



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 196**

51 Int. Cl.:

C07D 311/30 (2006.01)

C07D 407/12 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/7012 (2006.01)

C07H 15/26 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09290237 .8**

96 Fecha de presentación : **31.03.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2107055**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.2009**

54 Título: **Derivados de diosmetina, su procedimiento de preparación y composiciones farmacéuticas que los contienen.**

30 Prioridad: **01.04.2008 FR 08 01779**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.07.2011

73 Titular/es: **LES LABORATOIRES SERVIER**
35, rue de Verdun
92284 Suresnes Cédex, FR

72 Inventor/es: **Wierzbicki, Michel;**
Boussard, Marie Françoise;
Verbeuren, Tony;
Sansilvestri-Morel, Patricia;
Rupin, Alain;
Paysant, Jérôme y
Lefoulon, François

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 363 196 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

Derivados de diosmetina, su procedimiento de preparación y composiciones farmacéuticas que los contienen.

La presente invención tiene por objeto nuevos derivados de diosmetina, su procedimiento de preparación y las composiciones farmacéuticas que los contienen.

5 En la patente EP 0 709 383 se describen derivados de diosmetina así como su actividad en el tratamiento de la insuficiencia venosa.

Los compuestos de la invención son inhibidores de las moléculas de adhesión, inhibidores de la NADPH-oxidasa y antiagregantes plaquetarios.

10 Las propiedades de inhibición de la adhesión leucocitaria y de la NADPH-oxidasa son importantes en el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica, ya que en esta patología se ha descrito ampliamente la inflamación de la red microcirculatoria de los miembros inferiores implicando infiltraciones leucocitarias (Verbeuren TJ, Bouskela E, Cohen RA y col., *Regulation of adhesion molecules: a new target for the treatment of chronic venous insufficiency*, 2000, *Microcirculation*, 7, S41-S48).

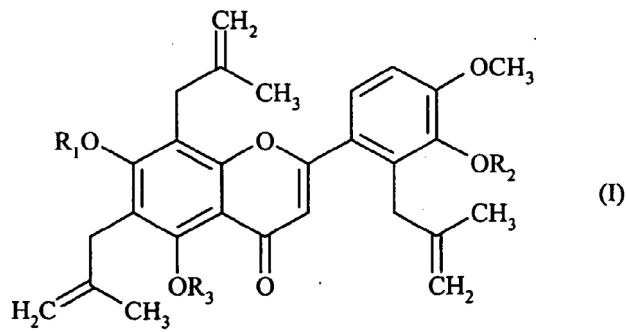
15 La propiedad de inhibición de la agregación plaquetaria demuestra el potencial antitrombótico de los compuestos de la invención, no sólo en la prevención y el tratamiento de las trombosis venosas y arteriales, sino también en el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica, donde las plaquetas pueden ser activadas por mediadores inflamatorios, o en pacientes que presentan un síndrome posttrombótico.

20 La presencia de una microangiopatía capilar-venular se ha evidenciado en las insuficiencias venosas crónicas. Esta microangiopatía resulta de la hipertensión venosa y ocasiona trastornos de filtración capilar-venular (hiperpermeabilidad) y, por tanto, micro-edemas (Barbier y col., *Microcirculation and rheology*, 1994, *Presse med.* 23, 213-224). Numerosos estudios han demostrado la implicación de la activación de las células endoteliales en la hipertensión venosa asociada a un aumento de la tasa circulante de las moléculas de adhesión (Saharay M, Shields DA, Georgiannos SN y col., *Endothelial activation in patients with chronic venous disease*, 1998, *Eur J Vasc Surg*, 15, 342-349; Verbeuren TJ, Bouskela E, Cohen RA y col., *Regulation of adhesion molecules: a new target for the treatment of chronic venous insufficiency*, 2000, *Microcirculation*, 7, S41-S48). Los compuestos de la presente invención no sólo tienen actividad antiinflamatoria, sino también actividad anti-hiperpermeabilidad.

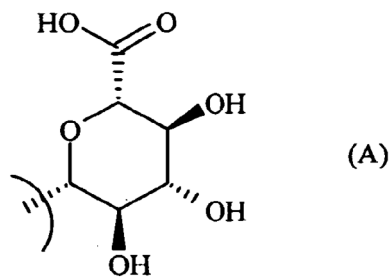
30 Por otra parte, se ha evidenciado en las insuficiencias venosas crónicas un incremento de radicales libres y, por tanto, una activación de la NADPH-oxidasa. Este estrés oxidativo estaría unido a la activación de las células endoteliales y a la infiltración leucocitaria (Glowinski J y Glowinski S, *Generation of reactive oxygen metabolites by the varicose vein wall*, 2002, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 23, 5550-555). La activación de las células endoteliales así como la inducción de moléculas de adhesión y de la NADPH-oxidasa se ha demostrado en varias patologías vasculares (Bedard K y Krause KH, *The NOX family of ROS-generating oxidases: Physiology and pathophysiology*, 2007, *Physiol. Rev.* 87, 245-313).

