



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 931**

51 Int. Cl.:
A61K 31/47 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
C07D 215/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02720493 .2**
96 Fecha de presentación : **18.04.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1386608**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

54 Título: **Agente reparador para enfermedad glomerular.**

30 Prioridad: **19.04.2001 JP 2001-121058**
27.11.2001 JP 2001-361257

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.08.2011

73 Titular/es: **KOWA Co., Ltd.**
6-29, Nishiki 3-chome,
Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi 460-0003, JP
NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, Ltd.

72 Inventor/es: **Nakagawa, Takashi;**
Suda, Makoto y
Yamauchi, Yoichi

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 363 931 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

Agente reparador para enfermedad glomerular

5 **Campo Técnico**

La presente invención se refiere a un agente útil para la prevención o terapia de enfermedades glomerulares.

10 **Antecedentes de la Técnica**

10 Las enfermedades glomerulares (principalmente nefritis glomerular), que se desarrollan en glomérulos de los riñones, se clasifican clínicamente en siete tipos; es decir, nefritis aguda después de infección con estreptococo hemolítico, glomerulonefritis semilunar (glomerulonefritis rápidamente progresiva), nefropatía de IgA, nefropatía membranosa, nefropatía proliferativa membranosa, glomerulonefritis focal y síndrome nefrótico de cambio mínimo. 15 De estos, las enfermedades distintas de nefritis aguda después de infección con estreptococo hemolítico, glomerulonefritis semilunar y síndrome nefrótico de cambio mínimo generalmente se denominan "nefritis glomerular crónica", pero aún debe elucidarse la causa y el momento de aparición de la nefritis glomerular crónica. En las nefritis glomerulares crónicas de procesos de lesión, la mayoría de ellas son generalmente progresivas y con frecuencia dan como resultado insuficiencia renal.

20 En muchos casos, la nefritis glomerular crónica se reconoce con frecuencia por una lesión que aparece en los glomérulos. Se cree que la lesión está asociada en gran medida con la proliferación de las células mesangiales (es decir, un tipo de células constituyentes de un glomérulo) y un aumento en la cantidad de matriz mesangial (es decir, la matriz celular extramesangial). Estudios recientes han sugerido que citocinas/factores de crecimiento tales como 25 PDGF-BB y TGF- β_1 , desempeñan un papel activo en la provocación de una lesión en el mesangio (es decir células mesangiales y la matriz mesangial). Por ejemplo, se sabe que PDGF-BB, que se produce a partir de células mesangiales, promueve la proliferación de las células mesangiales (Yoshimura A. *et al*, *Kidney int.*, 40: 470, 1991), y se sabe que TGF- β_1 promueve la síntesis y secreción de la matriz mesangial (Border WA. *et al*, *Nature.*, 346:371, 1990).

30 Por lo tanto, se considera que suprimir la respuesta de las células mesangiales a PDGF-BB o TGF- β_1 e inhibir la proliferación de células mesangiales e hiperplasia de la matriz mesangial es capaz de detener el progreso de una lesión que se produce en el mesangio y además detener el progreso de una enfermedad glomerular. Por lo tanto, se ha investigado hasta el momento una diversidad de tales fármacos (por ejemplo, un inhibidor de la proliferación de 35 células mesangiales) de acuerdo con el modelo patológico (Eitner F. *et al*, *Kidney int.*, 51(1)69, 1997).

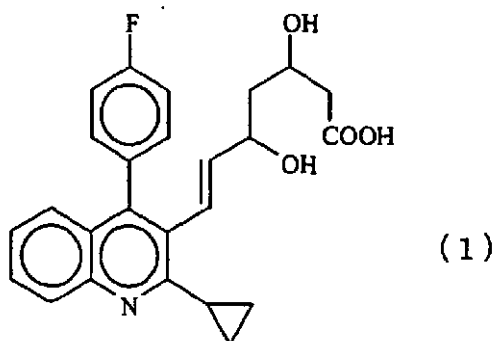
40 Sin embargo, no se ha desarrollado hasta la fecha un agente terapéutico eficaz para una enfermedad glomerular y, por lo tanto, existe una fuerte demanda para el desarrollo de un nuevo fármaco que ejerza un efecto terapéutico excelente en pacientes que padecen las enfermedades glomerulares anteriormente mencionadas.

