

(22) Data de pedido: 2010.06.04	(73) Titular(es): AVEXXIN AS	
(30) Prioridade(s): 2009.06.04 GB 0909643	NORDAHL BRUNS VEI 2A 7052 TRONDHEIM NO	
(43) Data de publicação do pedido: 2012.04.11	(72) Inventor(es): BERIT JOHANSEN	NO
(45) Data e BPI da concessão: 2015.07.29 199/2015	ANDREA HUWILER	CH
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS	
	RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO DE GLOMERULONEFRITE**

(57) Resumo:

UM COMPOSTO DE FÓRMULA (I) R-L-CO-X (I) (EM QUE R É UM GRUPO HIDROCARBONETO C10-24 INSATURADO OPCIONALMENTE INTERROMPIDO POR UM OU MAIS HETEROÁTOMOS OU GRUPOS DE HETEROÁTOMOS SELECIONADOS A PARTIR DE S, O, N, SO, SO₂, O REFERIDO GRUPO HIDROCARBONETO COMPREENDENDO PELO MENOS 4 LIGAÇÕES DUPLAS NÃO CONJUGADAS; L É UM GRUPO DE LIGAÇÃO FORMANDO UMA PONTE DE 1 A 5 ÁTOMOS ENTRE O GRUPO R E O CARBONILO CO; E X É UM GRUPO DE REMOÇÃO DE ELETRÕES) OU UM SAL DESTE PARA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE GLOMERULONEFRITE.

RESUMO**"TRATAMENTO DE GLOMERULONEFRITE"**

Um composto de fórmula (I) R-L-CO-X (I) (em que R é um grupo hidrocarboneto C₁₀₋₂₄ insaturado opcionalmente interrompido por um ou mais heteroátomos ou grupos de heteroátomos selecionados a partir de S, O, N, SO, SO₂, o referido grupo hidrocarboneto compreendendo pelo menos 4 ligações duplas não conjugadas; L é um grupo de ligação formando uma ponte de 1 a 5 átomos entre o grupo R e o carbonilo CO; e X é um grupo de remoção de elétrons) ou um sal deste para utilização no tratamento de glomerulonefrite.

DESCRIÇÃO

"TRATAMENTO DE GLOMERULONEFRITE"

Esta invenção refere-se à utilização de certas cetonas de cadeia longa polinsaturadas para o tratamento da glomerulonefrite e em particular de cetonas que transportam substituintes de remoção de eletrões alfa para a funcionalidade carbonilo em tal tratamento.

A glomerulonefrite, também conhecida como nefrite glomerular, abreviada GN, é uma doença renal, caracterizada por inflamação dos glomérulos, ou pequenos vasos sanguíneos nos rins. Pode apresentar-se com hematúria isolada e/ou proteinúria ou como uma síndrome nefrótica, insuficiência renal aguda, ou insuficiência renal crónica. A glomerulonefrite é classificada em vários padrões patológicos diferentes, que são agrupados em tipos não-proliferativos ou proliferativos. O diagnóstico do padrão de GN é importante, porque o resultado e o tratamento diferem em diferentes tipos.

As principais causas de glomerulonefrite são aquelas que são intrínsecas ao rim, enquanto as causas secundárias estão associadas a certas infeções (patogénios bacterianos, virais ou parasitários), fármacos, distúrbios sistémicos (SLE, vasculite) ou cancros.

O glomérulo é uma rede vascular única com três tipos especializados de células: a célula endotelial, a célula mesangial e a célula epitelial visceral. As células mesangiais (MC) têm várias funções no capilar glomerular renal, incluindo o suporte estrutural do tufo capilar, modulação da hemodinâmica glomerular e uma função fagocítica permitindo a remoção de macromoléculas e complexos imunitários. A proliferação das MC é uma característica proeminente da doença glomerular incluindo a nefropatia de IgA, glomerulonefrite membranoproliferativa, nefrite de lúpulos e nefropatia diabética.

A redução da proliferação de MC em modelos de doenças glomerulares através de tratamento com, por exemplo, mostrou-se que uma dieta de baixo teor de proteína produz expansão da matriz extracelular e alterações glomeruloscleróticas. Os inibidores da proliferação de MC podem, por conseguinte, oferecer oportunidades terapêuticas para o tratamento da doença proliferativa glomerular.

A glomerulonefrite proliferativa mesangial é uma forma de glomerulonefrite que envolve inflamação nos glomérulos renais. As células mesangiais que são uma parte dos capilares glomerulares aumentam em tamanho dando aos glomérulos uma aparência irregular. O distúrbio provoca geralmente síndrome nefrótica que representa perda de proteína na urina. Pode estar presente como glomerulonefrite aguda, crónica ou rapidamente progressiva e pode progredir para insuficiência renal crónica.

Sabe-se que a proliferação de MC é inibida por uma variedade de drogas farmacológicas, por exemplo, inibidores contra a enzima de conversão da angiotensina (ACE), cinases dependentes de ciclina (CDK), fator de crescimento derivado de plaquetas e outros. O glomérulo também tem potencial para expressar várias isoformas da óxido nítrico-sintase (NOS). A indução de NOS induzível ocorre como parte de uma resposta inicial rápida a uma lesão imunitária numa glomerulonefrite. Embora o papel do NO gerado pela NOS no glomérulo ainda não seja claro, alguns estudos demonstraram que a inibição de NO pode alterar o nível de proteinúria e a infiltração de leucócitos e outras manifestações de danos, tais como trombose, proliferação e produção de matriz.

Parece claro que a redução de NO contribuirá para a melhoria da proliferação de células mesangiais e, assim, oferece alívio dos sintomas da glomerulonefrite.

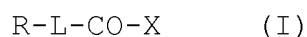
Os presentes inventores buscam novos tratamentos para condições de GN e relacionadas. Tal como observado acima, as atuais terapias propostas podem ser baseadas em inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ACE), tais como lisinopril e compostos semelhantes. Estes inibidores reduzem a pressão sanguínea, uma característica comum a todos os fármacos anti-hipertensivos, mas também possuem atividade inibidora da proliferação de MC intrarrenal e também parecem diminuir a proteinúria.

Os presentes inventores verificaram que os compostos reivindicados aqui, alguns dos quais são novos, outros conhecidos, têm potencial no tratamento de condições proliferativas em geral e, em particular, na glomerulonefrite. Os inventores verificaram que uma certa classe de compostos baseados em moléculas de ácidos gordos insaturados de cadeia longa é útil no tratamento da glomerulonefrite.

Alguns dos compostos propostos para utilização nesta invenção foram divulgados antes, por exemplo, em EP-A-1469859 mas aí apenas no contexto do tratamento de psoríase.

Os presentes inventores verificaram que estes e outros compostos também têm utilidade no tratamento de glomerulonefrite ou outras doenças proliferativas.