35 Así, los compuestos de la presente invención pueden utilizarse en la prevención o el tratamiento de enfermedades venosas, en particular de la insuficiencia venosa crónica en todos sus niveles (dolores, telangectasia, venas varicosas, edemas, trastornos tróficos, úlceras), así como en la prevención o el tratamiento del síndrome posttrombótico, de complicaciones vasculares asociadas a la diabetes, hipertensión, aterosclerosis, inflamación, síndrome metabólico relacionado con la obesidad, complicaciones vasculares asociadas a la obesidad, angina de pecho, arteritis de los miembros inferiores o accidentes vasculares cerebrales, cicatrización de llagas crónicas, 40 incluyendo úlceras de pierna con predominancia venosa o mixta, y del pie diabético, en el tratamiento o la prevención de crisis hemorroidales, en el tratamiento o la prevención de escaras y en el tratamiento de la esclerosis en placas.

La presente invención se refiere especialmente a los compuestos de fórmula (I):

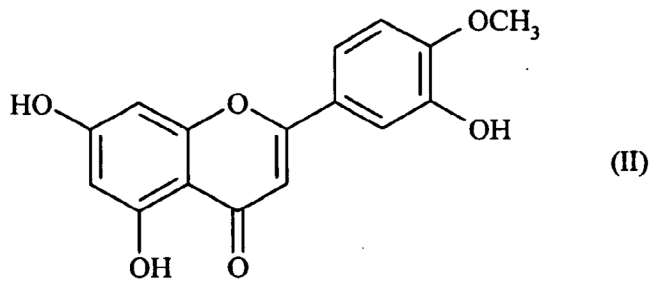


donde R_1 , R_2 y R_3 , idénticos o diferentes, representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula (A):

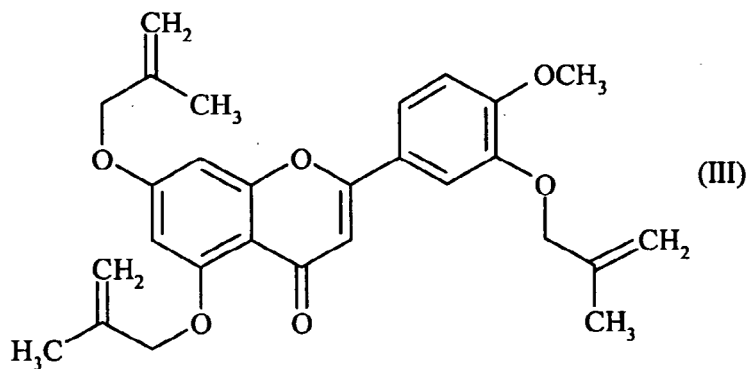


5 Los compuestos para los cuales al menos uno de entre R_1 , R_2 y R_3 representa un grupo (A) son metabolitos del compuesto de fórmula (I) en los cuales R_1 , R_2 y R_3 representan todos un átomo de hidrógeno.

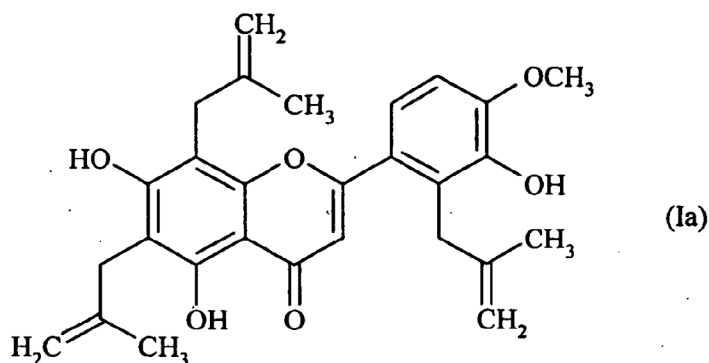
La presente invención tiene también por objeto el procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula (I) a partir de la diosmetina, de fórmula (II):



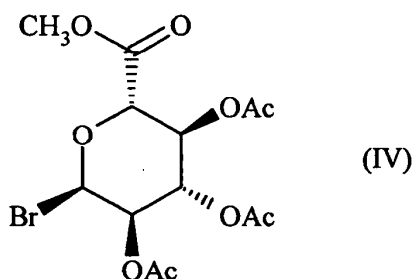
la cual se somete a reacción con bromuro de metalilo, para conducir al compuesto de fórmula (III):



que se calienta para conducir al compuesto de fórmula (Ia), caso particular de los compuestos de fórmula (I) donde R_1 , R_2 y R_3 representan un átomo de hidrógeno:



5 el cual se somete a reacción, cuando se desea tener acceso a los demás compuestos de fórmula (I), con el compuesto de fórmula (IV):

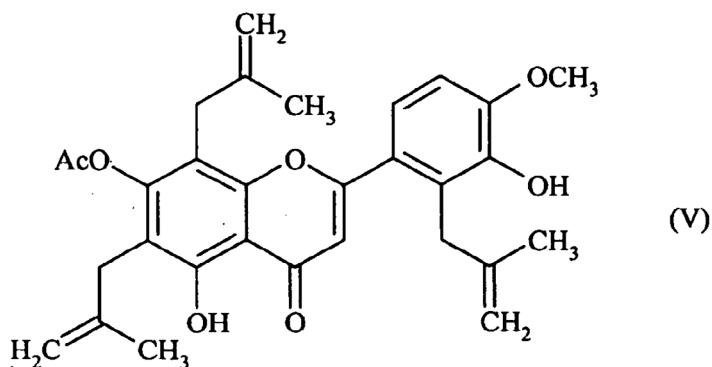


en la que Ac representa un grupo acetilo,

para conducir, después de desprotección de la función ácido y de las funciones alcohol del grupo (A), a los compuestos de fórmula (I) donde al menos uno de entre R_1 , R_2 y R_3 no es H.

