

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 950 455**

51 Int. Cl.:

A61K 38/13 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 41/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2018** **PCT/GB2018/052066**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2019** **WO19016572**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2018** **E 18749087 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023** **EP 3655012**

54 Título: **Análogos de ciclosporina y usos de estos**

30 Prioridad:

21.07.2017 GB 201711749

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2023

73 Titular/es:

CYPRALIS LIMITED (100.0%)
St John's Innovation Centre, Cowley Road
Cambridge CB4 0WS, GB

72 Inventor/es:

PEEL, MICHAEL;
ZENG, LI y
YU, SHENGQIANG

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 950 455 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

Análogos de ciclosporina y usos de estos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a análogos de ciclosporina para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos. En particular, la invención se refiere al uso de un análogo de ciclosporina de Fórmula 1, en el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios crónicos o agudos, que incluyen lesión renal aguda, pancreatitis aguda o crónica y lesión por isquemia-reperusión.

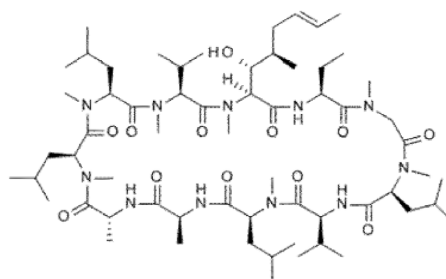
Se conoce bien que la inflamación aguda implica la interacción compleja de varios factores celulares (neutrófilos, macrófagos) y extracelulares (complemento, histamina) que actúan en respuesta a las señales PAMP (patrones moleculares activados por patógenos) y DAMP (patrones moleculares activados por daños) para resolver la agresión causal. Se ha demostrado que la ciclofilina A funciona como una quimiocina para facilitar la migración de leucocitos en apoyo a una respuesta inflamatoria y se mostró que el bloqueo de la ciclofilina A es beneficioso en modelos animales de inflamación aguda. Más recientemente se ha descrito una forma grave de inflamación que se acompaña de muerte celular y necrosis tisular. Un importante cuerpo de evidencia apoya ahora la apertura de un poro en la membrana mitocondrial, denominado Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (MPTP), como fundamental para el inicio y el mantenimiento de esta inflamación necrótica. Un regulador clave de la apertura de este MPTP es la Ciclofilina D (CypD), y los inhibidores de CypD han mostrado buena actividad en la prevención del daño tisular asociado con la inflamación necrótica. La apertura del MPTP, y el inicio posterior de la muerte celular necrótica, se desencadena por niveles de calcio intracelular elevados que resultan de una variedad de factores que incluyen estrés oxidativo, hipoxia, toxinas de sales biliares, etc. Notablemente, se descubrió que la ablación genética o inhibición farmacológica de CypD protege contra la degradación tisular debido a la lesión por isquemia-reperusión del tejido cardíaco, lo que sugiere que la inhibición de CypD es una diana medicamentosa viable para la lesión por isquemia-reperusión en general.

La isquemia renal resulta de la oclusión arterial, el shock y el trasplante de riñón y puede llevar a la muerte de las células renales y la insuficiencia renal. Una fuente adicional de daño tisular asociado con la isquemia sucede durante el proceso de trasplante de órganos. Después de la extracción del órgano donante, el tejido está inevitablemente sujeto a falta de oxígeno como un resultado de la pérdida de flujo sanguíneo, y se produce daño al tejido isquémico al reiniciar el flujo. Un compuesto que sea capaz de prevenir el daño tisular durante el proceso de reperusión mejoraría la viabilidad del órgano trasplantado. Un perfil preferido para un compuesto que se use como un protector de tejidos incluiría inhibición potente de CypD, la prevención de la apertura de MPTP después de estrés isquémico y solubilidad suficiente para agregarse a las soluciones de conservación que se usan normalmente durante el transporte de órganos, en concentraciones lo suficientemente altas para proteger el tejido.

En estudios realizados mediante el uso de ratones con inactivación génica para ciclofilina D, así como en estrategias farmacológicas con inhibidores de ciclofilina, se ha demostrado sin ambigüedades que la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPTP), un canal no específico en la membrana mitocondrial interna, es fundamental para múltiples formas de pancreatitis aguda y valida el MPTP como una diana farmacológica para esta enfermedad (Mukherjee R, y otros Gut 2016;65:1333-1346). Los estudios in vitro han demostrado que la lesión a las células acinares pancreáticas es el evento clave en el inicio de la degeneración tisular necrótica asociada con la pancreatitis aguda. Específicamente, el tratamiento de células acinares aisladas con agresiones tóxicas tales como sales biliares, alcohol o hiperestimulación de un receptor hormonal (desencadenantes claves para la aparición de pancreatitis aguda) resulta en una muerte celular necrótica que depende de la activación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. Se mostró que las células acinares pancreáticas aisladas de ratones en los cuales se eliminó el gen de la ciclofilina D son resistentes a estos desafíos tóxicos. La traducción de estos hallazgos a modelos animales mostró que los animales con inactivación génica para ciclofilina D estaban protegidos de los efectos de estas toxinas pancreáticas. Los estudios mediante el uso de un inhibidor de ciclofilina D apoyaron aún más la identificación de la ciclofilina D como un enfoque para un posible tratamiento para la pancreatitis aguda.

55 Antecedentes de la invención

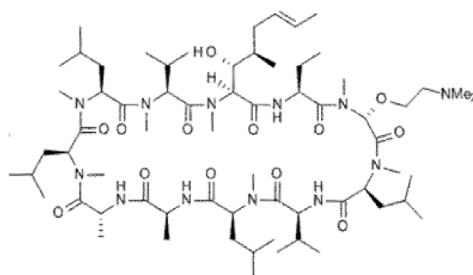
La ciclosporina A es un compuesto bien conocido por sus propiedades inmunosupresoras, pero también se han descrito otras propiedades biológicas. La ciclosporina A tiene la siguiente estructura química:



Ciclosporina A (CsA)

También se han realizado derivados biológicamente activos de ciclosporina A. Por ejemplo, los documentos US 6,583,265, EP 0 484 281 y EP 0 194 972 describen derivados de ciclosporina que tienen varias propiedades que incluyen propiedades inmunosupresoras, antiparasitarias y antivirales.

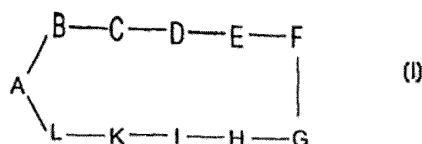
El documento US 6 583 265 describe derivados de ciclosporina con modificaciones realizadas en la posición 3 del macrociclo de ciclosporina. En particular, el documento US 6 583 265 describe el Compuesto 1:



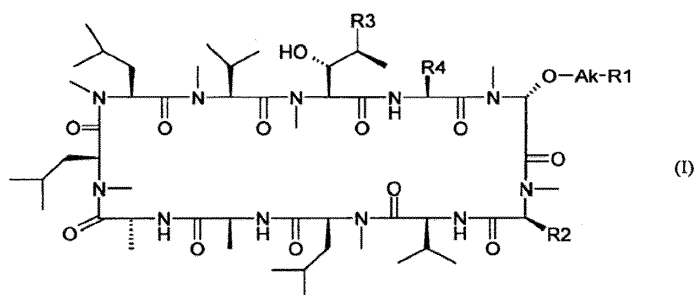
Compuesto 1

Este compuesto es el ejemplo 27 en la patente US 6 583 265, la cual incluye muchos cientos de compuestos nombrados que tienen modificaciones en varias posiciones alrededor del anillo. Sin embargo, no se describen datos de ensayos biológicos o usos especiales para este compuesto o análogos relacionados. Cuando los solicitantes intentaron sintetizar dicho compuesto mediante el uso de la ruta publicada utilizada para preparar el Compuesto 27 en el documento US 6 583 265, el método no fue efectivo. Se realizaron muchos intentos para replicar la metodología en el documento US 6,583,265 sin gran éxito. Sin pretender imponer la teoría, se cree que el grupo dimetilamino (al ser básico) reaccionó preferentemente con el catalizador ácido. De este modo se previno que el catalizador ácido activara la pérdida del grupo saliente, lo que inhibe el progreso de la reacción. Entonces, existe alguna duda respecto a si el Ejemplo 27 se sintetizó previamente y, por lo tanto, dudas sobre si este estado de la técnica es realmente una descripción que permite la preparación del Compuesto 1.