45 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un agente preventivo o terapéutico para una enfermedad glomerular que implica una lesión que se produce en un glomérulo, particularmente causada por una lesión en el mesangio.

45 **Descripción de la invención**

50 A la vista de lo anterior, los presentes inventores han realizado estudios intensivos y han descubierto que un compuesto representado por fórmula (1) (ácido (+)-(3R,5S,6E)-7-[2-ciclopropil-4-(4-fluorofenil)-3-quinolil]-3,5-dihidroxi-6-heptenoico) inhibe una lesión que se produce en el mesangio por inhibición de la producción de una matriz mesangial y por lo tanto es útil como un agente terapéutico o preventivo eficaz para una enfermedad glomerular. La presente invención se ha conseguido basándose en este hallazgo.

En consecuencia, la presente invención proporciona un agente terapéutico o preventivo para su uso en una enfermedad glomerular que comprende como un principio activo un compuesto representado por la fórmula (1):



o una sal del mismo.

5 La invención también proporciona el uso del compuesto anterior o una sal del mismo para producir un agente preventivo o terapéutico para una enfermedad glomerular.

Además, la presente invención proporciona un uso para tratar una enfermedad glomerular caracterizada porque el uso comprende administrar el compuesto anterior o una sal del mismo.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que muestra la cantidad total de proteína (18 horas) excretada en una muestra de orina recogida de ratas nefríticas anti-Thy-1 progresivas;

15 La Figura 2 es una gráfica que representa la evaluación graduada de un daño túbulointersticial de hallazgo patológico observado en ratas nefríticas anti-Thy-1 progresivas;

La Figura 3 es una gráfica que muestra el curso temporal en la relación (proteína total)/creatinina de muestras de orina recogidas de ratas modelo con insuficiencia renal; y

20 La Figura 4 es una gráfica que muestra el curso temporal en el nivel de nitrógeno de urea en sangre de muestras de sangre recogidas de ratas modelo de insuficiencia renal.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

25 El compuesto de fórmula (1) o una sal del mismo de acuerdo con la presente invención inhibe de forma notable la producción de péptido de tipo procolágeno I-C (PIP), que es un índice para hiperplasia de la matriz mesangial, en un ensayo de inhibición de producción de matriz mesangial (Ejemplo 1); inhibe de forma notable, en un ensayo farmacológico de ratas nefríticas anti-Thy-1 progresivas, la cantidad de proteína excretada en una muestra de orina y una lesión que se produce en los tubos de Malpighi y el estroma (Ejemplo 2); inhibe una reducción en la función renal de ratas modelo de insuficiencia renal (Ejemplo 3); y muestra una excelente seguridad (Ejemplo 4). Por lo tanto, la administración del compuesto evita el desarrollo de una lesión en el mesangio, que conduce a una detención de la aparición o progreso de una enfermedad glomerular. Por lo tanto, el compuesto de fórmula (1) o una sal del mismo es útil como un agente preventivo o terapéutico para una diversidad de enfermedades glomerulares incluyendo nefritis glomerular crónica (por ejemplo, nefropatía de IgA, glomerulonefritis focal, nefropatía membranosa y nefropatía proliferativa membranosa. En particular, el compuesto o una sal del mismo es útil como un agente preventivo o terapéutico para una enfermedad glomerular que implica una lesión que se produce en el mesangio.

35 El compuesto de fórmula (1) usado en la presente invención puede transformarse en una sal farmacológicamente aceptable del mismo a través de un método rutinario. Los ejemplos de una sal tal incluyen sales de metales alcalinos tales como una sal sódica y una sal potásica; sales de metales alcalinotérreos tales como una sal cálcica y una sal magnésica; y sales de amonio. De estas, se prefiere una sal sódica y una sal cálcica.

El compuesto de fórmula (1) o una sal del mismo usado en la presente invención también abarca un hidrato del mismo y un solvato con un disolvente farmacéuticamente aceptable.

