

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 022 546**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/427** (2006.01)

**A61P 7/02** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2023** **E 23382170 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2025** **EP 4420661**

54 Título: **Moléculas pequeñas que tienen como diana la glicoproteína VI como agentes antiplaquetarios, para uso en la prevención y/o tratamiento de la trombosis y patologías asociadas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.05.2025**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (100.00%)  
Avda. das Ciencias, 6 - 4ºD  
15782 Santiago de Compostela, ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA ALONSO, ÁNGEL;  
DOMÍNGUEZ MEDINA, EDUARDO;  
LOZA GARCÍA, MARÍA ISABEL;  
CARRACEDO ÁLVAREZ, ANGEL MARÍA;  
CORREIA PINTO CARVALHO DE MATOS, MARÍA  
JOÃO y  
IZQUIERDO BERJANO, IRENE**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

**ES 3 022 546 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Moléculas pequeñas que tienen como diana la glicoproteína VI como agentes antiplaquetarios, para uso en la prevención y/o tratamiento de la trombosis y patologías asociadas

5

### Campo de la invención

La presente invención pertenece al sector farmacéutico y, más particularmente, se refiere a una familia de moléculas que actúan como ligandos de la glicoproteína VI (GPVI). Puesto que las moléculas descritas en presente invención bloquean la activación plaquetaria mediada por GPVI, son útiles, por tanto, como inhibidores de la agregación plaquetaria. Por consiguiente, la presente invención se refiere a una familia de ligandos de GPVI, así como a composiciones que comprenden los mismos, para uso en la prevención y/o el tratamiento de trombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio.

10

15

### Antecedentes de la invención

Las plaquetas o trombocitos son esenciales para la hemostasia o prevención de la hemorragia y también desempeñan otros papeles en la inmunidad innata y participan en muchos procesos inflamatorios. La hemostasia es el proceso mediante el cual se activan las plaquetas para formar agregados o grumos con los glóbulos rojos y la proteína fibrina, dando como resultado la formación de trombos. En principio, un trombo es la respuesta apropiada del organismo a una lesión hemorrágica, pero puede ser perjudicial cuando se forma en vasos sanguíneos sanos, obstruyendo el aparato circulatorio.

20

25

De hecho, la formación de trombos en un endotelio intacto se previene mediante óxido nítrico, prostaciclina y CD39. Sin embargo, la hiperreactividad o el mal funcionamiento de las plaquetas representa un riesgo importante en el desarrollo de trombosis y eventos isquémicos.

30

Los fármacos antiplaquetarios pueden inhibir el proceso implicado en la activación plaquetaria, de manera reversible o irreversible. A lo largo de las últimas décadas, los fármacos antiplaquetarios han reducido significativamente la morbimortalidad asociada con la trombosis arterial. Se han estudiado extensamente sus características farmacológicas, incluyendo los perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos, y un número significativo de ensayos clínicos que evalúan su eficacia y seguridad en diversos ámbitos clínicos han establecido su eficacia antitrombótica.

35

Los fármacos antiplaquetarios disponibles actualmente actúan previniendo la formación de mensajeros secundarios (inhibidor de COX-1), interaccionando con rutas de señalización intracelular (inhibidores de PDE y el análogo de PGI<sub>2</sub>), o bloqueando los receptores de membrana (antagonistas del receptor P2Y<sub>12</sub> y el antagonista de PAR1), o inhibiendo la agregación plaquetaria (inhibidores de GPIIb/IIIa) de por sí.

40

Sin embargo, la administración, a menudo prolongada, de terapias antiplaquetarias está asociada con un riesgo inherente de hemorragia. Dado que la hemorragia está asociada con desenlaces cardiovasculares adversos y mortalidad, existe una necesidad clínica no satisfecha de desarrollar nuevas terapias antiplaquetarias que inhiban la trombosis mientras que mantienen la hemostasia y reducen los eventos hemorrágicos adversos.

45

Muchos de los papeles de las plaquetas están regulados por la glicoproteína VI (GPVI) y el receptor de lectina tipo C 2 (CLEC-2), que señalizan a través de un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). Los receptores con un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) son importantes para respaldar la señalización y la activación de las integrinas que son esenciales para la función plaquetaria. De hecho, GPVI representa una diana atractiva para gestionar la función plaquetaria puesto que sólo se expresa en plaquetas y células precursoras de plaquetas en médula ósea (megacariocitos). La unión de GPVI al colágeno, uno de los componentes trombogénicos más importantes, induce el agrupamiento de receptores y la posterior activación plaquetaria [Lockyer S. *et al.* (2006)].

50

55

La patente (KR 20190026154A) describe compuestos que van a usarse como inhibidores de la unión entre la proteína TRAF4 y una o más de GPIb y GPVI para tratar la trombosis.

Puesto que GPVI desempeña un papel crítico en la activación plaquetaria y la iniciación de trombos, así como en la prevención de hemorragia inducida por inflamación, representa, por tanto, una diana atractiva con respecto a las terapias antiplaquetarias actuales en las que la hemorragia puede suponer un problema.

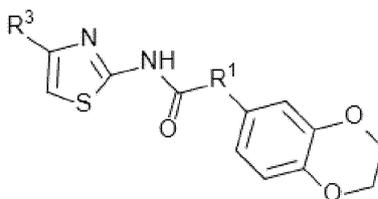
60

### Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una familia de compuestos de fórmula (I) descritos en el presente documento que actúan como ligandos de GPVI y son útiles como inhibidores similares a fármacos de la movilización de Ca<sup>+2</sup> y la agregación plaquetaria tras la activación de GPVI. En este sentido, dicha familia de compuestos de fórmula (I) descritos en el presente documento son útiles, por consiguiente, como fármacos antiplaquetarios que previenen la

65

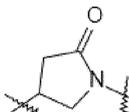
agregación plaquetaria y la formación de trombos, para la prevención y/o el tratamiento de trombosis y patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, mientras que previenen los eventos hemorrágicos adversos, debido a su administración. La familia de compuestos de fórmula (I) descritos en el presente documento también son útiles como herramienta farmacológica, tal como herramientas para estudios de inhibición *in vitro* que interfieren con la activación plaquetaria mediada por GPVI. En particular, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



(I)

10

en donde R<sup>1</sup> se selecciona de un grupo que consiste en -CH<sub>2</sub>- o un grupo R<sup>2</sup>:

(R<sup>2</sup>),

15 en donde R<sup>2</sup> está unido a la 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina por el átomo de nitrógeno del anillo de pirrolidin-2-ona; y en donde R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en un fenilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo naftilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup> y un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo; y en donde R<sup>4</sup> es H o un halógeno; para uso como medicamento antiplaquetario; o para uso como medicamento inhibidor de la agregación plaquetaria; y, por tanto, para uso como  
20 inhibidor de GPVI en la prevención y/o el tratamiento de trombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, mientras que previene los eventos hemorrágicos adversos.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), tal como se describe en el presente documento, para uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades mediadas por ligandos de GPVI, así como enfermedades que responden a los inhibidores de la movilización de Ca<sup>+2</sup> y la agregación plaquetaria tras la activación de GPVI. En este sentido, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (I), tal como se describe en el presente documento, para uso como fármaco antiplaquetario, que previene la agregación plaquetaria y la formación de trombos, y, por tanto, para uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades que responden a los inhibidores de GPVI, en particular, trombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, mientras que previene los eventos hemorrágicos adversos. De manera adicional o alternativa, la presente invención se refiere a un uso *in vitro* de un compuesto de fórmula (I) como herramienta farmacológica. Por ejemplo, el compuesto de fórmula (I), tal como se describe en el presente documento, puede usarse en estudios de inhibición *in vitro* que interfieren con la activación plaquetaria mediada por GPVI.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal farmacéuticamente aceptable que, al administrarse al paciente, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como se describe en el presente documento. Tales sales son preferiblemente sales de adición de ácido con ácidos orgánicos o inorgánicos fisiológicamente aceptables, o sales de adición de álcali con bases orgánicas o inorgánicas aceptables. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácidos minerales tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, lactato, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y *p*-toluenosulfonato. Los ejemplos de sales de adición de álcali incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, las sales de sodio, potasio, calcio y amonio, y sales de álcali orgánicas tales como, por ejemplo, las sales de etilendiamina, etanolamina, *N,N*-dialquilenetanolamina, trietanolamina y aminoácidos básicos. Sin embargo, se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también se encuentran dentro del alcance de la invención puesto que pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. Los procedimientos para la formación de sales son convencionales en la técnica.

Debe entenderse que el término “solvato farmacéuticamente aceptable” según esta invención significa cualquier forma del compuesto activo según la invención en la que dicho compuesto está unido por un enlace no covalente a otra molécula (normalmente un disolvente polar), incluyendo especialmente hidratos y alcoholatos.

Otro aspecto preferido de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se da a conocer en el presente documento; y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso como fármaco antiplaquetario, que previene la agregación plaquetaria y la formación de trombos, y, por tanto, para uso como inhibidor de GPVI en la prevención y/o el tratamiento de trombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, mientras que previene los eventos hemorrágicos adversos.

Por consiguiente, las características de los compuestos de fórmula (I) como ligandos de GPVI los convierten en inhibidores de la agregación plaquetaria y, por tanto, hacen que sean útiles también en la prevención y/o el tratamiento de patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio.

A los efectos de la presente invención, el término “trombosis” se refiere a la formación de un coágulo sanguíneo dentro de los vasos sanguíneos que limita el flujo sanguíneo en los mismos y que da como resultado un posible daño (rotura vascular, bajo suministro de oxígeno a un tejido u órgano, etc.). La formación de trombos puede producirse en venas (vasos sanguíneos que transportan sangre desde diferentes partes del cuerpo al corazón) o arterias (vasos sanguíneos que suministran sangre rica en oxígeno desde el corazón a diferentes partes del cuerpo). Por tanto, el término “trombosis”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a trombosis venosa y trombosis arterial, preferiblemente trombosis arterial. La trombosis representa la causa más común de muerte en los países desarrollados. Esta mortalidad depende de la ubicación y la gravedad del trombo formado, siendo el infarto de miocardio y el ictus isquémico los que representan la mayor proporción de muertes asociadas a trombosis (Ashorobi *et al.*, 2021).

A los efectos de la presente invención, el término “trombosis arterial” se usa de manera equivalente al término “aterotrombosis” y se refiere a la formación de un coágulo sanguíneo en el interior de las arterias, lo que limita el flujo sanguíneo en las mismas. Las plaquetas desempeñan un papel significativo en el desarrollo de la trombosis arterial en comparación con la trombosis venosa, y esto explica la importancia de los agentes antiplaquetarios en la prevención y el tratamiento de la trombosis arterial. La trombosis arterial, o aterotrombosis, puede iniciarse por la acumulación de placas lipídicas en la pared arterial, lo que provoca la activación plaquetaria y de células de inflamación crónica, tal como puede observarse en la arteriopatía coronaria. Las placas lipídicas iniciales evolucionan hasta convertirse en placas fibrosas que pueden romperse y conducir a la liberación de factores procoagulantes adicionales. Este proceso se denomina entonces “ateroesclerosis” a los efectos de la presente invención. La aterosclerosis permite la activación plaquetaria, provocando adhesión y agregación, lo que conduce a la formación de un coágulo. La oclusión vascular debida a la aterosclerosis y la formación de trombina en las arterias coronarias del corazón puede conducir a cardiopatía isquémica e infarto de miocardio. Adicionalmente, a los efectos de la presente invención, el término “ictus isquémico” se refiere a la aparición de un ictus o accidente cerebrovascular debido a un evento trombótico que provoca una disminución del flujo sanguíneo al cerebro.

Finalmente, a los efectos de la presente invención, el término “arteriopatía coronaria” se refiere a una patología que implica la formación de placas ateroscleróticas en la luz vascular. Esto conduce a una insuficiencia del flujo sanguíneo y, por tanto, del suministro de oxígeno, en particular al miocardio, y puede dar como resultado un infarto de miocardio, que se refiere, por consiguiente, a una disminución o un cese completo del flujo sanguíneo al miocardio.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se da a conocer en el presente documento, para uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades que responden a los inhibidores de GPVI, y, por consiguiente, para uso como inhibidor de GPVI en la prevención y/o el tratamiento de trombosis arterial y aterotrombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos, en donde dichas patologías asociadas con la formación de trombos son ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o al uso de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se da a conocer en el presente documento, para fabricar un medicamento para prevenir la agregación plaquetaria y la formación de trombos, en particular mediante la inhibición de GPVI, y, por tanto, un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de trombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, mientras que previene los eventos hemorrágicos

adversos.

Además, la presente invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o al uso de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se da a conocer en el presente documento, para fabricar un medicamento para prevenir y/o tratar ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o al uso *in vitro* de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se da a conocer en el presente documento, como herramienta farmacológica. El término "herramienta farmacológica" se refiere a cualquier herramienta farmacológica adecuada. Específicamente, los compuestos de fórmula (I), tal como se describe en el presente documento, son inhibidores de GPVI. Mediante la inhibición de GPVI, se interfiere en la activación plaquetaria. Por tanto, estos compuestos pueden usarse en sistemas de prueba *in vitro* para la detección de la activación plaquetaria mediada por GPVI. Por ejemplo, en un sistema de ensayo en el que se observa activación plaquetaria en ausencia de un compuesto de fórmula (I) tal como se da a conocer en el presente documento, si entonces se observa una reducción de la activación plaquetaria tras la adición de un compuesto de fórmula (I) tal como se da a conocer en el presente documento, al menos parte de la activación plaquetaria observada es debida a GPVI. Por tanto, la herramienta puede ser una herramienta para estudiar la inhibición *in vitro* por interferencia con la activación plaquetaria mediada por GPVI.

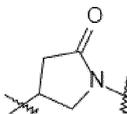
A los efectos de la presente invención, el término "comprende" puede reemplazarse por cualquiera de los términos "consiste en" o "consiste esencialmente en". Por consiguiente, "comprende" puede referirse a un grupo de características A, B y C, que adicionalmente pueden incluir otras características, tales como E y D, con la condición de que dichas características no impidan la viabilidad de la reivindicación, pero dicho término "comprende" también incluye la situación en la que el grupo de características "consiste en" o "consiste esencialmente en" A, B y C.

A los efectos de la presente invención, una cantidad eficaz de los compuestos dados a conocer en el presente documento, cuando dicha cantidad eficaz se refiere a un uso terapéutico de dichos compuestos, es aquella que proporciona un efecto terapéutico en el sujeto o una mejora identificable objetivamente en el estado de salud de dicho sujeto tal como constata un médico u otro observador cualificado.

En una realización preferida de la invención, R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>- y R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en un fenilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo naftilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup> y un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo; y en donde R<sup>4</sup> es H o un halógeno.

Más preferiblemente, R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>- y R<sup>3</sup> es un grupo fenilo no sustituido, un grupo fenilo sustituido con uno o más grupos halógeno, un grupo naftilo, un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo o un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo. Incluso más preferiblemente, R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>- y R<sup>3</sup> es un grupo fenilo no sustituido, un grupo 4-clorofenilo, un grupo 4-bromofenilo, un grupo naftilo, un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo o un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo.

En otra realización preferida de la invención, R<sup>1</sup> es un grupo R<sup>2</sup>:

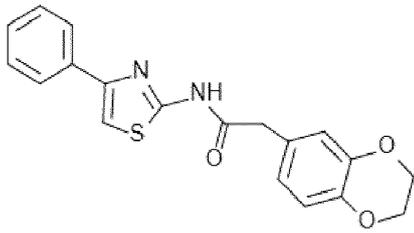


(R<sup>2</sup>).

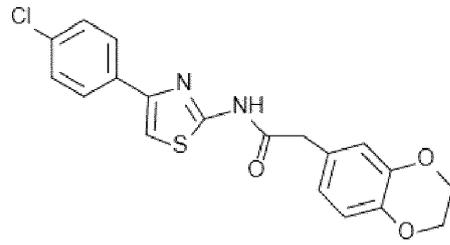
en donde R<sup>2</sup> está unido a la 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina por el átomo de nitrógeno del anillo de pirrolidin-2-ona; y R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en un fenilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo naftilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup> y un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo; y en donde R<sup>4</sup> es H o un halógeno.

Más preferiblemente, R<sup>1</sup> es un grupo R<sup>2</sup>, tal como se da a conocer en el presente documento, y R<sup>3</sup> es un grupo fenilo no sustituido, un grupo fenilo sustituido con uno o más grupos halógeno, un grupo naftilo, un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo o un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo. Incluso más preferiblemente, R<sup>1</sup> es un grupo R<sup>2</sup>, tal como se da a conocer en el presente documento, y R<sup>3</sup> es un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo.

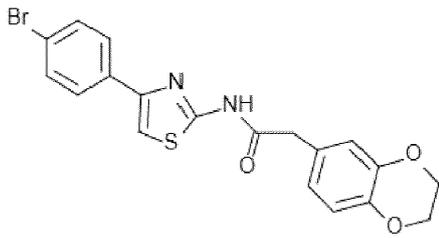
En una realización más preferida de la invención, el compuesto de fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en I<sub>a</sub>, I<sub>b</sub>, I<sub>c</sub>, I<sub>d</sub>, I<sub>e</sub>, I<sub>f</sub> y I<sub>h</sub>, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



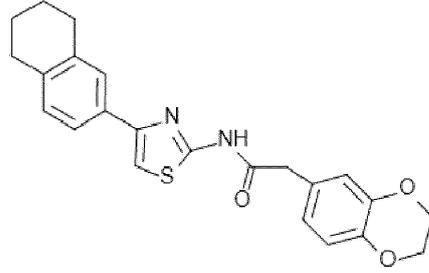
(Ia)



(Ib)

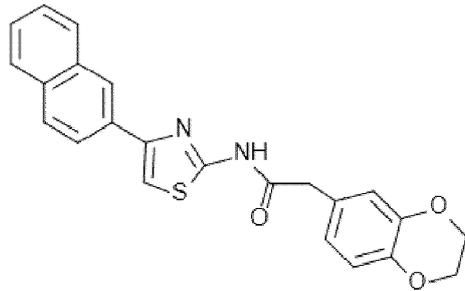


(Ic)

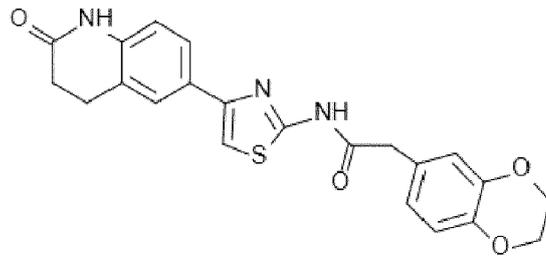


(Id)

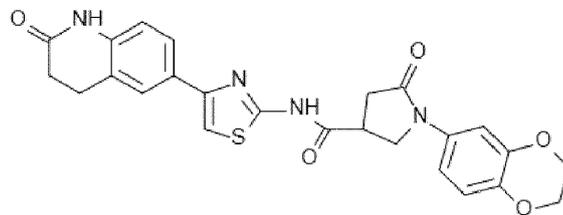
5



(Ie)



(If)



(Ih).

10

15

Ventajosamente,  $R^1$  es  $-CH_2-$  y  $R^3$  es un grupo fenilo no sustituido y el compuesto de fórmula (I) es el compuesto (Ia), o  $R^1$  es  $-CH_2-$  y  $R^3$  es un grupo 4-clorofenilo y el compuesto de fórmula (I) es el compuesto (Ib), o  $R^1$  es  $-CH_2-$  y  $R^3$  es un grupo 4-bromofenilo y el compuesto de fórmula (I) es el compuesto (Ic), o  $R^1$  es  $-CH_2-$  y  $R^3$  es un grupo naftilo y el compuesto de fórmula (I) es el compuesto (Ie), o  $R^1$  es  $-CH_2-$  y  $R^3$  es un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo y el compuesto de fórmula (I) es el compuesto (Id), o  $R^1$  es  $-CH_2-$  y  $R^3$  es un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo y el compuesto de fórmula (I) es el compuesto (If), o  $R^1$  es un grupo  $R^2$ , tal como se da a conocer en el presente documento, y  $R^3$  es un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo y el compuesto de fórmula (I) es el compuesto (Ih).

Tal como se observa en los ejemplos que forman parte de la presente descripción, y en particular en la figura 1 y la tabla 1, los compuestos de fórmula (I) dados a conocer en el presente documento actúan como ligandos de GPVI. Por ejemplo, el compuesto (I<sub>r</sub>) muestra una respuesta dependiente de la dosis robusta similar tras la interacción con GPVI, de una manera muy similar a su ligando natural, el péptido relacionado con colágeno (CRP).

Además, tal como se observa en los ejemplos dados a conocer en el presente documento, los compuestos de fórmula (I) para uso según la presente invención son capaces de inhibir la agregación plaquetaria al inhibir la movilización de calcio (tal como se observa en la tabla 2 y la figura 2). Sin embargo, la inhibición de la agregación plaquetaria proporcionada por los compuestos de fórmula (I) dados a conocer en el presente documento se induce específicamente por el ligando natural de GPVI, CRP, mientras que la agregación no se vio afectada cuando se usaron otros agonistas tales como rodocitina o trombina (véase la figura 3).

Esta selectividad de los compuestos de fórmula (I) como ligandos de GPVI los convierte en inhibidores más específicos de la agregación plaquetaria en comparación con otros compuestos que pueden actuar como agentes antitrombóticos a través de otras dianas biológicas y, por tanto, pueden provocar una gama más amplia de efectos adversos, tales como hemorragia. El perfil de seguridad mejorado de los compuestos de fórmula (I) relativo a los eventos adversos, tales como hemorragia, permite potencialmente la administración de dichos compuestos a un grupo más amplio de pacientes o en situaciones clínicas donde no pueden usarse otros agentes antiplaquetarios debido a sus efectos adversos (por ejemplo, antes de una cirugía, o en pacientes donde la hemorragia da como resultado problemas de salud importantes).

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) para uso según la presente invención, o las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención, tal como se dan a conocer en el presente documento, pueden administrarse antes de, en combinación con, o posteriormente después de la administración de un agente terapéutico adicional para uso en la prevención y/o el tratamiento de trombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, que tiene actividades biológicas aditivas o sinérgicas.

Además, preferiblemente, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento pueden comprender opcionalmente al menos un segundo agente terapéutico para uso en la prevención y/o el tratamiento de trombosis tal como trombosis arterial, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, que tiene actividades biológicas aditivas o sinérgicas.

A los efectos de la presente invención, el término "agente terapéutico" debe tomarse como sinónimo y significar una entidad química que ejerce efectos terapéuticos cuando se administra a un paciente.

Más preferiblemente, dicho agente terapéutico adicional para uso en la prevención y/o el tratamiento de trombosis tal como trombosis arterial, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, es un fármaco antiplaquetario. Incluso más preferiblemente, dicho agente terapéutico adicional para uso en la prevención y/o el tratamiento de trombosis tal como trombosis arterial, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor del receptor de difosfato de adenosina, un inhibidor de fosfodiesterasa, antagonista del receptor activado por proteasa 1, un inhibidor de glicoproteína IIB/IIIA, un inhibidor de la recaptación de adenosina y un inhibidor de tromboxano.

Las composiciones para uso según la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida, o retardada de los compuestos para uso según la presente invención después de la administración al paciente empleando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Pueden utilizarse sistemas de administración de liberación lenta o prolongada, incluyendo cualquiera de varios biopolímeros (sistemas de base biológica), sistemas que emplean liposomas, coloides, resinas, y otros depósitos compartimentados o sistemas de administración poliméricos, con las composiciones descritas en el presente documento para proporcionar una fuente continua o duradera de los compuestos terapéuticos dados a conocer en el presente documento.

Tal como se da a conocer en el presente documento, la vía de administración puede ser cualquier vía que transporte eficazmente los compuestos y las composiciones dados a conocer en la presente divulgación al sitio de acción apropiado o deseado, tal como oral, nasal, tópica, pulmonar, transdérmica o parenteral, por ejemplo, rectal, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular, intranasal, disolución oftálmica o pomada.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) para uso según la presente invención, o las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención, tal como se dan a conocer en el presente documento, pueden administrarse por vía oral, por vía transdérmica o por vía parenteral.

A los efectos de la presente invención, el excipiente incluido en las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención se refiere a un componente inerte tal como, pero sin limitarse a, codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes o agentes de humectación, emulsionantes y agentes de suspensión, agentes edulcorantes o aromatizantes, conservantes, estabilizantes y antioxidantes.

5 Las cantidades eficaces de los excipientes son aquellas cantidades que son eficaces para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable en cuanto a solubilidad, actividad biológica, etc.

10 Tales composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención pueden incluirse en una cápsula, un sobre, un papel u otro recipiente. A la hora de preparar las composiciones, pueden usarse técnicas convencionales para la preparación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, los compuestos para uso según la presente invención pueden mezclarse con un excipiente, o diluirse con un excipiente, o incorporarse en el interior de un excipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido, o líquido que actúa como vehículo o medio para el compuesto activo. Los compuestos para uso según la presente invención pueden adsorberse en un recipiente sólido granular, por ejemplo, en un sobre. Dichas composiciones también pueden incluir agentes de humectación, agentes de emulsificación y suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes, conservantes, estabilizantes y antioxidantes.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse y mezclarse, si se desea, con emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y/o sustancias colorantes, que no reaccionen de forma perjudicial con los compuestos para uso según la presente invención. Puede usarse cualquier tampón farmacológicamente aceptable, tal como los tampones Tris o fosfato.

25 Algunos ejemplos de excipientes adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrina, amilosa, estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, ácido esteárico o (alquil inferior)-éteres de celulosa, ácido silícico, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, polioxietileno, hidroximetilcelulosa, y polivinilpirrolidona. De manera similar, el excipiente o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

30 La dosificación de los compuestos y las composiciones dados a conocer según la invención varía dependiendo del compuesto y la afección que esté tratándose, por ejemplo, la edad, el peso, y el estado clínico del paciente receptor, así como su uso en combinación con otros agentes terapéuticos. Otros factores incluyen: la vía de administración, el paciente, el historial médico del paciente, la gravedad del proceso patológico, y la potencia del compuesto particular. La dosis, o cantidad eficaz, debe ser suficiente para mejorar los síntomas o signos de la enfermedad tratada sin producir una toxicidad inaceptable para el paciente.

40 Por consiguiente, otra realización preferida de la invención es el esquema de dosificación de los compuestos y las composiciones para uso según la presente invención. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto farmacéutico deseado en asociación con el excipiente farmacéutico requerido (diluyente, portador o vehículo). Las especificaciones de las formas de dosificación unitarias de esta invención vienen dictadas por, y dependen de, (a) las características singulares de los compuestos dados a conocer anteriormente en el presente documento y el efecto particular que va a lograrse y (b) las limitaciones inherentes a la técnica en la que se usan dichos compuestos en un sujeto que lo necesita. Ejemplos de formas de dosificación unitarias son comprimidos, cápsulas, pastillas, bolsitas de polvo, obleas, supositorios, gránulos, sellos, cucharaditas, cucharadas, goteros, ampollas, viales, aerosoles con dosificador, múltiples segregados de cualquiera de los anteriores, y otras formas tal como se describen en el presente documento. Los compuestos y las composiciones dados a conocer en el presente documento pueden incluirse en kits, que pueden contener una o más formas de dosificación unitarias de las composiciones, así como otras composiciones que comprenden agentes terapéuticos adicionales, tal como se dan a conocer en el presente documento, e instrucciones para su uso.

55 Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de partes que comprende una o más formas de dosificación unitarias de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), tal como se da a conocer en el presente documento, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y opcionalmente una o más formas de dosificación unitarias de otra composición farmacéutica que comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales para uso en la prevención y/o el tratamiento de trombosis tal como trombosis arterial, así como patologías asociadas con la formación de trombos, tales como ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, tal como se da a conocer en el presente documento, e instrucciones para su uso.

60 Las instrucciones se refieren al modo de administración que indica que las formas de dosificación unitarias descritas en el presente documento, que comprenden los compuestos y las composiciones dados a conocer en la presente invención, pueden administrarse una o más veces al día, a la semana, al mes, etc.

**Breve descripción de las figuras**

- 5 Figura 1. Interacción entre GPVI y (A) péptido relacionado con colágeno (CRP), el ligando natural de GPVI, o (B) compuesto (I<sub>f</sub>), a diferentes concentraciones.
- Figura 2. Efecto de (A) compuesto (I<sub>b</sub>); (B) compuesto (I<sub>c</sub>) y (C) compuesto (I<sub>e</sub>) a una concentración 10 µM, en agregación inducida por CRP (1 µg/ml) en plaquetas humanas. Se usó DMSO al 0,5 % como control.
- 10 Figura 3. Inhibición de la agregación plaquetaria por el compuesto (I<sub>c</sub>) en plaquetas expuestas a (A) colágeno, (B) trombina y (C) rodocitina. Se usó DMSO al 0,5 % como control.
- Figura 4. Ensayos de extensión de plaquetas. Imágenes de la forma de plaquetas proporcionada mediante tinción con faloidina adquiridas mediante microscopía de fluorescencia confocal. Se proporciona la inhibición de la extensión de plaquetas en CRP (1 µg/ml) para los compuestos (I<sub>b</sub>), (I<sub>c</sub>), (I<sub>f</sub>) y (I<sub>h</sub>), en comparación con un control donde sólo estaba presente CRP con DMSO al 1 %. Se obtuvieron el número medio de plaquetas y el área media por plaqueta cuando se administró cada uno de los compuestos de prueba (I<sub>b</sub>), (I<sub>c</sub>), (I<sub>f</sub>) y (I<sub>h</sub>) a una dosis de 10 µM, respectivamente. (A1) Número medio de plaquetas, área media por plaqueta y (A2) imágenes mostradas para un primer ensayo llevado a cabo con los compuestos (I<sub>f</sub>) y (I<sub>h</sub>). (B1) Número medio de plaquetas, área media por plaqueta y (B2) imágenes mostradas para un segundo ensayo llevado a cabo con los compuestos (I<sub>b</sub>), (I<sub>c</sub>) y (I<sub>f</sub>).
- 15
- Figura 5. Porcentaje de inhibición de las enzimas citocromo P450 (A) CYP2A2, (B) CYP2C19, (C) CYP206, (D) CYP2C9 y CYP3A4 con testosterona (E) y midazolam (F) como sondas, con el compuesto (I<sub>f</sub>) a diferentes concentraciones molares (se muestra el logaritmo de la concentración molar usada).
- 20
- 25

**Ejemplos**

Los ejemplos de la presente invención descritos a continuación tienen como objetivo ilustrar sus realizaciones preferidas sin limitar su alcance de protección.

30 EJEMPLO 1: Modelo de unión de los compuestos de fórmula (I) a GPVI

Se realizó un estudio *in silico* para analizar las posibles interacciones de las moléculas de fórmula (I) con GPVI usando una simulación de acoplamiento virtual. En este análisis se usó la estructura GPVI 2GI7 a partir de PDB, siguiendo un protocolo previamente descrito [Álvarez-Coiradas *et al.*, (2020)].

El compuesto (I<sub>h</sub>) interactúa mejor con la diana en comparación con el compuesto (I<sub>f</sub>): mejor compuesto conformero (I<sub>h</sub>): -9,5 kcal/mol frente a mejor compuesto conformero (I<sub>f</sub>): -8,1 kcal/mol.

40 Las observaciones preliminares de los presentes inventores muestran que ningún residuo de cisteína está implicado en la interacción y que los sitios de unión para el mejor conformero son diferentes, aunque las moléculas pueden unirse al sitio de unión de ligandos endógenos (no mostrado).

45 EJEMPLO 2: Ensayo de unión biofísico de los compuestos de fórmula (I) a GPVI

Se desarrolló un ensayo biofísico para ensayar la interacción directa con GPVI usando una metodología sin marcadores basada en la redistribución dinámica de masa (DMR).

Este protocolo consiste en inmovilizar la proteína diana en una superficie mediante medios químicos y luego medir el índice de refracción de una luz dirigida a la parte inferior de la superficie, que contiene un sensor. Se ha usado previamente con otras dianas para determinar la potencia de ligandos tales como péptidos y moléculas [Akhter *et al.*, (2017) y Álvarez-Coiradas *et al.*, (2020)].

55 Brevemente, las placas de alta sensibilidad EnSpire LFB (PerkinElmer 6057460, EE. UU.) se activaron con EDC (clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) 400 mM (Sigma Aldrich, Reino Unido) y sulfo-NHS (sulfo-N-hidroxisulfosuccinimida) 100 mM (Thermo Fisher, EE. UU.) diluidos en agua ultrapura durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las microplacas se lavaron con agua ultrapura. La proteína GPVI se inmovilizó (25 µg/ml) en tampón acetato de sodio 20 mM, pH 5,5. Después de una incubación durante la noche a 4 °C, la microplaca se lavó con PBS con Tween-20 al 0,005 %, pH 7,4 (tampón de ensayo). La lectura inicial se realizó tres horas después en el lector de placas de múltiples marcadores EnSpire™ 2300 (PerkinElmer, Singapur). Se añadieron los compuestos a la microplaca, se incubaron durante 1 h y se realizó la lectura final en el lector de placas de múltiples marcadores EnSpire™ 2300. Se emplearon CRP recombinante y tampón de ensayo como control positivo y negativo, respectivamente.

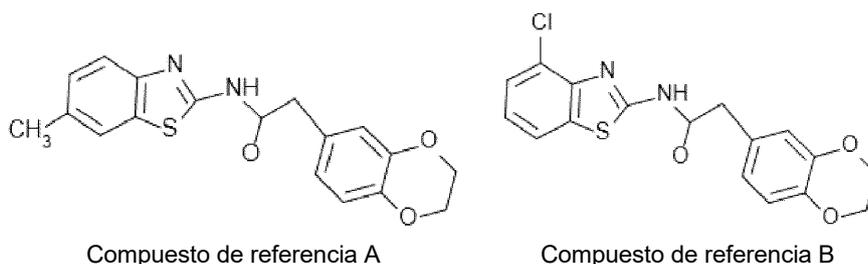
65 Los compuestos se sometieron a ensayo por medio de curvas de concentración-respuesta con concentraciones entre 100 µM y 0,4 µM (diluciones en serie 1:3 por triplicado), mientras que CRP se sometió a ensayo de manera

similar comenzando con una dosis máxima de 7 µg/ml y con un total de 6 concentraciones (diluciones en serie 1:2 por triplicado). La respuesta (pm) se obtuvo restando la medición inicial de la lectura final.

5 Se halló que el péptido relacionado con colágeno (CRP), el ligando natural de GPVI, muestra una respuesta dependiente de la dosis robusta al interactuar con la diana. Curiosamente, el compuesto de fórmula (I) muestra un perfil de interacción con molécula diana similar a CRP con GPVI (figura 1).

Además, los compuestos de fórmula (I<sub>a</sub>), (I<sub>b</sub>), (I<sub>c</sub>), (I<sub>d</sub>) y (I<sub>e</sub>) también muestran (tabla 1 a continuación) una respuesta similar hacia la interacción a dosis micromolares, lo que sugiere la unión a GPVI.

10 Por otro lado, se evaluaron dichos compuestos frente a otros compuestos con una estructura similar, tales como los compuestos de referencia A y B:



15 Los compuestos de referencia A y B, que tienen una estructura similar a la de los compuestos de fórmula (I), no mostraron un buen perfil de interacción (tabla 1 a continuación) con GPVI, lo que indica que las características específicas de los compuestos de fórmula (I) permiten un buen perfil de interacción con GPVI.

	Concentración de compuesto (1 µM)		Concentración de compuesto (10 µM)	
	Media	DE	Media	DE
Compuesto (I <sub>a</sub> )	10,8	8,08	19,81	2,89
Compuesto (I <sub>b</sub> )	13,76	7,00	20,47	4,14
Compuesto (I <sub>c</sub> )	12,37	5,72	25,42	3,51
Compuesto (I <sub>d</sub> )	17,38	6,66	28,66	4,52
Compuesto (I <sub>e</sub> )	6,50	7,63	25,16	3,35
Compuesto de ref. A	-9,78	3,60	1,91	12,48
Compuesto de ref. B	6,77	3,78	-16,01	14,48

20 *Tabla 1: Interacción de los compuestos de fórmula (I) con GPVI a diferentes concentraciones molares (1 µM y 10 µM).*

EJEMPLO 3: Efecto de los compuestos de fórmula (I) sobre los transitorios de calcio en plaquetas humanas

25 Se usó un ensayo de movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular para ensayar la actividad de los ligandos en plaquetas. Este ensayo mide los cambios de calcio en tiempo real mediante el colorante fluoróforo Calcium 4, lo que proporciona una forma útil de caracterizar la activación plaquetaria mediante la señalización de GPVI [Barrachina *et al.* (2021)].

Ensayos de movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular:

30 Las plaquetas lavadas (5x10E6) se incubaron con el reactivo FLIPR Calcium 4 (Molecular Devices LLC, San José, CA, EE. UU.) en una placa de fondo transparente de 384 pocillos (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Austria) y se complementaron con probenecid (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EE. UU.) al 0,07 % durante 1 h a 37 °C. Las plaquetas se incubaron conjuntamente durante 10 min con los compuestos ensayados e  
 35 inhibidores de mediadores secundarios (apirasa 2 U/ml e indometacina 10 µM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.)) en condiciones de no agregación (eptifibatida 9 µM (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EE. UU.)). Luego, se añadió el agonista específico de GPVI, péptido relacionado con colágeno (CRP), a la suspensión de las plaquetas a diferentes dosis. Tanto los posibles inhibidores de GPVI como CRP se dispensaron automáticamente mediante el sistema de detección de fármacos funcionales FDSS7000EX (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón). Se  
 40 evaluó la movilización Ca<sup>2+</sup> intracelular midiendo los cambios de fluorescencia (longitudes de onda de emisión a 480 nm y excitación a 540 nm) en tiempo real durante 15 min después de la adición del agonista. El 100 % se expresó como liberación máxima de Ca<sup>2+</sup> en plaquetas tratadas con el agonista CRP. Para determinar la CI<sub>50</sub>, los

compuestos se ensayaron a 9 concentraciones diferentes por duplicado, comenzando desde 10  $\mu\text{M}$  y realizando diluciones en serie 1:3. El análisis de los datos se realizó con el software GraphPad Prism® (versión 6.0e, marzo de 2014) (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) realizando un ajuste de regresión no lineal para log(inhibidor) frente a la actividad relativa de CRP usando una pendiente de Hill de -1, y restricciones superior e inferior de 100 y 0, respectivamente.

Los resultados (tabla 2) indican que los compuestos de fórmula (I) ensayados son capaces de inhibir la movilización de calcio a concentraciones micromolares tras la activación de plaquetas humanas inducida por fármaco con CRP:

	% de inhibición del efecto de CRP a 1 $\mu\text{M}$	
	Media	DE
Compuesto (I <sub>h</sub> )	68,16	1,26
Compuesto (I <sub>f</sub> )	31,02	1,40
Compuesto (I <sub>a</sub> )	53,74	7,20
Compuesto (I <sub>b</sub> )	15,91	0,03
Compuesto (I <sub>c</sub> )	34,05	43,13
Compuesto (I <sub>d</sub> )	35,97	4,44
Compuesto (I <sub>e</sub> )	24,64	19,30

Tabla 2: Efecto de los compuestos de fórmula (I) sobre la movilización de calcio en plaquetas humanas.

#### EJEMPLO 4: Solubilidad de los compuestos de fórmula (I) en agua

La solubilidad se determinó mediante nefelometría para evaluar su posible impacto en los bioensayos a concentraciones activas.

Se diluyeron disoluciones madre ( $10^{-2}$  M) de los compuestos de fórmula (I) ensayados en un intervalo de molaridad de desde 300  $\mu\text{M}$  hasta 0,1  $\mu\text{M}$  en una placa transparente de 384 pocillos (Greiner 781801) en disolución tampón de DMSO al 1 %:PBS al 99 %. Luego, se incubaron dichos compuestos durante 2 horas a 37 °C y se leyeron en un dispositivo NEPHELOstar Plus (BMG LABTECH).

Los resultados se ajustaron a una regresión segmentada para obtener la concentración máxima a la que son solubles los compuestos. La digoxina y la prazosina se incluyeron como referencia para fármacos de alta solubilidad, mientras que la progesterona se ensayó como referencia para fármacos de baja solubilidad, y los datos obtenidos en el experimento indican el perfil de solubilidad esperado. Los compuestos activos muestran una solubilidad global a concentraciones superiores a 20  $\mu\text{M}$ , lo que indica que los bioensayos pueden realizarse en intervalos micromolares bajos (véase la tabla 3):

Compuesto de fórmula (I)	Solubilidad ( $\mu\text{M}$ )	Solubilidad notificada ( $\mu\text{M}$ )
(I <sub>f</sub> )	61,5	
(I <sub>a</sub> )	5,4	
(I <sub>b</sub> )	50,0	
(I <sub>c</sub> )	51,9	
(I <sub>d</sub> )	21,9	
(I <sub>e</sub> )	22,5	
Digoxina	96,9	59,3*
Prazosina	77,2	26,3*
Progesterona	5,1	3,7*

Tabla 3: Solubilidad de los compuestos de fórmula (I). \* Solubilidad de patrones a partir de [Dehring et al. (2004)].

#### EJEMPLO 5: Efecto de los compuestos de fórmula (I) sobre la agregación de plaquetas humanas

Se llevaron a cabo ensayos de agregación plaquetaria para evaluar la potencia de los compuestos activos tal como se describió previamente [Barrachina et al. (2021)].

Brevemente, se aislaron plaquetas humanas de al menos 7 individuos sanos y se lavaron. Luego, se incubó la suspensión con los compuestos a 10  $\mu\text{M}$  a 37 °C durante 4 min en un agregómetro Chrono-log® 490-X (Chrono-log Corporation, Havertown, PA, EE. UU.). Después de eso, se estimularon las plaquetas con el agonista CRP a 1  $\mu\text{g/ml}$  durante 5 min.

Los datos muestran una inhibición consistente de la agregación plaquetaria para los compuestos de fórmula (I): ( $I_b$ ), ( $I_c$ ) y ( $I_e$ ) (figuras 2A, 2B y 2C, respectivamente), aunque con menor potencia que el compuesto ( $I_h$ ) y el compuesto ( $I_f$ ) (56  $\pm$  20 % de inhibición para el compuesto ( $I_h$ ), y 70  $\pm$  19 % para el compuesto ( $I_f$ )).

Además, se llevó a cabo una evaluación de la selectividad del compuesto activo ( $I_c$ ) a 10  $\mu\text{M}$  basándose en ensayos de agregación. Brevemente, se aislaron plaquetas humanas de individuos sanos y se lavaron. Los agonistas usados en este ensayo de selectividad fueron colágeno, rodocitina y trombina.

Los datos muestran una inhibición consistente de la agregación plaquetaria por el compuesto ( $I_c$ ) en plaquetas expuestas a colágeno (figura 3A), mientras que la agregación inducida por rodocitina y trombina permanece sin cambios (figuras 3B y 3C, respectivamente).

#### EJEMPLO 6: Efecto de los compuestos de fórmula (I) sobre la extensión de plaquetas humanas

Se llevaron a cabo experimentos de extensión de plaquetas para evaluar la potencia de los compuestos de fórmula (I), ejemplificados por los compuestos ( $I_f$ ) y ( $I_h$ ).

Las plaquetas pueden cambiar de una forma redondeada y no adherente a una forma aplanada y adherente al exponerse a ligandos. Este efecto de “extensión” puede conducir a la formación de un reordenamiento de las proteínas citoesqueléticas. La adhesión y el grado de extensión (área cubierta) de plaquetas pueden cuantificarse.

Brevemente, se aislaron plaquetas humanas de individuos sanos y se lavaron. Luego, se incubaron las plaquetas con los inhibidores a 10  $\mu\text{M}$  durante 5 min a temperatura ambiente y luego durante 45 min a 37 °C en cubreobjetos recubiertos con 1  $\mu\text{g/ml}$  de agonista (CRP).

Las imágenes de la forma de plaquetas proporcionada mediante tinción con faloidina se adquirieron mediante microscopía de fluorescencia confocal y el área se analizó mediante ImageJ [Onselaer *et al.*, (2020)]. Los datos muestran inhibición de la extensión de plaquetas en CRP para los compuestos ( $I_b$ ), ( $I_c$ ), ( $I_f$ ) y ( $I_h$ ), en consonancia con el efecto inhibitorio sobre la agregación (véase el número medio y el área media de plaquetas).

#### EJEMPLO 7: Efecto de los compuestos de fórmula (I) sobre la viabilidad de plaquetas humanas

También se evaluó la posible toxicidad de los compuestos de fórmula (I). El ensayo usa calceína-AM como marcador de la viabilidad de plaquetas. La calceína-AM es una molécula no fluorescente permeable a la membrana, que se convierte en calceína fluorescente mediante esterasas intracelulares.

#### Ensayo de citometría de flujo de calceína-AM relacionado con la viabilidad

Para medir la posible toxicidad de los inhibidores, se realizó un ensayo de viabilidad basado en la unión de calceína-AM, medida mediante citometría de flujo. Las plaquetas lavadas (2,5x10E8 plaquetas/ml) se incubaron durante 10 min con 10  $\mu\text{M}$  de los compuestos que iban a ensayarse o DMSO al 0,1 % (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) como vehículo. Luego, se añadió 1  $\mu\text{l}$  de calceína-AM 0,1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) a la suspensión y se incubó durante 20 min adicionales a temperatura ambiente. La unión de calceína-AM se midió por triplicado con un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.). Los datos se analizaron comparando el promedio del porcentaje de eventos positivos en presencia del inhibidor con el promedio del porcentaje de eventos positivos en ausencia del inhibidor (vehículo).

En general, los compuestos de fórmula (I) evaluados a 5 y 10  $\mu\text{M}$  no afectan significativamente a la viabilidad.

#### EJEMPLO 8: Estabilidad plasmática y metabólica, unión a proteínas plasmáticas e inhibición de CYP de los compuestos de fórmula (I)

##### 1.- ESTABILIDAD PLASMÁTICA

En el ensayo se empleó plasma de rata, ser humano, ratón y perro extraído de donantes sanos en tubos con citrato.

Se incubaron las placas que contenían 5  $\mu\text{M}$  de los compuestos en plasma (volumen total: 100  $\mu\text{l}$ ) a 37 °C en diferentes tiempos (0, 60, 120 y 360 min). Luego, se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo para precipitar la proteína plasmática, y se centrifugó la placa a 4000 g durante 60 min a 4 °C.

## ES 3 022 546 T3

Se tomó el sobrenadante y se analizó mediante UPLC/EM/EM para la cuantificación de muestras.

Fase estacionaria: ACQUITY BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$  2,1x50 mm de fase inversa (Waters)

5 Fase móvil: ácido fórmico al 0,1 % en agua/ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo	Agua	Acetonitrilo
0,0	95 %	5 %
0,1	95 %	5 %
1	0 %	100 %
2	0 %	100 %
2,1	95 %	5 %
2,5	95 %	5 %

10 *Tabla 4: Gradiente de UPLC / ensayo de estabilidad plasmática.*

Flujo: 0,6 ml/min.

15 El equipo cromatográfico empleado fue un dispositivo UPLC QSM Waters Acquity. Las concentraciones de compuesto se calcularon a partir de las áreas de pico de EM.

Resultados:

		t (min)			
		0	60	120	360
(I <sub>r</sub> ) 10 $\mu\text{M}$	Rata	100,0	105,5	105,4	81,6
	Ser humano	100,0	101,0	101,7	101,4
	Ratón	100,0	67,8	41,6	5,6
	Perro	100,0	89,2	85,1	83,5
(I <sub>r</sub> ) 100 $\mu\text{M}$	Rata	100,0	88,8	95,1	65,7
	Ser humano	100,0	104,3	107,4	106,4
	Ratón	100,0	77,6	57,5	9,6
	Perro	100,0	101,4	106,5	102,4

20 *Tabla 5: Estabilidad plasmática de los compuestos de fórmula (I).*

Tal como se observa a partir de los resultados mostrados en la tabla 5, el compuesto de fórmula (I<sub>r</sub>) tiene una alta estabilidad plasmática en ser humano (niveles máximos) y ratas, pero no en ratones.

### 25 2.- ESTABILIDAD METABÓLICA

En el ensayo se emplearon microsomas de Tebu-bio Xenotech, que tenían un contenido de proteína de 20 mg/ml. Se añadieron las siguientes cantidades a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos.

## ES 3 022 546 T3

		Rata (µl)	Ratón (µl)	Perro (µl)	Ser humano (µl)
Tampón fosfato Na/K 50 mM pH 7,4		301	310	308	296
MgCl <sub>2</sub> 30 mM	COFACTORES	163	163	163	162,5
NADP 10 mM					
Glucosa 6-P 100 mM					
Glucosa 6-PDH 40 U/ml					
Microsomos de rata		31,4			
Microsomos de ser humano					36,5
Microsomos de ratón			22,4		
Microsomos de perro				24,5	
Compuesto de ensayo		5	5	5	5
Volumen total (µl)		500	500	500	500

*Tabla 6: Ensayo de estabilidad metabólica.*

5 Se incubaron las placas a 37 °C y se tomaron muestras de 75 µl a los 0, 10, 20, 40 y 60 minutos.

Se transfirieron las muestras a una microplaca y se añadieron 75 µl de acetonitrilo + PI (rolipram) para inactivar los microsomas y 30 µl de H<sub>2</sub>O con ácido fórmico al 0,5 % para mejorar las condiciones cromatográficas y se mantuvieron a 4 °C. Cuanto se tomaron todas las muestras, se centrifugó la placa a 46000 g durante 30 min a 15 °C.

10

Fase estacionaria: ACQUITY BEH C18 1,7 µm 2,1x50 mm (Waters)

Fase móvil: A: ácido fórmico al 0,1 %; B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %

15 Gradiente:

Tiempo (min)	A	B
0,0	95 %	5 %
0,1	95 %	5 %
1,0	0 %	100 %
2,0	0 %	100 %
2,1	95 %	5 %
2,5	95 %	5 %

*Tabla 7: Gradiente de UPLC / ensayo de estabilidad metabólica.*

20 Flujo: 0,6 ml/min

El equipo cromatográfico empleado fue un dispositivo UPLC QSM Waters Acquity.

25 La estabilidad metabólica se calculó a partir del logaritmo del compuesto restante en cada uno de los tiempos evaluados.

Compuesto	Rata			Ratón		
	% restante (*)	t1/2 (min)	Clint (µl/min* mg de prot.)	% restante (*)	t1/2 (min)	Clint (µl/min* mg de prot.)
(I <sub>r</sub> )	49,9	62,1	8,89	71,6	109	7,09
Testosterona	0,14	0,9	610	0,06	4,76	163

Compuesto	Perro			Ser humano		
	% restante (*)	t1/2 (min)	Clint (µl/min*mg de prot.)	% restante (*)	t1/2 (min)	Clint (µl/min* mg de prot.)
(I <sub>r</sub> )	89,2	325	2,17	41,21	46,88	10,13
Testosterona	49,1	59,9	11,8	4,02	12,95	36,66

Tabla 8: Estabilidad metabólica de los compuestos de fórmula (I) en ratas, ratones, perros y seres humanos / (\*) tiempo de muestreo de 60 min.

5

3.- UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS:

En el ensayo se empleó plasma de Seralab y se llevó a cabo mediante diálisis de equilibrio rápido (RED) de Thermo Scientific.

10

Los compuestos se disolvieron a 5 µM en plasma y se añadieron al inserto correspondiente del dispositivo de RED. El tampón de diálisis se añadió al inserto correspondiente del dispositivo de RED. La placa se incubó durante 4 h a 37 °C.

15

Después del periodo de incubación, se transfirieron alícuotas de 50 µl de cada cámara a viales vacíos. Se añadieron 50 µl de tampón de diálisis a las muestras de plasma y se añadieron 50 µl de plasma a las muestras de tampón. Se añadieron 300 µl de acetonitrilo a todas las muestras y se centrifugaron a 4000 rpm. Se transfirieron alícuotas de 100 µl de los sobrenadantes a una placa de análisis de CL.

20

Las muestras se analizaron en un dispositivo UPLC/EM/EM.

Fase estacionaria: Acquity UPLC® BEHC18 1,7 µm (2,1 mm x 50 mm) (Waters)

25

Gradiente: A (H<sub>2</sub>O + ácido fórmico al 0,1 %); B (ACN + ácido fórmico al 0,1 %)

Flujo: 0,6 ml/min

Tiempo (min)	A	B
0,0	95 %	5 %
0,1	95 %	5 %
1,0	0 %	100 %
2,0	0 %	100 %
2,1	95 %	5 %
2,5	95 %	5 %

Tabla 9: Gradiente de UPLC / ensayo de unión a proteínas.

30

El equipo cromatográfico empleado fue un sistema ACQUITY UPLC/Xevo TQD. Las concentraciones de compuesto se calcularon a partir de las áreas de pico de EM.

Compuesto		Unión a proteínas plasmáticas (%)	Fracción no unida (%)	Intervalo de aceptación, ppb de fenitoína (%)
(I <sub>f</sub> )	RATA	99,90	0,10	
	SER HUMANO	99,89	0,11	
	RATÓN*	99,54	0,46	
	PERRO	99,85	0,15	
Fenitoína	RATA	86,24	13,76	73,0-89,0
	SER HUMANO	82,23	17,77	78,4-94,4
	RATÓN	82,06	17,94	73,5-89,5
	PERRO	81,06	18,94	70,4-86,4

Tabla 10: Unión a proteínas plasmáticas de los compuestos de fórmula (I) en ratas, ratones, perros y seres humanos I (\*) baja recuperación.

5 Tal como se observa en la tabla 10, el compuesto (I<sub>f</sub>) mostró una unión a proteínas plasmáticas muy alta.

#### 4.- INHIBICIÓN DE CYP:

10 El citocromo P450 (CYP) es una familia de enzimas que desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de los fármacos. Es importante evaluar el potencial de un compuesto para inhibir una enzima citocromo P450 específica, ya que la coadministración de compuestos puede dar como resultado que uno o ambos inhiban el metabolismo del otro.

15 Todas las incubaciones se realizaron en 250 µl de medio de reacción que contenía tampón fosfato de sodio/potasio 50 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, un sistema de regeneración de NADPH con NADP 1 mM, glucosa 6-fosfato 10 mM y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 1 U/ml, 0,5 mg de proteína/ml de microsomas hepáticos (HLM Xenotech), y un cóctel de sustrato compuesto por fenacetina para CYP1A2, diclofenaco para CYP2C9, S-mefenitoína para CYP2C19, bufuralol para CYP2D6, midazolam para CYP3A4, y testosterona para CYP3A4. Las concentraciones  
20 finales de sustrato en el medio de reacción fueron: fenacetina 10 µM, diclofenaco 10 µM, bufuralol 5 µM, S-mefenitoína 100 µM, midazolam 5 µM y testosterona 50 µM. Tras la incubación a 37 °C durante 25 min, las reacciones se detuvieron mediante la adición de acetonitrilo helado y la placa se centrifugó a 4000 g durante 60 min a 4 °C.

25 El compuesto de fórmula (I) usado en el ensayo de inhibición fue el compuesto (I<sub>f</sub>) a diferentes concentraciones (la figura 5 muestra el logaritmo de las diferentes concentraciones molares usadas frente al % de inhibición de la enzima CYP).

30 Se tomó el sobrenadante y se analizó mediante UPLC/EM/EM para la cuantificación de muestras. El equipo cromatográfico empleado fue un dispositivo UPLC QSM Waters Acquity.

Fase estacionaria: Acquity UPLC® BEHC18 1,7 µm (2,1 mm x 100 mm) de fase inversa (Waters)

Fase móvil: ácido fórmico al 0,1 % en agua/ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo

35 Flujo: 0,8 ml/min

Gradiente:

Tiempo	Agua	Acetonitrilo
0	100 %	0 %
0,1	100 %	0 %
0,5	2 %	98 %
0,75	2 %	98 %
1	100 %	0 %

40 Tabla 11: Gradiente de UPLC/ensayo de inhibición de CYP.

Los resultados para el compuesto ( $I_i$ ) se muestran en la tabla 12 a continuación, así como en las figuras 5A-F.

	% de inhibición (10 $\mu$ M)	Cl <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
CYP1A2	-5,3	>10
CYP2C9	-0,7	>10
CYP2C19	-18,8	>10
CYP2D6	-2,9	>10
CYP3A4 (midazolam)	-9,4	>10
CYP3A4 (testosterona)	-12,8	>10

Tabla 12: Ensayo de inhibición de CYP con los compuestos de fórmula (I).

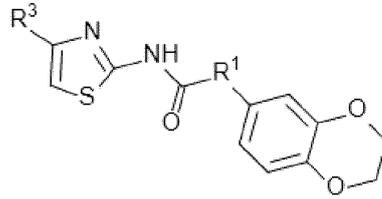
5

### Referencias

- 10 Álvarez-Coiradas E, Munteanu CR, Diaz-Saez L, Pazos A, Huber KVM, Loza MI, *et al.* Discovery of novel immunopharmacological ligands targeting the IL-17 inflammatory pathway. *Int Immunopharmacol.* Diciembre de 2020;89(parte A):107026.
- Akhter S, Chakraborty S, Moutinho D, *et al.* The human VGF-derived bioactive peptide TLQP-21 binds heat shock 71 kDa protein 8 (HSPA8) on the surface of SH-SY5Y cells. *PLoS One.* 21 de septiembre de 2017;12(9):e0185176.
- 15 Ashorobi D, Ameer MA, Fernandez R. Thrombosis. [actualizado el 29 de diciembre de 2021]. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.*
- Barrachina N, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, *et al.* The PI3K $\delta$  Inhibitor Idelalisib Diminishes Platelet Function and Shows Antithrombotic Potential. *Int J Mol Sci.* 24 de marzo de 2021;22(7):3304.
- 20 Dehring KA, Workman HL, Miller KD, Mandagere A, Poole SK. Automated robotic liquid handling/laser-based nephelometry system for high throughput measurement of kinetic aqueous solubility. *J Pharm Biomed Anal.* 15 de noviembre de 2004;36(3):447-56.
- 25 Lockyer S, Okuyama K, Begum S, Le S, Sun B, Watanabe T, Matsumoto Y, Yoshitake M, Kambayashi J, Tandon NN. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thromb Res.* 2006;118(3):371-80.
- 30 Onselaer M-B, Nagy M, Pallini C, Pike JA, Perrella G, Quintanilla LG, *et al.* Comparison of the GPVI inhibitors losartan and honokiol. *Platelets.* 2020;31(2):187-97.

REIVINDICACIONES

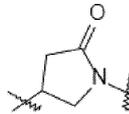
1. Compuesto de fórmula (I), o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



5

(I)

en donde R<sup>1</sup> se selecciona de un grupo que consiste en -CH<sub>2</sub>- o un grupo R<sup>2</sup>:



(R<sup>2</sup>),

10

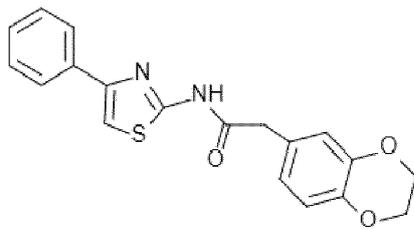
en donde R<sup>2</sup> está unido a la 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina por el átomo de nitrógeno del anillo de pirrolidin-2-ona; en donde R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en un fenilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo naftilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup> y un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo; y en donde R<sup>4</sup> es H o un halógeno;

15

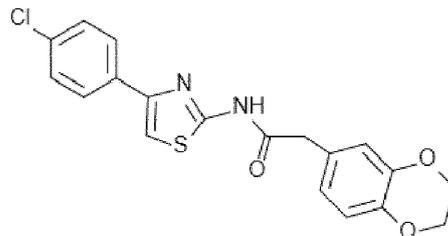
para uso como inhibidor de GPVI en la prevención y/o el tratamiento de trombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos seleccionadas de: ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio.

20

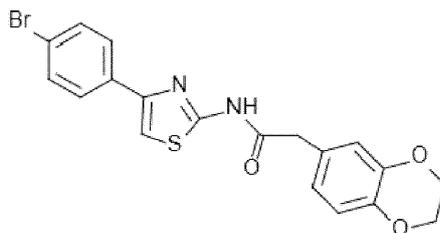
2. Compuesto de fórmula (I) para uso según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If y Ih:



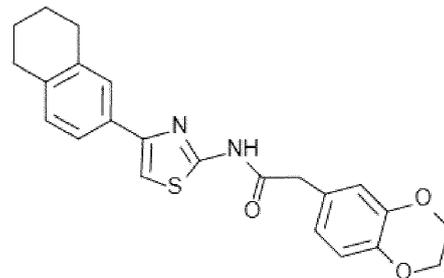
(Ia)



(Ib)

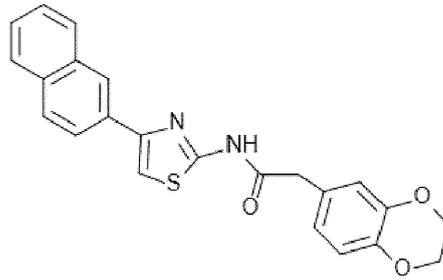


(Ic)

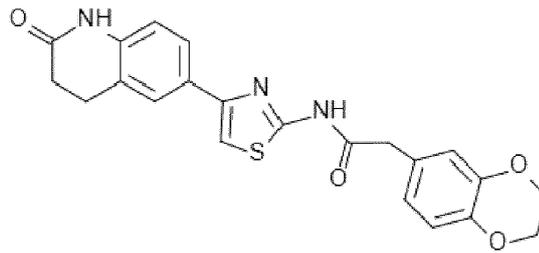


(Id)

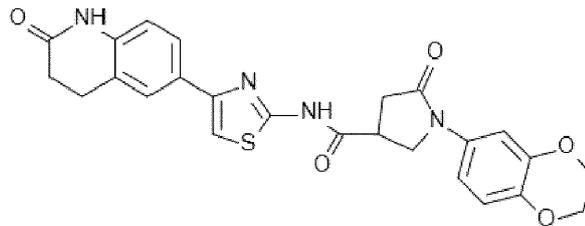
25



(Ie)



(Ii)



(Ih)

5

3. Compuesto de fórmula (I) para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicho compuesto de fórmula (I) se administra antes de, en combinación con, o posteriormente después de la administración de un agente terapéutico adicional para uso en la prevención y/o el tratamiento de trombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos seleccionadas de: ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio.

10

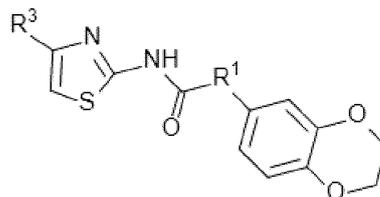
4. Compuesto de fórmula (I) para uso según la reivindicación 3, en donde dicho agente terapéutico adicional es un fármaco antiplaquetario.

15

5. Compuesto de fórmula (I) para uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en donde dicho agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor del receptor de difosfato de adenosina, un inhibidor de fosfodiesterasa, antagonista del receptor activado por proteasa 1, un inhibidor de glicoproteína IIB/IIIA, un inhibidor de la recaptación de adenosina y un inhibidor de tromboxano.

20

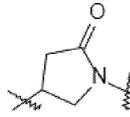
6. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



(I)

25

en donde R<sup>1</sup> se selecciona de un grupo que consiste en -CH<sub>2</sub>- o un grupo R<sup>2</sup>:

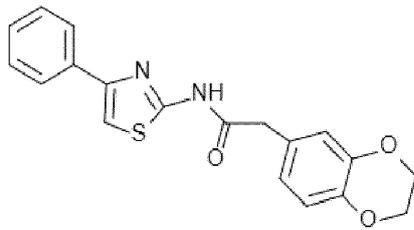


(R<sup>2</sup>),

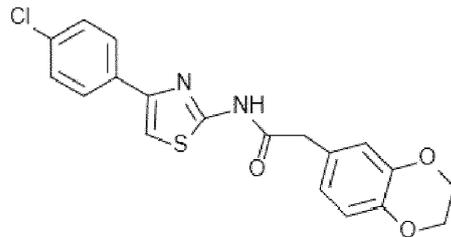
5 en donde R<sup>2</sup> está unido a la 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina por el átomo de nitrógeno del anillo de pirrolidin-2-ona; en donde R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en un fenilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo naftilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>, un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaft-6-ilo sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup> y un grupo 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ilo; y en donde R<sup>4</sup> es H o un halógeno;

10 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso como inhibidor de GPVI en la prevención y/o el tratamiento de trombosis, así como patologías asociadas con la formación de trombos seleccionadas de: ictus isquémico, aterosclerosis, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio.

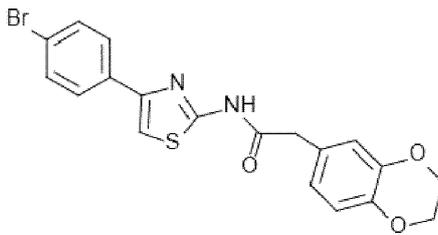
15 7. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 6, en donde dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If y Ih:



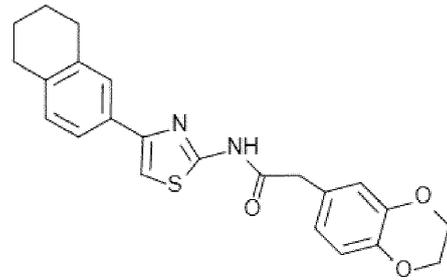
(Ia)



(Ib)

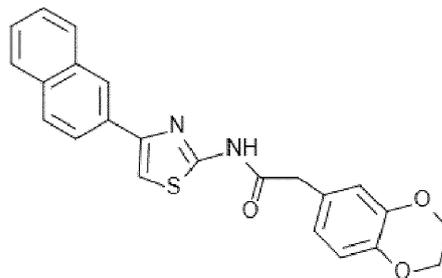


(Ic)

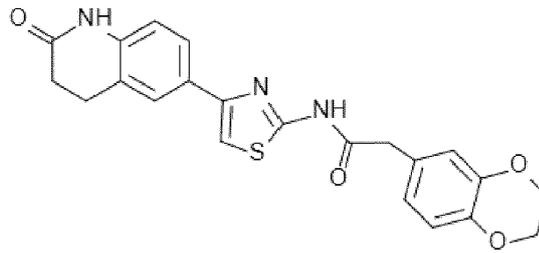


(Id)

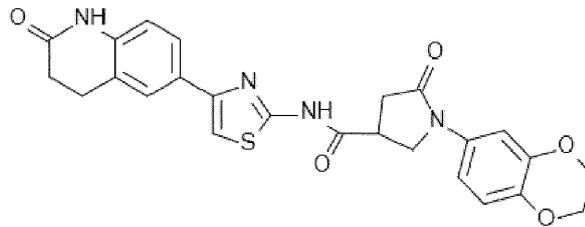
20



(Ie)



(I)

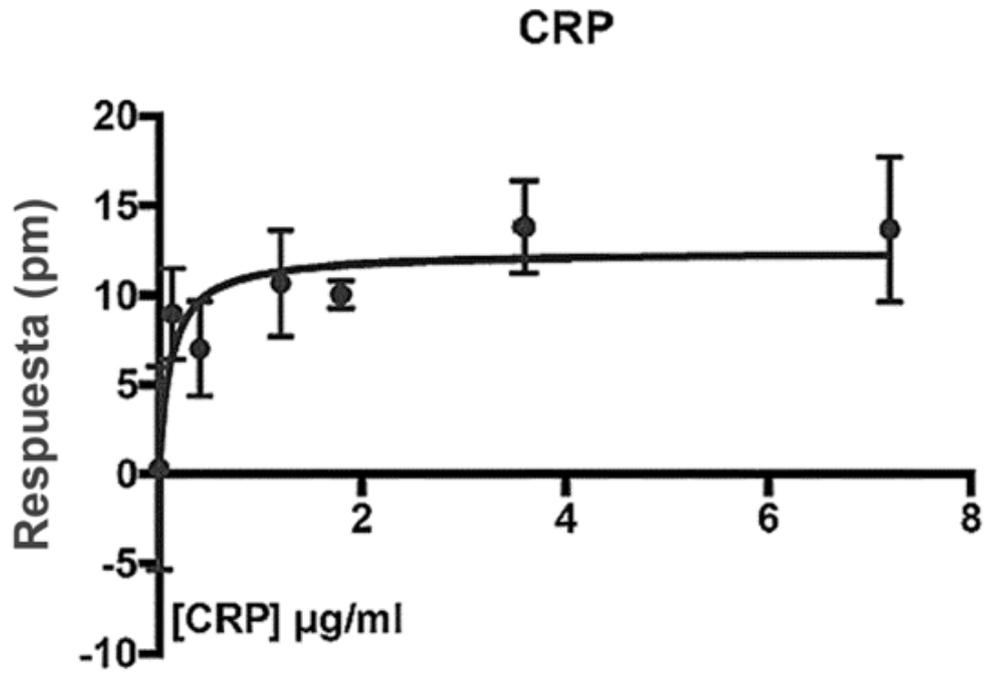


(I<sub>h</sub>)

- 5 8. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en donde dicha  
composición farmacéutica se administra antes de, junto con, o después de la administración de un agente  
terapéutico adicional para uso en la prevención y/o el tratamiento de trombosis.
- 10 9. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en donde dicha composición farmacéutica  
comprende además otro agente terapéutico adicional para uso en la prevención y/o el tratamiento de  
trombosis.
- 15 10. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en donde dicho agente  
terapéutico adicional es un fármaco antiplaquetario.
- 20 11. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde dicho agente  
terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor  
del receptor de difosfato de adenosina, un inhibidor de fosfodiesterasa, antagonista del receptor activado  
por proteasa 1, un inhibidor de glicoproteína IIB/IIIA, un inhibidor de la recaptación de adenosina y un  
inhibidor de tromboxano.
- 25 12. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde dicha  
composición farmacéutica se administra por vía oral, por vía transdérmica o por vía parenteral.
13. Uso de un compuesto de fórmula (I) en un sistema de ensayo *in vitro* para la detección de la activación  
plaquetaria mediada por GPVI.

FIGURA 1

A



B

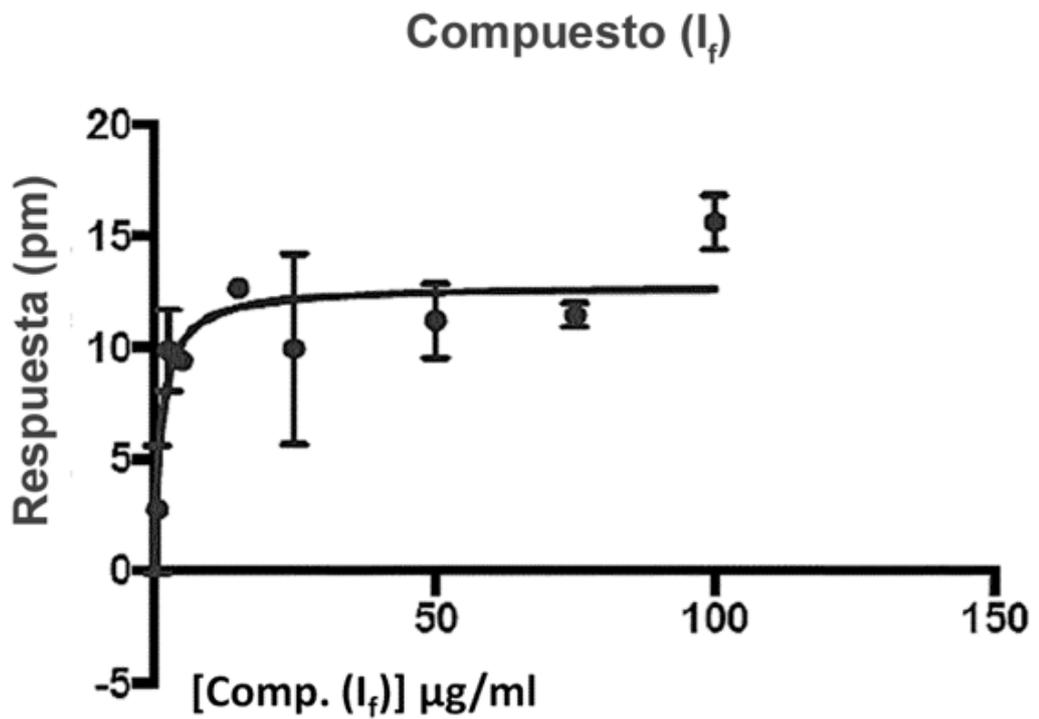
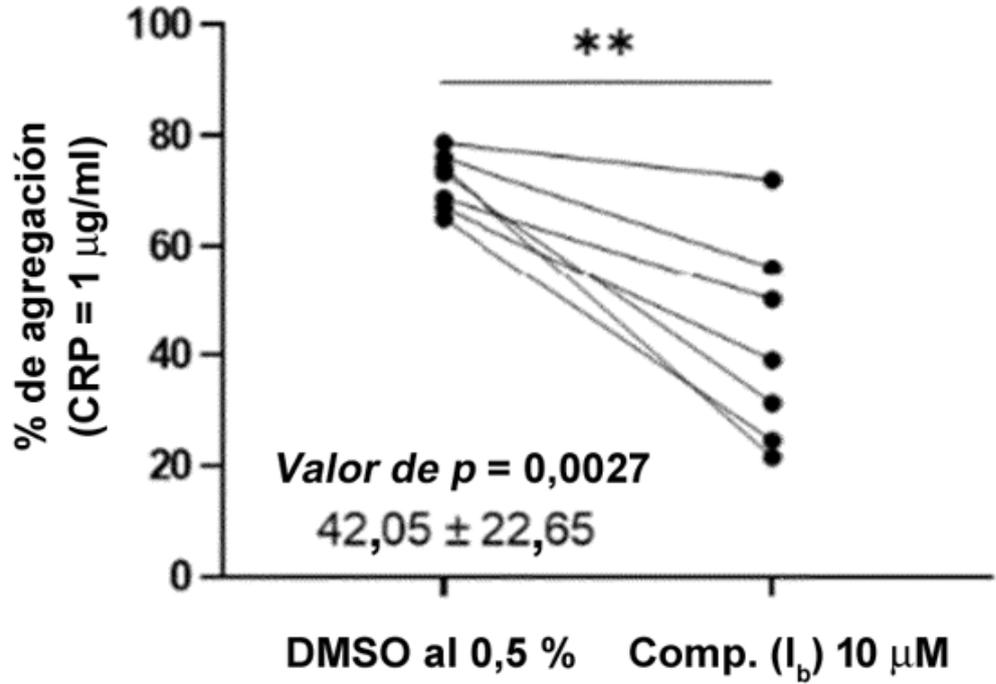


FIGURA 2

A



B

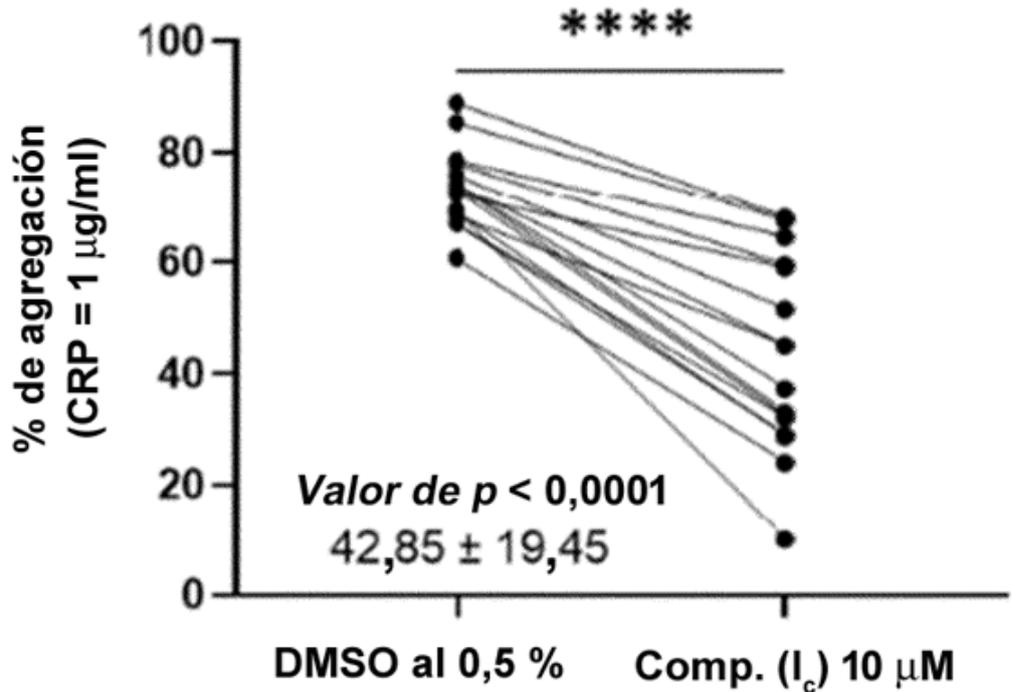


FIGURA 2 (cont.)

C

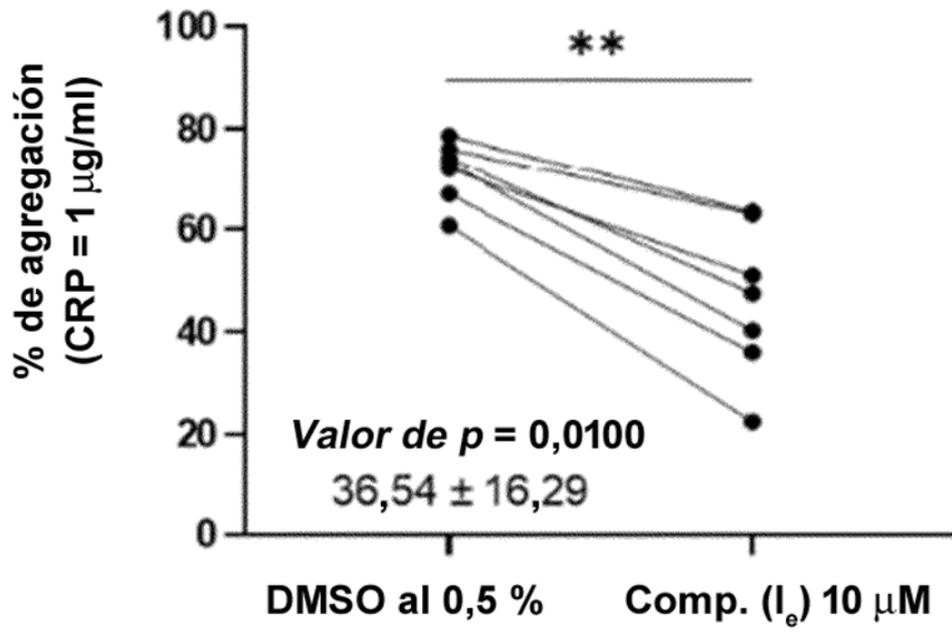


FIGURA 3

A

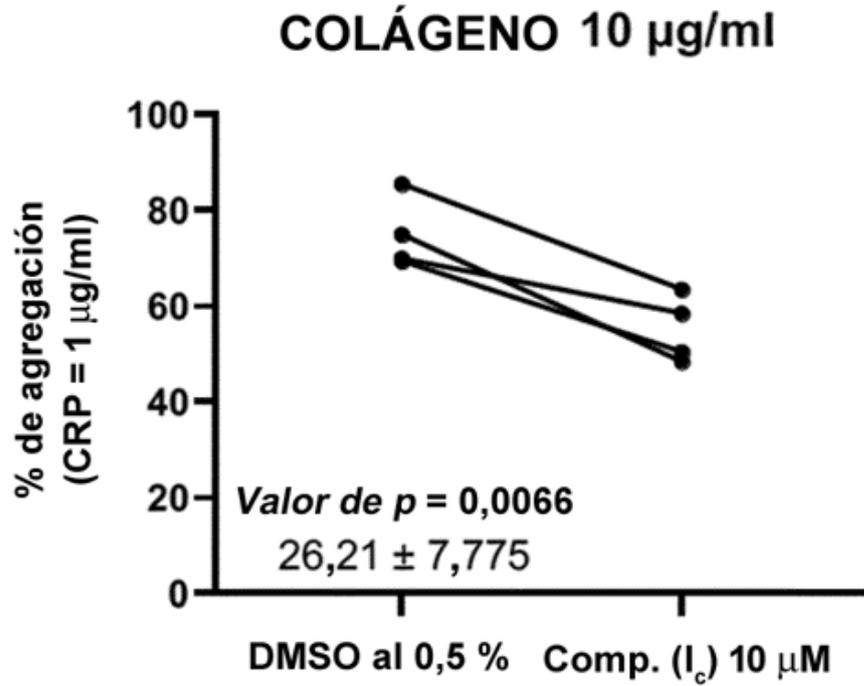


FIGURA 3 (cont.)

B

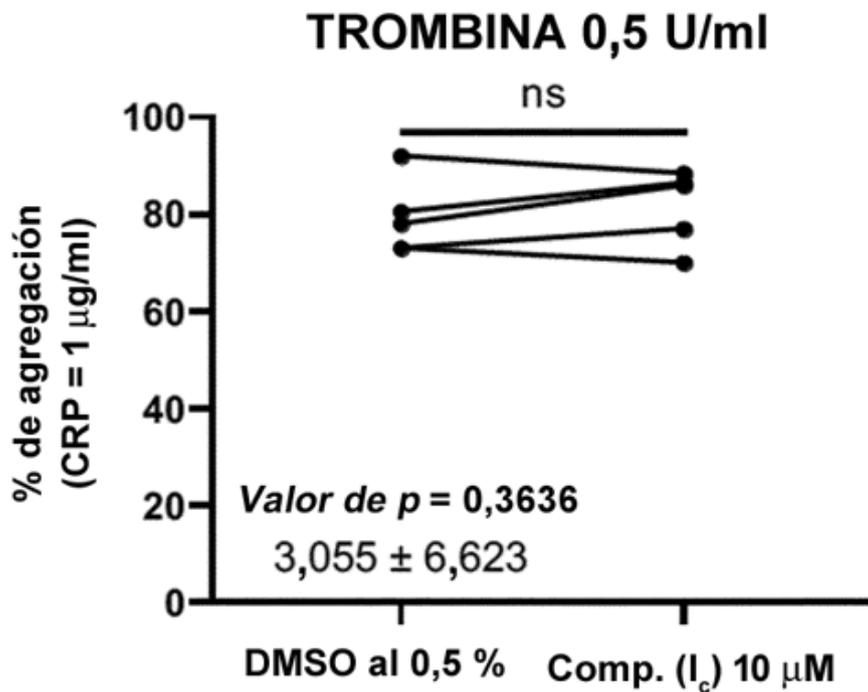


FIGURA 3 (Cont.)

C

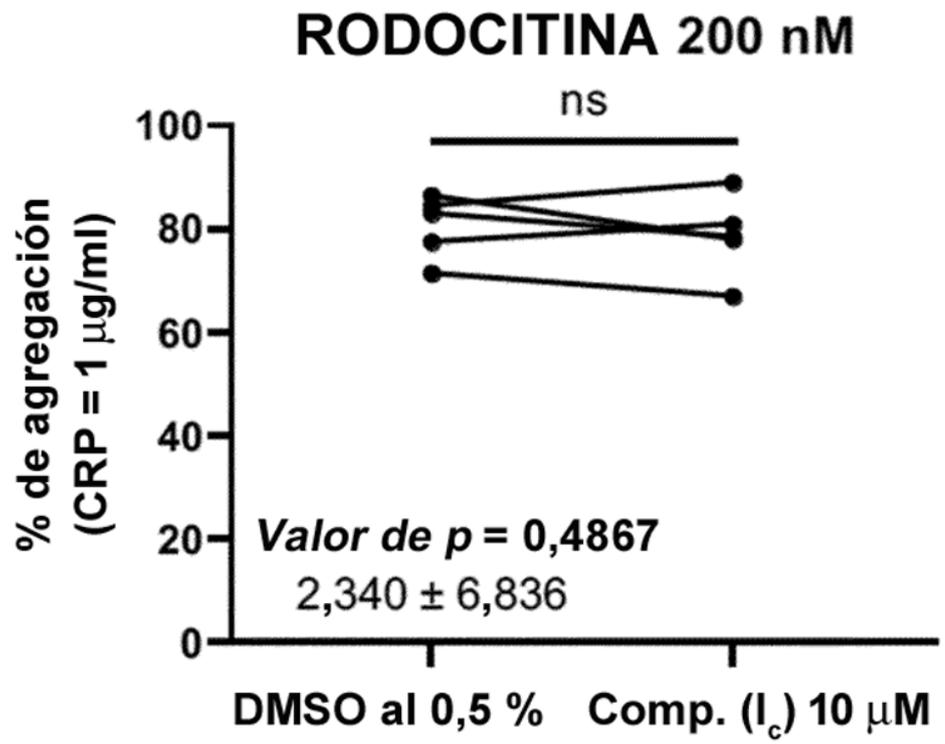
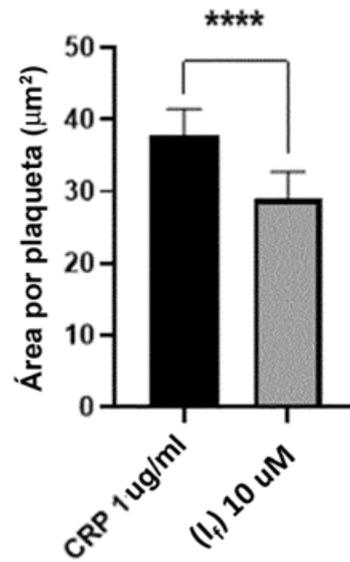
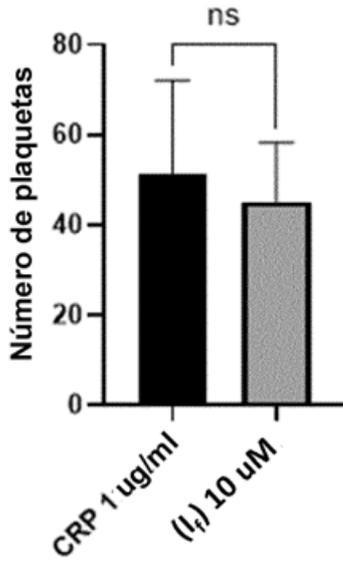


FIGURA 4

A1

NÚMERO DE PLAQUETAS (n=10)

ÁREA MEDIA DE PLAQUETAS (n=10)

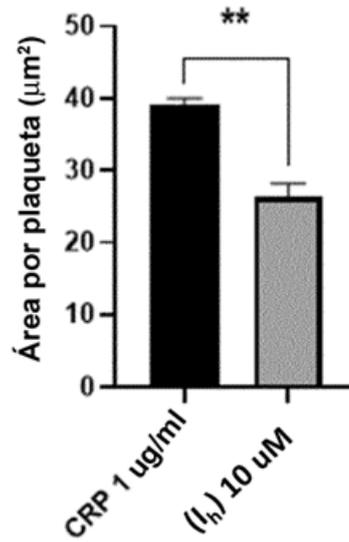
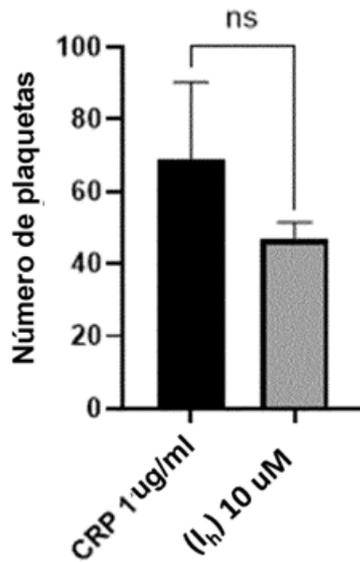


Condiciones

Condiciones

NÚMERO DE PLAQUETAS (n=4)

ÁREA MEDIA DE PLAQUETAS (n=4)



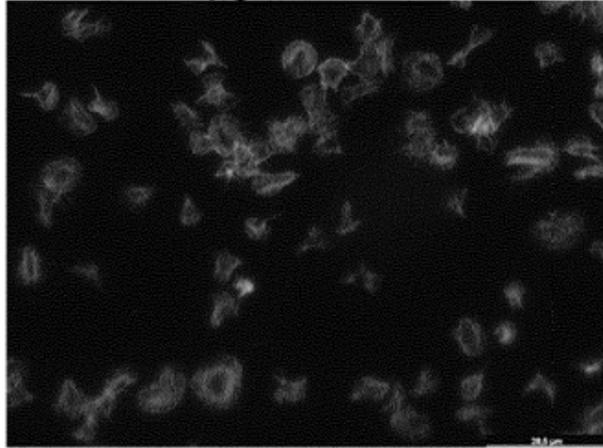
Condiciones

Condiciones

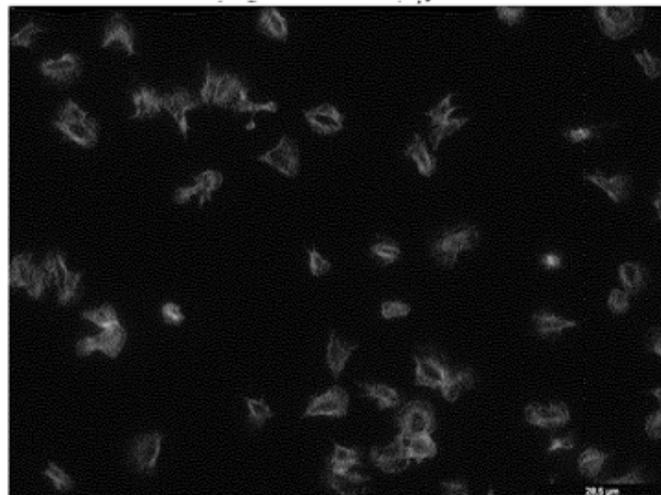
FIGURA 4 (cont.)

A2

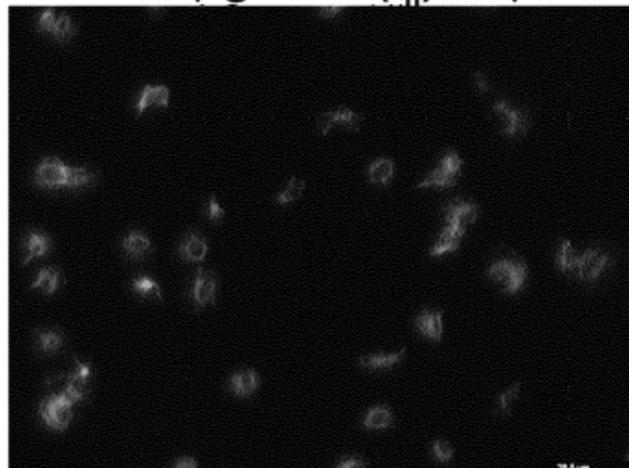
**CRP 1  $\mu\text{g/ml}$  + DMSO al 1 %**



**CRP 1  $\mu\text{g/ml}$  + (I<sub>f</sub>) 10  $\mu\text{M}$**



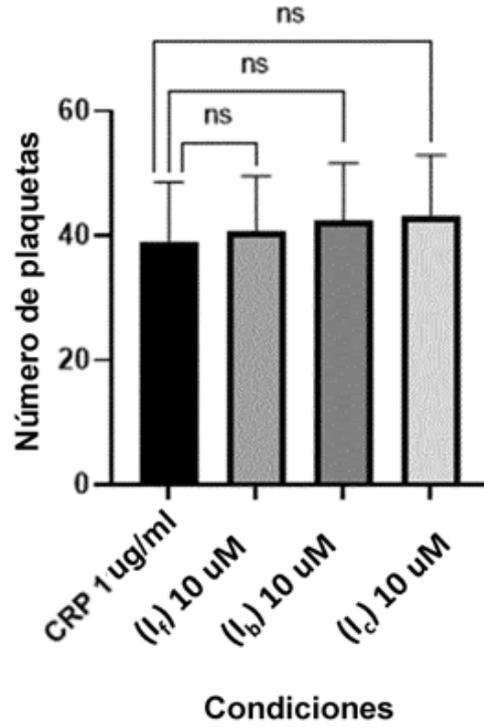
**CRP 1  $\mu\text{g/ml}$  + (I<sub>h</sub>) 10  $\mu\text{M}$**



B1

FIGURA 4 (cont.)

**NÚMERO DE PLAQUETAS (n=6)**



**ÁREA MEDIA DE PLAQUETAS (n=6)**

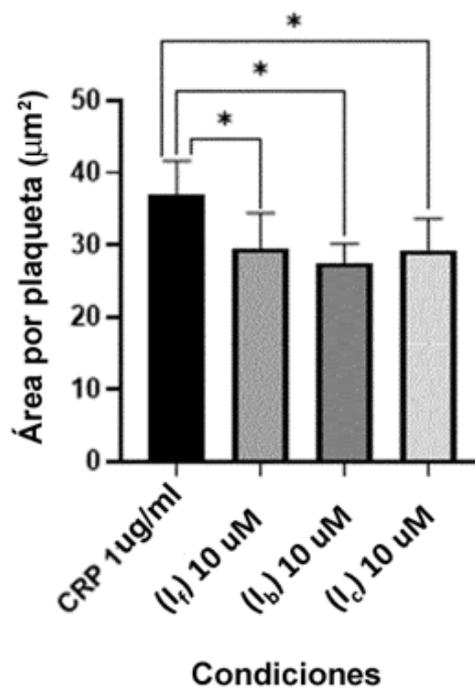
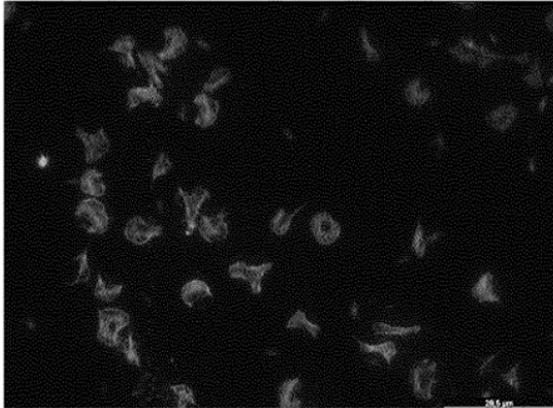


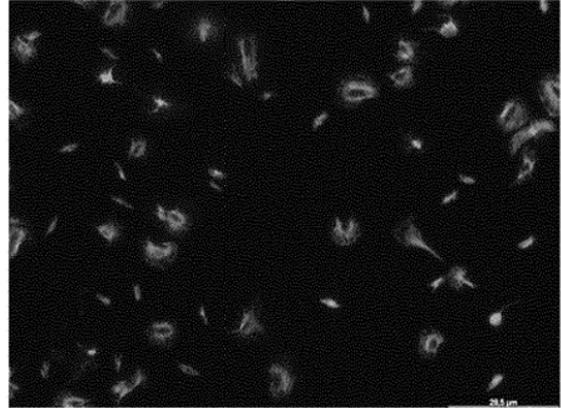
FIGURA 4 (cont.)

B2

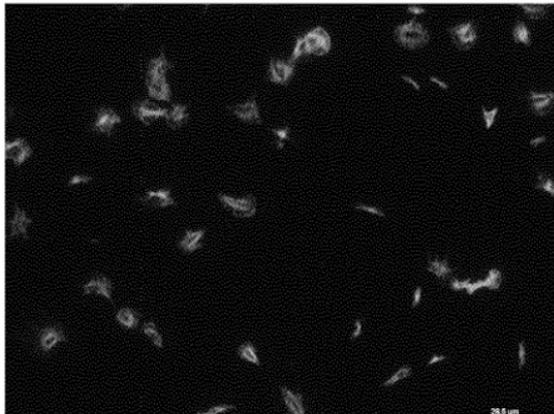
CRP 1  $\mu\text{g/ml}$  + DMSO al 1 %



CRP 1  $\mu\text{g/ml}$  + ( $I_f$ ) 10  $\mu\text{M}$



CRP 1  $\mu\text{g/ml}$  + ( $I_b$ ) 10  $\mu\text{M}$



CRP 1  $\mu\text{g/ml}$  + ( $I_c$ ) 10  $\mu\text{M}$

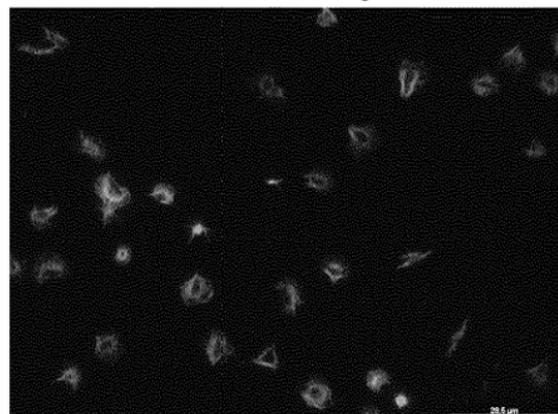


FIGURA 5

CYP1A2

A

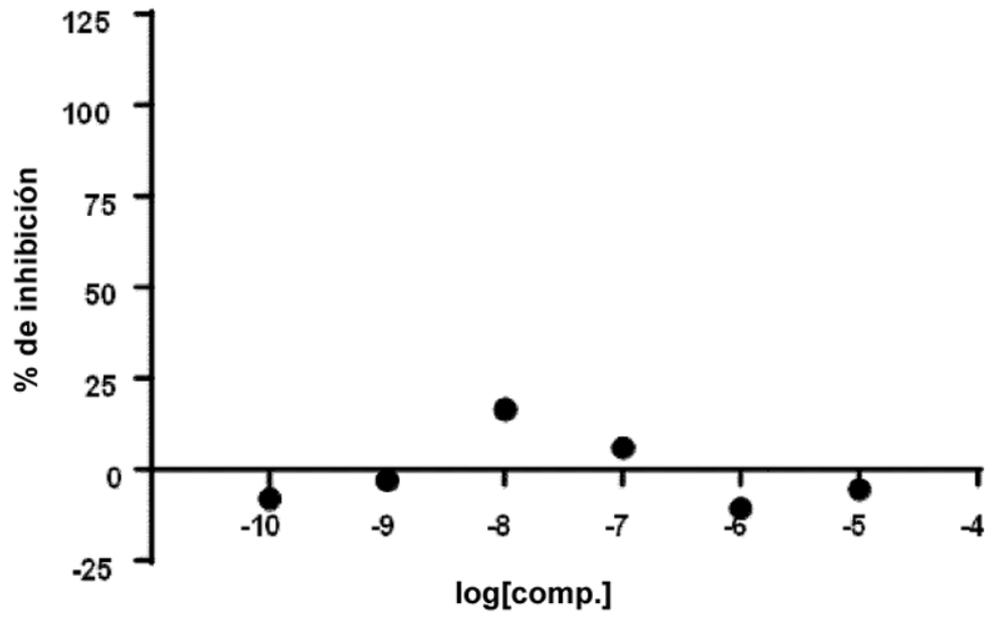
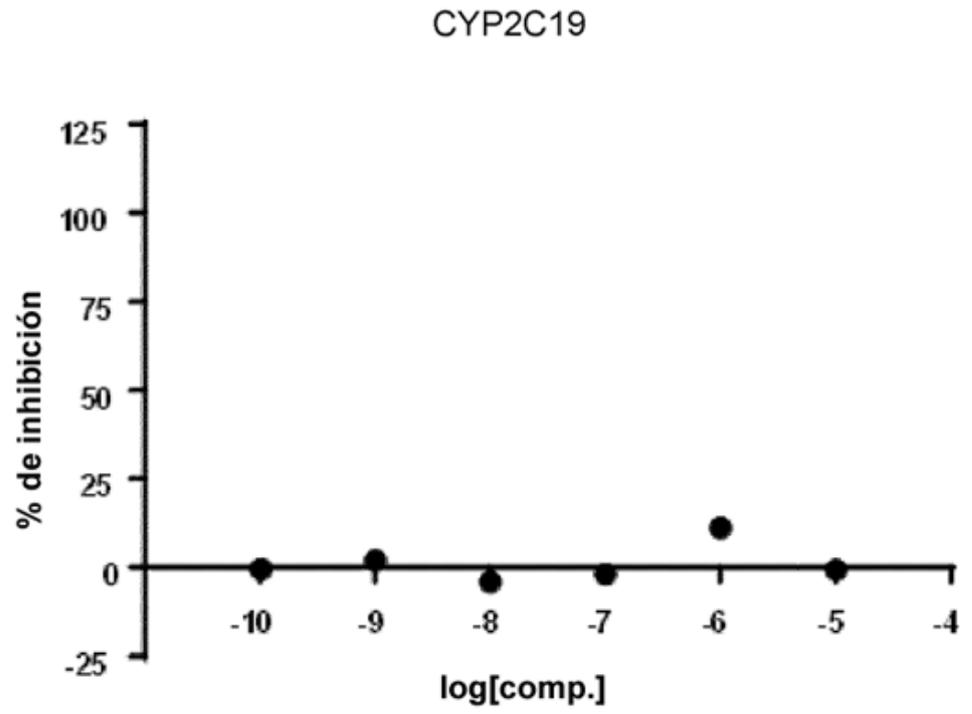


FIGURA 5 (cont.)

B



C

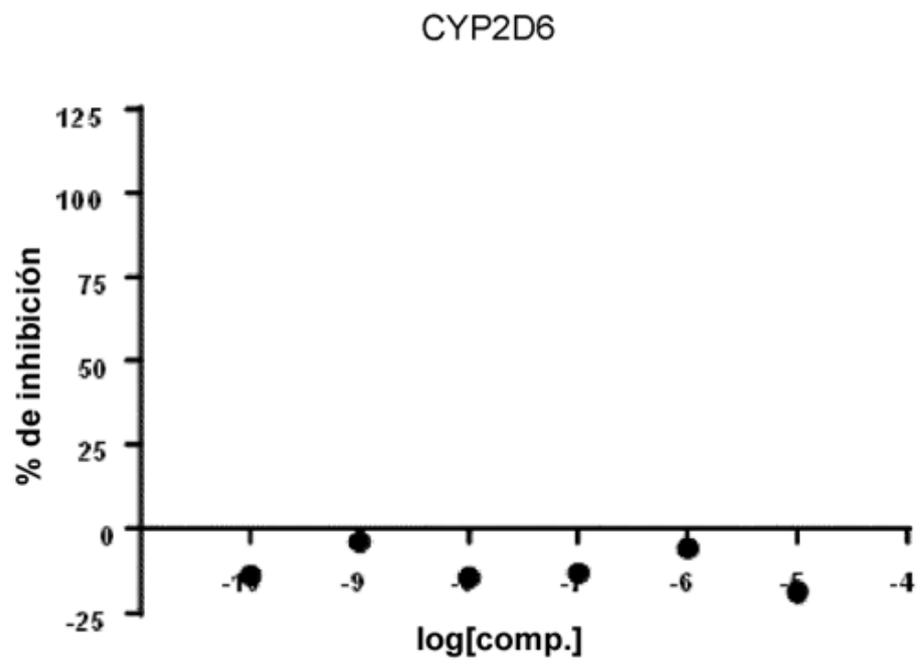
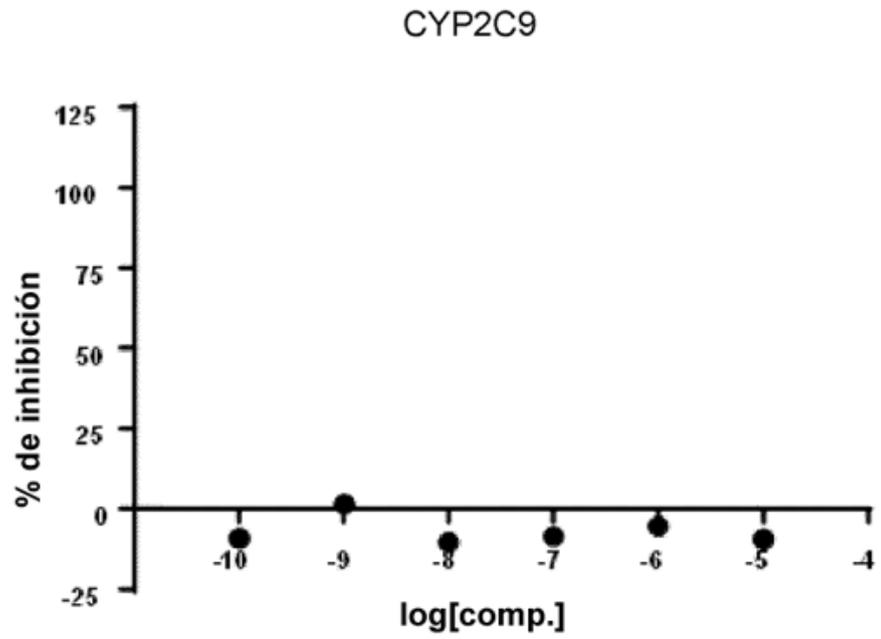


FIGURA 5 (cont.)

D



E

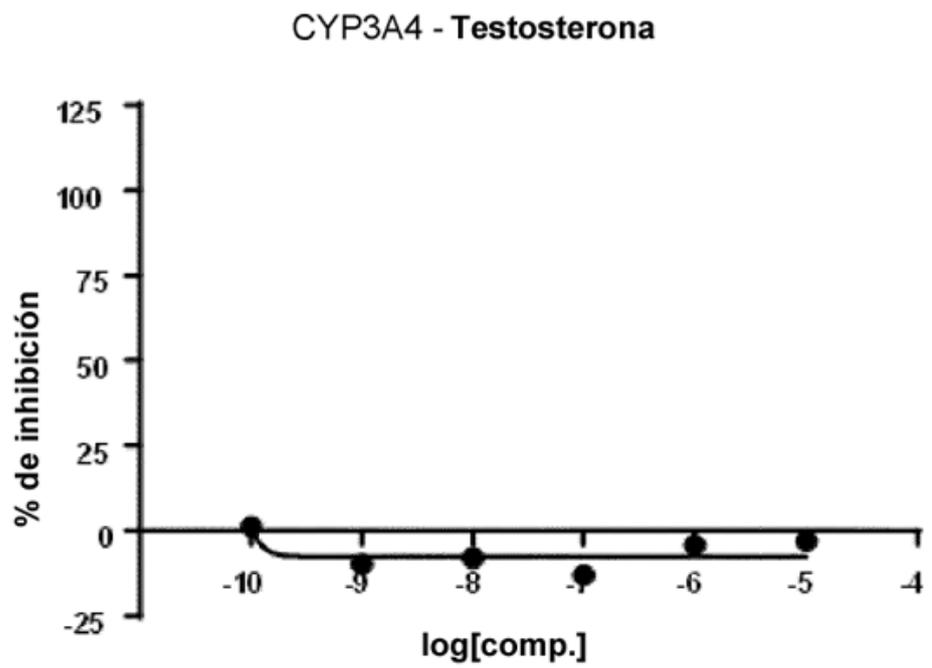
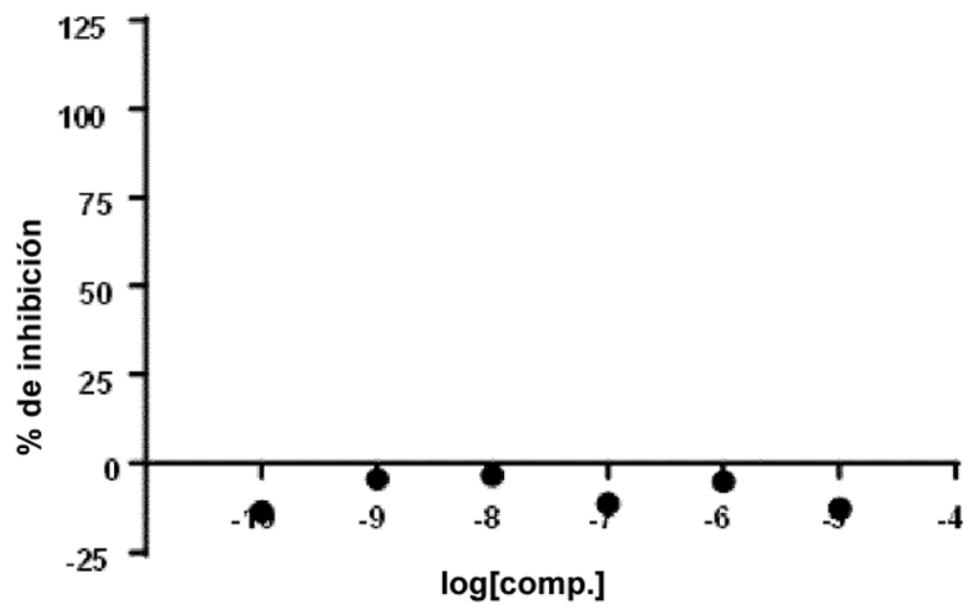


FIGURA 5 (cont.)

F

CYP3A4 - Midazolam



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION**

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos citados en la descripción**

- KR 20190026154 A [0008]

**Literatura no patente citada en la descripción**

- ALVAREZ-COIRADAS E ; MUNTEANU CR ; DIAZ-SAEZ L ; PAZOS A ; HUBER KVM ; LOZA MI et al. Discovery of novel immunopharmacological ligands targeting the IL-17 inflammatory pathway. *Int Immunopharmacol*, December 2020, vol. 89 (A), 107026 [0104]
- AKHTER S ; CHAKRABORTY S ; MOUTINHO D et al. The human VGF-derived bioactive peptide TLQP-21 binds heat shock 71 kDa protein 8 (HSPA8) on the surface of SH-SY5Y cells. *PLoS One*, 21 September 2017, vol. 12 (9), e0185176 [0104]
- Thrombosis. ASHOROBI D ; AMEER MA ; FERNANDEZ R. StatPearls. StatPearls Publishing, 29 December 2021 [0104]
- BARRACHINA N ; IZQUIERDO I ; HERMIDANOQUEIRA L et al. The PI3K $\delta$  Inhibitor Idelalisib Diminishes Platelet Function and Shows Antithrombotic Potential. *Int J Mol Sci*, 24 March 2021, vol. 22 (7), 3304 [0104]
- DEHRING KA ; WORKMAN HL ; MILLER KD ; MANDAGERE A ; POOLE SK. Automated robotic liquid handling/laser-based nephelometry system for high throughput measurement of kinetic aqueous solubility. *J Pharm Biomed Anal*, 15 November 2004, vol. 36 (3), 447-56 [0104]
- LOCKYER S ; OKUYAMA K ; BEGUM S ; LE S ; SUN B ; WATANABE T ; MATSUMOTO Y ; YOSHITAKE M ; KAMBAYASHI J ; TANDON NN. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thromb Res*, 2006, vol. 118 (3), 371-80 [0104]
- ONSELAER M-B ; NAGY M ; PALLINI C ; PIKE JA ; PERRELLA G ; QUINTANILLA LG et al. Comparison of the GPVI inhibitors losartan and honokiol. *Platelets*, 2020, vol. 31 (2), 187-97 [0104]