El documento WO 99/65933 (C-Chem AG) se refiere a nuevos compuestos de ciclosporinas de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde las letras A a L tienen el significado indicado en la descripción y los procesos para su preparación y sus usos,



El documento WO 2007/136759 (Scynexis Inc.) se refiere a unos métodos para el tratamiento y prevención de trastornos oculares, los métodos comprenden la administración de un compuesto de Fórmula general (I):

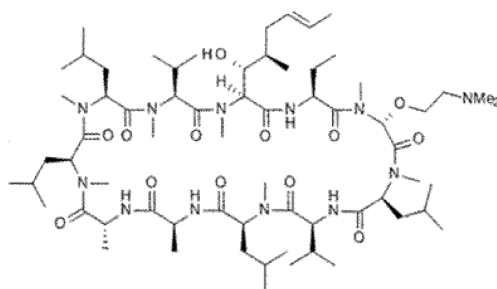


en donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y Ak son como se definen en la descripción.

El documento CN 106 902 347 A (Waterstone Pharmaceuticals Wuhan Co. Ltd.) se refiere a la aplicación de un inhibidor de ciclofilina, y particularmente proporciona la aplicación de un inhibidor de ciclofilina o una sal o solvato de este farmacéuticamente aceptable en la preparación de medicamentos. Los medicamentos se utilizan para tratar y/o prevenir enfermedades causadas por la infección por el virus de la hepatitis B.

Declaraciones de la invención

Los solicitantes han sintetizado compuestos previamente sugeridos en el estado de la técnica y sorprendentemente descubrieron que el Compuesto 1 es un inhibidor de ciclofilina D especialmente bueno. Entonces, el Compuesto 1 se puede usar en el tratamiento de condiciones que se benefician de las inhibiciones de la actividad de la ciclofilina D. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios agudos o crónicos en donde el compuesto es el Compuesto 1 de fórmula:



Compuesto 1

o una sal de este,

y en donde el trastorno se selecciona de lesión renal aguda, pancreatitis crónica o aguda y lesión por isquemia-reperfusión, en donde la lesión por isquemia-reperfusión sucede después de la reinserción de una parte del cuerpo cercenada o durante el proceso de trasplante de órgano.

En una modalidad, el trastorno inflamatorio agudo o crónico es, por ejemplo, lesión renal aguda.

En una modalidad, el trastorno inflamatorio agudo o crónico es, por ejemplo, pancreatitis crónica.

En una modalidad, el trastorno inflamatorio agudo o crónico es, por ejemplo, pancreatitis aguda.

En una modalidad, el trastorno inflamatorio agudo o crónico es, por ejemplo, una lesión por isquemia-reperfusión.

Se ha encontrado que el Compuesto 1 es sorprendentemente efectivo en el tratamiento o prevención tanto de lesión renal aguda, lesión por isquemia-reperfusión (IRI) y pancreatitis.

El compuesto 1 se puede usar en el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios agudos o crónicos, que incluyen lesión renal aguda y lesión por isquemia-reperfusión. El compuesto 1 se puede usar en el tratamiento o prevención de lesión renal aguda. El compuesto 1 se puede usar en el tratamiento de lesión por isquemia-reperfusión asociada con la reinserción de partes del cuerpo cercenadas. Los datos proporcionados con esta solicitud, que se muestran gráficamente en las Figuras 1 y 2, muestran que el Compuesto 1 superó significativamente al ejemplo comparativo bien establecido de la Ciclosporina A y otros análogos estrechamente relacionados. De hecho, en la prueba de exposición llevada a cabo, donde se extrajo sangre de un órgano durante

treinta minutos, el Compuesto 1 dio resultados sorprendentemente buenos, que mostraban de hecho una inversión casi completa en el daño esperado a los órganos afectados.

El compuesto 1 muestra una potencia notable como un inhibidor de ciclofilina D. Como se ve en la tabla 1, el compuesto 1 (entrada 4) muestra una EC_{50} de 24 nM contra la ciclofilina D. Reemplazo de un grupo metilo en el átomo de N con H (la entrada 1 es simplemente NHMe ve NMe₂) reduce la potencia aproximadamente 100 veces, con una EC_{50} de >2000 nM. Entonces, el compuesto 1 es un inhibidor sorprendentemente potente de ciclofilina D y la Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (MPT).

En una modalidad del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, la dosis del compuesto es de 0,1 a 10 mg/kg. En una modalidad del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, la dosis del compuesto es de 1 a 3 mg/kg. En estos intervalos de dosis, el compuesto es especialmente efectivo.

Las sales de la invención pueden resultar de la adición de ácidos al Compuesto 1. Las sales resultantes de la adición de ácidos incluyen aquellos formados con ácidos acético, 2,2-dicloroacético, cítrico, láctico, mandélico, glicólico, adípico, algínico, arilsulfónico (por ejemplo, bencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico y p-toluenosulfónico), ascórbico (por ejemplo, L-ascórbico), L-aspártico, benzoico, 4-acetamidobenzoico, butanoico, (+) alcanfórico, alcanforsulfónico, (+)-(1S)-alcanfor-10-sulfónico, cáprico, caproico, caprílico, cinámico, cítrico, ciclámico, dodecilsulfónico, etano-1,2-disulfónico, etanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, fórmico, fumárico, galactárico, gentísico, glucoheptónico, glucónico (por ejemplo, D-glucónico), glucurónico (por ejemplo, D-glucurónico), glutámico (por ejemplo, L-glutámico), α -oxoglutarico, glicólico, hipúrico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, isetiónico, láctico (por ejemplo, (+)-L-láctico y ($\pm$)-DL-láctico), lactobiónico, maleico, málico (por ejemplo (-)-L-málico), ($\pm$)-DL-mandélico, metafosfórico, metanosulfónico, 1-hidroxi-2-naftoico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamoico, fosfórico, propiónico, L-piroglutámico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebácico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, tartárico (por ejemplo (+)-L-tartárico), tiocianico, undecilénico y valérico.

En particular, las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico; de ácidos orgánicos tales como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico, arilsulfónico

El compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción se puede administrar junto con una o más sustancias activas adicionales.

La lesión isquémica ocurre cuando se interrumpe el suministro de sangre a un área de tejido. La incidencia de lesiones isquémicas es enorme: infarto al miocardio, accidente cerebrovascular y otros eventos trombóticos, y estos afectan a más de 1,3 millones de personas cada año solo en los EE. UU.

En adición, la lesión isquémica también sucede durante la cirugía cuando se pinzan los vasos sanguíneos y en órganos para trasplante. El tiempo que un tejido puede sobrevivir a la privación de oxígeno varía, pero eventualmente el tejido isquémico se vuelve necrótico.

La lesión por reperusión (reoxigenación) es el daño tisular causado cuando el suministro de sangre retorna al tejido después de un período de isquemia o falta de oxígeno (anoxia, hipoxia). Sin pretender imponer la teoría, se cree que la ausencia de oxígeno y nutrientes de la sangre durante el período isquémico crea una condición en la cual la restauración de la circulación resulta en inflamación y daño oxidativo.

En el trasplante de órganos, existe un período de tiempo entre la remoción de un órgano del suministro de sangre del donante hasta la reconexión del órgano al suministro de sangre del receptor del donante. Durante este período existe la posibilidad de lesión por isquemia-reperusión. En algunos casos, puede necesitarse la transportación de órganos largas distancias hasta el lugar de la cirugía, lo que aumenta la probabilidad de daño a los órganos.

En accidentes que involucran extremidades cercenadas, existe un período de tiempo entre la separación de la parte del cuerpo del suministro de sangre hasta la reconexión de la parte del cuerpo al suministro de sangre. Durante este período existe la posibilidad de lesión por isquemia-reperusión. En algunos casos, puede necesitarse la transportación de partes del cuerpo y pacientes largas distancias hasta el lugar de la cirugía, lo que aumenta la probabilidad de daño antes, durante y después de la reinserción.

La invención proporciona la administración del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción para prevenir este daño a partes y órganos del cuerpo. En particular, en el período de tiempo entre la remoción de una parte u órgano del cuerpo del suministro de sangre del donante hasta la reconexión del suministro de sangre del receptor del donante o, en el caso de partes del cuerpo cercenadas, la reinserción. El experto en la materia estará enterado de las formas en las cuales el compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción puede administrarse a una parte del cuerpo removida de un individuo, ya sea un donante de órganos o una víctima de un accidente. Por ejemplo, el compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción podría añadirse a (o incluirse en) un fluido en el cual se coloca el órgano; y/o el compuesto

para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción podría añadirse a (o incluirse en) un fluido que se recircula en y/o a través del órgano/parte del cuerpo.