Assim, visto de um aspeto da invenção, um composto de fórmula (I)



(em que R é um hidrocarboneto insaturado C_{10-24} que pode possuir até três substituintes, o referido grupo hidrocarboneto compreendendo pelo menos 4 ligações duplas não conjugadas;

L é um grupo de ligação formando uma ponte de 1 a 5 átomos

entre o grupo R e o carbonilo CO, em que L compreende pelo menos um heteroátomo; e
X é CHal₃) ou sal deste
para utilização no tratamento de glomerulonefrite.

Visto de um outro aspeto, a invenção proporciona um método de tratamento de glomerulonefrite, compreendendo a administração a um animal, de preferência um mamífero, e.g., humano, de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula (I) ou um sal deste tal como aqui anteriormente descrito.

Visto de um outro aspeto, a invenção proporciona a utilização de um composto de fórmula (I) ou de um sal deste tal como aqui descrito anteriormente para utilização no fabrico de um medicamento para o tratamento de glomerulonefrite.

Descrição Detalhada

A presente invenção envolve a utilização de compostos de fórmula (I) ou de um sal destes, no tratamento de glomerulonefrite e de condições relacionadas. A glomerulonefrite é uma doença renal, caracterizada por inflamação dos glomérulos.

O grupo R compreende, de preferência, de 5 a 9 ligações duplas, de preferência, 5 ou 8 ligações duplas, e.g. de 5 a 7 ligações duplas tal como 5 ou 6 ligações

duplas. Estas ligações não devem ser conjugadas. É também preferido que as ligações duplas não se conjuguem com a funcionalidade carbonilo.

As duplas ligações presentes no grupo R podem estar na configuração *cis* ou *trans*, no entanto, é preferido que a maioria das ligações duplas presentes (isto é, pelo menos, 50%) esteja na configuração *cis*. Noutras formas de realização vantajosas todas as ligações duplas no grupo R estão na configuração *cis* ou todas as ligações duplas estão na configuração *cis*, exceto a ligação dupla mais próxima do grupo carbonilo que pode estar na configuração *trans*.

As O grupo R pode ter entre 10 e 24 átomos de carbono, de preferência de 12 a 20 átomos de carbono, especialmente de 17 a 19 átomos de carbono.

O esqueleto do grupo R contém apenas átomos de carbono.

O grupo R pode possuir até três substituintes, e.g. selecionados a partir de halo, alquilo C₁₋₆, e.g. metil, alcoxilo C₁₋₆. Se presentes, os substituintes são de preferência não polares, e pequenos, e.g. um grupo metilo. É preferido, no entanto, que o grupo R permaneça não substituído.

O grupo R é de preferência linear. De preferência deriva de uma fonte natural tal como um ácido gordo de

cadeia longa ou éster. Em particular, o grupo R pode derivar de AA, EHA ou DHA.

O grupo de ligação L proporciona um grupo de ligação de 1 a 5 átomos de esqueleto, de preferência de 2 a 4 átomos de esqueleto entre o grupo R e o carbonilo. Os átomos no esqueleto do ligador compreendem heteroátomos tais como N, O, S, SO, SO₂.

Os componentes preferidos do grupo de ligação são -CH₂-, -CH(alquilo C₁₋₆)-, -N(alquil C₁₋₆)-, -NH-, -S-, -O-, -CH=CH-, -CO-, -SO-, -SO₂- que podem ser combinados uns com os outros por qualquer ordem (quimicamente significativa) para formar o grupo de ligação. Assim, através da utilização de dois grupos metileno e um grupo -S- é formado o ligador -SCH₂CH₂-.

O grupo de ligação L contém pelo menos um heteroátomo no esqueleto. É preferido que o primeiro átomo do esqueleto do grupo de ligação ligado ao grupo R seja um heteroátomo ou grupo de heteroátomos.

É altamente preferido que o grupo de ligação L contenha pelo menos uma ligação -CH₂- no esqueleto. Idealmente os átomos do grupo de ligação adjacentes ao carbonilo são -CH₂-.

É preferido que o grupo L (dependendo do tamanho do grupo L) proporciona um heteroátomo ou grupo de

heteroátomos posicionado α , β , γ , ou δ do carbonilo, de preferência β ou γ do carbonilo. De preferência o heteroátomo é O, N ou S ou um derivado de enxofre tal como SO.

Os grupos de ligação altamente preferidos são, portanto, $-\text{NH}_2\text{CH}_2$, $-\text{NH}(\text{Me})\text{CH}_2-$, $-\text{SCH}_2-$, $-\text{SOCH}_2-$, $-\text{COCH}_2-$.

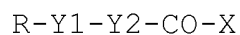
O padrão de substituição é de preferência tal que os substituintes R e carbonilo são alfa, gama um ao outro (i.e. 1,3 ou 2, 4 ou 3, 5-separação).

Para evitar qualquer dúvida, salienta-se que a ponte de 1 a 5 átomos deve contada como o percurso mais curto desde o início do ligador até ao carbonilo.

Os grupos de ligação altamente preferidos são SCH_2 , NHCH_2 , e $\text{N}(\text{Me})\text{CH}_3$.

O grupo X é CHal_3 , em que Hal representa um halogeneto, e.g. flúor, cloro, bromo ou iodo, especialmente CF_3 .

Assim, os compostos de fórmula (I) preferidos são aqueles de fórmula (I').



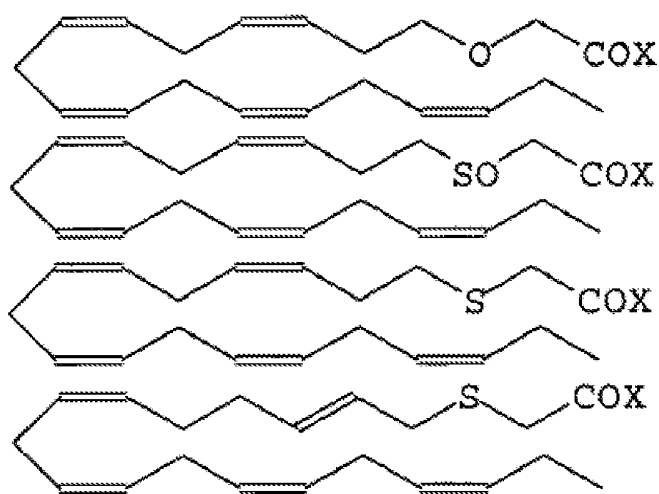
em que R e X são tal como aqui anteriormente definidos; Y1 é selecionado a partir de O, S, NH, $\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{-alquilo})$, SO

ou SO₂ e

Y₂ é (CH₂)_n ou CH (alquilo C₁₋₆);

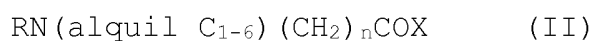
onde n é de 1 a 3, de preferência 1.

Os compostos preferidos (conhecidos) para uso na invenção são representados abaixo.



Certos compostos são novos e formam um outro aspecto da invenção.

Outros compostos que são novos incluem os compostos RN(alquil C₁₋₆)COX. Assim, visto de outro aspecto, a invenção proporciona um composto de fórmula (II)

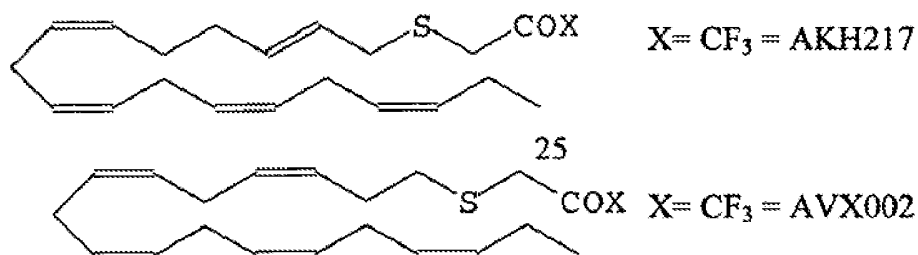


onde R, n e X são tal como anteriormente definidos, especialmente o composto:



Visto de outro aspeto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo qualquer novo composto tal como anteriormente definido em combinação com pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Os seguintes compostos são altamente preferidos para utilização na invenção:



Sempre que possível, os compostos da invenção podem ser administrados na forma de sal, solvato, pró-fármaco ou éster, especialmente na forma de sal. De preferência no entanto, tal forma não é utilizada.

Tipicamente, um sal farmacêuticamente aceitável pode ser facilmente preparado através da utilização de um ácido desejado. O sal pode precipitar a partir da solução e ser colhido através de filtração ou pode ser recuperado através de evaporação do solvente. Por exemplo, uma solução aquosa de um ácido tal como ácido clorídrico pode ser

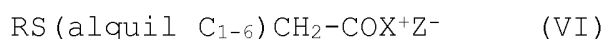
adicionada a uma suspensão aquosa de um composto de fórmula (I) e a mistura resultante evaporada até à secura (liofilizada) para se obter o sal de adição ácida como um sólido. Alternativamente, um composto de fórmula (I) pode ser dissolvido num solvente adequado, por exemplo um álcool tal como isopropanol, e o ácido pode ser adicionado no mesmo solvente ou noutro solvente adequado. O sal de adição ácida resultante pode em seguida ser precipitado diretamente, ou através da adição de um solvente menos polar tal como éter diisopropílico ou hexano, e isolado através de filtração.

Os sais de adição adequados são formados a partir de ácidos inorgânicos ou orgânicos que formam sais não tóxicos e são exemplos os sais cloridrato, bromidrato, iodidrato, sulfato, bissulfato, nitrato, fosfato, fosfato de hidrogénio, acetato, trifluoroacetato, maleato, malato, fumarato, lactato, tartarato, citrato, formato, gluconato, succinato, piruvato, oxalato, oxaloacetato, trifluoroacetato, sacarato, benzoato, sulfonatos de alquilo ou de arilo (por exemplo, metanossulfonato, etanossulfonato, benzenossulfonato ou p-toluenossulfonato) e isotionato. Exemplos representativos incluem sais trifluoroacetato e formato, por exemplo, os sais bis ou tris-trifluoroacetato e os sais mono ou diformato, em particular o sal tris ou bis-trifluoroacetato e o sal monoformato.

Noutra forma de realização altamente preferida, o composto da invenção é um sal de sulfónio. Num tal com-

posto, um átomo de enxofre no esqueleto da molécula, *e.g.*, no grupo ligador, é funcionalizado para possuir um grupo alquilo C_{1-6} . Isto pode ser alcançado através de reação com um halogeneto de alquilo, *e.g.*, iodeto de metilo. O ião de halogeneto forma o contraíão do sal.

Numa outra forma de realização preferida, portanto, a invenção proporciona um sal sulfônio de um composto de fórmula (I). De preferência, o composto é de fórmula (VI)



onde R e X são tal como anteriormente definidos e Z é um contraíão, *e.g.* halogeneto; *e.g.* o composto



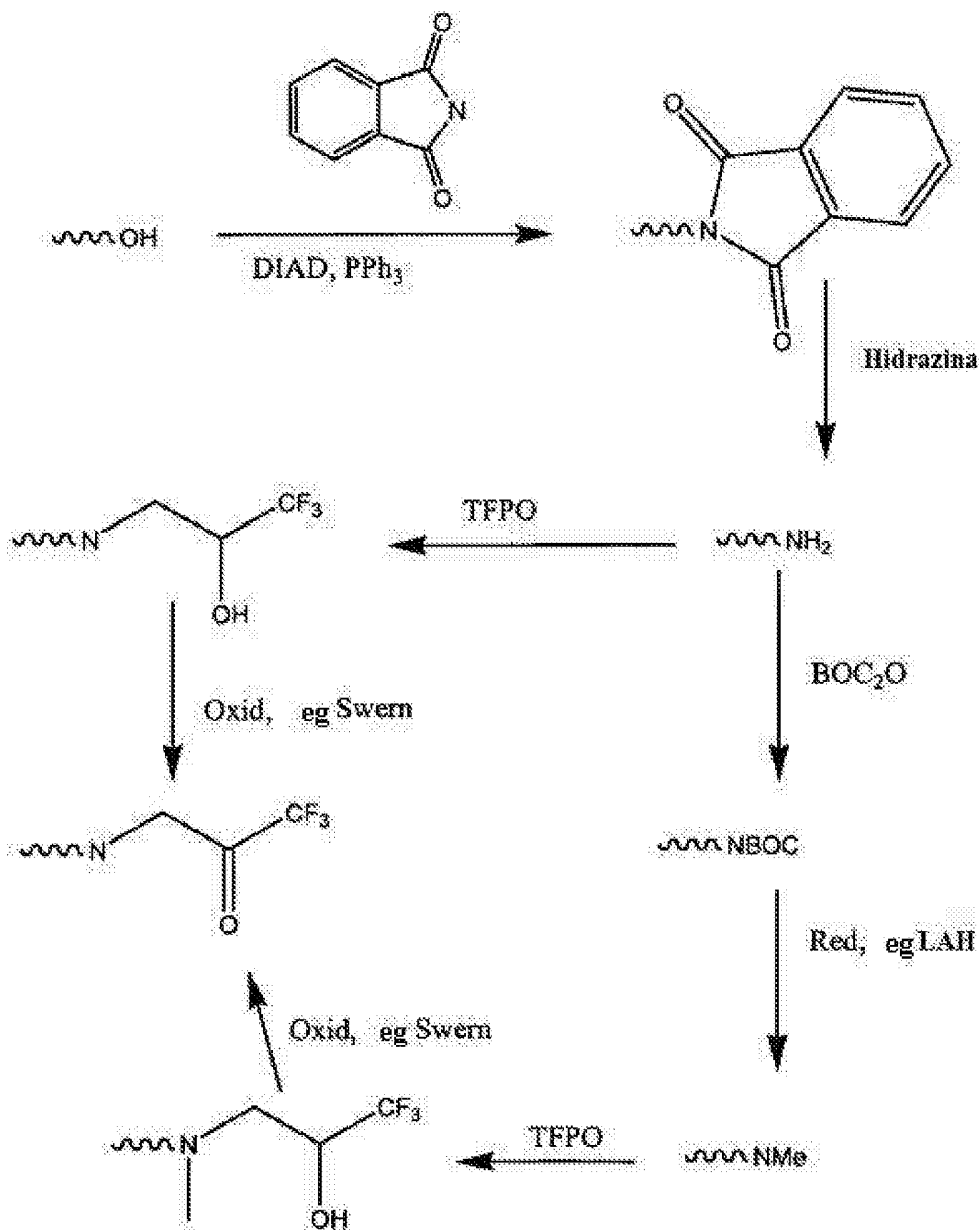
Os compostos de fórmula (I) podem ser produzidos utilizando vias sintéticas químicas conhecidas. É conveniente iniciar a síntese a partir do composto ácido araquidônico (AA), EPA (ácido all-Z-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenóico) ou DHA (ácido all-Z-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenóico) disponíveis comercialmente. A conversão da funcionalidade ácido destes compostos para, por exemplo, um grupo $-COCF_3$ pode ser prontamente conseguida, *e.g.*,