10 Cuando los compuestos de fórmula (I) se obtienen como mezcla, se pueden separar, por ejemplo mediante cromatografía HPLC preparativa.

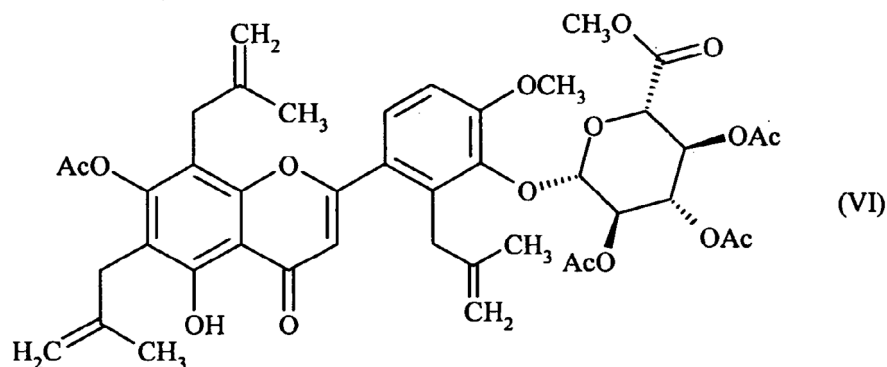
El compuesto de fórmula (Ib) para el cual R_1 y R_3 representan cada uno un átomo de hidrógeno y R_2 representa un grupo de fórmula (A) se puede obtener también mediante acetilación del compuesto de fórmula (Ia), para conducir al compuesto de fórmula (V):



15

en la que Ac representa un grupo acetilo,

el cual se somete a reacción con el compuesto de fórmula (IV), para conducir al compuesto de fórmula (VI):



en la que Ac representa un grupo acetilo,

en el que se desprotege la función ácido y las funciones alcohol y fenol, para conducir al compuesto de fórmula (Ib).

- 5 Los compuestos de la invención son inhibidores de las moléculas de adhesión y de la NADPH-oxidasa, así como de antiagregantes plaquetarios.

10 Por esta razón, son útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades venosas, en particular la insuficiencia venosa crónica en todos sus niveles (dolores, telangectasia, venas varicosas, edemas, trastornos tróficos, úlceras), así como en la prevención o el tratamiento del síndrome postrombótico, de complicaciones vasculares asociadas a la diabetes, hipertensión, aterosclerosis, inflamación, síndrome metabólico relacionado con la obesidad, complicaciones vasculares asociadas a la obesidad, angina de pecho, arteritis de los miembros inferiores o accidentes vasculares cerebrales, cicatrización de llagas crónicas, incluyendo úlceras de pierna con predominancia venosa o mixta, y el pié diabético, en el tratamiento o la prevención de crisis hemorroidales, en el tratamiento o la prevención de escaras y en el tratamiento de la esclerosis en placas.

- 15 Son igualmente objeto de la presente invención las composiciones farmacéuticas que contienen como principio activo un compuesto de fórmula (I), en combinación con uno o varios excipientes o vehículos inertes, no tóxicos, farmacéuticamente aceptables.

20 Entre las composiciones farmacéuticas según la invención, se mencionan en particular aquellas adecuadas a la administración oral, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea), percutánea o transcutánea, nasal, rectal, perlingual, ocular o respiratoria, y especialmente los comprimidos simples o en grageas, comprimidos sublinguales, cápsulas duras, cápsulas, supositorios, cremas, pomadas, geles dérmicos, preparaciones inyectables o bebibles, aerosoles, gotas oculares o nasales.

25 Además del compuesto de fórmula (I), las composiciones farmacéuticas según la invención contienen uno o varios excipientes o vehículos, tales como diluyentes, lubricantes, ligantes, agentes de desintegración, absorbentes, colorantes, edulcorantes.

A modo de ejemplo de excipientes o vehículos, se pueden mencionar:

- como diluyentes: lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, glicerina;
 - como lubricantes: sílice, talco, ácido esteárico y sus sales de magnesio y de calcio, polietilenglicol;
 - como ligantes: silicato de aluminio y de magnesio, almidón, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona;
 - como desintegrantes: agar, ácido algínico y su sal de sodio, mezclas efervescentes.
- 30

El porcentaje de principio activo de fórmula (I) en la composición farmacéutica oscila preferentemente entre el 5% y el 50% en peso.

La posología útil varía según la edad y el peso del paciente, la vía de administración, la naturaleza y la severidad de la afección, así como según la toma de tratamientos eventuales asociados y oscila entre 0,5 mg y 1.000 mg en una o varias tomas al día.

- 5 Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención. Las estructuras de los compuestos descritos en los ejemplos han sido determinadas según las técnicas espectrofotométricas habituales (infrarrojo, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas).

