

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 198**

51 Int. Cl.:

A61K 31/121 (2006.01)

A61K 31/131 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

C07C 221/00 (2006.01)

C07C 225/06 (2006.01)

C07D 333/22 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010 E 10722643 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2437739**

54 Título: **Tratamiento contra la glomerulonefritis**

30 Prioridad:

04.06.2009 GB 0909643

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

21.09.2015

73 Titular/es:

**AVEXXIN AS (100.0%)
Nordahl Bruns vei 2A
7052 Trondheim, NO**

72 Inventor/es:

**JOHANSEN, BERIT y
HUWILER, ANDREA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 546 198 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

Tratamiento contra la glomerulonefritis

5 La presente invención se refiere al uso de determinadas cetonas de cadena larga poliinsaturadas para el tratamiento de la glomerulonefritis y en particular a cetonas que tienen sustituyentes electroatrayentes en alfa a la funcionalidad carbonilo en dicho tratamiento.

10 La glomerulonefritis, conocida también como nefritis glomerular, abreviada GN, es una enfermedad renal caracterizada por inflamación de los glomérulos, o pequeños vasos sanguíneos en los riñones. Puede presentarse con hematuria y/o proteinuria aislada o como un síndrome nefrótico, insuficiencia renal aguda, o insuficiencia renal crónica. La glomerulonefritis se clasifica en varios modelos patológicos diferentes, que se agrupan ampliamente en tipos no proliferativos o proliferativos. Diagnosticar el modelo de GN es importante debido a que el resultado y tratamiento difiere en diferentes tipos.

15 Las causas primarias de las glomerulonefritis son aquellas que son intrínsecas al riñón, mientras que las causas secundarias se asocian con determinadas infecciones (producidas por patógenos bacterianos, víricos o patógenos parásitos) fármacos, trastornos sistémicos (SLE, vasculitis) o cánceres.

20 El glomérulo es una red vascular única con tres tipos especializados de células: la célula endotelial, la célula mesangial y la célula epitelial visceral. Las células mesangiales (MC) sirven a numerosas funciones en el capilar glomerular renal incluyendo de soporte estructural de la cresta capilar, modulación de la hemodinámica glomerular y función fagocítica que permite la eliminación de macromoléculas e inmunocomplejos. La proliferación de MC es una característica notable de la enfermedad glomerular que incluye la nefropatía de IgA, la glomerulonefritis membranoproliferativa, nefritis por lupus, y nefropatía diabética.

25 La reducción de la proliferación de MC en los modelos de enfermedad glomerular mediante tratamiento con, por ejemplo, una dieta baja en proteínas ha mostrado producir la expansión de la matriz extracelular y cambios glomeruloescleróticos. Los inhibidores de la proliferación de MC pueden por tanto ofrecer oportunidades terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad glomerular proliferativa.

30 La glomerulonefritis proliferativa mesangial es una forma de glomerulonefritis que implica la inflamación en los glomérulos de los riñones. Las células mesangiales que son parte de los capilares glomerulares aumentan de tamaño dando lugar a que los glomérulos tengan una apariencia grumosa. El trastorno produce usualmente síndrome nefrótico que representa una pérdida de proteínas en la orina. Puede estar presente como glomerulonefritis aguda, crónica o rápidamente progresiva y puede progresar a insuficiencia renal crónica.

35 Se sabe que la proliferación de MC está inhibida por una variedad de fármacos farmacológicos, por ejemplo, inhibidores contra la enzima que convierte la angiotensina (ACE), quinasas dependientes de ciclina (CDK), factor de crecimiento derivado de plaquetas y otros.

40 El glomérulo tiene también potencial para expresar algunas isoformas de sintasas del óxido nítrico (NOS). La inducción de NOS inducibles se produce como parte de una respuesta inicial rápida a la lesión inmune en una glomerulonefritis. Mientras que el papel de NO generado por NOS en el glomérulo está todavía poco claro, algunos estudios han demostrado que la inhibición de NO puede alterar el nivel de proteinuria y la infiltración de leucocitos y otras manifestaciones de lesión tales como trombosis, proliferación y producción de matriz.

45 Parece evidente que la reducción de NO contribuirá a la mejora de la proliferación mesangial y ofrece por tanto el alivio de los síntomas de la glomerulonefritis.

50 Los presentes inventores buscan nuevos tratamientos para la GN y las dolencias relacionadas. Como se ha señalado anteriormente, los tratamientos propuestos actualmente pueden estar basados en inhibidores de la enzima que convierte la angiotensina (ACE) tales como lisinopril y compuestos similares. Estos inhibidores reducen la tensión arterial, una característica común a todos los fármacos antihipertensores, pero que poseen actividad inhibidora o proliferación de MC intrarrenal, y se observa también una proteinuria menor. Otros tratamientos incluyen el uso de antagonistas de CDK2 o antagonistas del calcio.

55 Los presentes inventores han considerado que los compuestos reivindicados en el presente documento, algunos de los cuales son nuevos, otros conocidos, tienen potencial en el tratamiento de dolencias proliferativas en general y glomerulonefritis en particular. Los inventores han encontrado que una determinada clase de compuestos basados en moléculas de ácidos grasos insaturados de cadena larga son útiles en el tratamiento de la glomerulonefritis.

60 Se han descrito antes algunos de los compuestos propuestos para el uso en la presente invención, por ejemplo, en el documento EP-A-1469859, pero solo existen en el contexto del tratamiento de la psoriasis. Los presentes inventores han considerado que estos compuestos y otros tienen utilidad también en el tratamiento de la glomerulonefritis u otras enfermedades proliferativas.

De esta manera, vistos desde un aspecto de la invención, un compuesto de fórmula (I)



- 5 (en la que R es un hidrocarburo C_{10-24} insaturado que puede transportar hasta tres sustituyentes, comprendiendo dicho grupo hidrocarburo al menos 4 enlaces dobles no conjugados;
L es un grupo de enlace que forma un puente de 1 a 5 átomos entre el grupo R y el carbonilo CO, en el que L comprende al menos un heteroátomo, y
X es CHal_3) o una de sus sales
10 Para uso en el tratamiento de la glomerulonefritis.

Vista desde otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar la glomerulonefritis que comprende administrar a un animal, preferentemente a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

15 Vista desde otro aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales como se ha descrito anteriormente en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar la glomerulonefritis.

20 Descripción detallada

La presente invención implica el uso de compuestos de fórmula (I) o una de sus sales en el tratamiento de la glomerulonefritis y las dolencias relacionadas. La glomerulonefritis es una enfermedad renal caracterizada por la inflamación de los glomérulos.

25 El grupo R comprende preferentemente 5 a 9 dobles enlaces, preferentemente 5 u 8 dobles enlaces, por ejemplo 5 a 7 dobles enlaces tales como 5 o 6 dobles enlaces. Estos enlaces no deben estar conjugados. Se prefiere también que los dobles enlaces no se conjuguen con la funcionalidad carbonilo.

