



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 522**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/688** (2006.01) **A61K 31/663** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01) **A61P 7/02** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03727670 .6**  
96 Fecha de presentación : **14.05.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1503800**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **Tratamiento y prevención del daño tisular asociado a la producción de proteína C-reactiva aumentada.**

30 Prioridad: **15.05.2002 GB 0211136**

73 Titular/es: **Pentraxin Therapeutics Limited  
Finance Division University  
College London Gower Street  
London WC1E 6BT, GB**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.02.2010**

72 Inventor/es: **Pepys, Mark, B.**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.02.2010**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

**ES 2 333 522 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento y prevención del daño tisular asociado a la producción de proteína C-reactiva aumentada.

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un medicamento para el tratamiento o la prevención del daño tisular en un sujeto, especialmente en el hombre que presente una afección inflamatoria o de daño tisular. Se proporcionan compuestos para el tratamiento o la prevención de dicho daño tisular en virtud de su capacidad para inhibir la unión de la proteína C-reactiva (CRP) *in vivo* a ligandos autólogos y extrínsecos.

### **Antecedentes de la invención**

La proteína C-reactiva es una proteína (CRP) plasmática normal de la familia proteica de las pentraxinas, siendo otro miembro de las cuales una molécula muy similar, el componente P amiloide del suero (SAP) (1). La CRP es la clásica proteína de la fase aguda, cuya concentración circulante aumenta de forma importante en respuesta a la mayoría de las formas de inflamación, daño tisular e infecciones, correlacionándose estrechamente los valores obtenidos, en la mayoría de las situaciones, con el grado y actividad patogénica (2). La CRP es una proteína dependiente del calcio, que se une a un ligando, siendo los residuos de fosfocolina (3) a los que se unen con una mayor afinidad, pero también se une a otros. Se une a muchos de estos ligandos con gran avidez. Los ligandos conocidos para la CRP incluyen tanto estructuras autólogas como extrínsecas. Los ligandos autólogos incluyen lipoproteínas plasmáticas originales (4, 5) y modificadas, membranas celulares dañadas, (6), distintos fosfolípidos diferentes y compuestos relacionados (7), y pequeñas partículas ribonucleoproteicas nucleares (8, 9). Los ligandos extrínsecos incluyen muchos componentes glicanos, fosfolípidos y otros, de microorganismos, tales como componentes somáticos y capsulares bacterianos, hongos y parásitos, así como productos vegetales (10-15). Cuando CRP se ha unido a sus ligandos, puede activar el complemento mediante la clásica vía a través de Clq (16-19), obteniendo la activación y fijación de C3, la principal molécula de adhesión del sistema del complemento (20, 21), así como la implicación de la fase lítica terminal C5-C9 (22).

Aunque trabajos clínicos muy iniciales (23) sugirieron que CRP podría contribuir posiblemente a la inflamación, y subsiguientes estudios experimentales animales se interpretaron como demostrativos de papel proinflamatorio para CRP, no ha sido hasta hace poco que se ha mostrado evidencia directa de que no existe ninguna implicación de la CRP en procesos de inflamación y daño tisular. Existen algunos informes de la precipitación de la CRP en lesiones inflamatorias y necróticas, y de la asociación entre CRP y la activación del complemento (24-30). Sin embargo, ninguno de estos estudios muestra directamente que CRP sea responsable del daño tisular, y el único estudio de la precipitación en tiempo real de la CRP en los tejidos humanos en pacientes vivos, mostró que tuvo lugar sólo en cantidades pequeñísimas, si es que lo hubo en alguna (31). Verdaderamente, el trabajo publicado que examina directamente el papel de la CRP en modelos experimentales de la enfermedad, indica que la CRP puede tener un papel antiinflamatorio que regula por disminución la infiltración de células inflamatorias y reduce el daño tisular (32, 33). Esto concuerda con el hallazgo de que la CRP cuando forma un complejo es relativamente ineficaz para generar la fase terminal de la activación del complemento y que la implicación de la CRP regula por disminución otros aspectos inflamatorios de la activación del complemento (34, 35). Trabajos muy recientes en distintos modelos que implican el manejo de células apoptóticas, indican también que CRP tiene propiedades antiinflamatorias (36). No existe, por lo tanto, consenso con respecto al papel de la CRP *in vivo* y la opinión predominante es que puede ser antiinflamatoria. En general, la asociación de aumento de la producción de CRP con la situación de la enfermedad, se ha interpretado hasta la fecha basándose en que la producción de CRP refleja la gravedad de la patología subyacente y/o la presencia de complicaciones intercurrentes. Sin embargo, hemos demostrado recientemente de forma inequívoca que la CRP puede exacerbar el daño tisular isquémico *in vivo*, mediante un mecanismo que depende del complemento, estableciendo que la inhibición de la unión de CRP *in vivo* constituye una meta potencialmente importante (37). Este es el objeto de la solicitud de la patente US con el número de serie 0119370.5

La aterosclerosis predomina extensamente en los países desarrollados y sus complicaciones más importantes de infarto miocárdico e ictus representan un tercio de todas las muertes. Aunque ha habido avances en la comprensión de algunos aspectos de la patogénesis y en los tratamientos profilácticos y de último recurso, la carga personal, social y económica de estas situaciones sigue siendo enorme. De modo similar, las enfermedades inflamatorias crónicas de etiología desconocida son habituales, debilitantes, caras y a menudo peligrosas de tratar sintomáticamente, así como incurables y a menudo con un acortamiento de la esperanza de vida. Por ejemplo, la artritis reumatoide afecta a aproximadamente 4% de la población con edad superior a los 50 años, siendo dolorosa y provocando discapacidad severa, se asocia con una mortalidad prematura significativa. La carga del cáncer es muy pesada, representando alrededor de un tercio de todas las muertes en los países desarrollados, y la gravedad e importancia de las enfermedades infecciosas a través del mundo, es evidente. Existe necesidad de un compromiso para nuevos medicamentos con objeto de reducir la gravedad y prolongar la supervivencia en todas estas distintas situaciones.

### **Sumario de la invención**

De acuerdo con esto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente para utilizar en medicina, particularmente para la preparación de una composición para el tratamiento o la prevención del daño tisular en un individuo que presente una situación inflamatoria o de daño tisular. El agente comprende dos ligandos unidos

## ES 2 333 522 T3

covalentemente mediante un enlazador, de manera que se forma un complejo con diversas moléculas de proteínas C-reactivas (CRP) en su presencia, el cual a agente posee la estructura general Ligando-Enlazador-Ligando,

5 en la que cada ligando puede unirse mediante un sitio de unión del ligando presente en la molécula CRP y que presenta independientemente la fórmula general



15 en la que R comprende una amina, unida opcionalmente al -O- mediante un grupo alquileo; en la que la amina es trimetilamonio, un dimetilamonio aminometilo o NH<sub>2</sub>, y en la que el enlazador posee una longitud de cadena de entre 5 a 7 átomos. Los ligandos son los mismos o diferentes.

20 Sorprendentemente, se ha encontrado que los agentes según la presente invención, son potentes para inhibir la unión del ligando a la CRP. Se ha demostrado que CRP juega un papel patogénico directo en una situación de enfermedad, potenciando específicamente el grado de daño miocárdico producido por la alteración isquémica. Este papel patogénico puede tratarse o prevenirse utilizando un medicamento que pueda inhibir la unión de CRP a su ligando diana *in vivo*. Sin pretender de teorizar y tal como se describe con mayor detalle en la presente memoria, se cree que la inhibición de la unión de CRP a su ligando diana *in vivo* podría prevenir que CRP activara el complemento y de este modo, reducir o eliminar los efectos deletéreos de la activación del complemento mediada por CRP, que se cree en la actualidad responsable del daño tisular en las condiciones en que va a tratarse, según la presente invención.

30 En una forma de realización según la invención, la situación de daño tisular y/o inflamatoria comprende la aterosclerosis.

Aunque la CRP se produce en grandes cantidades en respuesta a muchas formas de daños tisulares, inflamación e infección, su concentración circulante es extremadamente baja en individuos sanos normales y en la mayoría de los individuos en la población general (38,39). Hasta recientemente, se consideró que estos niveles bajos no tenían ningún significado clínico, y los ensayos generalmente disponibles para CRP se diseñaron sólo para detectar y medir la CRP circulante cuando la concentración excedía de 5 o incluso de 10 mg/l, que representa el 90-99% del intervalo que se encontró en los individuos sanos. Sin embargo, se ha acumulado mucho trabajo desde nuestros descubrimientos originales, que empezaron en 1994 (40), que muestra de modo convincente que, incluso dentro del intervalo de referencia para CRP, entre los valores previamente considerados como “normales”, se asoció muy significativamente un aumento de la producción de CRP con eventos aterotrombóticos, incluyendo el infarto miocárdico, el ictus y la progresión de la enfermedad vascular (41-49).

45 Los mecanismos que subyacen a la asociación entre una producción de CRP que ha aumentado modestamente y el desarrollo, progresión y complicaciones de la aterosclerosis, no se conocen. Sin embargo, es probable que sea muy relevador que se sepa que la aterosclerosis constituye una situación inflamatoria, y que CRP y el complemento activado se codepositan en virtualmente todas las placas ateromatosas (29, 50). Además, la CRP se une selectivamente a la lipoproteína de baja densidad (LDL), la lipoproteína más importante que se acumula en las lesiones arteriales de la aterosclerosis (4, 5), y la unión de CRP a la LDL “modificada”, que está parcialmente degradada, tal como se encuentra en las placas, activa de forma intensa el complemento (51). La CRP promueve la absorción de LDL nativa por los macrófagos y las células musculares lisas vasculares *in vitro* para formar células espumosas, que constituyen características típicas y patológicas importantes de las lesiones ateroscleróticas *in vivo*. Finalmente, existe evidencia de que la CRF puede estimular a los macrófagos, que son las células más abundantes que infiltran las placas ateromatosas, para producir un factor tisular (TF) (52). TF es el iniciador de la coagulación sanguínea, responsable de la iniciación de la formación de los trombos en las placas rotas que ocluyen actualmente las arterias ateroscleróticas y precipitan el infarto miocárdico o el ictus. La CRP puede, por tanto, contribuir directamente a la patogénesis, progresión y a las complicaciones clínicamente significativas de la aterosclerosis.

55 Una vez que el infarto miocárdico ha tenido lugar, todos los pacientes experimentan una respuesta importante de fase aguda de la CRF, y el valor máximo alcanzado constituye un pronóstico muy significativo de las consecuencias, de sus complicaciones y de la (eventual) muerte, en los días, semanas y meses posteriores (53-59). Dada la co-precipitación universal de la CRP y del complemento activado dentro del infarto mismo, esto sugiere intensamente que la CRP contribuye de forma importante al grado y gravedad de la patología isquémica (28, 60, 61). Los valores CRP, y particularmente la producción acumulativa de CRP a lo largo del tiempo, constituyen también predictores significativos de la progresión, gravedad y complicaciones de las enfermedades inflamatorias de etiología desconocida tales como la artritis reumatoide (62) y la enfermedad de Crohn, de las infecciones parasitarias, fúngicas, víricas y bacterianas crónicas, de las enfermedades necróticas e isquémicas tales como lapancreatitis aguda, y de muchas formas de cáncer (revisado en 1, 2). Incluso en el contexto de la cirugía electiva, los valores preoperatorios de CRP y postoperatorios de la producción de CRP predicen las complicaciones y consecuencias (63). Nuestras observaciones en la aterosclerosis,

## ES 2 333 522 T3

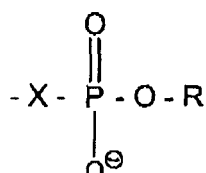
y especialmente en el modelo de infarto miocárdico de rata exacerbado por la CRP humana, indican ahora que la CRP puede actualmente contribuir activamente a la gravedad de la enfermedad en todas estas distintas situaciones.

5 En otra forma de realización, la situación de daño tisular y/o inflamatoria se selecciona de entre una infección, una complicación alérgica de la infección, una enfermedad inflamatoria, isquémica u otra necrosis, daño tisular traumático y neoplasia maligna.

10 Por ejemplo, si la situación es una infección, puede consistir en infección no protozoaria, tal como una infección vírica o bacteriana. Si la situación es una complicación alérgica de la infección, ésta puede seleccionarse de entre la fiebre reumática, la glomerulonefritis y el eritema nudoso leproso. Si la situación es una enfermedad inflamatoria, puede seleccionarse de entre artritis reumatoide, artritis (reumatoide) crónica juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, vasculitis sistémica, polimialgia reumática, enfermedad de Reiter, enfermedad de Crohn y fiebre familiar mediterránea. Si la situación implica la isquemia u otra necrosis, puede seleccionarse de entre infarto miocárdico, ictus isquémico, embolia tumoral y pancreatitis aguda. Si la situación es traumática, puede seleccionarse de entre cirugía aguda o electiva, quemaduras, daños físicos o químicos, y fracturas. Si la situación es la neoplasia maligna, puede seleccionarse a partir del linfoma, enfermedad de Hodkin, carcinoma y sarcoma.

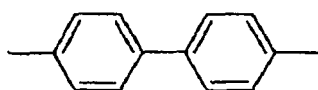
20 Según la presente invención, los medicamentos que inhiben la unión de CRP a sus ligandos *in vivo*, y/o que reducen su disponibilidad para dicha unión *in vivo*, bloquearán la contribución de CRP a la patogénesis o a la enfermedad, y por tanto, reducirán el grado y gravedad de la patología, reduciendo síntomas y prolongando la supervivencia. La presente invención proporciona compuestos con dichos efectos, para la preparación de una composición que prevea y/o trate la aterosclerosis y sus complicaciones, incluyendo el infarto miocárdico, el ictus y la enfermedad vascular periférica, enfermedades inflamatorias crónicas de etiología conocida y desconocida, infecciones crónicas y agudas de todo tipo, daños traumáticos incluyendo quemaduras, cirugía aguda y electiva, neoplasias malignas de todo tipo, y 25 todas las situaciones patológicas asociadas con el aumento de la producción de CRP.