convertendo o ácido carboxílico no seu cloreto de ácido correspondente e fazendo reagir o mesmo com anidrido trifluoroacético na presença de piridina.

A introdução de um heteroátomo na cadeia de carbonos, é também prontamente alcançada. Convenientemente, por exemplo, o ácido de partida é reduzido a um álcool e, se necessário, convertido no tiol correspondente. O tiol nucleofílico pode então ser feito reagir com um grupo tal como $\text{BrCH}_2\text{COCF}_3$ introduzindo assim o carbonilo e as espécies de remoção de eletrões. Protocolos de síntese completos podem ser verificados em *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 2000, 2271-2276 ou *J. Immunol.*, 1998, 161, 3421.

Quando o esqueleto da molécula contém um átomo de azoto, é necessária uma síntese alternativa. A formação de um álcool polinsaturado pode ser conseguida utilizando protocolos dados no artigo de Perkin Trans acima. A partir daí, a conversão de um álcool $-\text{OH}$ em $-\text{NH}_2$ com, por exemplo, ftalimida e subsequente redução de hidrazina permite a formação de um grupo $-\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COCF}_3$ através de reação com trifluoropropileneóxido (TFPO) e oxidação do hidroxilo numa cetona. Esta reação é mostrada abaixo.

A metilação do azoto pode ser realizada antes desta reação, através da formação de um grupo N-BOC e da redução, e.g. com hidreto de alumínio e lítio. A reação com TFPO e oxidação produz o ligador NMe-CH_2 .



Isto forma um aspeto adicional da invenção que, portanto proporciona um processo para a preparação de um composto de fórmula (I) compreendendo:

- (I) conversão do composto R-OH em R-NH₂;
- (II) opcionalmente metilação do átomo N;
- (III) fazer reagir com TFPO; e
- (IV) oxidação do hidroxilo formado numa cetona.

Os compostos da invenção são propostos principalmente para utilização no tratamento de, *inter alia*, glomerulonefrite. Embora os compostos da invenção sejam, geralmente, de uso no tratamento de glomerulonefrite, os compostos são de particular utilidade no tratamento de doença do tipo proliferativo.

Por tratar ou tratamento, entende-se, pelo menos, um de:

- (i). prevenção ou retardamento do aparecimento dos sintomas clínicos da doença que se desenvolve num mamífero;
- (ii). inibição da doença i.e. paragem, redução ou atraso do desenvolvimento da doença ou de um relapso desta ou pelo menos de um sintoma clínico ou subclínico desta, ou
- (iii). alívio ou atenuação de um ou mais dos sintomas clínicos ou subclínicos da doença.

O benefício de um sujeito a tratar é estatisticamente significativo ou pelo menos perceptível ao paciente ou ao médico. Em geral um perito pode apreciar quando o "tratamento" ocorre.

A palavra "tratamento" é também aqui utilizada para abranger o tratamento profilático, isto é, o tratamento de indivíduos que estão em risco de desenvolver uma doença em questão.

Os compostos da invenção podem ser utilizados em qualquer sujeito animal, em particular um mamífero e, mais particularmente, um ser humano ou um animal que sirva como um modelo para uma doença (e.g., rato, macaco, etc.).

Para tratar uma doença tem de ser administrada a um paciente uma quantidade eficaz do agente ativo. Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" significa a quantidade de um composto que, quando administrada a um animal para o tratamento de um estado, distúrbio ou condição, é suficiente para efetuar esse tratamento. A "quantidade terapêuticamente eficaz" variará dependendo do composto, da doença e da sua gravidade e da idade, peso, condição física e capacidade de resposta do sujeito a tratar e será, por fim, à discrição do médico assistente.

Embora seja possível que, para utilização nos métodos da invenção, um composto de fórmula I possa ser administrado como substância em bruto, é preferível apresentar o ingrediente ativo numa formulação farmacêutica, por exemplo, em que o agente está misturado com um transportador farmacêuticamente aceitável selecionado considerando a via de administração pretendida e a prática farmacêutica padrão.

O termo "transportador" refere-se a um diluente, excipiente, e/ou veículo com o qual um composto ativo é administrado. As composições farmacêuticas da presente

invenção podem conter combinações de mais de um transportador. Tais transportadores farmacêuticos são bem conhecidos na especialidade. As composições farmacêuticas podem também compreender qualquer ou quaisquer ou agentes ligadores, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de revestimento, e/ou agentes solubilizantes e assim por diante, adequados. As composições também podem conter outros componentes ativos, e.g., outros fármacos para o tratamento da glomerulonefrite.

Será apreciado que as composições farmacêuticas para utilização de acordo com a presente invenção podem estar na forma suspensões, cápsulas ou comprimidos, de administração oral, parentérica, transdérmica, por inalação, sublingual, tópica, por implante, nasal, ou entérica (ou outra administrada por via mucosa) que podem ser formulados de um modo convencional, utilizando um ou mais transportadores ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis. As composições da invenção também podem ser formuladas como formulações de nanopartículas.

Os compostos da invenção podem ser administrados para aplicações de distribuição imediata, retardada, modificada, sustentada, pulsada, ou controlada.

As composições farmacêuticas da invenção podem conter de 0,01 a 99% peso - por volume do material ativo.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz do compos-

to da presente invenção pode ser determinada através de métodos conhecidos na especialidade. As quantidades terapeuticamente eficazes dependerão da idade e da condição fisiológica geral do paciente, da via de administração e da formulação farmacêutica usada. As doses terapêuticas estarão geralmente entre cerca de 10 e 2000 mg/dia e de preferência entre cerca de 30 e 1500 mg/dia. Podem ser utilizados outros intervalos, incluindo, por exemplo, 50-500 mg/dia, 50-300 mg/dia, 100-200 mg/dia.

A administração pode ser uma vez por dia, duas vezes por dia, ou mais frequentemente, e pode ser diminuída durante a fase de manutenção da doença ou distúrbio, *e.g.*, uma vez de dois em dois ou de três em três dias em vez de todos os dias ou de duas vezes por dia. A dose e a frequência de administração dependerão dos sinais clínicos, que confirmam a manutenção da fase de remissão, com a redução ou ausência de pelo menos um ou de preferência ainda mais do que um dos sinais clínicos da fase aguda conhecidos do perito na técnica.

É vantajoso que o medicamento da invenção seja tomado oralmente.

Os compostos da invenção podem ser utilizados no tratamento da glomerulonefrite e de doenças relacionadas. Em particular, os compostos da invenção podem ser utilizados para tratar glomerulonefrite mesangioproliferativa, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica

ou aguda, proteinúria, hematúria, nefropatia por IgA, glomerulonefrite membranoproliferativa, nefrite do lúpus, nefropatia diabética, e glomerulosclerose.

Os compostos da invenção podem ser utilizados para tratar a glomerulonefrite em combinação com outros produtos farmacêuticos conhecidos para o referido fim, e isto forma um aspeto adicional da invenção. Outros produtos farmacêuticos úteis incluem corticosteroides, imunossuppressores, agentes anti-hipertensivos e medicamentos diuréticos.

A invenção é adicionalmente descrita abaixo com referência aos seguintes exemplos e figuras não limitativos.

Descrição das Figuras:

A Figura 1 mostra o efeito dos inibidores dos exemplos na formação de PGE₂ estimulada por citocinas em células mesangiais. As Células quiescentes foram estimuladas com DMEM (-), IL-1 β (1 nM), na ausência (-) ou presença das concentrações indicadas de AKH-217 e AVX002. Os sobrenadantes foram colhidos e tomados para quantificação de PGE₂ usando um ELISA. Os dados são expressos como % da PGE₂ máxima estimulada com IL-1 β e são médias \pm DP (n=3).

A Figura 2 mostra o efeito dos inibidores dos

exemplos na proteína sPLA₂ estimulada por citocinas (A) e na expressão do ARNm (B) e atividade do promotor em células mesangiais. As células quiescentes foram estimuladas com DMEM (-), ou IL-1 β (1 nM) na ausência (-) ou presença de AKH-217 (etOH), controle de veículo. (A) Os sobrenadantes foram tomados para precipitação de proteínas e as proteínas precipitadas foram separadas através de SDS-PAGE e sujeitas a análise *Western blot* utilizando um anticorpo monoclonal contra sPLA₂ de rato. Os dados mostram duplicados de uma experiência representativa. (B) As células foram tomadas para extração de ARN e sujeitas a análise quantitativa de PCR da IIA-sPLA₂ de rato e ARN de 18 S. Os valores de $\Delta\Delta Ct$ foram calculados e os resultados são expressos como % da resposta máxima estimuladas por IL-1 β e são médias + DP (n=3). (C) As células foram transfectadas com a construção do promotor de sPLA₂ mais um plasmídeo codificando para a luciferase de Renilla. Após a transfeção, as células foram estimuladas durante 24 h com veículo (-), IL-1 β (1 nM), ou IL-1 β mais 10 μ M de AKH-217. A atividade do promotor de sPLA₂ foi calculada e os resultados são expressos como unidades relativas de luciferase (RLU) e são médias \pm DP (n=3).

A Figura 3 mostra o efeito dos inibidores dos exemplos na formação de NO estimulada por citocinas em células mesangiais. As células quiescentes foram estimuladas com DMEM (-), IL-1 β (1 nM; +), na ausência ou presença das concentrações indicadas de AKH-217, AVX002, ou AACOCF3. Os sobrenadantes foram colhidos e tomados para

quantificação do óxido nítrico (NO) através da utilização de um ensaio de Reação de Griess. Os dados são expressos como μM de NO no sobrenadante e são médias \pm DP ($n=3$).

A Figura 4 mostra o efeito dos inibidores dos exemplos na proteína iNOS estimulada por citocinas (A) e expressão de ARNm (B) e atividade do promotor em células mesangiais. As células quiescentes foram estimuladas com veículo (DMEM), IL-1 β (1 nM), na ausência (-) ou presença das concentrações indicadas (em μM) de AVX001 e AVX002. EtOH, controlo do veículo. (A) As células foram tomadas para extração de proteína e uma quantidade igual de proteína foi separada através de SDS-PAGE e submetida a uma análise de *Western blot* utilizando um anticorpo policlonal contra iNOS a uma diluição de 1:2000. Os dados são representativos de pelo menos 3 experiências independentes dando resultados semelhantes. (B). As células foram tomadas para extração de ARN e sujeitas a análise quantitativa de PCR da iNOS de rato e do ARN de 18 S. Os valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$ foram calculados e os resultados são expressos como % da resposta máxima de IL-1 β e são médias \pm DP ($n = 3$). (C) As células foram transfectadas com a construção do promotor da iNOS de rato mais um plasmídeo codificando para a luciferase de Renilla. Após transfeção, as células foram estimuladas com veículo (-), IL-1 β (1 nM), ou IL-1 β mais 10 μM de AVX001. A atividade do promotor de iNOS foi calculada e os resultados são expressos como unidades relativas de luciferase (RLU) e são médias \pm DP ($n = 3$).

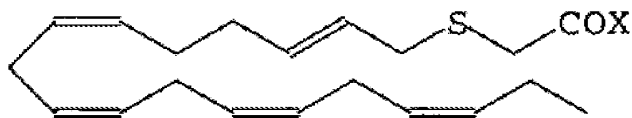
A Figura 5 mostra o efeito dos inibidores dos exemplos na incorporação de timidina-[³H] em células mesangiais. As células quiescentes foram estimuladas durante 24 h com veículo (DMEM), ou 100 μ M de ATP na ausência (-) ou presença das concentrações indicadas de AVX001 ou AVX002, na presença de timidina-[³H]. (B) As células foram estimuladas durante 24h com insulina (100 ng/ml) ou IGF (50 ng/ml) na ausência (-) ou presença de 10 μ M de AVX001 ou AVX002, na presença de timidina-[³H]. A timidina incorporada no ADN foi determinada e os resultados são expressos como % do controlo e são médias \pm DP (n=3).

A Figura 6 mostra o efeito dos inibidores dos exemplos na ativação de NF κ B estimulada com IL-1 β em células mesangiais. As células quiescentes foram estimuladas durante 30 min com veículo (DMEM), ou IL-1 β (2 nM) na ausência (-) ou presença (+) de AVX001 ou AVX002 (10 μ M, pré-tratada 2 h). Em seguida, os lisados celulares foram separados por SDS-PAGE e sujeitos a uma análise de *Western blot* utilizando um anticorpo policlonal contra a fosfo-p65 (NF κ B) (painel superior), Hur como um controlo de carga (painel do meio), e I κ B (painel inferior). Os dados na Fig. 6A mostra duplicados de uma experiência representativa. As Figuras 6B e C mostram a avaliação densitométrica das bandas de NF κ B e I κ B.

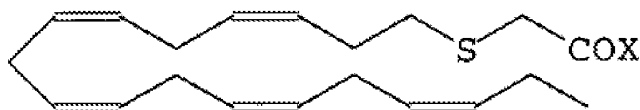
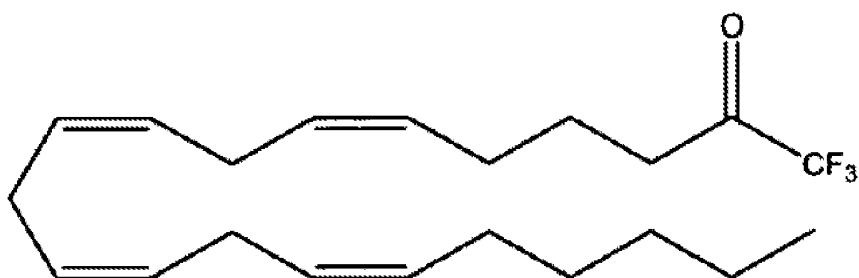
Exemplos

Os seguintes compostos foram utilizados nas Experiências:

AKH-217/AVX001



AVX002

X = CF₃Ref.
AACOCF3

Estes compostos foram sintetizados com base em *Chem. Soc.*,
Perkin Trans 1, 2000, 2271-2276.

Exemplo 1

Efeitos dos inibidores na formação de PGE2 em células mesangiais renais de rato

Investigámos o efeito dos inibidores na formação de PGE2 em células mesangiais. A formação de PGE2 é altamente induzida pela estimulação das células com a citocina pró-inflamatória IL-1 β . Esta indução de PGE2 é reduzida de forma dependente da dose na presença dos

inibidores. Os efeitos máximos foram observados com 3-10 3-10 μ M de AKH-217 (AVX001) e Composto B (AVX002) (Fig. 1).

Foi anteriormente mostrado que a formação de PGE2 induzida por citocinas em células mesangiais envolve tanto a ativação de sPLA2 como da cPLA2 (Pfeilschifter *et al.*, 1993), investigámos então o efeito dos inibidores acima na expressão da proteína sPLA2 e do ARNm. Tal como observado na Fig. 2, AKH-217 foi capaz de reduzir a expressão e a segregação da proteína IIA-sPLA2 (Fig. 2A), mas também a expressão do ARNm de IIA-sPLA2 (Fig. 2B). Este efeito sobre a expressão do ARNm de sPLA2 foi devido a um efeito de redução na transcrição do gene. Isto foi mostrado através de um ensaio do gene repórter da luciferase que refletia a atividade do promotor de sPLA2.

Para este fim, um fragmento de 2,26 kb do promotor da IIA-sPLA2 foi clonado de acordo com Scholz-Pedretti *et al.* (2002). Este fragmento foi ligado num vetor contendo luciferase (pGL3) e usado para transfetar células mesangiais. Tal como pode ser observado na Fig. 2C, a atividade do promotor, estimulada por IL-1 β , foi completamente reduzida através de AKH-217.

Estes dados sugerem que os inibidores da presente invenção poderiam afetar alguns fatores de transcrição, que são ativados por IL-1 β e são essenciais para a transcrição do gene de sPLA2. Os candidatos potenciais incluem NF κ B e PPAR.

Exemplo 2

Efeito de inibidores de óxido nítrico (NO) na formação de células mesangiais renais de rato

O óxido nítrico (NO) é também considerado um mediador pró-inflamatório que é gerado pela NO-sintetase induzível (iNOS) após tratamento de citocinas de células mesangiais. Vários estudos anteriores indicaram que a expressão da iNOS é regulada pelos mesmos fatores de transcrição que sPLA2. Investigou-se se a expressão de iNOS desencadeada por citocinas também é afetada pelos inibidores.

A formação de NO em células mesangiais foi altamente reduzida através do tratamento de IL-1 β . Esta formação de NO estimulada foi reduzida de um modo dependente da dose na presença de AKH-217 e AVX002 (Fig. 3). Além disso, a expressão da proteína da iNOS, que é induzida através de IL-1 β (Fig. 4A), é subregulada na presença de AKH-217 e AVX002 (Fig. 4A). Um efeito de redução semelhante foi também observado na expressão do ARNm de iNOS quando foram realizadas análises quantitativas de PCR em Tempo Real (Fig. 4B). Para observar se este efeito é devido à transcrição de um gene alterado de iNOS, foram realizados ensaios de gene repórter de luciferase para medir a atividade do promotor de iNOS. Um fragmento de 4,5 kb do promotor da iNOS de rato foi gentilmente cedido pelo Dr. K.F. Beck (pharmazentrum frankfurt). Tal como

observado na Fig. 4C, estimulação de IL-1 β das células mesangiais estimulou promotor da iNOS em 10 vezes. Na presença de AKH217, a atividade do promotor perdeu-se completamente.

Estes dados sugerem que, também no caso de iNOS, os inibidores de AVX têm um efeito redutor sobre a transcrição de genes, afetando muito provavelmente os mesmos fatores de transcrição que no caso da transcrição de sPLA2.

Exemplo 3

Efeito dos inibidores sobre a proliferação de células mesangiais

A glomerulonefrite é caracterizada numa primeira fase inicial por aumento da apoptose mesangial que numa segunda fase é substituída por um evento oposto, ou seja, hiperproliferação de células mesangiais. Muitos estudos anteriores demonstraram que as células mesangiais quiescentes em cultura podem reentrar no ciclo celular, quando expostas a vários fatores de crescimento, incluindo PDGF, insulina, factor de crescimento semelhante a insulina (IGF), ou nucleótidos extracelulares tais como ATP e UTP. Estes dados são confirmados aqui, uma vez que a insulina, IGF e ATP desencadearam aumento da incorporação de timidina-[³H] no ADN (Fig. 5A e 5B). Na presença de AKH217 ou AVX002, a incorporação de timidina-[³H] estimulada por agonistas é reduzida (Fig. 5A e 5B). Dados semelhantes

foram obtidos quando as células foram estimuladas com PDGF. Estes dados sugerem um potencial antiproliferativo dos inibidores.

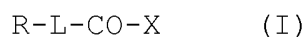
Exemplo 4

Efeito dos inibidores na atividade de NFkB em células mesangiais.

Como observámos nos Exemplos 1 e 2, que a expressão de iNOS e sPLA2 é regulada pelos inibidores de um modo semelhante, estudámos ainda se estes inibidores tinham um efeito na ativação de NFkB. A ativação de NFkB foi medida através de análise *Western blot* através da deteção da quantidade de fosfo-p65 que representa a subunidade do fator de transcrição ativo. A estimulação a curto prazo das células com IL-1 β (3 revelaram um aumento pequeno, mas claro da fosfo-p65 (Fig. 6, painel superior) consistente com muitos relatos anteriores de que as citocinas ativam NFkB. Este efeito foi reduzido por AKH217 (Fig. 6). Além disso, o inibidor de kB (IkB), que é expresso constitutivamente em células não estimuladas, é subregulado através da estimulação de IL-1 β , e esta subregulação é revertida pelos inibidores (Fig. 6, painel inferior). Para uma carga igual, o fator de estabilização nuclear HuR era corado (Fig. 6, painel do meio).

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula (I)



em que R é um grupo hidrocarboneto insaturado C₁₀₋₂₄, de preferência C₁₇₋₁₉, que pode possuir até três substituintes, o referido grupo hidrocarboneto compreendendo pelo menos 4 ligações duplas não conjugadas;

L é um grupo de ligação formando uma ponte de 1 a 5 átomos entre o grupo R e o carbonilo CO em que L compreende pelo menos um heteroátomo, e.g. O, S, N, ou SO; e

X é CHal₃ ou sal deste

para utilização no tratamento de glomerulonefrite.

2. Composto para uso tal como reivindicado em qualquer reivindicação precedente, em que o referido grupo hidrocarboneto tem de 5 a 7 ligações duplas.

3. Composto para uso tal como reivindicado nas reivindicações 1 a 2, em que nenhuma ligação dupla é conjugada com o grupo carbonilo.

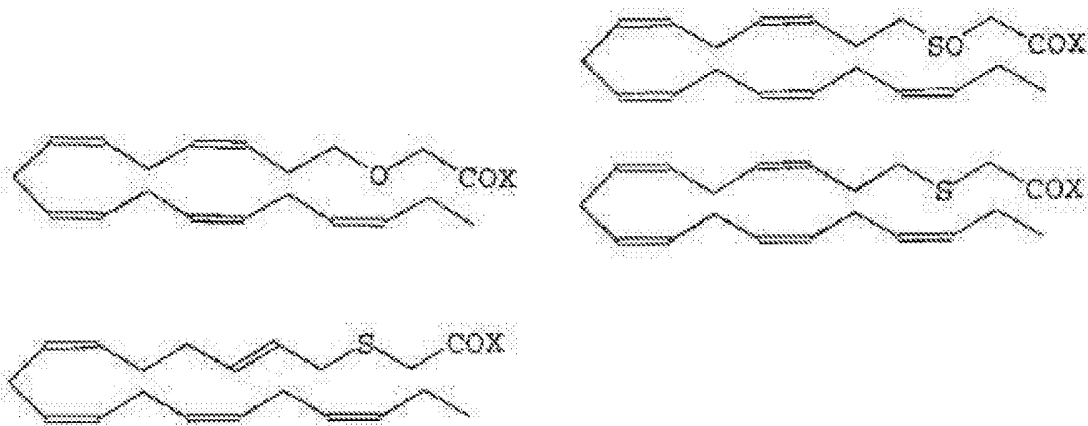
4. Composto para uso tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3 em que todas as ligações duplas estão na configuração *cis* ou em que todas as ligações duplas estão na configuração *cis* exceto a ligação dupla mais próxima do carbonilo.

5. Composto para uso tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4 em que grupo de ligação L compreende $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{alquilo } \text{C}_{1-6})-$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})-$, $-\text{NH}-$, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CO}-$, $-\text{SO}-$, ou $-\text{SO}_2-$ que podem ser combinados uns com os outros por qualquer ordem (quimicamente significativa) para formar o grupo de ligação, em que L compreende pelo menos um heteroátomo.

6. Composto para uso tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores em que L é $-\text{NH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}(\text{Me})\text{CH}_2-$, $-\text{SCH}_2-$, ou $-\text{SOCH}_2-$.

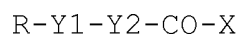
7. Composto para uso tal como reivindicado nas reivindicações de 1 a 6 em que X é CF_3 .

8. Composto para uso tal como reivindicado na reivindicação 1 possuindo a fórmula:



em que X é CHal_3 .

9. Composto para uso tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores possuindo a fórmula (I')



em que R e X são tal como definidos na reivindicação 1;

Y1 é selecionado a partir de O, S, NH, N(alquil C₁₋₆), SO ou SO₂ e

Y2 é (CH₂)_n ou CH(alquilo C₁₋₆);

onde n é de 1 a 3, de preferência 1.

