administración puede ser más frecuente.

La administración del compuesto puede realizarse por cualquier medio
como un único modo de tratamiento o junto con otras terapias y modalidades de
tratamiento, p. ej., antibióticos, analgésicos, hidroxurea, vacunas, transfusiones
de sangre, suministro de oxígeno suplementario, genoterapia, óxido nítrico,
25 medicamentos para aumentar la producción de hemoglobina fetal, estatinas, etc.
Además, si las secuelas de la enfermedad incluyen otras morbilidades, p. ej. una
afección cardíaca, entonces, pueden ofrecerse tratamientos adicionales para las
cardiopatías, incluyendo cirugía. Otras opciones de tratamiento incluyen diversos
neutraceuticos, dietas, ejercicio, etc. "Junto con" se refiere tanto a la
30 administración de una preparación separada de uno o más agentes adicionales,
como a la inclusión de uno o más agentes adicionales en una composición de la
presente divulgación.

El sujeto al que se administra la composición generalmente es un
mamífero, con frecuencia un ser humano, pero este no siempre es el caso. Las
35 aplicaciones veterinarias de esta tecnología también se contemplan, p. ej., para

animales de compañía (gatos, perros, etc.) o para ganadería y animales de granja, para caballos e incluso para animales "salvajes" que tengan un especial valor o que estén bajo el cuidado de un veterinario, p. ej., animales en reservas o zoológicos, animales heridos que estén siendo rehabilitados, etc.

5 ENFERMEDADES Y AFECCIONES QUE SE TRATAN

En algunos aspectos, la enfermedad o afección que se previene o trata como se describe en el presente documento es la AF y las fisiopatologías asociadas a ella, tal como la falciformación de los GR. Además, los compuestos mejoran los efectos adversos secundarios en cascada, incluyendo la adhesión de los GR al endotelio tisular, estrés oxidativo, hemólisis de los GR, disminución de la biodisponibilidad vascular de NO, vasoclusión, deterioro del flujo sanguíneo microvascular, aumento de la presión sanguínea, derrames cerebrales y crisis dolorosas. Además, los compuestos aumentan la afinidad al O₂ de la HbS, disminuyen la formación de fibras, reducen la fragilidad mecánica de las células falciformes y reducen la hemólisis de los GR.

En otros aspectos, los compuestos se usan para tratar o prevenir los síntomas de la hipoxia que está o no relacionada con la AF. Tal como se utiliza en el presente documento, la hipoxia es una afección en la que el cuerpo o una región del cuerpo se ven privados de un suministro adecuado de oxígeno a nivel tisular. La hipoxia se clasifica como generalizada, que afecta a todo el cuerpo, o local, que afecta a una región del cuerpo. Existen cuatro tipos de hipoxia: (1) el tipo hipoxémica, en la que la presión de oxígeno en la sangre que va a los tejidos es demasiado baja para saturar la hemoglobina; (2) el tipo anémica, en la que la cantidad de hemoglobina funcional es demasiado pequeña y, por tanto, la capacidad de la sangre para transportar oxígeno es demasiado baja; (3) el tipo estancada, en la que la sangre es o puede ser normal, pero el flujo sanguíneo a los tejidos es reducido o distribuido de forma desigual; y (4) el tipo histotóxica, en la que el tejido y/o las células están contaminados y, por tanto, son incapaces de hacer un uso adecuado del oxígeno. Enfermedades de la sangre, del corazón y la circulación, y de los pulmones pueden producir algún tipo de hipoxia.

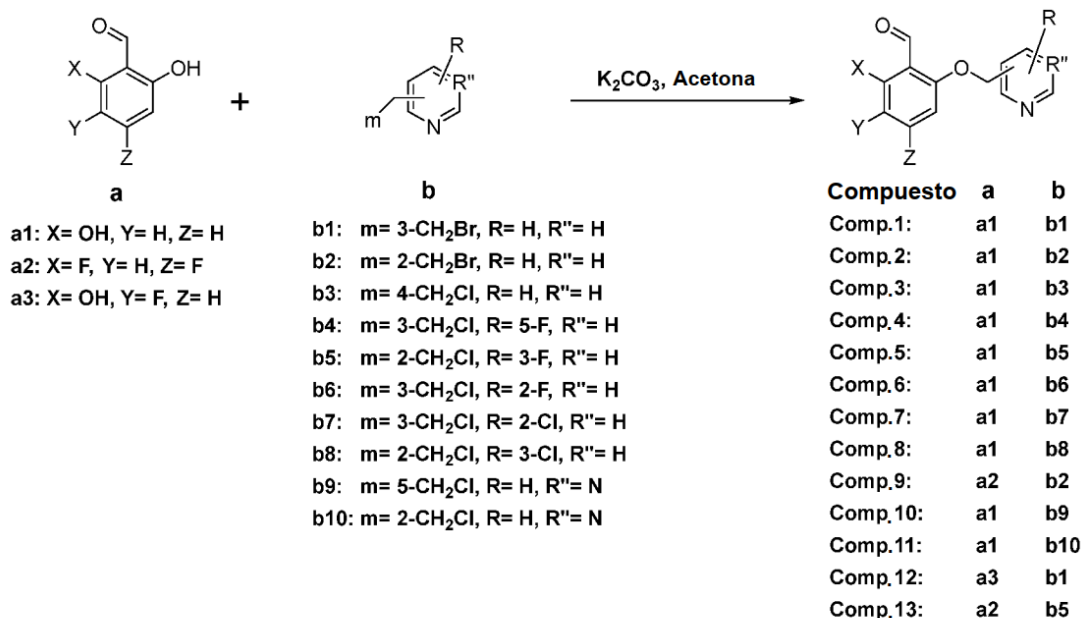
Se produce una hipoxia generalizada, por ejemplo, en personas sanas cuando ascienden a gran altitud, donde provoca el mal de altura, que puede causar complicaciones mortales, tales como edema pulmonar de altitud (EPAA) y edema cerebral de altitud (ECAA). La hipoxia también se produce en individuos sanos cuando respiran mezclas de gases con un bajo contenido de oxígeno, p.

ej. al bucear bajo el agua o en el espacio exterior, y especialmente cuando se utilizan sistemas recicladores de circuito cerrado que controlan la cantidad de oxígeno del aire suministrado. La hipoxia también se produce como consecuencia del nacimiento prematuro en el neonato debido a la inmadurez del desarrollo pulmonar. La hipoxia resultante de isquemia (flujo sanguíneo insuficiente a un tejido u órgano), se denomina "hipoxia isquémica" y está causada, por ejemplo, por una embolia, un infarto que disminuye el flujo sanguíneo general, o un traumatismo en un tejido que provoca daños, o puede ser inducido a propósito en algunos procedimientos médicos, p. ej. la implantación de una endoprótesis, aplicación de un torniquete, etc. Enfermedades tales como la enfermedad vascular periférica pueden causar hipoxia local. Otras causas incluyen alteraciones del impulso respiratorio, tal como en la alcalosis respiratoria, derivación fisiológica o patológica de la sangre, enfermedades que interfieren en la función pulmonar dando lugar a un desajuste ventilación-perfusión, tal como un émbolo pulmonar, o alteraciones de la presión parcial de oxígeno en el ambiente o en los alvéolos pulmonares. Cuando la hemoglobina es deficiente, puede producirse anemia y causar "hipoxia anémica" si disminuye la perfusión tisular. La intoxicación por monóxido de carbono puede causar hipoxia, ya sea agudamente, como en la intoxicación por humo, ya sea durante un periodo de tiempo, como con el consumo de cigarrillos o la exposición al esmog. Ciertos gases asfixiantes inodoros (p. ej. nitrógeno, metano, etc.) inducen hipoxia, al igual que la intoxicación por cianuro y la formación de metahemoglobina, p. ej. por la ingestión de nitrito sódico o de algunos otros fármacos y productos químicos. Los compuestos descritos en el presente documento se utilizan para prevenir o tratar los síntomas de una o más de cualquiera de estas afecciones relacionadas con la hipoxia. Además, los compuestos atenúan la necrosis celular y la apoptosis inducidas por la hipoxia, mejoran la función microvascular durante la reanimación del choque hemorrágico, producen beneficios hemodinámicos y de oxigenación durante la hipoxia (p. ej. mantenimiento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca; conservación del flujo sanguíneo microvascular; reducción de las zonas de hipoxia cardíaca y cerebral, etc.), y proporcionan mejora en varios síntomas clínicos, incluyendo la reducción del dolor, disminución de la lactato deshidrogenasa y/o hemólisis de los GR, reducción de la presión arterial diastólica, y un aumento de los niveles de oxígeno en sangre (S_pO_2) durante la