30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona la utilización de un agente para la preparación de una composición para el tratamiento o prevención del daño tisular asociado con el aumento de la producción de la proteína C-reactiva (CRP), en un individuo que presente una situación de daño tisular y/o inflamatoria, seleccionada a partir de aterosclerosis, infarto miocárdico, ictus y necrosis isquémica. También se proporciona un agente para utilizarlo en dicho tratamiento. Según este aspecto, el agente comprende dos ligandos unidos covalentemente mediante un 35 enlazador, de forma que se forme un complejo con distintas moléculas de proteína C-reactivas (CRP) en su presencia, el cual agente posee la estructura general Ligando-enlazador-Ligando, en el que cada ligando puede unirse mediante un sitio de unión del ligando presente en la molécula CRP y que posee independientemente la fórmula general



45 en la que R comprende una amina, unida opcionalmente al -O- mediante un grupo alquileo; y X es O o CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>.

50 En los agentes de la presente invención según este segundo aspecto, los ligandos están unidos covalentemente mediante un enlazador. Esto permite que los ligandos estén suficientemente separados espacialmente para que diversas proteínas diana puedan unirse al agente, sin que una proteína dificulte la unión de la otra proteína o proteínas. La estructura exacta del enlazador no es crítica, aunque se prefiere típicamente que no incluya grupos reactivos. El enlazador puede comprender un hidrocarbilo lineal o ramificado que puede tener uno o más de sus átomos de carbono sustituidos opcionalmente por un heteroátomo. El enlazador puede tener una longitud de cadena del orden de 2 a 20 átomos, aunque se prefiere que sea del orden de 5 a 7 átomos. La longitud útil de la cadena y la composición química pueden determinarse empíricamente, dependiendo de la proteína con la que el agente va a formar el complejo. El enlazador es típicamente lineal y posee la estructura general: ligando-enlazador-ligando. Esto se denomina convenientemente un “palíndromo” en el contexto de la presente solicitud. El enlazador puede comprender uno o más 55 enlaces dobles, tal como se expone a continuación. Si el enlazador comprende por lo menos dos enlaces dobles, estos pueden estar conjugados y son preferentemente trans con respecto a otros. Alternativamente, el enlazador comprende uno o más grupos arileno, por ejemplo, como una mitad -Ar-Ar-. Los grupos arileno pueden ser grupos heteroarileno. Preferentemente, los grupos arileno son



65 El ligando que se utiliza en el agente de la presente invención, puede seleccionarse a partir de los ligandos conocidos porque se unen mediante el sitio de unión del ligando de CRP, ligandos cuya unión se predice mediante este sitio, basándose, por ejemplo, en la información estructural de que se dispone sobre el sitio de unión, tal como la in-

## ES 2 333 522 T3

formación cristalográfica de los rayos X, o de sus análogos estructurales. Pueden identificarse compuestos apropiados mediante el rastreo de la gran cantidad de materiales producidos a partir de las bibliotecas químicas y/o de diseños moleculares basados en la estructura. La afinidad de cada interacción del sitio individual de unión ligando-CRP no requiere ser particularmente alta, teniendo en cuenta que el ligando es específico para cada proteína diana. Es posible que sea suficiente una constante de disociación de hasta 10 milimoles. Sin embargo, resulta preferido que la constante de disociación no sea superior a 1 milimol, que sea más preferentemente inferior a 100 micromoles, y muy preferentemente sea inferior a 10 micromoles. La afinidad es preferentemente micromolar o superior. Se ha descubierto que, en el caso de CRP, la afinidad micromolar es suficiente, aunque es claramente deseable la afinidad más alta posible.

Un procedimiento que puede utilizarse para seleccionar un compuesto farmacéutico tal como se define en las reivindicaciones, para tratar o prevenir el daño tisular en un individuo que presente una situación inflamatoria y/o que dañe el tejido, comprende el contacto de la proteína C-reactiva (CRP) con un ligando suyo de prueba, bajo condiciones que permitan la unión del ligando de CRP en presencia de un compuesto de prueba; y seleccionando el compuesto de prueba como el compuesto farmacéutico, si el compuesto de prueba inhibe la unión de CRP al ligando de prueba. El compuesto de prueba, tal como se define en las reivindicaciones, comprende diversos ligandos que son los mismos o distintos y que están unidos covalentemente de forma que se forme un complejo con diversas moléculas de CRP.

Un procedimiento que puede utilizarse para la producción de un agente farmacéutico tal como el que se define en las reivindicaciones, comprende (1) la identificación de un compuesto farmacéutico mediante la selección del compuesto, tal como se describe anteriormente, y (2) la producción de un agente farmacéutico proporcionando un compuesto farmacéutico.

En la etapa de contacto del CRP con el ligando de prueba, las condiciones deben ser suficientes para permitir la unión del ligando del CRP en ausencia del compuesto de prueba. De esta forma, si la unión del ligando de CRP no tiene lugar en presencia del compuesto de prueba, o tiene lugar en un grado menor que el esperado, este efecto puede atribuirse al compuesto de prueba. Debe considerarse que la inhibición de la unión deberá llevarse a cabo ampliamente, y que no se limita a ningún mecanismo particular; cualquier reducción en el grado de unión constituye inhibición de la unión, según la presente invención. La inhibición de la unión se mide generalmente con respecto a un valor de control (máxima unión en ausencia del compuesto de prueba), y se prefiere que la  $IC_{50}$  sea micromolar baja o menor, más preferentemente nanomolar o menor. El contacto tiene lugar bajo condiciones que incluyen suficientes iones libres de calcio para permitir la unión específica de la CRP dependiente del calcio. Un tampón preferido para el contacto es la solución tamponada fisiológica. La CRP puede proporcionarse en forma pura o aislada, o incorporarse al suero total.

El orden en el que la CRP, el ligando de prueba y el compuesto de prueba se ponen en contacto conjuntamente, no es crítico. Los tres componentes pueden mezclarse en esencialmente el mismo instante, o dos de los tres componentes pueden mezclarse y quizás preincubarse antes de la adición del tercer componente. La puesta en contacto se lleva a cabo generalmente bajo condiciones en las que por lo menos, uno de los componentes, está en fase líquida. Es conveniente, sin embargo, para la CRP o el ligando de prueba, formar parte de una fase sólida, de forma que, en el procedimiento de ensayo, la separación de las fases pueda utilizarse como una técnica para separar especies unidas a partir de especies no unidas, para facilitar el ensayo con respecto al grado de unión del ligando del CRP.

De acuerdo con esto, resulta preferido un primer componente que comprende una de las CRP o el ligando de prueba, se encuentre como parte de una fase sólida, que se pone en contacto con un segundo componente, que comprende el otro como parte de una fase líquida. La etapa de ensayo para la unión del ligando de CRP puede, pues, comprender la detección de la unión del segundo componente a la fase sólida. La detección de la unión del segundo componente a la fase sólida puede realizarse detectando la presencia del segundo componente en la fase sólida, o determinando la cantidad del segundo componente que no está unida a la fase sólida, y deduciendo, a partir de la cantidad del segundo componente que se aplicó originariamente a la fase sólida, la cantidad que actualmente se une a la fase sólida.

La fase sólida comprende preferentemente el primer componente unido a un soporte sólido, el cual soporte sólido puede incluir un soporte articulado o una superficie sólida. De una forma conveniente, la superficie sólida comprende una superficie interior de un contenedor tal como un pocillo de una placa de microtitulación.

De modo conveniente, la etapa de ensayo para la unión del ligando de la CRP comprende además el lavado de la fase sólida para eliminar el material no unido.

El segundo componente puede marcarse con un marcador detectable, tal como un radiomarcador, un fluorocromo o una enzima, tal como se considera en la memoria. Alternativamente, la unión del segundo componente a la fase sólida puede detectarse inmunológicamente mediante unión del anticuerpo al segundo componente unido a la segunda fase, o mediante determinación inmunológica cuantitativa de la cantidad del segundo componente no unido a la fase sólida.

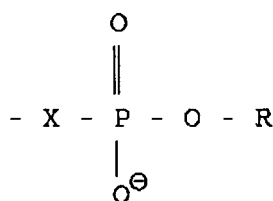
Los ensayos *in vitro* de máculas, los procedimientos de rastreo de elevadas y escasas cantidades de materiales producidos para detectar compuestos tales como los definidos en las reivindicaciones, con capacidad para inhibir la unión de CRP, del hombre o de otros animales, a cualquiera de y a todos sus ligandos químicos y biológicos conocidos, constituyen procedimientos apropiados para rastrear bibliotecas de compuestos naturales de origen orgánico, inorgánico y biológico, así como de bibliotecas químicas creadas mediante síntesis convencionales o mediante cualquier forma de química combinatoria. Son también apropiados para el análisis del mecanismo de inhibición de la

## ES 2 333 522 T3

unión de la CRP, y para la evaluación de la potencia de la inhibición durante el desarrollo químico y de la química medicinal de productos farmacéuticos potenciales o actuales, a partir de moléculas originales identificadas mediante rastreo o ensayos de manchas. Los procedimientos *in vivo* están disponibles para ensayar los efectos y potencia de los compuestos inhibitorios de la CRP sobre la unión de ésta, el recambio plasmático y el catabolismo en el hombre y en los animales experimentales, y en los modelos experimentales de enfermedades que son exacerbadas por la CRP humana.

Un procedimiento para seleccionar un compuesto farmacéutico tal como el definido en las reivindicaciones, para tratar o prevenir el daño tisular a partir de varios compuestos de prueba, comprende proporcionar una colección de zonas reactivas y diversos compuestos de prueba, y seleccionar el compuesto farmacéutico tal como se define en las reivindicaciones, llevando a cabo el procedimiento anterior de seleccionar el compuesto en cada zona reactiva.

Cada ligando del agente según el segundo aspecto de la presente invención, tiene de forma independiente la fórmula general



en la que X es O o CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, y R comprende una amina. En el presente contexto, la amina puede ser una amina primaria, secundaria o terciaria, o un amonio cuaternario. La amina puede ser alifática o aromática, incluyendo compuestos heterocíclicos e en los que el grupo nitrógeno forma parte de un anillo. La amina puede estar unida al -O- mediante un grupo alquileo tal como un grupo metileno o etileno, los cuales grupos pueden opcionalmente sustituirse con un sustituyente tal como 3 hidroxil,1-ciclopentanilo o 4 hidroxil,1-ciclohexanilo. Preferentemente, la amina comprende un trimetilamonio, un amino metil dimetil amonio, o NH<sub>2</sub>. Ejemplos de estos ligandos se presentan a continuación como los compuestos 2, 3, 7 y 8, y se consideran con mayor detalle en los Ejemplos. En una forma de realización particularmente preferida de cualquier aspecto de la invención, cada ligando comprende un grupo [(trimetilamonio) etoxi fosfinil] oxi. De esta forma, el agente comprende preferentemente 1,6-bis [([(trimetilamonio) etoxi]fosfinil)-oxi] hexano, de forma coloquial fosfocolina-hexano-fosfocolina, abreviado en la presente memoria como PCHPC. Los ejemplos de estos ligandos se presentan a continuación como compuestos 2, 3, 7 y 8 y se consideran con mayor detalle en los Ejemplos.

En otra forma de realización, la amina puede comprender un indol, adenina o guanina. Los ejemplos de dichos ligandos se presentan en los Ejemplos como compuestos n° 1, 5 y 6.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse comprendiendo un agente según la presente invención que incorpora opcionalmente un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. La naturaleza exacta y las cantidades de los componentes de dichas composiciones farmacéuticas pueden determinarse empíricamente y dependerán en parte de la vía de administración de la composición. Las vías de administración para los receptores incluyen la oral, bucal, sublingual, por inhalación, tópica (incluyendo la oftálmica), rectal, vaginal, nasal y parenteral (incluyendo la intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea e intraarticular). Debido a la conveniencia de su utilización, las dosificaciones según la presente invención se administran preferentemente de forma oral, pero esto dependerá del medicamento actual y de su biodisponibilidad.

### Breve descripción de las figuras

La invención se describirá a continuación con mayor detalle, únicamente a título de ejemplo y haciendo referencia a las figuras adjuntas y a los Ejemplos siguientes.

La figura 1 representa la inhibición de la unión de CRP al CPS inmovilizado mediante la fosfocolina y el PCHPC (número de lote GP44), mostrando una IC<sub>50</sub> 10 veces menor para PCHPC que la fosfocolina.

La figura 2 representa una visualización de pares de moléculas de CRP entrecruzadas por el PCHPC, en la que la fig. 2a muestra micrografías electrónicas coloreadas negativamente de sólo la CRP pentamérica humana nativa. La fig 2b muestra dímeros de CRP formados después de mezclar con PCHPC, y la figura 2c muestra una representación en bandas de la estructura cristalina, mediante rayos X, del complejo CRP-PCHPC, que muestra dos moléculas CRP pentaméricas que interactúan enfrentadas; el par de átomos de calcio en la cavidad de unión del ligando de cada protómero, se muestran como esferas. La estructura que corresponde a la densidad electrónica de las moléculas de PCHPC, no se muestra.

## ES 2 333 522 T3

La figura 3 representa el efecto de PCHPC (número de lote RMM) sobre la concentración de CRP medida mediante MIRA.

La figura 4 representa la activación del componente C3 del complemento en el suero entero, que se muestra mediante 2D inmunoelectroforesis, y su inhibición por PCHPC.

La figura 5 representa la formación de células espumosas por las células musculares lisas vasculares cultivadas *in vitro* con la lipoproteína de baja densidad (LDL) y CRP.

La figura 6 representa la inhibición de la formación de las células espumosas por las células musculares lisas vasculares cultivadas *in vitro* en presencia de LDL y CRP, junto con PCHPC.

La figura 7 representa el efecto de CRP sobre la respuesta vascular a la fenilefrina (PE) y la inhibición por PCHPC.

La figura 8 representa que la CRP protege a los ratones contra la infección letal por *Streptococcus pneumoniae*.

La figura 9 representa que PCHPC abroga completamente el efecto protector de CRP contra la infección letal por *Streptococcus pneumoniae in vivo*.

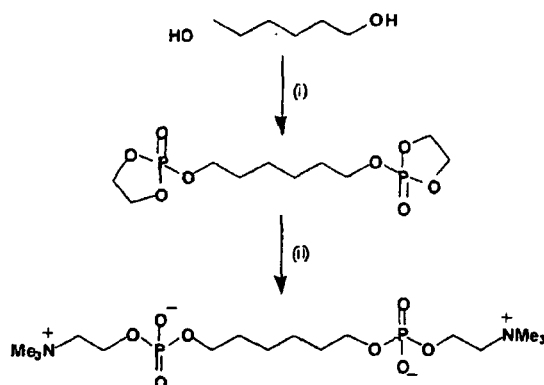
La figura 10 representa que PCHPC no afecta a la depuración de la CRP humana a partir de la circulación de ratones *in vivo*, que se muestra en la figura 10 (a) mediante electroinmunoensayo, a pesar de que inicialmente forma complejo con la CRP, tal como se muestra claramente en la fig 10 (b) (en la parte inferior), por pérdida de la inmunoreactividad de CRP en el ensayo MIRA.

### Descripción detallada de la invención

#### Ejemplos

La mitad fisiológica unida por CRP con afinidad más intensa es fosfocolina, que es un componente de algunos de los ligandos extrínsecos y de alguno de los ligandos macromoleculares autólogos de la CRP. Según una forma de realización de la presente invención, las moléculas de bisfosfocolina que comprenden dos grupos principales de fosfocolina unidos mediante una estructura enlazador, constituyen potentes inhibidores de la unión de CRP a todos sus ligandos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Un ejemplo típico de esta invención es 1,6-bis [((trimetilamonio)etoxi]fosfinil)-oxi]hexano, de forma coloquial fosfocolina-hexano-fosfocolina, abreviado en la presente memoria como PCHPC. La estructura y una síntesis típica de esta molécula se muestran a continuación.

#### 1,6-bis [((trimetilamonio) etoxi]fosfinil)-oxi] hexano



Reactivos y condiciones: (i) clorofosfato de etileno, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DCM/THF, -10°C a RT, 6 horas. (ii) MeCN, Me<sub>3</sub>N, 100°C (calentamiento mediante microondas), tubos de ensayo precintados, 30 minutos.

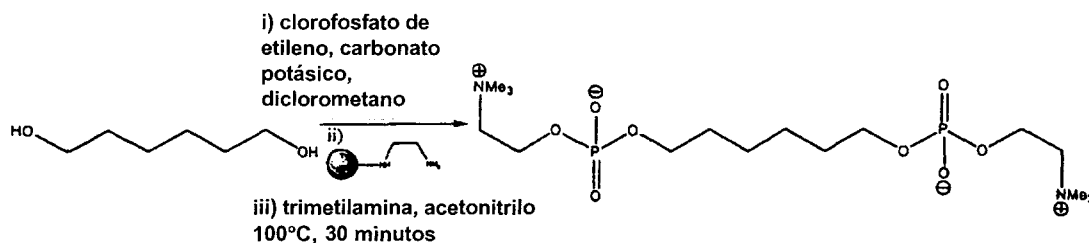
Se añadieron gota a gota (19,34 ml, 0,212 moles) de clorofosfato de etileno a una suspensión agitada de carbonato potásico anhidro (29,84 g, 0,216 moles) en diclorometano recién destilado (50 ml) a -10°C bajo una atmósfera de argón. Se añadió a esta mezcla, gota a gota, durante 10 minutos, una solución de hexano 1,6-diol (5 g, 42,34 mol) en tetrahidrofurano recién destilado (10 ml), y la suspensión resultante se sometió a agitación a -10°C. Se calentó la reacción a 25°C durante 4 horas. Después de 6 horas, t.l.c. indicó la presencia de un compuesto principal que no constituía material inicial. La mezcla reactiva se diluyó con diclorometano (250 ml), se filtró y se vertió en una solución tampón de pH 7 (200 ml). La capa orgánica se lavó con solución saturada de carbonato ácido de sodio (200 ml) y las

## ES 2 333 522 T3

capas acuosas se extrajeron con diclorometano (100 ml) y cloroformo (100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), filtraron (disolvente: diclorometano) y se concentraron *al vacío* para obtener el éster bisfosfato como un pálido aceite de color amarillo. Este aceite (*circa* de 9 g) se disolvió en acetonitrilo anhidro (60 ml) y se distribuyó entre 30 viales (Smith Process Vials™) (de 5 ml). Se añadió trimetilamina (2 ml,  $-10^\circ\text{C}$ ) a cada recipiente, antes de que los viales se sellaran y se calentaran a  $100^\circ\text{C}$  durante 30 minutos bajo irradiación de microondas (300 W). Después de enfriarlos viales se abrieron, (precaución), se combinaron (disolvente: metanol), se concentraron *al vacío* y se secaron exhaustivamente bajo alto vacío para obtener 1,6-bis [[(trimetilamonio)etoxi]fosfinil]-oxi]hexano como una espuma de color amarillo pálido (11,8 g).

*Procedimientos experimentales generales.* Se llevaron a cabo experimentos de calentamiento mediante microondas en un "Personal Chemistry Smith Synthesizer" en recipientes de vidrio dedicados (disponibles en Personal Chemistry, Uppsala, Suecia). Se llevó a cabo una cromatografía en capa fina sobre placas prevestidas con el lomo de vidrio p(Merck Kieselgel 60 F254). La visualización se realizó mediante una solución acuosa de molibdato de amonio o de permanganato potásico, seguido por calentamiento. Todas las reacciones húmedas y/o sensibles al aire se llevaron a cabo en recipientes de vidrio que se habían sometido a secado en la estufa ( $150^\circ\text{C}$ ), bajo una atmósfera inerte de argón. A partir del hidruro cálcico, se destilaron acetonitrilo y diclorometano. El tetrahydrofurano se destiló a partir del sodio en presencia de benzofenona. Otros reactivos y disolventes se utilizaron tal como fueron suministrados, o se purificaron mediante procedimientos estándares. Se preparó tampón pH 7 disolviendo ortofosfato dihidrógeno de potasio (212,5 g) e hidróxido sódico (36,25 g) en agua (2375 ml).

A continuación se describe un procedimiento sintético mejorado.



El clorofosfato de etileno (15,1 g, 106 mmoles, 5 eq) se añadió gota a gota a una suspensión con agitación de carbonato potásico anhidro (14 g, 107,6 mmol, 5,1 eq) en diclorometano recién destilado (20 ml) a  $-10^\circ\text{C}$  bajo atmósfera de argón. Una solución de 1,6-hexanediol (2,5 g, 22 mmoles) en tetrahydrofurano recién destilado (10 ml) se añadió gota a gota a esta mezcla durante 10 minutos, y la suspensión resultante se agitó a  $-10^\circ\text{C}$ . La reacción se calentó a  $25^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Después de 16 horas, (se comprobó, mediante LC-MS que) la reacción se había completado. A la mezcla reactiva se añadió resina de *N*-(2-Aminoetil)-aminoetil poliestireno (ca. 22 g de un polímero cargado de 2,8 mM/g, equivalente a 62 mmol de clorofosfato de etileno teórico que no ha reaccionado), agitándose la mezcla resultante a  $20^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Después de que hubo transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró mediante un embudo de aglomerado, y el filtrado se evaporó para obtener el éster bifosfato como un aceite amarillo pálido (cuantitativo). Algo de este aceite (ca.4 g) se disolvió en acetonitrilo anhidro (40 ml) y se distribuyó entre 20 viales (Smith Process Vials™) (de 5 ml). Trimetilamina fría, condensada, (2 ml), se añadió a cada vial antes de que los viales se precintaran y calentaran a  $100^\circ\text{C}$  durante 30 minutos bajo irradiación de microondas (300 W). Después de enfriar los viales se abrieron (precaución) y los sobrenadantes se combinaron. El residuo que permaneció en el fondo de cada vial se disolvió en metanol y se combinó con los sobrenadantes que se evaporaron y se secaron exhaustivamente bajo alto vacío, para producir 1,6-bis[[(trimetilamonio)etoxi]fosfinil]-oxi]hexano como una espuma de color amarillo pálido (6 g, cuantitativo).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, MeOD): 4.27 (2H, br,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.89 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.65 (2H, br,  $\text{CH}_2\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.24 (9H, s,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.65 (2H, br,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OP}$ ), 1.45 (2H, br,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OP}$ ).

La potente capacidad de PCHPC para inhibir la unión *in vitro* de CRP a su mejor ligando macromolecular extrínseco conocido, el polisacárido-C somático neumocócico (CPS), se muestra en la fig 1. El CPS se inmovilizó covalentemente sobre placas microtituladoras de plástico y se pudo demostrar fácilmente la típica unión a él, dependiente del calcio, de la CRP humana pura marcada con  $\text{I}^{125}$ . Esta unión fue inhibida claramente por la misma fosfocolina en solución, con una  $\text{IC}_{50}$  de aproximadamente  $20\ \mu\text{M}$ , mientras que, contrariamente a esto, PCHPC inhibió la unión de CRP con una  $\text{IC}_{50}$  diez veces menor de aproximadamente  $2\ \mu\text{M}$  (fig 1). Además, la medición directa mediante microcalorimetría isotérmica de la  $K_d$  para PCHPC con CRP, dio valores, en experimentos repetidos, de 0,469, 0,679, 0,73 y  $0,855\ \mu\text{M}$ , cuando se comparó con los valores para  $K_d$  de la fosfocolina con CRP de 1,6, 2,02 y  $3,8\ \mu\text{M}$ .

La potencia superior de PCHPC como un ligando para, y un inhibidor de, la unión de CRP, comparada con la de la misma fosfocolina libre, refleja la naturaleza bifuncional y palindrómica de la molécula PCHPC. La presencia en cada extremo de la mitad del enlazador de un residuo de fosfocolina reconocido y capaz de unirse mediante la cavidad de unión del ligando presente en cada protómero de la molécula pentamérica de CRP, permite que PCHPC se una a través

de y se entrecruce con los pares de unión de las moléculas CRP. Esta capacidad para (llevar a cabo) interacciones múltiples potencia en gran manera la avidez de la interacción entre PCHPC y CRP. Los sitios de unión del ligando sobre cada uno de los 5 protómeros en la molécula de CRP, se encuentran todos en la misma cara del ensamblaje pentamérico tipo disco de la proteína nativa. El entrecruzamiento de pares de moléculas CRP mediante moléculas PCHPC reduce además también, de este modo, la disponibilidad de CRP para que se una con otros ligandos, ocluyendo la unión o la cara "B" de la proteína. "Abrumado" por el exceso molar de PCHPC, cada sitio de unión del ligando sobre CRP está ocupado por una molécula PCHPC individual, no pudiendo tener lugar el entrecruzamiento de pares de moléculas de CRP, y, por tanto, conservando ésta, por tanto, su forma pentamérica original única. La fosfocolina libre se une mediante CRP, pero siendo "monomérica" no puede entrecruzarse con pares de moléculas CRP. Estos efectos se muestran mediante cromatografía de filtro molecular que distingue claramente entre el ensamblaje pentamérico único nativo de CRP y los pares de dichos pentámeros que han sido dimerizados por el medicamento. De forma importante, con respecto a la capacidad de PCHPC de actuar como un inhibidor de la unión potencialmente patológica *in vivo* de CRP, se observan idénticos efectos con la CRP aislada pura en tampón acuoso y con la CRP en el medio fisiológico del suero entero.

TABLA

*Efecto de PCHPC sobre el ensamblaje molecular de CRP, revelado mediante cromatografía de filtración en gel*

Exceso molar de PCHPC o de la fosfocolina libre	Ensamblaje molecular de CRP
Sin medicamento	Pentámeros únicos
PCHPC equimolar	Dímeros decaméricos
Exceso en 10 veces de PCHPC	Dímeros decaméricos
Exceso en 10 veces de fosfocolina	Pentámeros únicos
Exceso en 1.000 veces de PCHPC	Dímeros decaméricos
Exceso en 10.000 veces de PCHPC	Pentámeros únicos

Estos efectos dependen absolutamente del calcio. En ausencia de iones libres de calcio, PCHPC no tiene efecto sobre el ensamblaje molecular de CRP.

El análisis espectrométrico de masas proporciona además evidencia precisa de la dependencia del calcio de los complejos entre CRP y PCHPC.

El examen de la CRP humana nativa pura aislada en solución, en ausencia de calcio, con o sin PCHPC, revela predominantemente la presencia de los pentámeros esperados, con  $M_r$  valores  $M_r(s)$ , cada uno, de 23027, próximos a los calculados para los 5 protómeros, según la estructura covalente conocida. Asimismo, se encuentran presentes pequeñas cantidades de especies  $M_r$  más altas, que corresponden de modo preciso a decámeros. En presencia de ambos, PCHPC e iones cálcicos, sin embargo, las especies decaméricas predominan y muestran un  $M_r$  superior que los decámeros que se apreciaron en la CRP sola pura. La diferencia en  $M_r$  entre los decámeros de la CRP sola y los que se formaron con PCHPC y calcio, es del orden de 2840-2890, que corresponde de manera muy próxima a 5 moléculas PCHPC ( $M_r$  de 448 cada una) y a 20 iones de calcio ( $M_r$  de 40 cada uno) por par de pentámeros de CRP.

El emparejamiento de las moléculas CRP mediante PCHPC es también demostrable mediante microscopía electrónica directa, tal como se muestra en la fig 2b. Además, la estructura del complejo CRP-PCHPC dilucidada mediante cristalografía mediante rayos X, muestra pares de moléculas CRP pentaméricas que interaccionan cara a cara (fig 2c), exactamente tal como se predijo mediante el diseño de la molécula de PCHPC según la presente invención.

El inmunoensayo automatizado MIRA de Roche para CRP (64) depende del reconocimiento mediante un anticuerpo monoclonal de un epítipo dependiente del calcio en la molécula de CRP. La formación mediante PCHPC de los dímeros de CRP en los que el sitio de unión del ligando dependiente del calcio está ocluido, encubre este epítipo y hace que el complejo CRP-PCHPC no se pueda detectar en este ensayo (fig 3). Esto proporciona un procedimiento conveniente para la demostración de dichos complejos, generados *in vitro* o *in vivo*. Esto se muestra en la figura 3 en la que la concentración de CRP se mide mediante MIRA en presencia de una vía continua de PCHPC (número de lote RMM), comparada con el efecto de una vía interrumpida de fosfocolina libre. Resultados idénticos se obtuvieron con CRP pura aislada y con CRP en el suero entero de la fase aguda.

Un mecanismo principal por el que los efectos proinflamatorios y que dañan los tejidos de la CRP son mediados *in vivo*, es mediante la activación del sistema del complemento. Es por tanto, crítico, que los medicamentos, según la presente invención, que bloquean dichos efectos secundarios de la CRP, puedan inhibir la activación

del complemento mediante CRP. PCHPC es potente a este respecto, tal como se muestra en la fig 4. La figura 4 muestra la activación del componente C3 del complemento en el suero entero, que se muestra mediante 2D inmunoelectroforesis, y su inhibición por PCHPC. En la parte superior a la izquierda (en la figura), el suero humano normal (NHS) incubado solo a 4°C, que no muestra activación de C3; en la parte superior a la derecha, el NHS incubado a 37°C con CRP y CPS, mostrando la activación completa de C3; en la parte inferior a la izquierda, el NHS incubado solo a 37°C, que no muestra activación; en la parte inferior a la derecha, el NHS incubado a 37°C con CRP y CPS, conjuntamente con PCHPC, mostrando una inhibición casi completa de la activación de C3.

Asimismo, es crítico que, los medicamentos, según la presente invención, bloquearán otros efectos patogénicos de CRP. La acumulación de LDL en el interior del citoplasma de los macrófagos y de las células musculares lisas vasculares para formar células espumosas, es una característica típica de las placas ateroscleróticas. Cuando dichas células se cultivan con LDL *in vitro* no forman células espumosas, a menos que las células sean estimuladas exponiéndolas a citoquinas proinflamatorias o a otros agentes que activan células. Sin embargo, la adición de CRP a las células cultivadas con LDL conduce a la formación de células espumosas en ausencia de cualesquiera otros agentes estimulantes o activantes (fig 5), y si esto se produce *in vivo*, proporcionaría un mecanismo por el cual el aumento de la producción de CRP podría ser directamente proaterogénica. La figura 5 muestra la formación de células espumosas por las células musculares lisas vasculares cultivadas *in vitro* con la lipoproteína de baja densidad (LDL) y CRP. LDL intracelular ingerida y retenida se tiñe con el colorante Aceite Rojo o. En ausencia de CRP, la LDL sola no se acumula en las células. De forma importante, la adición de PCHPC a los cultivos de células musculares lisas incluyendo tanto LDL como CRP, inhibe de modo efectivo la formación de células espumosas (fig 6).

Se acepta generalmente que la disfunción endotelial, que se reconoce habitualmente como un fallo relativo de la apropiada relajación y dilatación vascular *in vivo*, se asocia con el desarrollo y progresión de la aterosclerosis que conduce a la enfermedad cardiovascular. La reducción de la producción apropiada de óxido nítrico está, a su vez, asociada con dicho fallo en la dilatación vascular y se ha reivindicado que la CRP reduce la producción de óxido nítrico en las paredes de los vasos sanguíneos y en células endoteliales *in vitro*. Sin embargo, nuestros propios estudios han mostrado de forma muy reproducible que la CRP humana reduce actualmente la respuesta vasoconstrictora de los vasos sanguíneos humanos y de la rata expuestos a la fenilefrina *in vitro*, como resultado del aumento en la producción de óxido nítrico mediada por el aumento regulado de eNOS (fig 7). No está claro qué significado patofisiológico puede tener este efecto de CRP en relación con la aterosclerosis u otras patologías *in vivo*. Sin embargo, es una acción biológica sólida de CRP, y constituye, por tanto, una prueba muy importante en principio, según la presente invención, de que está completamente abrogado por la inclusión de PCHPC en el experimento (fig 7).

La figura 7 muestra el efecto de CRP en la respuesta vascular a la fenilefrina (PE) y la inhibición mediante PCHPC. La contracción de la arteria explantada en respuesta a PE se reduce significativamente por la adición de CRP al medio de cultivo. Esto se debe al aumento regulado de eNOS por la CRP (datos que no se muestran en la presente memoria) y al aumento de forma correspondiente de la producción de NO (datos que no se muestran), que es un relajante vascular. El efecto de CRP ese inhibe completamente por la adición de PCHPC (número RMM de lote).

La administración *in vivo* de PCHPC a ratones, a los que previamente se había inyectado CRP humana, conduce a la formación de complejos PCHPC-CRP que pueden demostrarse en la circulación. Así, existe una pérdida de la reactividad de CRP en el ensayo MIRA, mientras que en el electroinmunoensayo para CRP utilizando anticuerpos policlonales, se conserva la reactividad completa de la CRP. El electroinmunoensayo se procesa en presencia de EDTA que se une al calcio y libera CRP a partir de los complejos. Además, después de la administración de PCHPC a ratones a los que se había inyectado CRP humana, la CRP sérica disminuye para unirse *ex vivo* a la fosfoetanolamina inmovilizada sobre perlas de Sepharose. Por ejemplo, en el suero de un ratón al que se le había administrado CRP humana, pero no el medicamento, el 96% de la CRP (45 mg/l) se unió a la Sepharose-PE, mientras que con suero procedente de un ratón al que se le había administrado una dosis única de PCHPC, así como de CRP, sólo el 17% de 47 mg/l pudo unirse a Sepharose-PE.

La eficacia clínica de PCHPC, según la presente invención, requiere que PCHPC no sólo bloquee la unión de CRP a sus ligandos *in vivo*, sino que esto también abroga los efectos biológicos de CRP *in vivo*. Se ha sabido durante mucho tiempo que la administración de CRP humana a los ratones puede protegerlos de las infecciones letales por *Streptococcus pneumoniae*, y un típico ejemplo de dicha protección se muestra en la figura 8.

Cuando a los ratones infectados con *Streptococcus pneumoniae* y que también reciben la CRP humana se les suministran inyecciones repetidas de PCHPC, la protección mediada por CRP se abroga completamente, tal como se muestra en la fig 9. Estas observaciones muestran claramente que PCHOC abroga de forma intensa una potente acción biológica *in vivo* de la CRP humana y constituye, por tanto, un compuesto apropiado para utilizarlo, según la presente invención.

Aunque PCHPC inhibe la activación del complemento mediante CRP, y forma complejos con CRP *in vitro* e *in vivo*, que bloquean la unión de CRP a otros ligandos *in vitro* e *in vivo*, la administración de PCHPC *in vivo* no afecta a la tasa de depuración de CRP a partir de la circulación, tal como se muestra en el cuadro superior de la fig 10 (a). Cuando las mismas muestras de este experimento se evalúan en el ensayo MIRA con respecto a CRP (fig 10 (b)), el

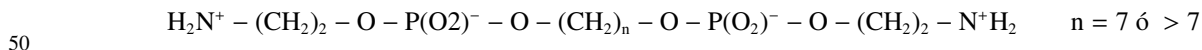
efecto del medicamento para formar complejos con CRP y de esta forma abolir su inmunoreactividad en este ensayo, es evidente. Sin embargo, PCHPC en sí mismo es rápidamente depurado y después de 4 horas la CRP humana que circula en el ratón se vuelve completamente detectable en el ensayo MIRA, siendo su tasa de depuración la misma que la de los animales de control no tratados.

5

La incapacidad de PCHPC para afectar la depuración de la CRP humana a partir del plasma murino, a pesar de la formación de complejos medicamento-PCR, está de acuerdo con trabajos publicados, que muestran que la CRP humana se depura siempre con una tasa rápida constante en individuos humanos normales, y en pacientes que están afectados de distintas enfermedades (31). Asimismo, estudios en animales experimentales muestran de forma similar que la CRP humana muestra siempre idéntica tasa de depuración, a pesar de la presencia, incluso, de ávidos ligandos macromoleculares tales como CPS (65). Este fenómeno contrasta acusadamente con el comportamiento *in vivo* de la molécula estrechamente relacionada “componente P amiloide sérico” (SAP), el otro miembro de la familia proteica humana de las pentraxinas. SAP comparte con CRP la estructura homopentamérica, formada por 5 protómeros idénticos asociados no covalentemente en una configuración de tipo discoidal, con un único sitio de unión del ligando, sitio calcio dependiente, (situado) en una cara de cada subunidad. Sin embargo, cuando la molécula palindrómica ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidín-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidín-2-carboxílico (abreviado como CPHPC), que se menciona en la presente memoria como un ejemplo de referencia, que es reconocido y unido por SAP, forma complejos con SAP, que comprenden pares de moléculas SAP entrecruzadas por CPHPC, siendo estos complejos muy rápidamente depurados a partir de la circulación *in vivo* (66,67). El manejo del SAP humano agregado *in vivo* puede diferir notablemente, por tanto, del de la CRP segregada. Alternativamente, los complejos entre CRP y CPHPC pueden ser menos estables que los formados por SAP y CPHPC. La afinidad de unión, medida mediante calorimetría isotérmica es de 10 nM para SAP y CPHPC, comparada con los 400 nM para CRP y CPHPC. La SAP del ratón se une menos ávidamente a todos los ligandos que la SAP humana, y la administración de CPHPC a los ratones no acelera la depuración de la SAP murina *in vivo*, mientras que depura intensamente la SAP humana que se expresa en los ratones transgénicos de SAP humana (67). Así, compuestos que están unidos ambos mediante CRP con una alta afinidad y que se entrecruzan con ésta en complejos estables más ávidos, pueden provocar, *in vivo*, una aceleración de la depuración a partir del plasma.

Los compuestos que, como PCHPC, no sólo inhiben la unión del ligando mediante CRP, sino que promueven también una depuración acelerada de CRP, convirtiéndola, por tanto, en no disponible para la producción de efectos secundarios, a patogénicos, son deseables según la presente invención. Dichos compuestos están caracterizados por una unión de alta afinidad de mediante PCR, en virtud de interacciones accesorias con la proteína, además del reconocimiento del grupo en cabeza de fosfocolina en la cavidad de unión dependiente del calcio. Por ejemplo, existe una pequeña abertura hidrofóbica estrecha y larga, adyacente al sitio de unión de la fosfocolina, que puede acomodar un grupo metilo u otro grupo hidrofóbico pequeño, y aumenta notablemente la afinidad de unión mediante CRP (68), la unión de un grupo situado aproximadamente en cada extremo de la molécula PHCHPC. La afinidad de unión y la avidez para la formación de los complejos medicamento-CRP aumentan también modificando el enlazador alifático entre los dos grupos en cabeza de fosfocolina, por ejemplo, alterando la longitud de la cadena, incluyendo enlaces dobles para volverla rígida en conformaciones óptimas, incluyendo grupos aromáticos y cadenas laterales que puedan generar interacciones proteicas del medicamento adicionales a la unión dependiente del calcio de la fosfocolina.

Más específicamente, un componente importante de la unión dependiente del calcio de la fosfocolina en la cavidad del ligando de unión de CRP, es la interacción electrostática entre el amonio cuaternario de la colina y el residuo Glu81. Esta interacción de carga se conserva en los compuestos bisfosfoetanolamínicos con longitud más largas de la cadena que los 6 carbonos en PCHPC, por ejemplo, con 7 o más átomos de carbono, y dichos compuestos de la fórmula general que se muestra a continuación son deseables, según la presente invención.



50

Otros fosfatos que contienen grupos en cabeza que pueden hacerse palindrómicos según la presente invención, se muestran a continuación y corresponden a los compuestos 1-3, 5-8 de la página 32. Los compuestos 1,5 y 6 proporcionan un anillo que “se amontona” con Trp66 en la cavidad de unión del ligando de CRP, aumentando de este modo la afinidad de unión, conservando mientras la coordinación del calcio. Los compuestos 5 y 6 permiten también la formación de enlaces (puentes) de hidrógeno entre los nitrógenos del anillo y los grupos polares que interaccionan con el nitrógeno de la fosfocolina en su complejo con CRP (68).

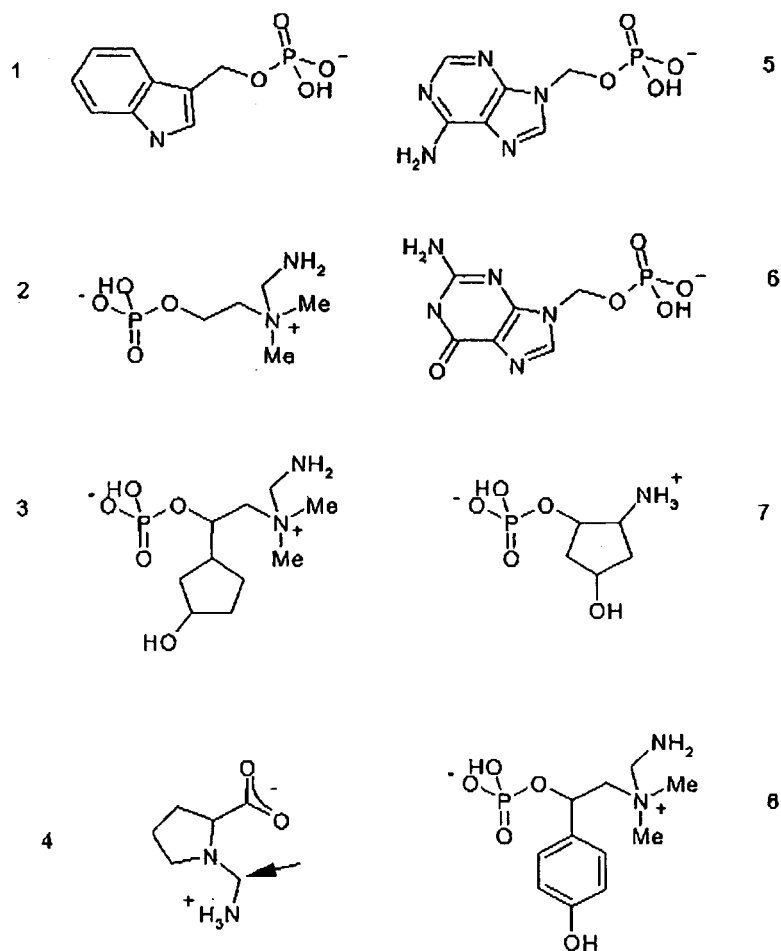
Otra variación que aumenta la afinidad de la unión es el reemplazo con un grupo amino de uno de los átomos de hidrógeno en uno de los grupos metilo en uno de los nitrógenos cuaternarios de la estructura de la bisfosfocolina. Esto permite la unión del hidrógeno a los residuos Ser68 y/o Ser74 próximos al grupo en cabeza de la colina, produciéndose, por lo tanto, una unión de afinidad más alta, que es deseable, según la presente invención. El grupo en cabeza con esta estructura se muestra en 2 en las fórmulas estructurales siguientes. Los compuestos 3 y 8 tienen la misma constitución deseable en el grupo colina e incluyen también cinco o seis grupos en cabeza que pertenecen al anillo, respectivamente, que rellenan la cavidad de unión del ligando o CRP, y forman enlaces de hidrógeno adicionales con el residuo polar crítico Thr76 que constituye una de las paredes de la cavidad, tal como se explica seguidamente. El compuesto 7 proporciona ventajosamente un anillo de tipo hidroxiprolinea que puede formar un puente de hidrógeno con Thr76, siendo más pequeño el grupo amino cargado positivamente que el nitrógeno cuaternario de la colina, y permitiendo

65

## ES 2 333 522 T3

que el grupo en cabeza en su totalidad encaje más cómodamente en la cavidad. Esto produce una unión de alta afinidad, que es deseable, según la presente invención.