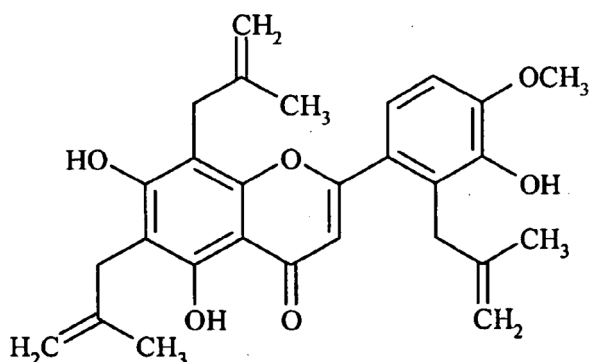
Abreviaturas

DMSO: dimetilsulfóxido

NADPH: forma reducida de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

- 10 HPLC: Cromatografía en Fase Líquida de Alta Resolución

Ejemplo 1: 6,8,2'-tris(isobut-2-en-1-il)diosmetina



Fase A: 2-(4-metoxi-3-[(isobut-2-en-1-il)oxi]fenil)-5,7-bis[(isobut-2-en-1-il)oxi]-4H-cromen-4-ona

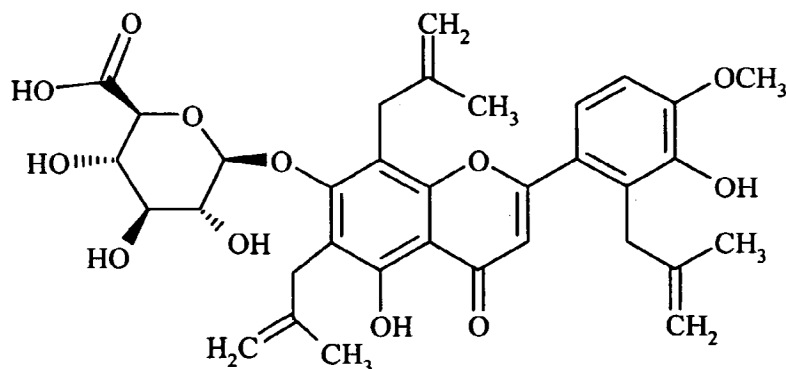
- 15 A 30 g de diosmetina se añaden 69,3 g de carbonato de potasio y 450 ml de acetona. Se calienta a reflujo la mezcla durante 4 h 30 min, se lleva a temperatura ambiente y se añaden 54 g de bromuro de metalilo. Después, se calienta a reflujo la mezcla de reacción durante toda la noche, se lleva a temperatura ambiente y se filtra. Se enjuaga la torta con acetona, luego se evapora el filtrado para conducir a un residuo, que se recristaliza en tolueno para conducir al producto del título.

Fase B: 6,8,2'-tris(isobut-2-en-1-il)diosmetina

- 20 A 10 g del compuesto obtenido en la fase anterior se añaden 120 ml de N,N-dimetilanilina y se calienta a reflujo la mezcla durante 1 hora. Luego se evapora el disolvente bajo presión reducida y el residuo obtenido se recristaliza en isopropanol para conducir al producto del título.

Punto de fusión: 141°C

- 25 **Ejemplo 2: Ácido (5-hidroxi-2-[3-hidroxi-4-metoxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-7-il)beta-D-glucurónico**



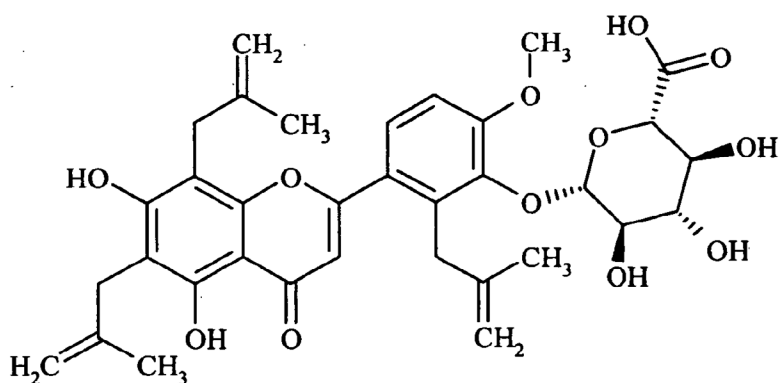
Fase A: 5-hidroxi-2-[3-hidroxi-4-metoxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-6,8bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-7-il 2,3,4-tris-O-acetil-beta-D-glucuronato de metilo

5 Se obtiene el compuesto del título mediante la reacción del compuesto del Ejemplo 1 (250 mg) con el compuesto de fórmula (IV) (429 mg), mediante catálisis por transferencia de fase, según el proceso descrito en la publicación *Synth Commun* 1999, 29(16), 2775-2781.

Fase B: Ácido (5-hidroxi-2-[3-hidroxi-4-metoxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-7-il)-beta-D-glucurónico

10 El compuesto obtenido en la Fase A se pone en solución en metanol y se añade hidróxido sódico. Se lleva a reflujo el medio durante 1 h 30 min, se neutraliza con una disolución de ácido clorhídrico 2N antes de evaporarse en seco para conducir al producto del título.

Ejemplo 3: Ácido 3-[5,7-dihidroxi-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-2-il]-6-metoxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil beta-D-glucurónico



15 **Fase A:** Acetato de 5-hidroxi-2-[3-hidroxi-4-metoxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-7-ilo

20 El compuesto del Ejemplo 1 (3 g) se pone en solución en piridina y se añade a temperatura ambiente anhídrido acético (0,61 ml). Luego se agita el medio de reacción durante 16 horas y se evapora en seco. Se recoge el residuo mediante agua helada, después se extrae con diclorometano, se seca, se filtra y se evapora. El producto bruto así obtenido se purifica en gel de sílice y mediante HPLC preparativa en fase inversa, para conducir al producto del título.

Fase B: 3-[7-(acetiloxi)-5-hidroxi-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-2-il]-6-metoxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil 2,3,4-tris-O-acetil-beta-D-glucuronato de metilo

Se obtiene el compuesto del título según el proceso de la Fase A del Ejemplo 2 a partir del compuesto obtenido en la fase anterior.