Lisboa, 3 de setembro de 2014

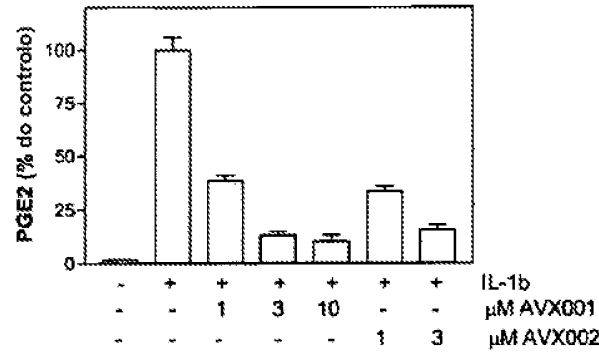


Fig. 1

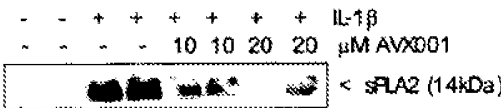


Fig. 2A

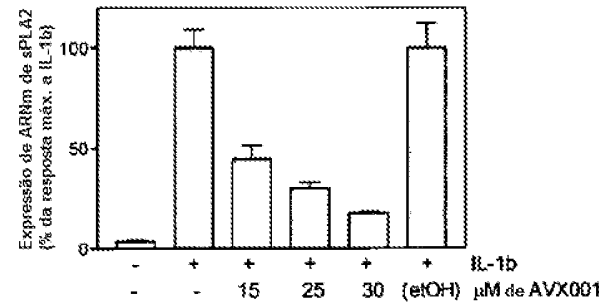


Fig. 2B

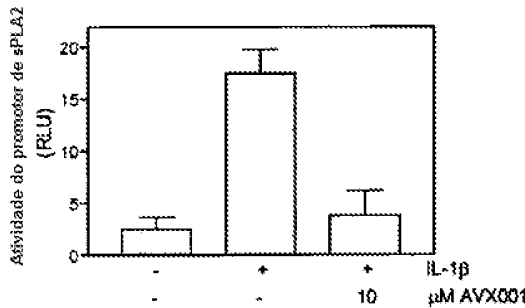


Fig. 2C

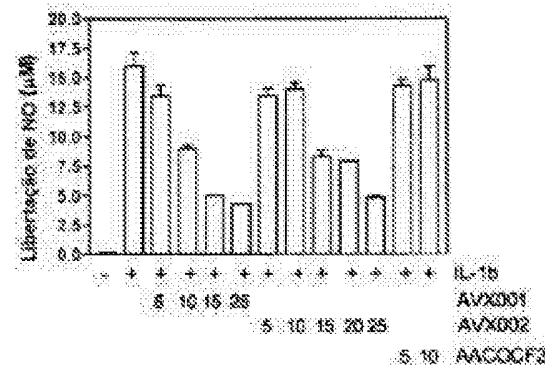


Fig. 3

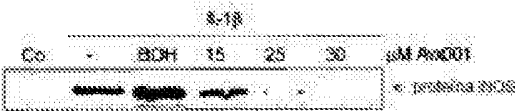


Fig. 4A

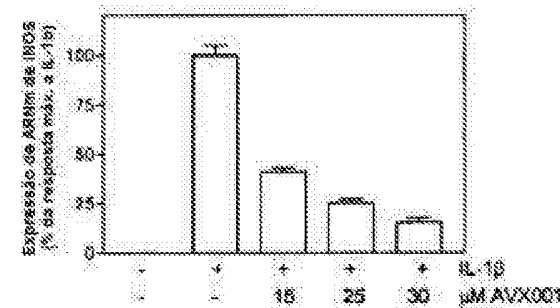


Fig. 4B

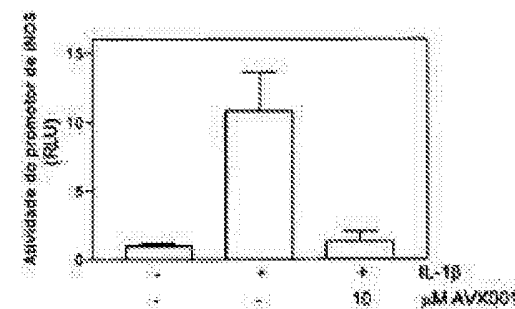


Fig. 4C

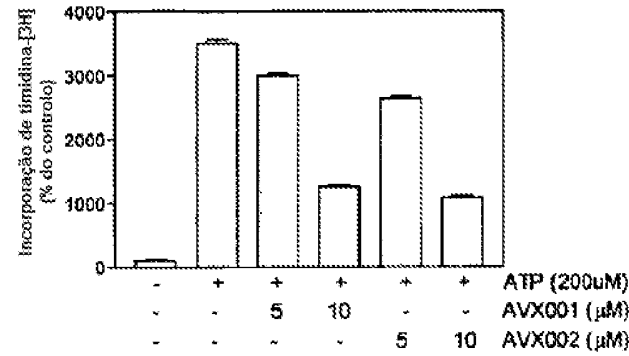


Fig. 5 A

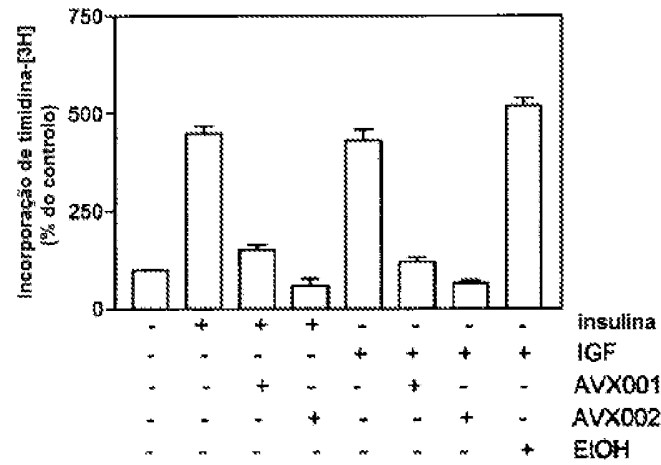


Fig. 5B

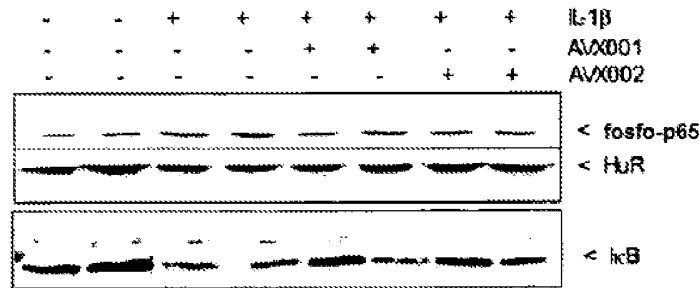


Fig. 6 A

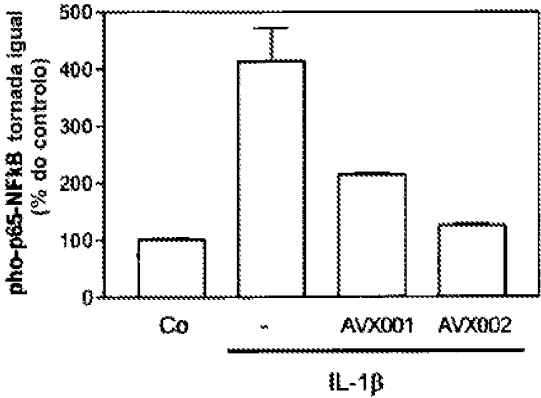


Fig. 6 B

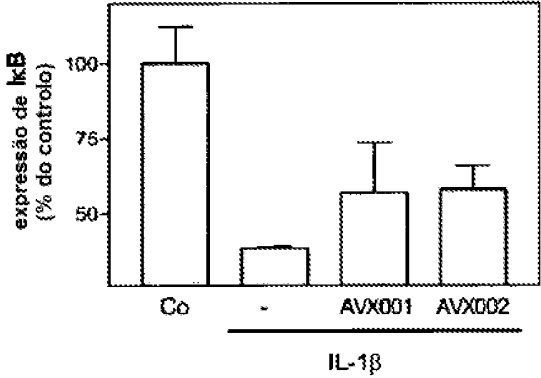


Fig. 6 C

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * EP 1469859 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- | | |
|--|---|
| * J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2000, vol. 1, 2271-2276 | * J. Immunol., 1998, vol. 161, 3421 |
| | * Chem. Soc., Perkin Trans 1, 2000, 2271-2276 |