En una modalidad del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, el compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción se administra al órgano después de la remoción del órgano del individuo y antes del trasplante o reinserción. Alternativamente, o adicional al compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, se administra al sujeto donante antes de la remoción del órgano donante. Por ejemplo, el compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción se puede administrar sistémicamente. Una inyección es una forma de administrar una dosis sistémica del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción. El compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción también se puede administrar al receptor después del trasplante de órganos o a la víctima del accidente después de la reinserción.

Se puede administrar una dosis sistémica del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción al donante de órganos antes de la remoción del órgano. Esto permite que el órgano reciba una dosis protectora del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción antes de la remoción, para preservar de este modo el órgano al proteger el órgano del daño durante la remoción y hasta y durante el proceso de trasplante en el receptor del donante. En el caso donde se remueva más de un órgano de un donante, esta dosis sistémica asegura que cada órgano reciba una dosis del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción. También es más probable que una dosis sistémica proporcione una dosis uniforme del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción al tejido del órgano que se va a trasplantar. En el caso donde el donante esté legalmente muerto, la dosis puede ser mayor que la que se administraría normalmente a un sujeto vivo.

El compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción se puede administrar poco antes de la cirugía o durante la cirugía. Por ejemplo, el compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción se puede administrar hasta 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 horas antes de la cirugía.

En adición, o como alternativa, el receptor del órgano o la víctima del accidente puede recibir una dosis del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, antes de recibir el órgano o someterse a la cirugía de reinserción, de modo que su suministro de sangre contenga una dosis protectora del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, para preservar de este modo la parte del cuerpo trasplantada o reinsertada del daño después de la cirugía.

La parte del cuerpo se puede cercenar y reinsertar al mismo individuo, o se puede dar a un segundo individuo como un trasplante. Allí, la parte del cuerpo se cercena un sujeto, la separación puede ser total o parcial. La separación parcial puede ser, por ejemplo, el corte del suministro de sangre, pero la parte del cuerpo permanece unida, por ejemplo, a través de la piel, el hueso o el tejido muscular. El compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción se puede administrar (i) a una parte del cuerpo cercenada; y/o (ii) al sujeto antes de la reinserción de la parte del cuerpo; y/o (iii) al sujeto durante o después de la reinserción de la parte del cuerpo.

La invención también tiene aplicación en sujetos no humanos, por ejemplo, gatos, perros, caballos y cerdos. La invención también tiene aplicación en animales transgénicos (por ejemplo, cerdos transgénicos), donde tales animales tienen órganos adecuados para el trasplante humano.

En esta solicitud se ha mostrado que el Compuesto 1 es especialmente efectivo en el tratamiento de la lesión renal aguda y en la prevención o el tratamiento de la IRI. En esta solicitud se ha mostrado que el Compuesto 1 es especialmente efectivo en el tratamiento de la lesión renal aguda y de la pancreatitis aguda y crónica.

Los resultados que se muestran en la Tabla 1 demuestran la inhibición inesperadamente alta de Ciclofilina D y la MPT del Compuesto 1 (entrada 4) en relación con análogos similares también conocidos en la técnica (entradas 1-3 y 5-7). Se observó una mejora de 100 veces en MPT en relación con otros tres compuestos estrechamente relacionados (entradas 1, 5 y 7) y se observó una mejora de más de 25 veces en relación con el siguiente análogo con mejor rendimiento (entrada 3). El compuesto 1 también mostró una inhibición superior de la ciclofilina D, con una mejora de al menos 50 veces en relación con todos los otros análogos probados.

En una modalidad del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, el órgano puede ser el riñón, el páncreas, el hígado, el corazón, los pulmones o los intestinos. En el caso de partes del cuerpo cercenadas, las partes del cuerpo pueden ser extremidades, manos, pies, dedos de las manos o de los pies.

En una modalidad del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, la dosis del compuesto es de 0,1 a 10 mg/kg; y opcionalmente es de 1 a 3 mg/kg. En el caso donde un órgano o parte del cuerpo se bañe en un fluido que contenga el compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, o este fluido se recircule, la concentración del compuesto puede ser mayor o menor según lo requiera la necesidad.

En una modalidad del compuesto para su uso mencionado anteriormente en la presente descripción, el compuesto se formula en Cremophor/solución salina/DMSO.

De acuerdo con un aspecto de la descripción, se proporciona un método para preparar el Compuesto 1, el método comprende una reacción de formación de producto, la reacción comprende triflato de cobre y N,N-dimetilaminoetanol.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el Compuesto 1 se vuelve fácilmente disponible por el método mencionado anteriormente. Por ejemplo, el presente solicitante realizó muchos intentos fallidos para replicar la metodología descrita en el documento US 6 583 265, y al final se abandonó el enfoque en el documento US 6 583 265, al ser poco viable.

En una modalidad, la reacción comprende un agente secante y/o se lleva a cabo bajo condiciones sustancialmente anhidras. Opcionalmente, el agente de secado son tamices moleculares. Opcionalmente, los tamices moleculares son tamices moleculares de 3 Å.

En una modalidad, el N,N-dimetilaminoetanol reacciona con un compuesto precursor de ciclosporina que comprende un grupo lábil, en donde el grupo lábil se pierde en la reacción. Opcionalmente, el grupo lábil se une al compuesto precursor mediante un enlace -S-. Además, opcionalmente, el grupo lábil es un grupo tiopiridilo o un grupo mercaptobenzotiazol-2-iltio.

El ámbito de la presente invención es definido por las reivindicaciones. Las referencias a métodos de tratamiento en el resumen y la descripción detallada de la invención en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto inhibitor y/o protector del Compuesto 1, y del compuesto comparativo CsA, sobre la lesión renal aguda inducida en ratas, mediante la medición de las concentraciones de creatinina en suero sanguíneo.

La Figura 2 muestra el efecto inhibitor y/o protector del Compuesto 1, y del compuesto comparativo CsA, sobre la lesión renal aguda inducida en ratas mediante la medición de las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN).

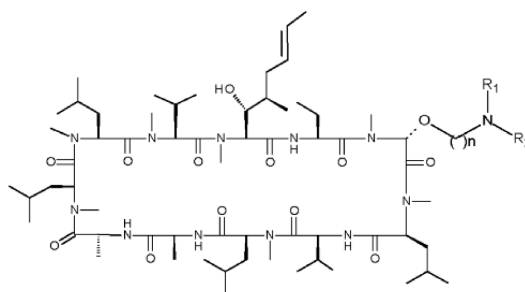
La Figura 3 muestra el efecto inhibitor y/o protector del Compuesto 1 contra la lesión renal aguda inducida por LPS.

Descripción Detallada de la Invención

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos.

Métodos experimentales y resultados

El experto en la materia reconocerá que los compuestos de Fórmula 1 de fórmula:



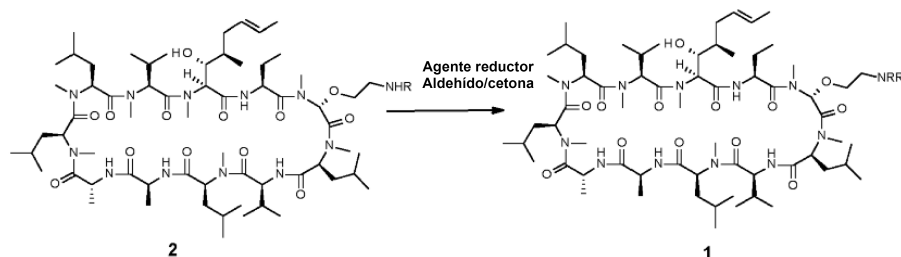
Fórmula 1

en donde n es 2-5 y

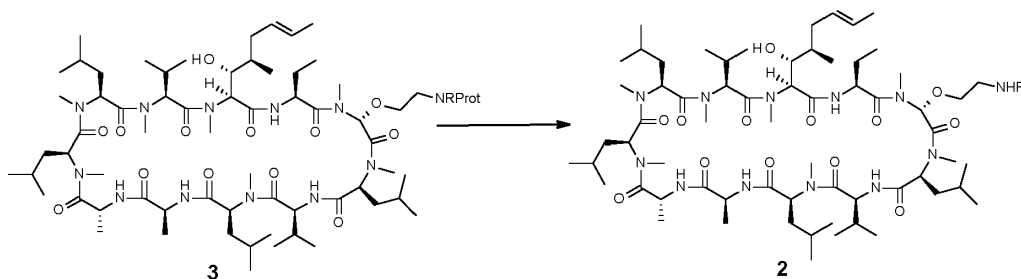
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de H o alquilo C₁-C₄, en donde R₁ y R₂ se pueden unir entre sí para formar un anillo de heteroalquilo C₃-C₅,

se puede preparar de varias formas. La ruta a continuación es meramente ilustrativa de una forma que podría emplearse para la síntesis del Compuesto 1. Dicho esto, la ruta usada para preparar el Compuesto 1 en el documento US 6 583 265 no fue efectiva. Se hicieron muchos intentos para replicar la metodología en el documento US 6 583 265 sin gran éxito. Sin pretender imponer la teoría, se cree que el grupo dimetilamino (al ser básico) reaccionó preferentemente con el catalizador ácido. De este modo se previno que el catalizador ácido activara la pérdida del grupo saliente, lo que inhibe el progreso de la reacción.

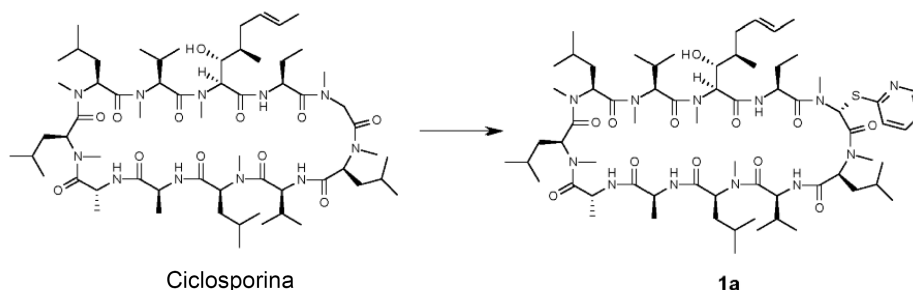
Los compuestos de fórmula general 1 se pueden preparar convenientemente mediante el uso de varias rutas. En una instancia (Esquema 1), la reacción del compuesto 2, en el cual el compuesto R es alquilo inferior, con un compuesto de carbonilo y un agente reductor puede llevar a cabo un procedimiento de aminación reductora para dar los compuestos deseados. Preferiblemente, el compuesto carbonilo es un aldehído de alquilo inferior o una cetona y el agente reductor es un borohidruro de metal. Más preferiblemente, el aldehído es formaldehído, acetaldehído o propionaldehído y la cetona es acetona, 2-butanona y similares. Preferiblemente, el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio.



El compuesto de amina 2 se puede preparar convenientemente a partir de un compuesto de etanolamina adecuadamente protegido tal como 3, en donde R es hidrógeno o alquilo inferior, al tratar dicho compuesto con condiciones conocidas para eliminar el grupo protector y rendir el compuesto de amina libre. Los grupos protectores adecuados que se pueden eliminar en presencia de otros grupos funcionales en la molécula incluyen terc-butoxicarbonilo (BOC), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y similares. Preferiblemente, el grupo protector es terc-butoxicarbonilo (BOC) y las condiciones empleadas para la eliminación del grupo BOC implican el tratamiento con ácido, como el ácido trifluoroacético.



Etapas 1: Preparación de [2'-(2-tiopiridil)-Sar]³-ciclosporina A

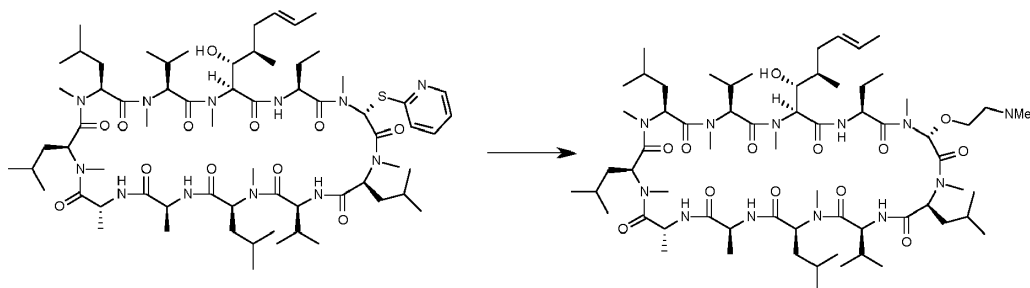


[2'-(2-tiopiridil)-sar]³-ciclosporina A (1a)

A un matraz seco de 1 L se adicionó ciclosporina A (20 g, 16,6 mmol), cloruro de litio anhidro (21,1 g, 499 mmol) y THF seco (500 mL), el matraz se lavó con argón y la mezcla se enfrió a -45 C. En un matraz separado, se disolvió diisopropilamina (13,5 g, 133 mmol) en THF seco (120 mL) y se enfrió a -78 C. A este matraz se le adicionó n-butil litio (53,2 mL de una solución 2,5 M, 133 mmol) y la solución resultante se agitó a -78 C durante 20 min. Mediante el

uso de una cánula, la solución de diisopropilamida de litio se transfirió a la solución de ciclosporina y la mezcla resultante se agitó a -45 °C durante 90 min. Se añadió gota a gota una solución de disulfuro de 2-piridilo (11 g, 49,9 mmol) en THF seco (20 ml) y se permitió que la mezcla resultante se calentara a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactivó mediante la adición cuidadosa de solución saturada de NaCl (200 mL) y la capa orgánica resultante se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 mL) y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaOH 3 N (2 x 100 mL), solución saturada de NH₄Cl (100 mL) y NaCl saturado (100 mL) seguido por secado sobre Na₂SO₄ anhidro y evaporación. El compuesto del título se aisló por cromatografía en gel de sílice como un sólido de 7,18 g. ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 8,45 (ddd, J=0,88, 1,73, 4,90 Hz, 1H), 7,98 (d, J=9,66 Hz, 1H), 7,65-7,73 (m, 1H), 7,59 (dt, J=1,85, 7,71 Hz, 1H), 7,51 (ddd, J=0,76, 1,68, 6,44 Hz, 0H), 7,45 (d, J=8,54 Hz, 1H), 7,35 (ddd, J=1,73, 6,97, 8,77 Hz, 0H), 7,25 (s, 0H), 7,17 (d, J=7,96 Hz, 1H), 7,09-7,15 (m, 2H), 6,72 (dt, J=1,17, 6,71 Hz, 0H), 5,70 (dd, J=4,29, 10,88 Hz, 1H), 5,50 (d, J=6,39 Hz, 1H), 5,32-5,38 (m, 1H), 5,28 (dd, J=3,88, 11,74 Hz, 1H), 5,13 (d, J=10,88 Hz, 1H), 4,97-5,11 (m, 2H), 4,84 (dq, J=7,03, 7,24 Hz, 1H), 4,69 (t, J=9,15 Hz, 1H), 4,54 (quin, J=7,31 Hz, 1H), 4,13 (q, J=7,16 Hz, 0H), 3,81 (dt, J=1,00, 5,75 Hz, 1H), 3,59-3,72 (m, 1H), 3,50 (s, 2H), 3,38 (s, 2H), 3,26 (s, 2H), 3,13 (s, 5H), 2,70 (d, J=1,07 Hz, 5H), 2,34-2,54 (m, 1H), 1,92-2,23 (m, 4H), 1,55-1,85 (m, 11H), 1,19-1,54 (m, 11H), 1,12 (d, J=6,54 Hz, 2H), 0,78-1,07 (m, 30H), 0,73 (d, 3H).