45 El compuesto de fórmula (1) incluye estereoisómeros con respecto a su enlace insaturado y a un átomo de carbono asimétrico. El compuesto usado en la presente invención abarca todos los estereoisómeros tales.

50 El compuesto de fórmula (1) o una sal del mismo, que es un compuesto conocido que muestra notablemente una excelente actividad inhibitoria de HMG-CoA reductasa, puede producirse a través de un método conocido por sí mismo o un método similar (véase la Patente Japonesa N° 2.569.746, la memoria descriptiva de la Patente de Estados Unidos 5.856.336 y la memoria descriptiva de la Patente Europea N° 0.304.063).

El compuesto de fórmula (1) o una sal del mismo puede transformarse, de acuerdo con instrucciones para su uso, en una diversidad de preparaciones farmacéuticas. Los ejemplos de las formas farmacéuticas incluyen polvo, gránulos, gránulos finos, jarabe seco, comprimidos, capsulas e inyección.

5 Estas preparaciones farmacéuticas pueden producirse, de acuerdo con la forma de dosificación, a través de un método rutinario mezclando de forma apropiada con, diluyendo con o disolviendo en un aditivo medicinal tal como un excipiente, un disgregante, un aglutinante, un lubricante, un diluyente, un tampón, un agente de tonicidad, un agente antiséptico, un agente humectante, un emulsionante, un dispersante, un estabilizador o un adyuvante de solución y estos aditivos pueden usarse en la fabricación farmacéutica.

10 Específicamente, la formulación en polvo puede prepararse mezclando el compuesto de fórmula (1) o una sal del mismo con un aditivo opcional apropiado tal como un excipiente o un lubricante. La formulación de comprimidos puede prepararse mezclando el compuesto o una sal del mismo con un aditivo opcional apropiado tal como un excipiente, un disgregante, un aglutinante o un lubricante y sedimentando la mezcla formada a través de un método rutinario. Los comprimidos formados de este modo pueden recubrirse de acuerdo con las necesidades, produciendo de este modo comprimidos recubiertos de película, comprimidos recubiertos de azúcar, etc.

15 La formulación de inyección puede estar en forma de una formulación líquida (solución aséptica o solución acuosa), una emulsión o una suspensión y se prepara en combinación con un vehículo no acuoso, un diluyente, un disolvente o un vehículo; por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva y un éster de ácido orgánico inyectable tal como un etiloleato. La composición anterior puede mezclarse de forma apropiada con adyuvantes tales como un agente antiséptico, un agente humectante, una emulsionante o un dispersante.

20 La dosis del agente preventivo o terapéutico de la presente invención para una enfermedad glomerular se determina de forma apropiada de acuerdo con el peso corporal del paciente, su edad, sexo, progreso de la enfermedad u otros factores en relación con el paciente. En el caso de administración peroral, el agente puede administrarse en una dosis diaria por adulto de 0,01 a 100 mg como se reduce al compuesto de fórmula (1) o una sal del mismo y puede administrarse de forma sencilla o de una manera dividida.

30 Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación en más detalle mediante ejemplos.

35 Ejemplo de producción

Producción de monocalcio (+) -bis[(3R,5S,6E)-7-[2-ciclopropil-4-(4-fluorofenil)-3-quinolil]-3,5-dihidroxi-6-heptenoato] (compuesto A)

40 Se sintetizó metil [2-ciclopropil-4-(4-fluorofenil)-3-quinolil]carboxilato a partir de 2-amino-4'-fluorobenzofenona de acuerdo con un método descrito en J. Org. Chem., 2899 (1966). El compuesto A anteriormente mencionado se sintetizó a partir del metil éster siguiendo las descripciones de la Patente Japonesa N° 2.569.746, Patente de Estados Unidos 5.856.336 o los ejemplos 1 a 3 descritos en la memoria descriptiva de la Patente Europea N° 0.304.063.

45 Ejemplo 1 Efecto de inhibir la producción de matriz mesangial (1) Cultivo y almacenamiento de células mesangiales humanas

50 Se cultivaron células mesangiales humanas (células mesangiales humanas normales, CryoNHMC, producto de Sanko Junyaku Co., Ltd.) en medio MsGM (15 ml/matraz) mediante el uso de dos matraces de 75 cm² (430720, CORNING). El medio se reemplazó con medio fresco cada 2 a 3 días. Posteriormente, el cultivo se cambió de escala a un nivel de matraz de 225 cm² (3000, COSTER) y tres frascos de pase 5 y 27 viales de pase 6 se prepararon a un conteo celular de 5 x 10⁶ células/1 ml de Cell Banker/frasco (430659, CORNING). Las muestras celulares cultivadas de este modo se almacenaron en un recipiente enfriado por nitrógeno líquido.

55 (2) Determinación de actividad inhibidora de producción de matriz mesangial

Se revivieron las células mesangiales humanas criopreservadas del pase 6 y se sembraron en un medio colocado en un matraz de 75 cm². El medio se reemplazó al día siguiente y se continuó la incubación durante tres días más. Las células cultivadas de este modo se trataron con tripsina 0,25%, EDTA 0,02%. Mediante el uso de una placa de 96 pocillos, se añadieron soluciones de compuesto A (1, 3, 10, 30 μmol/l) a las células humanas mesangiales (5760 células/0,1 ml/pocillo). Inmediatamente después de la adición de compuesto A, se añadió además TGF-β₁ (10 ng/ml), seguido de cultivo durante 72 horas. Se emplearon cuatro pocillos con respecto a cada concentración de compuesto A. Después de la compleción del cultivo, se determinó el nivel de PIP de cada líquido de cultivo a través de ELISA mediante uso de un kit de determinación de PIP (producto de TAKARA). El porcentaje de inhibición (%) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación y la actividad inhibidora de producción de PIP (valor de CI₅₀) se derivó del porcentaje de inhibición. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Porcentaje de inhibición (%) = $100 \times \frac{[(\text{cantidad de PIP con estimulación de TGF-}\beta_1) - (\text{cantidad de PIP con estimulación de TGF-}\beta_1 \text{ después de adición del compuesto A})]}{[(\text{cantidad de PIP con estimulación de TGF-}\beta_1) - (\text{cantidad de PIP sin estimulación de TGF-}\beta_1)]}$

5

Tabla 1

	actividad inhibidora de producción de PIP (CI ₅₀ ; μM)
compuesto A	22,4

Como resulta evidente a partir de la Tabla 1, el compuesto A inhibe, a una concentración baja la producción de PIP que está causada por estimulación con TGF-β₁.

10 Ejemplo 2: Ensayo farmacológico usando una rata nefrítica anti-Thy-1 progresiva

(1) Se sometió a cuarentena a ratas hembra Wistar (5 semanas de edad, obtenidas de Japan SLC Co., Ltd.) y se aclimataron durante cuatro días y se usaron para el ensayo. Primero, se retiró el riñón derecho de cada rata a través de una incisión en el flanco en anestesia con pentobarbital. Dos semanas después de la retirada del riñón derecho, se administró por vía intravenosa un anticuerpo anti-Thy-1 (anticuerpo anti células mesangiales/anticuerpo monoclonal 1-22-3 obtenido de Panafarm Laboratories Co., Ltd.) (500 μg/rata) en la vena de la cola, por lo que se indujo nefritis anti-Thy-1 progresiva. Inmediatamente después, el compuesto A que se había suspendido en una solución de carboximetil celulosa sódica acuosa 0,5% se administró por vía peroral mediante una sonda peroral a cada rata de una manera forzada y continua (20 mg/kg de peso corporal, una vez/día, 10 semanas). Después de la compleción de la administración de 10 semanas del compuesto A, se tomó orina de cada rata durante 18 horas en una jaula metabólica (Sugiyama Gen Co., Ltd.) y se determinó la cantidad total de proteína excretada en la orina.

Como resulta evidente a partir de la Figura 1, la cantidad de proteína excretada a la orina se reduce significativamente a través de la administración de compuesto A.

(2) Después de la compleción del análisis de orina, se extirpó el riñón izquierdo de cada rata, se fijó en formalina y se incluyó con parafina. Se tiñó un corte fino obtenido del riñón tratado de esta manera con hematoxilina y eosina (HE) y se observó en un microscopio estereoscópico. Se realizó una investigación patológica-histológica del corte fino de acuerdo con un método descrito por Raji *et al* (Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats, *Kidney int.* 26:137-143, 1984). Específicamente, se observó el área completa (sección coronaria) de la corteza renal a una ampliación baja (objetivo, X10), y se calculó la relación de área de lesión teñida con HE con el área total. La relación se evaluó basándose en la siguiente clasificación.

Puntuación 0: normal a casi normal
 Puntuación 1: área de lesión de <10%
 Puntuación 2: área de lesión de 10% a 30%
 Puntuación 3: área de lesión de 30% a 50%
 Puntuación 4: área de lesión de >50%

La Figura 2 muestra los resultados. Como resulta evidente a partir de la Figura 2, las lesiones que se producen en los tubos de Malpighi y el estroma (es decir, contracción o expansión de los tubos de malpighi y fibrosis del estroma alrededor de los tubos de malpighi) se inhiben significativamente a través de la administración de compuesto A.

45 Ejemplo 3 Efecto de la presente invención en ratas modelo con insuficiencia renal (5/6 nefrectomizadas)

Se anestesió a ratas macho Wistar (10 semanas de edad, 300 a 350 g, obtenidas de Japan SLC Co., Ltd.) con pentobarbital y se extirpó el riñón derecho de cada rata. Posteriormente, se expuso el riñón izquierdo. En un microscopio estereoscópico, se ligaron dos de las ramas de la arteria renal izquierda (generalmente, una arteria renal está separada en tres ramas) y se dejó intacta una rama central, para proporcionar de este modo una rata nefrectomizada 5/6. Cuando se liga una rama de la arteria renal, una parte controlada por la rama sufre isquemia y dicha parte renal isquémica puede detectarse visualmente. Los modelos de insuficiencia renal producidos de este modo se evaluaron con respecto a aumento en el nivel de nitrógeno de urea en sangre (BUN) un día después de la ligación. Las ratas que mostraban un BUN (un día después de la ligación) que quedaba dentro de un intervalo de aproximadamente 40 a 80 mg/dl se seleccionaron como los modelos de insuficiencia renal.

Las ratas se dividieron en tres grupos de modo que el nivel de BUN (un día después de la ligación) de los grupos se igualó y el compuesto A se administró a cada rata de los grupos. Los grupos consistían en un grupo de ratas normales (N = 5); un grupo nefrectomizado 5/6 y sin tratamiento con fármaco (control: N = 8); y un grupo nefrectomizado 5/6 y administrado con compuesto A (15 mg/kg; N = 8). Se administró compuesto A que se había suspendido en una solución de carboximetil celulosa sódica 0,5% acuosa por vía peroral una vez al día a cada rata de una manera forzada. Se determinaron la relación de (proteína total)/queratinita (Up/Ucr) en una muestra de orina y el nivel de BUN los días 7, 14, 21, 28 y 35 después de la ligación. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4.

Como resulta evidente a partir de la Figura 3, se ha confirmado una reducción de UP/Ucr en el grupo administrado con compuesto A en una etapa comparativamente temprana después de la administración. La UP/Ucr se reduce significativamente en las semanas 7 y 8 después de la administración en comparación con el grupo no tratado con fármaco.

5 Como resulta evidente a partir de la Figura 4, en el grupo administrado con Compuesto A, el nivel de BUN se reduce desde la semana 3 después de la administración y se ha confirmado reducción significativa después de la semana 4.

10 En este modelo, lesiones irreversibles tales como esclerosis glomerular emergen después de la semana 4. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente el compuesto A inhibe un aumento en el nivel de BUN (un índice de reducción en la función renal, es decir, un mediador para las lesiones irreversibles). Este hallazgo indica que el compuesto A proporcionaría efectos beneficiosos a pacientes que padecen enfermedad renal. Por lo tanto, el compuesto A es útil como un fármaco para detener el progreso de una enfermedad glomerular.

