

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 553**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/401** (2006.01)  
**A61K 31/4025** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04736527 .5**  
96 Fecha de presentación: **10.06.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1633345**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **COMPUESTOS QUE INHIBEN LA UNIÓN DE SAP PARA TRATAR LA OSTEOARTRITIS.**

30 Prioridad:  
**10.06.2003 GB 0313386**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.02.2012**

73 Titular/es:  
**Pentraxin Therapeutics Limited**  
**The Network Building 97 Tottenham Court Road**  
**London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:  
**PEPYS, Mark, B. y**  
**HAWKINS, Philip, Nigel**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 373 553 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

Compuestos que inhiben la unión de SAP para tratar la osteoartritis

La presente invención se refiere al tratamiento y prevención de la osteoartritis.

**Campo de la invención**

5 La osteoartritis es la forma más común de artritis y se detecta radiológicamente en 80 % de los individuos con edad por encima de 55 en las poblaciones de Occidente. La osteoartritis sintomática de la rodilla, que es dolor con anomalías radiográficas, se encuentra presente en aproximadamente 6 % de los individuos con edad por encima de 30 tanto en EE.UU. como en Reino Unido. En EE.UU, aproximadamente 21 millones de personas presentan osteoartritis diagnosticada por el médico, presentado la mayoría de los casos dolor y discapacidad. De hecho, en alrededor de 12 % de los sujetos con limitación de actividad, la causa es osteoartritis y supone una mayor dependencia para andar y subir escaleras que en el caso de otras enfermedades. El coste anual estimado de la osteoartritis en EE.UU. fue de 15,5 millones de dólares en 1994, que se aproxima a 1 % del PIB, debiéndose más que 50 % de los costes a pérdidas de tipo laboral. El problema se hace inevitablemente más grave a medida que la población envejece y con una incidencia de la osteoartritis claramente relacionada con la edad (1).

15 La patología de la osteoartritis comprende la pérdida de cartílago articular y procesos complejos de reparación con fibrocartilago y formación ósea reactiva, conduciendo a la alteración de la articulación normal y de las arquitectura peri-articular. Esto se asocia a dolor, derrames sinoviales y disfunción.

Los tratamientos tradicionales son: adelgazamiento, ejercicio y ayuda físico-social; analgésicos simples; fármacos anti-inflamatorios no esteroideos; corticoesteroides intra-articulares; ácido hialurónico; lavado de la articulación; asistencia físicas y dispositivos. No obstante, estos enfoques conservadores resultan inadecuados en una parte importante de pacientes para los cuales la cirugía se convierte en apropiada, incluyendo sinovectomía, reparación de desgarros meniscales, osteotomía de reposición y recolocación articular considerablemente total. Únicamente la última es una solución para la osteoartritis, y obviamente no resulta aplicable en algunas articulaciones y en algunos individuos.

25 Otros enfoques terapéuticos experimentales y menos validados incluyen la administración glucosamina y sulfato de condroitina, para favorecer de manera ostensible la supervivencia o incluso para reparar el cartílago dañado y tetraciclina, antagonistas de interleucina-1 e inhibidores de colagenasa y otras proteína de matriz. Kelly describe el papel de sulfato de glucosamina y sulfato de condroitina en el tratamiento de una enfermedad degenerativa de las articulaciones en *Alternative Medicine Review*, Vol 3(1), Febrero de 1998, páginas 27-29. Se discute el efecto de la heparina de bajo peso molecular y de heparina de pesos moleculares diferentes sobre la actividad de agreganasa en *Blood*, 100(11), resumen nº. 3849 (2002). Askarov y Samtsov informan sobre el tratamiento de Osteoartritis Deformans con heparina en *Kazanskii Meditsinskii Zhurnal*, 67, 190-192 (1986). Natchus et al describen el desarrollo de inhibidores de metaloproteínasa de matriz de hidroxamato procedentes de 4-aminoprolinas funcionalizadas.

35 De este modo, existe una evidente y gran necesidad de nuevos medicamentos que puedan modificar el avance de las osteoartritis, y, de manera importante, alivien los síntomas de dificultad e incapacidad del dolor, deformaciones en la articulación y derrames, limitación de actividad y discapacidad.

40 El componente P amiloide del suero (SAP) es un miembro de la familia (2) de pentraxina conservada y evolucionadamente antigua de las proteínas de plasma, cuyos otros miembros son proteína C-reactiva (CRP), la clásica proteína de fase aguda (3). Las proteína homólogas que comparten el mismo pliegue 3D (4, 5), ensamblaje oligomérico y capacidad para unir ligandos dependientes de calcio, se encuentran presentes en todos los vertebrados (6) e incluso en el cangrejo cacerola, *Limulus polyphemus* (7), que se encuentra separado en cuanto a evolución de los primates aproximadamente 600 millones de años. No se ha descrito todavía deficiencia o polimorfismo de proteína de SAP en humanos, y su componente de carbohidrato es la glucoproteína (8) mas invariante de cualquiera de las conocidas. Esto supone una evidencia convincente de que SAP presenta funciones beneficiosas que contribuyen a la supervivencia.

45 No obstante, el nombre de SAP procede del hecho de que se encuentra presente de forma universal en los depósitos de tejidos patológicos de amiloide en el estado de enfermedad de amiloidosis (9). El conjuntos de estos depósitos consiste en fibrillas amiloides formadas por proteína autóloga desdoblada y suplementada con pliegue de cruce- $\beta$  (10) patonómico, junto con glucosaminoglucanos unidos fuertemente de los tipos de sulfato de heparano y sulfato de dermatano (11).SAP experimenta unión específica dependiente de calcio con estas fibrillas, tanto *in vivo* (12) como *in vitro* (13, 14), y se ha aprovechado esta propiedad para desarrollar SAP con radiomarcaje como marcador gammagráfico, altamente específico, sensible y cuantitativo usado para el diagnóstico y control de los depósitos de amiloidosis (15) sistémica y extra-cerebral local.

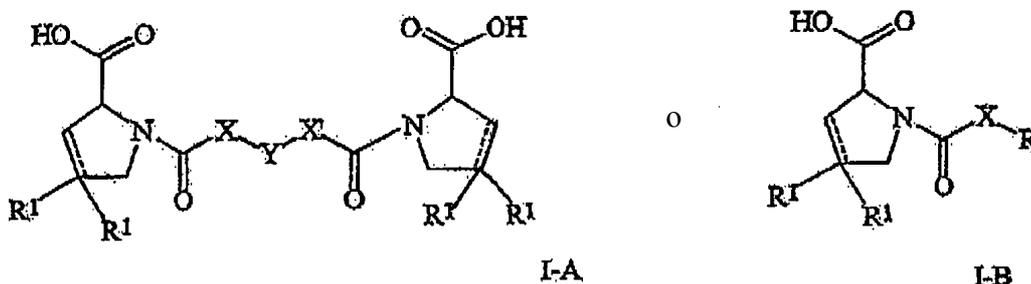
55 Una de las formas de amiloidosis extra-cerebral local que es la que presenta mayor importancia clínica es la amiloidosis asociada a diálisis, una complicación muy grave, dolorosa y que conduce a parálisis de la diálisis a largo plazo para lesiones renales en etapa terminal. Este tipo de amiloide se confina en gran medida en las articulaciones y estructuras peri-articulares, produciendo compresión de los nervios y quistes óseos que dan lugar a la alteración

de la articulación y a fracturas patológicas. Se han estudiado en gran medida la amiloidosis de diálisis usando SAP radiomarcado, mostrando que la captación al interior y alrededores de las articulaciones es específica para depósitos amiloides histológicamente comprobados en estas localizaciones (16, 17).

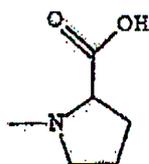
5 Se han desarrollado fármacos que son fijados por SAP con el fin de tratar la amiloidosis, incluyendo la enfermedad de Alzheimer. El documento WO 95/05394 describe agentes terapéuticos y diagnósticos para la amiloidosis que comprenden moléculas que inhiben la unión de SAP a las fibrillas amiloides. El documento EP-A-0915088 describe D-prolinas y sus derivados para su uso en el tratamiento o prevención de amiloidosis central y sistémica que incluyen la enfermedad de Alzheimer, y Diabetes mellitus de aparición con la madurez. El documento WO 03/013508 describe agentes terapéuticos para la disminución de poblaciones de proteínas no deseadas en el plasma en el que los agentes bifuncionales formar un complejo con una pluralidad de proteínas para provocar su disminución en el plasma de la persona. Se describe que ácido R-1-[6-R-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidin-2-carboxílico se dirige de manera específica a SAP *in vivo* para provocar la agregación de moléculas de SAP pentaméricas nativas en complejos SAP-fármaco que posteriormente son eliminados de forma rápida por el hígado. Esto también es documentado por Pepys et al en Nature, 417, 254-259 (2002).

15 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere al uso de D-prolina de fórmula:



en la que R



20 y el grupo

R<sup>1</sup> es hidrógeno o halógeno;

X-Y-X' es un enlazador que tiene al menos 4, de manera ventajosa al menos 5, de manera ventajosa al menos 6, hasta 20 átomos de carbono de cadena lineal o sencilla, en la que

25 X es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; -CH(R<sup>2</sup>)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; CH<sub>2</sub>NH-; bencilo; -C(R<sup>2</sup>)=CH-; -CH<sub>2</sub>-CH(OH)- o tiazol-2,5-diilo;

30 Y es -S-S-; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; -O-; -NH-; -N(R<sup>2</sup>)-; -CH=CH-; -NHC(O)NH-; -N(R<sup>2</sup>)C(O)N(R<sup>2</sup>)-; -N[CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-; -N(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)-; N(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)C(O)N(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)-; -N(alcoxilalquilo)-; N(cicloalquil-metilo)-; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno ó 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno, en el que los grupos fenileno se encuentran sustituidos de manera opcional por 1-4 sustituyentes, escogidos entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi, -COO-alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazol (ácido 2-carboxílico pirrolidin-1-il)-2-oxo-etoxi, N-hidroxycarbamimidilo, 5-oxo[1,2-oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxotiadiazolilo, 5-tioxo[1,2,4]oxadiazolilo y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxadiazolilo;

35 X' es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH(R<sup>2</sup>)-; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>2</sub>-; -NHCH<sub>2</sub>-; bencilo; -CH=C(R<sup>2</sup>)-; CH(OH)CH<sub>2</sub>; o tiazol-2,5-diilo;

R<sup>2</sup> es alquilo inferior, alcoxi inferior o bencilo y

n es 0-3.

o una de sus sales aceptables farmacéuticamente o de sus mono-o o diésteres que son capaces de inhibir la unión del ligando SAP o la disminución de SAP en el plasma de una persona, para la preparación de un medicamento para



ésteres más preferidos con ésteres de alquilo procedentes de alcoholes C<sub>1-4</sub>, especialmente ésteres de metilo y etilo.