30 Los dobles enlaces presentes en el grupo R pueden estar en configuración cis o trans, se prefiere sin embargo que la mayoría de los dobles enlaces presentes (es decir, al menos un 50%) estén en configuración cis. En las realizaciones ventajosas adicionales, todos los dobles enlaces en el grupo R están en la configuración cis o todos los dobles enlaces están en la configuración cis excepto el doble enlace más próximo al grupo carbonilo que puede estar en la configuración trans.

35 El grupo R puede tener entre 10 y 24 átomos de carbono, preferentemente 12 a 20 átomos de carbono, especialmente 17 a 19 átomos de carbono.

La estructura del grupo R contiene solo átomos de carbono.

40 El grupo R puede transportar hasta tres sustituyentes, seleccionados, por ejemplo entre halo, alquilo C_{1-6} , por ejemplo, metilo, alcoxi C_{1-6} . Si están presentes, los sustituyentes son preferentemente no polares, y pequeños, por ejemplo, un grupo metilo. Se prefiere sin embargo, si el grupo R sigue estando no sustituido.

45 El grupo R es preferentemente lineal, deriva preferentemente de una fuente natural tal como un ácido o éster graso de cadena larga. En particular, el grupo R puede derivarse de AA, EHA o DHA.

El grupo de unión L proporciona un grupo puente de 1 a 5 átomos en la estructura, preferentemente 2 a 4 átomos en la estructura entre el grupo R y el carbonilo. Los átomos en la estructura del enlazador comprenden heteroátomos tales como N, O, S, SO, SO_2 .

50 Los componentes preferidos del grupo de unión son $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{alquilo } \text{C}_{1-6})-$, $-\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_{1-6})-$, $-\text{NH}-$, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CO}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$ que se pueden combinar entre sí en cualquier orden (químicamente significativo) para formar el grupo de unión. De esta manera, utilizando dos grupos metileno y un grupo S, se forma el enlazador $-\text{SCH}_2\text{CH}_2-$.

El grupo de unión L contiene al menos un heteroátomo en la estructura. Se prefiere que el primer átomo de la estructura del grupo de unión unido al grupo R sea un heteroátomo o grupo de heteroátomos.

60 Se prefiere mucho si el grupo de unión L contiene al menos un enlace $-\text{CH}_2-$ en la estructura. Idealmente, los átomos del grupo de unión adyacente al carbonilo son $-\text{CH}_2-$.

Se prefiere que el grupo L (dependiendo del tamaño del grupo L) proporcione un heteroátomo o grupo de heteroátomos situados en posición α , β , γ , o δ al carbonilo, preferentemente β o γ al carbonilo. Preferentemente, el heteroátomo es O, N o S o un derivado de azufre tal como SO.

Los grupos de unión muy preferidos son por tanto -NH₂CH₂-, -NH(Me)CH₂-, -SCH₂-, -SOCH₂-, -COCH₂-

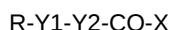
El modelo de sustitución es preferentemente tal que los sustituyentes R y carbonilo están en posición alfa, gamma entre sí (es decir, 1,3 o 2, 4 o 3, 5-dividido).

Para evitar la duda, se acentúa que el puente de los átomos 1 a 5 debe contarse como la ruta más corta desde el inicio del enlazador al carbonilo.

Grupos de unión muy preferidos son SCH₂, NHCH₂, y N(Me)CH₃.

El grupo X es CHal₃, en el que Hal representa un halógeno, por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo, especialmente CF₃.

De esta manera, los compuestos preferidos de fórmula (I) son aquellos de fórmula (I')



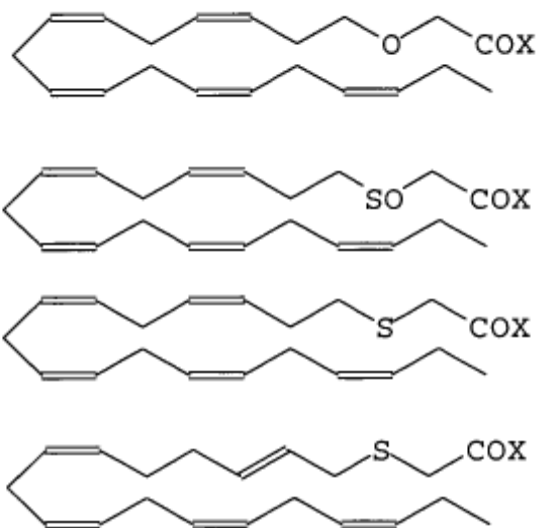
en el que R y X son como se ha definido anteriormente en el presente documento;

Y₁ se selecciona entre O, S, NH, N(alquilo C₁₋₆), SO o SO₂ e

Y₂ es (CH₂)_n o CH(alquilo C₁₋₆);

en el que n es 1 a 3, preferentemente 1.

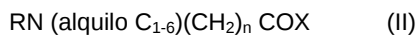
Se representan a continuación los compuestos preferidos (conocidos) para uso en la invención.



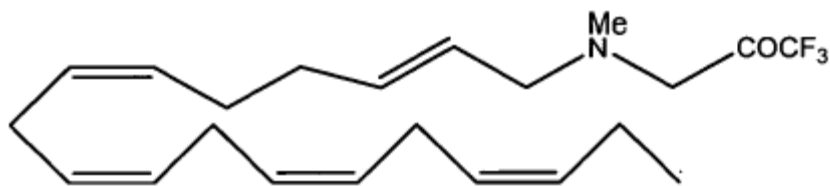
Determinados compuestos son nuevos y forman un aspecto adicional de la invención.

Los compuestos adicionales que son nuevos incluyen los compuestos

RN (alquilo C₁₋₆)COX. Vista de esta manera. Desde otro aspecto, la invención proporciona un Compuesto de fórmula

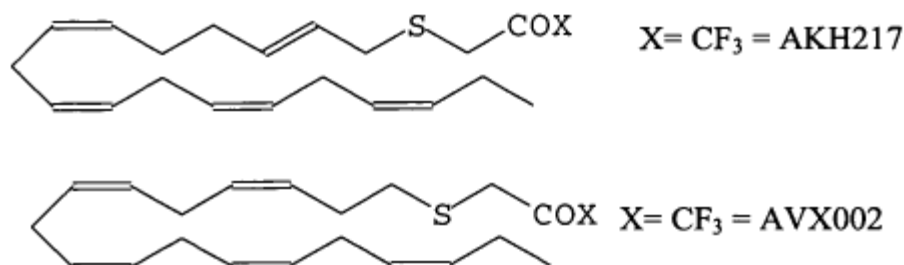


donde R, n y X son como se ha definido anteriormente en el presente documento, especialmente el compuesto:



Vista desde otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquier nuevo compuesto que se ha definido anteriormente en el presente documento en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Los siguientes compuestos son muy preferidos para uso en la invención:



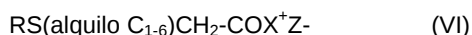
10 Cuando sea posible, los compuestos de la invención se pueden administrar en forma de sal, solvato, profármaco o éster, especialmente en forma de sal. Preferentemente, sin embargo, no se usa dicha forma.

Normalmente, una sal farmacéuticamente aceptable puede prepararse fácilmente utilizando un ácido deseado. La sal puede precipitar desde una solución y recogerse mediante filtración o puede recuperarse mediante evaporación del disolvente. Por ejemplo, puede añadirse una solución acuosa de un ácido tal como ácido clorhídrico a una suspensión acuosa de un compuesto de fórmula (I) y la mezcla resultante evaporarse hasta sequedad (liofilizarse) para obtener la sal de adición de ácido como un sólido. Alternativamente, un compuesto de fórmula (I) puede disolverse en un disolvente adecuado, por ejemplo, un alcohol tal como isopropanol, y se puede añadir el ácido en el mismo disolvente u otro disolvente adecuado. La sal de adición de ácido resultante puede a continuación precipitarse directamente, o por adición de un disolvente menos polar tal como diisopropil éter o hexano, y aislarse mediante filtración.

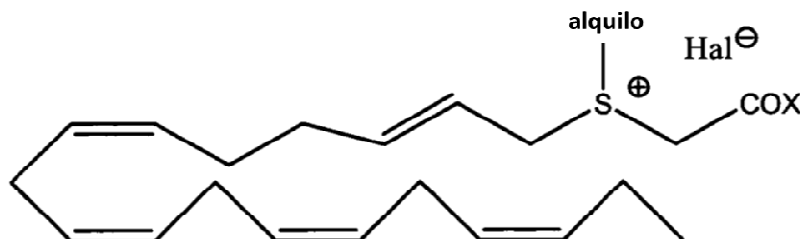
Se forman sales de adición adecuadas a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos adecuados que forman sales no tóxicas y los ejemplos son clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, fosfato, hidrogenofosfato, acetato, trifluoroacetato, maleato, malato, fumarato, lactato, tartrato, citrato, formiato, gluconato, succinato, piruvato, oxalato, oxaloacetato, trifluoroacetato, sacarato, benzoato, alquil o aril sulfonatos (por ejemplo, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato o p-tolueno sulfonato) e isetionato. Los ejemplos representativos incluyen sales de trifluoroacetato y formiato, por ejemplo, las sales de bis o tris trifluoroacetato y las sales de mono o diformiato, en particular, la sal de tris o bis trifluoroacetato y la sal de monoformiato.

30 En una realización adicional muy preferida, el compuesto de la invención es una sal de sulfonio. En dicho compuesto, un átomo de azufre en la estructura de la molécula, por ejemplo, en el grupo enlazador, se funcionaliza para transportar un grupo alquilo C_{1-6} . Esto se puede conseguir a través de una reacción con haluro de alquilo, por ejemplo, yoduro de metilo. Los iones haluro forman el contraión de la sal.

35 En una realización preferida adicional, la invención proporciona por tanto una sal de sulfonio de un compuesto de fórmula (I). Preferentemente el compuesto es de fórmula (VI)



40 donde R y X son como se ha definido anteriormente en el presente documento y Z es un contraión, por ejemplo, el compuesto



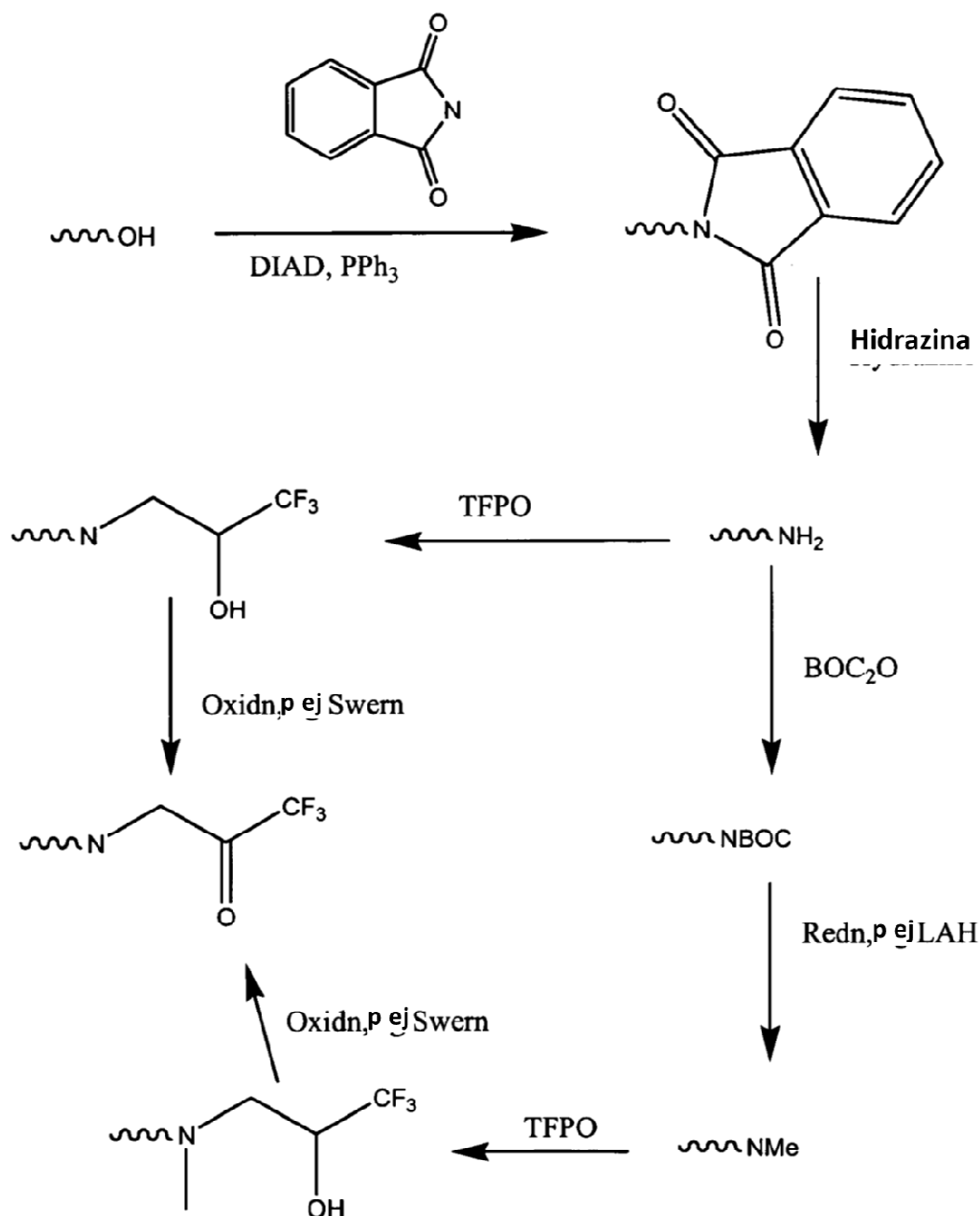
45 Los compuestos de fórmula (I) pueden fabricarse utilizando rutas sintéticas químicas conocidas. Es conveniente comenzar la síntesis a partir de los compuestos comercialmente disponibles ácido araquidónico (AA), EPA (ácido todo-Z-eicosa-5,8,11,14,17-pentanoico) o DHA (ácido todo-Z-docosa-4,7,10,13,16,19-hexanoico). La conversión de la funcionalidad ácido de estos compuestos en, por ejemplo, un grupo $-COCF_3$ puede conseguirse fácilmente, por

