



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 287**

51 Int. Cl.:
C07D 209/44 (2006.01)
C07C 69/96 (2006.01)
C07C 237/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04731590 .8**
96 Fecha de presentación : **07.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1651200**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **Péptidos de galoilo.**

30 Prioridad: **30.05.2003 EP 03012122**
03.02.2004 EP 04075320
19.02.2004 EP 04075545
27.02.2004 EP 04075630

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **Astellas Pharma Inc.**
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8411, JP

72 Inventor/es: **Biessen, Erik Anna L.;**
Appeldoorn, Chantal, Catharina;
Bonnefoy, A.;
Van Berkel, Theodorus Josephus, Cornelis;
Kuiper, Johan y
Hoylaerts, M.F.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 318 287 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

Péptidos de galoilo.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a polihidroxifenoles según la reivindicación 1, a un procedimiento para la preparación de polihidroxifenoles, a composiciones que contienen estos polihidroxifenoles y al uso de polihidroxifenoles como medicamento, especialmente para la prevención, el tratamiento o el diagnóstico de enfermedades o trastornos en los que está implicada la P-selectina. Además de esto, la presente invención se refiere al uso de polihidroxifenoles como agente de transporte dirigido para células que expresan P-selectina.

Antecedentes de la invención

15 En los últimos años, la arteriopatía coronaria (CAD) se ha convertido en una causa principal de muerte en las sociedades occidentales. La hiperlipidemia y la aterosclerosis se consideran mecanismos de riesgo principal para las enfermedades coronarias, mientras que existen algunas evidencias de que la hipertensión, la diabetes y un peso corporal excesivo pueden tener menos impacto negativo sobre los trastornos coronarios de lo que se supuso anteriormente.

20 Se cree que la aterosclerosis se inicia en sitios críticos de la vasculatura arterial mediante un proceso de adhesión de monocitos a la pared de los vasos, sostenido por la aparición de cambios funcionales activos sobre la superficie endotelial (M. A. Gimbrone *et al.*, *Thromb. Haemost.* 82 (2): 722-6 (1999)).

25 Las plaquetas sanguíneas desempeñan un papel principal en la arteriopatía coronaria (B. A. Osterud, *Thromb. Res.* 85: 1-22 (1997)). Las plaquetas se encuentran en los sitios de lesiones ateroscleróticas tempranas. Cuando están activadas, las plaquetas secretan potentes factores mitógenos tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento transformante β y factor de crecimiento epidérmico, que conducen a la proliferación del músculo liso y a la evolución de las lesiones ateroscleróticas. Una reactividad plaquetaria potenciada y una agregación plaquetaria espontánea se asociaron con un mayor riesgo de arteriopatía coronaria recurrente. Los metabolitos antiplaquetarios fisiológicos, tales como óxido nítrico, activan la guanilato ciclasa plaquetaria y elevan el guanosín-3',5'-monofosfato cíclico, reduciendo de ese la unión del fibrinógeno al receptor de glicoproteína IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) a través de la inhibición del flujo de calcio mediado por agonistas.

35 Varias intervenciones demostraron un menor riesgo de enfermedad cardiovascular, tal como con dosis terapéuticas de aspirina (R. Collins *et al.*, *N. Eng. J. Med.* 336: 847-60 (1997)) y complementos antioxidantes (C. H. Hennekens, *Am. Heart J.* 128: 1333-6 (1994)). El tratamiento con agentes antiplaquetarios tales como aspirina y clopidogrel disminuye significativamente la incidencia de acontecimientos coronarios primarios y secundarios (C. H. Hennekens, *Annu. Rev. Public Health* 18: 37-49 (1997)). Los anticuerpos y péptidos que bloquean la unión del fibrinógeno a la glicoproteína plaquetaria IIb-IIIa activada han mejorado los resultados de los procedimientos de revascularización coronaria. Los antígenos plaquetarios dependientes de la activación indican también cambios en la función plaquetaria tras el ejercicio físico, sensibilizaciones fisiológicas (D. Rajasekhar, *Thromb. Haemost.* 77: 1002-7 (1997)) e intervención dietética (M. A. Allinan-Farinelli *et al.*, *Thromb. Res.* 90: 163-9 (1998)).

45 En los últimos años, ciertos componentes dietéticos, en particular ácidos grasos insaturados y polifenoles, se han identificado como mediadores clave en numerosos procesos celulares. Tal como observaron De Caterina *et al.* (*Atheroscler. Thromb.* 14: 1829-36 (1994); *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 52: 191-5 (1995)), los ácidos grasos ω -3, que tienen efectos sobre el colesterol-LDL y total y aún parecen también estar relacionados con la protección frente a aterosclerosis, pueden actuar inhibiendo acontecimientos aterógenos tempranos relacionados con la adhesión de monocitos a células endoteliales. Este proceso se produce a través de la inhibición de la activación endotelial, es decir, la expresión concertada de moléculas de adhesión de leucocitos al endotelio inducible por citocinas y quimioatrayentes de leucocitos que afectan a la adhesión de monocitos. Por tanto, se sugirió la inhibición de una ruta de transducción de señales común que implica el factor de transcripción factor nuclear κ B (NF- κ B).

55 La participación del factor nuclear κ B se ha establecido por M. A. Carluccio *et al.* (*Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23(4): 622-629 (2003)). Demostraron que la oleuropeína y el hidroxitirosol (componentes principales del extracto de hoja de olivo) inhiben a concentraciones nutricionalmente relevantes la expresión de moléculas de adhesión endotelial transcripcional, presentando por tanto características ateroprotectoras.

60 Varios estudios epidemiológicos y de laboratorio indican que el consumo moderado de alcohol puede disminuir el riesgo de aterosclerosis e hiperlipidemia y por tanto la posibilidad de arteriopatía coronaria (E. B. Rimm *et al.*, *BMJ* 312: 731-36 (1996); D. M. Goldberg *et al.*, *Clin. Chim. Acta* 237: 155-187 (1995)). En Francia, donde el consumo de vino tinto es relativamente alto en comparación con los países del norte de Europa y los EE.UU., pero el patrón de ingestión de grasas saturadas es similar, la tasa de mortalidad por CAD es aproximadamente un 50% inferior. Esta denominada "paradoja francesa" (S. Renaud *et al.*, *Lancet* 339: 1523-1526 (1992)) se ha atribuido al principal constituyente de los "taninos del vino", los alcoholes polifenólicos, tales como ácido gálico y flavonoides de la familia de las catequinas incluyendo (+)-catequina, (-)-epicatequina y procianidina B2, que están presentes en abundancia en el vino tinto (S. Rosenkranz *et al.*, *Faseb J.* 16: 1958-1976 (2002); P. M. Kris-Etherton *et al.*, *Am. J. Med.* 113, supl. 9B: 71-88 (2002)).

Se ha encontrado que las sustancias fenólicas contenidas en el vino tinto inhiben la oxidación de las LDL humanas y por tanto se ha postulado que presentan propiedades ateroprotectoras. Sin embargo, es difícil atribuir una reducción de los procesos ateroscleróticos y por consiguiente una protección frente a la arteriopatía coronaria solamente a la inhibición de la oxidación de las LDL debido a que muchos efectos vasculares de los antioxidantes no están relacionados con la resistencia de las LDL a la oxidación (M. N. Diaz *et al.*, N. Eng. J. Med. 337: 408-416 (1997)).

Varios estudios llevados a cabo en seres humanos y animales han demostrado que los compuestos fenólicos del vino podrían ejercer sus efectos reduciendo la síntesis de prostanooides a partir de araquidonato. Además, se ha sugerido que las fracciones fenólicas del vino podrían reducir la actividad plaquetaria mediada por óxido nítrico. Además, los componentes fenólicos del vino aumentan los niveles de vitamina E, mientras que disminuyen la oxidación de las plaquetas sometidas a estrés oxidativo.

M. E. Ferrero *et al.* (Am. J. Clin. Nutr. 68: 1208-14 (1998)) mostraron el papel del resveratrol (un polifenol presente en el vino tinto) en la regulación de la expresión de moléculas 1 de adhesión de células endoteliales, y demostraron por tanto que su actividad antiaterógena no está en primera línea en relación a la protección de las LDL frente a la oxidación tal como postularon M. N. Diaz *et al.* (citado anteriormente).

S. Rotondo *et al.* (Br. J. Pharmacol. 123 (8): 1691-99 (1998)) investigaron el efecto del trans-resveratrol sobre las respuestas funcionales y bioquímicas de leucocitos polimorfonucleares (PMN), que se sugiere que están implicados en la patogenia de cardiopatías coronarias agudas. Los resultados de sus estudios indican que el trans-resveratrol interfiere con la liberación de los mediadores inflamatorios mediante PMN activados y regula por disminución funciones de PMN trombogénicos dependientes de la adhesión.

M. A. Carluccio *et al.* (Atheroscler. Thromb. Vase. Biol. 23 (4): 622-29 (2003)) confirmaron recientemente las conclusiones de Ferrero *et al.* y S. Rotondo *et al.* que establecen la participación del factor nuclear κ B como factor de transcripción clave para la expresión de moléculas 1 de adhesión de células endoteliales.

D. Rein *et al.* (Am. J. Clin. Nutrition 72 (1): 30-35 (2000); J. of Nutrition 130 (8S): 2120S-2126S (2000)) llevaron a cabo una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* sobre los efectos de procianidinas de cacao (trímeros y pentámeros), epicatequina y vino desalcoholizado (DRW) sobre la activación plaquetaria. Se seleccionaron anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia que reconocen la conformación de unión a fibrinógeno de GPIIb-IIIa (unión a PAC-1) y el epítipo plaquetario dependiente de activación CD62P (P-selectina) como marcadores para la activación plaquetaria. Ambos componentes sometidos a prueba añadidos a sangre completa *in vitro* aumentaban la unión a PAC-1 y la expresión de P-selectina en plaquetas no estimuladas, pero suprimían la activación plaquetaria en respuesta a epinefrina. Por el contrario, las procianidinas de cacao inhibían la activación plaquetaria estimulada en la sangre completa, mientras que el efecto del vino desalcoholizado no era tan pronunciado. Generalmente, este efecto supresor observado sobre la reactividad plaquetaria puede explicar los efectos cardioprotectores de los polifenoles presentes en el vino u otras preparaciones nutricionales (por ejemplo, bebidas de cacao y chocolate).

Los polifenoles del vino tinto y su impacto sobre la agregación plaquetaria se han estudiado además por P. Russo *et al.* (Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 11 (1): 25-9 (2001)). Han aislado cuatro clases de compuestos fenólicos del vino: ácidos fenólicos (fracción 1), procianidinas, catequinas y antocianidinas monoméricas (fracción 2), flavonoles y resveratrol (fracción 3) y antocianidinas poliméricas (fracción 4). Se comparó el efecto de cada fracción sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP en ratas y el contenido en c-AMP con los del vino tinto desalcoholizado (DRW) y los compuestos fenólicos puros solos (quercetina, catequina, resveratrol, ácido cafeico). Tanto el DRW como la fracción 2 fenólica inhibían significativamente la agregación plaquetaria inducida por ADP, mientras que los efectos de las fracciones 3 y 4 y los compuestos fenólicos puros no eran significativos. Se observó un aumento significativo en el contenido en c-AMP plaquetario en primer lugar tras la adición del DRW y la fracción 2.

Como otro enfoque para mostrar el impacto de los polifenoles del vino tinto sobre la activación plaquetaria y por consiguiente sus propiedades ateroprotectoras, A. D. Blann *et al.* (Blood Coagul. Fibrinolysis 13 (7): 647-651 (2002)) exploraron marcadores de la actividad plaquetaria (beta-tromboglobulina y P-selectina soluble) y la función celular endotelial (factor de von-Willebrand y trombomodulina soluble) antes y después de la ingestión de vino tinto *in vivo*. El único aumento significativo se observó para la beta-tromboglobulina. Los resultados del estudio llevan a la conclusión de que el vino tinto activa las plaquetas sin tener ningún efecto sustancial sobre el endotelio.

Rosenkranz *et al.* (Faseb J. 16: 1958-1976 (2002)) observaron que los constituyentes no alcohólicos del vino tinto que se acumulan durante la fermentación del mosto actúan como potentes inhibidores de la señalización del factor de crecimiento derivado de plaquetas β (β PDGFR) y las respuestas celulares dependientes de PDGF en las células del músculo liso vascular (VSMC). Las señales iniciadas por el β PDGFR desempeñan un papel importante en el desarrollo vascular y la patogenia de la aterosclerosis. La migración dependiente de PDGF y la proliferación del VSMC son etapas críticas durante la aterogénesis. En el mismo trabajo demostraron que principalmente los flavonoides de la familia de las catequinas inhiben la fosforilación de tirosina dependiente de PDGF del β PDGFR, mientras que el ácido gálico solo no media un efecto significativo.

Además, a partir del documento US 6.133.311 se sabe que el ácido gálico inhibe las actividades de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA reductasa), que media la síntesis del ácido mevalónico, un producto intermedio en la biosíntesis de esteroides, por ejemplo colesterol, o isoprenoides (William W. Parmley y Kanu Chatterjee (Eds.)),

Cardiovascular Pharmacology, Wolfe Publishing, 1994). Por tanto, reduce la tasa de biosíntesis de colesterol y previene por tanto la arteriosclerosis y hipercolesterolemia que se sabe que están fuertemente relacionadas con la CAD.

En el documento US 6.133.311, se propone un mecanismo de acción adicional para el ácido gálico cuando se usa para controlar el aumento del nivel de colesterol en plasma. Se hace referencia a una interacción del ácido gálico con la acil CoA-colesterol-o-aciltransferasa (ACAT). La ACAT promueve la esterificación del colesterol en la sangre. Las células espumosas se forman mediante la acción de la ACAT y contienen una gran cantidad de éster de colesterol portado por lipoproteína de baja densidad (LDL) en la sangre (D. T. Witiak y D. R. Feller (Eds.), *Anti-Lipidemic Drugs: Medicinal, Chemical and Biochemical Aspects*, Elsevier, págs. 159-195 (1991)). La formación de células espumosas en la pared arterial aumenta con la actividad ACAT. Por consiguiente, dado que el ácido gálico inhibe la acción de la ACAT, también puede llevar a la prevención de la arteriosclerosis y la hiperlipidemia.

La P-selectina es un mediador clave en una variedad de procesos inflamatorios y está implicada en, por ejemplo, la arteriosclerosis y la trombosis. Por tanto, el bloqueo de la P-selectina es una estrategia atractiva para el tratamiento de estas enfermedades importantes. Anteriormente se identificaron varios oligopéptidos (con una secuencia consenso Trp-Val-Asp-Val) como antagonistas selectivos de P-selectina, mostrando una baja afinidad micromolar (documento WO 03/020753). Además, podían obtenerse inhibidores en el intervalo nanomolar funcionalizando el extremo N-terminal de ésta y secuencias similares con un grupo galoílo (3,4,5-trihidroxibenzóilo) (solicitud de patente internacional no publicada previamente PCT/EP03/07260).

El documento WO 03/031430 da a conocer el uso de catequinas para el tratamiento de enfermedades vasculares y cardiovasculares.

Pese al mayor entendimiento de algunas de las enfermedades principales incluyendo la arteriopatía coronaria y la arteriosclerosis, y la disponibilidad de nuevos compuestos y procedimientos para controlar las enfermedades y afecciones mencionadas anteriormente hasta cierto grado, sigue existiendo una necesidad de mejoras adicionales, tanto con respecto a potentes compuestos como a procedimientos para controlar o antagonizar los efectos de la activación de la P-selectina en seres humanos y a procedimientos que reducen el riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con la actividad de la P-selectina que sean rentables, aceptables para grandes fracciones de la población, seguros y tolerables. Finalmente, existe una necesidad de procedimientos mejorados que puedan usarse para el diagnóstico temprano de afecciones que llevan a enfermedades asociadas con la P-selectina.

Sumario de la invención

El objeto de la invención es proporcionar polihidroxifenoles según la reivindicación 1, que son miméticos no peptídicos de péptidos de galoílo, y un procedimiento para la preparación de los polihidroxifenoles según la reivindicación 1 usando un resto que proporciona ácido gálico.