15 **Ejemplo 4: Ensayo de toxicidad aguda**

Slc: Se sometió a ratas Wistar (5 ratas macho y 5 ratas hembra, 6 semanas de edad, obtenidas de Japan SLC Co., Ltd.) a ayunas durante una noche. Después del ayuno, se administró compuesto A que se había suspendido en una solución de carboximetil celulosa sódica 0,5% acuosa por vía peroral de una manera forzada a cada rata macho (500 mg/kg) y cada rata hembra (250 mg/kg). Durante el periodo de observación de 14 días, no se produjo ningún caso de muerte.

20 **Ejemplo 5: Formulación de preparación farmacológica**

25 Se produjeron comprimidos que tenían la siguiente composición por comprimido a través del procedimiento descrito posteriormente.

Tabla 2

Compuesto A	1,0 mg
Lactosa	101,4 mg
Hidroxipropil celulosa poco sustituida	12,0 mg
Hidroxipropil metil celulosa 2910	2,0 mg
Aluminato de metasilicato magnésico	2,4 mg
Estearato de magnesio	1,2 mg
Total	120,0 mg

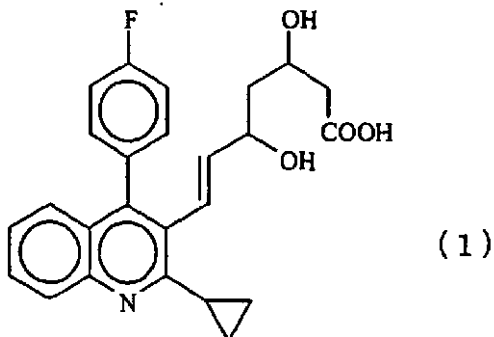
30 Los ingredientes del compuesto A se mezclaron a través de aluminato de metasilicato magnésico, para preparar de este modo una mezcla de polvo uniforme y se añadió una cantidad apropiada de agua purificada a la mezcla. La mezcla formada se granuló a través de granulación por agitación y se sedimentó. Se añadió estearato de magnesio a los gránulos sedimentados y la mezcla se volvió a sedimentar, para producir de este modo comprimidos que contenían compuesto A.

35 **Aplicabilidad Industrial**

40 El agente preventivo o terapéutico de la presente invención para enfermedades glomerulares es útil para prevenir o tratar una diversidad de enfermedades glomerulares incluyendo nefritis glomerular crónica (por ejemplo, nefropatía de IgA, glomerulonefritis focal, nefropatía membranosa y nefropatía proliferativa membranosa).

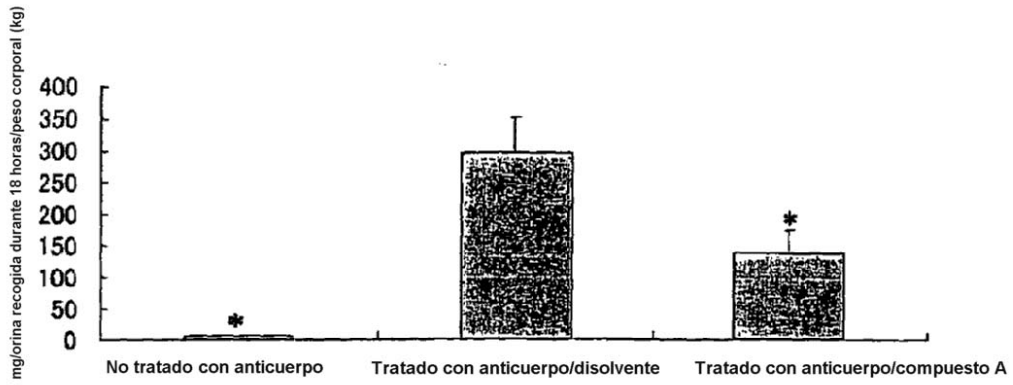
REIVINDICACIONES

1. Un agente preventivo o terapéutico para su uso en la prevención o tratamiento de nefritis glomerular primaria, que comprende como un principio activo un compuesto representado por fórmula (1):



- 5 o una sal del mismo.
2. El agente preventivo o terapéutico para su uso en la prevención o tratamiento de nefritis glomerular primaria de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la nefritis glomerular primaria se selecciona de entre nefropatía de IgA, glomerulonefritis focal, nefropatía membranosa, nefropatía proliferativa membranosa y nefritis glomerular crónica.
- 10 3. Uso de un compuesto o una sal del mismo como se indica en la reivindicación 1 para producir un agente preventivo o terapéutico para la prevención o tratamiento de nefritis glomerular primaria.