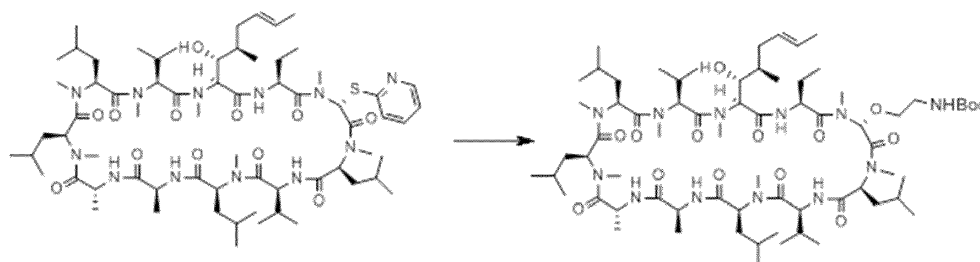
Etapas 2: Preparación de [2'-(2-Dimetilaminoetoxi)-Sar]³-ciclosporina A (Compuesto 1)



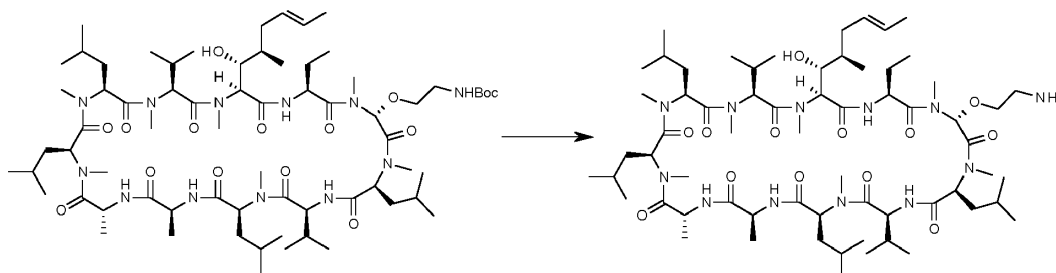
[2'-(2-Dimetilaminoetoxi)-Sar]³-ciclosporina A (1)

Se adicionaron triflato de cobre (0,291 g, 0,8 mmol) y tamices moleculares de 3 angstrom a un matraz, se añadió THF seco (3 mL) y el matraz se lavó con argón. En un matraz separado, una mezcla de [2'-(2-tiopiridil)-Sar]³-ciclosporina A (1a) (0,293 g, 0,223 mmol), dimetilaminoetanol (0,086 g, 0,96 mmol) y tamices moleculares 3 A en THF seco (2 mL) se agitó durante 30 minutos y luego se adicionó a la solución de triflato de cobre. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se adicionó una solución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y la mezcla se filtró a través de celite. El celite se lavó con acetato de etilo (3 x 25 mL) y se adicionó al filtrado. La capa orgánica se separó; lo acuoso se extrajo con EtOAc (2 x 25 mL) y las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó. La purificación del material crudo en gel de sílice brindó el compuesto del título, 86,4 mg. ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,92 (d, J=9,61 Hz, 1H), 7,75 (d, J=7,32 Hz, 1H), 7,22 (d, J=8,15 Hz), 7,15 (d, J=7,86 Hz), 6,01 (s, 1H), 5,70 (dd, J=4,22, 10,86 Hz, 1H), 5,46 (d, J=6,10 Hz, 1H), 5,35 (q, J=4,77 Hz, 1H), 5,27 (dd, J=4,15, 11,42 Hz, 1H), 5,14 (d, J=10,83 Hz, 1H), 5,05-5,11 (m, 1H), 4,94-5,04 (m, 1H), 4,77-4,90 (m, 1H), 4,73 (s), 4,66 (t, J=8,83 Hz, 1H), 4,46-4,57 (m, 1H), 3,71-3,81 (m, 1H), 3,58-3,67 (m, J=5,15, 5,64, 5,64, 5,83 Hz, 1H), 3,53-3,58 (m, 1H), 3,51 (s, 2H), 3,24 (s, 2H), 3,20 (s, 2H), 3,13 (d, J=2,10 Hz, 3H), 2,71 (d, J=6,54 Hz, 3H), 2,49-2,67 (m, 2H), 2,33-2,46 (m, 1H), 2,27 (s, 4H), 1,88-2,20 (m, 4H), 1,74 (d, J=0,29 Hz, 6H), 1,57-1,68 (m, 5H), 1,38-1,52 (m, 2H), 1,35 (d, J=7,27 Hz, 3H), 1,26 (d, J=2,88 Hz, 4H), 0,77-1,12 (m, 30H), 0,70 (d, 2H).

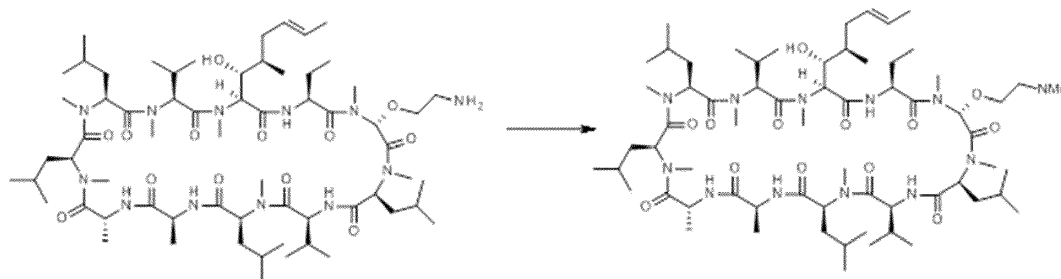
El experto apreciará, por ejemplo, que se pueden preparar análogos del Compuesto 1 mediante el uso de diferentes reactivos de amino alcohol. Por ejemplo, el número de átomos de carbono entre el alcohol y el grupo amina podría aumentar o disminuir (los ejemplos de grupos de enlace incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno y pueden incluir versiones ramificadas de estos, tales como isopropileno, sec-butileno, terc-butileno, 2-metilbutileno, 2,2-dimetilpropileno). Alternativamente, o en adición, los sustituyentes N-amino en el aminoalcohol también podrían cambiarse para dar análogos adicionales del Compuesto 1 (los ejemplos de sustituyentes N-amino incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo).

Preparación de [2'-(2-N-Boc-aminoetoxi)-Sar]³-ciclosporina A

Se suspendieron triflato de cobre (4,95 g, 13,7 mmol) y tamices moleculares de 3 A en THF anhidro (50 mL) y se agitaron bajo argón durante 30 min. Una solución de [2'-(2-tiopiridil)-Sar]³-ciclosporina A (1) (5,0 g, 3,82 mmol) y N-Boc-etanolamina (2,64 g, 16,4 mmol) en THF anhidro (10 mL) se secó sobre tamices moleculares de 3 A durante 30 minutos y luego se adicionó a la suspensión de triflato de cobre. La mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió NaHCO₃ saturado (2 x 50 mL) y la mezcla se filtró a través de celite. La almohadilla de celite se lavó con EtOAc (4 x 100 mL) y la capa orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL) y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado (50 mL), se secaron sobre NaSO₄ anhidro y se evaporó. El material crudo se purificó en sílice para rendir el compuesto del título, 4,18 g. ¹NMR H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 0,72 (ddd, 2 H) 0,91 (m, 31 H) 1,32 (m, 8 H) 1,48 (dddd, J=3,95, 3,07, 2,23, 0,95 Hz, 2 H) 1,69 (m, 10 H) 2,10 (m, 4 H) 2,39 (m, 1 H) 2,70 (m, 4 H) 2,95 (m, 2 H) 3,12 (d, J=7,42 Hz, 4 H) 3,17 (d, J=9,37 Hz, 1 H) 3,20 (s, 2 H) 3,25 (s, 2 H) 3,29 (m, J=6,69, 3,02, 1,45, 0,76, 0,63 Hz, 1 H) 3,41 (m, 1 H) 3,51 (s, 2 H) 3,61 (m, 1 H) 3,75 (dddd, J=7,73, 1,54, 1,02, 0,73 Hz, 1 H) 4,13 (q, J=7,11 Hz, 1 H) 4,50 (m, 1 H) 4,65 (dd, J=18,06, 0,44 Hz, 1 H) 4,98 (m, 4 H) 5,30 (m, 2 H) 5,47 (m, 1 H) 5,70 (m, 1 H) 5,93 (d, J= 0,34 Hz) 7,21 (m, 1 H) 7,71 (m) 8,03 (m).

Preparación de [2'-(2-aminoetoxi)-Sar]³-ciclosporina A

Una solución de [2'-(2-N-Boc-aminoetoxi)-Sar]³-ciclosporina A (3) (3,0 g, 2,2 mmol) en CH₂Cl₂ (30 mL) se enfrió a 0 °C y se adicionó gota a gota ácido trifluoroacético (6,54 mL, 10,03 g, 88 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. El disolvente se evaporó y el material crudo se purificó sobre sílice para obtener el compuesto del título, 1,99 g.

Preparación de [2'-(2-Dimetilaminoetoxi)-Sar]³-ciclosporina A (2)

[2'-(2-aminoetoxi)-sar]³-ciclosporina A (0,273 g, 0,216 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (5 mL) y se adicionó formaldehído (solución acuosa al 37 %, 0,048 mL, 0,69 mmol) seguido de NaB(OAc)₃H (0,138 g, 0,649 mmol) y se permitió la agitación de la reacción hasta aproximadamente 18 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice la cual se lavó con 90:9:1 CH₂Cl₂:MeOH:conc.NH₄OH (5 x 100 mL). Se evaporó el disolvente y se aisló el producto por cromatografía en gel de sílice para brindar el compuesto del título, 0,214 g.