provocación de la hipoxia.

MÉTODOS PARA PREPARAR LOS COMPUESTOS

Un esquema genérico para preparar los compuestos divulgados en el presente documento se representa abajo en el esquema I. Brevemente, el hidroxibenzaldehído sustituido y la clorometilpiridina sustituida o bromometilpiridina sustituida se hicieron reaccionar juntos en condiciones básicas a temperatura ambiente durante 2 horas, y a continuación a 60 °C durante 4-6 horas para dar los Compuestos **1-13** en rendimientos del 9-47 %.



Esquema I

Debe entenderse que esta invención no está limitada a realizaciones particulares descritas anteriormente en el presente documento y a continuación, y de tal manera puede, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio entre el límite superior y el inferior de dicho intervalo (hasta una décima de la unidad del límite inferior) está incluido en el intervalo y abarcado dentro de la invención, a menos que el contexto o la descripción indiquen claramente lo contrario. Además, se abarcan intervalos más pequeños entre dos valores cualesquiera en el intervalo, salvo que el contexto o la descripción indiquen claramente lo contrario.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que

entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. En el presente documento, se describen métodos y materiales ilustrativos representativos; también puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención.

Todas las publicaciones y patentes citadas en esta especificación se incorporan en el presente documento como referencia como si cada publicación o patente individual se indicara específica e individualmente para incorporarse como referencia y se incorpore aquí como referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones. La mención de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de disponibilidad al público reales y tal vez deban confirmarse independientemente.

Se observa que, tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración está prevista para servir de apoyo a la mención en las reivindicaciones de terminología tan exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la mención de los elementos de las reivindicaciones o el uso de limitaciones "negativas", tal como "en donde [una característica o elemento particular] está ausente", o "excepto por [una característica o elemento particular]", o "en donde [una característica o elemento particular] no está presente (incluido, etc.)...".

Como resultará evidente para los expertos en la materia tras la lectura de la presente divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene características y componentes discretos que fácilmente pueden separarse o combinarse con las características de cualquiera de las otras realizaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la presente invención. Cualquier método citado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea posible lógicamente.

EJEMPLO

Recientemente, descubrimos, por casualidad, un conjunto de benzaldehídos que presentan efectos desestabilizadores de polímeros muy potentes, pero sin ningún sustituyente químico en el segundo anillo (piridina o benceno) que se esperaba que fuera necesario para establecer fuertes interacciones con los residuos de la hélice αF , salvo posiblemente la sustitución de un hidrógeno por un halógeno (p. ej., F o Cl). Inicialmente, estos compuestos se sintetizaron y ensayaron sobre la base de que representaban un andamiaje químico para el descubrimiento de nuevos benzaldehídos desestabilizadores de polímeros mediante el cribado de nuevos sustituyentes químicos para añadir al segundo anillo, pero se presumía que tendrían efectos desestabilizadores de polímeros muy débiles, de forma similar a INN-310, ya que carecen de un sustituyente químico para establecer fuertes interacciones con la hélice αF , como con VZHE-039 y PP-14. Sin embargo, inesperadamente, estos compuestos pueden establecer interacciones muy fuertes con los residuos de la hélice αF , que pueden ser totalmente hidrófobas directamente a través de una piridina, o alternativamente a través de un nitrógeno de pirimidina o triazina, o incluso totalmente hidrófobas a través de un anillo de benceno. Aunque en algunos aspectos, los halógenos sustituyen al hidrógeno en las estructuras de anillo, estos halógenos no interactúan con los residuos de la hélice αF , sino que están previstos para limitar o modificar posiblemente las interacciones con las enzimas metabólicas y/o eliminar los intermediarios metabólicos posiblemente tóxicos. El resultado inesperado parece ser consecuencia de ligeros cambios en la orientación de los compuestos en la hendidura α de Hb con la adición del *orto* hidroxilo en el anillo de benzaldehído para sustituir al *meta* metoxi de INN-310. Esto, fortuitamente, colocó a la segunda estructura de anillo en posición de establecer sus propias interacciones fuertes con los residuos de la hélice αF sin necesidad de ningún sustituyente donante/aceptor de enlaces de hidrógeno. Por el contrario, la sustitución del *orto* hidroxilo en el benzaldehído por un flúor (Compuesto **9** y **13**) anula completamente los efectos de desestabilización de polímeros de los compuestos. También, la adición de un *meta* flúor después del *orto* hidroxilo en el benzaldehído (Compuesto **12**) redujo significativamente la potencia de la inhibición de polímero.

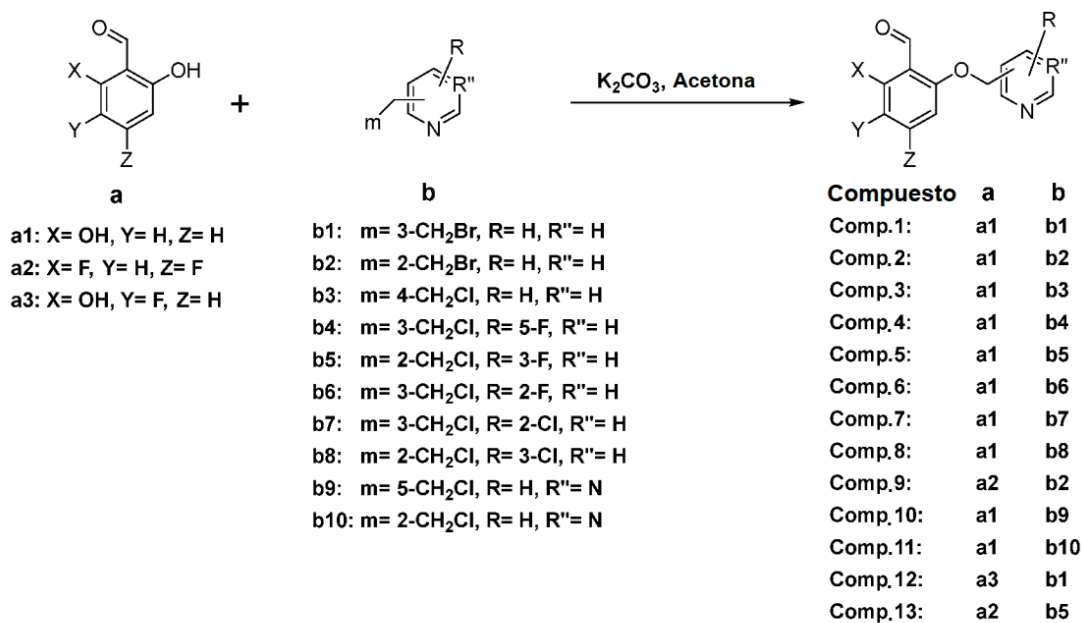
Por lo tanto, se ha preparado una serie de nuevos análogos con inesperados efectos desestabilizadores de polímeros y sorprendente potencia. De hecho, los Compuestos **1** y **2** (Tabla 1) son los desestabilizadores de

polímeros más potentes descubiertos hasta la fecha, demostrando de forma consistente una rápida partición en los GR y una inhibición robusta y sostenida de la falciformación de los GR en anoxia completa, mejorando la potencia de VZHE-039 y PP-14. Los Compuestos **1**, **2** y **5** también han demostrado una absorción, distribución, metabolismo y propiedades de eliminación (ADME) aceptables sin labilidad metabólica, consistentes en un fármaco humano oral viable de molécula pequeña para el tratamiento de la anemia falciforme. Por el contrario, el Compuesto de referencia A, que establece interacciones totalmente hidrófobas con la hélice αF a través de un anillo de benceno y presenta potentes efectos desestabilizadores de polímeros, no está biodisponible. Los Compuestos **1**, **2** y **5** han demostrado seguridad en toxicología no clínica por encima de los niveles terapéuticos previstos sin hepatotoxicidad, indicando una ventana terapéutica aceptable para un ensayo clínico en seres humanos. Se trata de los primeros benzaldehídos desestabilizadores de polímeros con propiedades adecuadas para avanzar hacia un ensayo en seres humanos. A la inversa, de cientos de compuestos ensayados con diferentes sustituyentes químicos en el segundo anillo, no se identificaron fármacos candidatos viables debido a diversas responsabilidades relacionadas con el segundo sustituyente del anillo.

Resultados y análisis

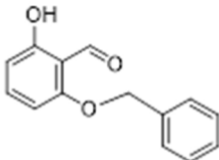
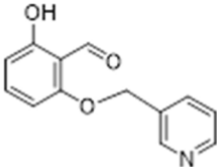
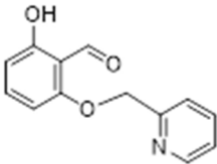
Síntesis/Química

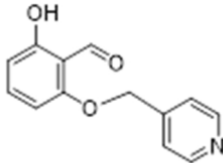
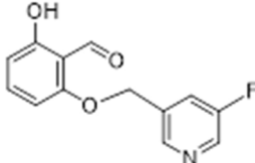
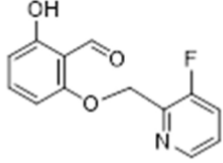
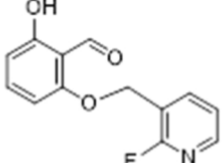
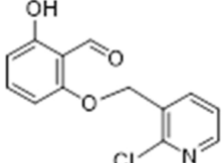
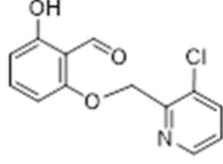
Los Compuestos **1-13** de la Tabla 1 se sintetizaron como se muestra en el esquema 4. Brevemente, el hidroxibenzaldehído sustituido y la clorometilpiridina sustituida o bromometilpiridina sustituida se hicieron reaccionar juntos en condiciones básicas a temperatura ambiente durante 2 horas, y a continuación a 60 °C durante 4-6 horas para dar los Compuestos **1-13** en rendimientos del 9-47 %. En la sección experimental se describe detalladamente la síntesis de cada compuesto. Las síntesis de moléculas de comparación en la Tabla 2, tales como TD-7, INN-310, PP-14, y Voxelotor, se han descrito en la bibliografía.



Esquema I

Tabla 1. Estructuras de compuestos diana de ejemplo

Compuesto	Estructura y nombre del compuesto
Referencia A	 2-(benciloxi)-6-hidroxi-benzaldehído
Comp. 1	 2-hidroxi-6-(piridin-3-ilmetoxi)benzaldehído
Comp. 2	 2-hidroxi-6-(piridin-2-ilmetoxi)benzaldehído

Compuesto	Estructura y nombre del compuesto
Comp. 3	 2-hidroxi-6-(piridin-4-ilmetoxi)benzaldehído
Comp. 4	 2-((5-fluoropiridin-3-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído
Comp. 5	 2-((3-fluoropiridin-2-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído
Comp. 6	 2-((2-fluoropiridin-3-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído
Comp. 7	 2-((2-cloropiridin-3-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído
Comp. 8	 2-((3-cloropiridin-2-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído

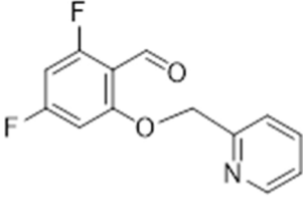
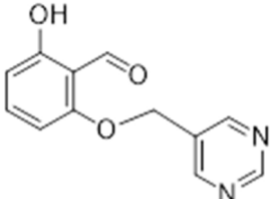
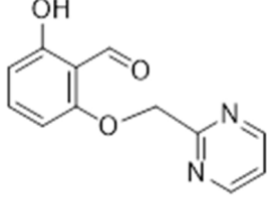
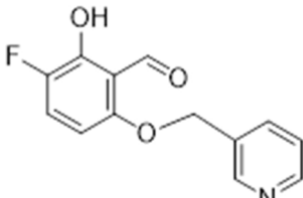
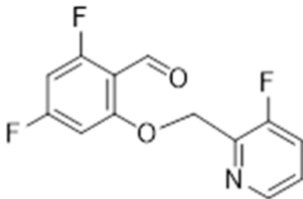
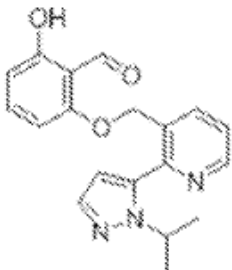
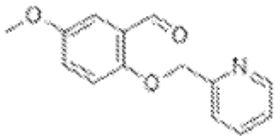
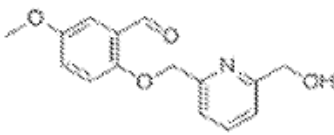
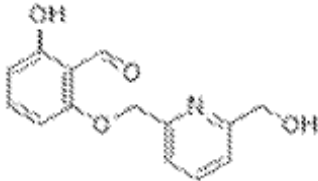
Compuesto	Estructura y nombre del compuesto
Comp. 9	 2,4-difluoro-6-(piridin-2-ilmetoxi)benzalhído
Comp. 10	 2-hidroxi-6-(pirimidin-5-ilmetoxi)benzalhído
Comp. 11	 2-hidroxi-6-(pirimidin-2-ilmetoxi)benzalhído
Comp. 12	 3-fluoro-2-hidroxi-6-(piridin-3-ilmetoxi)benzalhído
Comp. 13	 2,4-difluoro-6-((3-fluoropiridin-2-il)metoxi)benzalhído

Tabla 2. Estructuras de las moléculas de comparación

Compuesto	Estructura y nombre del compuesto
Voxelotor	
INN-310	
TD-7	
VZHE-039	
PP-14	

Evaluación funcional y biológica *in vitro*

5 Los Compuestos **1-13** (Tabla 1) se estudiaron con moléculas de comparación INN-310, TD-7, VZHE-039, PP-14 y Voxelotor (Tabla 2). Las síntesis de las moléculas de comparación se han descrito en la bibliografía. Todas las moléculas de comparación son aldehídos aromáticos y se conoce que aumentan la afinidad de la Hb por el oxígeno con la inhibición concomitante de

10 la hipoxia inducida por la falciformación de los GR. Mientras que PP-14 y VZHE-039 presentan potentes efectos antifalciformación a través de la desestabilización directa de polímeros, Voxelotor, INN-310 y TD-7 muestran un

efecto limitado o nulo.

Los Compuestos **1-13** formaron aductos con la Hb y presentaron una potente inhibición falciforme tras la incubación en hipoxia, y la mayoría de los compuestos de la clase, inesperadamente, demostraron también potentes efectos desestabilizadores de polímeros con inhibición falciforme en anoxia (Tabla 3). Comparativamente, Voxelotor no demostró ninguna inhibición falciforme en condiciones anóxicas. En los experimentos de anoxia a lo largo del tiempo (Figura 2), los Compuestos **1** y **2** demostraron sorprendentemente los efectos desestabilizadores de polímeros más potentes y sostenidos observados hasta la fecha, generalmente al menos tan potentes o más que los compuestos con sustituyentes químicos que establecen interacciones directas con los residuos de la superficie de la hélice αF , tales como VZHE-039 y PP-14, entre otros muchos que se han ensayado. Por el contrario, el INN-310 solo demostró una potencia débil en anoxia. A pesar de sus potentes efectos antifalciformación, los Compuestos **1, 2 y 5** presentaron cambios relativamente débiles en la p50 de Hb en sangre humana en comparación con Voxelotor (Figura 2) a niveles equivalentes de ocupación fármaco-Hb, demostrando la importancia relativa de la desestabilización directa de polímeros para la eficacia de esta clase de compuestos.

En estudios de partición, todos los compuestos presentaron elevados coeficientes de partición superiores al 90 % (Tabla 4), lo que indica que los compuestos permeabilizaron rápidamente la membrana del GR. Por lo tanto, las diferencias en los aductos fijados fármaco-Hb reflejan en gran medida solo diferencias en la afinidad de unión a la Hb de cada compuesto. Los compuestos más potentes, Comp. **1, 2, y 5**, demostraron más de un 90 % de aductos de Hb tras la incubación a una concentración de 2 mM en sangre AA.

Tabla 3. Estudios de modificación de la hemoglobina y de inhibición falciforme utilizando suspensiones sanguíneas de seres humanos con AF homocigótica

ID del Compuesto	Modificación de la Hb (%)	% Inhibición de falciformación (Hipoxia)	% Inhibición de falciformación (Anoxia)
Voxelotor	92,3 $\pm$ 6,8	79,9 $\pm$ 6,2	1,5 $\pm$ 5,5
INN-310	65,7 $\pm$ 6,0	69,9 $\pm$ 20,0	17,9 $\pm$ 7,0
TD-7	72,5	80,6 $\pm$ 5,8	20,4 $\pm$ 2,9
VZHE-039	90,7 $\pm$ 9,9	75,3 $\pm$ 14,3	68,9 $\pm$ 17,7

PP-14	85,3 ± 11,3	83,1 ± 6,9	80,5 ± 17,4
Comp. 1	95,8 ± 6,2	74,8 ± 15,9	71,9 ± 16,0
Comp. 2	95,5 ± 5,7	72,8 ± 13,0	63,2 ± 17,2
Comp. 3	74,4 ± 10,6	54,1 ± 14,7	26,2 ± 8,6
Comp. 4	92,9 ± 9,8	64,3 ± 24,5	69,6 ± 13,4
Comp. 5	98,2 ± 2,5	66,6 ± 9,4	66,5 ± 21,1
Comp. 6	73,8 ± 15,4	67,1 ± 5,8	32,6 ± 28,5
Comp. 7	73,91 ± 9,8	36,1 ± 19,7	9,4 ± 10,7
Comp. 8	100,0 ± 0,0	69,7 ± 8,0	18,3 ± 8,4
Comp. 9	69,1 ± 11,8	68,1 ± 29,8	0 ± 5,6
Comp. 10	100,0 ± 0,0	76,6 ± 10,9	75,6 ± 18,5
Comp. 11	98,1 ± 3,2	67,4 ± 18,2	45,1 ± 10,8
Comp. 12	99,8 ± 0,4	68,6 ± 12,0	28,7 ± 6,9
Comp. 13	79,1 ± 10,3	63,6 ± 24,3	-0,5 ± 2,7

Efectos biológicos mostrados con compuestos a una concentración de 2 mM, 4 réplicas biológicas

Tabla 4. Modificación de la hemoglobina, estudios utilizando sangre AA sin falciformación

5

ID del Compuesto	Aductos fijos (%)	Aducto no fijado (%)	Relación de partición (%)
Voxelotor	77,0 ± 3,8	80,3 ± 6,3	96,1 ± 3,7
INN-310	82,0 ± 3,1	79,7 ± 4,3	103,0 ± 1,7
TD-7	80,9 ± 2,5	73,5 ± 1,5	103,7 ± 7,5
VZHE-039	90,9 ± 3,4	92,4 ± 5,6	98,5 ± 4,3
PP-14	96,1 ± 1,1	91,8 ± 11,6	102,2 ± 8,0
Comp. 1	96,0 ± 1,9	97,4 ± 2,8	98,6 ± 2,8
Comp. 2	95,2 ± 2,3	96,3 ± 2,6	98,9 ± 2,9
Comp. 3	60,1 ± 3,0	60,0 ± 3,3	100,1 ± 0,9
Comp. 4	85,9 ± 7,1	88,8 ± 6,2	96,9 ± 5,73
Comp. 5	93,1 ± 3,3	95,8 ± 3,3	97,2 ± 3,2
Comp. 6	67,3 ± 12,1	67,1 ± 10,3	100,0 ± 2,8
Comp. 7	59,6 ± 5,7	60,2 ± 5,7	99,0 ± 3,1
Comp. 8	85,6 ± 2,5	84,8 ± 7,5	101,3 ± 6,3

ID del Compuesto	Aductos fijos (%)	Aducto no fijado (%)	Relación de partición (%)
Comp. 9	72,7 ± 4,1	69,4 ± 7,5	105,2 ± 5,9
Comp. 10	94,8 ± 2,8	96,3 ± 3,0	98,5 ± 2,7
Comp. 11	88,2 ± 2,1	87,7 ± 4,3	100,7 ± 3,0
Comp. 12	80,4 ± 9,1	80,8 ± 5,9	99,4 ± 4,2
Comp. 13	80,7 ± 4,8	78,4 ± 6,1	103,0 ± 2,9

Efectos biológicos mostrados con compuestos a una concentración de 2 mM, 6 réplicas biológicas

Cristalografía de rayos X con base atómica de los efectos desestabilizadores de polímeros de Hb

Los Compuestos **1-13** se co-cristalizaron con Hb con ligando (carbonmonoxi Hb o COHb) utilizando condiciones de baja salinidad. Solo los Compuestos **1, 2, 5 y 8** dieron como resultado cristales de calidad de difracción de rayos X con Hb, lo que permitió determinar su estructura con resoluciones de 1,9 Å a 2,1 Å. Las consiguientes estructuras cristalinas de complejos compuestos tetraméricos unidos a Hb, como era de esperar estaban en la conformación relajada del estado R2, similares a las estructuras tetraméricas de Hb en estado R2 determinadas previamente en complejo con las moléculas de comparación INN-310, VZHE-039, PP-14, y Voxelotor. Las estructuras globales de todos los complejos eran indistinguibles (RMSD 0,3-0,5Å) cuando se compararon entre sí o con la estructura nativa del estado R2 (código PDB 1BBB) o con las estructuras de los complejos Hb de comparación. También, como se esperaba, y similar a INN-310, VZHE-039, PP-14 (pero a diferencia de Voxelotor), dos moléculas de cada compuesto se unen de forma simétrica a la hendidura α del tetramero de Hb con las fracciones aldehído formando interacciones de base de Schiff con las dos aminas α Val1 N-terminales de las subunidades α 1- y α 2, estableciendo a la vez otras interacciones proteínicas. Voxelotor solo se une a una molécula en la hendidura α (forma 1 interacción de base de Schiff) debido a su naturaleza voluminosa que excluye la unión de dos moléculas. La interacción de base de Schiff de estos compuestos consiste en la modificación observada de la Hb, que presenta un pico diferente en la HPLC de intercambio catiónico que la Hb no modificada. Las interacciones específicas con la proteína implican que el anillo de benzaldehído y/o piridina establezca interacciones hidrófobas y/o de enlace

de hidrógeno (directas o mediadas por agua) intra e intersubunidad con α Ala130, α Ser131, α Thr134, α Thr134 y/o α Leu2. Para los compuestos que se unen con dos moléculas (la excepción es Voxelotor), los anillos de piridina de las dos moléculas unidas también formaron amplias interacciones de apilamiento π - π cara a cara entre sí (Figura 14A-G). Las interacciones con Hb, como se ha informado anteriormente para otros benzaldehídos, sirven para estabilizar Hb de estado relajado, consistentes con su capacidad para aumentar la afinidad de la Hb por el oxígeno con efectos concomitantes antifalciformación dependientes del oxígeno, como se muestra en la Tabla 3.

Y lo que es más importante, y consistente con los efectos antifalciformación independientes del oxígeno de los compuestos en condiciones completamente anóxicas, los Compuestos **1**, **2**, **5** y **8**, como VZHE-039 y PP-14 pero no INN-310 y Voxelotor, también establecen interacciones de enlace de hidrógeno con los residuos de la hélice α F situados en la superficie (Figura 3A-3G). Como se ha indicado anteriormente, la hélice α F es importante en la estabilización de los polímeros de Hb, y su perturbación como resultado de las interacciones con el segundo anillo de los benzaldehídos conduce a la desestabilización directa de polímeros. Las diferencias en las interacciones únicas de cada compuesto con la hélice α F se corresponden siempre con la potencia de los efectos desestabilizadores de polímeros, como se determina en función de la inhibición de la falciformación en anoxia. VZHE-039 y PP-14 tienen sustituyentes metilhidroxilo y carboxiléster, respectivamente, en el anillo de piridina para establecer interacciones de enlace de hidrógeno con residuos de la hélice α F. A pesar de no tener ningún sustituyente que contenga heteroátomos en el anillo de piridina, los Compuestos **1**, **2**, **5** y **8** establecen inesperadamente interacciones mediadas por agua con los residuos de la hélice α F a través del nitrógeno de la piridina. El Compuesto **1** implica interacciones muy fuertes de enlace de hidrógeno mediadas por agua con los residuos de la hélice α F a través de 1 o 2 moléculas de agua. Los Compuestos **2**, **5** y **8** establecen interacciones con la hélice α F a través de al menos 3 moléculas de agua. Así pues, el Compuesto **1** parece establecer las interacciones de enlace de hidrógeno más fuertes con los residuos de la hélice α F, incluso en comparación con VZHE-039 y PP-14, explicando también la alta afinidad del Compuesto **1** (K_D de 0,06 mM frente a 0,1 mM para VZHE-039 y 0,15 para PP-14). INN-310 solo tiene una interacción hidrófoba de débil a moderada con la hélice α F y ninguna interacción

de enlace de hidrógeno, y presenta solo efectos desestabilizadores de polímeros muy débiles con un efecto limitado antifalciformación en anoxia. De ahí que se esperara anteriormente que los compuestos de la presente invención no presentaran potentes efectos desestabilizadores de polímeros. En cambio, el

5 sustituyente voluminoso de Voxelotor orienta la fracción de piridina lejos de la hélice α F, explicando la ausencia total de efectos desestabilizadores de polímeros.

Evaluaciones farmacocinéticas *in vivo*

Estudio de FC de dosis única

10 Se evaluó la farmacocinética (FC) de dosis única en ratas macho Sprague Dawley (SD) (n=4) para cada compuesto, y la concentración máxima o pico en sangre total y el área bajo la curva se muestran en la Tabla 5. Los Compuestos **1**, **2** y **5** presentaron los mayores niveles de exposición oral observados hasta la fecha para los benzaldehídos desestabilizadores de polímeros, especialmente

15 sobre una base equivalente molar. Si bien no se muestra, PP-14 se metaboliza rápidamente en su metabolito de ácido carboxílico tras la administración oral.

Tabla 5. Resumen de propiedades farmacocinéticas de dosis única en ratas

ID del Compuesto	C _{máx} (ng/ml) [μ M]	AUC _{0-∞} (ng·h/ml) [μ M·h]	T _{1/2} (horas)
VZHE-039	102.120 [394]	2.276.790 [8.782]	8,4
Comp. 1	210.775 [919]	3.992.235 [17.415]	5,0
Comp. 2	219.599 [958]	4.543.996 [19.822]	9,7
Comp. 4	59.759 [242]	830.811 [3.360]	5,9
Comp. 5	85.965 [348]	2.978.475 [12.047]	8,8
Comp. 6	12.053 [49]	179.894 [728]	8,2
Comp. 8	20.035 [76]	269.353 [1.022]	9,5
Comp. 10	36.219 [157]	693.278 [3.011]	4,7

Dosis oral única administrada a 100 mg/kg

20 **Estudio de FC de dosis repetidas de 14 días**

Se administraron dosis orales repetidas de cada compuesto por sonda oral durante 14 días a ratas SD macho y hembra (n=3). En la Tabla 6 se muestran las concentraciones máximas de fármaco en estado estacionario y el área bajo la curva para cada compuesto. Los Compuestos **2** y **5** presentaron los mayores

25 niveles de exposición oral observados hasta la fecha, especialmente sobre una

base equivalente molar. Los niveles de exposición oral del Compuesto **1** fueron similares a los de VZHE-039 y superiores a los de Voxelotor, especialmente sobre una base equivalente molar. Las exposiciones en estado estacionario para el intervalo de dosificación final del día 14 fueron similares a la exposición total al compuesto a partir de la FC de dosis única. No se observaron cambios clínicos o histopatológicos tras 14 días de exposición a los Compuestos **1**, **2**, o **5**. Se observaron cambios clínicos e histopatológicos en el hígado, incluyendo la necrosis hepatocitaria, en los animales a los que se administró VZHE-039 durante 14 días.

Tabla 6. Resumen de propiedades farmacocinéticas de dosis repetidas en ratas

ID del Compuesto	$C_{\text{máx}}$ (ng/ml) [μM] (hombre / mujer)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/ml) [$\mu\text{M}\cdot\text{h}$] (hombre / mujer)
Voxelotor	142.253 [422] / 184.744 [548]	2.279.147 [6.760] / 2.567.945 [7.617]
VZHE-039	195.148 [753] / 231.673 [894]	3.003.535 [11.585] / 3.159.917 [12.188]
Comp. 1	161.057 [703] / 122.473 [534]	2.404.624 [10.490] / 1.853.321 [8.085]
Comp. 2	253.715 [1.107] / 254.382 [1.110]	4.668.020 [20.363] / 4.939.391 [21.547]
Comp. 5	211.029 [854] / 245.508 [993]	4.221.059 [17.073] / 5.084.546 [20.566]

Dosis orales repetidas administradas a 100 mg/kg durante 14 días

Sección experimental

Métodos sintéticos detallados

15 Síntesis de 2-hidroxi-6-(piridin-3-ilmetoxi)benzaldehído (Comp. 1):

A una solución agitada de 2,6-dihidroxibenzaldehído (36,2 mmol) y carbonato potásico (36,2 mmol) en 3-pentanona, se añadió HBr de 3-bromometilpiridina (36,2 mmol). La reacción se sometió a reflujo durante 3 horas, y tras completarse, el precipitado sólido se filtró y se lavó con 3-pentanona. El sólido en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (1:1 hexano/acetato de etilo) para obtener 1,62 g (19,5 %) de sólido granular de color amarillo claro. Pf 99-103. RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ 11,93 (s a, 1H), 10,31 (s, 1H), 8,64 (dt, 2H, $J=1,7, 4,4$ Hz), 7,7-7,9 (m, 1H), 7,2-7,5 (m, 2H), 6,49 (dd, 2H, $J=5,2, 8,4$ Hz), 5,13

(s, 2H). RMN ^{13}C (20 MHz, CDCl_3) δ 193,9, 163,6, 161,1, 149,8, 148,9, 138,4, 135,3, 131,5, 123,7, 110,9, 110,5, 102,1, 68,1.

Síntesis de 2-hidroxi-6-(piridin-2-ilmetoxi)benzaldehído (Comp. 2):

HBr de 2-bromometilpiridina (60,966 mmol) seguido de 2,6-dihidroxibenzaldehído (1 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), y acetona seca se añadieron en un
 5 matraz cónico seco con agitador magnético y se enjuagaron con gas N_2 . Después de sellar con un tapón de goma, se burbujeó N_2 en la mezcla de reacción utilizando una aguja larga. La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y, a continuación, durante 1 hora adicional a 60 °C con
 10 una aguja de calibre pequeño acoplada. Tras confirmar que la reacción mediante TLC se había completado, la mezcla se filtró al vacío a través de un lecho de sílice en caliente y se lavó con acetona caliente. Después de la evaporación, el material en bruto se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un sistema 2:1 Hex/EtOAc para producir 6,58 g (47 %) de sólido de color amarillo
 15 pálido con el siguiente perfil de caracterización. 99 % de pureza. P_f = 127,5-129,2 °C. RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ 12,03 (s, 1H), 10,54 (s, 1H), 8,67 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 7,81 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,44 (dd, J = 10,2, 6,6 Hz, 3H), 6,55 (t, J = 8,5 Hz, 2H), 5,34 (s, 2H).

Síntesis de 2-hidroxi-6-(piridin-4-ilmetoxi)benzaldehído (Comp. 3):

Una mezcla de 2,6-dihidroxibenzaldehído (1 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), KI (0,1 eq.), EtOAc (2 ml), y DMF (2 ml) en 50 ml de 3-pentanona se sonicó durante 5-10 minutos. A continuación se añadió HCl de 4-(clorometil)piridina y se sonicó a 60 °C durante 90 minutos. La mezcla de reacción se transfirió a una placa
 20 caliente y se agitó a 75 °C hasta que se confirmó por TLC que la reacción se había completado. La mezcla se filtró al vacío en caliente y se lavó con acetona caliente. El filtrado se evaporó y a continuación se purificó por cromatografía ultrarrápida (Biotage Selekt, Safar HC 25g) para dar 0,252 g (11 %) de sólido de color amarillo pálido con el siguiente perfil de caracterización: Pureza: 97 %; punto de fusión 140,8 °C; RMN ^1H (80 MHz,) δ 12,00 (s, 1H), 10,51 (s, 1H), 8,70
 25 (s, 2H), 7,59-7,25 (m, 4H), 6,62 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,40 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 5,22 (s, 2H).
 30

Procedimiento sintético general para Comp. 4-8:

A una solución de piridina sustituida en acetona seca, 2,6-dihidroxibenzaldehído (1 eq.), se añadieron K_2CO_3 (2 o 3 eq.) y KI (0,1 eq.).
 35 Después de burbujear N_2 en la solución, la mezcla de reacción se agitó durante

1 hora a temperatura ambiente y, a continuación, a 60 °C con una aguja de calibre pequeño acoplada. Tras confirmar que la reacción mediante TLC se había completado, la mezcla se filtró al vacío a través de un lecho de sílice en caliente y se lavó con acetona caliente. Después de la evaporación, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna.

Síntesis de 2-((5-fluoropiridin-3-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído (Comp. 4)

Se hizo reaccionar HCl de 3-(clorometil)-5-fluoropiridina (10 mmol) con 2,6-dihidroxibenzaldehído según el procedimiento general anterior. La purificación del material en bruto produjo 0,942 g (38,1 %) de sólido de color amarillo pálido con el siguiente perfil de caracterización: Pureza: 97 %; punto de fusión: 128-129 °C; RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ 11,92 (s, 1H), 10,35 (s, 1H), 8,46 (d, J = 2,6 Hz, 2H), 7,57-7,18 (m, 3H), 6,47 (dd, J = 13,6, 8,3 Hz, 2H), 5,15 (s, 2H).

Síntesis de 2-((3-fluoropiridin-2-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído (Comp.5)

Se hizo reaccionar HCl de 2-(clorometil)-3-fluoropiridina (17,141 mmol) con 2,6-dihidroxibenzaldehído según el procedimiento general anterior. La purificación y cristalización a partir de TBME produjo 1,8 g (42,5 %) de sólido de color amarillo pálido con el siguiente perfil de caracterización: Pureza: 99 %; punto de fusión: 132-136 °C; RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ 12,09 (s, 0H), 10,48 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 7,54 (t, J = 8,7 Hz, 3H), 6,93-6,29 (m, 2H), 5,46 (s, 2H).

Síntesis de 2-((2-fluoropiridin-3-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído (Comp. 6)

Se hizo reaccionar 3-(clorometil)-2-fluoropiridina (10 mmol) con 2,6-dihidroxibenzaldehído según el procedimiento general anterior. La purificación del material en bruto produjo 0,924 g (37,4 %) de sólido de color amarillo pálido con el siguiente perfil de caracterización: Pureza: 97 %; punto de fusión: 156-160 °C; RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ 11,97 (s, 1H), 10,42 (s, 1H), 8,41-7,65 (m, 2H), 7,64-7,04 (m, 3H), 6,76-6,33 (m, 2H), 5,23 (s, 2H).

Síntesis de 2-((2-cloropiridin-3-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído (Comp. 7)

Se hizo reaccionar 2-cloro-3-(clorometil)piridina (10 mmol) con 2,6-dihidroxibenzaldehído según el procedimiento general anterior. La purificación del material en bruto produjo 0,447 g (17 %) de sólido de color beige claro con el siguiente perfil de caracterización: Pureza: 97 %; punto de fusión: 158-159 °C; RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ 11,98 (s, 1H), 10,38 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 7,69-7,16 (m, 3H), 6,58 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 5,36 (s, 2H).

Síntesis de 2-((3-cloropiridin-2-il)metoxi)-6-hidroxibenzaldehído (Comp. 8)

Se hizo reaccionar 3-cloro-2-(clorometil)piridina (10 mmol) con 2,6-dihidroxibenzaldehído según el procedimiento general anterior. La purificación del material en bruto produjo 0,63 g (23,6 %) de sólido de color blanco con el siguiente perfil de caracterización: Pureza: 99 %; punto de fusión: 123-124 °C; RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ 11,84 (s, 1H), 10,26 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,65 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,43-6,93 (m, 3H), 6,42 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 5,26 (s, 2H).

Síntesis de 2,4-difluoro-6-(piridin-2-ilmetoxi)benzaldehído (Comp. 9):

Se hizo reaccionar HBr de 2-bromometilpiridina (12,7 mmol) con 2,4-difluoro-6-hidroxibenzaldehído según el procedimiento del Comp. 2. Purificación del material en bruto utilizando un sistema 1:3 Hex/CHCl₃, seguido de cristalización a partir de TBME produjo material sólido de color amarillo pálido. 99 % de pureza. RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ 10,49 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,77 (d, J = 11,1 Hz, 2H), 7,30 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 6,64 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 5,34 (s, 2H). RMN ¹⁹F (76 MHz, CDCl₃) δ -94,41 (dd, J = 23,4, 12,4 Hz, -108,93 (d, J = 12,0 Hz).

Procedimiento sintético general para Comp. 10-11:

A una solución de pirimidina sustituida en acetona seca, se añadieron 2,6-dihidroxibenzaldehído (1 eq.), K₂CO₃ (3 eq.) y KI (0,1 eq.). Se burbujó N₂ en la solución, y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C con una aguja de calibre pequeño acoplada. Tras confirmar que la reacción mediante TLC se había completado, la mezcla se filtró al vacío en caliente, y a continuación se lavó con acetona caliente. Después de la evaporación, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna.

Síntesis de 2-hidroxi-6-(pirimidin-5-ilmetoxi)benzaldehído (Comp. 10)

Se hizo reaccionar HCl de 5-(clorometil)pirimidina (6,06 mmol) con 2,6-dihidroxibenzaldehído durante 18 horas según el procedimiento general anterior. La purificación del material en bruto utilizando un sistema 1:2:1 Hex/CHCl₃/EtOAc, seguido de cristalización a partir de TBME produjo 0,206 g (14,8 %) de sólido de color amarillo con el siguiente perfil de caracterización: Pureza: 99 %; RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃) δ 11,91 (s, 1H), 10,31 (s, 1H), 9,21 (s, 1H), 8,81 (s, 2H), 7,61-7,07 (m, 1H), 6,49 (dd, J = 11,3, 8,4 Hz, 2H), 5,13 (s, 2H).

Síntesis de 2-hidroxi-6-(pirimidin-2-ilmetoxi)benzaldehído (Comp. 11)

Se hizo reaccionar HCl de 2-(clorometil)piridina (6,06 mmol) con 2,6-dihidroxibenzaldehído durante 2 horas según el procedimiento general anterior. Purificación del material en bruto utilizando un sistema 1:3 Hex/CHCl₃, seguido

de cristalización a partir de TBME produjo 0,423 g (15,7 %) de sólido de color amarillo con el siguiente perfil de caracterización: Pureza: 99 %; RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ 12,02 (s, 1H), 10,55 (s, 1H), 8,82 (d, $J = 4,9$ Hz, 2H), 7,53-7,09 (m, 2H), 6,50 (dd, $J = 11,4, 8,4$ Hz, 2H), 5,42 (s, 2H).

5 **Síntesis de 3-fluoro-2-hidroxi-6-(piridin-3-ilmetoxi)benzaldehído (Comp. 12):**

Se hizo reaccionar HBr de 3-bromometilpiridina (12,811 mmol) con 3-fluoro-2,6-dihidroxibenzaldehído según el procedimiento anterior para el Comp. 2. Purificación del material en bruto utilizando un sistema 1:3 Hex/ CHCl_3 , seguido
10 de cristalización a partir de TBME produjo el producto como un sólido de color amarillo pálido. 97 % de pureza. RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ 11,40 (s, 1H), 10,16 (s, 1H), 8,59 (d, $J = 3,2$ Hz, 2H), 7,73 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,43-6,99 (m, 2H), 6,75-6,38 (m, 1H), 5,30 (s, 2H).

15 **Síntesis de 2,4-difluoro-6-((3-fluoropiridin-2-il)metoxi)benzaldehído (Comp. 13):**

Una solución de 2,4-difluoro-6-hidroxibenzaldehído (1 eq.), K_2CO_3 (2 o 3 eq.), y KI (0,1 eq.) en acetona seca se calentaron a 40 °C durante 30 minutos. Se calentó HCl de 2-(clorometil)-3-fluoropiridina (2,747 mmol) en acetona seca, y a continuación se añadió gota a gota a la solución de aldehído. La mezcla se
20 calentó a 65 °C durante 2 horas. Tras confirmar que la reacción mediante TLC se había completado, la mezcla se filtró al vacío en caliente, y a continuación se lavó con acetona caliente. El filtrado se evaporó y el material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (columna Biotage Selekt, Safar HC de 10 g, sistema isocrático 1:3 Hex/ CHCl_3) para dar 64 mg (8,7 %) de sólido blanquecino
25 con el siguiente perfil de caracterización: Pureza: 99 %; RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3) δ 10,39 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 7,75-7,15 (m, 3H), 7,00-6,27 (m, 2H), 5,43 (s, 2H).

Ensayos bioquímicos.

Inhibición falciforme, aducto de Hb, y equilibrio de oxígeno de Hb en suspensiones de sangre SS.

30 Todos los compuestos (Comp. 1-13) y las moléculas de comparación (VZHE-039, PP-14, INN-310 y Voxelotor) se evaluaron siguiendo los procedimientos establecidos. Las muestras de sangre de donantes individuales con AF homocigótica (obtenidas con consentimiento informado) se diluyeron utilizando solución tampón Hemox con adición de glucosa (10 mM) y BSA (0,2 %)
35 para ajustar el hematocrito de las suspensiones sanguíneas al 20 %, que

estandariza el procedimiento para normalizar la relación de GR por fármaco, para la consistencia y reproducibilidad de los ensayos. Brevemente, las suspensiones de sangre se incubaron con aire ambiente en presencia de diversas concentraciones de compuestos de ensayo (0-2 mM) a 37 °C durante 1 hora en
5 placas de fondo redondo de 96 pocillos. Posteriormente, las suspensiones se incubaron con una mezcla gaseosa hipóxica (2,5 % de gas Oxígeno/gas Nitrógeno de equilibrio) a 37 °C durante un máximo de 2 horas antes de la fijación con una solución de glutaraldehído al 2 % sin exposición al aire. Las alícuotas de sangre fijada se evaluaron mediante análisis morfológico microscópico
10 (análisis de imágenes con el programa Image J) para identificar la proporción de GR falciformes y no falciformes, y se calculó la inhibición falciforme basándose en el % de cambio a partir del control negativo (DMSO).

Para establecer la inhibición falciforme independiente del oxígeno, posteriormente, se abrió la cámara de incubación y se expuso al aire ambiente
15 durante 15 minutos para garantizar la reoxigenación completa y la reversión de las células falciformes a células redondas normales. La reversión se confirmó mediante microscopía. A continuación se cerró la cámara de incubación y se repitió el ensayo con incubación en gas nitrógeno al 100 % durante 1 hora (para cribado), o hasta 2,5 h (para estudios de curso temporal), con extracción y
20 fijación de alícuotas de sangre a intervalos definidos. Las muestras alícuotas se sometieron de nuevo a un análisis morfológico microscópico de imágenes de campo claro para identificar la proporción de células falciformes y no falciformes, y se calculó la inhibición falciforme.

A continuación, las muestras residuales se lavaron en solución salina
25 tamponada con fosfato y se hemolizaron en tampón de lisis hipotónico, con o sin borohidruro de sodio (50 mM). Las alícuotas obtenidas de los lisados con o sin borohidruro de sodio (para reducir los aductos de la base de Schiff) también se evaluaron para determinar el nivel de modificación de la Hb (formación de aductos del fármaco) mediante HPLC de intercambio catiónico (Hitachi Serie D-
30 7000, Hitachi Instruments, Inc., San Jose, CA) con una columna de intercambio catiónico débil (Poly CAT A: 50 mm x 4,6 mm, Poly LC, Inc., Columbia, MD). Los picos de isotipo de hemoglobina se eluyen con un gradiente lineal de fase B del 0 % al 80 % a A410nm (Fase móvil A: Bis-Tris 40 mM, KCN 2 mM, pH 6,9; Fase B: Bis-Tris 40 mM, KCN 2 mM, cloruro de sodio 0,2 M, pH 6,55). Lisado
35 clarificado de Hb humana de adulto normal (Hb A), así como patrones

comerciales que contienen cantidades aproximadamente iguales de Hb F, A, S y C (Helena Laboratories, Beaumont, TX), se utilizaron como isotipos de referencia. Se utilizaron muestras reducidas para evaluar la formación de "aductos fijos" (en función de la permeabilidad de la membrana de los GR), mientras que las muestras no reducidas evaluaron la formación de aductos de fármaco independientemente de la permeabilidad del fármaco.

Estudios de partición de fármacos.

Los estudios de partición de GR se realizaron tanto con GR SS tras los estudios de falciformación anteriores, como en estudios independientes con sangre no falciforme. Brevemente, alícuotas de muestras de sangre, que habían sido incubadas con moléculas de ensayo, se lisaron en agua desionizada (sin fijar) o en agua con borohidruro de sodio 50 mM (fijadas). Las muestras se sometieron a análisis de HPLC de intercambio catiónico, como se ha descrito anteriormente. La Hb modificada (aductos de Hb) se determinó como proporción de la Hb total en cada muestra, y la relación de partición se determinó como la fracción relativa de modificación de Hb de las muestras fijadas en comparación con las correspondientes muestras no fijadas. El coeficiente de partición es la fracción relativa de Hb que fue modificada intracelularmente por moléculas que atravesaron la membrana del GR, en comparación con los aductos no fijados que reflejan la unión de la Hb sin permeación de la membrana del GR.

Desplazamiento P50 dependiente de la dosis en sangre humana.

Se incubó sangre humana no falciforme con compuestos de ensayo a concentraciones de 0,25 - 2 mM a 37 °C durante 1 hora en placas de fondo redondo de 96 pocillos. En conclusión, los GR se lavaron una vez con PBS, seguido de lisis con agua desionizada. Se añadieron alícuotas de aproximadamente 100 µl de lisados individuales a 3 ml de tampón fosfato potásico 0,1M, pH 7,0 en una cubeta y se sometió a un análisis hemoximétrico utilizando un analizador Hemox™ (TCS Scientific Corp.) como se describió anteriormente. El cambio en los valores p50 ($\Delta p50$) se calculó restando los valores p50 de las muestras tratadas del valor de la muestra de control y expresando la diferencia como porcentaje de los valores p50 de control.

Estudios farmacocinéticos y de seguridad *in vivo*

Se administraron dosis únicas de cada compuesto como suspensiones orales por sonda en carboximetilcelulosa al 0,5 % a 100 mg/kg. Los niveles en sangre total se recogieron al menos 72 horas después de la administración de la

dosis. Los bioanálisis se realizaron con cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LS-MS).

Se administraron dosis repetidas de cada compuesto una vez al día como suspensiones orales por sonda en carboximetilcelulosa al 0,5 % durante 14 días a 100 mg/kg. Se recogió sangre completa en 7 puntos temporales durante un máximo de 24 horas durante el intervalo de dosificación final del día 14. Las observaciones clínicas, los pesos corporales y el consumo de alimentos se registraron durante los 14 días del estudio. Se evaluaron la química clínica y los parámetros hematológicos, y se realizó la histopatología de los órganos tras 14 días de exposición al fármaco del estudio.

Cristalografía de rayos X

Se obtuvieron co-cristales de Hb con ligando con los Compuestos **1**, **2**, **5**, y **8** siguiendo los métodos publicados. Brevemente, se filtraron al vacío 40-50 mg/ml de Hb en un matraz de fondo redondo durante ~1 hora para eliminar el oxígeno y formar Hb desoxigenada. Posteriormente, se burbujeó monóxido de carbono en la Hb desoxigenada para formar Hb ligada con CO (COHb). A continuación, se incubó COHb con un exceso molar de 10-20 de los Compuestos **1**, **2**, **5**, u **8** durante aproximadamente 1 hora para formar complejos COHb-compuesto. Se añadió cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₄) en un exceso molar de 10 para reducir el aducto de base de Schiff reversible al enlace covalente de alquilamina irreversible correspondiente. A continuación, se cristalizaron las soluciones del complejo COHb-compuesto con PEG 6000 al 10-20 %, tampón HEPES 100 mM, pH 7,4 usando el método por lotes. Los datos de difracción de rayos X se recogieron a 100 K utilizando el generador de rayos X Rigaku MicroMaxTM 007HF, detector Eiger R 4M y criosistema Oxford Cobra (The Woodlands, TX). Los cristales se crioprotegieron primero con 80 µl de licor madre mezclado con 62 µl de PEG6000 al 50 %. Los datos de difracción se procesaron utilizando el software CrysAlisPro (Rigaku) y el paquete de programas CCP4. La estructura cristalina del complejo se resolvió mediante el método de sustitución molecular con el programa Phenix, utilizando la estructura cristalina nativa del estado R2 (PDB ID 1BBB) como modelo de búsqueda. La estructura se refinó usando Phenix y COOT.

Si bien la invención se ha descrito en términos de sus diversas realizaciones de ejemplo, los expertos en la materia reconocerán que la invención puede ponerse en práctica con modificaciones, dentro del espíritu y

alcance de las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con ello, la presente invención no debe limitarse a las realizaciones como se ha descrito anteriormente, sino que debe incluir además todas las modificaciones y equivalentes dentro de la misma dentro del espíritu y alcance de la descripción

5 que se ofrece en el presente documento.