Fig. 1



Los valores representan el valor medio \pm el error típico
 *: $p < 0,05$ (frente a tratado con anticuerpo/disolvente)

Fig. 2



Los valores representan el valor medio \pm el error típico
 **: $p < 0,01$ (frente a tratado con anticuerpo/disolvente)

Fig. 3

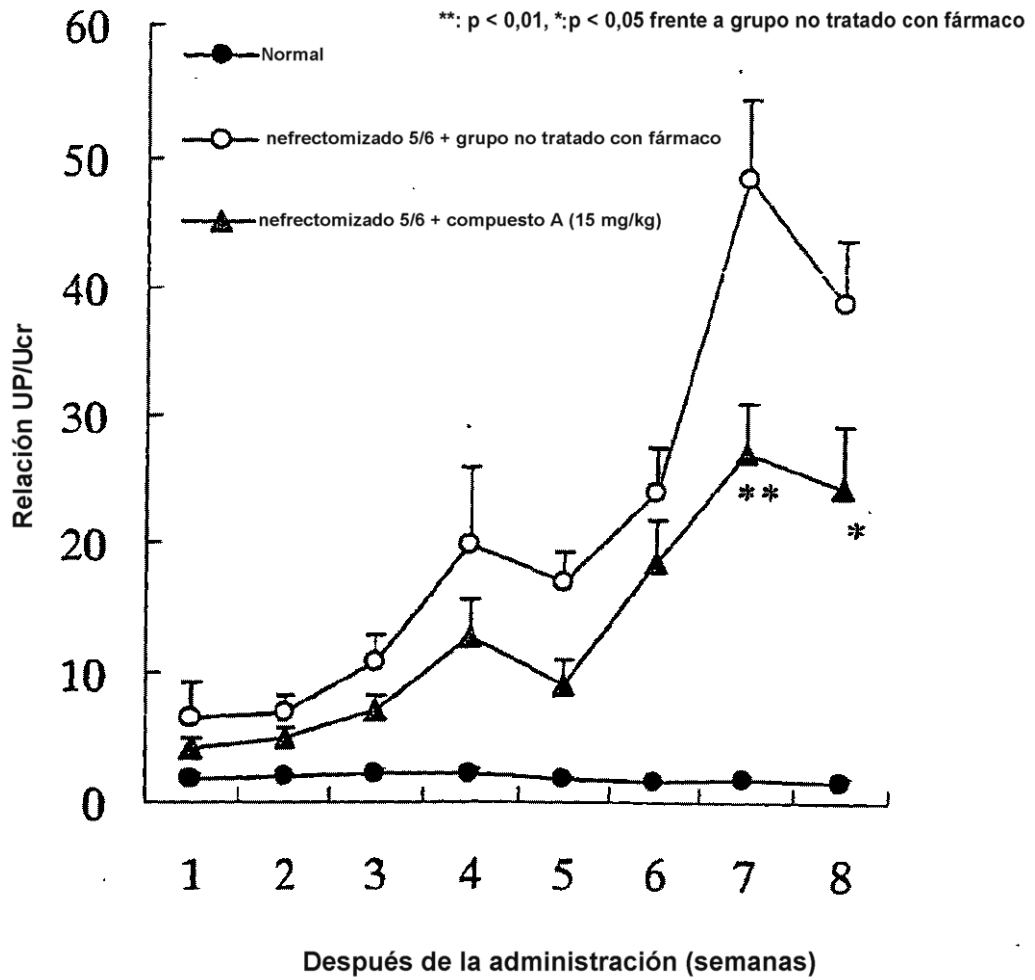


Fig. 4