Mediciones de unión de inhibición de ciclofilina

La unión de inhibición de ciclofilina de los compuestos descritos en la presente descripción se determinó mediante el uso de un ELISA competitivo adaptado de los métodos descritos por Quesniaux y otros (Eur. J Immunol., 1987, 17:1359-1365). Los ésteres activados de espaciadores de succinilo unidos a D-Lys⁸-ciclosporina A (D-Lys⁸-Cs) se acoplan a la albúmina de suero bovino (BSA) a través del residuo D-lisilo en la posición 8. Se disuelve BSA en tampón de borato 0,1 M, pH 9,0 (4 mg en 1,4 ml). Un exceso molar de cien veces de D-Lys⁸-Cs disuelto en dimetilformamida (0,6 ml) se añade gota a gota a la BSA bajo agitación vigorosa. La reacción de acoplamiento se realiza durante 2 a 3 horas a temperatura ambiente bajo agitación media y el conjugado se dializa extensamente frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Después de la precipitación con acetona de una alícuota de la proteína conjugada, no permanece la unión covalente D-Lys⁸-Cs en la solución de acetona y se calcula el grado de unión covalente de ciclosporina.

Las placas de microtitulación están recubiertas con conjugado D-Lys⁸-Cs-BSA (2 µg/ml en PBS durante 24 horas a 4 °C). Las placas se lavan con Tween®/PBS y con PBS solo. Para bloquear la unión no específica, se adiciona BSA/PBS al 2 % (pH 7,4) a los pocillos y se permite la incubación durante 2 horas a 37 °C. Se prepara una serie de diluciones de cinco veces del compuesto a ensayar en etanol en una placa de microtitulación separada. La concentración inicial es de 0,1 mg/mL para ensayos con ciclofilina recombinante humana. Se adicionan 198 µL de una solución de ciclofilina de 0,1 µg/ml al microtítulo, seguidos inmediatamente de 2 µL de ciclosporina A diluida (usada como compuesto de referencia) o el compuesto de la invención. La reacción entre el conjugado BSA-Cs recubierto, la ciclosporina A libre y la ciclofilina se deja equilibrar durante la noche a 4 °C. La ciclofilina se detecta con antisuero de conejo anti-ciclofilina diluido en BSA al 1 % que contiene PBS y se incuba durante la noche a 4 °C. Las placas se lavan como se describió anteriormente. A continuación, los anticuerpos de conejo unidos se detectan mediante IgG anti-conejo de cabra conjugada con fosfatasa alcalina diluida en BSA-PBS al 1 % y se deja incubar durante 2 horas a 37 °C. Las placas se lavan como se describió anteriormente. Después de la incubación con fosfato de 4-nitrofenilo (1 g/l en tampón de dietanolamina, pH 9,8) durante 1 a 2 horas a 37°C, la reacción enzimática se mide espectrofotométricamente a 405 nm mediante el uso de un espectrofotómetro. Los resultados se expresan como EC₅₀, la cual es la concentración del compuesto de la invención requerida para lograr una inhibición del 50%. El compuesto 1 tenía valores de EC₅₀ inferiores a 100 nM frente a las ciclofilinas A, B y D.

Inhibición de PPlasa

El ensayo se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro Agilent 8453 esencialmente como se describe como el "ensayo desacoplado" por Janowski y otros {Janowski y otros Anal. Biochem. (1997), 252:299-307}. El tampón de ensayo que consistía en HEPES 35 mM pH 7,8 y DTT 50 µM se enfrió a 10 °C (con agitación) en una cubeta de precisión de vidrio y se adicionó inhibidor a partir de una solución madre de DMSO al 100 %. Se obtuvo un espectro en blanco y luego se adicionó la enzima ciclofilina humana recombinante etiquetada con His (f/c 2 nM) purificada y el sustrato tetrapeptídico, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*par*nitroanilida disuelto en LiCl 0,5 M en trifluoroetanol (Bachem, f/c 60 µM) y se midió el cambio en la absorbancia durante 5 min a 330 nM. Se ajustó una ecuación de velocidad de primer orden a los datos de absorbancia para obtener una constante de velocidad (los primeros 10 a 15 s se eliminaron debido a la mezcla). La tasa catalítica se calculó a partir de la tasa enzimática menos la tasa de fondo. La *k_i* para un inhibidor se obtuvo a partir de la constante de velocidad representada frente a la concentración de inhibidor.

Transición de permeabilidad mitocondrial

La transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) se determina por medición de la inflamación de las mitocondrias inducida por Ca²⁺. El procedimiento está adaptado del método descrito por Blattner y otros, 2001, Analytical Biochem, 295:220. Las mitocondrias se preparan a partir de hígados de rata, las cuales se han perfundido con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar la sangre, mediante el uso de métodos estándar que utilizan una homogeneización suave en un tampón basado en sacarosa y luego una centrifugación diferencial para eliminar primero los desechos celulares y luego sedimentar las mitocondrias. La hinchazón se induce por Ca²⁺ 150 micromolar (adicionado de una solución concentrada de CaCl₂) y se monitorea por medición de la dispersión a 535-540 nm. Se adicionan compuestos representativos 5 minutos antes de que se induzca la hinchazón. EC₅₀se determina mediante comparación del hinchamiento con y sin los compuestos descritos en la presente descripción. El compuesto 1 inhibió la hinchazón mitocondrial con una EC₅₀de menos de 0,2 µM.

Lesión renal aguda

Las formulaciones de Compuesto 1 y Ciclosporina A se prepararon mediante la mezcla de estos compuestos con Cremophor/solución salina/DMSO.

Las ratas Sprague Dawley se dividieron en seis grupos: Grupo (i) el grupo testigo, dosificado con Cremophor/solución salina/DMSO sin principio activo; Grupo (ii) el grupo de control, dosificado con Cremophor/solución salina/DMSO sin activo; Grupo (iii) dosificado con Compuesto 1 (3 mg/kg); Grupo (iv) dosificado con CsA (3 mg/kg); Grupo (v) dosificado con Compuesto 1 (10 mg/kg); Grupo (vi) dosificado con CsA (10 mg/kg). Con la excepción del Grupo (i), es decir, el 'grupo testigo', se indujo lesión renal aguda (AKI) renal inducida por

isquemia-reperfusión en las ratas mediante ligadura de arterias renales bilaterales durante 30 minutos y luego se liberó la ligadura.

A los animales de los grupos de control y de tratamiento se les administraron inyecciones intraperitoneales tres veces (1 hora antes de la ligadura, 4 horas y 8 horas después de la ligadura). Se extrajo sangre de los animales 24 horas después del procedimiento de ligadura/liberación y se analizó la creatinina sérica y las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN), como una medida de lesión renal.

Los resultados de esos experimentos se muestran a continuación, y gráficamente en las Figuras 1 y 2.

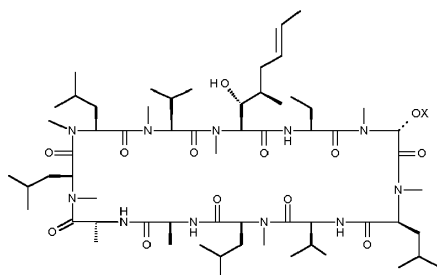


Tabla 1 - Medición de la inhibición de ciclofilina A, inhibición de ciclofilina D y transición de permeabilidad mitocondrial (MPT).

Entrada	X	CypA EC ₅₀ (nM)	CypD EC ₅₀ (nM)	MPT (μM)
1		61	2170	10
2		202	3550	7,6
3		14	ND	2,69
4 Compuesto 1		60	24	0,1
5		66	ND	10
6		118	2500	7,5
7		12	1200	10

Los resultados que se muestran en la Tabla 1 demuestran la inhibición inesperadamente alta de la ciclofilina D y la MPT del Compuesto 1 (entrada 4) en relación con análogos similares (entradas 1-3 y 5-7). Se observó una mejora de 100 veces en MPT en relación con otros tres compuestos (entradas 1, 5 y 7) y una mejora de más de 25 veces en relación con el siguiente análogo con mejor rendimiento (entrada 3). El compuesto 1 también mostró una inhibición superior de la ciclofilina D, con una mejora de al menos 50 veces en relación con todos los otros análogos probados.

Tabla 2 - Medición de las concentraciones séricas de Creatinina y BUN de los Grupos (i) a (vi)

	Creatinina (μmol/L)	Nitrógeno ureico en sangre (mmol/L)
Grupo (i)	25	5
Grupo (ii)	195	38
Grupo (iii)	60	14
Grupo (iv)	115	22
Grupo (v)	250	40
Grupo (vi)	290	42

Se indujo lesión renal aguda (AKI) inducida por LPS en ratones (C57) mediante inyección intraperitoneal de LPS (15 mg/kg). Veinte ratones se dividieron al azar en dos grupos. Los animales del grupo de control recibieron vehículo (Cremophor/solución salina/DMSO) y el grupo de tratamiento recibió el Compuesto 1 (3 mg/kg en

Cremophor/solución salina/DMSO) cada uno administrado por vía intraperitoneal. A los animales se les dosificó el vehículo o el Compuesto 1 tres veces (1 h antes de la inyección de LPS y 4 h y 8 h después de la inyección de LPS) y se extrajo sangre de los animales 12 h después de la inyección de LPS. La actividad del compuesto se determinó mediante el aumento de la tasa de supervivencia y mediante la evaluación de marcadores de la función renal.

Discusión de resultados

En la Figura 1, la concentración de creatinina en suero sanguíneo es indicativa de daño renal. El 'grupo testigo' son ratas sin AKI inducida. El "grupo de control" representa ratas con AKI inducida y las cuales no están tratadas. Por lo tanto, se puede ver que la AKI inducida resulta en un aumento de los niveles de creatinina de 25 umol/ml (Grupo 1) a 195 umol/ml (Grupo 2).

El tratamiento de ratas con AKI inducida con 3 mg/kg de CsA (Grupo 4) resulta en el descenso de los niveles de creatinina de 195 umol/ml a 115 umol/ml en comparación con el Grupo 2. Por tanto, se entiende que la CsA está actuando para prevenir la lesión por isquemia-reperfusión.

Sorprendentemente, cuando las ratas con AKI inducida se tratan con 3 mg/kg del Compuesto 1 (Grupo 3), esto da una reducción muy marcada en los niveles de Creatinina, que descienden de 195 umol/ml a 60 umol/ml (en comparación con el Grupo 2), el cual se acerca a los niveles de creatinina observados en el 'grupo testigo' (Grupo 1), es decir, ratas sin AKI inducida. Cuando la dosis del Compuesto 1 y CsA se incrementa de 3 mg/ml (Grupos 3 y 4) a 10 mg/ml (Grupos 5 y 6), parece que el beneficio de CsA y Compuesto 1 se reduce, con un funcionamiento del Compuesto 1 mejor que el de CsA.

En la Figura 2, las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN) son indicativas de daño renal.

La Figura 2 sigue la misma tendencia que se ve en la Figura 1. Es decir, 3 mg/kg de CsA resulta en una caída en los niveles de BUN (Grupo 4 en comparación con el Grupo 2), mientras que 3 mg/kg del Compuesto 1 muestran una reducción muy marcada en los niveles de BUN (Grupo 3 en comparación con el Grupo 2), que llega al nivel de BUN visto en el 'grupo testigo' (Grupo 1). El aumento de la concentración del Compuesto 1 y CsA de 3 mg/kg (Grupos 3 y 4) a 10 mg/kg (Grupos 5 y 6) demuestra ser menos efectivo. Este resultado apoya el resultado visto en la Figura 1. Muerte celular necrótica de células acinares pancreáticas murinas por yoduro de propidio

Con el objetivo de evaluar la activación de la ruta de muerte celular necrótica, se usó yoduro de propidio 1 μ M (PI; λ_{ex} : 543 nm, λ_{em} : 610-690 nm) para evaluar la ruptura de la membrana plasmática. Con el objetivo de evaluar la inhibición de la necrosis por un fármaco potencial, las células acinares pancreáticas (PAC) recién aisladas de un ratón CD1 se dividieron en los cuatro grupos siguientes:

1. Grupo de control; PAC incubadas con HEPES de sodio y vehículo (DMSO al 0,5 %).
2. Grupo de sulfato ácido de taurolitocolato (TLCS); PAC incubadas con TLCS 500 μ M y vehículo.
3. Grupo solo de fármaco potencial (para prueba de citotoxicidad); PAC incubadas con el fármaco potencial.
4. Fármaco potencial + grupo TLCS; PAC incubadas con el fármaco potencial en presencia de 500 μ M de TLCS.

Para cada grupo, las PAC se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Para cada grupo, se tomaron al azar 8 campos seleccionados (cada campo contenía en su mayoría más de 100 células) de visión bajo microscopio confocal de cada aislado de ratón, y se contó el número total de células por campo que mostraban captación de PI para dar una relación porcentual para cada campo, promediados entre campos y convertidos a una media y un error estándar de la media para un mínimo de tres ratones por grupo experimental. Todo el ensayo se realizó a ciegas de tal manera que el observador que seleccionaba los campos y el observador que realizaba el análisis de imágenes desconocían los grupos de tratamiento.

Modelo de pancreatitis aguda TLCS de ratón in vivo

El experimento mide la capacidad de un compuesto para rescatar pancreatitis aguda inducida por ácido biliar, taurolitocolilsulfato (TLCS) en un modelo de ratón. Los protocolos para animales *in vivo* están aprobados por el Ministerio del Interior del Reino Unido. Los ratones C57BL6/J (Charles River UK Ltd) se aclimatan durante al menos 1 semana antes de los experimentos *in vivo*. Los compuestos se preparan en la formulación apropiada. TLCS-AP se induce mediante inyección retrógrada en el conducto pancreático de TLCS 3 mM como se describió anteriormente [Laukkanen y otros, 2007]. El compuesto normalmente se administra por inyección i.p. y luego los animales se sacrifican 24 horas más tarde. Se visualizó la histología y se midió la actividad de la amilasa sérica, la interleucina 6 y la mieloperoxidasa como se describió anteriormente [Mukherjee y otros, 2016].

Los niveles de amilasa sérica se determinaron mediante el uso de un analizador de química clínica automatizado Roche (Roche).

Los niveles de IL-6 en suero se determinaron mediante el kit ELISA de ratón Quantikine (R&D Systems).

5

La actividad mieloperoxidasa (MPO) se usó como marcador de la infiltración de neutrófilos y se determinó como se describe. Primero se homogeneizó el tejido pulmonar y pancreático y se resuspendió en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,4) que contenía inhibidor de proteasa, después de repetir la centrifugación y la resuspensión 2-3 veces, luego se resuspendió además en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 5,4) que contenía hexadeciltrimetilo al 0,5 %, bromuro de amonio, EDTA 10 mM e inhibidores de proteasa, luego se congelaron y descongelaron tres veces, se sonicaron durante 30 s y finalmente se centrifugaron durante 15 min a 16 000 × g. Se recogió el sobrenadante y se midió la actividad de MPO con sustratos de peroxidasa general 3,3,5,5-tetrametilbencidina mediante el uso de H₂O₂. Se midió la absorbancia a 655 nm. El nivel de proteína del homogeneizado se detectó mediante el uso del kit de ensayo BCA. La actividad de MPO se normalizó en función del nivel de proteína de cada muestra y el valor medio del grupo TLCS.

10

15

Histología

Para el examen morfológico, los tejidos pancreáticos se fijaron en formalina al 10 %, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). La evaluación histopatológica se evaluó a ciegas en 10 campos aleatorios (x10 campos de gran aumento) de cada portaobjetos por dos investigadores independientes, mediante la clasificación del grado y la extensión del edema, la infiltración inflamatoria y la necrosis de 0 a 3 [5], mediante el cálculo de la media ± s.e.m. total.

20

25 Discusión de resultados

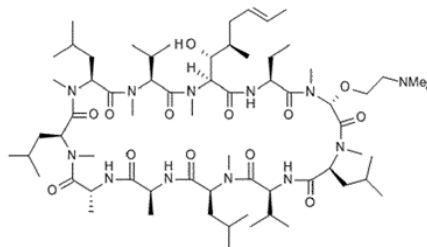
En resumen, se encontró que el Compuesto 1 era sorprendentemente efectivo en el tratamiento o prevención de la pancreatitis en comparación con compuestos similares.

30

En resumen general, se encontró que el Compuesto 1 era sorprendentemente efectivo en el tratamiento o prevención de lesiones por isquemia-reperfusión, en particular a niveles de concentración más bajos. El compuesto también es particularmente efectivo contra la lesión renal aguda y la pancreatitis.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios agudos o crónicos en donde el compuesto es el Compuesto 1:



Compuesto 1

o una sal de este;

y en donde el trastorno se selecciona de lesión renal aguda, pancreatitis crónica o aguda y lesión por isquemia-reperfusión, en donde la lesión por isquemia-reperfusión sucede después de la reinserción de una parte del cuerpo cercenada o durante el proceso de trasplante de órganos.

2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trastorno es lesión renal aguda.
3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trastorno es lesión por isquemia-reperfusión que sucede después de la reinserción de una parte del cuerpo cercenada o durante el proceso de trasplante de órganos.
4. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trastorno es pancreatitis crónica o aguda.
5. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la dosis del compuesto es 0,1 a 10 mg/kg.
6. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la dosis del compuesto es 1 a 3 mg/kg.
7. Un método para preparar el compuesto como se define en la reivindicación 1, el método comprende una reacción de formación de producto, la reacción comprende triflato de cobre y N,N-dimetilaminoetanol.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la reacción comprende un agente secante y/o se realiza bajo condiciones sustancialmente anhidras; y en donde opcionalmente el agente desecante son tamices moleculares.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde el N,N dimetilaminoetanol reacciona con un compuesto precursor de ciclosporina que comprende un grupo lábil, en donde el grupo lábil se pierde en la reacción; en donde opcionalmente el grupo lábil se une al compuesto precursor mediante un enlace -S-; y además, opcionalmente, el grupo lábil es un grupo tiopiridilo o un grupo mercaptobenzotiazol-2-iltio.

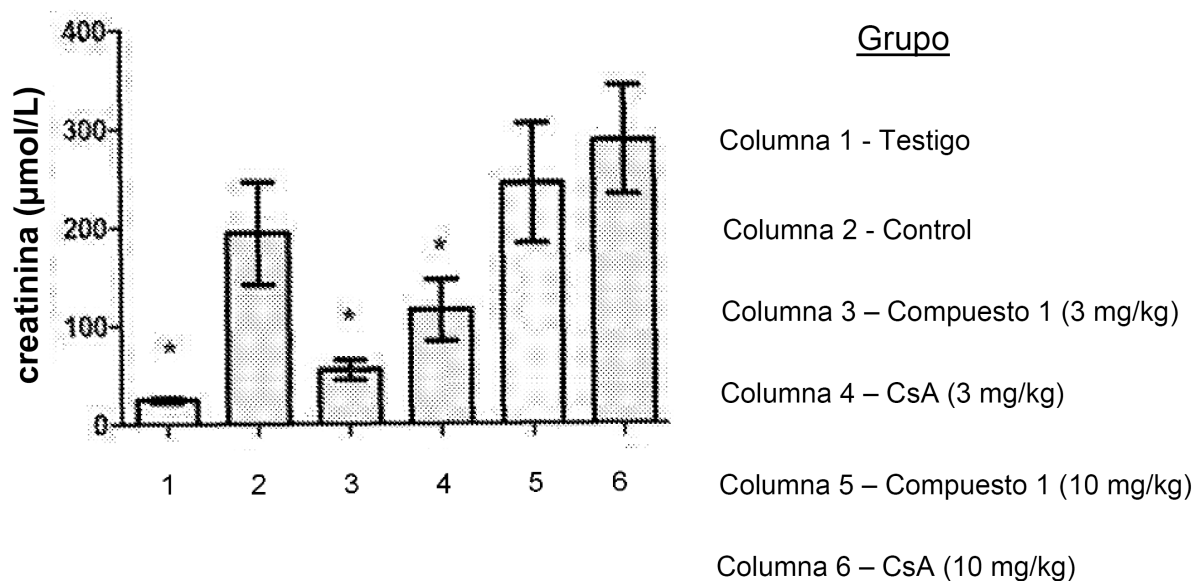


Figura 1

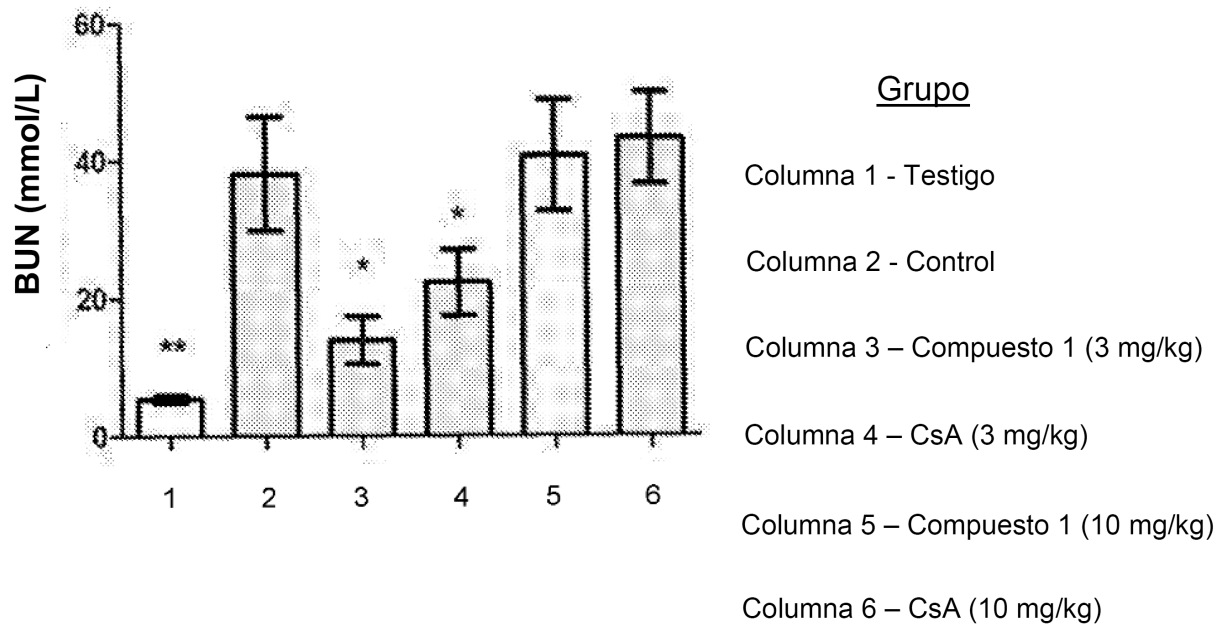


Figura 2

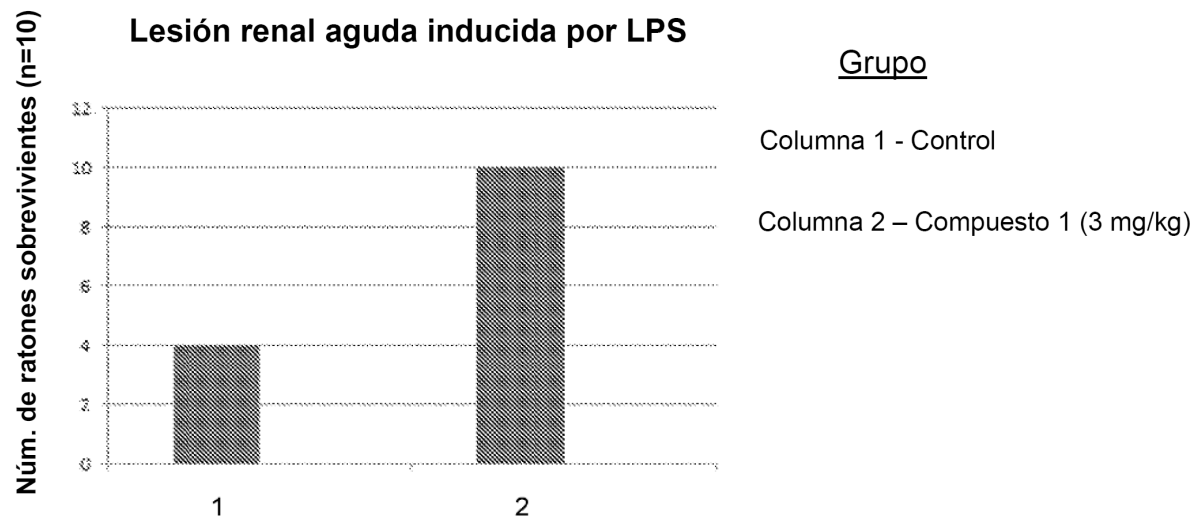


Figura 3