ejemplo, convirtiendo el ácido carboxílico en su correspondiente cloruro de ácido y haciendo reaccionar el mismo con anhídrido trifluoroacético en presencia de piridina.

La introducción de un heteroátomo en la cadena de carbono se consigue también fácilmente. De manera conveniente, por ejemplo, el ácido de partida se reduce a un alcohol y, si se requiere, se convierte al correspondiente tiol. A continuación puede hacerse reaccionar el tiol nucleófilo con un grupo tal como $\text{BrCH}_2\text{COCF}_3$ introduciendo por tanto el carbonilo y especies electroatrayentes. Se pueden encontrar protocolos sintéticos completos en J. Chem. Soc., Perkin Trans 1, 2000, 2271-2276 o J. Immunol., 1998, 161, 3421.

Cuando la estructura de la molécula contiene un átomo de nitrógeno, se requiere una síntesis alternativa. Se puede conseguir la formación de un alcohol poliinsaturado utilizando protocolos que se proporcionan en el papel Perkin Trans anterior. Posteriormente, la conversión de un alcohol $-\text{OH}$ a $-\text{NH}_2$ con, por ejemplo, ftalamida y la posterior reducción de la hidrazina permite la formación de un grupo $-\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COCF}_3$ mediante reacción con óxido de trifluoropropileno (TFPO) y la oxidación del hidroxilo a una cetona. A continuación se muestra esta reacción.

Se puede efectuar la metilación del nitrógeno antes de esta reacción mediante la formación de un grupo N-BOC y la reducción, por ejemplo, con hidruro de aluminio litio. La reacción con TFPO y la oxidación da como resultado el enlazador NMe- CH_2 .



Esto forma un aspecto adicional de la invención que proporciona por tanto un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (I) que comprende:

- 5 (I) convertir el compuesto R-OH a R-NH₂;
- (II) metilar opcionalmente el átomo N;
- (III) hacer reaccionar con TFPO; y
- (IV) oxidar el hidroxilo formado a una cetona.

10 Los compuestos de la invención se proponen principalmente para el uso en el tratamiento de, *entre otros*, glomerulonefritis. Aunque que los compuestos de la invención son generalmente de uso en el tratamiento de la glomerulonefritis, los compuestos son de particular utilidad en el tratamiento del tipo proliferativo de la enfermedad.

Por tratar o tratamiento se entiende al menos uno de:

- 15 (i). prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad que se desarrollan en un mamífero;
- (ii). Inhibir la enfermedad, es decir, detener, reducir o retrasar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de la misma o al menos un síntoma clínico o subclínico de la misma, o
- (iii). aliviar o atenuar uno o más de los síntomas clínicos o subclínicos de la enfermedad.

20 El beneficio a un sujeto que se va a tratar es tanto estadísticamente significativo como al menos perceptible al paciente o al médico. En general, una persona experta puede apreciar cuando se produce el "tratamiento".

La palabra "tratamiento" se usa también en el presente documento para cubrir el tratamiento profiláctico, es decir, tratar sujetos que están en riesgo de desarrollar una enfermedad en cuestión.

25 Los compuestos de la invención se pueden usar en cualquier sujeto animal, en particular un mamífero y de forma más particular en un ser humano o en un animal que sirven como un modelo para una enfermedad (por ejemplo, ratón, mono, etc.).

30 Para tratar una enfermedad, necesita administrarse una cantidad eficaz del principio activo a un paciente. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un animal para tratar un estado, trastorno o dolencia, es suficiente para efectuar dicho tratamiento. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, el peso, la condición física y la sensibilidad del sujeto y atenderá en última instancia al criterio del médico a cargo del

35 tratamiento.

Aunque es posible que, para uso en los métodos de la invención, se pueda administrar un compuesto de fórmula I como sustancia a granel, es preferible presentar el principio activo en una formulación farmacéutica, por ejemplo, en la que el agente está en premezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable seleccionado con respecto a

40 la ruta de administración prevista y a la práctica farmacéutica normalizada.

El término "transportador" se refiere a un diluyente, excipiente, y/o vehículo con el cual se administra un compuesto activo. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener combinaciones de más de un transportador. Dichos transportadores farmacéuticos son bien conocidos en la materia. Las composiciones

45 farmacéuticas pueden comprender también cualquier(cualesquiera) aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) suspensor(es), agente(s) de revestimiento, y/o agente(s) solubilizante(s) y así sucesivamente. Las composiciones pueden contener también otros componentes activos, por ejemplo, otros fármacos para el tratamiento de la glomerulonefritis.

50 Se apreciará que las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden estar en la forma de suspensiones, cápsulas o comprimidos administrados de forma oral, parenteral, transdérmica, para inhalación, sublingual, tópica, para implante, nasal, o entérica (o administrarse de formas diferentes a la mucosal), que se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones de la invención podrían formularse también como formulaciones

55 de nanopartículas.

Los compuestos de la invención pueden administrarse para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

60 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener de 0,01 a 99% en peso – por volumen del material activo.

Puede determinarse una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente invención mediante métodos conocidos en la materia. Las cantidades terapéuticamente eficaces dependerán de la edad y de la condición fisiológica general del paciente, la ruta de administración y la formulación farmacéutica utilizada. Las dosis

65 terapéuticas estarán generalmente entre aproximadamente 10 y 2000 mg/día y preferentemente entre

aproximadamente 30 y 1500 mg/día. Se pueden usar otros intervalos, incluyendo, por ejemplo, 50-500 mg/día, 50-300 mg/día, 100-200 mg/día.

La administración puede ser una vez al día, dos veces al día, o más a menudo, y puede disminuirse durante una fase de mantenimiento de la enfermedad o trastorno, por ejemplo, una vez cada segundo o tercer día en vez de cada día o dos veces al día. La dosis y la frecuencia de administración dependerán de los signos clínicos, que confirman el mantenimiento de la fase de remisión, con la reducción o ausencia de al menos uno o de forma más preferible más de un signo clínico de la fase aguda conocida por la persona experta en la materia.

Es ventajoso si el medicamento de la invención se toma por vía oral.

Los compuestos de la invención se pueden usar en el tratamiento de la glomerulonefritis y las enfermedades relacionadas. En particular, los compuestos de la invención se pueden usar para tratar la glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome nefrótico, insuficiencia renal crónica o aguda, proteinuria, hematuria, nefropatía por IgA, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefritis por lupus, nefropatía diabética, y glomeruloesclerosis,

Los compuestos de la invención se pueden usar para tratar la glomerulonefritis en combinación con otros compuestos farmacéuticos conocidos para dicho fin y esto forma un aspecto adicional de la invención. Otros compuestos farmacéuticos útiles incluyen corticoesteroides, fármacos inmunosupresores, agentes antihipertensivos y medicaciones diuréticas.

La invención se describe adicionalmente a continuación con referencia a los siguientes ejemplos y figuras no limitantes.

Descripción de las Figuras:

La Figura 1 muestra el efecto de los inhibidores de los ejemplos sobre la formación de PGE₂ estimulada por citoquinas en células mesangiales. Se estimularon células quiescentes tanto con DMEM (-), IL-1 β (1 nM), en ausencia (-) o presencia de las concentraciones indicadas de AKH-217 y AVX002. Se recogieron los sobrenadantes y se capturaron para la cuantificación de PGE₂ utilizando un ELISA. Los datos se expresan como % de PEG2 máxima estimulada con IL-1 β y son promedios $\pm$ S.D. (n=3).

La Figura 2 muestra el efecto de los inhibidores de los ejemplos en la proteína sPLA₂ estimulada con citoquinas (A) y la expresión del ARNm (B) y la actividad promotora en células mesangiales. Se estimularon células quiescentes tanto con DMEM (-) como con IL-1 β (1 nM) en ausencia (-) o presencia de AKH-217 (EtOH), vehículo control.

(A) Se capturaron sobrenadantes para la precipitación de proteínas y las proteínas precipitadas se separaron mediante SDS-PAGE y se sometieron a un análisis de transferencia Western utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra sPLA₂ de rata. Los datos muestran duplicados de un experimento representativo. (B) Se capturaron células para la extracción del ARN y se sometieron al análisis de la PCR cuantitativa de IIA-sPLA₂ de rata y ARN 18 S. Se calcularon los valores $\Delta\Delta Ct$ y los resultados se expresan como % de respuesta máxima estimulada por IL-1 β y son promedios $\pm$ S.D. (n=3).

(C). Se transfectaron las células con una construcción de un promotor sPLA₂ más un plásmido que codifica la luciferasa de Renilla. Tras la transfección, se estimularon las células durante 24 h con vehículo (-), IL-1 β (1nM), o IL-1 β más 10mM de AKH-217. Se calculó la actividad del promotor sPLA₂ y los resultados se expresan como unidades relativas de luciferasa (URL) y son promedios $\pm$ S.D. (n=3).

La Figura 3 muestra el efecto de los inhibidores de los ejemplos en la formación de NO estimulada por citoquinas en células mesangiales. Se estimularon células quiescentes tanto con DMEM (-), IL-1 β (1 nM; +), en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de AKH-217, AVX002, o AACOCF₃. Se recogieron los sobrenadantes y se capturaron para la cuantificación del óxido nítrico (NO) utilizando un ensayo de reacción Griess. Los datos se expresan como μ M de NO en el sobrenadante y son promedios $\pm$ S.D. (n=3).

La Figura 4 muestra el efecto de los inhibidores de los ejemplos sobre la proteína iNOS estimulada por citoquinas Y en la expresión del ARNm (B) y en la actividad promotora en células mesangiales. Se estimularon células quiescentes tanto con vehículo (DMEM), IL-1 β (1 nM), en ausencia (-) o presencia de las concentraciones indicadas (en μ M) de AVX001 y AVX002. EtOH, vehículo control. (A) Se capturaron células para la extracción de proteínas y se separaron cantidades iguales de proteína mediante SDS-PAGE y se sometieron al análisis por transferencia Western usando un anticuerpo policlonal contra iNOS a una dilución de 1:2000. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes que proporcionan resultados similares. (B). Se capturaron células para la extracción del ARN y se sometieron a análisis de la PCR cuantitativa de iNOS de rata y ARN 18 S. Se calcularon los valores $\Delta\Delta Ct$ y los resultados se expresan como % de la respuesta máxima de IL-1 β y son promedios $\pm$ S.D (n=3).

(C) Se transfectaron células con la construcción del promotor iNOS de rata más un plásmido que codificaba la luciferasa de Renilla. Tras la transfección, se estimularon las células con vehículo (-), IL-1 β (1nM), o IL-1 β más

10mM de AVX001. Se calculó la actividad del promotor iNOS y los resultados se expresan como unidades relativas de luciferasa (URL) y son promedios $\pm$ S.D. (n=3).

La Figura 5 muestra el efecto de los inhibidores de los ejemplos sobre la incorporación de [3 H] timidina en células mesangiales. Se estimularon células quiescentes durante 24h con vehículo (DMEM), o 100 μ M de ATP en ausencia (-) o presencia de las concentraciones indicadas de AVX001 o AVX002, en presencia de [3 H] timidina.

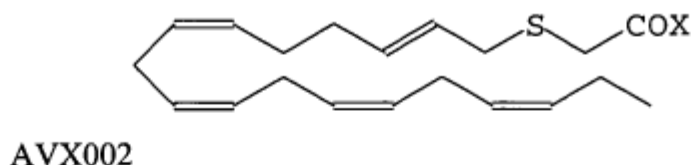
(B) Se estimularon células durante 24h con insulina (100 ng/ml) o IGF (50 ng/ml) en ausencia (-) o presencia de 10 μ M de AVX001 o AVX002, en presencia de [3 H] timidina. Se determinó la timidina incorporada en el ADN y se expresaron los resultados como % del control y son promedios $\pm$ S.D. (n=3)

La Figura 6 muestra el efecto de los inhibidores de los ejemplos sobre la actividad de NFkB estimulada por IL-1 β en células mesangiales. Se estimularon células quiescentes durante 30 minutos tanto con vehículo (DMEM), o IL-1 β (2nM) en ausencia (-) o presencia (+) de AVX001 or AVX002 (10 μ M, pretratados 2h). Posteriormente, los lisados celulares se separaron mediante SDS-PAGE y se sometieron a un análisis por transferencia Western utilizando un anticuerpo policlonal contra fosfo-p65 (NFkB) (panel superior), HuR como carga control (panel medio) y IkB (panel inferior). Los datos en la Fig 6^a muestran duplicados de algunos experimentos representativos. Las Figuras 6B y C muestran la evaluación densitométrica de NFkB y las bandas IkB.

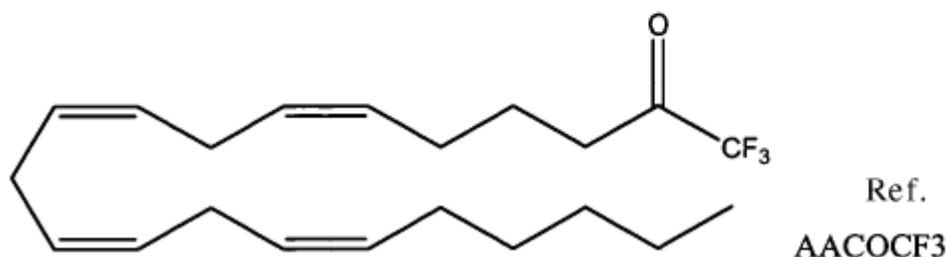
EJEMPLOS

Se han usado los siguientes compuestos en los Experimentos:

AKH-217/AVX001



X = CF₃



Estos compuestos se sintetizaron basándose en la Chem. Soc., Perkin Trans 1, 2000, 2271-2276.

Ejemplo 1

Efectos de inhibidores sobre la formación de PGE2 en células mesangiales renales de ratas

Los inventores han investigado el efecto de los inhibidores sobre la formación de PGE2 inducida por citoquinas en células mesangiales. La formación de PGE2 está muy inducida por la estimulación de células con la citoquina proinflamatoria IL-1 β . Esta inducción de PGE2 se reduce de manera dependiente de la dosis en presencia de

inhibidores. Se observaron los efectos máximos con 3-10 μ M de AKH-217 (AVX001) y el Compuesto B (AVX002) (Fig. 1).

Se ha mostrado previamente que la formación de PGE2 inducida por citoquinas en células mesangiales implica la activación de sPLA2 y cPLA2 (Pfeilschifter et al., 1993), los investigadores han investigado a continuación los efectos de los inhibidores anteriormente sobre la proteína sPLA2 y las expresiones del ARNm. Como se observa en la Fig. 2, AKH-217 ha sido capaz de reducir la expresión y la secreción de la proteína IIA-sPLA2 (Fig. 2A), pero también la expresión del ARNm de IIA-sPLA2 (Fig. 2B). Este efecto sobre la expresión del ARNm de sPLA2 ha sido debido a un efecto reductor sobre la transcripción génica. Se ha mostrado esto mediante un ensayo con el gen indicador de la luciferasa que ha reflejado la actividad del promotor sPLA2.

A este fin, se clonó un fragmento de 2,26 kb del promotor IIA-sPLA2 de rata de acuerdo a Scholz-Pedretti et al. (2002). Este fragmento se ligó en un vector que contenía la luciferasa (pGL3) y se usó para transfectar células mesangiales. Como se ha observado en la FIG 2C, la actividad del promotor estimulada por IL-1 β se redujo completamente por AKH-217.

Estos datos sugieren que los inhibidores de la invención podrían afectar algunos factores de transcripción, que se activan mediante IL-1 β y son esenciales para la transcripción del gen sPLA2. Los candidatos potenciales incluyen NFkB y PPAR.

Ejemplo 2

Efecto de los inhibidores sobre la formación de óxido nítrico (NO) en células mesangiales renales de rata

El óxido nítrico (NO) se considera también como un mediador proinflamatorio que está inducido por la NO sintasa inducible (iNOS) tras el tratamiento con citoquinas de células mesangiales. Diversos estudios previos han indicado que la expresión de iNOS está regulada por los mismos factores de transcripción que sPLA2. Los inventores han investigado si la expresión de iNOS estimulada por citoquinas está también afectada por los inhibidores.

La formación de NO en células mesangiales está muy inducida por el tratamiento con IL-1 β . Esta formación de NO estimulada se redujo de una manera dependiente de la dosis en presencia de AKH-217 y AVX002 (Fig. 3). Además, la expresión de la proteína de iNOS, que está inducida por IL-1 β (Fig. 4A), está regulada por defecto en presencia de AKH-217 y AVX002 (Fig. 4A). Se ha observado también un efecto reductor similar sobre la expresión del ARNm de iNOS cuando se han llevado a cabo los análisis cuantitativos de la PCR en tiempo real (Fig. 4B). Para ver si el efecto es debido a la transcripción génica alterada de iNOS, se han llevado a cabo los ensayos del gen indicador de la luciferasa para medir la actividad del promotor iNOS. El Dr. K.F. Beck (pharmazentrum frankfurt) proporcionó amablemente un fragmento de 4,5 kb del promotor iNOS de rata. Como se ha observado en la Fig. 4C, la estimulación de IL-1 P de células mesangiales estimuló el promotor de iNOS en 10 veces. En presencia de AKH217, se perdió completamente la actividad del promotor.

Estos datos sugieren, que también en el caso de iNOS, los inhibidores de AVX tienen un efecto reductor sobre la transcripción génica, que afecta más probablemente los mismos factores de transcripción que en el caso de la transcripción de sPLA2.

Ejemplo 3

Efecto de los inhibidores sobre la proliferación de células mesangiales

La glomerulonefritis se caracteriza en una primera fase temprana por un aumento en la apoptosis mesangial que en una segunda fase se sustituye por un caso opuesto, es decir, la hiperproliferación de células mesangiales. Muchos estudios previos han mostrado que las células mesangiales quiescente en el cultivo pueden reentrar en el ciclo celular cuando se exponen a diversos factores de crecimiento, incluyendo PDGF, insulina, factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), o nucleótidos extracelulares tales como ATP y UTP. Estos datos se confirman aquí, dado que la insulina, el IGF y el ATP estimulan la incorporación de la [³H] timidina en el ADN (Fig. 5A y 5B). En presencia tanto de AKH217 o AVX002, se reduce la incorporación de [³H] timidina (Fig. 5A y 5B). Se obtuvieron también datos similares cuando se estimularon células con PDGF. Estos datos sugieren un potencial antiproliferativo de los inhibidores

Ejemplo 4

Efecto de los inhibidores sobre la actividad de NFkB en células mesangiales.

Como los inventores han observado en los Ejemplos 1 y 2, esta expresión de iNOS y sPLA2 está regulada por los inhibidores de una manera similar, los inventores han estudiado si estos inhibidores han tenido un efecto sobre la activación de NFkB. Se ha medido la activación de NFkB mediante los análisis por transferencia Western que detectan la cantidad de fosfo-p65 que representa la subunidad del factor de transcripción activa. La estimulación de

las células a corto plazo con IL-1 β (3 desvelaron un pequeño, pero evidente aumento de fosfo-p65 (Fig. 6, panel superior). Además, el inhibidor de kB (I κ B), que está constitutivamente expresado en células sin estimular, está regulado por defecto por la estimulación de IL-1 β , y esta regulación por defecto está revertida por los inhibidores (Fig. 6, panel inferior). Para una carga igual, se ha teñido el factor de estabilización HuR nuclear (Fig. 6 panel intermedio)

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)

5 R-L-CO-X (I)

en el que R es un grupo hidrocarburo C_{10-24} , preferentemente C_{17-19} insaturado que puede transportar hasta tres sustituyentes, comprendiendo dicho grupo hidrocarburo al menos 4 dobles enlaces no conjugados;

10 L es un grupo de unión formador de un puente de 1 a 5 átomos entre el grupo R y el carbonilo CO en el que L comprende al menos un heteroátomo, por ejemplo, O, S, N, o SO; y

X es $CHal_3$ o una de sus sales

Para uso en el tratamiento de la glomerulonefritis.

15 2. Un compuesto para uso según se reivindica en cualquier reivindicación anterior en el que dicho grupo hidrocarburo tiene de 5 a 7 dobles enlaces.

3. Un compuesto para uso según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 2 en el que no se conjugan dobles enlaces con el grupo carbonilo.

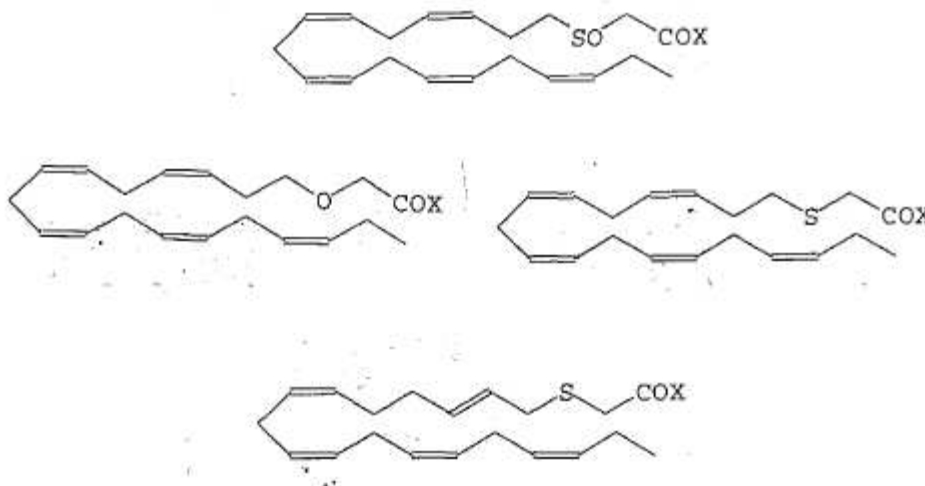
20 4. Un compuesto para uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que todos los dobles enlaces están en la configuración cis o en el que todos los dobles enlaces están en la configuración cis excepto el doble enlace más próximo al carbonilo.

25 5. Un compuesto para uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el grupo de unión L comprende $-CH_2-$, $-CH(\text{alquilo } C_{1-6})-$, $-N(\text{alquilo } C_{1-6})-$, $-NH-$, $-S-$, $-O-$, $-CH=CH-$, $-CO-$, $-SO-$, o $-SO_2-$ que se pueden combinar entre sí en cualquier orden (químicamente significativo) para formar el grupo de unión, en el que L comprende al menos un heteroátomo.

30 6. Un compuesto para uso según se reivindica en cualquier reivindicación anterior en el que L es $-NH_2CH_2-$, $-NH(Me)CH_2-$, $-SCH_2-$, o $-SOCH_2-$.

7. Un compuesto para uso según se reivindica en la reivindicación 1 a 6 en el que X es CF_3 .

35 8. Un compuesto para uso según se reivindica en la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



en el que X es $CHal_3$

40 9. Un compuesto para el uso según se reivindica en cualesquiera reivindicación anterior que tiene la fórmula (I')

R-Y1-Y2-CO-X

en el que R y X son como se ha definido en la reivindicación 1;

45 Y1 se selecciona entre O, S, NH, N(alquilo C_{1-6}), SO o SO_2 e

Y2 es $(CH_2)_n$ o $CH(\text{alquilo } C_{1-6})$;

en el que n es de 1 a 3, preferentemente 1.

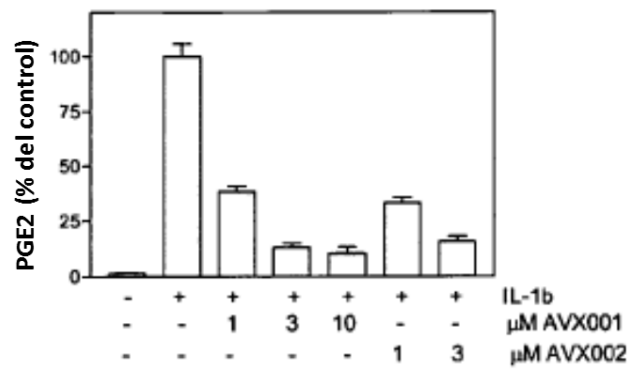


Fig. 1

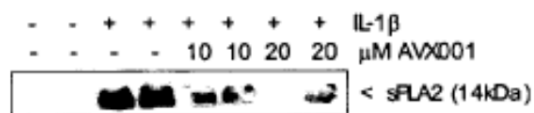


Fig. 2A

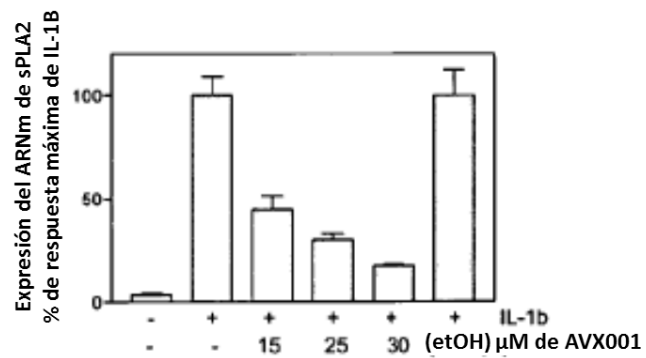


Fig. 2B

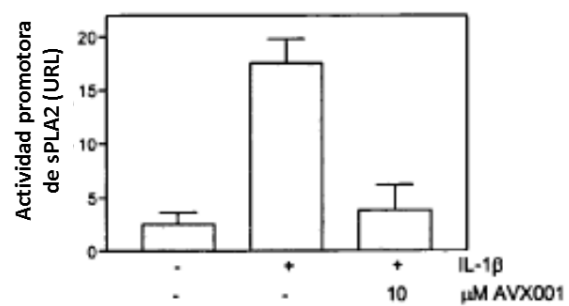


Fig. 2C

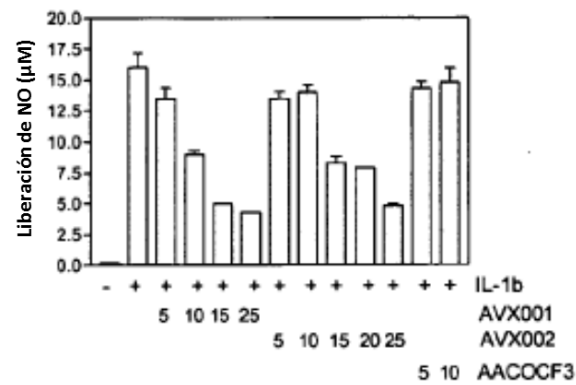


Fig. 3

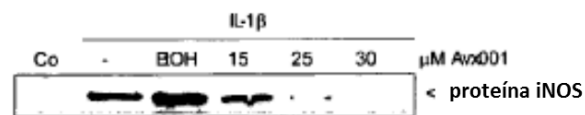


Fig. 4A

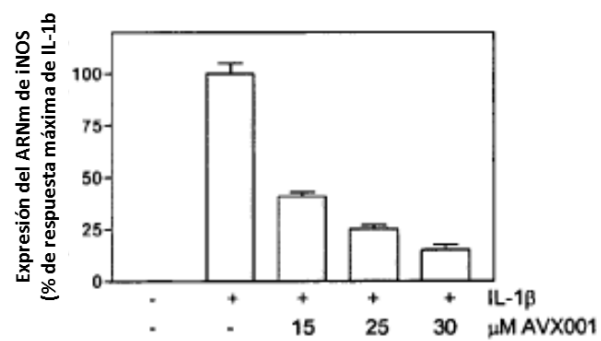


Fig. 4B

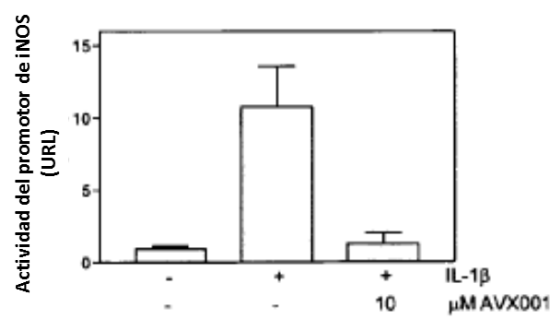


Fig. 4C

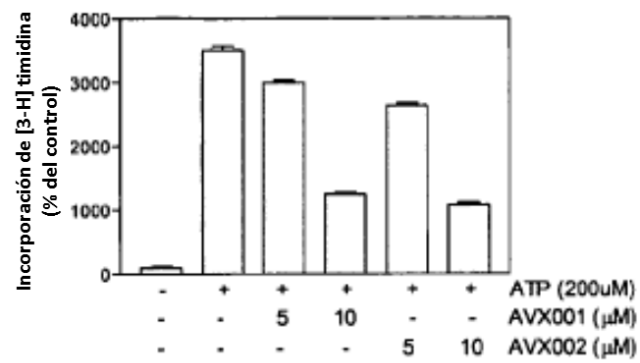


Fig. 5 A

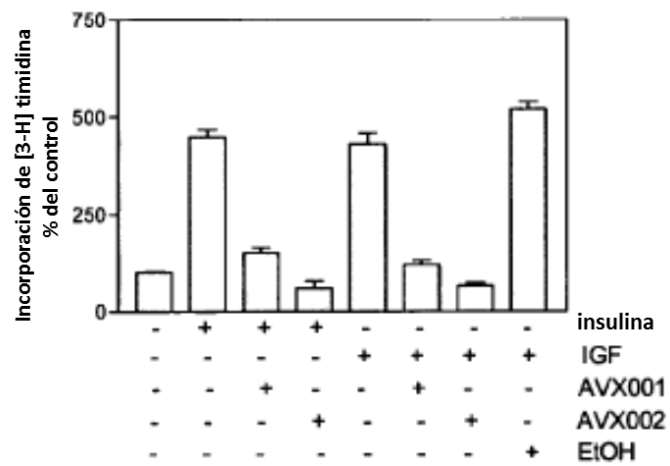


Fig. 5B

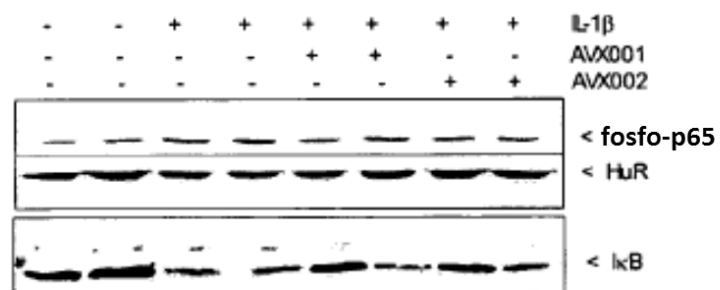


Fig. 6 A

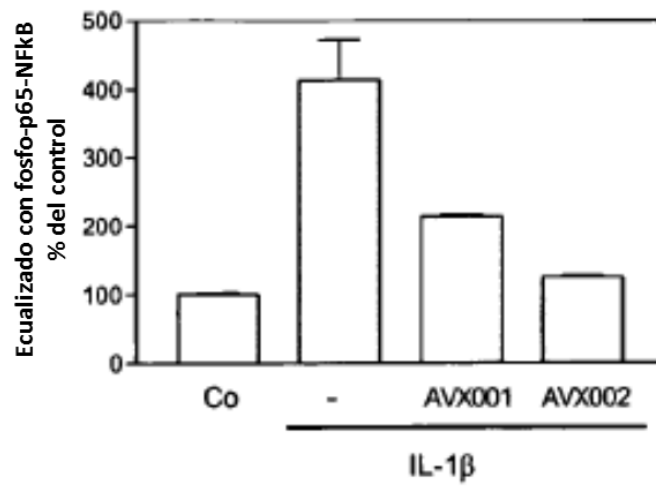


Fig. 6 B

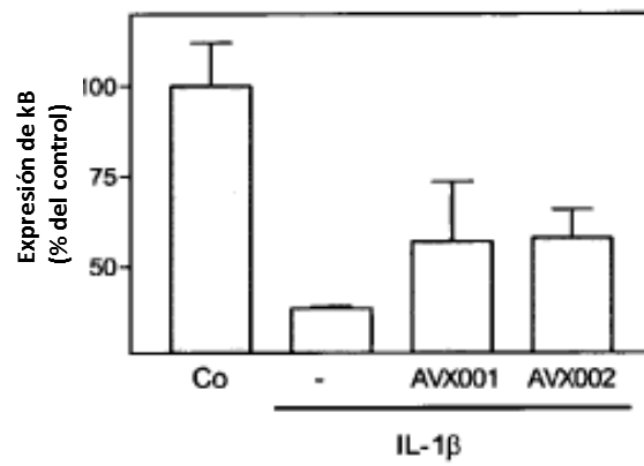


Fig. 6 C