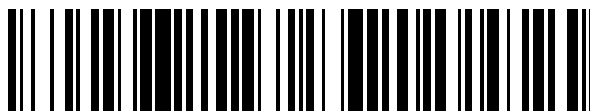


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 692**

51 Int. Cl.:
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01)
A61K 31/36 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 1/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08856548 .6**
96 Fecha de presentación: **06.11.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2214659**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2010**

54 Título: **UTILIZACIÓN DE DERIVADOS DEL ÁCIDO 4-OXOBUTANOICO EN EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS ASOCIADAS CON TRASTORNOS INMUNOLÓGICOS.**

30 Prioridad:
03.12.2007 EP 07291449

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2011

73 Titular/es:
**MERCK PATENT GMBH
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:
**AUTIER, Valérie;
FABREGUE, Roland y
MIOSSEC, Patrick**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 368 692 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

Utilización de derivados del ácido 4-oxobutanoico en el tratamiento de patologías asociadas con trastornos inmunológicos.

5 La presente invención hace referencia a la utilización de un derivado del ácido 4-oxobutanoico según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de patologías asociadas con trastornos inmunológicos según la reivindicación 1.

10 La autoinmunidad es un fenómeno natural que corresponde a una tolerancia del sistema inmune. La ruptura de mecanismos de tolerancia lleva a la acción destructiva del sistema inmune en los componentes naturales del cuerpo, tras la proliferación de linfocitos B o T autorreactivos de alta afinidad, lo cual lleva a una gran variedad de patologías conocidas en su conjunto como enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes se distinguen como aquellas que son específicas a un órgano, tales como diabetes tipo 1, tiroiditis autoinmune, hepatopatías autoinmunes, miastenia, enfermedades ampollas autoinmunes, uveitis autoinmune, retinopatía autoinmune y citopenia autoinmune; o enfermedades autoinmunes sistémicas o no específicas a un órgano, tales como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Gougerot-Sjögren, artritis reumatoide, escleroderma, polimiositis y dermatopolimiositis, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, angeitis aislada y policondritis atrópica. Algunos cánceres también se originan a partir de un trastorno de tipo inmunológico (Muller et al., Current Cancer Drug Targets (2007), 7(1), 31-40; Baniyash, Michal Seminars in Cancer Biology (2006), 16(1), 80-88). Estas enfermedades tienden a aparecer dentro de la misma familia, lo cual indica que las enfermedades autoinmunes dependen, además de factores ambientales, de factores inmunológicos.

20 El tratamiento de las enfermedades autoinmunes a menudo incluye una estrategia de inmunosupresión no específica que usualmente combina la corticoterapia y antimetabólicos. Estos tratamientos tienen efectos secundarios, que restringen su aplicación a enfermedades autoinmunes "graves". Estas estrategias terapéuticas están dirigidas a actuar de manera selectiva sobre linfocitos sobreactivados o sobre clones autorreactivos.

25 Durante la diferenciación celular y expansión de clones inducida por el antígeno, los linfocitos T secretan diversas linfocinas, especialmente interleucina 2 (IL2), que son necesarias para la amplificación de la respuesta inmune y la proliferación de las células efectoras. Los tratamientos inmunosupresores inhiben esta reacción y cada agente utiliza una acción prevalente en uno de los pasos de la respuesta inmune.

Diversas clases de agentes se utilizan actualmente de manera clínica:

- análogos de la purina (Azatioprina (Imurel) y mercaptopurina) y bases de pirimidina
- 30 • ciclosporina (Sandimmun, neoral)
- tacrolimus y rapamicina
- análogos del ácido fólico (metotrexato)
- glucocorticoides
- anticuerpos monoclonales

35 El arsenal terapéutico utilizado actualmente presenta problemas para los pacientes, que derivan de la naturaleza de los efectos secundarios observados, tales como nefrotoxicidad (deficiencia renal) y neurotoxicidad (temblores, dolores de cabeza, ansiedad, insomnio) para el tacrolimus, y hepatotoxicidad e hiperuricemia para la ciclosporina.

40 El establecimiento de nuevas terapias de inmunosupresión está justificado en todas las patologías que incluyen la activación inapropiada del sistema inmune, tales como las enfermedades autoinmunes (diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, anemia hemolítica, enfermedad de Crohn, algunas dolencias reumáticas) y en trasplantes para mantener la supervivencia del trasplante en los trasplantados y/o para prevenir la reacción de trasplante contra huésped.

45 El triptófano es un aminoácido esencial que el cuerpo obtiene a través de las proteínas ingeridas. El triptófano derivado de los alimentos primero llega al hígado a través del sistema hepatoportal, donde parte del mismo es utilizado para la síntesis de proteínas. La parte no utilizada se distribuye en los otros órganos por el flujo sanguíneo o se metaboliza en la vía de la quinurenina, principalmente en el hígado (revisión en Moffett and Nambodiri, 2003). El triptófano también es la única fuente de aminoácidos para diversas moléculas muy importantes, tales como la serotonina y melatonina. Además, si el suministro de niacina proveniente de los alimentos es inadecuado para la

- 5 síntesis de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD, por sus siglas en inglés), el metabolismo del triptófano se vuelve una fuente alternativa de este cofactor esencial. Recientemente se ha demostrado que el metabolismo del triptófano está muy implicado en reacciones inflamatorias y trastornos inmunológicos ligados a muchas enfermedades. Más particularmente, se ha descrito el rol de los metabolitos del triptófano que se originan de la vía de la quinurenina. Se han descrito las principales enzimas y sustratos para el metabolismo del triptófano en la vía de la quinurenina. El hígado es el único órgano que se conoce que posee todas las enzimas que permiten el metabolismo en los diversos segmentos en esta vía.
- 10 Más recientemente, se ha demostrado que las altas concentraciones de triptófano podrían llevar a una acumulación de leucocitos, lo cual refleja su probable implicación en el sistema inmune (Gross et al., 1999). El interferón gamma es una citocina proinflamatoria liberada por linfocitos T activados u otros leucocitos, que lleva a la producción de radicales libres por parte de macrófagos y neutrófilos (Tennenberg et al., 1993). Durante una respuesta inmune, el interferón gamma induce el catabolismo del triptófano de una manera potente y sostenida (Grant et al., 2000). Entre los metabolitos claves que se originan de este catabolismo se encuentran la quinurenina, 3-hidroxi-antranilato y quinolinato, cuyo rol como inmunomoduladores ha sido descrito (Moffett et al. 1993, 1994).
- 15 La utilización de los metabolitos del triptófano, tales como la quinurenina, para el tratamiento de cualquier enfermedad que requiera un tratamiento inmunosupresor se describe en la patente EP 1369114 A.
- 20 Los derivados del ácido 4-oxobutanoico ya han sido descritos en la solicitud de patente WO 98/07 681 como agentes antidiabéticos, y más específicamente para el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina. También han sido descritos como inhibidores de una enzima en el metabolismo del triptófano, la quinurenina 3-hidrolasa (WO 2004/060 368 y WO 2004/060 369).
- Esta familia química de la fórmula general (I) también se conoce para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación (WO 2003/047 561).
- La presente solicitud de patente hace referencia a la utilización de un compuesto seleccionado de
- ácido (-) 2-bencil-4-(4-fluorofenil)-4-oxobutanoico,
 - 25 - ácido (+) 2-bencil-4-(4-fluorofenil)-4-oxobutanoico,
 - solvatos y sales de estos ácidos
- para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología asociada con trastornos inmunológicos, seleccionados entre la enfermedad de Crohn, soriasis, lupus eritematoso, anemia hemolítica.
- 30 La presente invención también hace referencia a las formas tautoméricas de los compuestos, enantiómeros, diastereoisómeros y epímeros de estos compuestos, y también sus solvatos.
- Los ejemplos de sales de los compuestos incluyen sales farmacológicamente aceptables, tales como sales de sodio, sales de potasio, sales de magnesio, sales de calcio, sales de amino y otras sales del mismo tipo (aluminio, hierro, bismuto).
- Los compuestos se sometieron a pruebas biológicas para demostrar su actividad inmunosupresora.
- 35 Los compuestos de la invención pueden formularse juntos con cualquier excipiente apropiado, en cualquier forma apropiada para la administración enteral (más específicamente oral) o parenteral, por ejemplo, en forma de tabletas, cápsulas de gel, polvos, grageas, o soluciones bebibles o inyectables. Estas formas y excipientes adecuados son como se definen en la solicitud de patente WO98/7681 presentada por los solicitantes.
- 40 Los compuestos pueden administrarse a adultos en dosis diarias de entre 0,001mg y 400mg en forma oral o entre 0,001 y 100mg en forma parenteral.
- Parte experimental:
- La actividad inmunosupresora se evaluó mediante el estudio de la inmunidad humoral en ratas a través de la cuantificación de placas hemolíticas directas (células formadoras de placas, PFC, por sus siglas en inglés) después de la inmunización con eritrocitos de oveja.
- 45 Esta técnica consiste en la estimulación del sistema inmune con un agente antigénico, los eritrocitos de oveja, y en la evaluación del efecto de una sustancia en la respuesta inmune. Esta respuesta inmune se evalúa midiendo la

proporción de esplenocitos que producen anticuerpos anti-eritrocitos de oveja en la presencia de un complemento (Jerne N.K., 1974).

5 El efecto de los compuestos, en suspensión en hidrogel de metilcelulosa (Sigma ref: M0512), en el sistema inmune se evaluó en ratas Wistar macho después de la administración oral durante 5 y 7 días (5 días antes de la sensibilización y 2 días después). El volumen de administración fue de 10ml/kg.

10 Se utilizaron 10 ratas en cada grupo, en donde cada grupo corresponde a una dosis de un compuesto, más un grupo de control (normal) y un grupo de control positivo (sustancia de referencia). La sustancia de referencia utilizada fue ciclofosfamida (monohidrato) de Sigma (ref: C0768) a una dosis de 20mg/kg administrada de manera subcutánea a una tasa de 1ml/kg, administrada sólo el día quinto. Durante los cuatro días previos, los animales se trataron con el vehículo de compuesto (metilcelulosa).

El quinto día, una hora después del tratamiento, los animales se sensibilizaron con eritrocitos de oveja administrados por vía intravenosa (vena caudal) a una tasa de 0,5ml por animal. Los eritrocitos de oveja se suspendieron a una concentración de 2×10^9 células/ml en una solución de cloruro de sodio (isotónica).

15 El noveno día, es decir 4 días después de la sensibilización, se extirpó el bazo después de la eutanasia mediante exanguinación (sección de la aorta abdominal) de los animales, que fueron previamente anestesiados con pentobarbital (Sanofi, 60 mg/kg).

Se dividió la mitad del bazo (molido), produciendo, después de la separación, una suspensión de esplenocitos en tampón de PBS (Dulbecco Gibco Ref: 3018199) que contenía 10^7 células por mililitro.

20 La reacción de placa hemolítica (PFC) se indujo mediante la adición de 50 microlitros de la suspensión de esplenocitos obtenida para cada animal en 200 mililitros de una suspensión de PBS que comprendía eritrocitos de oveja y complementarios.

La mezcla, colocada entre el portaobjetos (soporte) y el cubreobjetos creando de este modo una cámara de evaluación (40 μ l) delimitada por parafina, se incubó durante una hora a 37°C.

25 Al final de la incubación, los portaobjetos se colocaron inmediatamente a 4°C. La evaluación se realizó lo antes posible. La cantidad de placas hemolíticas (PFC) se determinó mediante un método estandarizado de evaluación de portaobjetos utilizando un microscopio óptico. Una placa hemolítica (PFC) es una placa donde sólo puede observarse un esplenocito atrapado. El número de placas hemolíticas (PFC) se calculó para 10^6 células del bazo.

Los resultados experimentales con la molécula A se presentan en la Tabla I. Molécula A: ácido (-) 4-(4-fluorofenil)-4-oxo-2-fenilmetilbutanoico

30 Tabla I

1 ^{er} experimento ^a	% de inhibición
Ciclofosfamida (20mg/kg)	85**
A (30mg/kg)	3
A (100mg/kg)	19**
A (300mg/kg)	29**
2 ^{do} experimento ^b	% de inhibición
Ciclofosfamida (20mg/kg)	54**
A (0,01mg/kg)	0
A (0,1mg/kg)	43*
A (1mg/kg)	42**

Tabla I (continuación)

P<0,05; * P<0,01 ^a tratamiento durante 5 días antes de la sensibilización ^b tratamiento durante 7 días (5 días antes de la sensibilización y 2 días después)
--

5 Bajo estas condiciones experimentales utilizando el método de placa hemolítica (PFC - células formadoras de placas), el Ejemplo A induce un descenso en la respuesta inmune humoral, que es un descenso estadísticamente significativo en la cantidad de placas hemolíticas (PFC) de y superior a 0,1 mg/kg. Estos resultados también muestran que el compuesto A tiene un efecto más potente después de la fase de sensibilización.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un compuesto seleccionado de

- ácido (-) 2-bencil-4-(4-fluorofenil)-4-oxobutanoico,

- ácido (+) 2-bencil-4-(4-fluorofenil)-4-oxobutanoico,

5 - solvatos y sales de estos ácidos

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología asociada con trastornos inmunológicos, seleccionados entre la enfermedad de Crohn, soriasis, lupus eritematoso, anemia hemolítica.