El compuesto 4 (que no está de acuerdo con la invención) es un derivado D-prolina que proporciona un carboxilato en vez de un grupo ácido fosfato, y posee un grupo amino prolongado que alcanza hasta el residuo glutamato que normalmente se une al positivo N de la colina. El átomo de carbono que precede al carboxilo, que figura con una flecha en las fórmulas estructurales, es el sitio de unión para el enlazador. Para todos los otros grupos en cabeza que se muestran, el enlazador se une, mediante el grupo hidroxilo del fosfato, como en PCHPC.

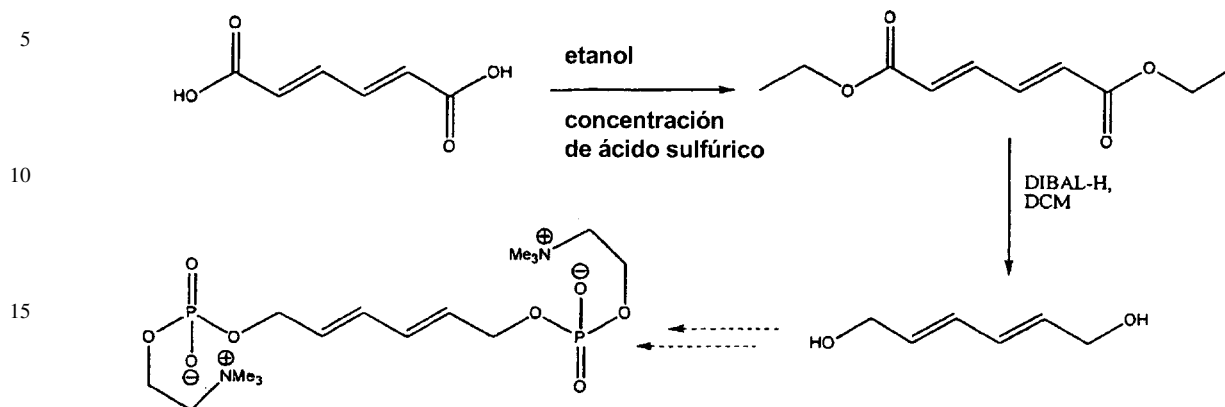


La cavidad de unión del ligando, dependiente del calcio, para la fosfocolina en CRP (68), es ligeramente más grande que la cavidad del ligando dependiente del calcio de SAP, que se une a un residuo D-prolina (67). La cavidad de CRP tiene también un lado polar en virtud del reemplazo de los residuos Tyr74, Tyr64 y Leu62 que tapizan la cavidad de SAP, y se unen a 3 de los 4 carbonos de la prolina, mediante el residuo Thr76 de CRP. Para rellenar la cavidad de CRP es necesario superar su falta de proximidad con los átomos de calcio que unen críticamente el fosfato u otra mitad ácida. En los ésteres de fosfato el átomo extra de O en la cadena desplaza al grupo en cabeza y a los sustituyentes del ramal añadido al enlazador, a partir de la cavidad. El reemplazo del átomo de O estérico por un fragmento de 2 carbonos, permite que una mitad polar del ramal en el extremo del enlazador, penetre en la cavidad y se una mediante un puente de hidrógeno a Thr74, creando por lo tanto una unión de afinidad más alta. Los compuestos palindrómicos de este tipo son, por lo tanto, deseables, según la presente invención.

Con respecto a la cadena del enlazador, la longitud de 6 carbonos en PCHPC se optimiza en la posición de los sitios de unión del ligando (dependientes del calcio) en los protómeros de CRP, que se vacían a partir del quintuple eje del pentámero intacto (68), siendo también deseable una cadena que comprenda 5 o 7 grupos metileno, según la presente invención. Con 5 metileno, son posibles más contactos pentámero-pentámero, y éstos aumentan de forma deseable la avidez para la unión. Con 7 grupos metileno el enlazador puede encorvarse para optimizar el posicionamiento del grupo en cabeza de la fosfocolina en la cavidad de unión del ligando, y por tanto, aumenta de forma deseable la afinidad de unión. La inclusión en la cadena del enlazador de enlaces dobles, para reducir la

## ES 2 333 522 T3

flexibilidad, aumenta de forma deseable la avidéz para la unión y mejora también las propiedades farmacológicas. Un ejemplo de dicho compuesto y de su síntesis se muestran a continuación.



25

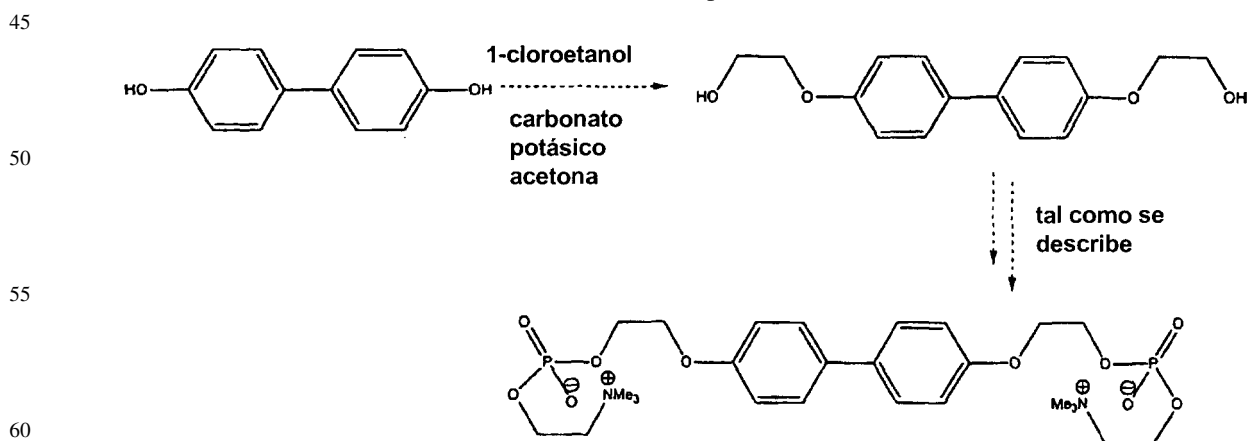
30

35

Ácido dietil-*trans-trans*-mucónico. A una solución de ácido *trans-trans*-mucónico (2,0 g, 9,71 mmoles) en etanol absoluto (10 ml) se le añadió ácido sulfúrico concentrado (1 ml) y la mezcla resultante se calentó con reflujo durante 16 horas. La solución resultante se diluyó con carbonato sódico saturado hasta convertirla justo en básica. El sólido que se formó fue filtrado y recristalizado a partir de etanol: agua (1:1), para dar lugar a un sólido cristalino blanco (1,8 g, 64%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7,29 (2H, m, =CH), 6,19 (2H, m, =CH), 4,22 (2H, q, *J* 12, CH<sub>2</sub>), 1,31 (3H, t, *J* 12, CH<sub>3</sub>). *trans-trans*-Muconol. A una solución con agitación de ácido dietil-*trans-trans*-mucónico (1,67 g, 8,4 mmol) en diclorometano anhidro (60 ml) se le añadió una solución etérica de hidruro de dibutilaluminio (1,0 M, 33,6 ml, 4 eq) mediante una jeringa durante 30 minutos. Después de completar la adición, se dejó que la solución amarilla se calentara a 20°C y se agitó durante 8 horas. Después de que este tiempo hubiera transcurrido, se extinguió la reacción con metanol en exceso (250 ml) para destruir cualquier hidruro de dibutilaluminio que no hubiera reaccionado, dejando que la mezcla se sometiera a agitación durante 1 hora. Después de este tiempo, la suspensión resultante se filtró, se mantuvo el filtrado separado, y el residuo se molió con más metanol en un mortero, el cual residuo se filtró otra vez mediante sílice de diatomeas y se combinó con el filtrado inicial. Las capas orgánicas combinadas se sometieron a secado (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se evaporaron para dar lugar a un aceite amarillo que se purificó mediante una cromatografía flash en columna (acetato de etilo: éter de petróleo, 7:3). Los grupos en cabeza del ligando de fosfocolina se unieron entonces a los grupos hidroxilo terminales del *trans-trans*-muconol, tal como se ha descrito anteriormente de modo preciso para la síntesis de PCHPC.

40

Otro enlazador que es deseable, según la presente invención, incluye componentes arilo que promueven una unión con una afinidad más alta de los grupos en cabeza de la fosfocolina mediante CRP, y proporcionan una potenciación de las interacciones medicamento-proteína que conducen a una formación más ávida y efectiva del complejo, así como a la mejora de las propiedades farmacológicas. A continuación se muestra un ejemplo de la vía sintética para dicho compuesto, en el que la creación del enlazador como un alcohol apropiado, es seguido por la unión de los grupos en cabeza de la fosfocolina, tal como se describe anteriormente para PCHPC.

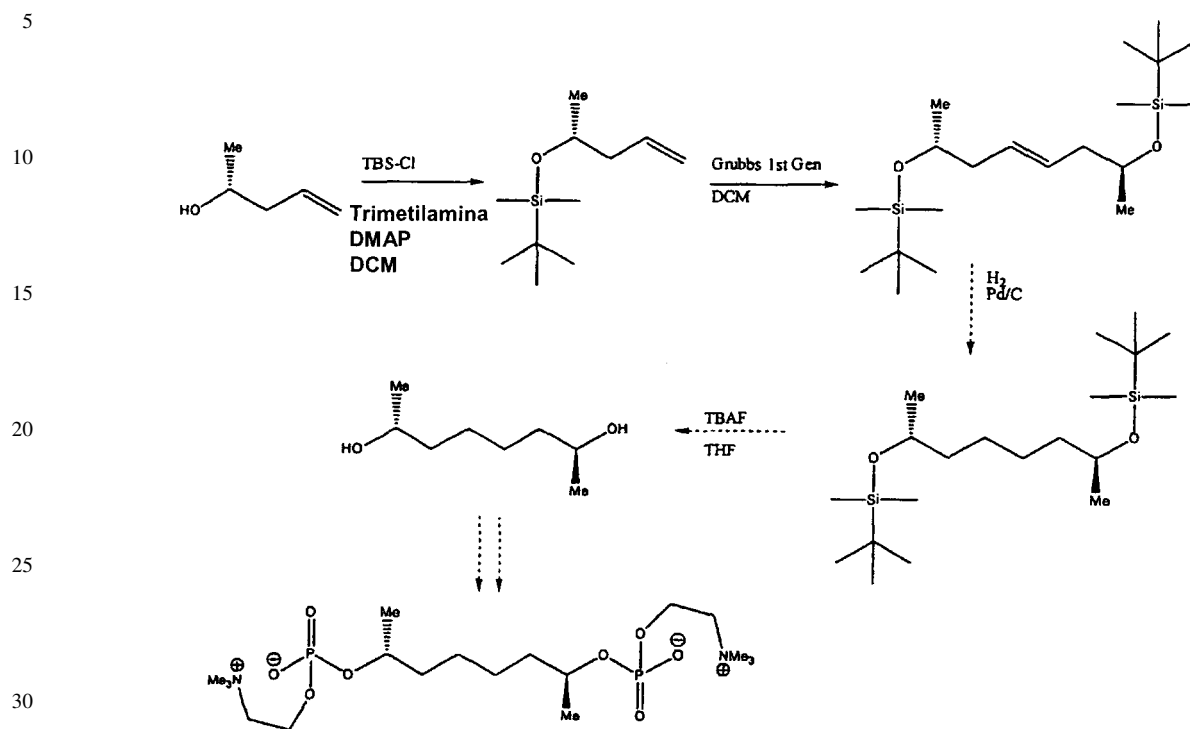


65

Los sustituyentes en la cadena lineal del enlazador son también deseables según la presente invención, en virtud de su capacidad para permitir interacciones secundarias con la molécula de CRP y, por lo tanto, aumentar la afinidad y avidéz de la unión. El agente de unión puede tener un sustituyente hidrofóbico en una posición próxima a cada ligando para la interacción con el sitio de unión del ligando que se encuentra en CRP. A continuación se muestra un ejemplo en el que una cadena lateral metilo en el átomo de carbono del enlazador (que se encuentra) próximo a cada grupo en cabeza de la fosfocolina, se sitúa apropiadamente para formar una interacción hidrofóbica con una pequeña

## ES 2 333 522 T3

cavidad hidrofóbica en la estructura de la CRP adyacente al sitio de unión del ligando dependiente del calcio (68). Esto aumenta sustancialmente la afinidad con la cual el compuesto se une mediante CRP. La síntesis de este compuesto se muestra a continuación.



35

40

45

(*R*)-*O*-*tert*-butildimetilsilil-penten-2-ol. Una solución de (*R*)-(-)-penten-2-ol (2 ml, 19,4 mmoles), trietilamina (5,4 ml, 38,9 mmol) y DMAP (0,237 g, 1,94 mmoles) en diclorometano (25 ml) se enfrió a 0°C, seguido por la adición de una solución de cloruro de TBDMS (3,81 g, 25,3 mmoles). Se dejó que la mezcla se calentara a 20°C y se agitó durante 17 horas, y a ella se añadió cloruro amónico saturado (100 ml), extrayéndose la capa acuosa con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las fases orgánicas combinadas se sometieron a secado (MgSO<sub>4</sub>), y se filtraron y evaporaron para producir un aceite claro, que se purificó mediante cromatografía flash en columna (éter de petróleo 40-60, 100%) para dar lugar a un aceite claro (3 g, 77%). 0,0-2, 7-di-(*tert*-butildimetilsilil)-oct-4-ene. A una solución de (*R*)-*O*-*tert*-butildimetilsilil-penten-2-ol (2 g, 10 mmoles) en DCM (60 ml) se añadió el catalizador Grubb de 1<sup>a</sup> generación (0,206 g, 25 mol %), calentándose la mezcla resultante con reflujo durante 16 horas. Pasado este tiempo, la reacción se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se sometieron a secado (MgSO<sub>4</sub>) y se filtraron y se evaporaron para producir un aceite blanco que se purificó mediante cromatografía flash en columna (hexano, 100%), para dar lugar a un aceite claro. La subsiguiente reducción e hidrólisis produjo el enlazador deseado como un alcohol apropiado para la unión de los grupos en cabeza de la fosfocolina, tal como se ha descrito para PCHPC.

50

55

Los compuestos multiméricos del medicamento con dos fosfocolinas u otros grupos en cabeza unidos por la CRP, espaciados apropiadamente para interactuar con más de un protómero en cada par de moléculas CRP en el dímero entrecruzado del medicamento, producen complejos medicamento-CRP muy ávidos y estables, y son deseables según la presente invención, tal como se definen en las reivindicaciones 1, 9 o 21. En particular, los compuestos tales como los definidos en las reivindicaciones 1, 9 o 21, con grupos en cabeza del ligando en una colección apropiadamente espaciada para unirse a cualquiera de las cinco cavidades de unión del ligando en la cara plana de unión (B) de la molécula de CRP, son deseables para el gran aumento de la avidéz, producido por dichas interacciones múltiples.

### Referencias

- 60
- 65
1. **Pepys, M. B. and Baltz, M. L. (1983)** Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv. Immunol.*, 34: 141-212.
  2. **Pepys, M. B. (1996)** The acute phase response and C-reactive protein. In: Oxford Textbook of Medicine, Third Ed., Vol. 2 (Weatherall, D.J., Ledingham, J.G.G. and Warrell, D.A., eds.), *Oxford University Press, Oxford*, pp. 1527-1533.
  3. **Volanakis, J. E. and Kaplan, M. H. (1971)** Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 136: 612-614.

4. de **Beer**, F. C., **Soutar**, A. K., **Baltz**, M. L., **Trayner**, I., **Feinstein**, A. and **Pepys**, M. B. (1982) Low density and very low density lipoproteins are selectively bound by aggregated C-reactive protein. *J. Exp. Med.*, 156: 230-242.
5. **Pepys**, M. B., **Rowe**, I. F. and **Baltz**, M. L. (1985) C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 27: 83-111.
6. **Narkates**, A. J. and **Volanakis**, J. E. (1982) C-reactive protein binding specificities: artificial and natural phospholipids bilayers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 389: 172-182.
7. **Volanakis**, J. E. and **Wirtz**, K. W. A. (1979) Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature*, 281: 155-157.
8. **Du Clos**, T. W. (1989) C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *J. Immunol.*, 143: 2553-2559.
9. **Pepys**, M. B., **Booth**, S. E., **Tennent**, G. A., **Butler**, P. J. G. and **Williams**, D. G. (1994) Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. *Clin. Exp. Immunol.*, 97: 152-157.
10. **Kindmark**, C.-O. (1972) *In vitro* binding of human C-reactive protein by some pathogenic bacteria and zymosan. *Clin. Exp. Immunol.*, 11: 283-289.
11. **Fletcher**, T. C., **White**, A. and **Baldo**, B. A. (1980) Isolation of a phosphorylcholine-containing component from the turbot tapeworm, *Bothriocephalus scorpii* (Müller) and its reaction with C-reactive protein. *Parasite Immunol.*, 2: 237-248.
12. de **Beaufort**, A. J., **Langermans**, J. A. M., **Matze-van der Lans**, A. M., **Hiemstra**, P. S., **Vossen**, J. M. and **Van Furth**, R. (1997) Difference in binding of killed and live *Streptococcus pneumoniae* serotypes by C-reactive protein. *Scand. J. Immunol.*, 46: 597-600.
13. **Weiser**, J. N., **Pan**, N., **McGowan**, K. L., **Musher**, D., **Martin**, A. and **Richards**, J. (1998) Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J. Exp. Med.*, 187: 631-640.
14. **Culley**, F. J., **Bodman-Smith**, K. B., **Ferguson**, M. A. J., **Nikolaev**, A. V., **Shantilal**, N. and **Raynes**, J. G. (2000) C-reactive protein binds to phosphorylated carbohydrates. *Glycobiology*, 10: 59-65.
15. **Lysenko**, E., **Richards**, J. C., **Cox**, A. D., **Stewart**, A., **Martin**, A., **Kapoor**, M. and **Weiser**, J. N. (2000) The position of phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein-mediated killing. *Mol. Microbiol.*, 35: 234-245.
16. **Kaplan**, M. H. and **Volanakis**, J. E. (1974) Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J. Immunol.*, 112: 2135-2147.
17. **Volanakis**, J. E. and **Kaplan**, M. H. (1974) Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. II. Consumption of guinea-pig complement by CRP complexes: requirement for human Clq. *J. Immunol.*, 113: 9-17.
18. **Claus**, D. R., **Siegel**, J., **Petras**, K., **Osmand**, A. P. and **Gewurz**, H. (1977) Interactions of C-reactive protein with the first component of human complement. *J. Immunol.*, 119: 187-192.
19. **Volanakis**, J. E. (1982) Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 389:235-250.
20. **Mortensen**, R. F., **Osmand**, A. P., **Lint**, T. F. and **Gewurz**, H. (1976) Interaction of C-reactive protein with lymphocytes and monocytes: complement-dependent adherence and phagocytosis. *J. Immunol.*, 117: 774-781.
21. **Nakayama**, S., **Mold**, C., **Gewurz**, H. and **Du Clos**, T. W. (1982) Opsonic properties of C-reactive protein *in vivo*. *J. Immunol.*, 128: 2435-2438.
22. **Osmand**, A. P., **Mortensen**, R. F., **Siegel**, J. and **Gewurz**, H. (1975) Interactions of C-reactive protein with the complement system. III. Complement-dependent passive hemolysis initiated by CRP. *J. Exp. Med.*, 142: 1065-1077.
23. **Finland**, M. and **Dowling**, H. F. (1935) Cutaneous reactions and antibody response to intracutaneous injections of *pneumococcus polysaccharides*. *J. Immunol.*, 29: 285-299.

24. **Kushner, I. and Kaplan, M. H. (1961)** Studies of acute phase protein. I. An immunohistochemical method for the localization of Cx-reactive protein in rabbits. Association with necrosis in local inflammatory lesions. *J. Exp. Med.*, 114: 961-973.
- 5 25. **Kushner, I., Rakita, L. and Kaplan, M. H. (1963)** Studies of acute phase protein. II. Localization of Cx-reactive protein in heart in induced myocardial infarction in rabbits. *J. Clin. Invest.*, 42: 286-292.
26. **Gitlin, J. D., Gitlin, J. I. and Gitlin, D. (1977)** Localisation of C-reactive protein in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 20: 1491-1499.
- 10 27. **Du Clos, T. W., Mold, C., Paterson, P. Y., Alroy, J. and Gewurz, H. (1981)** Localization of C-reactive protein in inflammatory lesions of experimental allergic encephalomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.*, 43: 565-573.
- 15 28. **Lagrand, W. K., Niessen, H. W. M., Wolbink, G.-J., Jaspars, L. H., Visser, C. A., Verheugt, F. W. A., Meijer, C. J. L. M. and Hack, C. E. (1997)** C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation*, 95: 97-103.
- 20 29. **Torzewski, J., Torzewski, M., Bowyer, D. E., Fröhlich, M., Koenig, W., Waltenberger, J., Fitzsimmons, C. and Hombach, V. (1998)** C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18: 1386-1392.
- 25 30. **Wolbink, G.-J., Bossink, A. W. J., Groeneveld, A. B. J., de Groot, M. C. M., Thijs, L. G. and Hack, C. E. (1998)** Complement activation in patients with sepsis is in part mediated by C-reactive protein. *J. Infect. Dis.*, 177: 81-87.
31. **Vigushin, D. M., Pepys, M. B. and Hawkins, P. N. (1993)** Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J. Clin. Invest.*, 91: 1351-1357.
- 30 32. **Kew, R. R., Hyers, T. M. and Webster, R. O. (1990)** Human C-reactive protein inhibits neutrophil chemotaxis *in vitro*: possible implications for the adult respiratory distress syndrome. *J. Lab. Clin. Med.*, 115: 339-345.
33. **Heuertz, R. M., Xia, D., Samols, D. and Webster, R. O. (1992)** Transgenic mice expressing plasma rabbit C-reactive protein exhibit diminished vascular permeability and neutrophil infiltration in C5a-induced alveolitis. *FASEB J.*, 6: 1064 (abstract).
- 35 34. **Mold, C. and Gewurz, H. (1980)** Activation of the alternative pathway by liposomes: inhibitory effect of C-reactive protein. *Fed. Proc.*, 39: 702.
- 35 35. **Mold, C. and Gewurz, H. (1981)** Inhibitory effect of C-reactive protein on alternative C pathway activation by liposomes and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.*, 127: 2089-2092.
- 40 36. **Gershov, D., Kim, S., Brot, N. and Elkou, K. B. (2000)** C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 192: 1353-1363.
- 45 37. **Griselli, M., Herbert, J., Hutchinson, W. L., Taylor, K. M., Sohail, M., Krausz, T. and Pepys, M. B. (1999)** C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J. Exp. Med.*, 190: 1733-1739.
- 50 38. **Shine, B., de Beer, F. C. and Pepys, M. B. (1981)** Solid phase radioimmunoassays for C-reactive protein. *Clin. Chim. Acta*, 117: 13-23.
39. **Hutchinson, W. L., Koenig, W., Fröhlich, M., Sund, M., Lowe, G. D. O. and Pepys, M. B. (2000)** Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. *Clin. Chem.*, 46: 934-938.
- 55 40. **Liuzzo, G., Biasucci, L. M., Gallimore, J. R., Grillo, R. L., Rebuffi, A. G., Pepys, M. B. and Maseri, A. (1994)** The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N. Engl. J. Med.*, 331: 417-424.
- 60 41. **Kuller, L. H., Tracy, R. P., Shaten, J. and Meilahn, E. N. (1996)** Relation of C-reactive protein and coronary heartdisease in the MRFIT nested case control study. *Am. J. Epidemiol.*, 144: 537-547.
42. **Haverkate, F., Thompson, S. G., Pyke, S. D. M., Gallimore, J. R. and Pepys, M. B. (1997)** Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet*, 349: 462-466.
- 65 43. **Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P. and Hennekens, C. H. (1997)** Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.*, 336: 973-979.

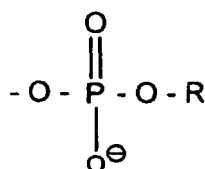
44. **Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P. and Hennekens, C. H. (1998)** Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*, 97: 425-428.
45. **Ridker, P. M., Buring, J. E., Shih, J., Matias, M. and Hennekens, C. H. (1998)** Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*, 98: 731-733.
46. **Ridker, P. M. (1998)** C-reactive protein and risks of future myocardial infarction and thrombotic stroke. *Eur. Heart J.*, 19: 1-3.
47. **Danesh, J., Collins, R., Appleby, P. and Peto, R. (1998)** Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 279: 1477-1482.
48. **Koenig, W., Sund, M., Fröhlich, M., Fischer, H.-G., Löwel, H., Döring, A., Hutchinson, W. L. and Pepys, M. B. (1999)** C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 a 1992. *Circulation*, 99: 237-242.
49. **Danesh, J., Whincup, P., Walker, M., Lennon, L., Thomson, A., Appleby, P., Gallimore, J. R. and Pepys, M. B. (2000)** Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *B. M. J.*, 321: 199-204.
50. **Zhang, Y. X., Cliff, W. J., Schoefer, G. I. and Higgins, G. (1999)** Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 145: 375-379.
51. **Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M. and Hemmes, M. (1999)** Complement and atherogenesis. Binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 2348-2354.
52. **Cermak, J., Key, N. S., Bach, R. R., Balla, J., Jacob, H. S. and Vercellotti, G. M. (1993)** C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood*, 82: 513-520.
53. **de Beer, F. C., Hind, C. R. K., Fox, K. M., Allan, R., Maseri, A. and Pepys, M. B. (1982)** Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br. Heart J.*, 47: 239-243.
54. **Ueda, S., Ikeda, U., Yamamoto, K., Takahashi, M., Nishinaga, M., Nago, N. and Shimada, K. (1996)** C-reactive protein as a predictor of cardiac rupture after acute myocardial infarction. *Am. Heart J.*, 131: 857-860.
55. **Pietilä, K. O., Hartiala, A. P., Jokiniitty, J. and Pasternack, A. I. (1996)** Serum C-reactive protein concentration in acute myocardial infarction and its relationship to mortality during 24 months of follow-up in patients under thrombolytic treatment. *Eur. Heart J.*, 17: 1345-1349.
56. **Morrow, D. A., Rifai, N., Antman, E. M., Weiner, D. L., McCabe, C. H., Cannon, C. P. and Braunwald, E. (1998)** C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. Thrombolysis in myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 31: 1460-1465.
57. **Tommasi, S., Carluccio, E., Bentivoglio, M., Buccolieri, M., Mariotti, M., Politano, M. and Corea, L. (1999)** C-reactive protein as a marker for cardiac ischemic events in the year after a first, uncomplicated myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, 83: 1595-1599.
58. **de Winter, R. J., Bholasingh, R., Lijmer, J. G., Koster, R. W., Gorgels, J. P. M. C., Schouten, Y., Hoek, F. J. and Sanders, G. T. (1999)** Independent prognostic value of C-reactive protein and troponin I in patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, 42: 240-245.
59. **Nikfardjam, M., Müllner, M., Schreiber, W., Oschatz, E., Exner, M., Domanovits, H., Laggner, A.N. and Huber, K. (2000)** The association between C-reactive protein on admission and mortality in patients with acute myocardial infarction. *J. Intern. Med.*, 247: 341-345.
60. **Beranek, J. T. (1997)** C-reactive protein and complement in myocardial infarction and postinfarction heart failure. *Eur. Heart J.*, 18: 1834-1835.
61. **Beranek, J. T. (1998)** C-reactive protein in postinfarction heart rupture. *Am. Heart J.*, 136: 563-564.
62. **van Leeuwen, M. A., van Rijswijk, M. H., Sluiter, W. J., van Riel, P. L. C. M., Kuper, I. H., van de Putte, L. B. A., Pepys, M. B. and Limburg, P. C. (1997)** Individual relationship between progression of radiological damage and the acute phase response in early rheumatoid arthritis. Towards development of a decision support system. *J. Rheumatol.*, 24: 20-27.

## ES 2 333 522 T3

63. **Boralessa, H., de Beer, F. C., Manchie, A., Whitwam, J. G. and Pepys, M. B. (1986)** C-reactive protein in patients undergoing cardiac surgery. *Anaesthesia*, 41: 11-15.
- 5 64. **Eda, S., Kaufmann, J., Roos, W. and Pohl, S. (1998)** Development of a new microparticle-enhanced turbidometric assay for C-reactive protein with superior features in analytical sensitivity and dynamic range. *J. Clin. Lab. Anal.*, 12: 137-144.
- 10 65. **Baltz, M. L., Rowe, I. F. and Pepys, M. B. (1985)** *In vivo* studies of the clearance of C-reactive protein. *Clin. Exp. Immunol.*, 59: 243-250.
- 15 66. **Pepys, M. B.** Patent Application No. 0119370.5: Therapeutic protein depletion (University College London, filed 2001).
- 20 67. **Pepys, M. B., Herbert, J., Hutchinson, W. L., Tennent, G. A., Lachmann, H. J., Gallimore, J. R., Lovat, L. B., Bartfai, T., Alanine, A., Hertel, C., Hoffmann, T., Jakob-Roetne, R., Norcross, R. D., Kemp, J. A., Yamamura, K., Suzuki, M., Taylor, G. W., Murray, S., Thompson, D., Purvis, A., Kolstoe, S., Wood, S. P. and Hawkins, P. N. (2002)** Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, 417: 254-259.
- 25 68. **Thompson, D., Pepys, M. B. and Wood, S. P. (1999)** The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, 7: 169-177.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

## REIVINDICACIONES

1. Agente para la utilización en medicina, comprendiendo dicho agente dos ligandos covalentemente unidos mediante un enlazador de manera que se forma un complejo con una pluralidad de moléculas de proteína C-reactiva (CRP) en su presencia, presentando dicho agente la estructura general Ligando-enlazador-Ligando, en el que cada ligando puede ser unido mediante un sitio de unión del ligando presente en una molécula de CRP y presenta independientemente la fórmula general



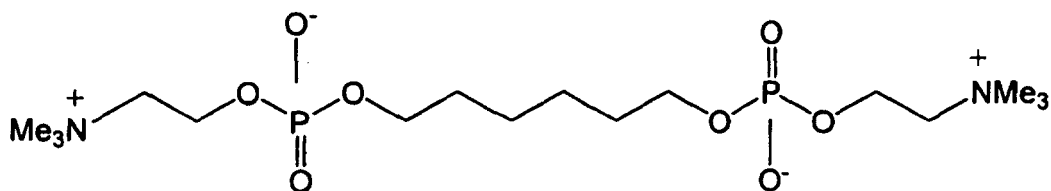
en la que R comprende un amina unida opcionalmente al -O- mediante un grupo alquileo; en el que la amina es trimetilamonio un dimetilamonio aminometilo o  $\text{NH}_2$ , y en el que el enlazador presenta una longitud de cadena de desde 5 a 7 átomos.

2. Agente según la reivindicación 1 para la utilización en medicina, en el que cada ligando comprende un grupo [(trimetilamonio)etoxi fosfinil]oxi.

3. Agente según la reivindicación 1 ó 2 para la utilización en medicina, en el que el enlazador comprende un hidrocarbilo lineal o ramificado en el que uno o más de sus átomos de carbono son sustituido(s) opcionalmente por un heteroátomo.

4. Agente según la reivindicación 2 para la utilización en medicina, en el que cada ligando es un grupo [(trimetilamonio)etoxi fosfinil]oxi y el enlazador es una cadena de 6 ó 7 grupos metilénicos.

5. Agente según la reivindicación 1 para la utilización en medicina, que comprende



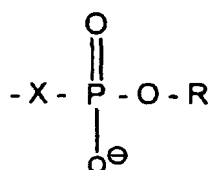
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Agente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la utilización en medicina, en el que el enlazador comprende uno o más enlaces dobles.

7. Agente según la reivindicación 6 para la utilización en medicina, en el que el enlazador comprende por lo menos dos enlaces dobles, que están conjugados.

8. Agente según la reivindicación 7 para la utilización en medicina, en el que los enlaces dobles son trans entre sí.

9. Utilización de un agente para la preparación de una composición para el tratamiento o la prevención de daño tisular asociado a la producción de la proteína C-reactiva (CRP) aumentada, en un sujeto que presenta una afección y/o daño tisular seleccionada de entre aterosclerosis, infarto miocárdico, ictus y necrosis isquémica, comprendiendo dicho agente dos ligandos covalentemente unidos mediante un enlazador de manera que se forma un complejo con una pluralidad de moléculas de proteína C-reactiva (CRP), presentando dicho agente la estructura general Ligando-enlazador-Ligando, en la que cada ligando puede ser unido mediante un sitio de unión del ligando presente en una molécula CRP y presenta independientemente la fórmula general



en la que X es O o  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  y R comprende una amina unida opcionalmente al -O- mediante un grupo alquileo.

## ES 2 333 522 T3

10. Utilización según la reivindicación 9, en la que la amina se une a -O- mediante un grupo metileno o etileno, que se sustituye opcionalmente con un sustituyente.

5 11. Utilización según la reivindicación 10, en la que la amina es un trimetilamonio, un aminometildimetilamonio o  $\text{NH}_2$ .

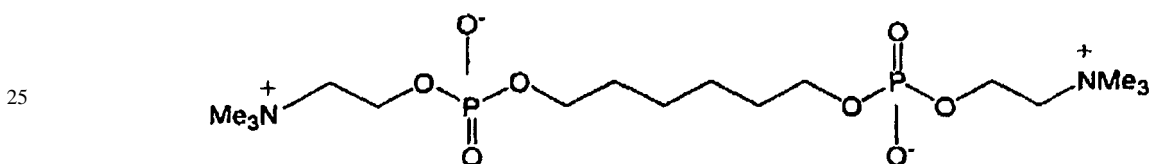
12. Utilización según la reivindicación 11, en la que cada ligando comprende un grupo [(trimetilamonio)etoxi fosfinil]oxi.

10 13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que el enlazador comprende un hidrocarburo lineal o ramificado en el que uno o más de sus átomos de carbono está sustituido opcionalmente por un heteroátomo.

14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en la que el enlazador presenta una longitud de cadena de desde 5 a 7 átomos.

15. Utilización según la reivindicación 14, en la que cada ligando es un grupo [(trimetilamonio)etoxi fosfinil]oxi y el enlazador es una cadena de 6 ó 7 grupos metileno.

20 16. Utilización según la reivindicación 9, en la que el agente comprende



30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

17. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en la que el enlazador comprende uno o más enlaces dobles.

35 18. Utilización según la reivindicación 17, en la que el enlazador comprende por lo menos dos enlaces dobles, que están conjugados.

19. Utilización según la reivindicación 18, en la que los enlaces dobles son trans entre sí.

40 20. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 en la que el enlazador comprende uno o más grupos arileno.

45 21. Agente para la utilización en el tratamiento o la prevención de daño tisular asociado a la producción de la proteína C-reactiva (CRP) aumentada, en un sujeto que presenta una afección inflamatoria y/o de daño tisular, seleccionada de entre aterosclerosis, infarto miocárdico, ictus y necrosis isquémica, comprendiendo dicho agente dos ligandos unidos covalentemente mediante un enlazador de manera que se forma un complejo con una pluralidad de moléculas de proteína C-reactiva (CRP) en su presencia, presentando dicho agente la estructura general Ligando-enlazador-Ligando,

50 en el que cada ligando puede estar unido mediante un sitio de unión del ligando presente en una molécula de CRP y presenta independientemente la fórmula general



60 en la que X es O o  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  y R comprende una amina unida opcionalmente al -O- mediante un grupo alquileo.

22. Agente según la reivindicación 21, para la utilización según la reivindicación 21, en el que la amina se une a -O- mediante un grupo metileno o etileno, que es sustituido opcionalmente con un sustituyente.

65 23. Agente según la reivindicación 22, para la utilización según la reivindicación 21, en el que la amina es un trimetilamonio, un aminometildimetilamonio o  $\text{NH}_2$ .

## ES 2 333 522 T3

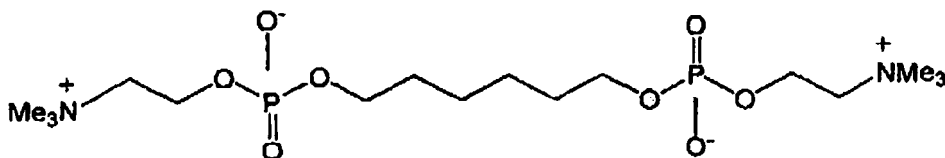
24. Agente según la reivindicación 23, para la utilización según la reivindicación 21, en el que cada ligando comprende un grupo [(trimetilamonio)etoxi fosfinil]oxi.

25. Agente según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, para la utilización según la reivindicación 21, en el que el enlazador comprende un hidrocarbilo lineal o ramificado, en el que uno o más de sus átomos de carbono se sustituye opcionalmente por un heteroátomo.

26. Agente según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para la utilización según la reivindicación 21, en la que el enlazador presenta una longitud de cadena de desde 5 a 7 átomos.

27. Agente según la reivindicación 26, para la utilización según la reivindicación 21, en el que cada ligando es un grupo [(trimetilamonio)etoxi fosfinil]oxi y el enlazador es una cadena de 6 ó 7 grupos metileno.

28. Agente según la reivindicación 21, para la utilización según la reivindicación 21, en el que el agente comprende



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

29. Agente según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, para la utilización según la reivindicación 21, en el que el enlazador comprende uno o más enlaces dobles.

30. Agente según la reivindicación 29, para la utilización según la reivindicación 21, en el que el enlazador comprende por lo menos dos enlaces dobles, que están conjugados.

31. Agente según la reivindicación 30, para la utilización según la reivindicación 21, en el que los enlaces dobles son trans entre sí.

32. Agente según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para la utilización según la reivindicación 21, en el que el enlazador comprende uno o más grupos arileno.

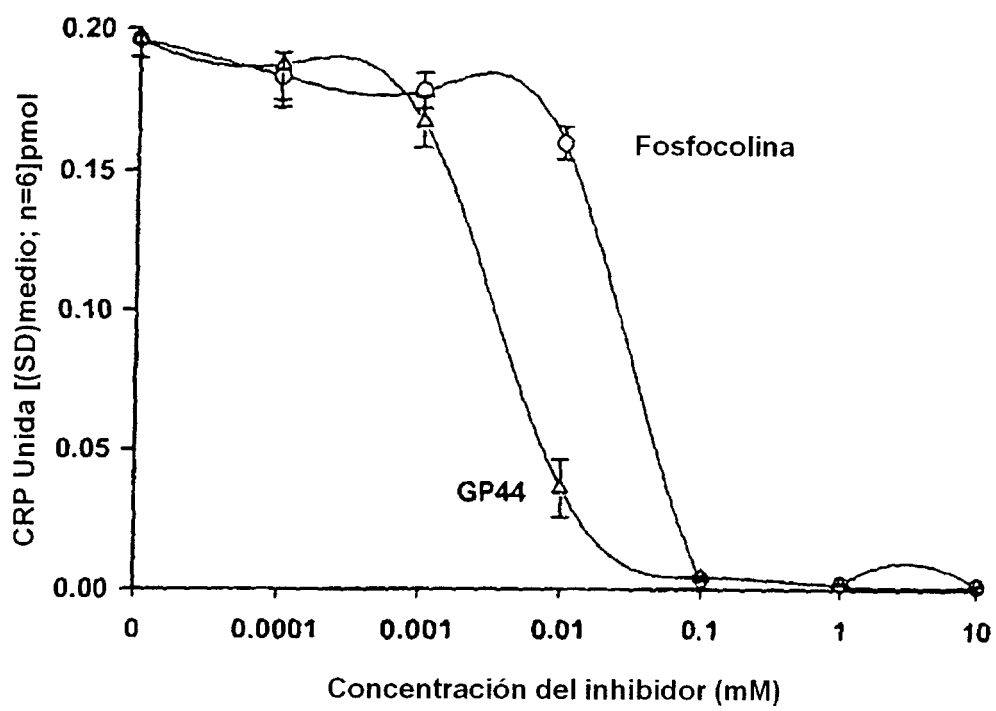


Figura 1

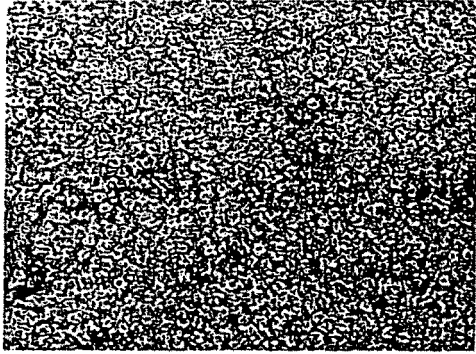


Fig. 2a

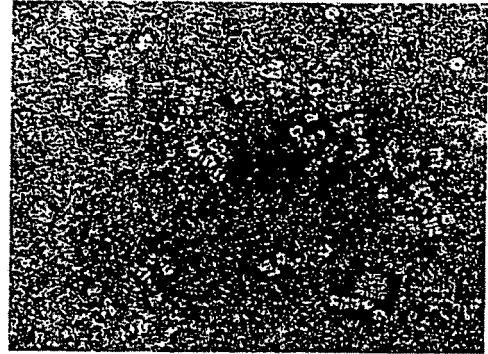


Fig. 2b



Fig. 2c

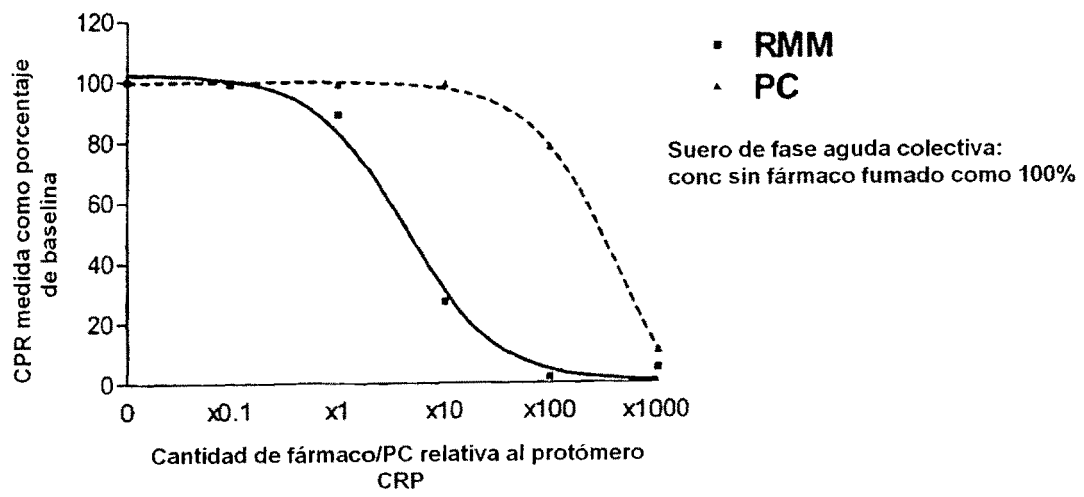


Figura 3

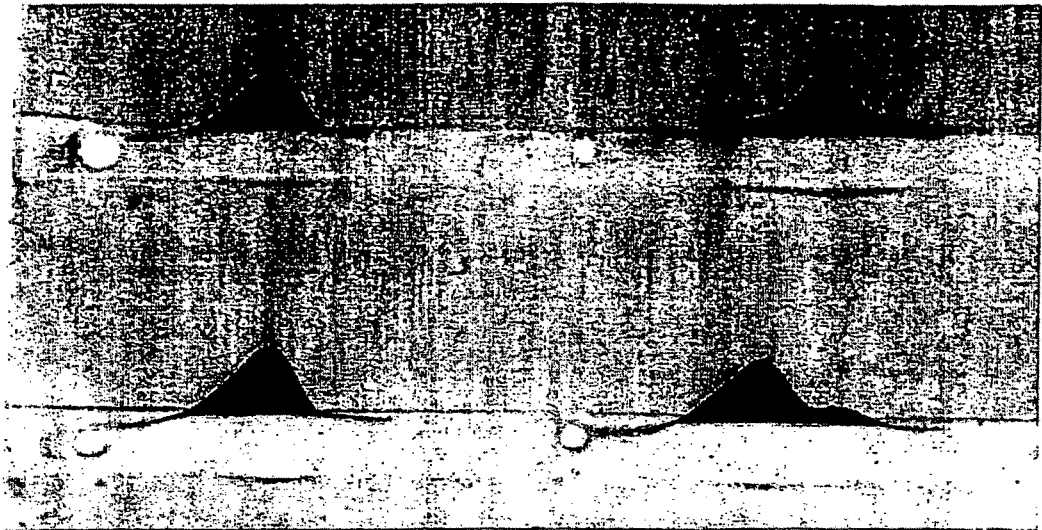


Figura 4



Figura 5



Figura 6

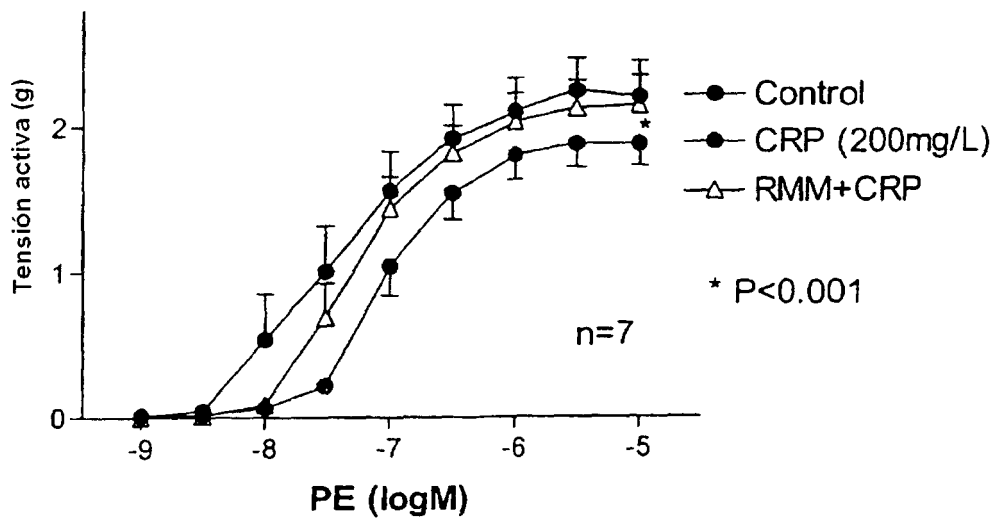


Figura 7

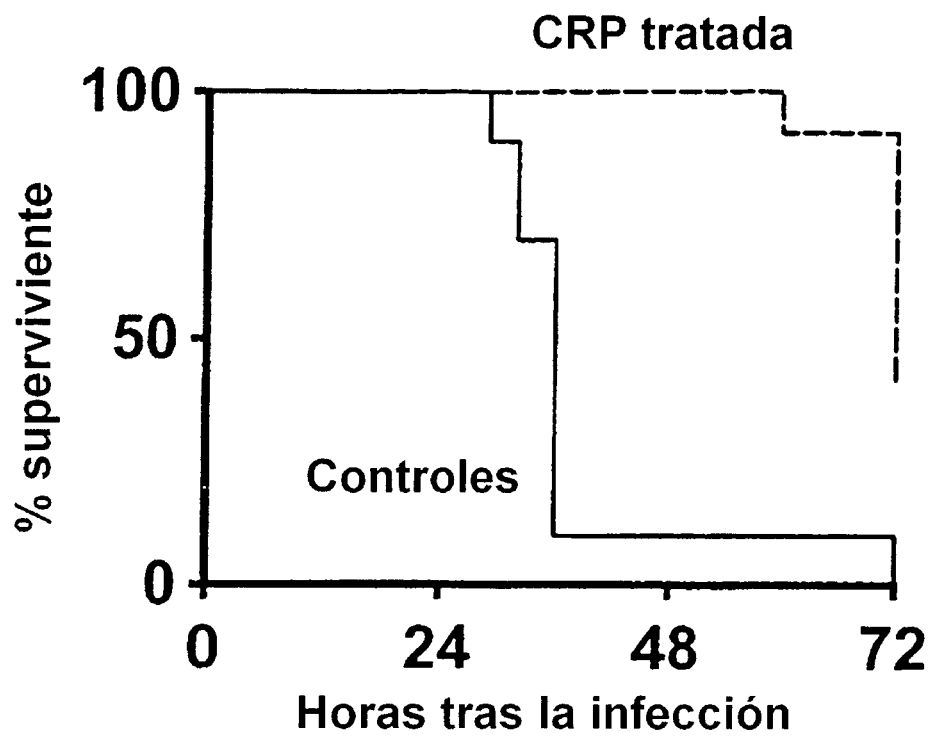


Figura 8

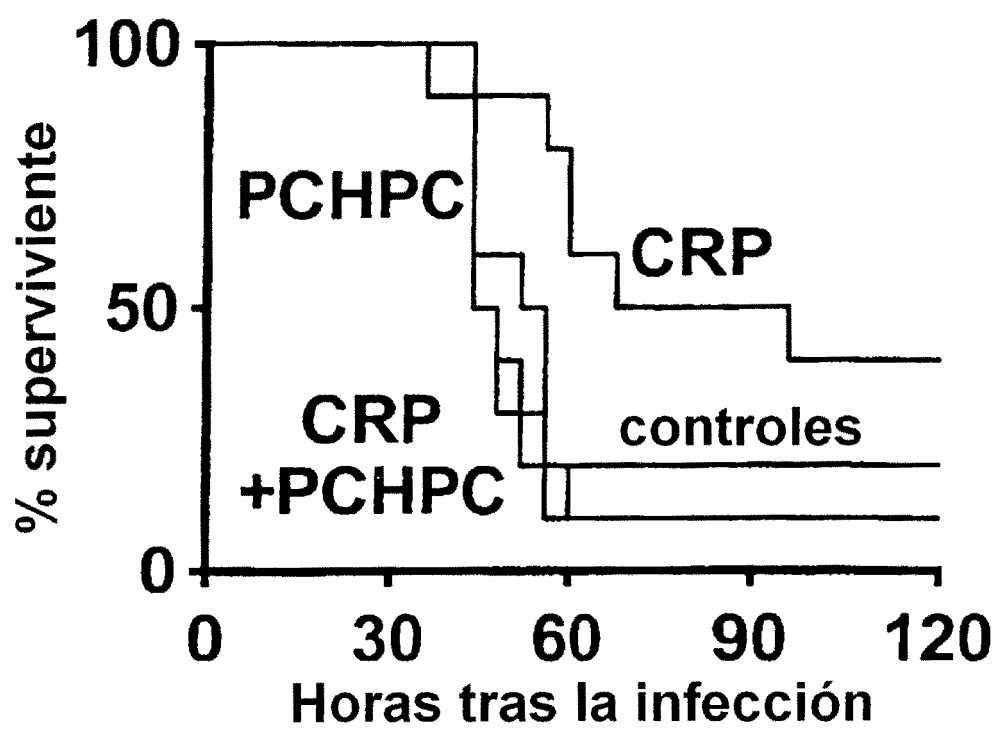


Figura 9

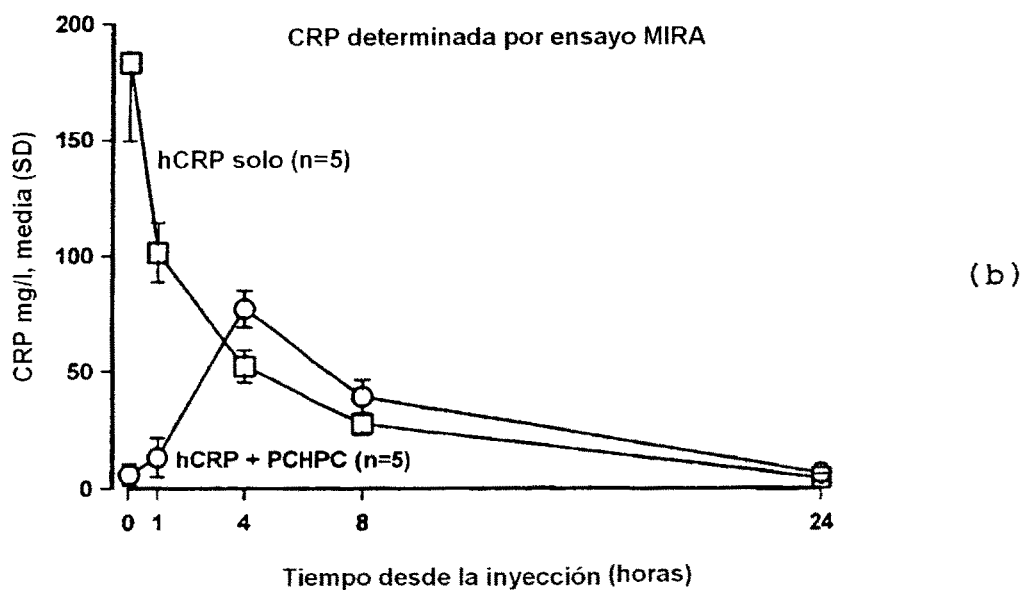
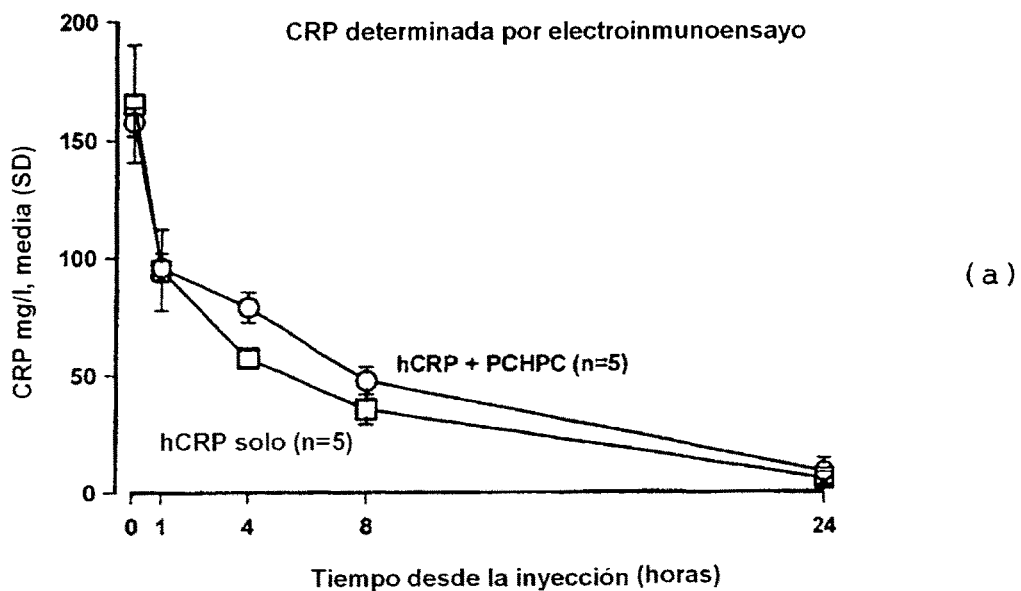


Figura 10