Fase C: *Ácido 3-[5,7-dihidroxi-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4H-cromen-2-il]-6-metoxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil beta-D-glucurónico*

Se obtiene el compuesto del título según el proceso de la Fase B del Ejemplo 2 a partir del compuesto obtenido en la fase anterior.

Estudio Farmacológico

5 383. En los siguientes ejemplos, el término "compuesto de referencia" corresponde al Ejemplo 69 de la EP 0 709

Ejemplo 4: Inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro*

A la altura de la carótida de conejos neozelandeses anestesiados se toma una muestra de sangre sobre citrato 0,109M. Se recupera mediante centrifugación el plasma rico en plaquetas. Después, se lavan por centrifugación las plaquetas.

10 Las plaquetas lavadas se vuelven a suspender en un tampón Tyrode. Se coloca la suspensión plaquetaria en una cuba y luego en un agregómetro a 37°C bajo agitación en presencia del compuesto del Ejemplo 1 (30 µM) diluido en el mismo disolvente (0,1% DMSO). Después de 2 minutos, la agregación es inducida por colágeno (4 µg/ml), se registra la respuesta durante 6 minutos. La cuantificación de la agregación plaquetaria se lleva a cabo mediante turbidimetría, es decir midiendo el porcentaje de luz transmitida a través de la suspensión plaquetaria con respecto a una cuba que
15 contiene Tyrode y una cuba que contiene el disolvente (0,1% DMSO).

La eficacia antiagregante de los derivados de diosmetina según la invención y en particular del compuesto del Ejemplo 1 y del compuesto de referencia se evalúa en función del porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria, esta actividad será tanto más importante cuanto más grande sea el porcentaje de inhibición. El compuesto del Ejemplo 1 (30 µM) provoca una inhibición de 36,6 ± 9,9%, mientras que el compuesto de referencia no provoca efecto significativo alguno (4,1 ± 1,8%) (P < 0,01 compuesto del Ejemplo 1 con respecto al compuesto de referencia, prueba t de Student, n = 7).
20

Esta prueba demuestra la actividad inhibidora de la agregación plaquetaria y, por tanto, el potencial antitrombótico del compuesto del Ejemplo 1.

Ejemplo 5: Inhibición de la adhesión leucocitaria *in vivo*

25 Se utilizaron en este estudio tres grupos de 3 hámsters que pesaban de 90 a 110 g. Treinta minutos antes de la anestesia, los hámsters fueron tratados vía oral con una dosis única de placebo (goma arábiga 10%), de compuesto del Ejemplo 1 (3 mg/kg) o de compuesto de referencia (3 mg/kg). Se anestesian los animales con 50 mg/kg de pentobarbital mediante administración intraperitoneal. Los hámsters se colocan bajo microscopio y el carrillo se aísla y sumerge en una solución de perfusión (110,0 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,0 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 18,0 mM NaHCO₃, 15,39 mM HEPES y 14,61 mM sal HEPES-Na⁺) (Duling, *The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the microcirculation*, 1973, Microvasc. Res. 5 : 423-429; Svensjö y col., *The hamster cheek pouch preparation as a model for studies of macromolecular permeability of the microvasculature*, 1978, Uppsala J. Med. Sci. 83 : 71-79).
30

Se lleva a cabo una isquemia local mediante un tubo de látex colocado a la entrada del carrillo. La presión intratubular del tubo se incrementa hasta 200-220 mm de Hg mediante una jeringa calibrada. Esta oclusión total se mantiene durante 30 minutos y se lleva a cabo una reperfusión durante 45 minutos. La adhesión de los leucocitos a las células endoteliales en las vénulas postcapilares se cuantifica en un campo de 6 mm² justo después del inicio de la isquemia (definido como del 100%) y luego a diferentes tiempos después de la reperfusión (0, 15, 30 y 45 minutos).
35

El modelo de adhesión leucocitaria inducida por isquemia-reperfusión en el carrillo de hámster permite comprobar la eficacia de los derivados de diosmetina según la invención como agentes antiadhesión y en particular del compuesto del Ejemplo 1 y del compuesto de referencia.
40

La actividad del compuesto del Ejemplo 1 y del compuesto de referencia se evalúa en función del número de leucocitos adheridos a las células endoteliales para un campo de 6 mm² después de la isquemia-reperfusión, esta actividad será tanto más importante cuanto más bajo sea el número de leucocitos y, por tanto, más bajo será el porcentaje de leucocitos adheridos con respecto al número de leucocitos adheridos después de la isquemia.

Tabla 1 Efecto del tratamiento oral de los hámsters con el compuesto del Ejemplo 1 o el compuesto de referencia sobre el número de leucocitos adheridos a las células endoteliales en las vénulas postcapilares del carrillo después de la isquemia (número de leucocitos considerado como del 100%) y después de 0, 15, 30 y 45 minutos de reperfusión

Tiempo después de reperfusión (minutos)	Placebo	Compuesto del Ejemplo 1	Compuesto de referencia
0	165,8 ± 12,8%	81,7 ± 19,1% **	129,3 ± 10,9%
15	211,8 ± 11,6%	100 ± 13,7% ***	138,0 ± 14,4% **
30	210,5 ± 16,6%	91,0 ± 18,7% ***	121,0 ± 18,0% **
45	166,3 ± 11,1%	109,3 ± 23,0%	133,7 ± 42,4%

** : p < 0,01; *** : p < 0,001 con respecto al tratamiento Placebo, ANOVA 2 factores (tiempo y tratamiento) seguido de prueba de Bonferroni (n = 3)

5 El compuesto del Ejemplo 1 permite reducir clara y significativamente el número de leucocitos adheridos a las células endoteliales después de la isquemia-reperfusión con respecto al placebo. La actividad del compuesto del Ejemplo 1 es más potente que la del compuesto de referencia.