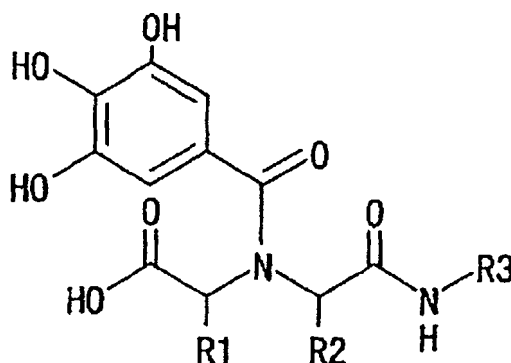
Un objeto adicional de la invención es proporcionar composiciones farmacéuticas y nutracéuticas que contienen polihidroxifenoles según la reivindicación 1.

Además, se proporciona el uso de polihidroxifenoles según la reivindicación 1 como medicamento y especialmente para la fabricación de un medicamento para la prevención, el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad o una afección, en las que está implicada la P-selectina.

Finalmente, se proporciona el uso de polihidroxifenoles según la reivindicación 1 como herramienta de transporte dirigido para tejidos o células que expresan P-selectina en una composición, comprendiendo además un compuesto activo en un vehículo.

Descripción detallada

Los presentes inventores han encontrado polihidroxifenoles de fórmula estructural:



en la que:

R^1 = un hidrógeno; un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado o un grupo aromático, opcionalmente sustituidos respectivamente con un grupo hidroxilo, un grupo ácido carboxílico, un grupo amino o un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado. Preferiblemente, R^1 = etilo, fenilmetilo, indolilmetilo o 4-hidroxifenilmetilo.

R^2 = un grupo opcional, que es un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado.

Preferiblemente, R^2 = un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal y más preferiblemente R^2 = hidrógeno, etilo, propilo o isopropilo.

R^3 = un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos ácido carboxílico, o un grupo alquilamida alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado; o un grupo cicloalquilo (C_3 - C_8), opcionalmente sustituido con un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado o uno o más grupos ácido carboxílico. Preferiblemente, R^3 = un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal, sustituido con uno o dos grupos ácido carboxílico, opcionalmente sustituido con un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado y más preferiblemente R^3 = ácido etilcarboxílico o ácido propildicarboxílico.

Además de la explicación proporcionada anteriormente en la presente invención se muestra a modo de ejemplo un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado con metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y similares. Un grupo aromático es uno que tiene de 6 a 14 átomos de carbono y comprende un grupo arilo carbocíclico y un grupo arilo heterocíclico. El grupo arilo carbocíclico es de monocíclico a tricíclico y preferiblemente es fenilo, naftilo, antrilo o fenantrilo y similares.

El grupo arilo heterocíclico es un grupo de monocíclico a tricíclico que tiene desde 1 hasta 4 heteroátomos, seleccionados del grupo constituido por átomo de nitrógeno, átomo de oxígeno o átomo de azufre. El grupo heterocíclico es pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, isooxazolilo, 1,3,5-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,3,5-tiadiazolilo, 1,3,5-oxadiazolilo, pirizilo, piridazinilo, pirimidilo, pirazilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, benzotienilo, indolilo, cromenilo, quinolilo, isoquinolilo, ftalazinilo o quinoxalinilo y similares.

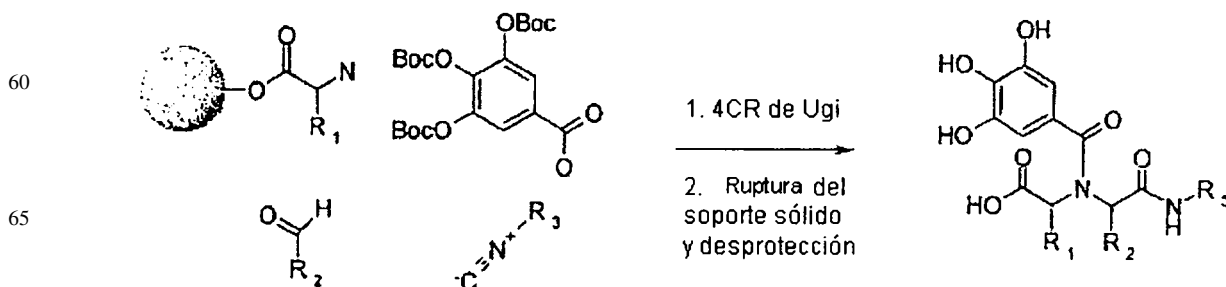
El grupo cicloalquilo (C_3 - C_8) representa ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo. Además, el grupo cicloalquilo (C_3 - C_8) está opcionalmente sustituido con un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado, o uno o más grupos ácido carboxílico.

Los polihidroxifenoles según la presente invención pueden prepararse de una variedad de modos. Se seleccionará un procedimiento de fabricación preferido, dependiendo de los sustituyentes en el polihidroxifenol, la disponibilidad de los materiales de partida, la eficacia y los costes.

Para la construcción de una biblioteca sesgada de compuestos, según la presente invención, ha parecido muy conveniente usar la reacción de cuatro componentes de Ugi en fase sólida (4CR de Ugi), tal como se ha descrito en detalle en los ejemplos. Las reacciones de Ugi en fase sólida se conocen ya en la técnica. Para información adicional se remite al lector a, por ejemplo, S. W. Kim, S. M. Bauer y R. W. Armstrong (1998) *Tetrahedron Lett.*, 39: 6993-6996; S. W. Kim, Y. S. Shin y S. Ro (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 1665-1668; P. A. Tempest, S. D. Brown y R. W. Armstrong (1996) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35: 640-643.

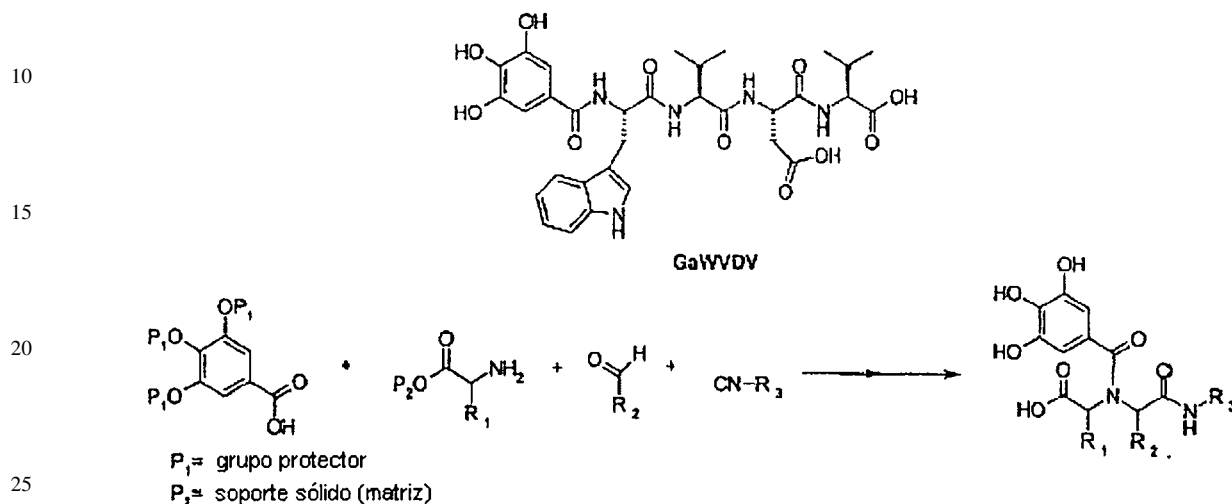
En el primer caso, los componentes de reacción se seleccionaron de una manera sesgada, basándose en las funcionalidades presentes en uno de los antagonistas más potentes hallados hasta la fecha, galoil-Trp-Val-Asp-Val-OH. Los componentes se seleccionaron de aminoácidos (unidos a un soporte sólido), aldehídos alifáticos y nitrilos que contienen carboxilo.

El ácido gálico no mostró estar en la forma más apropiada para llevar a cabo los cuatro componentes de Ugi y obtener productos en un alto rendimiento. Con el fin de mejorar el rendimiento del proceso, se desarrolló una nueva entidad que proporcionaba ácido gálico, a saber, el elemento estructural de ácido gálico sumamente protegido de manera conveniente, ácido 3,4,5-tri-O-(terc-butoxicarbonil)-gálico.



ES 2 318 287 T3

Usando la reacción de cuatro componentes de Ugi, se sintetizó una serie de estructuras de tipo péptido que contenían ácido gálico y se evaluó su potencia de bloqueo de la P-selectina. Inspirado por la alta potencia del antagonista GaWVDV (véase la figura a continuación para la fórmula estructural), se decidió seleccionar los componentes de reacción de modo que los productos de Ugi reflejaran las funcionalidades presentes en ese antagonista (véase a continuación).



El resto que proporciona ácido gálico, ácido 3,4,5-tri-O-(terc-butoxicarbonil)-gálico, ha mostrado ser un elemento estructural sumamente conveniente para la preparación de polihidroxifenoles, más en particular péptidos de galoílo o un equivalente funcional de los mismos o miméticos no peptídicos de péptidos de galoílo, tales como los polihidroxifenoles según la presente invención, que tienen la estructura que se mostró anteriormente.

Durante la reacción de cuatro componentes de Ugi descrita anteriormente se combinan un aminoácido, un aldehído alifático, un nitrilo y un resto que proporciona ácido gálico. En este procedimiento puede usarse cualquier aminoácido. Debe entenderse que el término amino comprende tanto aminoácidos que se producen en la naturaleza como compuestos preparados de manera sintética, que se representan mediante la general fórmula $\text{HOOC-C}(\text{NH}_2)\text{-R}^1$, en la que R^1 tiene el significado que se describió anteriormente. Como aldehído alifático se usa un aldehído alifático ($\text{C}_1\text{-C}_4$) lineal o ramificado, tal como propionaldehído, butiraldehído o isobutiraldehído. Sin embargo, puesto que no todos los compuestos de partida para esta reacción estaban comercialmente disponibles o disponibles en la forma más apropiada, los nitrilos según el procedimiento de la presente invención tuvieron que prepararse por los inventores. El procedimiento de preparación se describe en los ejemplos.

Por tanto, se seleccionaron aminoácidos (como agente que proporciona R^1), aldehídos alifáticos (como agente que proporciona R^2) y nitrilos (como agente que proporciona R^3) así como ciclohexilnitrilo como nitrilo control. Se construyó una biblioteca de compuestos (para una serie de fenilalanina (Phe), para una serie de triptófano (Trp), para una serie de tirosina (Tyr) y para otros aminoácidos, véase a continuación) sobre un soporte sólido. Todos los productos (mezclas diastereoisoméricas) se obtuvieron en purzas que oscilaban entre el 35% y el 75%.

Las mezclas brutas se evaluaron a $10 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ en ensayos ELISA de competición usando estreptavidina-AP. Los exámenes preliminares revelaron varias tendencias: 1) la serie de Phe y la serie de Tyr parecen ser un tanto más activas que la serie de Trp y los compuestos construidos con otros aminoácidos, 2) los productos que contienen cadenas de alquilo ramificadas son consecuentemente menos activos que los de cadenas lineales y 3) un ácido carboxílico unido a C-1 como sustituyente de R^3 está desfavorecido en comparación con una unión a C-2.

A continuación, se purificaron los compuestos más prometedores y se separaron los isómeros con el fin de establecer los valores de CI_{50} . Las pruebas iniciales mostraron que ML72A era el más activo de esta selección con valores de CI_{50} de $12 \mu\text{M}$ y $5 \mu\text{M}$ para los diferentes isómeros. ML75A era ligeramente menos activo ($18 \mu\text{M}$ y $8 \mu\text{M}$). Aunque los compuestos de la serie de Trp son obviamente activos, mostraron consecuentemente curvas de inhibición irregulares, haciendo bastante difícil establecer valores de CI_{50} fiables. El ensayo se está optimizando actualmente para los compuestos de Trp.

Finalmente, se prepararon varios compuestos adicionales, basándose en las estructuras más prometedoras para establecer la influencia de los diversos sustituyentes, y se sometieron a prueba.

En vista de los efectos prometedores mostrados en diversas pruebas, la presente invención proporciona además los polihidroxifenoles que tienen la fórmula estructural que se describió anteriormente como medicamento.

En otra realización, los polihidroxi-fenoles según la reivindicación 1 que tienen afinidad por la P-selectina humana no se usan principalmente como antagonistas de P-selectina, sino como agente de transporte dirigido o dispositivo de direccionamiento, en combinación con un sistema de administración de fármaco o bien conjugado con un fármaco o compuesto activo opcionalmente a través de un conector. Más en particular, las realizaciones preferibles de un sistema de administración de fármaco son un vehículo farmacológico, una composición de transporte dirigido y un inhibidor de la unión. Estas realizaciones se refieren a los ejemplos concretos descritos más adelante. Un vehículo farmacológico para una enfermedad o afección, en la que está implicada la P-selectina, comprende un polihidroxi-fenol. Una composición de transporte dirigido para el suministro de un fármaco a la lesión, en la que está implicada la P-selectina, así como a células que expresan P-selectina, comprende un fármaco, un polihidroxi-fenol según la fórmula estructural que se describió anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización se encuentra un procedimiento para administrar un fármaco a la lesión, en la que está implicada la P-selectina, caracterizado porque se administra por vía oral o por vía parenteral una composición que comprende un fármaco y el polihidroxi-fenol según la reivindicación 1 como agente de transporte dirigido. Otra realización del conjugado es un constructo, constituido por un compuesto activo, que se acopla a través de un conector lábil a esterasa a un residuo de un polihidroxi-fenol según la invención.

También es posible usar los sistemas mencionados anteriormente como herramienta de obtención de imágenes, mediante lo que el compuesto activo se sustituye por un agente de contraste o un radionúclido.

Los polihidroxi-fenoles según la reivindicación 1 también pueden acoplarse directamente a los compuestos activos que van a administrarse a tales dianas. Como alternativa, pueden incorporarse a o anclarse en la superficie de vehículos o entidades más grandes, que son liposomas u otras vesículas lipídicas, gotitas de emulsión, polímeros, nano- o micropartículas (incluyendo nanoesferas, nanocápsulas, microesferas, microcápsulas, etc.), hidrogeles, complejos o virosomas y similares para obtener vehículos dirigidos para fármacos o material genético que se administra a los tejidos o células que expresan la P-selectina. Además, la presentación multimérica de los polihidroxi-fenoles ha de ir acompañada por una mayor afinidad por la P-selectina.

La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas o nutracéuticas que comprenden un polihidroxi-fenol según la reivindicación 1 que tiene afinidad por la P-selectina.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión composición farmacéutica se refiere a composiciones terapéuticas y de diagnóstico, así como a medicamentos y diagnósticos que contienen tales composiciones. Los medicamentos y las composiciones terapéuticas se usan para la prevención o el tratamiento de enfermedades y otras afecciones de individuos de los que es deseable una mejora de sus afecciones. Los diagnósticos y composiciones de diagnóstico se usan para el diagnóstico de tales enfermedades *in vivo* e *in vitro*. Se prefieren medicamentos o composiciones terapéuticas para prevenir o mejorar enfermedades y afecciones que implican la P-selectina. Las composiciones pueden usarse también para tratar enfermedades en las que es deseable la inhibición de la señalización intracelular mediada por la P-selectina.

Las composiciones nutracéuticas incluyen todas las composiciones entendidas normalmente como alimentos funcionales o aditivos alimentarios. Los nutracéuticos comprenden también productos aislados o purificados a partir de alimentos y formulados generalmente de una manera similar a las formas de dosificación farmacéuticas no asociadas habitualmente con el alimento y que han demostrado tener un beneficio fisiológico, o proporcionar protección contra una enfermedad crónica.

Las composiciones nutracéuticas se formulan y procesan normalmente para su uso oral, mientras que las composiciones farmacéuticas que contienen los polihidroxi-fenoles según la reivindicación 1 que tienen afinidad por la P-selectina pueden adaptarse para diversas vías de administración, tales como la oral, parenteral, transmucosa, nasal o pulmonar. Se prefieren composiciones para su uso parenteral y oral, y se prefieren especialmente formulaciones adaptadas para la administración oral. En este documento, el término formulaciones se usa para tales composiciones nutracéuticas y farmacéuticas y las expresiones por vía oral y oral se usan de manera intercambiable.

Las composiciones farmacéuticas contienen preferiblemente uno o más compuestos activos tal como se definió anteriormente y al menos un excipiente farmacéutico. Tal como se usa en el presente documento, un excipiente farmacéutico es cualquier sustancia o mezcla de sustancias farmacéuticamente aceptable que no tiene ninguna actividad farmacológica sustancial, que puede usarse como vehículo o como sustancia auxiliar para formular un compuesto en una forma de dosificación que es estable y fácil de administrar. Se encuentran ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables en las monografías de todas las farmacopeas importantes.

Las formas de dosificación apropiadas para la administración oral incluyen formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, cápsulas duras, cápsulas blandas, polvos, gránulos, formas de dosificación de disgregación por vía oral, comprimidos efervescentes, comprimidos masticables, películas orales o formas de dosificación liofilizadas. La forma sólida puede proporcionar una liberación inmediata, sostenida o controlada del compuesto activo. En una de las realizaciones, la forma de dosificación oral es una forma de dosificación sólida con revestimiento entérico para proporcionar protección al compuesto frente al medio ácido del estómago. Pueden prepararse formas de dosificación sólidas siguiendo enfoques de fabricación convencionales tales como granulación en húmedo, compresión directa o mezclado simple del compuesto activo y los excipientes. Adicionalmente, las formas de dosificación líquidas tales

como jarabes, gotas y suspensiones, en las que el compuesto activo está disuelto o suspendido respectivamente, se consideran adecuadas para este fin. Pueden contener además agentes de transporte dirigido del fármaco, agentes de potenciación de la biodisponibilidad o principio activos distintos de los compuestos de la invención.

5 Los excipientes que se usan comúnmente para la preparación de formas de dosificación sólidas para la administración oral son agentes de unión tales como gelatina, gomas naturales, tales como goma arábica, tragacanto; almidones, alginato sódico, azúcares, polivinilpirrolidona; derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa, poliviniloxazolidonas; cargas (farmacéuticas) tales como lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de dicalcio, fosfato de tricalcio, sulfato cálcico, dextrosa, manitol, sacarosa; lubricantes de preparación de comprimidos si fuera necesario, 10 tales como estearato cálcico y de magnesio, ácido esteárico, talco, Sterotex (estearato alcalino); disgregantes tales como almidón, derivados de almidón y polímeros reticulados.

Los excipientes esenciales para la preparación de formas de dosificación líquidas son disolventes, codisolventes y otros vehículos líquidos tales como agua, etanol, propilenglicol, polietilenglicol; sustancias para aumentar la viscosidad del vehículo tales como azúcares, especialmente glucosa, polímeros hinchables en agua tales como derivados de 15 celulosa (por ejemplo carboximetilcelulosa sódica) o polivinilpirrolidona; estabilizadores que evitan la coagulación y la aglutinación de la suspensión; conservantes tales como parabenos; otros excipientes para el enmascaramiento del sabor y la mejora del sabor como edulcorantes y aromas.

20 Pueden usarse tensioactivos para mejorar la humectación y la disolución de los compuestos activos. Los ejemplos de tensioactivos útiles son laurilsulfato de sodio, monolaurato de sorbitano, monoestearato de sorbitano, monooleato de polioxietileno (20)-sorbitano, monoestearato de polioxietileno (20)-sorbitano, poloxámero 407, poloxámero 188 (polímeros en bloque de polioxetileno, polioxipropileno), polioxil 20 cetostearil éter, dioctilsulfosuccinato de sodio, dioctilsulfosuccinato de calcio, nonoxinol, cloruro de benzalconio, monooleato de sorbitano.

25 Pueden incorporarse estabilizadores para evitar la oxidación del ácido gálico o derivados de ácido gálico durante el almacenamiento, prolongando de ese modo la vida útil de almacenamiento de la composición.

En una realización, se formulan y procesan las composiciones para administración parenteral, preferiblemente para 30 inyección intravascular, tal como intravenosa o intraarterial, pero también para vía intramuscular, subcutánea, intralésional, intraperitoneal u otras vías de administración parenteral. La formulación y fabricación de tales composiciones siguen los mismos principios que se aplican a la formulación de otras sustancias farmacológicas para estas vías de administración particulares. Como ejemplo, la esterilidad es uno de los requisitos esenciales para la preparación de formas de dosificación parenterales. Otros requisitos, tales como el valor de pH y la osmolaridad, se describen en todas 35 las farmacopeas importantes, tales como en la USP 24, en la monografía "General Requirements for Tests and Assays. 1. Injections". Con el fin de mejorar la estabilidad de una formulación parenteral, puede ser necesario proporcionar una forma de dosificación seca que debe reconstituirse antes de que pueda administrarse. Un ejemplo de una forma de dosificación de este tipo es una formulación liofilizada o deshidratada por refrigeración.

40 En un intento de evitar inyecciones frecuentes y de mejorar el cumplimiento del paciente y la conveniencia del tratamiento, puede ser deseable administrar el compuesto de la invención como una forma de dosificación de liberación controlada parenteral. En la bibliografía se describe de manera extensa una variedad de procedimientos para preparar tales formulaciones de efecto prolongado. Puede proporcionarse una liberación prolongada mediante implantes sólidos, nanopartículas, nanocápsulas, micropartículas, microcápsulas, emulsiones, suspensiones, disoluciones aceitosas, 45 liposomas o estructuras similares.

Debido a cuestiones de tolerabilidad, el uso de excipientes en formulaciones parenterales está un tanto limitado. No obstante, los excipientes que son particularmente útiles para la preparación de formulaciones parenterales son disolventes, codisolventes y vehículos líquidos y semisólidos, tales como agua estéril, etanol, glicerol, propilenglicol, 50 polietilenglicol, butanodiol, aceites grasos, triglicéridos de cadena corta y media, lecitina, derivados de aceite de ricino de polioxietileno; sustancias para ajustar la osmolaridad y el pH, tales como azúcares, especialmente glucosa, alcoholes de azúcar, especialmente manitol, cloruro sódico, carbonato sódico, ácido cítrico, acetato, fosfato, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, hidróxido sódico etc.; estabilizadores, antioxidantes y conservantes, tales como ácido ascórbico, sulfito sódico o hidrogenosulfito sódico, EDTA, alcohol bencílico etc.; otros excipientes y adyuvantes de liofilización, 55 tales como albúmina, dextrano y similares.

Si un compuesto activo, tal como un polihidroxifenol según la reivindicación 1 con afinidad por la P-selectina tal como se dio a conocer anteriormente, muestra inestabilidad química, por ejemplo en los fluidos del sistema digestivo, o si su peso molecular es demasiado alto para absorberse desde el intestino de manera eficaz, la administración 60 transmucosa puede llevar a una biodisponibilidad mejorada del compuesto en comparación con la administración oral. Esta vía de administración es, a la vez, no invasiva y respetuosa con el paciente. La administración transmucosa incluye formas de dosificación nasales, bucales, sublinguales, gingivales y vaginales. Estas formas de dosificación pueden prepararse mediante técnicas establecidas; pueden formularse para representar pulverizaciones o gotas nasales, insertos, películas, parches, geles, pomadas o comprimidos. Preferiblemente, los excipientes usados para una forma de 65 dosificación transmucosa incluyen una o más sustancias que proporcionan mucoadhesión, prolongando así el tiempo de contacto de la forma de dosificación con el sitio de absorción y aumentando potencialmente de ese modo el grado de absorción.

En una realización adicional, los compuestos se administran a través de la vía pulmonar, usando un inhalador de dosis dosificada, un nebulizador, una pulverización en aerosol o un inhalador de polvo seco. Pueden prepararse formulaciones apropiadas mediante técnicas y procedimientos conocidos. En algunos casos también puede ser viable una administración transdérmica, rectal u ocular.

5 Puede ser ventajoso usar procedimientos de transporte dirigido o administración de fármaco avanzados en las composiciones según la invención de manera más eficaz. Por ejemplo, si se elige una vía de administración no parenteral, una forma de dosificación apropiada puede contener un agente de potenciación de la biodisponibilidad, que puede ser cualquier sustancia o mezcla de sustancias que aumenta la disponibilidad del compuesto. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la protección del compuesto frente a la degradación, tal como mediante un inhibidor enzimático o un antioxidante. Más preferiblemente, el agente de potenciación aumenta la biodisponibilidad del compuesto aumentando la permeabilidad de la barrera de absorción, que es normalmente una mucosa. Los potenciadores de permeación pueden actuar a través de diversos mecanismos; algunos aumentan la fluidez de las membranas de la mucosa, mientras que otros abren o ensanchan las uniones gap entre las células de la mucosa. Todavía otros reducen la viscosidad de la mucosidad que cubre la capa de células de la mucosa. Entre los potenciadores de la biodisponibilidad preferidos están sustancias anfífilas, tales como derivados del ácido cólico, fosfolípidos, etanol, ácidos grasos, ácido oleico, derivados de ácido graso, EDTA, carbómeros, policarbofilo y quitosano.

20 La cantidad de principio activo que va a incorporarse en las composiciones según la invención depende de varios factores incluyendo el uso pretendido de manera específica, los usuarios objetivo y el compuesto activo, que se selecciona realmente, es decir, si es un polihidroxifenol. Por supuesto, cuando se usan derivados con una actividad anti-P-selectina muchos mayor que la del ácido gálico, se necesita ajustar la dosis en consecuencia, tal como a menos de 100 mg, menos de 10 mg o incluso menos de 1 mg.

25 El principio activo puede incorporarse en forma pura, tal como es típico para los productos farmacéuticos.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un polihidroxifenol que tiene la fórmula estructural mostrada anteriormente para la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de la P-selectina en un sujeto que ha desarrollado una enfermedad o afección en la que está implicada la P-selectina o que corre el riesgo de desarrollar tal enfermedad o afección.

30 Tal como se usa en el presente documento, inhibición se refiere a cualquier tipo de interacción que lleva directa o indirectamente a la modulación de la actividad biológica de la P-selectina. Los tipos comunes de inhibición incluyen inhibición competitiva, incompetitiva y no competitiva. Además, la inhibición puede describirse como reversible o irreversible. En la práctica, muchos procesos de inhibición son de naturaleza competitiva y reversible. Inhibición, en la amplia definición usada en el presente documento, incluye también un tipo de interacción en la que se observa una fase inicial de activación, seguido de una depresión de la bioactividad. Normalmente puede encontrarse un efecto inhibidor cuando se une un inhibidor con alta afinidad a la molécula diana, tenga lugar o no la unión en la misma región molecular que el sustrato natural (es decir, como mimético). En el caso de la P-selectina, existen diferentes sitios de unión para diversos sustratos. Por ejemplo, la unión del ligando 1 glicoproteína de P-selectina (PSGL-1) implica un sitio o espacio diferente al del sialil-Lewis X (sLeX). Sin desear excluir otras interacciones entre los polihidroxifenoles dentro del alcance de la invención, los inventores han encontrado que el ácido gálico bloquea la interacción dinámica entre la P-selectina y el PSGL-1.

45 El sujeto al que van a administrarse los polihidroxifenoles es preferiblemente un individuo humano. Sin embargo, los compuestos según la invención pueden, en principio, aplicarse a otros sujetos, tales como mamíferos. La eficacia de los mismos dependerá de la afinidad de los polihidroxifenoles por la molécula de P-selectina que se encuentra en las especies específicas, ya que la secuencia de esta proteína difiere entre especies. Sin embargo, los inventores han demostrado que, por ejemplo, el ácido gálico y otros polihidroxifenoles tienen una alta afinidad por la P-selectina humana, y pueden usarse para modular de manera eficaz su actividad, particularmente como antagonistas o antagonistas parciales.

55 El uso de los polihidroxifenoles según la invención requiere que tales compuestos, que tienen afinidad por la P-selectina, se administren en una cantidad eficaz. Con respecto a los procedimientos de identificación de tales polihidroxifenoles que tienen afinidad por la P-selectina, se dan ejemplos útiles en el documento WO 03/020753. La dosis o cantidad exacta que se necesita administrar con el fin de reducir la actividad de la P-selectina depende de diversos parámetros, pero puede determinarse mediante procedimientos que se conocen por los profesionales expertos en este campo. También se hace referencia al documento WO 03/020753 y la bibliografía citada en el mismo, que contiene alguna información sobre procedimientos de análisis de la actividad de la P-selectina en un organismo. Además, la dosis que va a administrarse dependerá, en cualquier caso individual, de factores tales como el peso y la edad del individuo al que va a administrarse el material activo, la gravedad de las afecciones, síntomas o riesgos que han de reducirse, la actividad anti-P-selectina específica del compuesto activo o mezcla de compuestos que se usa, etc.

65 En la mayoría de los casos, la concentración deseada del/de los compuestos activo(s) en el sitio de acción, así como el grado de inhibición de la P-selectina que se pretende en el mismo, se conseguirá con dosis de más de 1 μ g al día.

Un factor importante asociado con el grado deseado de inhibición de la P-selectina es si el objetivo de usar los compuestos según la invención es prevenir o tratar una afección, un síntoma o una enfermedad asociados con la actividad de la P-selectina. A lo largo de los últimos pocos años se ha generado un conjunto creciente de pruebas de que la P-selectina está asociada de hecho con varios procesos patológicos relacionados con la inflamación y el cáncer, y en particular con procesos inflamatorios que llevan a enfermedades graves del sistema cardiovascular. Entre las afecciones que se asocian en la actualidad con la P-selectina están arteriopatía coronaria, trombosis, cáncer, trastornos inflamatorios crónicos, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, aterosclerosis, reestenosis, isquemia, lesión por reperfusión incluyendo insuficiencia renal, metástasis tumoral, septicemia bacteriana, coagulación intravascular diseminada, síndrome de dificultad respiratoria aguda, accidente cerebrovascular, angiogénesis, rechazo de trasplante, trombosis venosa profunda, infarto de miocardio y choque circulatorio.

Algunos de los mecanismos mediante los que la P-selectina puede influir en estas afecciones se describen en más detalle en: D. J. Lefler (Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 283-294 (2000)); R. W. McMurray (Semin. Arthritis Rheum. 25 (4): 215-233 (1996)).

En una realización preferida, el uso implica la administración de un polihidroxifenol según la reivindicación 1 a un individuo que ya ha desarrollado una enfermedad, afección o síntoma asociado con la P-selectina de este tipo.

En otra realización preferida, el uso según la invención implica la administración de un polihidroxifenol a un individuo que puede o no haber desarrollado ya una enfermedad, afección o síntoma asociado con la actividad de la P-selectina, pero que corre el riesgo de desarrollarlo. En el sentido más amplio, cualquier sujeto que no se excluye de las categorías y factores de riesgo asociados comúnmente con enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias o enfermedades neoplásicas que juntas representan las causas más importantes de muerte en las sociedades occidentales, puede correr un riesgo y por tanto beneficiarse del uso según la invención. En este sentido, un sujeto de este tipo puede ser un ser humano, normalmente un miembro de una de las sociedades occidentales y preferiblemente uno que no consume ya (tal como en virtud de cualquier hábito dietético) cantidades significativas de inhibidores de la P-selectina naturales.

En otra realización preferida, el individuo corre un riesgo mayor de desarrollar una enfermedad, afección o síntoma asociado con la actividad de la P-selectina. Un riesgo mayor se define normalmente como un riesgo sustancialmente superior al riesgo promedio de un grupo de referencia. Los riesgos mayores pueden ser características de individuos o de grupos. Por ejemplo, los individuos con ciertos hábitos dietéticos personales, tales como un consumo elevado de grasa animal, o fumadores empedernidos pueden tener un riesgo sustancialmente mayor de desarrollar una enfermedad cardiovascular tal como arteriopatía coronaria que los semejantes promedio. Por otro lado, los factores dietéticos que influyen en los riesgos cardiovasculares pueden caracterizarse también con frecuencia como rasgos nacionales, tales como el consumo de grasas y aceites saturados en algunos países en los que los aceites vegetales insaturados son tradicionalmente bastante poco comunes.

Con un riesgo particularmente alto en el contexto de la presente invención están aquellos individuos que ya han desarrollado algunos síntomas (tales como tensión arterial elevada, hiperlipidemia o diabetes) que frecuentemente se consideran prodrómicos para las enfermedades asociadas con la P-selectina enumeradas anteriormente. Se prefiere que la inhibición de la P-selectina administrando polihidroxifenoles se realice en tales individuos.

La administración de polihidroxifenoles se refiere a cualquier modo de proporcionarle a un individuo tales compuestos, ya sea mediante ingestión, también denominada la vía de administración (por vía) oral, o mediante cualquier otra vía, tal como administración mucosa, bucal, sublingual, lingual, nasal, rectal, vaginal, pulmonar, subcutánea, dérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intraarterial. Los modos más comunes de administración son normalmente aquéllos que están asociados con un alto grado cumplimiento y preferencia del paciente o consumidor. Por tanto, el modo más preferido de administración según la invención es mediante ingestión. Está disponible un gran número de tipos de productos, técnicas de formulación y formas de dosificación para adecuarse casi a cualquier fin y principio activo que pueda hacerse biodisponible por vía oral. En otra realización preferida, los polihidroxifenoles se administran por vía parenteral, preferiblemente mediante inyección, en particular mediante inyección intravenosa.

La presente invención se refiere también al uso de polihidroxifenoles que tienen la fórmula estructural mostrada anteriormente como medicamento. Más particularmente, proporciona usos para composiciones farmacéuticas y nutracéuticas que contienen un polihidroxifenol con afinidad por la P-selectina. Los usos concuerdan con los procedimientos de unión o inhibición de la actividad de la P-selectina, tal como se describió anteriormente, e incluyen el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de arteriopatía coronaria, trombosis, cáncer, trastornos inflamatorios crónicos, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, aterosclerosis, reestenosis, isquemia, lesión por reperfusión incluyendo insuficiencia renal, metástasis tumoral, septicemia bacteriana, coagulación intravascular diseminada, síndrome de dificultad respiratoria aguda, accidente cerebrovascular, angiogénesis, rechazo de trasplante, trombosis venosa profunda, infarto de miocardio o choque circulatorio.

Según el uso de diagnóstico, las composiciones pueden emplearse para pruebas *in vitro* para cuantificar las concentraciones de la P-selectina en tejidos y fluidos corporales (lesiones arteriales) como marcadores para determinar las enfermedades y afecciones asociadas con la P-selectina. Pueden usarse también para procedimientos de obtención

de imágenes de diagnóstico *in vivo* para controlar la reestenosis, aterosclerosis mediada por P-selectina y otras afec-
ciones seleccionadas de aquéllas en las que se moviliza la P-selectina. Como opción para este uso, puede conjugarse
una molécula o derivado de ácido gálico según la invención con un quelante, que posteriormente se compleja con una
etiqueta isotrópica que es detectable mediante el sistema de control seleccionado o asociado con un agente de contraste
5 (gadolinio quelado con DTPA o USPIO).

En cuanto al suministro de fármaco, una realización preferible es una composición de transporte dirigido. La com-
posición de transporte dirigido de la presente invención puede prepararse en una variedad de preparaciones farmacéu-
ticas en forma de, por ejemplo, una emulsión grasa, una emulsión, un liposoma, una micela etc., y estas preparaciones
10 pueden administrarse como inyección intravascular, intramuscular o subcutánea o como inyección al órgano, o como
implante o como preparación transmucosa a través de la cavidad oral, cavidad nasal, recto, útero, vagina, pulmón, etc.
La composición de la presente invención puede administrarse también en forma de preparaciones orales (por ejem-
plo, preparaciones sólidas tales como comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; preparaciones líquidas tales como
emulsiones o suspensiones).

Cuando se prepara la composición en una inyección, la composición puede contener, si se desea y es necesario,
un conservante, estabilizador, agente emulsionante, base de aceite, agente dispersante, agentes de ajuste del pH o
agente isotónico conocidos. Los ejemplos del conservante son glicerina, propilenglicol, fenol, alcohol bencílico, etc.
Los ejemplos del estabilizador son dextrano, gelatina, acetato de tocoferol, alfa-tioglicerina, etc. Los ejemplos del
20 agente emulsionante son DPPC, HSPC, DMPC, DSPC, DPPG, DMPG, lecitina de yema de huevo purificada, lecitina
de soja purificada, PEG-lípido (por ejemplo PEG-DSPE), etc. Los ejemplos de la base de aceite son aceite de soja
purificado, aceite de sésamo purificado, etc. Los ejemplos del agente dispersante incluyen monooleato de polioxie-
tileno (20)-sorbitano (Tween[®] 80), sesquioleato de sorbitano (Span[®] 30), polioxietileno(160)-polioxipropileno(30)-
glicol (Pluronic[®] F68), aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 60, etc. Los ejemplos del controlador de pH in-
cluyen ácido clorhídrico, hidróxido sódico, etc. Los ejemplos del agente isotónico son glucosa, D-sorbitol, D-manitol,
25 glicerina, etc.

En esta realización, el compuesto activo puede ser o no un inhibidor de la P-selectina. Más normalmente, será
un compuesto que actúa sobre el tejido o las células seleccionadas como diana a través de un mecanismo diferente y
30 el procedimiento se aplicará normalmente cuando la inhibición de la P-selectina sola no sea suficiente para producir
el efecto deseado. Químicamente, el compuesto activo puede representar cualquier clase de compuestos, tales como
moléculas orgánicas pequeñas sintéticas, semisintéticas o naturales, una sustancia inorgánica, un péptido, una proteína,
un polisacárido o un ácido nucleico tal como un oligonucleótido, un ADN o ARN. Preferiblemente, el compuesto
activo es un ácido nucleico o bien es un compuesto con cualquier tipo de acción inhibitoria sobre el tejido o la célula
35 diana.

Las células diana que expresan P-selectina son plaquetas y células endoteliales activadas.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar ciertos aspectos y realizaciones de la invención; sin embargo, no han de
40 entenderse como una limitación del alcance de las reivindicaciones tal como se exponen más adelante.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona la fórmula estructural de los compuestos de ejemplos 4, 5, 6 y 7.

La figura 2 es una representación gráfica de la unión a P-selectina en comparación con el control de los compuestos
de los ejemplos 4, 5, 6 y 7 a diferentes concentraciones.

La figura 3 muestra una tabla que enumera los valores de CI_{50} para los isómeros de varios compuestos de los
50 ejemplos 4, 5 y 7 de los que se muestra también la fórmula estructural.

Figura 4. El ácido gálico (GA) antagoniza a la P- y L-selectina pero no a la E-selectina. A. Unión competitiva
de GA-EWVDV (▲), EWVDV (+) y ácido gálico (■) durante la unión de TM11-PO a la P-selectina humana; B.
Competición por el ácido gálico de la unión de biotina-PAA-Le^a-SO₃ a la P-selectina humana (■), P-selectina de ratón
55 (□), L-selectina humana (A) y E-selectina humana (▲) por el ácido gálico. Se revistieron los pocillos con las selectinas
(0,3 μg/ml) y se incubaron con biotina-PAA-Le^a-SO₃ 0,33 μg/ml en ausencia de presencia de ácido gálico. Los valores
representan las medias ± DEM de experimentos por triplicado.

Figura 5. El rodamiento de células HL60 sobre células CHO-P se reduce por el ácido gálico. A. El número de célu-
60 las HL60 marcadas con calceína-AM que se adhieren sobre cubreobjetos revestidos con células CHO-P a velocidades
de cizalladura en la pared de 300 s⁻¹ (barras blancas) y 600 s⁻¹ (barras negras), en ausencia (control) o presencia de
ácido gálico a las concentraciones indicadas, se determinó a partir de fotografías tomadas durante el experimento. Para
cada uno, se analizaron 26-30 fotografías en dos ensayos de perfusión independientes (** p < 0,001). B. La velocidad
(μm/s) del rodamiento de células HL60 marcadas con calceína-AM sobre cubreobjetos revestidos con células CHO-P
65 a velocidades de cizalladura en la pared de 300 s⁻¹ (barras blancas) y 600 s⁻¹ (barras negras), en ausencia (control) o
presencia de ácido gálico (50 μM y 250 μM) se determinó a partir de películas en tiempo real. Para cada estado se mi-
dió la velocidad de rodamiento de al menos 20 células HL60 individuales en 5-9 ensayos de perfusión independientes.
Los valores representan la media ± DEM (* p < 0,05).

Figura 6. Rodamiento de leucocitos sobre monocapas de plaquetas *in vitro*. Representación en diagrama de cajas (*box plot*) de la distribución de velocidades durante el rodamiento de leucocitos sanguíneos en reposo sobre una superficie constituida por plaquetas humanas adheridas a colágeno de piel de ternero a una velocidad de cizalladura de 150 s^{-1} , en ausencia (control, número de células analizadas = 35) o presencia de ácido gálico $500 \mu\text{M}$ (GA500, número de células analizadas = 22). Se indican las velocidades de rodamiento medias para ambos grupos ($\mu\text{m/s}$, $p < 0,05$).

Figura 7. Movimiento de rotación (“tumbling”) dinámico de conjugados de leucocitos-plaquetas sobre endotelio de la vena femoral *in vivo*. Representación superpuesta de imágenes registradas en línea para 5 conjugados individuales entre leucocitos de ratón y plaquetas de ratón activadas con colágeno marcadas con fluorescencia, en presencia del antagonista de $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ G4120. El intervalo entre imágenes representa 0,1 s. La distancia recorrida se indica mediante la barra de escala. Los leucocitos no están marcados; las plaquetas unidas a leucocitos están marcadas como puntos negros.

Figura 8. El ácido gálico reduce el movimiento de rotación de leucocitos-plaquetas *in vivo*. Inhibición dependiente de la dosis del rodamiento del conjugado sobre el endotelio de la vena femoral por el ácido gálico en ratones C57/B16 (WT) expresada como el número de conjugados que ruedan por unidad de superficie (A); Inhibición por el ácido gálico del rodamiento de conjugados formados previamente entre leucocitos y plaquetas en ratones con aterosclerosis ancianos (ApoE^{-/-}), expresada como el porcentaje de rodamiento en ausencia de ácido gálico (B).

Figura 9. Rodamiento de conjugados y adhesión plaquetaria en ratones control y con aterosclerosis. Adhesión de plaquetas individuales (identificadas mediante flechas) y rodamiento de conjugados (identificados mediante plaquetas unidas a leucocitos rodeadas en rojo) en ratones no tratados (WT) y ratones ateroscleróticos (ApoE^{-/-}), en ausencia (control) o presencia de ácido gálico (AG) $500 \mu\text{M}$.

Figura 10. Agregación plaquetaria máxima en presencia de diferentes concentraciones de ácido gálico (A) y EGCG (B).

30 Ejemplos

Ejemplo 1

35 Ácido 3,4,5-tri-O-(terc-butoxicarbonil)-gálico

A ácido gálico (5,0 g, 29,4 mmol) se le añadió DCM anhidro (60 ml). Se burbujeó gas nitrógeno a través de la mezcla no homogénea durante 5 minutos. Entonces, se trató la mezcla posteriormente con piridina (88,2 mmol, 7,1 ml), dicarbonato de di-terc-butilo (88,2 mmol, 19,2 g) y 4-dimetilaminopiridina (0,3 mmol, 37 mg). Se observó el desprendimiento de gas y tras 1 hora la mezcla se volvió homogénea. Tras 2 horas, el análisis de CCF (eluyente: acetato de etilo) reveló la finalización de la reacción. Se diluyó la mezcla de reacción con DCM (200 ml) y se lavó con HCl 1 M y agua. Se secó la fase orgánica sobre MgSO_4 , entonces se filtró y se concentró a vacío. Se aplicó el residuo a una columna de gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo al 10% en tolueno. La recogida de las fracciones apropiadas proporcionó el compuesto del título (9,26 g, 19,7 mmol, 67%) como un sólido blanco.

45 RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 169,9, 149,9, 148,6, 143,8, 139,7, 126,9, 122,2, 84,6, 84,5, 22,4; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 7,91 (s, 1 H), 1,55 (s, 27 H). EM (ESI) m/z 493,2 (M+Na), 963,4 (M+M+Na).

50 Ejemplo de referencia 2

Síntesis de los nitrilos con protección frente a la labilidad en medio ácido

Se sintetizó isocianoacetato de terc-butilo según un precedente de la bibliografía: B. H. Novak y T. D. Lash, J. Org Chem. 1998, 63, 3998-4010.

55 Se sintetizó isocianoacetato de terc-butilo en dos etapas a partir de clorhidrato del éster terc-butílico de β -alanina comercialmente disponible (NovaBiochem) tal como sigue. A una disolución de clorhidrato del éster terc-butílico de β -alanina (2 g, 11 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) y formiato de etilo (5 ml) se le añadió trietilamina (12 mmol, 1,7 ml). Se equipó el matraz con un condensador de reflujo y se calentó la mezcla durante 4 horas, tras lo que se añadió otra cantidad de formiato de etilo (1 ml). Una hora después, se filtró la mezcla sobre gel de sílice. Se lavó el gel de sílice con acetato de etilo. Se eliminaron del filtrado las fracciones volátiles, proporcionando éster terc-butílico de N-formil- β -alanina (1,4 g, 11 mmol). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 171,2, 163,4, 80,8, 34,7, 33,4, 22,7; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 8,15 (s, 1H), 6,31 (s ancho, 1H), 3,52 (q, 2H, J = 6,1 Hz), 2,47 (t, 2H, J = 6,2 Hz), 1,46 (s, 9H). Se sometió este compuesto (0,65 g, 3,8 mmol) a las condiciones de deshidratación descritas para el nitrilo anterior proporcionando isocianopropionato de terc-butilo (0,50 g, 3,2 mmol, 85%) como un líquido amarillento. El color se oscureció durante el almacenamiento a 4°C (hasta dos meses), pero esto no afectó en gran medida a la calidad del producto. RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 3,64 (m, 2H), 1,48 (s, 9H).

ES 2 318 287 T3

Se sintetizó 2-S-isocianopentanoato de di-terc-butilo en dos etapas a partir de clorhidrato del éster di-terc-butílico de ácido L-glutámico comercialmente disponible (NovaBiochem) de la misma manera descrita para el isocianopropionato de terc-butilo. N-formil-L-glutamato de di-terc-butilo (sólido blanco, 0,96 g, 3,33 mmol, 99% a partir de clorhidrato del éster di-terc-butílico de ácido L-glutámico): RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 171,5, 170,3, 160,8, 81,7, 80,0, 50,3, 30,9, 27,5, 27,4, 27,1; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 8,21 (s, 1H), 6,37 (d ancho, 1 H), 4,64-4,54 (m, 1H), 2,41-1,76 (m, 4 H), 1,48 (s, 9H), 1,44 (s, 9H). Se obtuvo 2-S-isocianopentanoato de di-terc-butilo (0,41 g, 1,53 mmol, 90% a partir de la formamida) tal como se describió anteriormente como un aceite amarillento que solidifica tras el almacenamiento. RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 170,3, 164,7, 159,8, 83,1, 80,4, 55,8, 30,1, 27,5, 27,2; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 4,29 (dd, 1H, $J_1 = 5,1$ Hz, $J_2 = 8,8$ Hz), 2,50-2,42 (m, 2H), 2,32-2,02 (m, 2H), 1,50 (s, 9H), 1,46 (s, 9H).

Ejemplo 3

15 Procedimiento experimental para la reacción de Ugi

Se acopló el aminoácido protegido con Fmoc a la resina Tentagel equipada con el conector de ácido hidroximetilfenoxiacético (HMPA) mediante el procedimiento convencional (DIC/DMAP en DCM/NMP). Se estableció la carga de resina 1 mediante determinación de Fmoc convencional (normalmente de 0,16 mmol/g a 0,22 mmol/g).

Todas las reacciones de Ugi se llevaron a cabo en una escala de 10 μmol . Se eliminó el grupo Fmoc en el grupo amino de 1 mediante tratamiento con piperidina al 20% en DMF durante 15 minutos. Tras enjuagar la resina con NMP (2x) y DCM (2x), se añadieron el aldehído 2 (100 μmol) y DCM anhidro (0,2 ml). Se agitó la resina durante 1 hora. Entonces, se añadieron a la mezcla una disolución de ácido tri-Boc-gálico (1, 100 μmol , 47 mg) en MeOH anhidro (0,2 ml) y nitrilo 4 (100 μmol). Se continuó la agitación de la resina durante otras 15 horas. Entonces se filtró la resina, se lavó con NMP, MeOH y DCM (2x cada uno). Se logró la ruptura del soporte sólido y la desprotección del producto mediante tratamiento de la resina con TFA/DCM (0,5/0,5 ml) que contenía triisopropilsilano (25 μl) durante 2 horas. Se separó por filtración la resina, se enjuagó con DCM, MeOH y DCM (2x cada uno) y se evaporó el filtrado a temperatura ambiente obteniendo el producto de Ugi bruto.

Se determinaron la identidad y la pureza de los productos con CLEM (columna Alltima C18, usando acetonitrilo al 10-90% en TFA al 0,05%/H₂O, ESI-EM). Se realizó la purificación de las mezclas activas en una columna semipreparativa Alltima C18 (250x10 mm), normalmente usando un gradiente del 30-50% de acetonitrilo en TFA al 0,1%/H₂O), seguido de liofilización de las fracciones apropiadas.

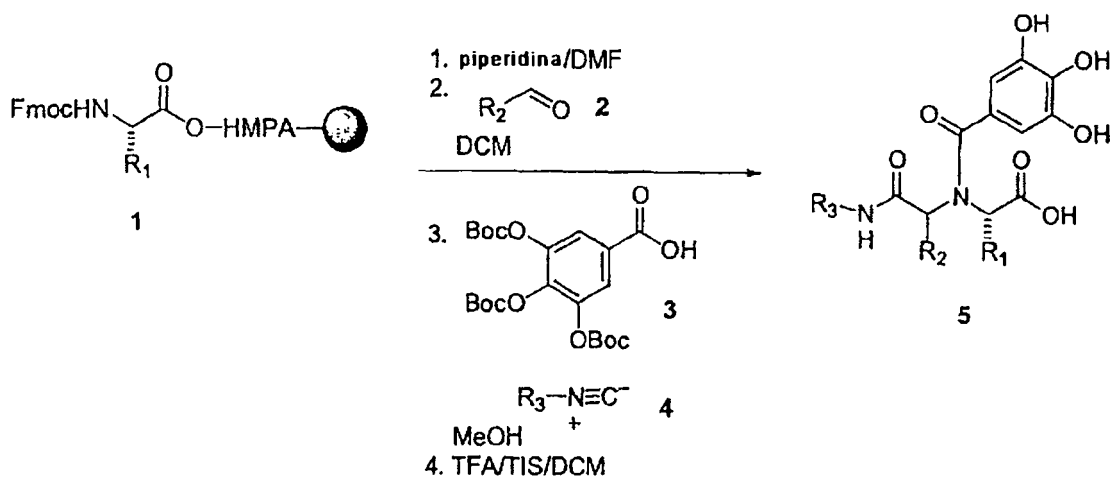
DIC: diisopropilcarbodiimida

DMPA : 4-dimetilaminopiridina

40 DCM: diclorometano

NMP: N-metilpirrolidona

45 TFA: ácido trifluoroacético



ES 2 318 287 T3

Ejemplo 4

Derivados de ácido gálico preparados a partir de fenilalanina

- 5 Para las fórmulas estructurales se remite al lector a la figura 1.
ML65A: (C₂₆H₃₃N₂O₇), EM (FT-ESI) m/z 485,22861 [M+H]⁺
ML65B
10 ML65C
ML72A: (C₂₃H₂₇N₂O₉)
15 diastereoisómero 1, EM(FT-ESI) m/z 475,17123 [M+H]⁺
diastereoisómero 2, EM(FT-ESI) m/z 475,17108 [M+H]⁺
ML75A: (C₂₅H₂₉N₂O₁₁)
20 diastereoisómero 1 EM(FT-ESI) m/z 533,17649 [M+H]⁺
ML65D
25 ML72B
ML75B: (C₂₆H₃₁N₂O₁₁), EM(FT-ESI) m/z 547,19244 [M+H]⁺
ML76
30 ML72C: (C₂₄H₂₉N₂O₉), EM(FT-ESI) m/z 489,18694 [M+H]⁺
ML75C
35 ML89A
ML93
ML94
40

Ejemplo 5

Derivados de ácido gálico preparados a partir de triptófano

- 45 Para las fórmulas estructurales se remite al lector a la figura 1.
ML78A
50 ML78B
ML78C: (C₂₇H₃₀N₃O₁₁)
diastereoisómero 1, EM(FT-ESI) m/z 572,18754 [M+H]⁺
55 diastereoisómero 2, EM(FT-ESI) m/z 572,18759 [M+H]⁺
ML78D
60 ML78E: (C₂₆H₃₀N₃O₉)
diastereoisómero 1, EM(FT-ESI) m/z 528,19769 [M+H]⁺
diastereoisómero 2, EM(FT-ESI) m/z 528,19780 [M+H]⁺
65 ML78F
ML78G: (C₂₅H₂₈N₃O₉), EM(FT-ESI) m/z 514,18246 [M+H]⁺

ES 2 318 287 T3

ML78H:

diastereoisómero 1, EM(FT-ESI) m/z 528,19773 [M+H]⁺

5 diastereoisómero 2, EM(FT-ESI) m/z 528,19752 [M+H]⁺

ML78I: (C₂₈H₃₂N₃O₁₁), EM(FT-ESI) m/z 586,20339 [M+H]⁺

ML89B

10

Ejemplo 6

Derivados de ácido gálico preparados a partir de tirosina

15

Para las fórmulas estructurales se remite al lector a la figura 1.

ML111E: (C₂₃H₂₇N₂O₁₀), EM(FT-ESI) m/z 491,16629

20

ML126

Tyr7

Tyr6

25

Ejemplo 7

Otros derivados de ácido gálico

30

Para las fórmulas estructurales se remite al lector a la figura 1.

ML95A

35

ML95B

ML97

ML111A

40

ML111B

ML111C

45

ML111D

ML89A

ML93

50

ML94

Ejemplo 8

55

Unión de SH31 a P-selectina en presencia o ausencia de un polihidroxifenol inhibidor

Se sometieron a ensayo mezclas brutas de productos de Ugi para determinar su capacidad para inhibir la unión de SH31-fosfatasa alcalina (SH31-AP) a la P-selectina humana. Se preparó de manera reciente SH31-AP, un complejo de SH31/estreptavidina-AP tetramérico, que se ha demostrado previamente que se une con alta afinidad y especificidad a la P-selectina humana (Molenaar, T.J.M. *et al.* Blood 2002; 100 (10): 3570-3577), incubando estreptavidina-AP (Amersham Life Science, Little Chalfont, RU; 5,0 μ l, 2,0 μ M) y SH31-biotina (biotina-VGLDPRDWVDVSDYA, 1,5 μ l, 190 μ M) durante 2 horas a temperatura ambiente en tampón de ensayo (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,4). Para estudios de competición, se revistió una placa de microtitulación de 96 pocillos (alta unión, fondo plano, Costar, Corning, EE.UU.) durante la noche a 4°C con IgG de cabra anti-ser humano 10 μ g/ml (específica de Fc) (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Los Países Bajos) en tampón de revestimiento (NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6). Posteriormente, se lavaron los pocillos con tampón de ensayo y se incubaron durante 1 hora a 37°C con tampón de bloqueo (BSA al 3% en tampón de ensayo). Tras lavar con tampón de ensayo, se incubaron los pocillos durante

ES 2 318 287 T3

2 horas a 37°C con quimera de P-selectina humana/Fc de IgG (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido; 0,3 µg/ml). Posteriormente, se lavaron los pocillos con tampón de ensayo y se incubaron durante 1 hora a 4°C con el complejo de SH31-AP con o sin productos de Ugi (10 µM o 100 µM). Se lavaron los pocillos seis veces con tampón de ensayo y sustrato (0,6 mg de fosfato de p-nitrofenilo (PNP; Merck, Whitehouse Station, EE.UU.)/ml de tampón de dietanolamina (dietanolamina al 9,6%/MgCl₂ 0,35 mM pH 9,8)) y se incubaron los pocillos a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de NaOH 2,4 M y se midió la absorbancia a 405 nm. Los resultados se muestran en la figura 2. Todos los compuestos sometidos a prueba inhibían de manera dependiente de la dosis la unión de SH31 a la P-selectina.

Se sometieron a ensayo los productos de Ugi purificados para determinar su capacidad para inhibir la unión de SH31-peroxidasa (SH31-PO) a la P-selectina humana. Se preparó de manera reciente SH31-PO, un complejo de SH31/estreptavidina-PO tetramérico incubando estreptavidina-PO (Amersham Life Science, Little Chalfont, RU; 5,0 µl, 2,0 µM) y SH31-biotina (biotina-VGLDPRDWVSDYA, 1,5 µl, 190 µM) durante 2 horas a temperatura ambiente en tampón de ensayo (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,4). Para estudios de competición, se revistió una placa de microtitulación de 96 pocillos (alta unión, fondo plano, Costar, Coming, EE.UU.) durante la noche a 4°C con IgG de cabra anti-ser humano 10 µg/ml (específica de Fc; Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Los Países Bajos) en tampón de revestimiento (NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6). Posteriormente, se lavaron los pocillos con tampón de ensayo y se incubaron durante 1 hora a 37°C con tampón de bloqueo (3% BSA en tampón de ensayo). Tras lavar con tampón de ensayo, se incubaron los pocillos durante 2 horas a 37°C con quimera de P-selectina humana/Fc de IgG (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido; 0,3 µg/ml). Posteriormente, se lavaron los pocillos con tampón de ensayo y se incubaron durante 1 hora a 4°C con el complejo de SH31-PO con o sin productos de Ugi (intervalo de 0,4-100 µM). Se lavaron los pocillos seis veces con tampón de ensayo y se añadió sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbencina (TMB)/H₂O₂; Pierce, Rochford, EE.UU.) y se incubaron los pocillos a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de H₂SO₄ 2 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Los resultados se muestran en la figura 3. Las CI₅₀ para los compuestos sometidos a prueba se enumeran en la figura 3 junto con su estructura química.

Ejemplo 9

30 *Ensayo de competición de ácido gálico con TM11-PO*

Se sometió a ensayo el ácido gálico (Acros, Geel, Bélgica) para determinar su capacidad para inhibir la unión de TM11-PO a la P-selectina humana. Se preparó de manera reciente TM11-PO, un complejo de TM11/estreptavidina-PO tetramérico, que se ha mostrado previamente que se une con alta afinidad y especificidad a la P-selectina humana (Molenaar *et al.*, Blood 2002, 100, 3570-3577), incubando estreptavidina-peroxidasa (estreptavidina-PO (Amersham Life Science, Little Chalfont, Reino Unido), 8,4 µl, 2,0 µM) y TM11-biotina (biotina-CDVEWVDVSSLEWDLPC (sintetizado por el Dr. Van der Zee, Departamento de Inmunología, Universidad de Utrecht, Los Países Bajos), 1,5 µl, 190 mM) durante 2 horas a temperatura ambiente en tampón de ensayo (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,4). Para estudios de competición, se revistió una placa de microtitulación de 96 pocillos (alta unión, fondo plano, Costar, Coming, EE.UU.) durante la noche a 4°C con IgG de cabra anti-ser humano 10 µg/ml (específica de Fc) (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Los Países Bajos) en tampón de revestimiento (NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6). Posteriormente, se lavaron los pocillos con tampón de ensayo y se incubaron durante 1 hora a 37°C con tampón de bloqueo (BSA al 3% en tampón de ensayo). Tras lavar con tampón de ensayo, se incubaron los pocillos durante 2 horas a 37°C con la quimera de P-selectina humana/Fc de IgG (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido) (0,3 µg/ml). Posteriormente, se lavaron los pocillos con tampón de ensayo y se incubaron durante 1 hora a 4°C con el complejo de TM11-PO. Se lavaron los pocillos seis veces con tampón de lavado (Tween 20 al 0,1% en tampón de ensayo). Se añadió 3,3',5,5'-tetrametilbenzamidina (TMB)/peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Pierce, Rochford, EE.UU.) y se incubaron los pocillos a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de H₂SO₄ 2 M y se midió la absorbancia a 450 nm.

Los resultados se muestran en la figura 4A. Como resultado, se encontró que el ácido gálico era un inhibidor potente de la unión de TM11-PO a la P-selectina humana con un valor de CI₅₀ de 7,2 µM.

Ejemplo 10

55 *Ensayo de competición de ácido gálico (derivados) con PAA-Le^a-SO₃H*

Para poder someter a prueba la unión del ácido gálico también a otros miembros de la familia de selectinas (es decir, E- y L-selectina), se usó biotina-PAA-Le^a-SO₃H (Synthesone, Munich, Alemania) en lugar de TM11-PO como ligando en el ensayo de competición. Este polímero a base de poliacrilamida (PAA) con grupos sulfo-Lewis A unidos, es un ligando de selectina establecido.

De manera experimental, se usó el mismo procedimiento que en el ejemplo 7, sin embargo con las siguientes diferencias. Tras lavar con tampón de ensayo, se incubaron los pocillos durante 2 horas a 37°C con la quimera de P-selectina humana/Fc de IgG, quimera de P-selectina de ratón/Fc de IgG, quimera de L-selectina humana/Fc de IgG y quimera de E-selectina humana/Fc de IgG respectivamente (todas de R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido) (0,3 µg/ml). Posteriormente se incubaron los pocillos de la placa de microtitulación con biotina-PAA-Le^a-SO₃H (0,33 µg/ml) durante 2 horas a 37°C, en lugar de con el complejo de TM11-PO.

ES 2 318 287 T3

En esta prueba se encontró que el ácido gálico inhibía la P-selectina humana (CI_{50} de aproximadamente $85 \mu\text{M}$). Además se encontró que el ácido gálico no podía inhibir la unión a E-selectina, mostrando menos del 20% de inhibición a concentraciones de hasta 1 mM, mientras que parecía ser un inhibidor moderado de la L-selectina, con una CI_{50} de $241 \mu\text{M}$. La unión del ácido gálico a la P-selectina parecía ser independiente de la especie.

Además del propio ácido gálico, se sometieron a prueba algunos derivados de ácido gálico (galato de n-dodecilo (Lancaster, Morecambe, Reino Unido) y galato de (-)-epigallocatequina (EGCG) (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Los Países Bajos)), un polifenol que tiene propiedades antioxidantes (ácido cafeico) (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Los Países Bajos) y ácido 4-hidroxibenzoico (Acros, Geel, Bélgica) para determinar su capacidad para inhibir la P-selectina humana. Los resultados se muestran en la figura 4B. De estos compuestos, EGCG podía inhibir la unión de biotina-PAA- $\text{Le}^a\text{-SO}_3$ a la P-selectina humana teniendo una CI_{50} de $114 \mu\text{M}$. Todos los demás compuestos mostraron valores de CI_{50} de $> 300 \mu\text{M}$.

Ejemplo 11

Inhibición de interacciones dinámicas entre células HL60 y células de ovario de hámster chino que expresan la P-selectina humana

Las células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas de manera estable con P-selectina humana (CHO-P) se donaron por gentileza del Dr. Modderman (Universidad de Amsterdam, Amsterdam, Los Países Bajos). Se hicieron crecer las células en DMEM (BioWhittaker Europe, Verviers, Bélgica) que contenía suero de ternero fetal (FCS) al 10% (BioWhittaker), L-glutamina 5 mM, 20.000 unidades de penicilina/estreptomicina (BioWhittaker) y aminoácidos no esenciales 5 mM (Gibco, Paisley, Reino Unido). Se incubaron los matraces con células a 37°C en CO_2 al 5% durante 3 ó 4 días hasta que las células habían crecido casi hasta la confluencia.

Las células HL60 provenían de la ATCC y se hicieron crecer en medio RPMI 1640 (BioWhittaker) con FCS al 10%, L-glutamina 5 mM y 20.000 unidades de penicilina/estreptomicina.

Se analizaron las interacciones dinámicas entre las células HL60 derivadas de macrófagos, que presentaban una alta expresión de PSGL-1, el ligando de P-selectina natural, y monocapas de células de ovario de hámster chino (células CHO-P) que expresaban P-selectina humana hechas crecer sobre cubreobjetos de vidrio revestidos con colágeno S (tipo I) $30 \mu\text{g/ml}$ (Roche Diagnosis, Bruselas, Bélgica) en una cámara de perfusión de placas en paralelo con un procedimiento adaptado de G. Theilmeier (Blood 1999.94: 2725-2734). El cubreobjetos constituía el fondo de la cámara y la cámara real estaba formada por una junta de caucho de silicio de $254 \mu\text{m}$ de altura diseñada con una trayectoria de flujo de forma cónica, dando como resultado por tanto un aumento de 3 veces de la velocidad de cizalladura desde la entrada de la cámara hasta la salida. Se perfundieron células HL60 marcadas con calceína-AM, suspendidas en RPMI ($0,5 \times 10^6/\text{ml}$) a 37°C y a una velocidad de flujo de 1 ml/min. con una bomba de jeringa invertida (Harvard Instruments, South Natick, MA, EE.UU.). Se montó la cámara de flujo sobre una plataforma de mesa de un microscopio de epifluorescencia invertido (Diaphot; Nikon, Melville, NY, EE.UU.) acoplado a una cámara de vídeo de CCD de Cohu (COHU Inc, San Diego, CA, EE.UU.) y se midió el traslado de células HL60 sobre monocapas de CHO-P a velocidades de cizalladura en la pared de 300 s^{-1} y 600 s^{-1} . Se añadió ácido gálico a suspensiones de células HL60 2 minutos antes del inicio de la perfusión. Para evitar la oxidación, se preparó de manera reciente la disolución de ácido gálico. Se almacenaron películas en tiempo real de 12 segundos (10 imágenes por segundo), grabadas en posiciones predefinidas en la trayectoria de flujo correspondiente a las velocidades de cizalladura en la pared seleccionadas y se digitalizaron con un capturador de fotogramas Scion LG3 (Scion Corp, Frederick, MD, EE.UU.). Se calculó la velocidad promedio de las células que rodaban sobre las células CHO-P a partir de la distancia de rodamiento de las células HL60 en un intervalo de tiempo de 1 segundo, usando el programa NIH Image versión 6.1. Se contó el número de células HL60 adheridas a partir de las fotografías tomadas durante el mismo experimento.

Los resultados se muestran en la figura 5A y 5B. Como resultado, el ácido gálico disminuyó significativamente la adhesión de células HL60 a la monocapa de CHO-P ya a $50 \mu\text{M}$ en comparación con el control sin tratar, independientemente de las velocidades de cizalladura en la pared (300 s^{-1} y 600 s^{-1} , -34% y -43% respectivamente). A $250 \mu\text{M}$, el efecto del ácido gálico fue incluso más pronunciado (-41% y -54% respectivamente).

Se midió la velocidad de rodamiento de las células HL60 que rodaban sobre la monocapa de CHO-P en la misma configuración experimental. Se dobló la velocidad de rodamiento de las células HL60 en presencia de $50 \mu\text{M}$ y $250 \mu\text{M}$ de ácido gálico.

Ejemplo 12

Aislamiento de plaquetas, marcaje y preparación de monocapa de plaquetas, rodamiento de leucocitos sobre monocapas de plaquetas unidas a colágeno

Se recogió sangre humana en ácido-citrato-dextrosa 1:6 (ACD: citrato de trisodio 93 mM, ácido cítrico 7 mM, dextrosa 140 mM, pH 6,5) y tirofibán $1 \mu\text{M}$. Se preparó plasma rico en plaquetas humanas (PRP) mediante centrifugación a 150 g durante 15 min. Se recogió sangre murina en hirudina $20 \mu\text{g/ml}$ y se centrifugó a 800 g durante 30 s, seguido inmediatamente de una segunda centrifugación a 150 g durante 5 min. para preparar PRP. Entonces se mezcló el PRP aislado (humano o murino) con dos volúmenes de ACD y se centrifugó de nuevo a 800 g durante 5

ES 2 318 287 T3

min. Posteriormente, se resuspendieron las plaquetas lavadas en tampón de Tyrode-HEPES (HEPES 5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0,36 mM, glucosa al 1% (p/v), pH 7,3) que contenía albúmina sérica humana al 1% (v/v) (HAS) a 10⁶ plaquetas/ μ l. Entonces se incubaron durante 20 min. a 37°C con calceína-AM 5 μ M, un éster acetoximetílico, fluorescente una vez roto mediante esterasas no específicas dentro de la célula, sin ningún efecto detectable sobre la función plaquetaria en los estudios de perfusión. Entonces se centrifugó la suspensión plaquetaria a 700 g durante 25 min. y se resuspendieron las plaquetas fluorescentes en tampón de Tyrode-HEPES, y se inyectaron plaquetas murinas como tales en ratones.

Se preparó una capa de plaquetas humanas para estudios de perfusión posteriores revistiendo durante la noche cubreobjetos de vidrio con colágeno de piel de ternero, disuelto en ácido acético 50 mM a 1 mg/ml. Entonces se enjuagaron los cubreobjetos en tampón de Tyrode completo (tampón de Tyrode que contenía CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM y albúmina humana al 1%). Entonces volvió a perfundirse sangre humana completa, anticoagulada con hirudina 20 μ g/ml, sobre la superficie revestida de colágeno en una cámara de flujo en paralelo a una velocidad de cizalladura de 300 s⁻¹, en presencia de tirofiban 1 mM (Merck). En estas condiciones, se forma una capa homogénea de plaquetas extendidas activadas sobre los cubreobjetos, sin formación de agregados plaquetarios.

Tras la perfusión de sangre completa anticoagulada con hirudina 20 μ g/ml en una cámara de flujo, a una velocidad de cizalladura de 300 s⁻¹ durante 5 min. a 37°C para producir capas de monocapas de plaquetas unidas a colágeno, se lavó la sangre progresivamente con tampón de Tyrode completo que contenía albúmina humana al 1%. Se continuó la perfusión a una velocidad de cizalladura constante de 150 s⁻¹, en presencia o ausencia de ácido gálico 500 μ M o bien 25 μ g/ml del anticuerpo anti-P-selectina WAPS12.2. Tras 3 min. de lavado, se visualizaron los leucocitos restantes que se trasladaban sobre la capa de plaquetas con un microscopio invertido, se capturaron películas en la memoria de un ordenador conectado y se calculó la velocidad de traslado, tal como se mencionó anteriormente. Los resultados se muestran en las figuras 6 y 7.

Ejemplo 13

Inhibición in vivo de la inflamación de células endoteliales

Todos los experimentos en animales se revisaron y aprobaron por el Consejo de Revisión Institucional de la Universidad de Leuven y se realizaron cumpliendo con las directrices de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (Giles AR). Para el estudio del rodamiento de leucocitos asistido por plaquetas sobre la superficie endotelial de vasos sanguíneos *in vivo*, se realizó vídeo-microscopía en línea en ratones. Se anestesiaron ratones C57B16 (6-12 semanas de edad) con Nembutal (70 mg/kg) mediante inyección por vía i.p., y se introdujo un catéter en la vena yugular. Se expuso la vena femoral y se colocaron los ratones sobre la mesa de un microscopio de epifluorescencia invertido, de modo que podía visualizarse la circulación sanguínea en la vena femoral a través de una cámara de vídeo de CCD de Cohu. Entonces se inyectaron plaquetas murinas marcadas con fluorescencia en la vena yugular con catéter (500 x 10⁶ plaquetas en 200 μ l) y se grabó el rodamiento de referencia para las plaquetas marcadas. Tras 10 min., se inyectó colágeno 50 μ g/kg para activar las plaquetas circulantes, con protección del antagonista de anticuerpo anti- α_{IIb}/β_3 G4120, que se inyectó junto con el colágeno a 1 mg/kg para evitar la agregación de las plaquetas activadas. Tras 5 min., se grabó entonces durante 10 min. el movimiento de rotación y el rodamiento inducido por colágeno de los conjugados de leucocitos-plaquetas. Se contó el número de rosetas que rodaban y se calculó su velocidad de movimiento de rotación promedio a partir de las películas grabadas. Para abordar el efecto del ácido gálico sobre el rodamiento de las rosetas, se infundió 5 min. antes de la administración del colágeno y se analizó el rodamiento de las rosetas como en los controles. También se estudiaron las interacciones pared de los vasos-rosetas en la vena femoral de ratones ApoE^{-/-} con aterosclerosis ancianos (> 1 año). Se contaron las rosetas con movimiento de rotación 10 min. tras la inyección de colágeno, antes y después de la infusión de ácido gálico de 0,75 a 7,5 mg/kg.h. Se calculó que la dosis que proporcionaba la mitad de la inhibición máxima del movimiento de rotación de las rosetas (DE₅₀) era de 1,5 \pm 0,4 mg/kg.h, lo que corresponde a una concentración eficaz en plasma de 40 μ M. Los resultados se muestran en las figuras 8A, 8B y 9.

Ejemplo 14

Efecto de un polihidroxifenol sobre la agregación plaquetaria

Se sometieron a prueba AG y EGCG (como referencia) para determinar sus efectos sobre la agregación plaquetaria. Debido a su tendencia a formar micelas, no pudo usarse DG en estos experimentos ya que produce lisis plaquetaria.

Se recogió sangre venosa extraída de manera reciente de voluntarios sanos con un consentimiento informado en volumen 1/10 de citrato de trisodio al 3,2% (p/v). Estos donantes negaron haber tomado aspirina u otros inhibidores de la función plaquetaria durante los diez días anteriores. Se preparó plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación (150 g, 15 min., 22°C). Se ajustó el PRP a una concentración final de 200.000 plaquetas/ μ l con plasma pobre en plaquetas (PPP), que se obtuvo tras una etapa de centrifugación adicional de la sangre restante (1100 g, 15 min., 22°C). Se dejó el PRP durante 30 min. a 37°C para garantizar un estado de reposo de las plaquetas.

ES 2 318 287 T3

Después de eso, se incubó el PRP durante 5 min. con diferentes concentraciones de ácido gálico, EGCG o disolvente a 37°C. Se transfirieron las muestras a un agregómetro (Kordia BV, Leiden, Los Países Bajos) para determinar la agregación plaquetaria a una velocidad de agitación de 900 r.p.m. Se inició la agregación plaquetaria tras la incubación previa con diferentes concentraciones de AG o EGCG (0, 50, 250 y 500 μM) mediante la adición de péptido de activación del receptor de trombina (TRAP, 6,5 μM , 37°C).

Se representa la agregación máxima en la figura 10 (A) para AG y en 10 (B) para EGCG.

Se encontró que tanto AG como EGCG inhiben la agregación plaquetaria de manera significativa a una concentración de 500 μM . A una concentración de 250 μM , no se midió inhibición significativa, que resulta de una gran variabilidad interindividual en la respuesta al ácido gálico entre los donantes.

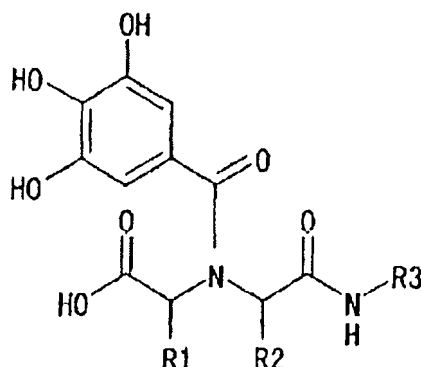
Ejemplo 15

Preparación de la emulsión

Tras añadir 0,5 partes de ML72A (un derivado de polihidroxifenol) y 0,4 partes de palmitato de dexametasona y 1,2 partes de lecitina de yema de huevo purificada y 10 partes de aceite de soja purificado en 2,21 partes de glicerina concentrada y 85,69 partes de agua, se preparó una preparación en emulsión usando un microfluidizador (82,7 MPa (12.000 psi), 10 minutos a temperatura ambiente).

REIVINDICACIONES

1. Polihidroxifenoles de fórmula estructural:



caracterizados porque:

R^1 = un hidrógeno; un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado o un grupo aromático, opcionalmente sustituidos respectivamente con un grupo hidroxilo, un grupo ácido carboxílico, un grupo amino o un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado;

R^2 = un grupo opcional, que es un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado;

R^3 = un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos ácido carboxílico, o un grupo alquilamida alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado; o un grupo cicloalquilo (C_3 - C_8), opcionalmente sustituido con un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado o uno o más grupos ácido carboxílico.

2. Polihidroxifenoles según la reivindicación 1, **caracterizados** porque:

R^1 = etilo, fenilmetilo, indolilmetilo o 4-hidroxifenilmetilo;

R^2 = un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal;

R^3 = un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal, sustituido con uno o dos grupos ácido carboxílico, opcionalmente sustituido con un grupo alquilo alifático (C_1 - C_4) lineal o ramificado.

3. El compuesto según la reivindicación 1, **caracterizado** porque:

R^1 = etilo, fenilmetilo, indolilmetilo o 4-hidroxifenilmetilo;

R^2 = hidrógeno, etilo, propilo o isopropilo

R^3 = ácido etilcarboxílico o ácido propildicarboxílico.

4. Ácido 3,4,5-tri-O-(terc-butoxicarbonil)-gálico.

5. Procedimiento para la preparación de los polihidroxifenoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende combinar un aminoácido, un aldehído alifático, un nitrilo y un resto que proporciona ácido gálico, **caracterizado** porque el compuesto según la reivindicación 4 se usa como el resto que proporciona ácido gálico.

6. Los polihidroxifenoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como medicamento.

7. Composición que comprende (a) uno o más polihidroxifenoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y (b) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. Los polihidroxifenoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como agente de transporte dirigido para células que expresan P-selectina.

ES 2 318 287 T3

9. Composición que comprende (a) uno o más de los polihidroxifenoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, (b) un principio activo, que es un fármaco, un agente de contraste o un radionúclido y (c) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 10. Composición según la reivindicación 9, **caracterizada** porque uno o más de los polihidroxifenoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se han conjugado o acoplado al principio activo, opcionalmente a través de un conector.

10 11. Composición según la reivindicación 9, **caracterizada** porque uno o más de los polihidroxifenoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se han incorporado a o anclado en entidades, que son vesículas lipídicas, gotitas de emulsión, polímeros, proteínas, nano- o micropartículas, hidrogeles, complejos, virosomas y similares.

15 12. Compuesto o composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como medicamento.

20 13. Uso de polihidroxifenoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la fabricación de un medicamento para la prevención, el tratamiento o el diagnóstico de arteriopatía coronaria, trombosis, cáncer, trastornos inflamatorios crónicos, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, aterosclerosis, reestenosis, isquemia, lesión por reperfusión incluyendo insuficiencia renal, metástasis tumoral, septicemia bacteriana, coagulación intravascular diseminada, síndrome de dificultad respiratoria aguda, accidente cerebrovascular, angiogénesis, rechazo de trasplante, trombosis venosa profunda, infarto de miocardio o choque circulatorio.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1/10

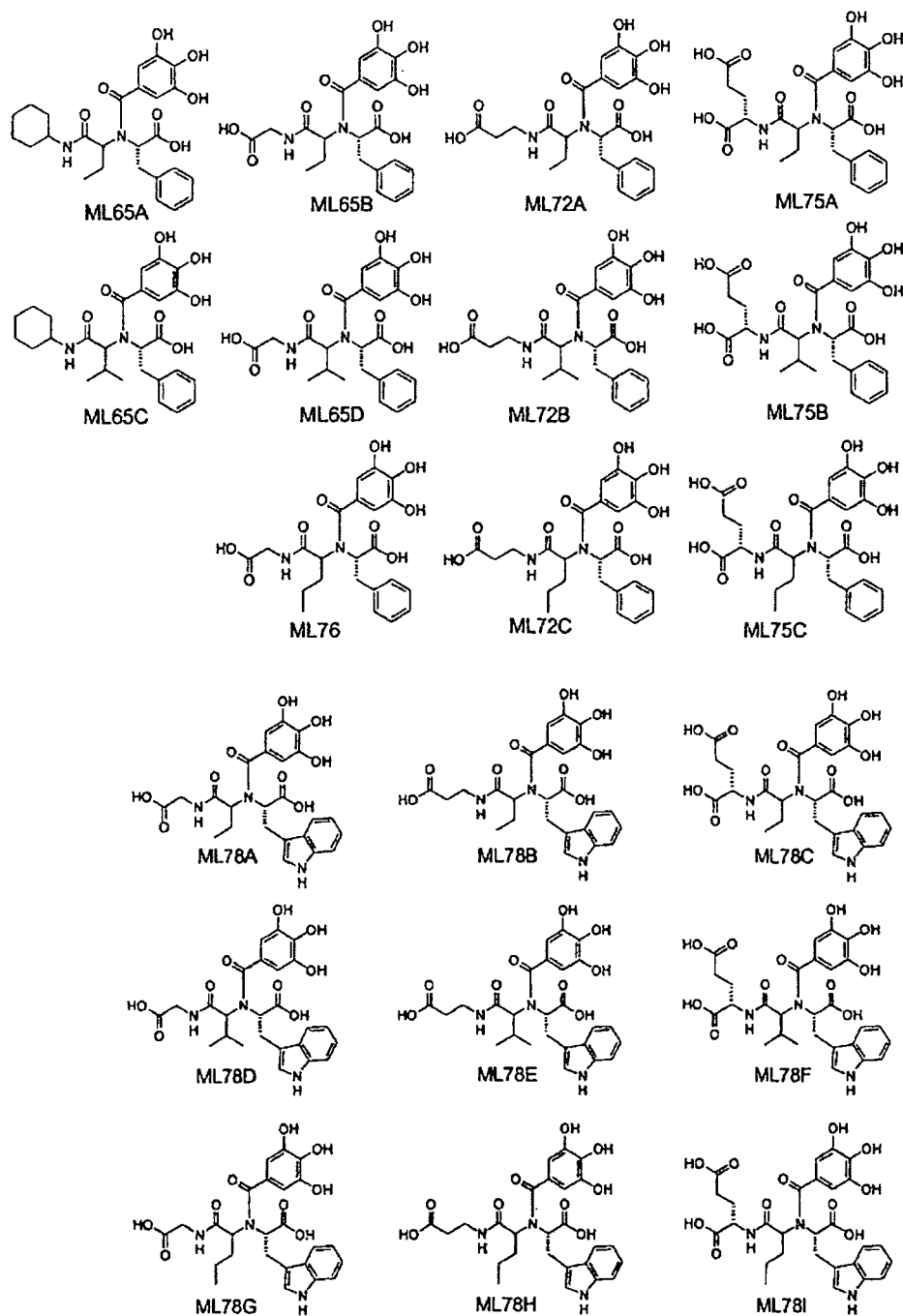


Figura 1/10 (continuación)

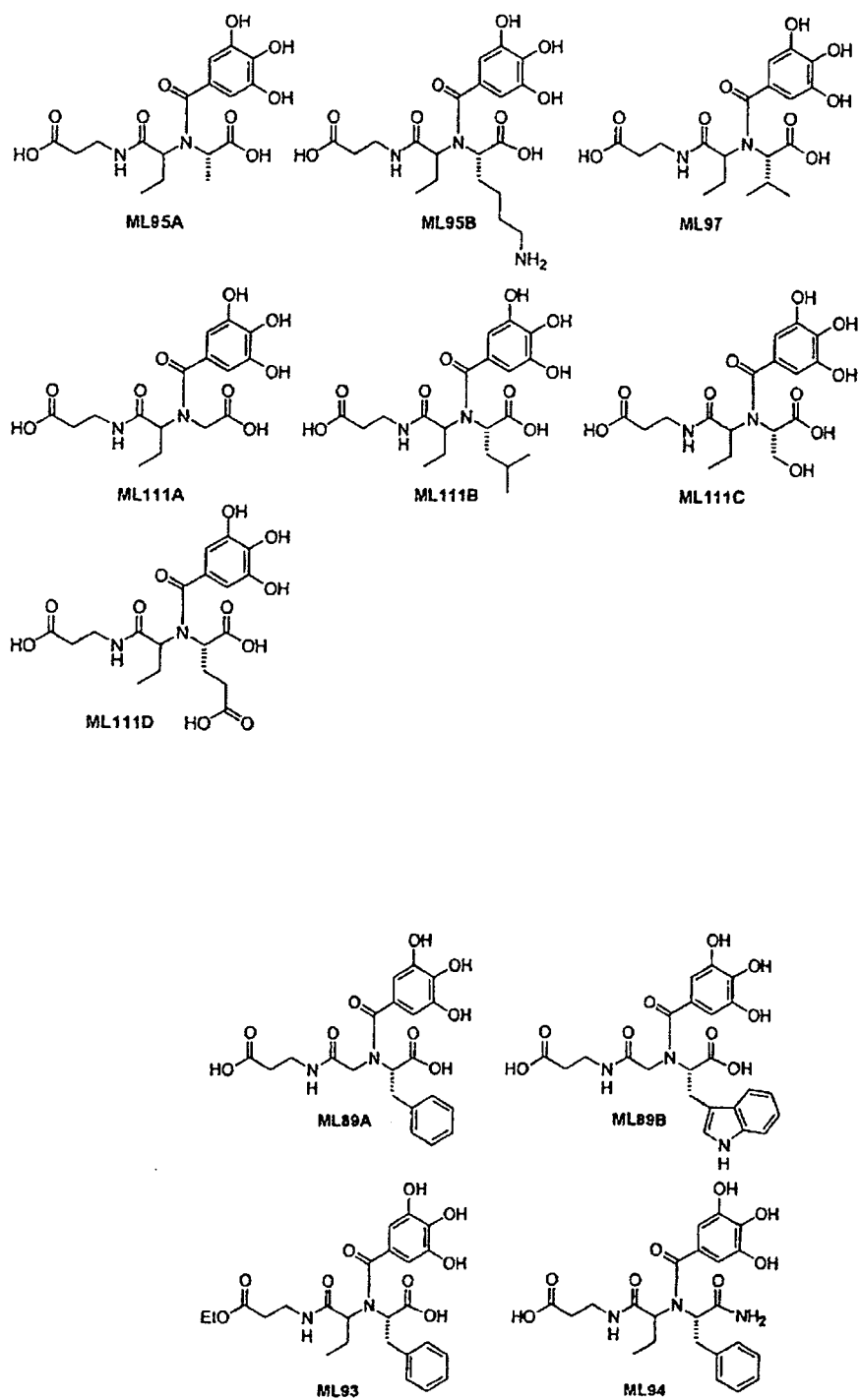
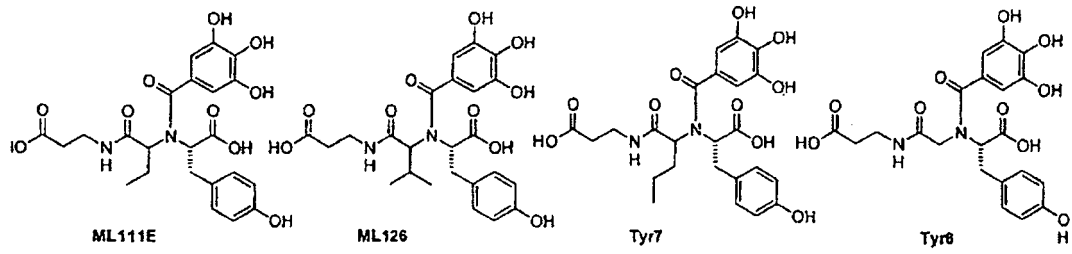


Figura 1/10 continuación



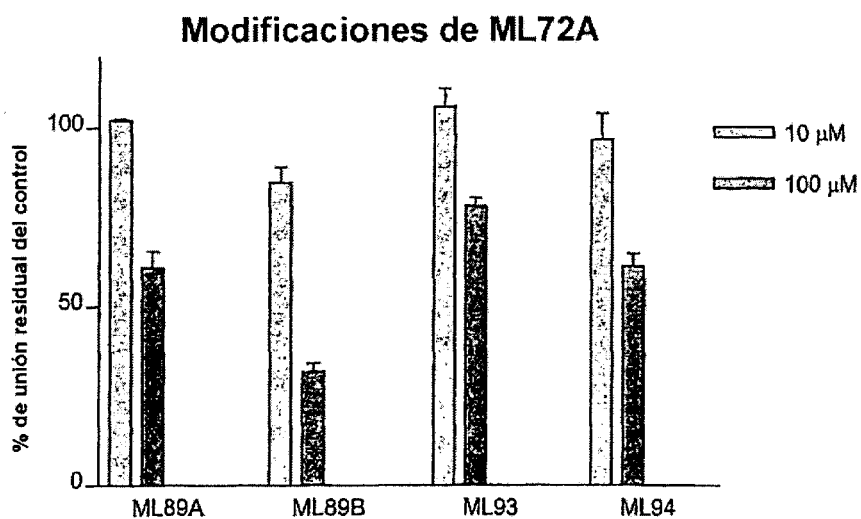
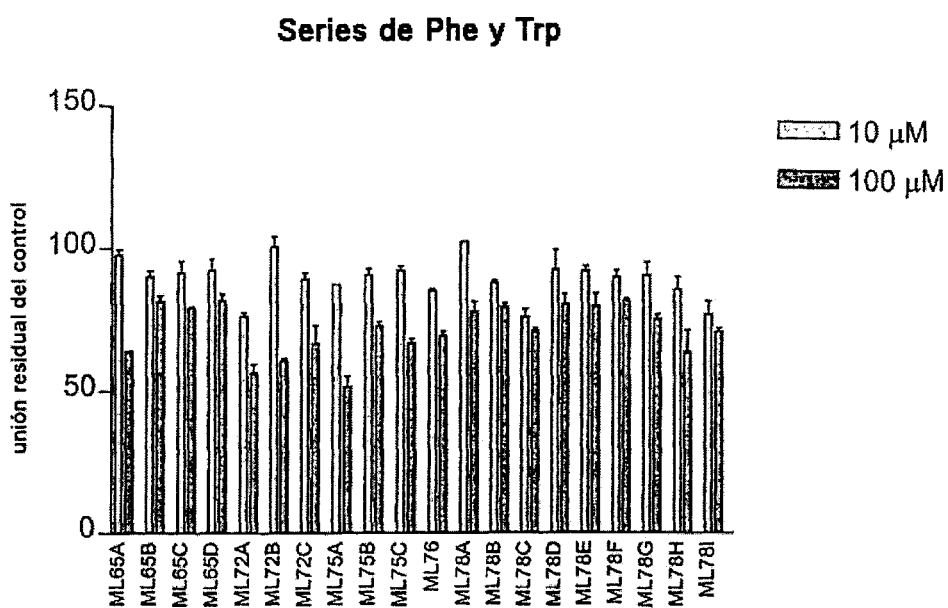
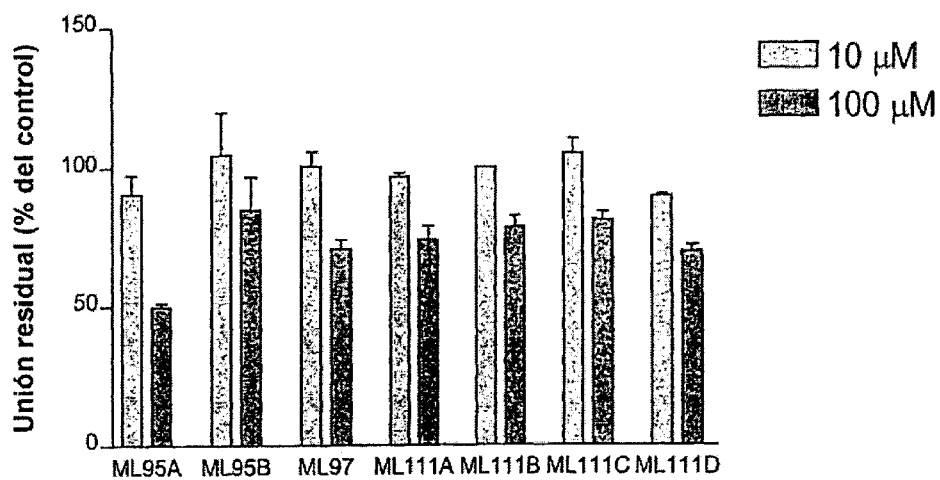


Figura 2/10

Figura 2/10 (continuación)

Detección de aminoácidos



Serie de Tyr

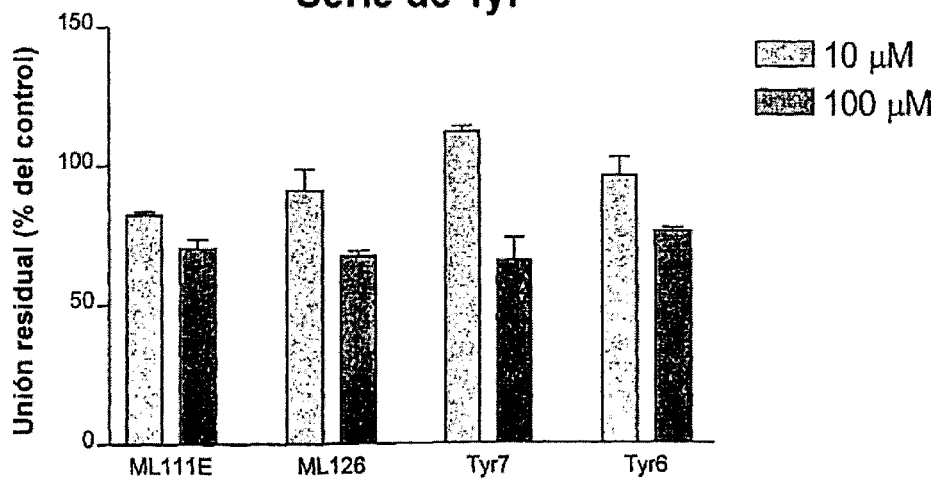
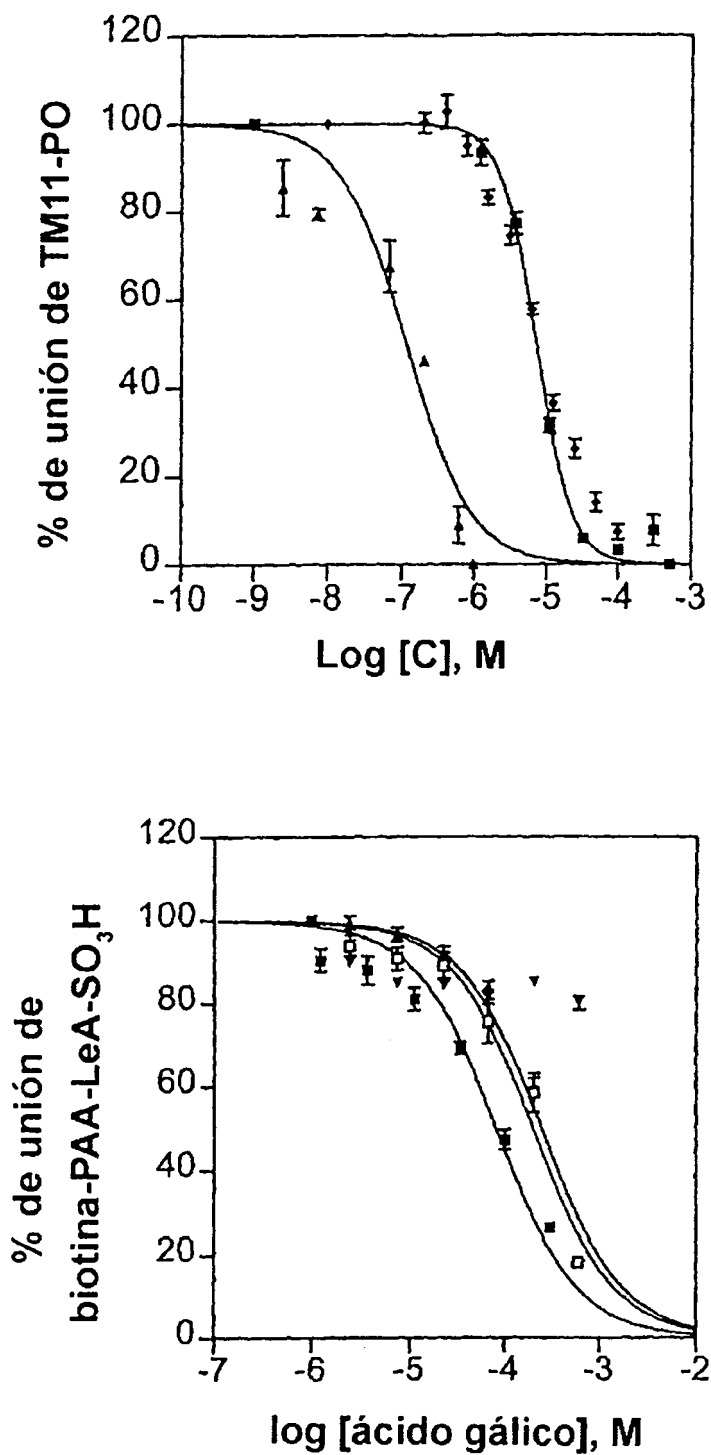


Figura 3/10

Evaluación *in vitro* de productos de Ugi purificados

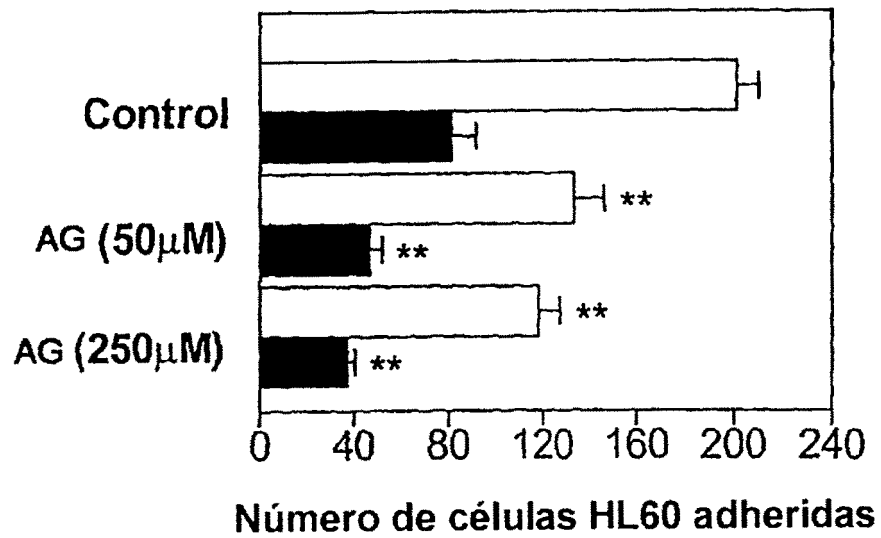
	Isómero 1	Isómero 2
	CI ₅₀ (IC del 95%)	CI ₅₀ (IC del 95%)
ML72A	12 μM (7,4-18)	5 μM (3,2-8,2)
ML75A	18 μM (8,8-36,8)	8 μM (2,5-23,8)
ML78C	8,5 μM (3,6-20,4)	12 μM (6,8-21,3)
ML78E	25 μM (10,5-57,8)	12 μM (2,9-48,8)
ML78H	10 μM (4,5-21,2)	3 μM (1,2-7,4)
ML89B	29 μM (7,5-110,5)	<i>(sólo 1 isómero)</i>
ML95A	23 μM (10,1-51,7)	23 μM (11,2-47,3)

Figura 4A y B/10

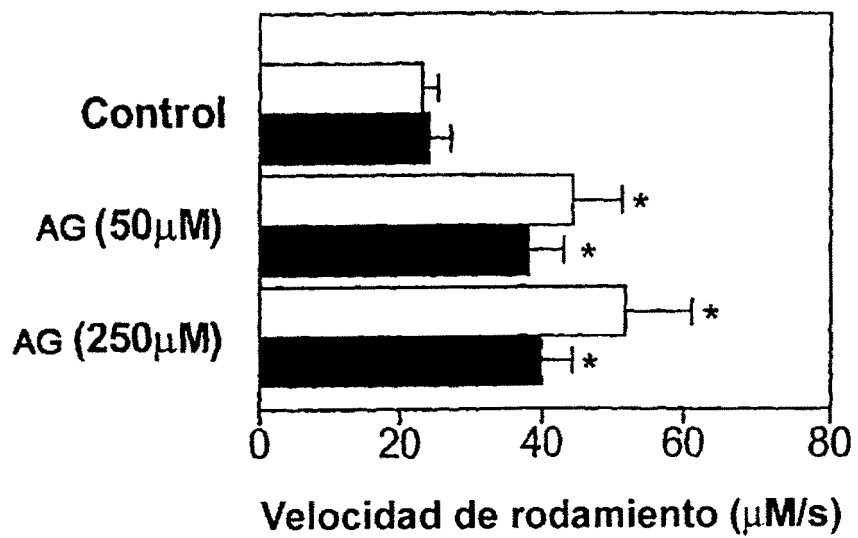


Figuras 5A y B/10

A



B



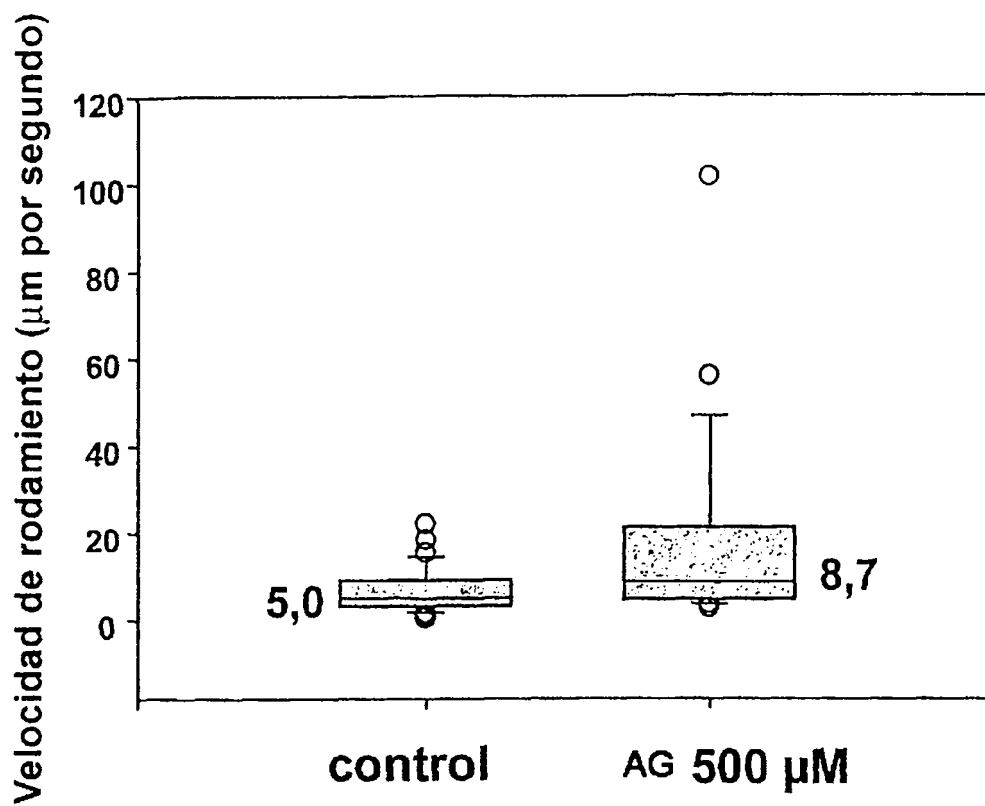
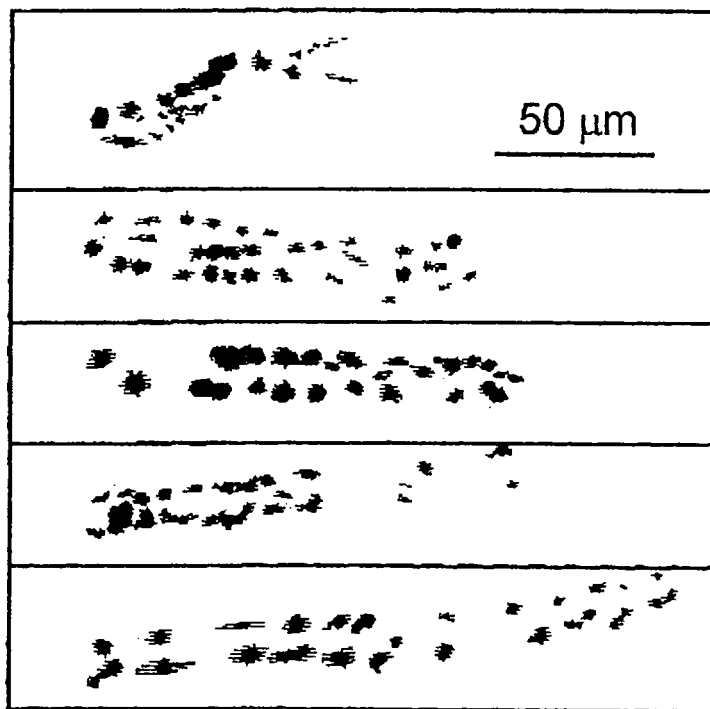


Figura 6/10

Figura 7/10

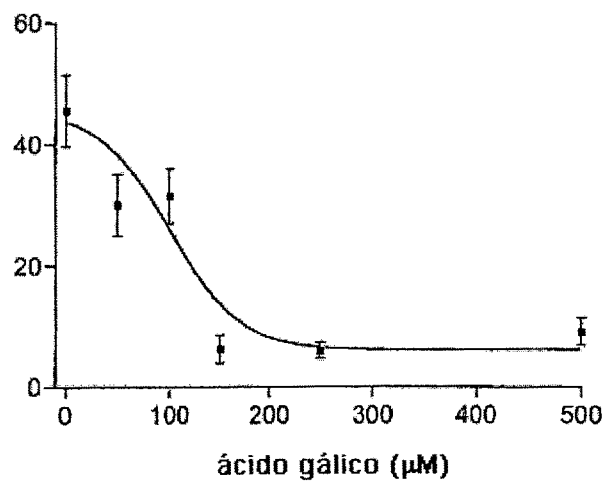
Rodamiento del conjugado



Figuras 8A y B/10

A

WT



B

ApoE^{-/-}

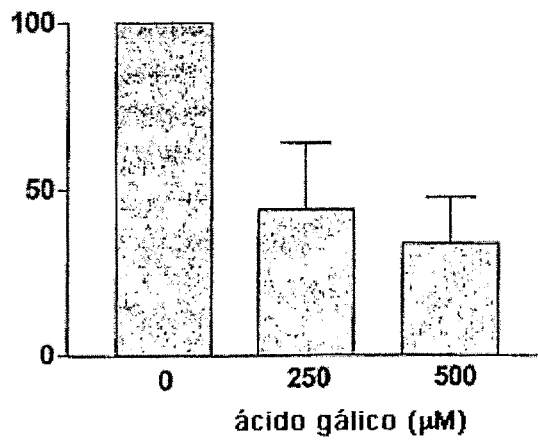


Figura 9/10

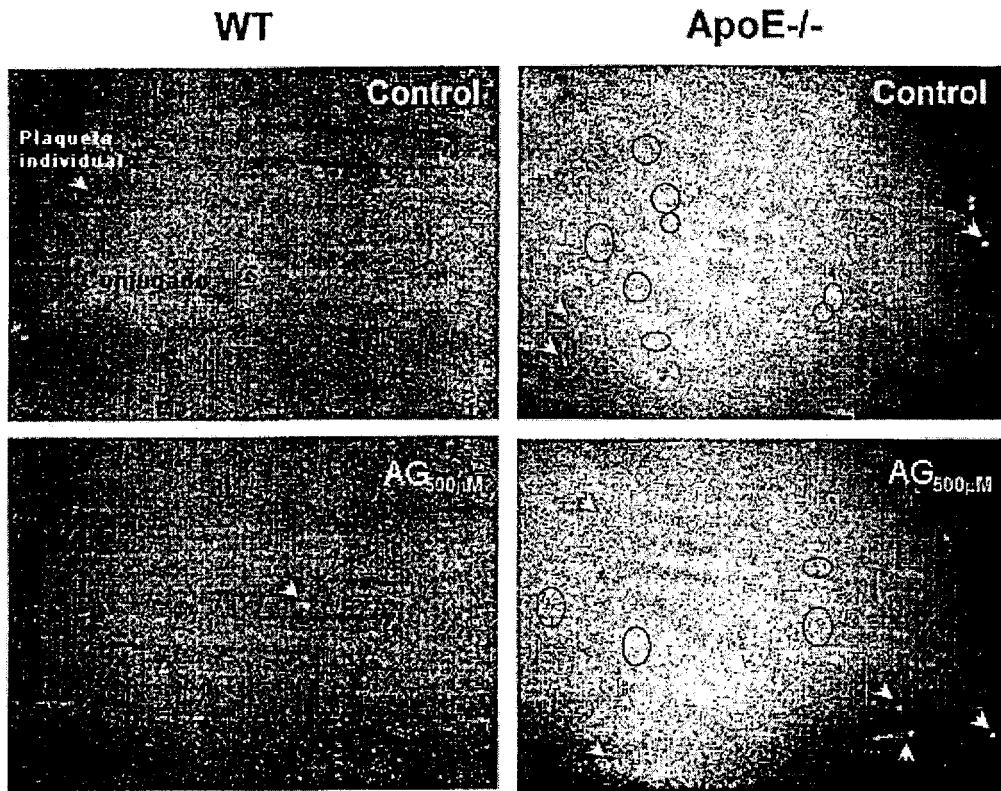
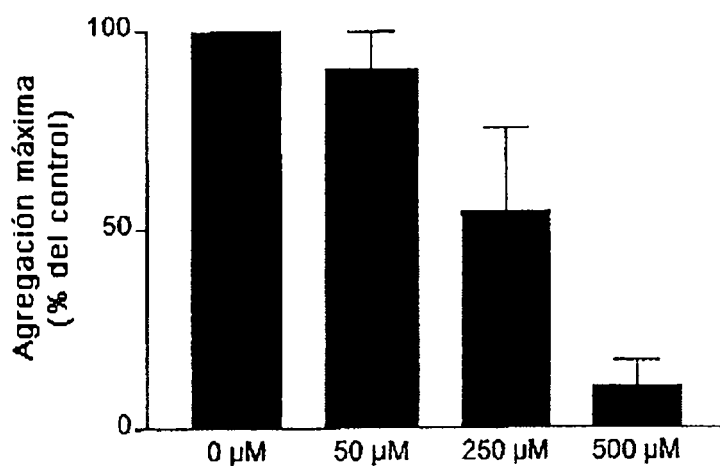


Figura 10/10

A

Efecto de AG sobre la agregación plaquetaria inducida por TRAP



B

Efecto de EGCG sobre la agregación plaquetaria inducida por TRAP