Estos compuestos también se pueden usar en forma de sus pro-fármacos en una o ambas funciones de carbonilo.

El documento EP-A-0915088 describe detalles de estos compuestos y de sus síntesis.

5 Acido Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil] pirrolidin-2-carboxílico o una de sus sales aceptables farmacéuticamente o uno de sus mono- o diésteres.

### Breve descripción de los dibujos

A continuación se describe la presente invención con más detalle, a modo únicamente de ejemplo, haciendo referencia a los siguiente Ejemplos y a los dibujos adjuntos, en los que:

10 Las Figuras 1 y 3 muestran trazas de experimentos de resonancia de plasmón superficial que evalúan el efecto de 1-[(S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-D-prolina (designada como Ro-3479 en estas figuras) sobre la unión de SAP a fibrillas amiloides en presencia y en ausencia de calcio;

La Figura 4 muestra un imagen de gammagrafía de las manos de un paciente con osteoartritis 24 horas después de la inyección intravenosa de SAP con marcaje de <sup>123</sup>I; y

15 La Figura 5 muestra la proporción de la concentración de varias proteínas en el fluido sinovial y en el suero de pacientes con varias formas de derrames que provocan artritis.

### Descripción detallada de la invención

#### Ejemplos

#### Métodos para mostrar la unión de SAP a los ligandos

20 Con el fin de identificar los compuestos que inhiben la unión de ligando de SAP, en primer lugar es necesario disponer de métodos para mostrar dicha unión.

#### 1) Unión de SAP a ligandos de fase sólida

Para los fines de la invención, se puede demostrar la unión de SAP a ligandos de ensayo directamente permitiendo el contacto de SAP, proporcionado bien por suero de origen humano o animal, o aislado en forma purificada, con el ligando de fase sólida. El contacto tiene lugar en una disolución salina tamponada fisiológicamente que contiene suficientes iones calcio libres (aproximadamente 2 mmol/l), que resulta esenciales para la unión del ligando por medio de SAP. En el caso de SAP humano aislado, el tampón debe contener también 40 g/l de albúmina de suero humano o bovino, con el fin de mantener SAP en la disolución; a concentraciones de albúmina bajas el SAP humano aislado experimenta autoagregación de forma rápida y precipita en presencia de calcio (18, 19). Ligandos apropiados para los que SAP muestra su unión típica dependiente de calcio incluyen agarosa (24), fosfoetanolamina (25), ADN (26), cromatina (27) y fibrillas amiloides (12, 28). Se inmovilizan sobre las partículas, tales como agarosa, acrilamida, poliestireno, látex, celulosa u otras perlas, o sobre membrana, filtros, o plástico u otras superficies sólidas tales como placas de microvaloración o tubos individuales, o pueden ser componentes integrales de partículas sólidas, tales como bacterias o gel de agarosa, que se pueden usar de forma directa. La inmovilización de ligandos solubles, o la inmovilización secundaria de ligandos en forma de partículas con fines de conveniencia puede tener lugar por medio de adherencia directa no específica del ligando, o mediante unión covalente por medio de grupos amino, hidroxilo u otros grupos químicos de las moléculas de ligando que se acoplan de forma directa o por medio de enlazadores de espaciador con el material de la fase sólida. Tras poner en contacto el sólido o los ligandos inmovilizados, se lava el SAP que no se ha unido, haciendo uso de la misma disolución tampón en la que tuvo lugar la unión, y se detecta la presencia de SAP unido a los ligandos y se cuantifica. El lavado implica la separación de fase, tal como la centrifugación de partículas sólidas, o la inmersión, el flujo a través o sobre superficies sólidas tales como membranas, filtros y superficies plásticas. Se puede detectar SAP unido directamente si la fuente de SAP contiene SAP que ha sido marcado con un marcador detectable. Dicho marcadores incluyen isótopos que emiten gamma tales como <sup>125</sup>I o <sup>131</sup>I para la detección en un contador gamma; isótopos que emiten beta tales como <sup>14</sup>C o <sup>3</sup>H para la detección en un contador de centelleo o beta, fluorocromos para la detección en un fluorímetro, citómetro de flujo o en un dispositivo de clasificación celular activado por fluorescencia; enzimas tales como peroxidasa o fosfatasa alcalina para la detección por medio de su actividad catalítica específica. En todos estos casos, resulta esencial demostrar que el proceso de marcar directamente el SAP no altera sus propiedades de unión fisiológicas. Esto se hace comparando la unión de SAP marcado y no marcado con un ligando de fase sólida inmovilizado, tal como fosfoetanolamina unida, usando carbodiimida, a carbohexil-Sepharose<sup>TM</sup>. También se puede demostrar la unión de SAP directamente por medio de ensayo inmunoquímico que muestra la disminución de SAP a partir de la fuente ofertada de SAP, y la recuperación de la SAP unido cuando, después de lavar primero con disolución tampón que contiene calcio, se eluye el material de ligando con disolución tampón que contiene EDTA para provocar la formación de quelatos de iones de calcio. De manera alternativa, el SAP puede ser detectado indirectamente, usando anticuerpos desarrollados en conejos, ovejas, cabras, ratas, ratones, cobayas u otros animales, específicos

para el SAP de las especies objeto de ensayo. Para este fin, los propios anticuerpos anti-SAP se pueden marcar directamente con un isótopo radiactivo, enzima, fluorocromo u otro marcador detectable, o se puede detectar la unión de los anticuerpos anti-SAP con el SAP usando un segundo anticuerpo dirigido contra la inmunoglobulina de las especies del reactivo anti-SAP principal. Además de la detección y el conteo en los instrumentos apropiados para el marcador usado, se puede visualizar la unión de SAP a los micro-organismos o sus otros componentes, de forma directa o indirecta usando microscopía óptica, electrónica o de fluorescencia. Se puede usar SAP marcado con enzima o anticuerpos anti-SAP para microscopía óptica o electrónica, reactivos marcados con fluorocromo para microscopía de fluorescencia y marcaje de oro (u otras partículas de densidad electrónica) para microscopía electrónica.

## 2) Unión de ligandos mediante SAP inmovilizado

Un enfoque alternativa para demostrar la unión del ligando por parte de SAP consiste en inmovilizar el SAP sobre la fase sólida y posteriormente permitir la unión con ligandos que se encuentran marcados directamente o que se pueden detectar, por ejemplo usando anticuerpos específicos dirigidos contra estos ligandos. De este modo, se puede inmovilizar SAP purificado aislado de origen humano o animal sobre perlas, partículas, membranas, filtros, plástico u otras superficies, por medio de la adherencia directa o mediante acoplamiento covalente, o por medio de atrapamiento con anti-cuerpos específicos anti-SAP inmovilizados sobre la fase sólida (29). Por medio del uso de las condiciones especificadas en 1] anteriormente, se pueden poner en contacto ligandos apropiados con el SAP inmovilizado y se puede permitir la unión por parte del mismo.

### Inhibición de la unión de SAP a los ligandos

Se puede usar cualquiera de los métodos explicados anteriormente en 1] y 2] para mostrar la unión del ligando por parte de SAP con el fin de evaluar la capacidad de los compuestos para inhibir dicha unión. No obstante, la velocidad y facilidad de uso de las diferentes técnicas varían en gran medida, así como también aptitud para los diferentes fines. De este modo, para la detección de grandes números de compuestos, los métodos de alto rendimiento, tales como los basados en placas de microvaloración, resultan esenciales. Un método típico de este tipo implica disponer de ligando inmovilizado sobre las placas, y ofrecer a cada pocillo una cantidad de SAP radiomarcado en condiciones tales que aproximadamente 40 % del mismo se encuentre unido. Se añaden los compuestos objeto de ensayo a los pocillos y se someten a pre-incubación en los mismos antes de la adición del SAP radiomarcado y se controla el efecto de su presencia en la unión posterior de SAP. En otra configuración, se pre-incuban los compuestos a ensayar con el SAP marcado antes de añadir la mezcla a las placas. La configuración contraria, en la que se inmoviliza SAP, también resulta informativa. En este momento, se pre-incuban los compuestos de ensayo con SAP inmovilizado antes de añadir el ligando detectable. Estos diferentes enfoques permiten la detección de los compuestos que bloquean la unión de ligando por parte de SAP mediante diferentes mecanismos, y contribuyen a distinguir entre los que son propiamente ligandos específicos para SAP, los que afectan a la molécula de SAP de otro modo y los que interactúan con el ligando para evitar su reconocimiento por parte de SAP.

### Detección directa de la unión del ligando por parte de SAP y su inhibición

La resonancia de plasmón superficial (SPR) es un método informativo muy potente aunque de bajo rendimiento para identificar compuestos que se unen por medio de, o que ellos mismos se unen a SAP, de forma dependiente o independiente del calcio, para los fines de la presente invención. Por ejemplo, los compuestos de bajo peso molecular que inhiben la unión de SAP a sus ligandos macromoleculares, que incluyen ligandos objetivo relevantes para la presente invención, pueden ser detectados por su efecto sobre la señal generada por medio de la unión de SAP en fase fluida al ligando inmovilizado sobre la fase sólida (Ejemplo A). Además, cuando el propio SAP queda inmovilizado sobre la fase sólida en un instrumento de SPR, la interacción con el mismo de moléculas de ensayo proporcionadas en al fase de fluido genera una señal que puedes ser detectada y cuantificada. El SAP purificado inmovilizado en el interior de un instrumento SPR proporciona una señal cuantificable cuando se expone a otra molécula que forma un complejo con el SAP, y esto es distinto de la ausencia de dichas señal en caso de que no se forme complejo. Esta técnica permite la detección de compuestos en cuanto a su capacidad para interactuar con SAP, y no depende de ningún modo específico de interacción con SAP, en particular el que implica el sitio de unión de ligando dependiente de calcio de SAP, de manera que detecta moléculas que podrían no encontrarse en los sistemas de ensayo que requieren una unión de SAP dependiente de calcio. Otro método directo potente y de bajo rendimiento es la calorimetría isotérmica que mide el calor de interacción en la disolución entre SAP y los compuestos de ensayo de acuerdo con la presente invención. Se mide de forma precisa la afinidad de unión como indicativo de la eficacia potencial. Lo resultados típicos por medio de este método para las constantes de disociación,  $K_d$ , entre SAP y varios compuestos son como se muestran a continuación:

Compuesto	K <sub>d</sub> en micromoles por litro (mediciones repetidas)
Fosfoetanolamina	36, 27, 48
Fosfocolina	Sin unión
N-acetil-D-prolina	16, 23, 17
Ro-63-8695	0,0139, 0,0059, 0,0065, 0,0088
Ro-64-2856	0,019, 0,02

Los dos últimos componentes proceden de EP-A-915088, en el que Ro-63-8695 es ácido (R)-1-[6-(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidin-2-carboxílico y Ro-64-2856 es ácido (R)-1-[[4-[2-(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etoxil]-fenoxil]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

#### Efectos sobre SAP *in vivo* en compuestos que bloquean la unión *in vitro* de ligando de SAP

5 Para los fines de la presente invención, se someten a ensayo los compuestos que bloquean la unión de SAP con ligandos diana *in vivo* en SAP humano de expresión de ratón transgénico, como se describe en otra parte (23), en cuanto a sus efectos sobre las concentraciones de SAP en plasma y la renovación y catabolismo de SAP. Habiéndose establecido por medio de dosificaciones medidas que los compuestos no son intrínsecamente tóxicos, se administran varias dosificaciones al ratón transgénico con SAP humano. Se toma el suero a intervalos regulares para el ensayo inmunoquímico de SAP. Además, se puede inyectar por vía intravenosa SAP humano radiomarcado en forma de traza en diferentes momentos con relación a la dosificación de fármaco, y se llevan a cabo tanto el conteo en cuerpo como la toma de muestra de sangre para controlar el período de semivida en plasma y la eliminación corporal de SAP (14, 30). Además, se pre-incuba el SAP de marcador con diferentes cantidades de los compuestos sometidos a ensayo, y posteriormente se inyecta en ratones que no reciben fármaco alguno, con el fin se evaluar el efecto que la unión del fármaco presenta sobre la eliminación de SAP. De acuerdo con la presente invención, es probable que los compuestos que aceleran la eliminación de SAP *in vivo* o que rebajan la concentración de SAP en plasma, reduciendo de este modo la disponibilidad *in vivo* de SAP, presenten valor terapéutico.

Se evalúan los compuestos que han sido sometidos a ensayos de toxicidad formal y que se han resultado aceptables para administración en humanos, en cuanto a sus efectos sobre la concentración de SAP en plasma, el período de semivida, la renovación y el catabolismo. Se somete SAP humano aislado a radiomarcaje de traza con <sup>125</sup>I y/o <sup>123</sup>I y se inyecta por vía intravenosa, seguido de estudios de renovación de plasma y formación de imágenes de gammagrafía de cuerpo entero, como se describe en otras referencias (15, 23, 31).

#### Ejemplo A. Uso de resonancia de plasmón superficial para detectar la inhibición de unión de ligando dependiente de calcio por parte de SAP.

Se inmovilizaron covalentemente fibrillas amiloides Aβ-42 sintéticas (28) sobre la superficie de reaccionante del instrumento de resonancia de plasmón superficial Fisons IAsys y posteriormente se expusieron a SAP aislado (32) en disolución en disolución salina de fisiológica con tampón Tris en ausencia de calcio (mostrado como TN/N en las Figuras). No tuvo lugar unión de SAP y de este modo no se generó señal. La introducción de calcio permitió que el SAP se enlazara de forma específica a las fibrillas amiloides inmovilizadas, generando una señal fácilmente detectable (Fig. 1). 1-[(S)-3-mercaptopropionil]-D-prolina (designando en la Figuras como Ro-3479) es un inhibidor específico de la unión de ligando dependiente de calcio por parte de SAP. La adición de 1-[(S)-3-mercaptopropionil]-D-prolina (Ro-3479) a 500 μmol/l en disolución salina fisiológica de tampón de Tris que contiene calcio (TC en las Figuras) invirtió por completo la unión de SAP y la correspondiente señal (Fig. 1). Tras la adición de SAP en ausencia de calcio, seguido de Ro-3479 a 100 μmol/l, y posteriormente permitiendo el equilibrio del sistema, la adición posterior de calcio para permitir la unión específica de ligando dependiente de calcio por parte de SAP no fue seguido de señal alguna (Fig. 2), lo que indica que Ro-3479 no solo disocia la unión de SAP sino que también la inhibe. Se regeneró el ligando de fase sólida para la unión posterior de ligando dependiente de calcio, mediante lavado con EDTA en disolución salina fisiológica tamponada con Tris (TE en las Figuras) y posteriormente se re-expuso a SAP en tampón TN seguido de calcio. Se observó de nuevo la señal típica que refleja la unión del ligando por parte de SAP y posteriormente se invirtió por completo mediante la adición de Ro-3479 a 50 μmol/l (Fig. 3).

#### Ejemplo B. Detección de inhibidores de la unión de SAP radiomarcado con <sup>125</sup>I a organismos de *Neisseria meningitidis* inmovilizados en placas de microvaloración.

##### Materiales y métodos

Se repartió una suspensión de *Neisseria meningitidis* a 1 x 10<sup>8</sup> organismos por ml en PBS en placas de microvaloración de poliestireno en volúmenes de 50 μl por pocillo, y se dejó durante la noche a 4 °C. Posteriormente, se lavaron todos los pocillos tres veces con volúmenes de 200 μl de PBS que contenía 0,05 % v/v de Tween 20, antes de equilibrio durante 2 min con NaCl 0,14 M/CaCl<sub>2</sub> 0,002 M tamponado con Tris 0,01 M a pH 8,0 (tampón TC),

que contenía BSA 4 % p/v y 0,05 % /v de Tween 20 (tampón TCBT). Se vaciaron los pocillos antes de añadir a cada uno de ellos los siguientes reactivos. Para la unión máxima inhibida de control: 35 µl de tampón de TCBT (que contenía CaCl<sub>2</sub> 2,3 mM, BSA 5,72 % p/v, Tween 20 0,072 % v/v), 10 µl de TC y 5 µl de SAP radiomarcado con <sup>125</sup>I en NaCl 0,14 M tamponado con Tris 0,01 M a pH 8,0 (tampón TN), para proporcionar concentraciones finales de BSA, Ca<sup>2+</sup> 4 %, 2 mM; Tween 20, 0,05 %. Para la unión de de EDTA de fondo, no dependiente de calcio, no específica: 5 µl de SAP radiomarcado en TN y 45 µl de NaCl 0,14 M tamponado con Tris 0,01 M a pH 8,0 que contenía EDTA 11,1 mM, BSA 4,4 % p/v y Tween 20 0,06 % p/v (tampón TEBT) para proporcionar concentraciones finales de EDTA, 10 mM; BSA, 4 %; Tween 20, 0,05 %. Para evaluar los inhibidores; 35 µl de TCBT (que contenía Ca<sup>2+</sup> 2,3 mM, BSA 5,72 % y Tween 20 0,072 %), 10 µl de TC que contenía los compuestos de ensayo a 10 mM, 1 mM, 100 mM, 10 µM o 1 µM, y 5 µl de SAP radiomarcado en TN. A continuación, se incubaron todos los pocillos a temperatura ambiente durante 2 h antes de ser lavados tres veces con volúmenes de 200 µl de TCBT, se dejaron secar durante 1 h a temperatura ambiente, y se unieron a SAP radiomarcado y posteriormente se contaron.

Los compuestos sometidos a ensayo en el experimento mostrados en el presente documento fueron una familia de moléculas desarrollada como inhibidores de la unión de SAP a fibrillas amiloides, seguido de la identificación de una molécula con derivación inicial durante la detección de elevado rendimiento de una biblioteca de compuestos de gran tamaño de acuerdo con la patente de EE.UU. 6.126.918. El éxito inicial fue 1-[(S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-D-prolina, (Ro-15-3479), y un dímero de uno de sus estereoisómeros, se encontró que el ácido (R)-1-[(S)-2-[(S)-3-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-metil-3-oxo-propildisulfanil]-2-metil-propionil]-pirrolidin-2-carboxílico (Ro-63-3300) era mucho más potente. Los otros dos diastereoisómeros no inhibieron la unión de ligando por parte de SAP. Posteriormente se produjo un programa de química, ácido (R)-1-[6-(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidin-2-carboxílico (Ro-63-8695) (Ejemplo 8b de EP-A-915088) y una familia de moléculas relacionadas, que se sometieron a ensayo en el presente documento. Sus nombre químicos y designaciones codificadas se muestran a continuación:

Ro-64-4383: ácido (R)-1-[[2,5-dihidroxi-4-[2-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil]-2-fenil]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-64-2856: ácido (R)-1-[[4-[2 [(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etoxi]-fenoxi]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-64-3300: ácido (R)-1-[(S)-3-[(S)-3-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-metil-3-oxo-propildisulfanil]-2-metil-propionil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-15-3479: 1-[(S)3-mercapto-2-metilpropionil]-D-prolina.

Ro-64-2848: (R)-1-[[3-[2-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etoxi]-2-metil-fenoxi]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-64-2668: (R)-1-[[3-[2-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil]-fenil]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-64-2845: (R)-1-[[2-[2-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etoxi]-2-metoxi-fenoxi]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-64-2600 (R)-1-[cis-4-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-carbonil]-ciclohexanocarbonil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-64-5607: (R)-1-[[4-[2-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil]-naftalen-1-il]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-64-5445: (R)-1-[[5-[2-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etoxi]-naftalen-1-iloxi]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-63-8593: (R)-1-[[2-[2-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etoxi]-fenoxil]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

Ro-63-7777: (R)-1-[[4-[2-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil]-fenil]-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico.

## Resultados

La capacidad de los compuestos sometidos a ensayo para inhibir la unión de SAP a meningococos se expresa como el porcentaje de reducción de la unión de SAP en comparación con la unión en ausencia de cualquier inhibidor (Tabla 1). Se inhibió toda la unión por parte de EDTA, confirmando la naturaleza de interacción específica y dependiente de calcio. Fosfoetanolamina, una ligando bien conocido de SAP (25, 32) produjo inhibición a concentración elevada, pero únicamente efectos modestos cuando se diluyó. Fosfocolina, el ligando específico de la proteína reactiva C, la otra proteína de pentraxina de plasma humano estrechamente relacionada con SAP, no presentó efecto virtual, como se esperaba ya que no hubo evidencia de que SAP reconociera y se uniera a fosfocolina en condiciones fisiológicas. La familia de moléculas Ro-63-8695 fue un potente inhibidor con valores de IC<sub>50</sub> en el intervalo sub-micromolar en varios casos. Por tanto, estos compuestos son candidatos para el ensayo posterior de acuerdo con la presente invención.

Tabla 1

Porcentaje de inhibición por parte de varios compuestos de la unión de SAP radiomarcado a *Neisseria meningitidis* inmovilizada

Compuesto	Molaridad				
	2 mM	200 µM	20 µM	2 µM	200 nM
Ninguno	0	0	0	0	0
EDTA 10 mM	100	nd	nd	nd	nd
Fosfoetanolamina	95	41	32	18	7
Fosfocolina	24	3	4	5	0
Ro-63-8695	100	79	74	61	5
Ro-64-4383	100	100	95	76	1
Ro-64-2856	100	65	74	65	0
Ro-63-3300	100	69	73	68	28
Ro-15-3479	77	54	50	42	3
Ro-64-2848	100	100	93	64	1
Ro-64-2868	100	100	92	64	28
Ro-64-2845	100	93	92	74	19
Ro-64-2600	100	100	93	73	31
Ro-64-5607	100	100	89	69	13
Ro-64-5445	100	100	81	72	30
Ro-63-8593	100	100	87	77	18
Ro-63-7777	100	100	73	64	7

**Ejemplo C**

**5 Detección de inhibidores de la unión de SAP radiomarcado con <sup>125</sup>I a cromatina inmovilizada en placas de microvaloración**

**Materiales y métodos**

Se repartió una disolución que contenía 100 µg/ml de cromatina larga procedente de eritrocito de pollo (27), en PBS con un pH ajustado a 9, sobre placas de microvaloración que contenían superficies activadas con N-oxisuccinimida, en volúmenes de 50 µl por pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se lavaron todos los pocillos tres veces con volúmenes de 200 µl de PBS, pH 7,4, que contenían 0,05 % v/v de Tween 20 (PBST) y se bloquearon los sitios activos sin reaccionar mediante la adición de 50 µl de BSA 2 % v/v en PBS, pH 7,4, sobre cada pocillo, durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los pocillos tres veces con volúmenes de 200 µl de PBST antes del equilibrio durante 2 minutos con NaCl 0,14 M/CaCl<sub>2</sub> 0,002 M tamponado con Tris 0,01 M a pH 8,0 (tampón TC), que contenía BSA 4 % p/v y Tween 20 0,05 % v/v (tampón TCBT). Posteriormente, se vaciaron los pocillos antes de añadir a cada uno de ellos los siguientes reactivos. Para el control de la unión máxima inhibida: 35 µl de tampón TCBT (que contenía 2,3 mM de CaCl<sub>2</sub>, BSA 5,72 % p/v, Tween 20 0,072 % v/v), 10 µl de TC y 5 µl de SAP radiomarcado con <sup>125</sup>I en NaCl 0,14 M tamponado con Tris 0,01 M a pH 8,0 (tampón TN), para proporcionar concentraciones finales de BSA, 4 %; Ca<sup>2+</sup>, 2 mM; Tween 20, 0,05 %. Para la unión de fondo, no específica, no dependiente de calcio, en presencia de EDTA; 5 µl de SAP radiomarcado en TN y 45 µl de NaCl 0,14 M tamponado con Tris 0,01 M a pH 8,0 que contenía 11,1 mM de EDTA, 4,4 % p/v de BSA y Tween 20 0,06 % p/v (tampón TEBT) para proporcionar concentraciones finales de EDTA, 10 mM; BSA, 4 %; Tween 20, 0,05 %. Para los ensayos de inhibidores; 35 µl de TCBT (que contenía 2,3 mM de Ca<sup>2+</sup>, 5,72 % de BSA y 0,072 % de Tween 20), 10 µl de compuestos de ensayo que contenían TC a 10 mM, 1 mM, 100 µM, 10 µM ó 1 µM y 5 µl de SAP radiomarcado en TN. A continuación se incubaron todos los pocillos a temperatura ambiente durante 2 h antes de ser lavados tres veces con volúmenes de 200 µl de TCBT, se dejaron secar durante 1 h a temperatura ambiente, se unieron a SAP radiomarcado y posteriormente se contaron. Los compuestos sometidos a ensayo del experimento mostrados en el

presente documento fueron los mismos que los especificados en el Ejemplo B anterior.

## Resultados

La capacidad de los compuestos sometidos a ensayo para inhibir la unión de SAP a cromatina se expresa como el porcentaje de reducción de la unión de SAP en comparación con la unión en ausencia de cualquier inhibidor (Tabla 2). Se inhibió toda la unión por parte de EDTA, confirmando la naturaleza de la interacción específica y dependiente de calcio. La unión a los pocillos de control sin cromatina y el bloqueo con BSA se encontraron al mismo nivel de fondo como se observa con la inhibición completa por parte de EDTA o los otros inhibidores específicos. Fosfoetanolamina, un conocido ligando de SAP (25, 32) produjo inhibición a concentración elevada, pero únicamente efectos modestos cuando se diluyó. Fosfocolina, el ligando específico de la proteína reactiva C, la otra proteína de pentraxina de plasma humano estrechamente relacionada con SAP, no presentó efecto virtual, como se esperaba ya que no hubo evidencia de que SAP reconociera y se uniera a fosfocolina en condiciones fisiológicas. La familia de moléculas Ro-63-8695 fue un potente inhibidor con valores de IC<sub>50</sub> en el intervalo micromolar en varios casos. Por tanto, estos compuestos son candidatos para el ensayo posterior de acuerdo con la presente invención, aunque de manera interesante este ensayo fue menos sensible que el que usa meningococos como ligando inmovilizado.

Tabla 2

Porcentaje de inhibición por parte de varios compuestos de la unión de SAP radiomarcado a cromatina larga nativa inmovilizada

Compuesto	Molaridad				
	2 mM	200 µM	20 µM	2 µM	200 nM
Ninguno	0	0	0	0	0
Fosfoetanolamina	94	59	36	9	3
Fosfocolina	19	3	0	0	2
Ro-63-8695	93	87	69	29	1
Ro-64-4383	97	88	78	45	0
Ro-64-2856	91	75	56	36	1
Ro-63-3300	99	88	69	34	3
Ro-15-3479	81	46	72	14	0
Ro-64-2848	98	95	65	22	0
Ro-64-2868	98	94	56	18	0
Ro-64-2845	100	96	75	nd	11
Ro-64-2600	100	94	67	35	1
Ro-64-5607	100	96	77	35	15
Ro-64-5445	96	82	74	51	12
Ro-63-8593	96	89	77	34	7
Ro-63-7777	92	66	39	19	4

## Ejemplo D. Detección de inhibidores de la unión de SAP radiomarcado con <sup>125</sup>I a virus de gripe inmovilizado sobre placas de microvaloración

### Materiales y métodos

Se diluyó una suspensión concentrada de virus de gripe purificado A/Shanghai/24/90 a 10 mg de proteína por ml en PBS 1:50 en PBS y posteriormente se repartió sobre placas de microvaloración de poliestireno en volúmenes de 50 µl por pocillo, y se dejó durante la noche a 4 °C. Se vaciaron todos los pocillos antes del bloqueo mediante adición a cada pocillo de 200 µl de BSA 2 % p/v en PBS e incubación a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se lavaron todos los pocillos tres veces con volúmenes de 200 µl de PBS que contenía 0,05 % v/v de Tween 20, antes del equilibrio durante 2 minutos con NaCl 0,14 M/CaCl<sub>2</sub> 0,002 M tamponado con Tris 0,01 M a pH 8,0 (tampón TC),

que contenía BSA 4 % p/v y Tween 20 0,05 % v/v (tampón TCBT). Posteriormente, se vaciaron los pocillos antes de añadir a cada uno de ellos los siguientes reactivos. Para el control de la unión máxima inhibida: 35 µl de tampón TCBT (que contenía 2,3 mM de CaCl<sub>2</sub>, BSA 5,72 % p/v, Tween 20 0,072 % v/v), 10 µl de TC y 5 µl de SAP radiomarcado con <sup>125</sup>I (32) en NaCl 0,14 M tamponado con Tris 0,01 M a pH 8,0 (tampón TN), para proporcionar concentraciones finales de BSA, 4 %; Ca<sup>2+</sup>, 2 mM; Tween 20, 0,05 %. Para la unión de fondo, no específica, no dependiente de calcio, en presencia de EDTA; 5 µl de SAP radiomarcado en TN y 45 µl de NaCl 0,14 M tamponado con Tris 0,01 M a pH 8,0 que contenía 11,1 mM de EDTA, 4,4 % p/v de BSA y Tween 20 0,06 % p/v (tampón TEBT) para proporcionar concentraciones finales de EDTA, 10 mM; BSA, 4 %; Tween 20, 0,05 %. Para los ensayos de inhibidores; 35 µl de TCBT (que contenía 2,3 mM de Ca<sup>2+</sup>, 5,72 % de BSA y 0,072 % de Tween 20), 10 µl de compuestos de ensayo que contenían TC a 10 mM, 1 mM, 100 µM, 10 µM ó 1 µM y 5 µl de SAP radiomarcado en TN. A continuación se incubaron todos los pocillos a temperatura ambiente durante 2 h antes de ser lavados tres veces con volúmenes de 200 µl de TCBT, se dejaron secar durante 1 h a temperatura ambiente, se unieron a SAP radiomarcado y posteriormente se contaron. Los compuestos sometidos a ensayo del experimento mostrados en el presente documento fueron los mismos que los especificados en el Ejemplo B anterior.

## 15 Resultados

La capacidad de los compuestos sometidos a ensayo para inhibir la unión de SAP a virus de gripe se expresa como el porcentaje de reducción de la unión de SAP en comparación con la unión en ausencia de cualquier inhibidor (Tabla 3). Se inhibió toda la unión por parte de EDTA, confirmando la naturaleza de la interacción específica y dependiente de calcio. La unión a los pocillos de control sin cromatina y bloqueados con BSA tuvieron lugar al mismo nivel de fondo como se observa con la inhibición completa por parte de EDTA o los inhibidores específicos. Fosfoetanolamina, un conocido ligando de SAP (25, 32) produjo inhibición a concentración elevada, pero únicamente efectos modestos cuando se diluyó. Fosfocolina, el ligando específico de la proteína reactiva C, la otra proteína de pentraxina de plasma humano estrechamente relacionada con SAP, no presentó efecto virtual, como se esperaba ya que no hubo evidencia de que SAP reconociera y se uniera a fosfocolina en condiciones fisiológicas. La familia de moléculas Ro-63-8695 fue un potente inhibidor con valores de IC<sub>50</sub> en el intervalo sub-micromolar, nanomolar elevado, en varios casos. Por tanto, estos compuestos son candidatos para el ensayo posterior de acuerdo con la presente invención, aunque de manera interesante este ensayo fue más sensible que el que usa meningococos enteros o cromatina larga nativa como ligando inmovilizado.

Tabla 3

30 Porcentaje de inhibición por parte de varios compuestos de la unión de SAP radiomarcado a virus de gripe inmovilizado

Compuesto	Molaridad				
	2 mM	200 µM	20 µM	2 µM	200 nM
Ninguno	0	0	0	0	0
Fosfoetanolamina	69	51	42	8	1
Fosfocolina	3	5	5	2	0
Ro-63-8695	98	96	90	81	36
Ro-64-4383	89	89	80	57	24
Ro-64-2856	87	84	82	77	3
Ro-63-3300	91	91	90	78	47
Ro-15-3479	68	51	40	30	12
Ro-64-2848	85	81	81	65	24
Ro-64-2868	82	77	73	68	25
Ro-64-2845	89	77	62	52	16
Ro-64-2600	92	89	83	76	0
Ro-64-5607	98	94	95	64	4
Ro-64-5445	80	76	64	51	23
Ro-63-8593	94	93	88	68	44
Ro-63-7777	89	89	85	65	37

**Ejemplo E****Acumulación de SAP radiomarcado en articulaciones de pacientes que padecen artritis**

Se encontró que SAP radiomarcado en articulaciones de pacientes sin amiloidosis de diálisis que padecían otras formas de artritis: 5 personas con osteoartritis (Fig. 4), 12 con artritis reumatoide y un sujeto con derrame traumático. En cada uno de estos pacientes, se detectó SAP marcado en todas las articulaciones con un derrama importante, independiente de la etiología. Esto no resulta sorprendente en sí mismo ya que se sabe que las proteínas del plasma penetran en los derrames de las articulaciones. No obstante, en 20 de 30 pacientes con diferentes artropatías, los inventores también observaron la captación de SAP marcado en el interior de las articulaciones que no presentaban derrames clínicamente detectables.

La Figura 4 muestra una imagen gammagráfica de las manos de un paciente con osteoartritis 24 h después de la inyección intravenosa de SAP marcado con  $^{125}\text{I}$ . La captación y la retención de SAP vienen indicadas tanto en zonas carpianas, en las articulaciones de la segunda falange del metacarpiano y en algunas articulaciones de las intrafalanges.

Un posible mecanismo para la localización de SAP a partir de sangre en una articulación dañada puede ser la presencia en el interior de la articulación de depósitos amiloides en las estructuras articular y peri-articular. De hecho, esto supone una amplia evidencia de la presencia dispersa de depósitos amiloides microscópicos en el sinovio, cartílago articular y/o las cápsulas de la articulación de los individuos mayores (33-44). No obstante, la impresión global de estos estudios observacionales de autopsia y/o muestras de retención es que los depósitos amiloides se encuentran asociados principalmente a una mayor edad de los sujetos y no particularmente al alcance o gravedad de las manifestaciones clínicas o patológicas de la osteoartritis. De manera alternativa, o además de, SAP puede unirse a ligandos sobre estructuras diferentes de las fibrillas amiloides que se encuentran presentes en las articulaciones inflamadas o dañadas. Se ha documentado la unión dependiente de calcio de SAP a los glucosaminoglucanos *in vitro* (45), pero resultado específica para los sulfatos de heparano y dermatano, en lugar de sulfato de condroitina y ácido hialurónico que son más abundantes en el cartílago y en el líquido sinovial, respectivamente. No obstante, los glucosaminoglucanos son ubicuos en el tejido conectivo y pueden encontrarse expuestos de manera anormal y por tanto proporcionar ligandos para SAP en el interior y alrededor de las articulaciones dañadas. Otro ligando al que se une SAP de forma rápida, *in vivo* así como *in vitro*, es ADN (26, 27), tanto libre como el interior de cromatina cuando se encuentra expuesto por muerte celular (46), y SAP también se une a células apróticas *in vivo* (47). Un mayor muerte celular en las articulaciones dañadas, bien por apoptosis o bien por necrosis, con exposición a cromatina, puede provocar una actividad anormal de los ligandos y de este modo un foco para la deposición de SAP.

**Ejemplo F****Unión de SAP a ligandos en articulaciones dañadas**

Con el fin de someter a ensayo si SAP puede unirse a ligandos en articulaciones dañadas, los inventores compararon en primer lugar la distribución de albúmina de suero humano radiomarcada con la de SAP en dos pacientes. En el que presentaba diálisis asociada a amiloide, la captación de SAP por parte de la articulación fue muy superior a la de albúmina, mostrando que la localización de SAP fue específica para amiloide. Por el contrario, en el paciente con artritis reumatoide activa y articulaciones múltiples dañadas con derrames, de manera general la localización de albúmina y SAP resultaron comparables, lo que sugiere un proceso similar no específico de derrame en el interior del espacio sinovial para ambas proteínas, aunque articulaciones esporádicas mostraron mayor retención de SAP que de albúmina. Además, en un paciente en el que se succionaron los derrames de articulación de la rodilla hasta sequedad 24 h después de la inyección de SAP radiomarcado, se apreció todavía una localización intensa de SAP en las articulaciones. En segundo lugar, se midieron las concentraciones de SAP en el líquido sinovial y en el suero y de otras proteínas del plasma en muestras emparejadas en 15 pacientes con derrames articulares de diferente etiología, y se calcularon las proporciones de líquido sinovial:suero. Existe una relación lineal inversa bien conocida entre esta proporción y la masa molecular relativa de las proteínas, reflejando su facilidad relativa de acceso mediante la difusión desde la circulación hasta el interior del espacio de la articulación. No obstante, la proporción fue notablemente y considerablemente menor para SAP que la esperada para la proteína de su masa molecular (Fig. 5). Esto indica que SAP, que evidentemente puede conseguir acceso al líquido sinovial, como queda mostrado por medio de los estudios de los inventores con SAP radiomarcado, se encuentra probablemente formando unión con la estructura(s) de la articulación y por tanto no se encuentran disponible para la detección y en el análisis del propio líquido sinovial.

La Figura 5 muestra la proporción de la concentración de varias proteínas de plasma en el líquido sinovial y en el suero para pacientes con varias formas de artritis que producen derrames. Existe una relación lineal,  $r = 0,62$ , entre la masa molecular relativa y la proporción de concentración de líquido sinovial/suero para todos los pacientes mostrados en el presente documento excepto SAP, para el cual la concentración en el líquido de sinovial es notablemente menor que la predicha a partir de su masa molecular y concentración en suero. (Clave:  $\alpha_1\text{AG}$ , glucoproteína de ácido- $\alpha_1$ ; Alb, albúmina; Trf, tranferrina; Cer, ceruloplasmina;  $\alpha_2\text{M}$ , macroglobulina  $\alpha_2$ ).

Hasta el momento, no se pensaba que los depósitos amiloides microscópicos muy comunes y dispersos en articulaciones de edad avanzada y que padecen osteoartritis contribuían a la patogénesis o a los síntomas de la osteoartritis. No está claro como la unión de SAP bien a fibrillas amiloides o a otras estructuras en las articulaciones podría resultar patogénica en osteoartritis. Aunque el SAP agregado artificialmente puede activar el sistema de complemento (48) y podría de este modo ser pro-inflamatorio, la unión de SAP a cualquiera de los ligandos conocidos no solo no activa el complemento, sino que actualmente inhibe la activación del complemento por parte del propio sustrato (49, 50). De igual forma, no existe evidencia alguna de la activación del complemento, bien de forma local o de forma sistémica, en pacientes con osteoartritis. No obstante, a la vista de las observaciones de los inventores de la localización de SAP en las articulaciones y de la concentración inesperadamente reducida de SAP libre en el líquido sinovial, los inventores sometieron a ensayo si el SAP podría verse implicado en la osteoartritis.

## Ejemplo G

### Tratamiento de pacientes con osteoartritis

Dos ejemplos demuestran la eficacia de dicho tratamiento.

1) RJ, un médico de cabecera retirado de 64 años de edad que vive en Nueva Zelanda, presenta un amplio historial de lesiones articulares y óseas, comenzando desde niño en una granja y continuando durante la adolescencia y posteriormente la edad adulta practicando rugby y esquí. Desde la edad de 42 años el paciente ha sufrido dolor e hinchamiento de articulaciones previamente dañadas tras esfuerzo y en condiciones meteorológicas de frío. Las articulaciones de inter-falange proximal de los dedos corazón izquierdo y anular derecho, el codo derecho y las articulaciones intervertebrales torácicas medias han sido los más afectados. Durante los últimos 22 años los síntomas han ido empeorando de forma progresiva, de manera que su capacidad de esfuerzo físico se ha visto muy restringida y durante el invierno ha sido preciso el tratamiento frecuente y continuo con fármaco anti-inflamatorios no esteroidales. Estas con todas las manifestaciones típicas de osteoartritis. En 2000, el descubrimiento de una disfunción renal condujo a una segunda diagnosis completamente separada de amiloidosis sistémica hereditaria provocada por la mutación en el gen de la cadena- $\alpha$  de fibrógeno A. Este tipo de amiloidosis no afecta a las articulaciones y su patogénesis y manifestaciones clínicas no se encuentran relacionadas para nada con la osteoartritis.

El 9 de octubre de 2001 el paciente comenzó el tratamiento experimental con ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]-pirrolidin-2-carboxílico, 10 mg dos veces al día mediante inyección sub-cutánea. En enero de 2002, tras tres meses de este potente fármaco de eliminación de SAP y con una reducción importante por encima de 95 % en la concentración de SAP en plasma, el paciente apreció en primer lugar que sus síntomas de artritis fueron menos problemáticos que anteriormente. Esta mejora se mantuvo y aumentó de manera que en abril de 2002, otoño en Nueva Zelanda, fue admirablemente más allá de la duda. Durante ese invierno, por primera vez en muchos años, el paciente no precisó tratamiento necesario con fármacos anti-inflamatorios no esteroidales, a pesar de una mayor actividad física. El paciente continuó el tratamiento con ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]piridin-2-carboxílico hasta la actualidad (junio de 2003) y todos sus síntomas de osteoartritis han continuado, de manera notable, en remisión. Durante los últimos meses, el paciente ha estado practicando ejercicio físico de forma regular en tierra, haciendo trabajos de arquitectura paisajística y cercado, incluyendo el levantamiento y acarreo de pesos importantes, sin padecer ningún dolor o hinchamiento de los que previamente le afectaban incluso sin el esfuerzo de la actividad física inusual.

2) CD, trabajadora de servicio de Gales de 49 años de edad, presentaba un historial de 6-8 años de dolor y disfunción en varias articulaciones. Presentaba dolor en los hombros, en particular en la zona superior o detrás de la cabeza, haciendo que el secado de pelo o determinadas tareas domésticas resultara dolorosas y complicadas. La mayoría de los días se veía afectada por dolor de espalda en la zona torácica media y dolores de tobillo bilaterales, normalmente provocados por estancias prolongadas de pie. También presentaba dolor en la muñeca derecha al realizar determinados movimientos, en particular la apertura de tarros, una maniobra que le resultaba muy complicada. Estos síntomas también son compatibles con la osteoartritis.

CD presentaba amiloidosis sistémica hereditaria provocada por la mutación en el gen de la apolipoproteína AI, diagnosticada en octubre de 2001 durante la investigación de una disfunción renal. Este tipo de amiloidosis no afecta a las articulaciones o provoca síntomas artríticos. Ella comenzó el tratamiento contra la amiloidosis el 22 de octubre de 2001 con ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]-pirrolidin-2-carboxílico, 15 mg dos veces al día mediante inyección sub-cutánea. En diciembre de 2001, tras dos meses con este potente fármaco de eliminación de SAP y con una reducción importante por encima de 95 % en la concentración de SAP en plasma, ella apreció que los síntomas de articulaciones fueron menos problemáticos que anteriormente. Esta mejora se mantuvo y aumentó de manera que en enero de 2002 la paciente se encontraba libre de dolor y presentaba una función normal en sus articulaciones. El tratamiento con ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]-pirrolidin-2-carboxílico concluyó el 22 de octubre y su remisión notable ha continuado hasta la actualidad (junio de 2003).

## Referencias

1. Brion, P.H. and Kalunian, K.C. (2003) Osteoarthritis. *In: Oxford Textbook of Medicine, 4th Ed., Vol. 3* (Warrell, D.A., Cox, T.M., Firth, J.D. and Benz, E.J., Jr., eds.), Oxford University Press, Oxford, pp. 62-68.
2. Osmand, A.P., Friedenson, B., Gewurz, H., Painter, R.H., Hofmann, T. and Shelton, B. (1977) Characterisation of C-reactive protein and the complement subcomponent Clt as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 739-743.
3. Pepys, M.B. and Baltz, M.L. (1983) Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv. Immunol.*, 34: 141-212.
4. Srinivasan, N., White, H.E., Emsley, J., Wood, S.P., Pepys, M.B. and Blundell, T.L. (1994) Comparative analyses of pentraxins: implications for protomer assembly and ligand binding. *Structure*, 2: 1017-1027.
5. Srinivasan, N., Rufino, S.D., Pepys, M.B., Wood, S.P. and Blundell, T.L. (1996) A superfamily of proteins with the lectin fold. *Chemtracts-Biochem. Mol. Biol.*, 6: 149-164.
6. Baltz, M.L., de Beer, F.C., Feinstein, A., Munn, E.A., Milstein, C.P., Fletcher, T.C., March, J.F., Taylor, J., Bruton, C., Clamp, J.R., Davies, A.J.S. and Pepys, M.B. (1982) Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 389: 49-75.
7. Tennent, G.A., Butler, P.J.G., Hutton, T., Woolfit, A.R., Harvey, D.J., Rademacher, T.W. and Pepys, M.B. (1993) Molecular characterization of *Limulus polyphemus* C-reactive protein. I. Subunit composition. *Eur. J. Biochem.*, 214: 91-97.
8. Pepys, M.B., Rademacher, T.W., Amatayakul-Chantler, S., Williams, P., Noble, G.E., Hutchinson, W.L., Hawkins, P.N., Nelson, S.R., Gallimore, J.R., Herbert, J., Hutton, T. and Dwek, R.A. (1994) Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5602-5606.
9. Pepys, M.B., Booth, D.R., Hutchinson, W.L., Gallimore, J.R., Collins, P.M. and Hohenester, E. (1997) Amyloid P component. A critical review. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, 4: 274-295.
10. Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B. and Blake, C.C.F. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.*, 273: 729-739.

11. Nelson, S.R., Lyon, M., Gallagher, J.T., Johnson, E.A. and Pepys, M.B. (1991) Isolation and characterization of the integral glycosaminoglycan constituents of human amyloid A and monoclonal light-chain amyloid fibrils. *Biochem. J.*, 275: 67-73.
12. Pepys, M.B., Dyck, R.F., de Beer, F.C., Skinner, M. and Cohen, A.S. (1979) Binding of serum amyloid P component (SAP) by amyloid fibrils. *Clin. Exp. Immunol.*, 38: 284-293.
13. Caspi, D., Zalzman, S., Baratz, M., Teitelbaum, Z., Yaron, M., Pras, M., Baltz, M.L. and Pepys, M.B. (1987) Imaging of experimental amyloidosis with <sup>131</sup>I-serum amyloid P component. *Arthritis Rheum.*, 30: 1303-1306.
14. Hawkins, P.N., Myers, M.J., Epenetos, A.A., Caspi, D. and Pepys, M.B. (1988) Specific localization and imaging of amyloid deposits *in vivo* using <sup>123</sup>I-labeled serum amyloid P component. *J. Exp. Med.*, 167: 903-913.
15. Hawkins, P.N., Lavender, J.P. and Pepys, M.B. (1990) Evaluation of systemic amyloidosis by scintigraphy with <sup>123</sup>I-labeled serum amyloid P component. *N. Engl. J. Med.*, 323: 508-513.
16. Nelson, S.R., Hawkins, P.N., Richardson, S., Lavender, J.P., Sethi, D., Gower, P.E., Pugh, C.W., Winearls, C.G., Oliver, D.O. and Pepys, M.B. (1991) Imaging of haemodialysis-associated amyloidosis with <sup>123</sup>I-serum amyloid P component. *Lancet*, 338: 335-339.
17. Tan, S.Y., Baillo, R., Brown, E., Farrington, K., Soper, C., Percy, M., Clutterbuck, E., Madhoo, S., Pepys, M.B. and Hawkins, P.N. (1999) Clinical, radiological and serum amyloid P component scintigraphic features of  $\beta_2$ -microglobulin amyloidosis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 14: 1467-1471.
18. Baltz, M.L., de Beer, F.C., Feinstein, A. and Pepys, M.B. (1982) Calcium-dependent aggregation of human serum amyloid P component. *Biochim. Biophys. Acta*, 701: 229-236.
19. Hutchinson, W.L., Hohenester, E. and Pepys, M.B. (2000) Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum. *Mol. Med.*, 6: 482-493.
20. Hind, C.R.K., Collins, P.M., Baltz, M.L. and Pepys, M.B. (1985) Human serum amyloid P component, a circulating lectin with specificity for the cyclic 4,6-pyruvate acetal of galactose. Interactions with various bacteria. *Biochem. J.*, 225: 107-111.
21. Noursadeghi, M., Bickerstaff, M.C.M., Gallimore, J.R., Herbert, J., Cohen, J. and Pepys, M.B. (2000) Role of serum amyloid P component in bacterial infection:

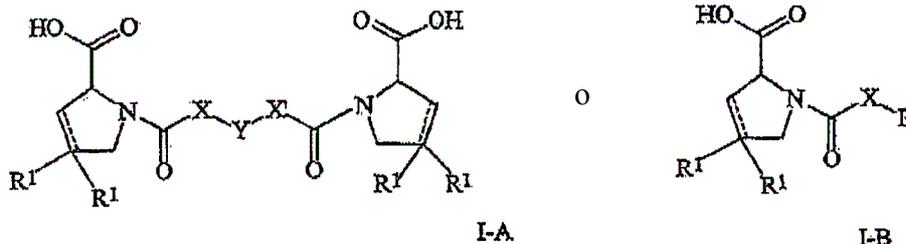
- protection of the host or protection of the pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 14584-14589.
22. Andersen, O., Vilsgaard Ravn, K., Sørensen, L.J., Jonson, G., Holm Nielsen, B. and Svehag, S.-B. (1997) Serum amyloid P component binds to influenza A virus haemagglutinin and inhibits the virus infection *in vitro*. *Scand. J. Immunol.*, 46: 331-337.
  23. Pepys, M.B., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Lachmann, H.J., Gallimore, J.R., Lovat, L.B., Bartfai, T., Alanine, A., Hertel, C., Hoffmann, T., Jakob-Roetne, R., Norcross, R.D., Kemp, J.A., Yamamura, K., Suzuki, M., Taylor, G.W., Murray, S., Thompson, D., Purvis, A., Kolstoe, S., Wood, S.P. and Hawkins, P.N. (2002) Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, 417: 254-259.
  24. Pepys, M.B., Dash, A.C., Munn, E.A., Feinstein, A., Skinner, M., Cohen, A.S., Gewurz, H., Osmand, A.P. and Painter, R.H. (1977) Isolation of amyloid P component (protein AP) from normal serum as a calcium-dependent binding protein. *Lancet*, i: 1029-1031.
  25. Pontet, M., Engler, R. and Jayle, M.F. (1978) One step preparation of both human C-reactive protein and C1t. *Fed. Eur. Biol. Soc. Lett.*, 88: 172-175.
  26. Pepys, M.B. and Butler, P.J.G. (1987) Serum amyloid P component is the major calcium-dependent specific DNA binding protein of the serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148: 308-313.
  27. Butler, P.J.G., Tennent, G.A. and Pepys, M.B. (1990) Pentraxin-chromatin interactions: serum amyloid P component specifically displaces H1-type histones and solubilizes native long chromatin. *J. Exp. Med.*, 172: 13-18.
  28. Tennent, G.A., Lovat, L.B. and Pepys, M.B. (1995) Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer's disease and systemic amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4299-4303.
  29. de Beer, F.C., Baltz, M., Holford, S., Feinstein, A. and Pepys, M.B. (1981) Fibronectin and C4-binding protein are selectively bound by aggregated amyloid P component. *J. Exp. Med.*, 154: 1134-1149.
  30. Baltz, M.L., Dyck, R.F. and Pepys, M.B. (1985) Studies of the *in vivo* synthesis and catabolism of serum amyloid P component (SAP) in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, 59: 235-242.
  31. Hawkins, P.N., Wootton, R. and Pepys, M.B. (1990) Metabolic studies of radioiodinated serum amyloid P component in normal subjects and patients with systemic amyloidosis. *J. Clin. Invest.*, 86: 1862-1869.

32. Hawkins, P.N., Tennent, G.A., Woo, P. and Pepys, M.B. (1991) Studies *in vivo* and *in vitro* of serum amyloid P component in normals and in a patient with AA amyloidosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 84: 308-316.
33. Goffin, Y.A., Thoua, Y. and Potvlieghe, P.R. (1981) Microdeposition of amyloid in the joints. *Ann. Rheum. Dis.*, 40: 27-33.
34. Sorensen, K.H., Stubbe Teglbjaerg, P., Ladefoged, C. and Christensen, H.E. (1981) Pyrophosphate arthritis with local amyloid deposition. *Acta Orthop. Scand.*, 52: 129-133.
35. Egan, M.S., Goldenberg, D.L., Cohen, A.S. and Segal, D. (1982) The association of amyloid deposits and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 25: 204-208.
36. Ladefoged, C. (1982) Amyloid deposits in human hip joints. A macroscopic, light and polarization microscopic and electron microscopic study of congophilic substance with green dichroism in hip joints. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect.*, 90: 5-10.
37. Ladefoged, C., Christensen, H.E. and Sorensen, K.H. (1982) Amyloid in osteoarthritic hip joints. Deposition in cartilage and capsule. Semiquantitative aspects. *Acta Orthop. Scand.*, 53: 587-590.
38. Ladefoged, C. (1983) Amyloid in osteoarthritic hip joints: deposits in relation to chondromatosis, pyrophosphate, and inflammatory cell infiltrate in the synovial membrane and fibrous capsule. *Ann. Rheum. Dis.*, 42: 659-664.
39. Takeda, T., Sanada, H., Ishii, M., Matsushita, M., Yamamuro, T., Shimizu, K. and Hosokawa, M. (1984) Age-associated amyloid deposition in surgically-removed herniated intervertebral discs. *Arthritis Rheum.*, 27: 1063-1065.
40. Bartley, C.J., Orford, C.R. and Gardner, D.L. (1985) Amyloid in ageing articular cartilage. *J. Pathol.*, 145: 107A.
41. Cary, N.R.B. (1985) Clinicopathological importance of deposits of amyloid in the femoral head. *J. Clin. Pathol.*, 38: 868-872.
42. Mitrovic, D.R., Stankovic, A., Quintero, M. and Ryckewaert, A. (1985) Amyloid deposits in human knee and hip joints. *Rheumatol. Int.*, 5: 83-89.
43. Ladefoged, C. (1986) Amyloid deposits in the knee joint at autopsy. *Ann. Rheum. Dis.*, 45: 668-672.
44. Lakhanpal, S., Li, C.Y., Gertz, M.A., Kyle, R.A. and Hunder, G.G. (1987) Synovial fluid analysis for diagnosis of amyloid arthropathy. *Arthritis Rheum.*, 30: 419-423.

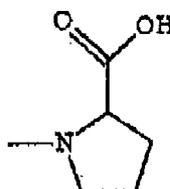
45. Hamazaki, H. (1987)  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated association of human serum amyloid P component with heparan sulfate and dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.*, 262: 1456-1460.
46. Breathnach, S.M., Kofler, H., Sepp, N., Ashworth, J., Woodrow, D., Pepys, M.B. and Hintner, H. (1989) Serum amyloid P component binds to cell nuclei *in vitro* and to *in vivo* deposits of extracellular chromatin in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.*, 170: 1433-1438.
47. Hintner, H., Booker, J., Ashworth, J., Auböck, J., Pepys, M.B. and Breathnach, S.M. (1988) Amyloid P component binds to keratin bodies in human skin and to isolated keratin filament aggregates *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.*, 91: 22-28.
48. Ying, S.-C., Gewurz, A.T., Jiang, H. and Gewurz, H. (1993) Human serum amyloid P component oligomers bind and activate the classical complement pathway via residues 14-26 and 76-92 of the A chain collagen-like region of C1q. *J. Immunol.*, 150: 169-176.
49. Butler, P.J.G. (1983) The folding of chromatin. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 15: 57-91.
50. de Haas, C.J.C., van Leeuwen, E.M.M., van Bommel, T., Verhoef, J., van Kessel, K.P.M. and van Strijp, J.A.G. (2000) Serum amyloid P component bound to gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation. *Infect. Immun.*, 68: 1753-1759.

REIVINDICACIONES

1.- El uso de D-prolina de fórmula:



en la que R es



5

y el grupo

R<sup>1</sup> es hidrógeno o halógeno;

X-Y-X' es un enlazador que tiene al menos 4, de manera ventajosa al menos 5, de manera ventajosa al menos 6, hasta 20 átomos de carbono de cadena lineal o sencilla, en la que

10 X es  $-(CH_2)_n-$ ;  $-CH(R^2)(CH_2)_n-$ ;  $CH_2O(CH_2)_n-$ ;  $CH_2NH-$ ; bencilo;  $-C(R^2)=CH-$ ;  $-CH_2-CH(OH)-$  o tiazol-2,5-diilo;

15 Y es  $-S-S-$ ;  $-(CH_2)_n-$ ;  $-O-$ ;  $-NH-$ ;  $-N(R^2)-$ ;  $-CH=CH-$ ;  $-NHC(O)NH-$ ;  $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$ ;  $-N[CH_2C_6H_3(OCH_3)_2]-$ ;  $-N(CH_2C_6H_5)-$ ;  $N(CH_2C_6H_5)C(O)N(CH_2C_6H_5)-$ ;  $-N(\text{alcoxilalquilo})-$ ;  $N(\text{cicloalquil-metilo})-$ ; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno ó 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno, en el que los grupos fenileno se encuentran sustituidos de manera opcional por 1-4 sustituyentes, escogidos entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi,  $-COO-$ alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazol (ácido 2-carboxílico pirrolidin-1-il)-2-oxo-etoxi, N-hidroxycarbamimidilo, 5-oxo[1,2-oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxotiadiazolilo, 5-tioxo[1,2,4]oxadiazolilo y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxadiazolilo;

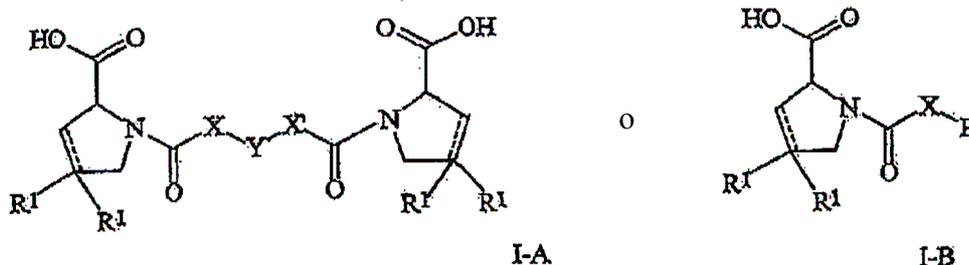
20 X' es  $-(CH_2)_n-$ ;  $-(CH_2)_n-CH(R^2)-$ ;  $-(CH_2)_nOCH_2-$ ,  $-NHCH_2-$ ; bencilo;  $-CH=C(R^2)-$ ;  $CH(OH)CH_2$ ; o tiazol-2,5-diilo;

R<sup>2</sup> es alquilo inferior, alcoxi inferior o bencilo y

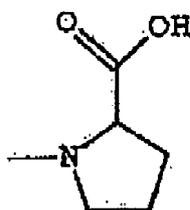
n es 0-3.

25 o una de sus sales aceptables farmacéuticamente o de sus mono-o o diésteres que son capaces de inhibir la unión del ligando SAP o la disminución de SAP en el plasma de una persona, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de osteoartritis en la persona.

2. Una D-prolina de fórmula:



en la que R es



y el grupo

5  $R^1$  es hidrógeno o halógeno;

X-Y-X' es un enlazador que tiene al menos 4, de manera ventajosa al menos 5, de manera ventajosa al menos 6, hasta 20 átomos de carbono de cadena lineal o sencilla, en la que

X es  $-(CH_2)_n-$ ;  $-CH(R^2)(CH_2)_n-$ ;  $CH_2O(CH_2)_n-$ ;  $CH_2NH-$ ; bencilo;  $-C(R^2)=CH-$ ;  $-CH_2-CH(OH)-$  o tiazol-2,5-diilo;

10 Y es  $-S-S-$ ;  $-(CH_2)_n-$ ;  $-O-$ ;  $-NH-$ ;  $-N(R^2)-$ ;  $-CH=CH-$ ;  $-NHC(O)NH-$ ;  $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$ ;  $-N[CH_2C_6H_3(OCH_3)_2]-$ ;  $-N(CH_2C_6H_5)-$ ;  $N(CH_2C_6H_5)C(O)N(CH_2C_6H_5)-$ ;  $-N(\text{alcoxilalquilo})-$ ;  $N(\text{cicloalquil-metilo})-$ ; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno ó 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno, en el que los grupos fenileno se encuentran sustituidos de manera opcional por 1-4 sustituyentes, escogidos entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi,  $-COO-$ alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazol (ácido 2-carboxílico pirrolidin-1-il)-2-oxo-etoxi, N-hidroxicarbamimidilo, 5-oxo[1,2-oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxotiadiazolilo, 5-tioxo[1,2,4]oxadiazolilo y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxadiazolilo;

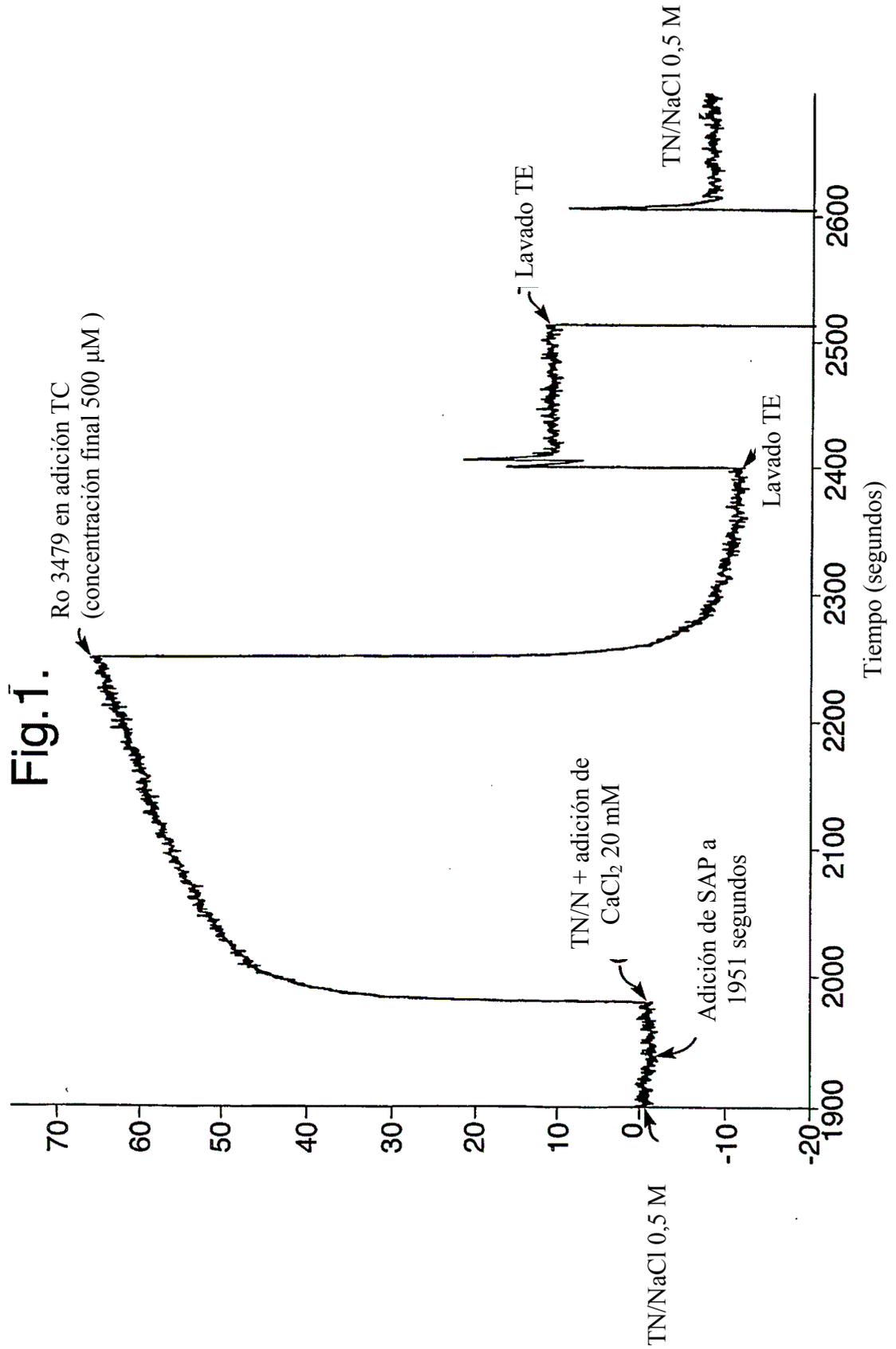
X' es  $-(CH_2)_n-$ ;  $-(CH_2)_n-CH(R^2)-$ ;  $-(CH_2)_nOCH_2-$ ,  $-NHCH_2-$ ; bencilo;  $-CH=C(R^2)-$ ;  $CH(OH)CH_2$ ; o tiazol-2,5-diilo;

$R^2$  es alquilo inferior, alcoxi inferior o bencilo y

20 n es 0-3.

o una de sus sales aceptables farmacéuticamente o uno de sus mono- o diésteres que son capaces de inhibir la unión del ligando SAP o la disminución de SAP en el plasma de una persona, para su uso en el tratamiento o la prevención de osteoartritis en la persona.

25 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o una D-prolina de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la D-prolina es ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidin-2-carboxílico.



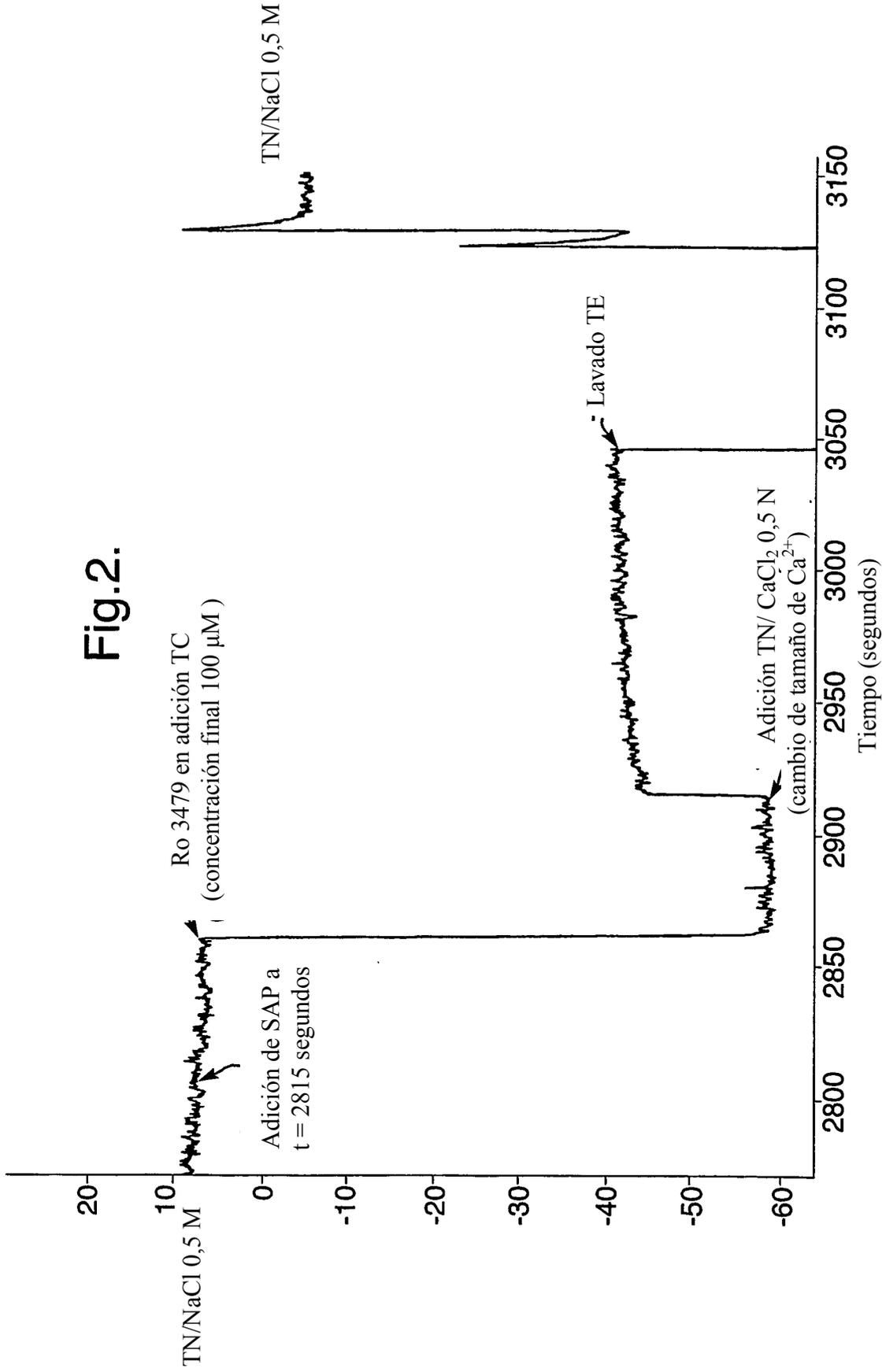


Fig.3.

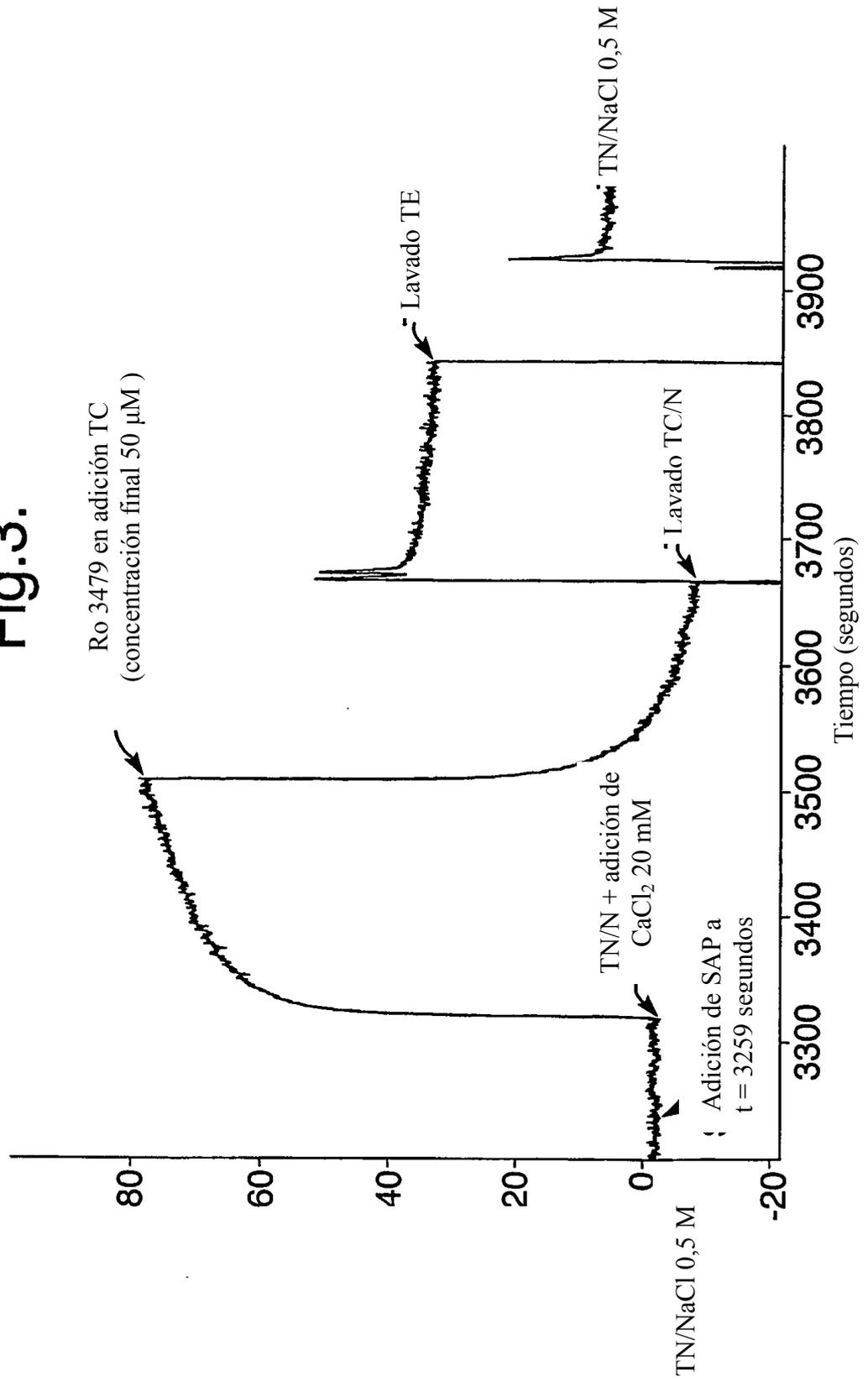


Fig.4.

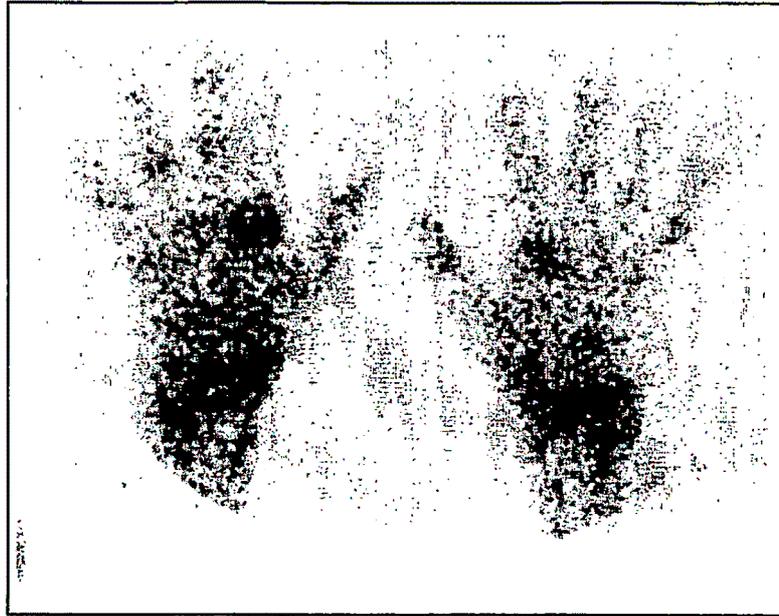


Fig.5.