10 Esta prueba demuestra la actividad inhibidora de la adhesión leucocitaria del compuesto del Ejemplo 1 y, por tanto, su potencial para el tratamiento de la insuficiencia venosa así como de enfermedades vasculares arteriales tales como aterosclerosis o complicaciones vasculares asociadas a la diabetes.

Ejemplo 6: Inhibición de la expresión de la Molécula 1 de Adhesión a Células Vasculares (VCAM-1) *in vivo*

15 Se utilizan en este estudio cuatro grupos de 8 ratones deficientes en proteína apolipoproteína E (ApoE^{-/-}, desarrollando espontáneamente placas de ateroma en las aortas). Con 9 semanas de edad, los ratones se convierten en diabéticos mediante 5 inyecciones intraperitoneales de 100 mg/kg de estreptozotocina en 5 días. A la décima semana, los animales se reparten en cuatro grupos: grupo control compuesto del Ejemplo 1, grupo tratado compuesto del Ejemplo 1 (130 mg/kg/día en la comida durante 6 semanas), grupo control compuesto de referencia, grupo tratado compuesto de referencia (130 mg/kg/día en la comida durante 6 semanas). Se sacrifican los ratones en la decimoquinta semana después de anestesia con isoflurano. Se extraen muestras de las aortas, se disecan y se congelan en nitrógeno líquido.

20 Se criotrituran las aortas y se extraen los ARN totales por medio del kit RNeasy® micro (Qiagen). A continuación, se realiza la transcripción inversa a partir de 1 µg de ARN total por medio del kit Superscript™ III de síntesis de primera hebra de ADNc (Invitrogen). La expresión de VCAM-1 se cuantifica mediante PCR en tiempo real y se normaliza con respecto a 3 genes de referencia: β actina, hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HPRT) y gliceraldehido-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Se utiliza el kit IQ™ SYBR® Green supermix (Biorad), con 2 µl de ADNc y 150 nM de cada cebador. Se desnaturalizan las muestras durante 5 minutos a 95°C y se amplifican durante 40 ciclos según el protocolo siguiente: desnaturalización durante 20 segundos a 95°C e hibridación así como alargamiento durante 1 minuto a 54°C para la VCAM-1, β actina y HPRT, 56°C para GAPDH. El ciclo umbral (definido como el ciclo para el cual la fluorescencia se considera como significativamente más elevada que el ruido de fondo) para la VCAM-1 de los animales no tratados se normaliza con respecto a los genes de referencia (y se considera el 100%) y es comparado luego con el de los animales tratados.

Los cebadores específicos utilizados son los siguientes:

VCAM-1: 5'-AGA GCA GAC TTT CTA TTT CAC-3' (sentido) y 5'-CCA TCT TCA CAG GCA TTT C-3' (antisentido);

β actina: 5'-AAG ACC TCT ATG CCA ACA CAG-3' (sentido) y 5'-AGC CAC CGA TCC ACA CAG-3' (antisentido);

HPRT: 5'-AGC TAC TGT AAT GAT CAG TCA ACG-3' (antisentido);

35 GAPDH: 5'-GCC TTC CGT GTT CCT ACC C-3' (sentido) y 5'-TGC CTG CTT CAC CAC CTT-3' (antisentido).

El modelo de inducción de la diabetes en ratones deficientes en ApoE permite comprobar la eficacia de los derivados de diosmetina según la invención como agentes antiadhesión.

La actividad del compuesto del Ejemplo 1 y del compuesto de referencia se evalúa en función del nivel de expresión de VCAM-1 en la aorta en comparación con los animales no tratados. Esta actividad será tanto más importante cuanto más bajo sea el nivel de expresión de VCAM-1. Los ratones tratados con el compuesto del Ejemplo 1 tienen un nivel de expresión de VCAM-1 de $65,9 \pm 10,1\%$ con respecto a los ratones no tratados ($P < 0,01$, prueba t de Student, $n = 8$), mientras que los ratones tratados con el compuesto de referencia tienen un nivel de expresión de VCAM-1 de $83,0 \pm 6,6\%$ ($P < 0,05$, prueba t de Student, $n = 8$).

El compuesto del Ejemplo 1 permite reducir clara y significativamente la expresión de VCAM-1 en la aorta de ratones diabéticos ApoE^{-/-} con respecto al grupo no tratado. La actividad del compuesto del Ejemplo 1 es más potente que la del compuesto de referencia.

Esta prueba demuestra la actividad inhibidora de la expresión de las moléculas de adhesión del compuesto del Ejemplo 1 y, por tanto, su potencial para el tratamiento de la insuficiencia venosa así como en patologías arteriales tales como complicaciones vasculares asociadas a la diabetes, hipertensión, aterosclerosis, inflamación, síndrome metabólico asociado a la obesidad, complicaciones vasculares relacionadas con la obesidad, angina de pecho, arteritis de los miembros inferiores, accidentes vasculares cerebrales.

