



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 300 317**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/4015 (2006.01)

A61K 31/4025 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/08 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01907912 .8**

(86) Fecha de presentación : **26.02.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1272178**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

(54) Título: **Fragmentos de degradación de la bilirrubina o de la biliverdina.**

(30) Prioridad: **25.02.2000 GB 0004549**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

(73) Titular/es: **MEDICAL RESEARCH COUNCIL
20 Park Crescent
London W1B 1AL, GB**

(72) Inventor/es: **Clark, Joseph, Floyd;
Cadoux-Hudson, Thomas, Andrew, Daniel y
Schofield, Christopher, Joseph**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 300 317 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

Fragmentos de degradación de la bilirrubina o de la biliverdina.

La presente invención se relaciona con fragmentos de degradación de la bilirrubina o de la biliverdina, con sus derivados y con su uso.

La lisis de eritrocitos (hemolisis) puede ir a continuación de una hemorragia subaracnoidea (HSA), un tipo de ictus hemorrágico en el que las complicaciones isquémicas retardadas son un factor importante que afecta al resultado del paciente. Componentes del hemolizado, tales como la oxihemoglobina, la methemoglobina, la hemina y la bilirrubina (BR), se encuentran en el fluido cerebroespinal (FCE) de pacientes con HSA. La HSA inducida por inyecciones subaracnoideas de sangre lisada regula a más la expresión de la hem oxigenasa-1 (HO-1), una isoforma inducible de la hem oxigenasa, en la glía de todo el cerebro. La HO-1 cataliza la degradación del hem, dando lugar a la liberación de biliverdina, CO y hierro libre y la expresión de la HO-1 es una etapa limitante en la ruta de degradación de la hemoglobina. La biliverdina es posteriormente reducida por la biliverdina reductasa para formar BR, un reductor que captura especies de oxígeno reactivas. Debido a su actividad antioxidante, la BR puede servir como agente protector en células, lípidos de membrana y lipoproteínas de baja densidad (LDL) expuestos a estrés oxidativo. Se pueden encontrar altos niveles de BR en coágulos subaracnoideos en el área perivascular y en el FCE durante la HSA (FCE_{HSA}).

Estudios bioquímicos y clínicos han indicado un papel para los radicales libres de oxígeno en la patogenia del vasoespasmo y de la disfunción neurológica que siguen a la HSA. La oxihemoglobina, un constituyente mayor del hemolizado, es un potente generador de especies de oxígeno reactivas. Se han visto aumentos en los productos de peroxidación de lípidos tanto enzimáticos (cascada del ácido araquidónico y producción de peróxidos de eicosanoides) como no enzimáticos (producción de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico e hidroperóxidos de ésteres de colesterol en modelos de HSA, lo que sugiere un papel para el estrés oxidativo durante la HSA.

Las células expuestas a estrés oxidativo tienen una mayor actividad de la isoforma inducible de la HO-1, dando lugar a elevados niveles de BR. La regulación a más por la HO-1 se asocia a hemorragia, vasoespasmo cerebral tras la HSA, isquemia-reperfusión y endotoxemia. Aunque se ha confirmado la presencia de BR en el FCE de pacientes con HSA, la BR *per se* no pudo desarrollar un espasmo arterial significativo *in vivo*. Por lo tanto, su papel en la HSA, en la patogenia del vasoespasmo y en las complicaciones debidas al vasoespasmo ha permanecido incierto.

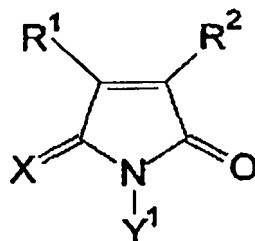
La generación de especies de oxígeno reactivas en el espacio subaracnoideo después de la HSA conduce a la regulación a más por la HO-1 y a la liberación de biliverdina y BR, que pueden servir como blancos de la degradación mediada por especies de oxígeno reactivas. En condiciones patológicas de estrés oxidativo grave, puede producirse degradación oxidativa de la BR y de la biliverdina para dar compuestos que causan vasoespasmo tras la HSA.

El término “vasoespasmo”, tal como se usa aquí, significa contracción de los vasos sanguíneos, particularmente en asociación con el cerebro.

El término “vasoconstricción”, tal como se usa aquí, significa contracción de los vasos sanguíneos, particularmente en asociación con órganos distintos del cerebro.

La presente invención se relaciona con fragmentos de degradación de bilirrubina o biliverdina que pueden producirse en condiciones patológicas de grave estrés oxidativo y con sus derivados.

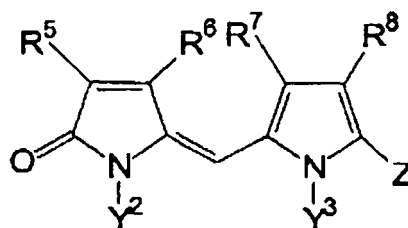
En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de



(I)

ES 2 300 317 T3

la fórmula (I) en donde o bien X es =CH(C-O)NH_2 , Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es hidrógeno o alquilo y el otro es alquenilo, o bien X es =O , Y^1 es hidrógeno, R^1 es alquenilo y R^2 es hidrógeno o alquilo, o de un compuesto de fórmula (II)



(II)

donde Y^2 e Y^3 son hidrógeno, Z es $\text{-CH=C(NHR}^{10}\text{)CH((CH}_2\text{)}_m\text{CO}_2\text{R}^{11}\text{)(C=O)CH}_3$ o $\text{-CH}_2\text{(C=O)CH((CH}_2\text{)}_m\text{CO}_2\text{R}^{11}\text{)(C=O)CH}_3$, uno de R^5 y R^6 es hidrógeno o alquilo y el otro es alquenilo, R^7 es alquilo, R^8 es $\text{(CH}_2\text{)}_2\text{CO}_2\text{H}$, cada uno de R^{10} y R^{11} es hidrógeno o alquilo y m es de 1 a 4, o de una sal de los mismos farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para uso en la inducción de vasoespasmo o vasoconstricción.

Se apreciará que R^1 a R^{20} , X, Y^1 a Y^6 y Z pueden ser combinaciones de los grupos especificados.

El término “alquilo”, tal como se usa aquí, incluye radicales de cadena lineal y ramificada tanto sin sustituir como sustituidos. Típicamente, es un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquilo, preferiblemente un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, por ejemplo metilo, etilo, i-propilo, n-propilo, t-butilo, s-butilo o n-butilo. También puede ser pentilo, hexilo y sus diversos isómeros de cadena ramificada. Cuando el grupo alquilo está sustituido, típicamente lleva uno o más sustituyentes seleccionados entre arilo, cicloalquilo, halógeno, trihaloalquilo tal como trifluorometilo, hidroxilo, alcoxilo, aralcoxilo, amino, mono- o dialquilamino, nitro, ciano, carbonilo, carboxilo, alquilsulfoxilo o alquilsulfonilo.

El término “cicloalquilo”, tal como se usa aquí, típicamente significa un grupo cicloalquilo que tiene de 3 a 8 carbonos, por ejemplo ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo y ciclooctilo. Un grupo cicloalquilo puede estar sin sustituir o sustituido como los grupos alquilo anteriores.

El término “alquenilo”, tal como se usa aquí, incluye radicales de cadena lineal y ramificada no sustituidos y sustituidos que tienen uno o más dobles enlaces. Típicamente, es un alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ tal como, por ejemplo, alilo, butenilo, butadienilo, pentenilo o hexenilo. Cuando el grupo alqueno está sustituido, típicamente lleva uno o más sustituyentes como se ha definido anteriormente para los grupos alquilo.

El término “cicloalqueno”, tal como se usa aquí, significa típicamente un grupo cicloalqueno que tiene de 4 a 8 carbonos, por ejemplo ciclopentenilo, ciclohexenilo o ciclooctadienilo.

El término “alquino”, tal como se usa aquí, incluye radicales de cadena lineal y ramificada no sustituidos y sustituidos que tienen uno o más triples enlaces. Típicamente, es alquino $\text{C}_2\text{-C}_6$, tal como butinilo. Cuando el grupo alquino está sustituido, típicamente lleva uno o más sustituyentes como se ha definido anteriormente para los grupos alquilo.

El término “arilo”, tal como se usa aquí, incluye grupos aromáticos tanto monocíclicos como bicíclicos que típicamente contienen de 6 a 10 carbonos en la porción del anillo, tales como fenilo o naftilo. El grupo arilo está sin sustituir o sustituido. Cuando está sustituido, el grupo arilo puede estar sustituido, por ejemplo, por uno o más sustituyentes seleccionados entre alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alcoxilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, trihaloalquilo tal como trifluorometilo, halógeno e hidroxilo.

El término “heterociclilo”, tal como se utiliza aquí, es típicamente un anillo heterocíclico saturado o insaturado de 3 a 10 miembros que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre N, O y S y que está eventualmente fusionado a un segundo anillo heterocíclico saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros o a un grupo arilo como se ha definido antes. El anillo heterocíclico puede ser, por ejemplo, piridina, furano, tiofeno, pirrol, pirrolidina, pirimidina, pirazina, piridazina, pirazol o indazol, o un éter cíclico tal como glucosa. El grupo heterociclilo puede estar sin sustituir o sustituido en cualquier posición. Como sustituyentes adecuados, se incluyen alquilo, por ejemplo haloalquilo, arilo, por ejemplo fenilo, halógeno e hidroxilo.

El término “halógeno”, tal como se usa aquí, significa flúor, cloro, bromo y yodo.

El término “aralquilo”, tal como se usa aquí, se refiere a grupos alquilo como se ha definido previamente que tienen un sustituyente arilo, por ejemplo bencilo, feniletilo, difenilmetilo y trifenilmetilo.

ES 2 300 317 T3

El término “alcoxilo” o “aralcoxilo”, tal como se usa aquí, incluye cualquiera de los grupos alquilo, cicloalquilo o aralquilo unidos a un átomo de oxígeno.

Preferiblemente, uno de R^1 y R^2 es hidrógeno o alquilo y el otro es alquénilo. Aún más preferiblemente, uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$.

Preferiblemente, Z es $-\text{CH}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{CH}((\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}((\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H})(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$.

Preferiblemente, uno de R^5 y R^6 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$ y R^7 es metilo.

Los compuestos preferidos de la invención son compuestos en los que, en la fórmula (I), cuando X es $=\text{CH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro $-\text{CH}=\text{CH}_2$, o, cuando X es $=\text{O}$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-\text{CH}=\text{CH}_2$ y R^2 es metilo, o, en la fórmula (II), cada uno de Y^2 e Y^3 es hidrógeno, Z es $-\text{CH}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{CH}((\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H})(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}((\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$, uno de R^5 y R^6 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$, R^7 es metilo y R^8 es $-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$, o, en la fórmula (III), cada uno de Y^4 a Y^6 es hidrógeno, uno de R^{13} y R^{14} es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$, cada uno de R^{15} y R^{18} es metilo y cada uno de R^{16} y R^{17} es $-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$.

Tal como se usa aquí, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal con un ácido o base farmacéuticamente aceptable. Como ácidos farmacéuticamente aceptables, se incluyen ácidos tanto inorgánicos como orgánicos, tales como ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, difosfórico, bromhídrico o nítrico y ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, fumárico, maleico, málico, ascórbico, succínico, tartárico, benzoico, acético, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico o p-toluensulfónico. Como bases farmacéuticamente aceptables, se incluyen hidróxidos de metales alcalinos (v.g., sodio o potasio) y de metales alcalinotérreos (v.g., calcio o magnesio) y bases orgánicas tales como alquilaminas, aralquilaminas o heterocicilaminas.

La presente invención incluye todos los posibles isómeros de los compuestos de fórmula (I) y (II) y sus mezclas, incluyendo los isómeros de alquenos *cis* y *trans* y mezclas diastereoméricas y mezclas racémicas, resultantes de las posibles combinaciones de la estereoquímica (R) y (S) cuando están presentes centros estereogénicos.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I), según se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde X es $=\text{CH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$, o X es $=\text{O}$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-\text{CH}=\text{CH}_2$ y R^2 es metilo, para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.

Como sales adecuadas, se incluyen las antes mencionadas como ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables.

También se proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto de la fórmula (I), como se ha definido antes, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, donde X es $=\text{CH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$, Y^1 es hidrógeno, y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$, o X es $=\text{O}$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-\text{CH}=\text{CH}_2$ y R^2 es metilo, un diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 1, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, donde X es $=\text{CH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$.

Los compuestos de fórmula (I) o (II) o sus sales pueden ser preparados por métodos sintéticos conocidos en la técnica. También pueden ser preparados por un procedimiento consistente en la reacción de bilirrubina o biliverdina con un reactivo oxidante, por ejemplo oxígeno, peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio o tetróxido de osmio. Se pueden emplear catalizadores tales como metales de transición en el procedimiento. Se pueden disolver adecuadamente la bilirrubina o la biliverdina en un álcali, tal como hidróxido de sodio o de potasio, por ejemplo hidróxido de sodio 1 a 5M. Se puede neutralizar entonces la solución usando, por ejemplo, ácido clorhídrico, tal como HCl 5 a 11 M, ácido acético, ácido perclórico, ácido nítrico o ácido sulfúrico. Se puede poner luego en contacto la solución resultante con una especie de radicales libres o reactiva. Se pueden extraer los fragmentos de degradación así obtenidos, purificarlos y modificarlos, según se desee, por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Se puede preparar una composición farmacéutica que contenga un compuesto de fórmula (I) o (II) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable de un modo convencional empleando soportes o diluyentes farmacéuticos no tóxicos convencionales en una variedad de formas de dosificación y modos de administración.

Las composiciones pueden ser, por ejemplo, administradas parenteralmente, ya sea subcutánea o intravenosa o intramuscularmente, o intraesternalmente, o por técnicas de infusión. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles.

Estas suspensiones pueden ser formuladas según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes suspensores adecuados. La preparación inyectable estéril puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden ser empleados, están el agua, la solución de Ringer y la solución

isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión.

Con este fin, se puede emplear convencionalmente cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como el ácido oleico hallan uso en la preparación de inyectables.

La dosis varía según la actividad del compuesto específico, la edad, el peso y las condiciones del sujeto que ha de ser tratado, el tipo y la gravedad de la enfermedad y la frecuencia y la vía de administración. Típicamente, la dosis es de 0,0001 a 50 mg por kg de peso corporal. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales de soporte para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Las formas unitarias de dosificación contendrán, en general, entre 5 y 500 mg del compuesto activo.

Los compuestos de fórmula (I) y (II) y sus sales farmacéuticamente aceptables han resultado inducir vasoespasmos o vasoconstricción. Las composiciones antes discutidas pueden, por lo tanto, hallar aplicación en el tratamiento o la inducción del vasoespasmos o de la vasoconstricción. Por ejemplo, las composiciones pueden ser usadas en el sellado de heridas, tal como el cierre perioperatorio de vasos e incisiones (solos o en combinación con métodos de sellado de heridas convencionales), el cierre de laceraciones o de heridas traumáticas o el cierre de vasos después de una resección de tejidos o de tumores. Las composiciones pueden estar en forma de emulsiones o suspensiones opacas de tal forma que, durante el uso, se reduzca la degradación del compuesto activo fotolábil por la luz. Tras la cirugía, o en caso de que se aplique la composición en el sitio equivocado, el compuesto activo fotolábil puede degradarse por irradiación del sitio tratado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico del vasoespasmos o de la vasoconstricción en un hospedador, consistente en determinar la presencia o ausencia en una muestra del hospedador de un compuesto de fórmula (I) según se ha definido anteriormente donde, cuando X es $=CH(C=O)NH_2$, Y¹ es hidrógeno y uno de R¹ y R² es metilo y el otro es $-CH=CH_2$, o, cuando X es $=O$, Y¹ es hidrógeno, R¹ es $-CH=CH_2$ y R² es metilo, o

un compuesto de fórmula (II) según se ha definido anteriormente donde cada uno de Y² e Y³ es hidrógeno, Z es $-CH_2(C=O)CH((CH_2)_2CO_2(C=O)CH_3)$, uno de R⁵ y R⁶ es metilo y el otro es $-CH=CH_2$, R⁷ es metilo y R⁸ es $(CH_2)_2CO_2H$, o

una sal del mismo;

donde la presencia del compuesto de fórmula (I) o (II) o de una sal del mismo indica que el hospedador tiene vasoespasmos o vasoconstricción.

En una realización, el método consiste en

(a) poner en contacto una muestra del hospedador con un agente que se une al compuesto de fórmula (I) o (II) o a una sal del mismo y

(b) detectar si el agente se une a los componentes de la muestra, determinando así la presencia o ausencia del compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal.

El agente puede ser cualquier agente capaz de unirse al compuesto de fórmula (I) o (II) o a su sal, por ejemplo un anticuerpo o un anticuerpo marcado.

Se puede producir un anticuerpo para el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal provocando la formación de anticuerpos en un animal hospedador contra todo o parte del compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal (en adelante, "el inmunógeno"). Son bien conocidos los métodos de producción de anticuerpos monoclonales y policlonales. Un método para producir un anticuerpo policlonal consiste en inmunizar un animal hospedador adecuado, por ejemplo un animal experimental, con el inmunógeno y aislar inmunoglobulinas del suero. Se puede inocular al animal, por lo tanto, con el inmunógeno, recoger posteriormente sangre del animal y purificar la fracción de IgG. Un método para producir un anticuerpo monoclonal consiste en immortalizar células que producen el anticuerpo deseado. Se pueden producir células de hibridoma fusionando células esplénicas de un animal experimental inoculado con células tumorales (Kohler y Milstein, Nature 256, 495-497, 1975).

Se puede seleccionar una célula immortalizada productora del anticuerpo deseado por un procedimiento convencional. Se pueden cultivar los hibridomas o inyectarlos intraperitonealmente para la formación de fluido ascítico o en el torrente sanguíneo de un hospedador alogénico o de un hospedador inmunocomprometido. Se puede preparar anticuerpo humano por inmunización *in vitro* de linfocitos humanos, seguida de transformación de los linfocitos con virus Epstein-Barr.

Para la producción de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, el animal experimental es adecuadamente una cabra, un conejo, una rata o un ratón. Si se desea, se puede administrar el inmunógeno como un conjugado en el que el inmunógeno está copulado a un soporte adecuado. La molécula de soporte es típicamente un soporte fisiológicamente aceptable. El anticuerpo obtenido puede ser aislado y, si se desea, purificado.

La muestra usada en el método para diagnosticar vasoespasmo o vasoconstricción según la presente invención puede ser cualquier muestra adecuada de humano o animal. La muestra es típicamente una muestra de fluido cerebrospinal o de sangre. La muestra puede ser procesada antes de usarla en el método; por ejemplo, puede ser diluida, típicamente en agua, solución salina o solución salina que contenga un tampón (cualquiera de estos diluyentes puede incluir adicionalmente un detergente).

Un anticuerpo usado en el método de la invención puede ser un anticuerpo completo o un fragmento del mismo que sea capaz de unirse al compuesto de fórmula (I) o (II) o a una sal del mismo. Típicamente, el anticuerpo es monoclonal. Dicho anticuerpo completo es típicamente un anticuerpo producido por cualquiera de los métodos de producción de un anticuerpo aquí discutidos. Típicamente, el anticuerpo es un anticuerpo de mamífero, tal como un anticuerpo de primate, humano, roedor (v.g., ratón o rata), conejo, óvulo, porcino, équido o camélido. El anticuerpo puede ser cualquier clase o isotipo de anticuerpo, por ejemplo IgM, pero es preferiblemente IgG.

El fragmento de anticuerpo completo que puede ser usado en el método incluye un sitio de unión a antígeno, v.g., fragmentos Fab o F(ab)₂. El anticuerpo completo o fragmento puede asociarse a otros restos, tales como enlazantes, que pueden ser usados para unir entre sí dos o más fragmentos de anticuerpos. Dichos enlazantes pueden ser enlazantes químicos o pueden estar presentes en forma de una proteína de fusión con el fragmento o el anticuerpo completo. Los enlazantes pueden ser así usados para unir entre sí anticuerpos completos o fragmentos que tengan las mismas o diferentes especificidades de unión, v.g., que puedan unirse a los mismos o diferentes compuestos de fórmula (I) o (II) o a sus sales. El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico capaz de unirse a dos antígenos (o superficies antigénicas) diferentes, típicamente cualesquiera dos de los compuestos de fórmula (I) o (II) o sus sales aquí mencionados. El anticuerpo puede ser un "diacuerpo" formado uniendo dos dominios variables por la espalda. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que tiene secuencia de diferentes anticuerpos naturales, por ejemplo un anticuerpo humanizado.

En general, el método es llevado a cabo en una solución acuosa. La muestra y/o el anticuerpo pueden estar presentes en solución en el método. En realizaciones particulares (algunas de las cuales son discutidas más adelante), el agente o la muestra están inmovilizados sobre un soporte sólido. Típicamente, dicho soporte es la superficie del recipiente en el que se está llevando a cabo el método, tal como la superficie de un pocillo de una placa de microtitulación.

En el método, la determinación de si el agente se une a un compuesto de fórmula (I) o (II) o a una sal del mismo en la muestra puede ser realizada por cualquier método conocido en la técnica para detectar la unión entre dos restos. Se puede determinar la unión midiendo una característica en el anticuerpo o el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal que cambia cuando se produce la unión, tal como un cambio espectroscópico.

En una realización preferida, se inmoviliza el agente sobre un soporte sólido (tal como los soportes antes discutidos). Cuando se pone en contacto la muestra con el agente, los compuestos de fórmula (I) o (II) o sus sales se unen al agente. Eventualmente, se lava luego la superficie del soporte sólido para eliminar cualquier compuesto de la muestra que no esté unido al agente. Se puede determinar entonces la presencia del compuesto de fórmula (I) o (II) o de su sal unidos al soporte sólido (a través de la unión con el agente), lo que indica que el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal están unidos al agente. Se puede hacer esto, por ejemplo, poniendo en contacto el soporte sólido (que puede tener o no el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal unidos al mismo) con una sustancia que se una al compuesto de fórmula (I) o (II) o a su sal específicamente. Este agente puede ser marcado directa o indirectamente mediante un marcaje detectable.

Típicamente, la sustancia es un segundo agente capaz de unirse al compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal de una manera específica, mientras que el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal se une al primer agente inmovilizado que se une al compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal. Este segundo agente puede ser marcado indirectamente por contacto con un tercer anticuerpo específico para la región Fc del segundo agente, donde el tercer agente lleva un marcaje detectable.

Otro sistema que se puede usar para determinar la unión entre el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal y el agente es un sistema de unión competitiva. Una realización de dicho sistema determina si el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal en la muestra es capaz de inhibir la unión del agente a un compuesto de referencia capaz de unirse al agente. El compuesto de referencia puede, por ejemplo, ser una cantidad conocida de compuesto marcado que contenga un grupo o grupos funcionales que el agente reconoce. Si el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal en la muestra es capaz de inhibir la unión entre el agente y el compuesto de referencia, entonces esto indica que dicho compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal son reconocidos por el agente.

Como ejemplos de marcajes detectables, se incluyen enzimas, tales como una peroxidasa (v.g., de rábano picante), fosfatasa, elementos radiactivos, oro (u otro metal coloidal) o marcajes fluorescentes. Se pueden detectar los marcajes enzimáticos usando un sistema basado en quimioluminiscencia o en cromógenos.

La invención también incluye una tira de inmersión que puede ser usada para llevar a cabo el método de la invención. La tira de inmersión consiste en un material poroso capaz de transportar cromatográficamente un líquido y uno o más de los agentes aquí mencionados. Cuando se pone en contacto la tira de inmersión con la muestra, aspira líquido de la muestra hacia una región de detección sobre la tira de inmersión. Se detectan las proteínas de la muestra que contienen los polimorfismos aquí mencionados por su unión a la región de detección.

En una realización, el líquido es llevado a través de una región de la tira de inmersión que contiene los agentes antes mencionados. Los agentes se unen al compuesto de fórmula (I) o (II) o a su sal, formando un complejo de agente/compuesto. Este complejo es llevado hacia la región de detección, que contiene una sustancia (inmovilizada sobre la tira de inmersión) que se une al complejo y lo inmoviliza así en la región de detección. La sustancia es típicamente un agente de unión específica (v.g., un anticuerpo) que se une al agente o al compuesto del complejo. El complejo de agente/compuesto es típicamente detectado en la región de detección mediante el uso de un marcaje que se une al agente.

En otra realización, se marca el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal de la muestra antes de ser aspirado por la tira de inmersión. Se aspira entonces el compuesto marcado por la tira de inmersión (que ha sido puesta en contacto con la muestra) y se detecta por la unión del anticuerpo (que se une a la región de detección).

Típicamente, el marcaje usado en los sistemas de tiras de inmersión antes descritos es un marcaje visualmente detectable que se vuelve visualmente detectable (es decir, que puede verse a simple vista) cuando se inmoviliza suficiente complejo de agente/compuesto en la región de detección. Un marcaje adecuado es una partícula de oro (u otro metal coloidal) o un fluoróforo (v.g., fluoresceína). La presente invención proporciona también un agente que se une a un compuesto de fórmula (I) según se ha definido antes, X es $=CH(C=O)NH_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-CH=CH_2$, o X es $=O$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-CH=CH_2$ y R^2 es metilo;

donde el agente es, o incluye, un anticuerpo específico para el compuesto de fórmula (I).

La presente invención es además ilustrada, meramente a modo de ejemplo, en relación a las figuras, en las cuales:

La Figura 1 muestra el efecto estimulador de los productos de degradación oxidativa de la bilirrubina (ox-BR) y del FCE de pacientes con HSA (FCE-HSA) sobre la tasa de consumo de oxígeno de la arteria carótida porcina (Figura 1A). La tasa de consumo de oxígeno en el estado estacionario (después de 90 minutos) por la arteria carótida porcina (n=3) en presencia de ox-BR (concentración final 1 mg/mL), FCE-HSA (dilución final 1/30) y control (A) es significativamente mayor en ambos casos en comparación con el control (* $P \leq 0,05$). El curso temporal para la estimulación del consumo de oxígeno también era similar. Se induce el desarrollo de tensión en el músculo liso vascular (n=4) mediante ox-BR (concentración final 1 mg/mL) y FCE-HSA (dilución final 1/30) y se puede abrogar mediante pretratamiento con dobutamina (DOB) de anillos de arteria carótida (B). Se expresan los resultados como la media $\pm$ SE.

La Figura 2 muestra el perfil de elución por HPLC de un extracto de cloroformo de BR oxidada bruta analizado en columna de fase invertida Spherisorb.

La Figura 3 muestra las posibles rutas generales para la formación mediada por H_2O_2 de la Caja A, la Caja B y 4-metil-3-vinilmaleimida de BR o biliverdina. En la ruta que conduce a la producción de la Caja A: R_1 es $-CH_3$, R_2 es $-CH=CH_2$, R_3 es $-CH_3$ y R_4 es $-CH_2-CH_2-COOH$. En la ruta que conduce a la formación de la Caja B: R_1 es $-CH=CH_2$, R_2 es $-CH_3$, R_3 es $-CH_3$ y R_4 es $-CH_2-CH_2-COOH$. En la ruta que conduce a 4-metil-3-vinilmaleimida: R es parte de la molécula de bilirrubina.

Los ejemplos siguientes ilustran aún más la presente invención en relación a las figuras.

Ejemplos

Materiales y métodos

Procedimiento de peroxidación de la bilirrubina

Se suspendió bilirrubina (isómeros mixtos, 100 mg, de Sigma Chemical Co.) con agitación en 25 mL de NaOH 5 M a lo largo de 4 h a temperatura ambiente. Se protegió el matraz de reacción de la luz mediante una hoja de aluminio. Después de 4 h, la suspensión naranja de BR se había disuelto en gran medida, para dar una solución verde oscura. Se neutralizó la solución usando HCl 11 M y se añadieron 20 mL de H_2O_2 al 30%. Se incubó entonces la mezcla de reacción en obscuridad durante 48 h a temperatura ambiente, para obtener una solución amarilla transparente con alguna precipitación. Se filtró una porción de esta mezcla bruta (tamaño de poro 0,2 μm), se evaporó a sequedad y se analizó por espectroscopía de 1H RMN (500 MHz). Se usó otra porción de mezcla bruta para la medición del consumo de oxígeno. Para este examen, se liofilizó una porción de mezcla bruta y se redisolvió en solución salina fisiológica (PSS, que se describe más adelante), para formar una concentración final de 1 mg/mL de PSS. Se filtró la mezcla de reacción restante y se extrajo 10 veces con cloroformo [mezcla de reacción:cloroformo (5:1)].

Se secó la solución sobre sulfato de sodio y se evaporó a vacío, para obtener un sólido amarillo. Se analizó también este último por espectroscopía de 1H RMN (500 MHz).

Análisis y purificación por HPLC

Se disolvió el extracto de cloroformo en acuoso al 50% (v/v) y se purificó por HPLC. Se realizaron los experimentos de forma que se excluyera la luz de las muestras. Se equilibraron columnas C18 de fase invertida Hypersil (250 x

ES 2 300 317 T3

7 mm) o de fase invertida Spherisorb ODS (2) (250 x 4,6 mm) con acetonitrilo acuoso al 30% (v/v) a una velocidad de flujo pf de 2 mL min⁻¹ y 1 mL min⁻¹, respectivamente. Se realizó la elución usando un gradiente lineal de acetonitrilo acuoso del 30% al 36% a las mismas velocidades de flujo a lo largo de 8 min. Se monitorizaron las fracciones a 320 nm y se recogieron manualmente. Se liofilizaron las fracciones y se guardaron a -80°C para otros análisis. Se redisolvió cada fracción en acetonitrilo acuoso al 50% (v/v), se reinyectó y se repurificó usando las mismas condiciones para eliminar impurezas de otras fracciones. Para investigar la sensibilidad a la luz de los compuestos, se expusieron las fracciones purificadas a la luz solar durante 90 minutos después de disolver en acuoso al 50% (v/v) y se analizaron por HPLC.

Espectroscopía

Se realizó la espectroscopía UV/Vis en H₂O doblemente destilada usando un espectrofotómetro Ultrospec 4000 UV/Vis. Se recogieron los espectros IR a una resolución de 4 cm⁻¹ en un espectrómetro Perkin Elmer FT-IR. Se sumaron y recogieron un mínimo de 256 barridos.

Se registraron espectros a una temperatura de 300 K en un espectrómetro Bruker AMX500 (500 MHz) equipado con un cabezal de sonda de gradiente z de banda ancha invertida. Se registraron espectros de correlación de enlaces múltiples heteronucleares (HMBC) con selección de gradiente y sin usar un filtro de bajo paso, de tal forma que se pudieron establecer correlaciones de enlaces sencillos simultáneamente. Éstas fueron identificadas por la estructura característica de dobletes ¹J_{CH} que es aparente cuando no se aplica desacoplamiento de carbono de banda ancha durante la recogida de cada FID. Todas las desviaciones químicas de ¹³C fueron obtenidas indirectamente de los picos de correlación en el experimento 2D.

Espectrometría de masas de ionización por electropulverización y mediciones de masa exacta

Se midieron los espectros de masas de ionización por electropulverización en un espectrómetro de masas cuadrupolar triple Micromass BioQ II-ZS equipado con una interfase de electropulverización. Se introdujeron las muestras (10 µL) en la fuente de electropulverización mediante un inyector de bucle. Se realizaron los espectros de iones positivos a partir de una solución en agua/acetonitrilo (1:1, v/v) que contenía un 0,2% (v/v) de ácido fórmico a un voltaje de cono de +30 V. Se realizaron los espectros de masas de iones negativos a partir de una solución en agua/acetonitrilo (1:1 v/v) a voltajes de cono de -10 V y -15 V y se fijó la temperatura de la fuente a 40°C. Se registraron los espectros de masas exactas de alta resolución en un espectrómetro de masas Micromass Autospec 5000 OA-Tof en el modo de ionización química con amoníaco como reactivo gaseoso.

Recogida de fluido cerebroespinal (FCE)

Se recogió FCE de pacientes HSA en el momento de la cirugía o a través del drenaje lumbar insertado para aliviar la presión intracraneal.

Recogida de tejidos y mediciones del consumo de oxígeno

Se recogieron arterias carótidas porcinas de un matadero en los 30 minutos después de la muerte, se lavaron y se sumergieron en PSS a 4°C y se transportaron inmediatamente al laboratorio. Se recortó entonces el exceso de tejido conectivo y de adventicia de las arterias para guardarlas en PSS a 4°C hasta su uso. Se cambió el PSS cada 12 horas y se mantuvieron los recipientes durante hasta 4 días. El PSS contenía lo siguiente: 118 mmol/L de cloruro de sodio, 25 mmol/L de hidrógeno carbonato de sodio, 5,76 mmol/L de cloruro de potasio, 2,5 mmol/L de cloruro de calcio, 1,2 mmol/L de sulfato de magnesio, 0,5 mmol/L de fosfato monobásico de sodio y 11,1 de mmol/L de glucosa. Se oxigenó la solución burbujeando oxígeno al 95% y dióxido de carbono al 5% para mantener un pH de 7,4.

Se determinó la tasa de consumo de oxígeno usando un electrodo de oxígeno Clark de Hansatech Instruments (Norfolk, Reino Unido). Se frotaron vigorosamente anillos de arteria carótida de aproximadamente 0,2 cm de longitud para eliminar las células endoteliales y se añadieron a las cámaras con camisa de agua que contenían PSS a 37°C. Se midieron las tasas de consumo de oxígeno antes y después de la adición de una mezcla bruta de los productos de degradación oxidativa de la BR (concentración final 1 mg/mL de PSS), FCE_{HSA} (dilución final 1/30) o 4-metil-3-vinilmaleimida (purificada por HPLC, liofilizada y redisoluelta después en PSS). Los resultados son presentados como µmol de O₂ consumidas por minuto y por gramo de peso seco, suponiendo que la solubilidad del oxígeno en PSS a 37°C es de 0,202 µmol/mL, o como porcentaje de aumento en el consumo de oxígeno en comparación con el consumo de oxígeno por la arteria carótida sola.

Mediciones de fuerza

Se realizaron mediciones de fuerza isométrica sobre anillos de arteria carótida porcina para valorar los parámetros funcionales durante la exposición a diversos compuestos. Los métodos usados fueron los utilizados por J F Clark y col., J. Vasc. Res., 1995, 32, 24-30. Se usa la contracción inducida por KCl como generación de tensión isométrica máxima y se dan los resultados como porcentaje de la máxima de KCl obtenida para cada carótida.

Análisis estadístico

Se usó el programa ANOVA para evaluar estadísticamente los datos y se consideró que los valores eran significativamente diferentes si p<0,05.

Resultados

Mediciones del consumo de oxígeno

La BR oxidada bruta a una concentración de 1 mg/mL de PSS aumentó el consumo de oxígeno de la arteria carótida porcina aproximadamente 3,6 veces en 90 min. (Figura 1). El FCE_{HSA} estimuló un aumento en la tasa de consumo de oxígeno de un modo similar a la BR oxidada bruta (Figura 1). Altas dosis de BR oxidada bruta o de FCE_{HSA} de pacientes con HSA inhibieron el consumo de oxígeno por la arteria carótida o incluso inhibieron el consumo de oxígeno por el tejido. El FCE de controles sanos o de soluciones control para la BR oxidada bruta no exhibieron actividad alguna. Extractos de cloroformo de BR oxidada bruta y la 4-metil-3-vinilmaleimida también estimularon el consumo de oxígeno. Sin embargo, no fue posible determinar la concentración de 4-metil-3-vinilmaleimida usada en los experimentos debido a la pequeña cantidad de material obtenida.

Análisis y purificación por HPLC

Seguendo la observación de que la actividad biológica era extraíble en cloroformo, se analizaron los extractos y se purificaron por HPLC. La Figura 2 muestra el patrón de separación para tres compuestos aislados: Caja (Bilirrubina oxidada) A, Caja B y 4-metil-3-vinilmaleimida (Caja C). La reacción de biliverdina con H₂O₂ dio también lugar a la producción de los mismos compuestos, según se juzga por sus tiempos de retención.

La Caja A, la Caja B y la 4-metil-3-vinilmaleimida eran sensibles a la luz. Cuando se expusieron a la luz solar durante 90 min, como se juzga por HPLC, la intensidad de sus picos disminuyó significativamente. Los análisis de ¹H RMN de la Caja A y de la Caja B tras exposición a la luz solar durante 90 min. también indicaron degradación a una serie de productos. Por el contrario, la Caja A, la Caja B y la 4-metil-3-vinilmaleimida eran relativamente termoestables cuando se mantuvieron a 60°C durante 2 h, según se juzga por los análisis de HPLC.

Análisis espectroscópicos

Caja A: 4-metil-5-oxo-3-vinil-(1,5-dihidropirrol-2-iliden)acetamida (Figura 3). Espectroscopía UV/Vis: $\lambda_{\text{máx}}$ 215 nm y 300 nm. Espectroscopía IR: 3.434,0 (N-H), 1.698,2 (C=O; lactama), 1.666,4 (C=O; amida), 1.430,5 y 1.292,7 cm⁻¹. Se establecieron las asignaciones de ¹H y ¹³C RMN (500 MHz) a partir de un experimento de correlación 2D ¹H-¹³C heteronuclear de rango largo (HMBC) (Tabla 1).

TABLA 1

35

40

45

50

55

60

	¹ H RMN (100% CD ₃ CN) ^a	¹³ C RMN (CD ₃ CN/D ₂ O) ^b
1	9,69	–
2	–	147,0
3	–	140,7
4	–	131,5
5	–	173,8
1'	5,62	99,1
2'	–	169,7
3-vinil-CH	6,57	125,3
3-vinil-CH ₂	5,68	124,6
	5,71	
4-Me	1,98	9,1
NH ₂	6,37/5,86	–

^a En referencia al CH₃CN residual a 1,94 ppm.

65

^b Referencia externa a TSP a 0,0 ppm.

El espectro de protones (en CD_3CN) demostró la presencia de un solo grupo $\text{CH}=\text{CH}_2$ vínfico más un singlete abrupto consistente con un resto de alqueno remoto. También estaban presentes en esta región dos resonancias amplias, cada una correspondiente a un solo protón, que no estaban presentes en este último espectro de D_2O /acetonitrilo. Estas sugerían un grupo NH_2 de amida primaria en el que los dos protones se diferenciaban como resultado de una rotación restringida del enlace amida. Se observó otra resonancia intercambiable amplia, también correspondiente a un solo protón, a 9,69 ppm, lo que indica la presencia de una estructura nuclear de anillo pirrólico. Estos datos, junto con la presencia de un singlete de tres protones adicional a 1,98 ppm, sugerían que un núcleo derivado de pirrol estaba intacto en este fragmento y el que llevara un grupo metilo y vínfico, y por ello que fuera el resultado de un sitio de escisión oxidativa, era consistente con la masa molecular, y se confirmó por las conectividades observadas en los experimentos de correlación 2D ^1H - ^{13}C heteronuclear de rango largo (HMBC) (en $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ 3:7, debido a la limitada solubilidad). Todas las correlaciones observadas eran consistentes con la Caja A. Es notable que el singlete de metilo tuviera una fuerte correlación con un carbonilo a 173,8 ppm, mientras que el protón de alqueno remoto se correlacionaba con el carbonilo de amida a 169,7 ppm. Estos datos también establecieron la localización del grupo metilo adyacente al carbonilo del anillo. No fue posible la asignación del doble enlace exocíclico. Espectrometría de masas: m/z 179,20 (MN^+ ; electroionización); m/z 179,082163 (MH^+), masa calc. 179,082053 (espectrometría de masas de alta resolución). Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$.

Caja B: 3-metil-5-oxo-4-vinil-(1,5-dihidropirrol-2-iliden)acetamida (Figura 4). Espectroscopía UV/Vis: $\lambda_{\text{máx}}$ 215 nm y 310 nm. Espectroscopía IR: 3435,7 (N-H), 1.654,1 (C=O; lactama) y 1.647,9 (C=O; amida) cm^{-1} . Se establecieron las asignaciones de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz) a partir de un experimento de correlación 2D ^1H - ^{13}C heteronuclear de rango largo (HMBC) (Tabla 2).

TABLA 2

	^1H RMN (100% CD_3CN) ^a	^{13}C RMN ($\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$) ^b
1	9,49	–
2	–	147,9
3	–	142,7
4	–	129,2
5	–	173,0
1'	5,55	99,0
2'	–	170,2
4-vinil-CH	6,62	125,7
4-vinil-CH ₂	5,52, 6,32	122,4
3-Me	2,07	9,1
NH ₂	6,37/5,86	–

^a En referencia al CH_3CN residual a 1,94 ppm.

^b Referencia externa a TSP a 0,0 ppm.

Los espectros de protones demostraron las mismas características de principios que para la Caja A, estando lo más significativo en la dispersión de la desviación de los protones vínficos. Los datos de HMBC (en $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ 3:7) confirmaron la presencia de la misma estructura nuclear, pero indicaban que la posición relativa de los grupos metilo y vinilo estaba cambiada. El protón CH del grupo vinilo guardaba ahora una fuerte correlación con el carbonilo del anillo de pirrol a 173,0 ppm. Este fragmento isomérico derivaría, por lo tanto, de la escisión oxidativa del otro extremo de la molécula de BR del que produjo la Caja A. No fue posible la asignación de estereoquímica de dobles enlaces exocíclicos. Espectrometría de masas: m/z 179 (MH^+ ; electroionización); m/z 179,082021 (MH^+), masa calc. 179,082053 (espectrometría de masas de alta resolución). Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$.

Los patrones de desviación observados para los protones del metilo y del vinilo en la Caja A y en la Caja B llevan una similitud notable con los de los fragmentos tripirrólicos: biotripirrina-a y biotripirrina-b (Figura 3) aisladas por Yamaguchi y col. (Yamaguchi 94). En ambos casos, los protones vínficos en particular exhiben un comportamiento característico, apareciendo el par geminal esencialmente coincidente cuando se asientan en el lado del núcleo pirrólico

ES 2 300 317 T3

opuesto al carbonilo pirrólico, pero exhibiendo una dispersión significativa cuando están adyacentes a este grupo carbonilo. Estas similitudes apoyan también la localización relativa asignada de los grupos metilo y vinilo en la Caja A y en la Caja B.

- 5 *4-Metil-3-vinilmaleimida*: Espectroscopía IR: 3.436,2 (N-H), 2.103,9, 1.773,7, 1.713,0, 1.639,6 cm^{-1} . Se establecieron las asignaciones de RMN ^1H y ^{13}C (500 MHz) a partir de un experimento de correlación 2D ^1H - ^{13}C heteronuclear de rango largo (HMBC) (Tabla 3).

TABLA 3

10

	^1H RMN ^a	^{13}C RMN ^b
15 1	7, 19	–
2	–	170, 2
3	–	134, 3
20 4	–	136, 7
5	–	171, 4
3-vinil-CH	6, 55	124, 2
25 3-vinil-CH ₂	6, 40, 5, 73	125, 9
4-Me	2, 07	8, 3

30 En referencia a CDCl_3 a 7,27^a y 77,0^b ppm.

La 4-metil-3-vinilmaleimida era soluble en cloroformo y dio un solo espectro de ^1H , demostrando la presencia de un grupo vinilo (en el que el par geminal estaba bien disperso), un grupo metilo y una resonancia amplia a 7,19 ppm. Los espectros HMBC demostraron correlaciones del protón del CH del vinilo y del grupo metilo con diferentes centros carbonilo e identificaron fácilmente el fragmento como poseedor de la estructura de la 4-metil-3-vinilmaleimida. La dispersión de los protones vinílicos es de nuevo consistente con que éstos sean adyacentes a un grupo carbonilo en el núcleo de pirrol. Espectrometría de masas de iones negativos: m/z 135,9. Los datos de la ^1H RMN (500 MHz) y de la espectrometría de masas eran consistentes con los dados para la 4-metil-3-vinilmaleimida.

40 Se vio que la BR reaccionaba con peróxido de hidrógeno, usando un procedimiento diseñado para imitar el estrés oxidativo grave, para dar varios productos de fragmentación. La solución de BR oxidada bruta estimulaba el consumo de oxígeno del músculo liso vascular de la arteria carótida porcina en ausencia de capa endotelial. El FCE_{HSA} también estimulaba el consumo de oxígeno en el músculo liso vascular. La comparación del FCE_{HSA} con los productos de degradación oxidativa de la BR en los ensayos de consumo de oxígeno reveló que se comportaban de un modo similar (Figura 1). El FCE_{HSA} y los productos de degradación oxidativa de la BR inducían estimulación del consumo de oxígeno tras la adición a la cámara con la arteria. Además, altas dosis tanto de FCE_{HSA} como de productos de degradación oxidativa de la BR inhibían la tasa de consumo de oxígeno o incluso mataban el músculo liso vascular. Experimentos de medición de fuerza isométrica confirmaron que el cambio en el metabolismo reflejaba los cambios causados por el FCE_{HSA} y los productos de oxidación de la BR.

50 Los compuestos bioactivos tanto del FCE_{HSA} como de la BR oxidada eran ambos extraíbles en cloroformo. Se aislaron tres compuestos fotolábiles por HPLC: 4-metil-5-oxo-3-vinil-(1,5-dihidropirrol-2-iliden)acetamida (Caja A) y 4-metil-3-vinilmaleimida y 3-metil-5-oxo-4-vinil-(1,5-dihidropirrol-2-iliden)acetamida (Caja B). Junto con la Caja A y la Caja B, también se aisló el derivado monopirrólico 4-metil-3-vinilmaleimida. Se sabe que la 4-metil-3-vinilmaleimida se forma durante la fotooxidación de la biliverdina, así como en la reacción de H_2O_2 con ferriprotoporfirina IX o por el ácido crómico con BR. Se protegió la mezcla de reacción de la luz, por lo que se supone que se forma 4-metil-3-vinilmaleimida en la reacción de H_2O_2 con BR o biliverdina. No obstante, se pueden producir trazas de 4-metil-3-vinilmaleimida por exposición fortuita a la luz. Aunque no se ha detectado 4-metil-3-vinilmaleimida directamente *in vivo*, se ha visto su hidrólisis en neonatos ictericos que sufren fototerapia.

60 La Caja A y la Caja B no pueden formarse usando el mecanismo que conduce a las biotripirrinas a y b, ya que la formación de la Caja A y de la Caja B oficiales requiere nitrógeno de los anillos de pirrol. Estudios sobre la degradación fotolítica mediada por oxígeno en singlete de la han indicado un mecanismo que implica la transferencia de electrones de la BR en estado excitado con dióxígeno en estado fundamental. Se han identificado una serie de productos, incluyendo biliverdina, 4-metil-3-vinilmaleimida y ácidos alifáticos simples. No está claro si la biliverdina es o no un intermediario en algunos o todos de los productos de fragmentación, pero, al igual que la BR, no son estables a la luz.

65

ES 2 300 317 T3

Se propone un posible mecanismo de la Caja A, de la Caja B y de la 4-metil-3-vinilmaleimida durante la fotooxidación en la Figura 3. Se ha propuesto un BR-dioxetano como intermediario para la 4-metil-3-vinilmaleimida durante la fotooxidación. Sin embargo, los intermediarios de dichas especies parecen menos probables en la oxidación mediada por H_2O_2 . El ataque del H_2O_2 en C-4 o C-16 para dar el peróxido mostrado en la Figura 3, seguido de reorganización de Crigee e hidrólisis para obtener 4-metil-3-vinilmaleimida, puede ser más probable. El mecanismo de ataque inicial del peróxido es incierto, con formación de un derivado catiónico (radical) de BR o biliverdina como posibilidad. De forma similar, la formación de peróxidos en C-6 o C-14, seguida de reorganización e hidrólisis, puede conducir a la Caja A y a la Caja B.

Como la 4-metil-3-vinilmaleimida, que ha mostrado reaccionar con tioles, incluyendo el glutatión, la Caja A y la Caja B son agentes alquilantes (aceptores de Michael). Es posible que ejerzan actividad biológica que dé lugar a vasoespasmo por un proceso de alquilación, v.g., afectando a los sistemas de fosfatasa/kinasa celulares.

Los productos de la degradación oxidativa de la BR exhiben actividad biológica y pueden tener un papel en la patogenia del vasoespasmo arterial después de una hemorragia. La oxidación de la BR conduce a la producción de fragmentos derivados de BR que están presentes en el FCE_{HSA} de pacientes de HSA.

Evidencia de la presencia de la Caja A en el fluido cerebroespinal humano (CSF)

Método

Se añadió agua doblemente desionizada (100 ml) a 45 ml en volumen seco de FCE liofilizado y se agitó en la oscuridad durante 45 min. Mientras se agitaba continuamente en la oscuridad, se añadió entonces urea (20 g) al FCE (parcialmente) reconstituido para obtener una concentración aproximada de urea 3M. Tras la adición de urea, se agitó la solución durante otros 5 min. más para obtener una solución totalmente reconstituida de FCE sin extracto sólido. Se añadieron entonces 500 ml de cloroformo a esta solución con agitación en oscuridad. Se agitó entonces la solución durante una hora y se centrifugó después a 2.800 rpm durante 5 min. Se recogió luego la capa clorofórmica y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro en oscuridad. Se retiró el sulfato de magnesio por filtración en oscuridad y se eliminó el cloroformo por evaporación rotatoria a vacío en oscuridad. Se redisolvió el extracto sólido resultante en 250 μ l de acetonitrilo:agua desionizada 1:1. Se configuró entonces la solución resultante a 13.000 rpm durante 15 min.

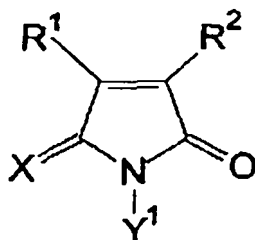
Se analizó el sobrenadante por HPLC equipada con un detector de disposición de fotodiodos. Las condiciones experimentales eran las siguientes: se analizaron 100 μ l de la solución 1:1 de acetonitrilo:agua desionizada por HPLC usando una columna Phenomenex Phenosphere de 5 micras ODS2 80A de 250 mm x 4,6 mm. Se desarrolló el siguiente gradiente con una velocidad de flujo de 1 ml por minuto.

Tiempo en minutos	% Tampón A Bicarbonato de amonio 10 mM en acetonitrilo 50%/agua desioni- zada 50%	% Tampón B Bicarbonato de amonio 10 mM en agua desionizada
0-5	50	50
5-30	50-100 (gradiente lineal)	50-0 (gradiente lineal)
30-35	100	0
35-45	50	50

A un tiempo de retención de aproximadamente 5 min. 20 seg., se observó un compuesto con un perfil UV con máximos de absorción a 212 y 297 nm. El perfil era el mismo que el de una Caja A de muestra de referencia (preparada sintéticamente). La presencia de la Caja A en el FCE fue además confirmada por análisis de muestras de FCE contaminadas con la Caja A de referencia.

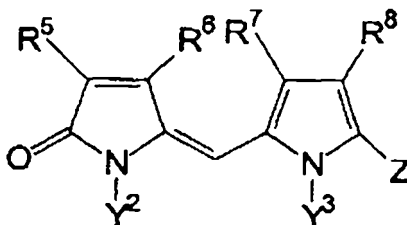
REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I)



(I)

donde o bien X es $=\text{CH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es hidrógeno o alquilo y el otro es alquenilo, o bien X es $=\text{O}$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es alquenilo y R^2 es hidrógeno o alquilo, o de un compuesto de fórmula (II)



(II)

donde Y^2 e Y^3 son hidrógeno, Z es $-\text{CH}=\text{C}(\text{NHR}^{10})\text{CH}((\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{R}^{11})(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}((\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{R}^{11})(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$, uno de R^5 y R^6 es hidrógeno o alquilo y el otro es alquenilo, R^7 es alquilo, R^8 es $(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$, cada uno de R^{10} y R^{11} es hidrógeno o alquilo y m es de 1 a 4, o de una sal de los mismos farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para uso en la inducción de vasoespasmo o vasoconstricción.

2. Uso según la reivindicación 1, donde, en la fórmula (I), o bien X es $=\text{CH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$, Y^1 es hidrógeno, y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-\text{H}=\text{CH}_2$, o bien X es $=\text{O}$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-\text{CH}=\text{CH}_2$ y R^2 es metilo, o bien, en la fórmula (II), cada uno de Y^2 e Y^3 es hidrógeno, Z es $-\text{CH}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{CH}((\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H})(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}((\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H})(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$, uno de R^5 y R^6 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$, R^7 es metilo y R^8 es $-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$.

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes de un compuesto de fórmula (I) donde o bien X es $=\text{CH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$, o bien X es $=\text{O}$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-\text{CH}=\text{CH}_2$ y R^2 es metilo.

4. Un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 1, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, donde o bien X es $=\text{CH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$, o bien X es $=\text{O}$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-\text{CH}=\text{CH}_2$ y R^2 es metilo, para uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal.

5. Un método para diagnosticar el vasoespasmo o la vasoconstricción en un hospedador, consistente en determinar la presencia o ausencia en una muestra del hospedador de

un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 1 donde, cuando X es $=\text{CH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$, o cuando X es $=\text{O}$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-\text{CH}=\text{CH}_2$ y R^2 es metilo, o

un compuesto de fórmula (II) según se define en la reivindicación 1 donde cada uno de Y^2 e Y^3 es hidrógeno, Z es $-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H})(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$, uno de R^5 y R^6 es metilo y el otro es $-\text{CH}=\text{CH}_2$, R^7 es metilo, R^8 es $(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$,

ES 2 300 317 T3

o una sal del mismo;

donde la presencia del compuesto de fórmula (I) o (II) o de su sal indica que el hospedador tiene vasoespasmo o vasoconstricción.

6. Un método según la reivindicación 5, cuyo método consiste en

(c) poner en contacto una muestra del hospedador con un agente que se une al compuesto de fórmula (I) o (II) o a su sal y

(d) detectar si el agente se une a los componentes de la muestra, determinando así la presencia o ausencia del compuesto de fórmula (I) o (II) o de su sal.

7. Un método según la reivindicación 6, donde el agente es un anticuerpo específico para el compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal.

8. Un método según la reivindicación 7, donde el anticuerpo está marcado.

9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde el compuesto es fotolábil.

10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 consistente en determinar la presencia o ausencia en una muestra de un hospedador de un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 1 o de una sal del mismo, donde X es $=CH(C=O)NH_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-CH=CH_2$, o X es $=O$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-CH=CH_2$ y R^2 es metilo.

11. Un agente que se une a un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 1, donde X es $=CH(C=O)NH_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-CH=CH_2$, o X es $=O$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-CH=CH_2$ y R^2 es metilo;

donde el agente es, o contiene, un anticuerpo específico para el compuesto de fórmula (I).

12. Un agente según la reivindicación 11, donde el anticuerpo está marcado.

13. Una composición farmacéutica consistente en un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 1, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, donde X es $=CH(C=O)NH_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-CH=CH_2$, o X es $=O$, Y^1 es hidrógeno, R^1 es $-CH=CH_2$ y R^2 es metilo, y un diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable.

14. Un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 1, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, donde X es $=CH(C=O)NH_2$, Y^1 es hidrógeno y uno de R^1 y R^2 es metilo y el otro es $-CH=CH_2$.

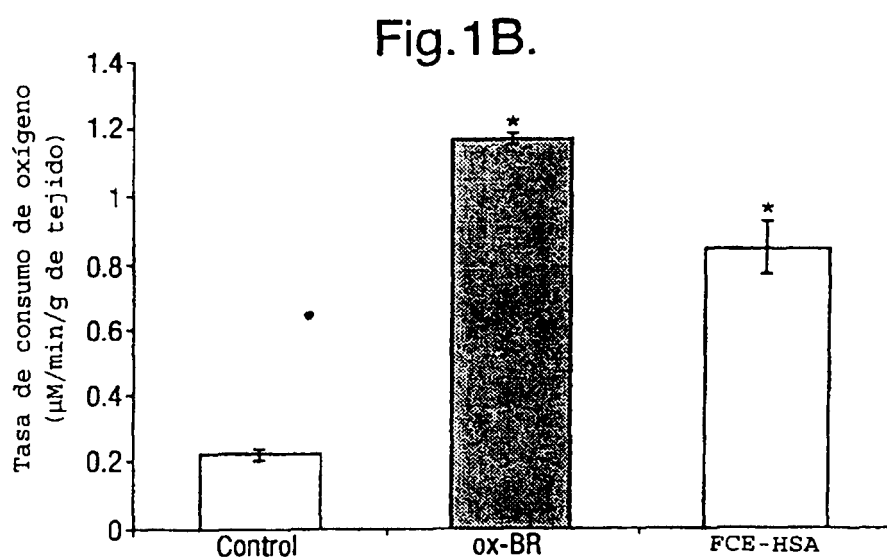
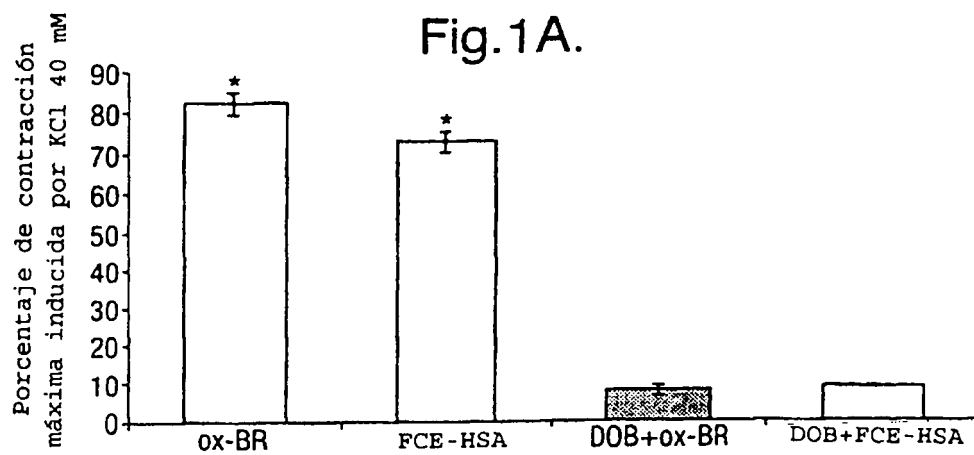
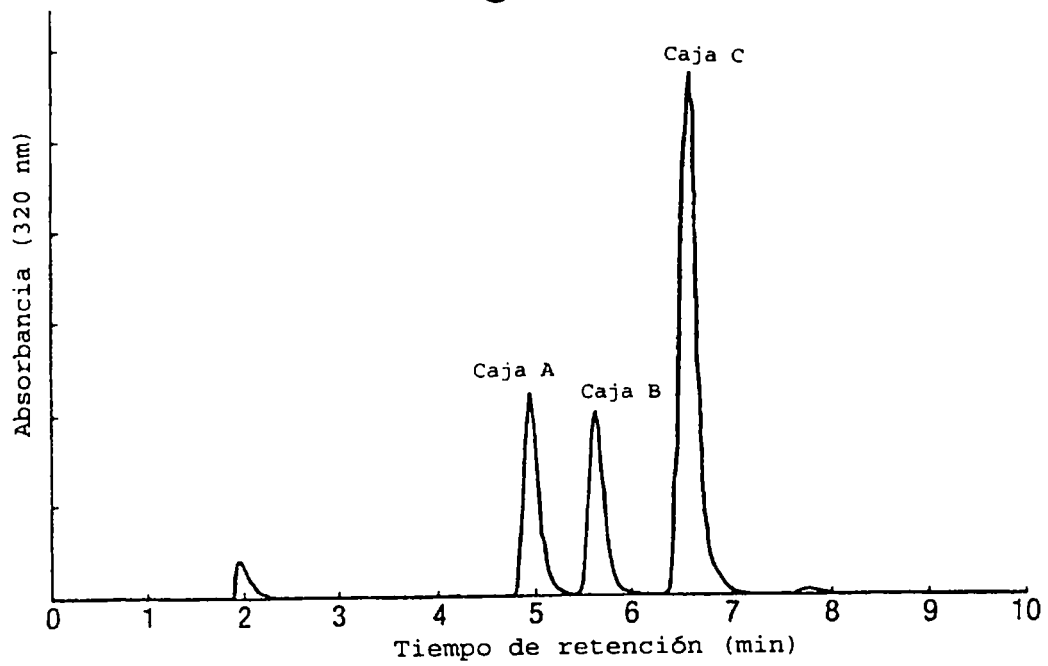


Fig.2.



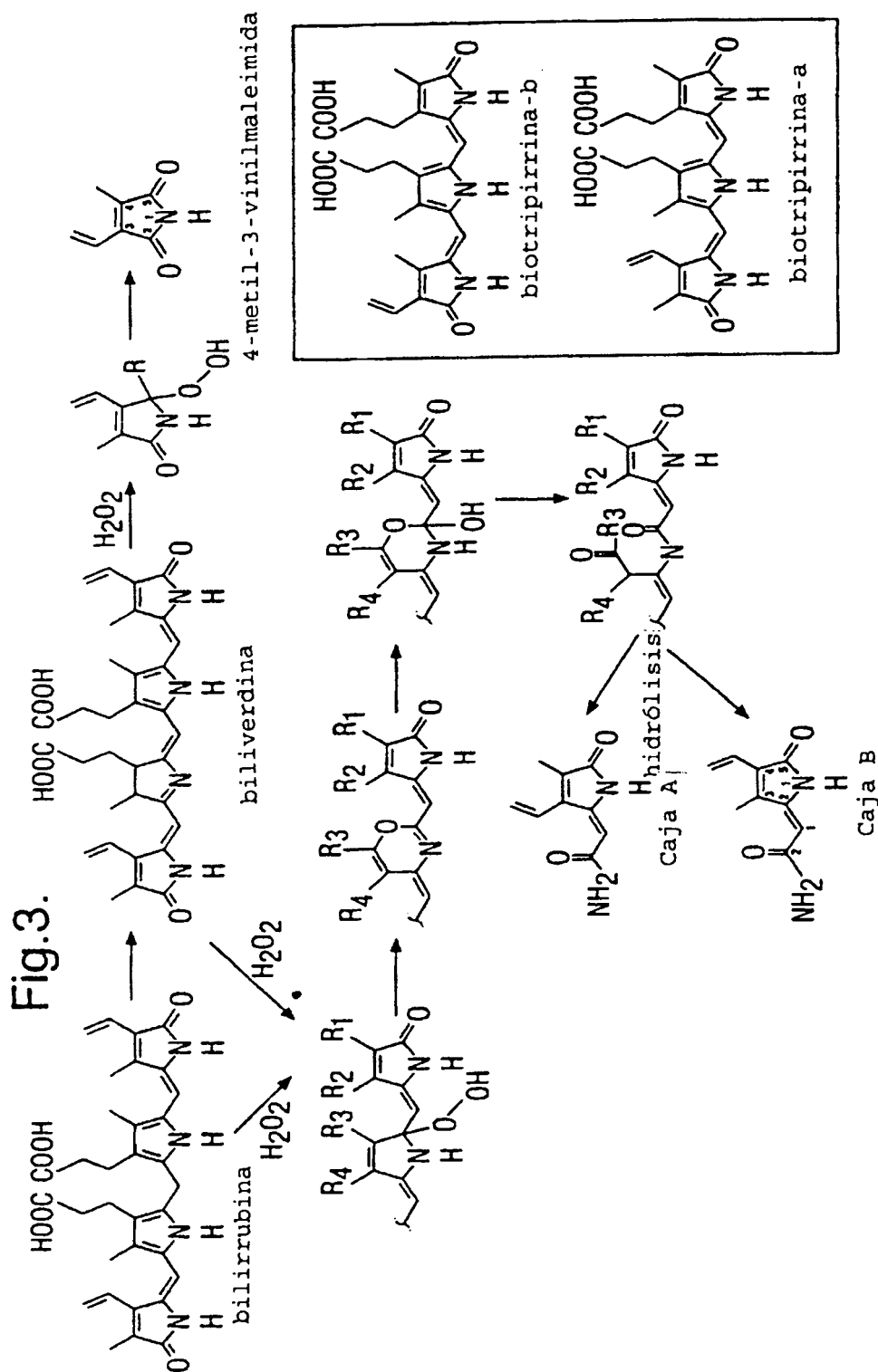


Fig.4A.



Fig.4B.



Fig.5A.

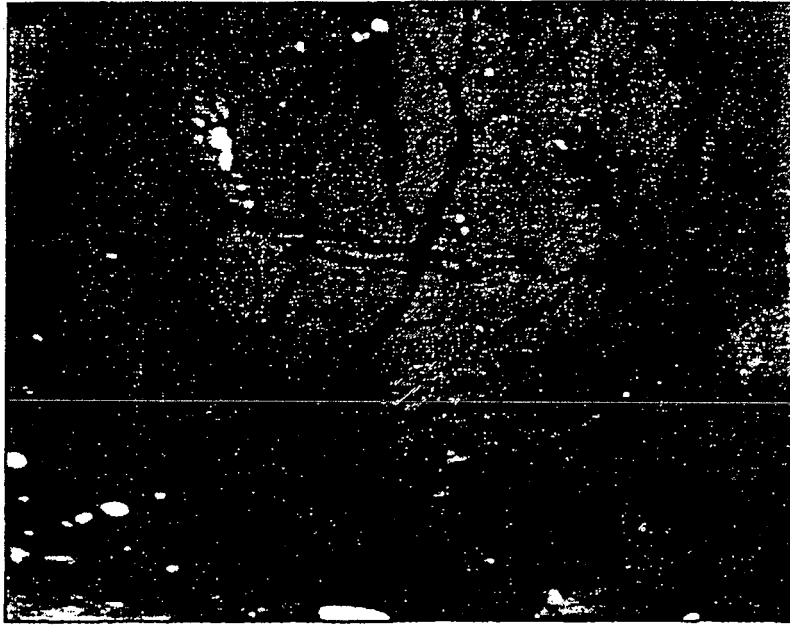


Fig.5B.



Fig.6a.



Fig.6B.