15 **Ejemplo 7: Inhibición de la actividad de la NADPH-oxidasa *in vitro***

El estudio se realiza en células endoteliales humanas HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, Clonetics Co.). Se cultivan las células en un medio EBM2 (*Endothelial Basal Medium*, Clonetics Co.) suplementado con un 2% de SVF (*Suero de Ternera Fetal*) y EGM2 (*Endothelial Growth Medium*, Clonetics Co.).

Se incuban las células en presencia de disolvente (0,1% DMSO, control del compuesto del Ejemplo 1), de EBM2 (control de los compuestos de los Ejemplos 2 y 3), del compuesto del Ejemplo 1 (100 μ M), del compuesto del Ejemplo 2 (100 μ M) o del compuesto del Ejemplo 3 (100 μ M) durante 15 minutos, luego se activan con angiotensina II (1 μ M) durante 30 minutos para activar la NADPH-oxidasa. Se lavan las células en EBM2 y se añade el sustrato de NADPH-oxidasa (NADPH, 200 μ M) y lucigenina (25 μ M). La reducción de la lucigenina por los aniones superóxidos producidos por la NADPH-oxidasa se cuantifica con un luminómetro. El número de puntos por segundo (cps) de los grupos de control se compara con los grupos tratados. Los cps obtenidos con los grupos de control se consideran como el 100% de la actividad NADPH-oxidasa.

El modelo de medición de la actividad NADPH-oxidasa endotelial inducida por angiotensina II permite comprobar la eficacia de los derivados de diosmetina según la invención como agentes inhibidores de la actividad de la NADPH-oxidasa.

La actividad de los compuestos de los Ejemplos 1, 2 y 3 se evalúa en función del número cps obtenido, esta actividad será tanto más importante cuanto más bajo sea el número de cps.

Tabla 3 Efecto del tratamiento de las células endoteliales humanas con los compuestos de los Ejemplos 1, 2 y 3 sobre la actividad de la NADPH-oxidasa tras la inducción por angiotensina II (actividad del grupo de control sin producto considerado como el 100%)

Grupo	Actividad NADPH-oxidasa (% / grupo de control)
Grupo de control compuesto del Ejemplo 1	100%
Grupo tratado compuesto del Ejemplo 1 (100 μ M)	$38,16 \pm 3,13\%$ ***
Grupo de control compuestos de los Ejemplos 2 y 3	100%
Grupo tratado compuesto del Ejemplo 2 (100 μ M)	$30,60 \pm 4,83\%$ ***
Grupo tratado compuesto del Ejemplo 3 (100 μ M)	$18,45 \pm 4,08\%$ ***
***: $p < 0,01$ con respecto al grupo de control compuesto del Ejemplo 1 o de los compuestos de los Ejemplos 2 y 3, Prueba t de Student ($n = 3$).	

Los compuestos de los Ejemplos 1, 2 y 3 permiten reducir clara y significativamente la actividad de la NADPH-oxidasa en las células endoteliales humanas.

Esta prueba demuestra la actividad inhibidora de la actividad NADPH- oxidasa vascular de los compuestos de los Ejemplos 1, 2 y 3 y, por tanto, su potencial inhibidor de radicales libres en la insuficiencia venosa así como en patologías arteriales tales como aterosclerosis, hipertensión, complicaciones vasculares asociadas a la diabetes y enfermedades isquémicas.

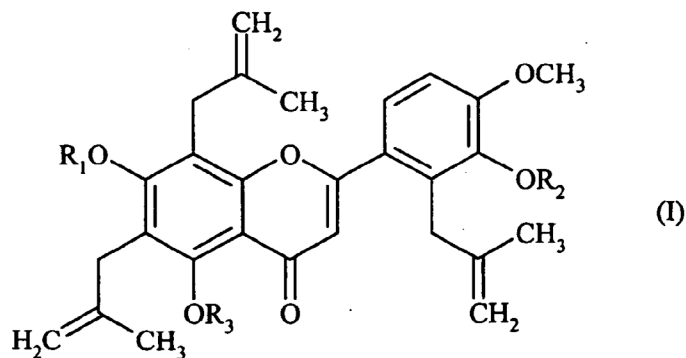
5 Ejemplo 8: Composición farmacéutica

Fórmula de preparación para 1.000 comprimidos dosificados a 10 mg:

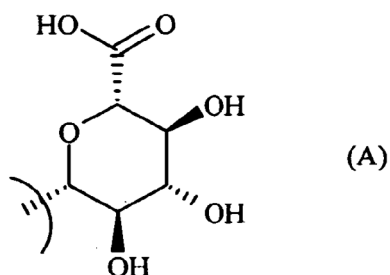
	Compuesto del Ejemplo 1	10 g
	Hidroxipropilcelulosa	2 g
	Almidón de trigo	10 g
10	Lactosa	100 g
	Estearato de magnesio	3 g
	Talco	3 g

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



donde R₁, R₂ y R₃, idénticos o diferentes, representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo de Fórmula (A):

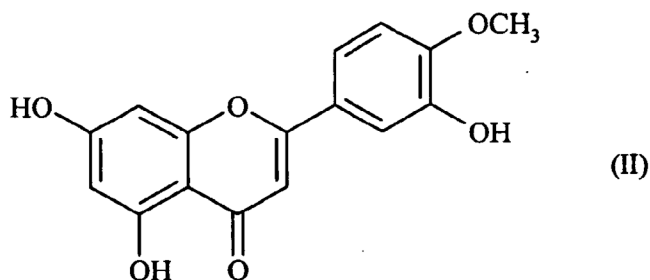


5 2. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, seleccionado de entre:

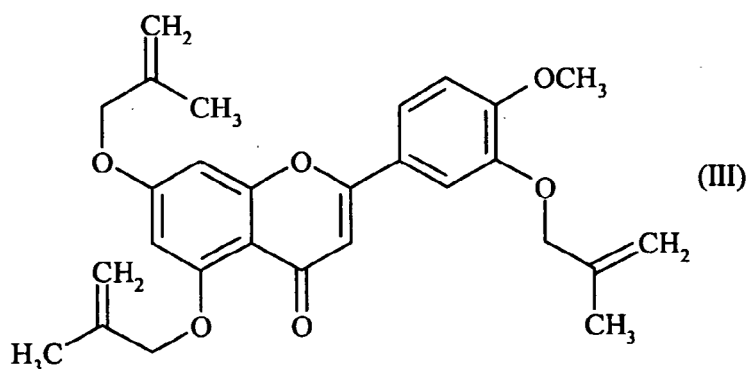
- 6,8,2'-tris(isobut-2-en-1-il)diosmetina,
- ácido (5-hidroxi-2-[3-hidroxi-4-metoxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil]-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4*H*-cromen-7-il) beta-D-glucurónico y
- ácido 3-[5,7-dihidroxi-6,8-bis(isobut-2-en-1-il)-4-oxo-4*H*-cromen-2-il]-6-metoxi-2-(isobut-2-en-1-il)fenil beta-D-glucurónico.

10

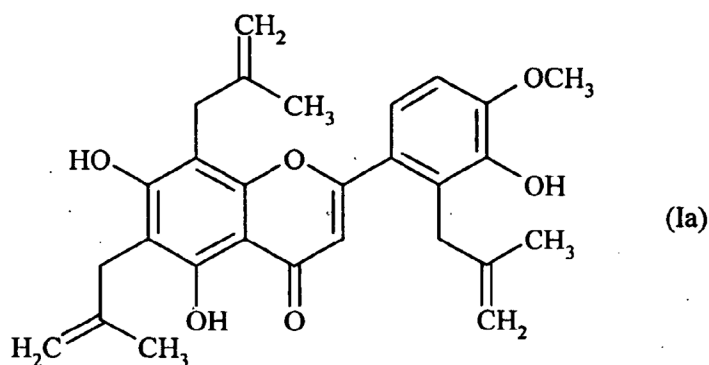
3. Procedimiento de síntesis de los compuestos de fórmula (I) según la reivindicación 1 a partir de diosmetina, de fórmula (II):



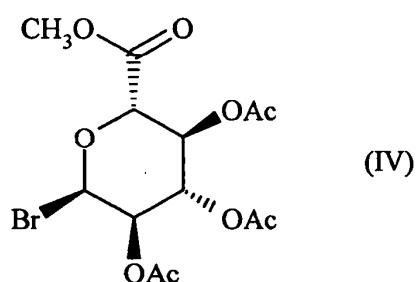
la cual se somete a reacción con bromuro de metalilo, para conducir al compuesto de fórmula (III):



que se calienta para conducir al compuesto de fórmula (Ia), caso particular de los compuestos de fórmula (I) para los cuales R_1 , R_2 y R_3 representan cada uno un átomo de hidrógeno:



- 5 el cual se somete a reacción, cuando se desea tener acceso a los demás compuestos de fórmula (I), con el compuesto de fórmula (IV):



donde Ac representa un grupo acetilo,

- 10 para conducir, después de desprotección de la función ácido y de las funciones alcohol del grupo (A) tal como se han definido en la reivindicación 1, a los compuestos de fórmula (I) para los cuales al menos uno de entre R_1 , R_2 y R_3 es diferente de H.

4. Composición farmacéutica que contiene como principio activo un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en combinación con uno o varios excipientes o vehículos inertes, no tóxicos, farmacéuticamente aceptables.
- 15 5. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la fabricación de medicamentos útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades venosas, para la prevención o el tratamiento del síndrome postrombótico, de complicaciones vasculares asociadas a la diabetes, hipertensión, aterosclerosis, inflamación, síndrome metabólico relacionado con la obesidad, complicaciones vasculares asociadas a la obesidad, angina de pecho, arteritis de los miembros inferiores o accidentes vasculares cerebrales, para la cicatrización de llagas

crónicas, incluyendo úlceras de pierna con predominancia venosa o mixta, y el pie diabético, para el tratamiento o la prevención de crisis hemorroidales, para el tratamiento o la prevención de escaras y para el tratamiento de la esclerosis en placas.

- 5 **6.** Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la fabricación de medicamentos útiles en la prevención o el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica.
- 10 **7.** Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 útil para la prevención o el tratamiento de enfermedades venosas, para la prevención o el tratamiento del síndrome postrombótico, de complicaciones vasculares asociadas a la diabetes, hipertensión, aterosclerosis, inflamación, síndrome metabólico relacionado con la obesidad, complicaciones vasculares asociadas a la obesidad, angina de pecho, arteritis de los miembros inferiores o accidentes vasculares cerebrales, para la cicatrización de llagas crónicas, incluyendo úlceras de pierna con predominancia venosa o mixta, y el pie diabético, para el tratamiento o la prevención de crisis hemorroidales, para el tratamiento o la prevención de escaras y para el tratamiento de la esclerosis en placas.
- 8.** Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 útil para la prevención o el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica.