

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 586**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4425 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08719457 .7**

96 Fecha de presentación: **25.02.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2124946**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **Uso de derivados de N-metil-piridinio para hepatoprotección**

30 Prioridad:
28.02.2007 PL 38186207

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2012

73 Titular/es:
Hependo Sp. z.o.o.
ul. Bobrzynskiego 14
30-348 Kraków , PL

72 Inventor/es:
GEBICKI, Jerzy;
MARCINEK, Andrzej;
CHLOPICKI, Stefan y
ADAMUS, Jan

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

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).

ES 2 388 586 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de derivados de N-metil-piridinio para hepatoprotección

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de piridinio cuaternario de fórmula (I) para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones asociadas con una lesión hepática.

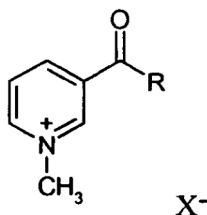
La divulgación se basa en la capacidad única de compuestos de piridinio cuaternario para estimular la producción endógena y la liberación de prostaciclina PGI_2 en el endotelio vascular, lo que puede producir efectos terapéuticos en enfermedades asociadas con disfunción endotelial, estrés oxidativo y producción insuficiente de PGI_2 endotelial, así como en las afecciones que aumentan el riesgo de incidencia de dichas enfermedades (efecto vasoprotector). El uso de dichos compuestos puede proporcionar efectos terapéuticos curativos y preventivos, entre otras enfermedades, en diabetes, síndrome metabólico, aterosclerosis y también en lesiones hepáticas (efecto hepatoprotector).

Técnica anterior

Existe la evidencia creciente de que la disfunción endotelial desempeña un papel clave en la formación y progresión de placa aterosclerótica, así como en el desarrollo de diabetes y complicaciones diabéticas. La disfunción endotelial ha ganado recientemente importancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica en aterotrombosis y diabetes (Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-2678; Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899-1906; Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberoberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104:191-196; Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Longterm follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101:948-954), de Jager J, Dekker JM, Kooy A, Kostense PJ, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM y col.: Endothelial dysfunction and low-grade inflammation explain much of the excess cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26, 1086-1093).

La disfunción del endotelio se define como una afección funcional del endotelio que se caracteriza por la deficiencia de factores vasoprotectores y el aumento de la producción de factores procoagulantes y proinflamatorios (Chlopicki S, *Kardiologia po Dyplomie*, 2005, Vol. 4 N° 5, 77-88). Clínicamente, la disfunción endotelial se identifica como la deficiencia de la actividad biológica de NO, que se diagnostica como una deficiencia de la actividad vasodilatadora de NO. Es posible realizar un seguimiento de la biodisponibilidad de NO mediante mediciones de la función vasoconstrictora dependiente de NO del endotelio *in vivo* (Chlopicki S, *Kardiologia po Dyplomie*, 2005, Vol. 4 N° 5, 75-81). La deficiencia de la actividad de NO coincide con estrés oxidativo (Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-2678) y al alteración de la síntesis de PGI_2 (Kyrle PA, Minar E, Brenner B, Eichler HG, Heisteringer M, Marosi L, Lechner K. Thromboxane A2 and prostacyclin generation in the microvasculature of patients with atherosclerosis - effect of low-dose aspirin. *Thromb Haemost* 1989;61:374-377), aunque los niveles sistémicos de PGI_2 pueden ser elevados. De hecho, se ha propuesto que la peroxidación aumentada de lípidos podría fomentar el desarrollo de aterosclerosis debido a la deficiencia selectiva de la síntesis de prostaciclina en células endoteliales y la subsiguiente activación de plaquetas (Gryglewski RJ. Prostacyclin and atherosclerosis. *TIPS* 1980;1: 164-168; Gryglewski RJ. Prostaglandins, platelets, and atherosclerosis. *CRC Crit Rev Biochem* 1980;7:291-338; Gryglewski RJ, Szczeklik A. Prostacyclin and atherosclerosis - experimental and clinical approach. 1983; 213-226). Este concepto se apoyó después experimentalmente. Es evidente, actualmente, que la deficiencia de la síntesis de PGI_2 en el endotelio puede conducir a una estimulación excesiva de receptores TP en células del endotelio y del músculo liso vascular por medio de TXA_2 , PGH_2 u otros eicosanoides. Dichos mecanismos conducen a la subsiguiente vasoconstricción, activación de plaquetas, respuesta inflamatoria del endotelio, así como a apoptosis endotelial (Chlopicki S, Gryglewski RJ. Endothelial secretory function and atherothrombosis in "The Eicosanoids", capítulo 23, 267-276. ed. P. Curtis-Prior, John Wiley and Sons, Ltd, 2004). Esto significa que la deficiencia de la síntesis de PGI_2 en el endotelio puede desencadenar o potenciar procesos inflamatorios o trombóticos en la pared vascular que actualmente se considera que son los elementos clave de la aterosclerosis. La disfunción endotelial también desempeña un papel clave en el desarrollo de la diabetes (de Jager J, Dekker JM, Kooy A, Kostense PJ, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM y col.: Endothelial dysfunction and low-grade inflammation explain much of the excess cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26, 1086-1093). Por lo tanto, el resultado de la capacidad de determinadas sales de piridinio cuaternario para estimular la síntesis endotelial de PGI_2 puede ser sus efectos potenciales antiescleróticos y antidiabéticos. De forma similar, en muchas otras enfermedades en las que la disfunción endotelial desempeña un papel en la patogénesis, la mejora farmacológica de la síntesis de PGI_2 en el endotelio causada por dichos compuestos puede conllevar efectos terapéuticos. Algunas de las sales de piridinio cuaternario también pueden tener efectos terapéuticos en enfermedades que responden a análogos de prostaciclina tales como, por ejemplo, lesiones hepáticas, hipertensión pulmonar y cicatrización de heridas.

El uso de sales de piridinio cuaternario de la fórmula:



en la que R es un grupo NH_2 , CH_3 o $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$, y X es un contraión farmacéuticamente aceptable, para la preparación de un agente vasoprotector para el tratamiento o la prevención de afecciones o enfermedades asociadas con disfunción del endotelio vascular, estrés oxidativo y/o producción insuficiente de prostaciclina PGI_2 endotelial se describe en el documento WO2005/067927. En particular, se demostró la actividad antiateroesclerótica y trombolítica de los compuestos de la fórmula anterior.

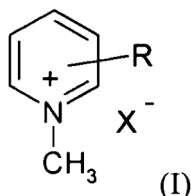
En publicaciones de R. Stadler y col. en w J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 1192-1199 y 1200-1206 se informó de productos de la descomposición de trigonelina formados durante el tueste de café. Según se informó, la mayor parte de productos no volátiles de la pirólisis de trigonelina fueron compuestos de 1-metilpiridina y dialquilpiridinio. Se sugirió una actividad potencial anticancerosa de compuestos de alquilpiridinio, especialmente de 1-metilpiridina.

Divulgación de la invención

El objetivo de la presente invención era proporcionar un agente terapéutico nuevo que tuviera actividad hepatoprotectora y, por lo tanto, una utilidad potencial para el tratamiento y la prevención de lesiones hepáticas de distintos orígenes.

Se ha hallado inesperada y sorprendentemente que algunos compuestos que se forman durante el proceso de descomposición térmica de la trigonelina muestran actividad hepatoprotectora debido a su capacidad para mejorar la función endotelial mediante la estimulación de la liberación de prostaciclina endógena.

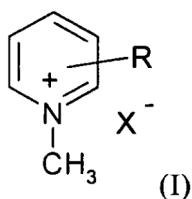
En consecuencia, un objeto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula (I)



en la que R representa un átomo de hidrógeno o CH_3 y X representa un contraión fisiológicamente aceptable, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones asociadas con una lesión hepática.

El objeto de la invención también es el uso de un compuesto tal como se ha definido anteriormente en el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones asociadas con una lesión hepática.

Dicho tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones asociadas con una lesión hepática comprende la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento o prevención de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I)



en la que R representa un átomo de hidrógeno o CH_3 y X representa un contraión fisiológicamente aceptable.

Breve descripción de las figuras de los dibujos

Fig. 1: muestra el esquema del procedimiento de detección de la acción trombolítica de fármacos en ratas *in vivo*.

5 Fig. 2: ilustra la falta de respuesta trombolítica significativa después de la administración intravenosa de nicotinamida o ácido nicotínico (30 mg/kg) *in vivo*.

Fig. 3: ilustra la falta de respuesta trombolítica significativa después de la administración intravenosa de trigonelina *in vivo* (30 mg/kg).

Fig. 4: muestra la respuesta trombolítica inducida por la administración intravenosa de termolisado de trigonelina *in vivo* (30 mg/kg).

10 Fig. 5: muestra la respuesta trombolítica *in vivo* inducida por la administración intravenosa de cloruro de 1-metilpiridinio (30 mg/kg) (registro superior) y cloruro de 1,4-dimetilpiridinio (30 mg/kg) (registro inferior).

Fig. 6: muestra el efecto de termolisado de trigonelina sobre hiperglucemia postprandial en comparación con metformina y control no tratado.

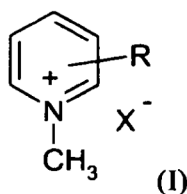
Fig. 7: muestra el efecto hepatoprotector de cloruro de 1,4-dimetilpiridinio *in vivo*.

15 Tal como se ha definido anteriormente, X⁻ puede ser cualquier anión orgánico o inorgánico fisiológicamente aceptable, es decir, un anión que carece de cualquier efecto tóxico o perjudicial de cualquier otra forma para el organismo, en particular aceptable para administración oral en dosis terapéuticas.

20 Ejemplos no limitantes de aniones inorgánicos adecuados fisiológicamente aceptables son cloruro, bromuro, yoduro y carbonato. Ejemplos no limitantes de aniones orgánicos adecuados fisiológicamente aceptables son aniones de ácidos mono-, di- y tricarboxílicos, por ejemplo acetato, benzoato, salicilato, hidroxiacetato, lactato, malonato y citrato, etc.

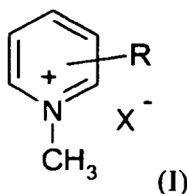
El anión fisiológicamente aceptable preferente es el cloruro.

En una de las realizaciones el compuesto tiene la fórmula



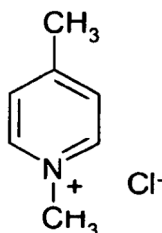
25 en la que R representa un átomo de hidrógeno o CH₃ en la posición 2 ó 4 del anillo de piridina.

Una de las realizaciones preferentes es el compuesto de la fórmula

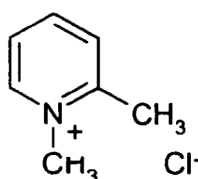


en la que R representa CH₃ en la posición 4 del anillo de piridina.

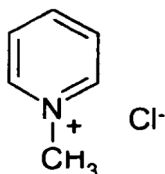
30 Compuestos particulares útiles en el procedimiento de la invención son sales de 1,4-dimetilpiridina, especialmente cloruro, lactato o citrato, siendo especialmente ventajoso el cloruro de 1,4-dimetilpiridina de la fórmula:



Otros compuestos particulares útiles en el procedimiento de la invención son sales de 1,2-dimetilpiridina, especialmente cloruro, lactato o citrato, siendo especialmente ventajoso el cloruro de 1,2-dimetilpiridina de la fórmula:



Otros compuestos particulares más útiles en el procedimiento de la invención son sales de 1-metilpiridina, especialmente cloruro, lactato o citrato, siendo especialmente ventajoso el cloruro de 1-metilpiridina de la fórmula:



Los compuestos de piridinio de fórmula (I) pueden obtenerse por síntesis química usando técnicas convencionales conocidas por el experto en la técnica de la síntesis orgánica.

Dichos compuestos pueden obtenerse, por ejemplo, partiendo de los compuestos conocidos correspondientes no sustituidos con grupos metilo en el átomo de nitrógeno del anillo de piridina, es decir, en la posición 1 del anillo de piridina. Cuando X^- representa un ión halogenuro, los compuestos de la fórmula (I) pueden obtenerse mediante la metilación directa con halogenuro de metilo a partir de materiales de partida no sustituidos con grupos metilo en el átomo de nitrógeno, de un modo conocido de por sí. Los compuestos en los que X^- representa un anión cloruro pueden obtenerse, por ejemplo, tratando con cloruro de metilo un compuesto de partida no sustituido con un grupo metilo en la posición 1, tal como se describe, por ejemplo, en los documentos AT 131.118, GB348345, US 3.614.408 y US 4.115.390.

Los compuestos en los que X^- es un anión distinto a un halogenuro pueden obtenerse por intercambio del anión halogenuro por otro anión, por ejemplo mediante tratamiento con una sal de dicho otro anión, por ejemplo sal de plata. Por ejemplo, pueden obtenerse lactatos o acetatos de los compuestos anteriores tratando un halogenuro, preferentemente un cloruro, con una sal de otro anión, por ejemplo sal de plata. Por ejemplo, pueden obtenerse lactatos o acetatos de los compuestos anteriores tratando un halogenuro, preferentemente un cloruro, con lactato o acetato de plata, respectivamente.

Los compuestos anteriores de fórmula (I) se producen en un procedimiento de descomposición térmica (termólisis) de trigonelina (sal de 3-carboxi-1-metilpiridinio de ácido N-metilnicotínico). Por lo tanto, pueden obtenerse también compuestos individuales de fórmula (I) mediante la separación de los productos de pirólisis de trigonelina (termolisado), obtenidos, por ejemplo, por pirólisis en atmósfera exenta de oxígeno a aproximadamente 220 °C.

Se ha hallado que los compuestos de piridinio definidos anteriormente poseen propiedades farmacológicas únicas debido a su capacidad para liberar prostaciclina (PGI_2) endógena desde el endotelio. Por consiguiente, los compuestos ejercen una actividad hepatoprotectora en el tratamiento o la prevención de lesiones hepáticas.

Dicha lesión hepática puede ser, en particular, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática crónica o cirrosis hepática.

Dicha lesión hepática puede ser también una lesión hepática inducida por fármacos provocada por el uso de medicamentos, tales como esteroides, agentes antifúngicos, antibióticos, inmunosupresores, etc. La composición que comprende dichos compuestos de piridinio puede usarse profilácticamente para proteger el hígado en el caso de tomar medicamentos que tienen efectos secundarios hepatotóxicos. Dicha lesión hepática puede ser también una lesión inducida por el alcohol provocada por el abuso de alcohol, una lesión hepática tóxica provocada por productos químicos tóxicos, tales como, por ejemplo, disolventes, incluido tetracloruro de carbono, cloroformo o por plaguicidas, o una lesión hepática provocada por hepatitis vírica.

- 10 La dosificación dependerá de la afección o enfermedad que se va a tratar, del tipo de tratamiento (terapéutico o preventivo), el estado y la edad del paciente que se va a tratar y debería ser determinada en última instancia individualmente por un médico. Generalmente, la cantidad del compuesto de piridinio o mezcla de compuestos de piridinio administrados debería estar en el intervalo de 0,1 a 10000 mg para su administración en una dosis única o en dosis divididas, por ejemplo de 0,5 mg a 1,125 mg, de 1 mg a 1100 mg, de 1,25 mg a 1075 mg, de 1,5 mg a 1050 mg, de 2,0 mg a 1025 mg, de 2,5 mg a 1000 mg, de 3,0 mg a 975 mg, de 3,5 mg a 950 mg, de 4,0 mg a 925 mg, de 4,5 mg a 900 mg, de 5 mg a 875 mg, de 10 mg a 850 mg, de 20 mg a 825 mg, de 30 mg a 800 mg, de 40 mg a 775 mg, de 50 mg a 750 mg, de 100 mg a 725 mg, de 200 mg a 700 mg, de 300 mg a 675 mg, de 400 mg a 650 mg, 500 mg o de 525 mg a 625 mg. En otra realización, la cantidad de compuesto(s) de piridinio incluida en la composición administrada debería ser de 0,1 mg a 25 mg. En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto(s) de piridinio incluida en la composición administrada debería ser inferior a 100 mg, o inferior a 80 mg, o inferior a 60 mg, o inferior a 50 mg, o inferior a 30 mg, o inferior a 20 mg, o inferior a 10 mg, o inferior a 5 mg, o inferior a 2 mg, o inferior a 0,5 mg.

- 25 Según la invención las sales de piridinio tal como se han definido anteriormente pueden administrarse como composiciones farmacéuticas o suplementos dietéticos en forma de administración oral o ingestión. Dichas formas pueden incluir productos farmacéuticos convencionales. Las formas para administración oral, tales como comprimidos, cápsulas duras y blandas, polvos, soluciones, suspensiones, etc., incluirán excipientes (ingredientes no activos) usados típicamente en la técnica de la formulación de formas farmacéuticas de dosificación, tales como vehículos, cargas, coadyuvantes de formación de comprimidos, agentes saborizantes, etc. Cada uno de tales excipientes debe ser "aceptable", es decir, debe ser compatible con otros ingredientes de la formulación, en particular con el ingrediente activo y no debe ser nocivo para el paciente. Ejemplos no limitantes de dichos materiales que pueden usarse como vehículos y cargas farmacéuticamente aceptables son: azúcares tales como lactosa, glucosa o sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata, celulosa y derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, acetato de celulosa, celulosa microcristalina; tragacanto; polivinilpirrolidona; fosfato de calcio. La formulación para administración oral también puede incluir lubricantes y agentes mejoradores de flujo tales como estearatos, por ejemplo estearato de magnesio, talco o sílice; agentes disgregantes tales como, por ejemplo, almidón glicolato de sodio. Los comprimidos pueden estar recubiertos con recubrimientos convencionales o recubrimientos de liberación mantenida.

- 40 Las formulaciones líquidas para la administración oral incluyen soluciones, jarabes y suspensiones. El vehículo adecuado es agua. Pueden incluir también conservantes convencionales que se usan típicamente para inhibir el crecimiento de microorganismos tales como, por ejemplo, parabenos, ácido ascórbico, timerosal, ácido sórbico, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo, etc.

- 45 Los compuestos también pueden administrarse parenteralmente en forma de inyecciones intravenosas o subcutáneas. Vehículos adecuados son agua exenta de pirógenos, solución salina isotónica, solución de Ringer, vehículos oleaginosos y otras sustancias no tóxicas que se usan para la formulación de formas farmacéuticas de dosificación. Pueden incluir agentes de isotonicidad tales como cloruro de sodio, azúcares o alcoholes polihidroxílicos tales como manitol o sorbitol, y estabilizantes o conservantes.

- 50 Los compuestos también pueden administrarse por inhalación, especialmente en el caso del tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En particular, los compuestos pueden administrarse por inhalación en forma de un polvo micronizado o un aerosol pulverizado. También pueden administrarse intranasalmente en forma de un aerosol pulverizado. También se contempla la administración rectal de los compuestos en el procedimiento de la invención, en forma de cremas, pomadas o supositorios. En cualquier caso, la formulación incorporará excipientes y vehículos adecuados para una forma de dosificación dada.

Las formas de dosificación indicadas anteriormente no limitan de ningún modo la forma de administración de los compuestos de piridinio o de las composiciones que los contienen.

- 55 Las descripciones de formulaciones típicas y convencionales, técnicas para su preparación y excipientes se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21 Ed., 2005.

Para su uso tal como se define en la invención los compuestos de piridinio pueden formularse como suplementos dietéticos. Los compuestos de piridinio pueden administrarse según la invención añadiéndose a productos

nutriciones de cualquier forma, típicamente en cantidades de al menos el 5 % en peso del producto nutricional, sin estar limitados a los contenidos dados.

Como ejemplos no limitantes, los productos nutricionales pueden estar en forma de un líquido, emulsión o pasta tal como bebidas, incluidos refrescos y bebidas alcohólicas, bebidas lácteas, productos lácteos tales como yogures.

- 5 Otro ejemplo pueden ser productos sólidos tales como, por ejemplo, caramelos, chicles, gelatinas, chocolates y productos en polvo, por ejemplo bebidas en polvo para su disolución en agua antes del consumo.

Para su uso según la invención los compuestos de piridinio también pueden añadirse a suplementos vitamínicos en forma sólida, tales como comprimidos, cápsulas, polvos para disolución, o a bebidas que contienen además del compuesto de fórmula (I) ingredientes típicos de suplementos vitamínicos.

- 10 Los ejemplos siguientes ilustran el uso y la actividad farmacológica de compuestos de piridinio según la invención.

Ejemplo 1

Preparación de termolisado de trigonelina

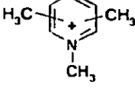
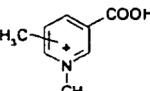
El termolisado de trigonelina se preparó por degradación térmica (pirólisis) de trigonelina a 220 °C durante 30 minutos. La trigonelina (en forma de una capa fina de cristales) se pirolizó en una ampolla de vidrio de pared delgada rellena con argón.

- 15 La mezcla resultante de los productos de pirólisis se disolvió en agua, la solución se filtró y se extrajo con cloroformo. Se eliminó el agua por destilación usando un evaporador rotatorio y el residuo se secó sobre pentóxido de fósforo.

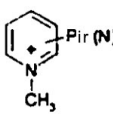
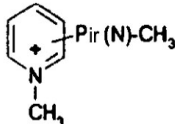
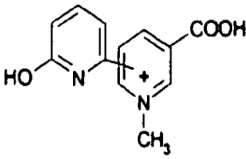
La mezcla resultante de los productos de pirólisis se disolvió en agua, la solución se filtró y se extrajo con cloroformo. Se eliminó el agua por destilación usando un evaporador rotatorio y el residuo se secó sobre pentóxido de fósforo.

- 20 Más adelante se muestran los análisis preliminares de los productos de pirólisis (termolisado) mediante técnicas de espectroscopia de masas ToF-SIMS (espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo).

Tabla 1. Análisis SIMS: composición de termolisado de trigonelina; compuestos identificados

Producto	Estructura	m/e	Intensidad de pico
C_5H_5N		79	9265
C_5H_5NH		80	3305
$C_5H_5NCH_3$		94	480657
$CH_3(C_5H_4)NCH_3$		108	14580
$CH_3CH_3(C_5H_3)NCH_3$		122	3472
$COOH(C_5H_4)NCH_3$		138	87964
$CH_3COOH(C_5H_3)NCH_3$		152	25725

(continuación)

Producto	Estructura	m/e	Intensidad de pico
CH ₃ Npir-pirN		171	31922
CH ₃ Npir-pirNCH ₃		186	2206
OHpir-COOH(C ₅ H ₃)NCH ₃		231	30048

El producto principal de la pirolisis es probablemente el catión 1-metilpiridinio, que es predominante en el espectro. Otros productos presentes en cantidades significativas son los cationes 1,2- y 1,4-dimetilpiridinio, y cationes de: metiltrigonelina, (2'-hidroxipiridina)trigonelina, N-metil(piridina)-piridinio y N-metil(N'-metilpiridina)piridinio.

Ejemplo de referencia 2

Unión de cationes de piridinio a heparina inmovilizada como indicadora de respuesta trombolítica

Investigaciones realizadas por los inventores indicaron una fuerte correlación entre la unión de compuestos de interés a heparina que podría estar relacionada con la presencia del catión piridinio cargado positivamente en su estructura y la actividad trombolítica de los compuestos. Ni la unión ni la actividad trombolítica se observaron para derivados de piridina no cargados, como, por ejemplo, otros metabolitos de nicotinamida.

La presencia de la heparina en la solución de sal de piridinio cambia el espectro de absorción de la sal mediante las interacciones electrostáticas no específicas de cationes de piridinio con restos heparina cargados negativamente. El uso de heparina inmovilizada en sefarosa insoluble en agua que se une a alguna fracción de cationes piridinio causa la disminución de la concentración de la sal en la solución. Debe indicarse que el agente que la sefarosa que inmoviliza al agente no se une con cationes piridinio.

A un gran exceso de heparina inmovilizada con respecto a la concentración de la sal de piridinio, el grado de unión depende sólo de la concentración de heparina. Esto permite, usando la metodología experimental que se describe más adelante, estimar el grado de unión de diferentes compuesto de piridinio a la heparina, siempre que se usen concentraciones analógicas de sales de piridinio y una concentración constante de heparina inmovilizada en sefarosa.

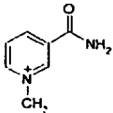
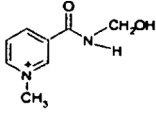
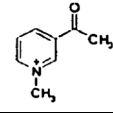
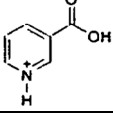
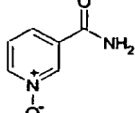
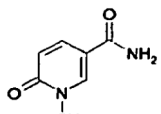
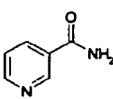
Metodología de la medición de la unión de cationes piridinio a heparina inmovilizada

Para estimar el grado de unión de los compuestos de piridinio con heparina se usaron procedimientos espectrofotométricos basados en las mediciones de absorción de soluciones acuosas de compuestos analizados a 20 ÷ 100 µM antes y después de ponerlas en contacto con la heparina.

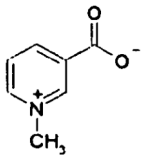
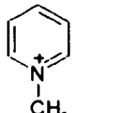
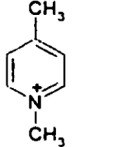
Se añadieron soluciones acuosas de compuestos analizados a la suspensión de heparina inmovilizada (Heparin Sepharose CL-6B, Amersham Biosciences AB, Suecia) (25 mg/ml) en agua ultrapura del sistema Millipore-Milli-Q y se incubaron durante 5 minutos. Las suspensiones de heparina inmovilizada con los compuestos analizados se dispusieron en microtubos Eppendorf y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 4 minutos usando microcentrifugadoras FORCE 1418 de Labnet Int. (Edison, NJ, Estados Unidos). Los espectros de absorción UV-visible de los sobrenadantes claros resultantes se midieron con espectrofotómetros Perkin Elmer Lambda 40. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. El grado de unión se estimó en base a la comparación del área integrada bajo la curva de absorción para las soluciones incubadas y no puestas en contacto con heparina.

Los resultados de compuestos de piridinio y metabolitos de nicotinamida seleccionados se presentan en las tablas 2 y 3 siguientes.

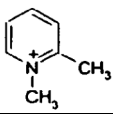
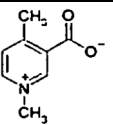
Tabla 2. Grado de unión de sales de piridinio sustituidas en la posición 3 y metabolitos de nicotinamida seleccionados con actividad antitrombótica conocida a heparina inmovilizada en sefarosa

Compuesto	Grado de unión	Respuesta trombolítica	
	1-metilnicotinamida MNA ⁺	> 45 %	sí
	1-metil-N'-(hidroximetil) nicotinamida MNAF ⁺	> 35 %	sí
	1-metil-3-acetilpiridina MAP ⁺	> 25 %	sí
	ácido nicotínico NC	> 40 %	no
	N-óxido de nicotinamida NOX	> 10 %	-
	1-metil-2-piridona-5- carboxamida 2-PYR	> 5 %	no
	nicotinamida NA	≈ 0 %	no

5 Tabla 3. Grado de unión de trigonelina y sus productos de descomposición térmica a heparina inmovilizada en sefarosa

Catión de piridinio		Grado de unión	Respuesta trombolítica
	trigonelina Tryg	0%	no
	1-metilpiridina MP ⁺	> 25%	sí
	1,4-dimetilpiridina 14-DMP ⁺	> 20%	sí

(continuación)

Catión de piridinio		Grado de unión	Respuesta trombolítica
	1,2-dimetilpiridina 12-DMP ⁺	> 15%	-
	4-metiltrigonelina 4MeTryg	> 5%	-

Los resultados presentados en la tabla 3 muestran que las sales de piridinio cuaternario definidas anteriormente tienen una tendencia a unirse a heparina que puede implicar su capacidad para interactuar con la superficie del endotelio vascular y se tienen en cuenta para su efecto terapéutico. El efecto terapéutico, especialmente la respuesta trombolítica de los compuestos presentados en la tabla 2 está bien documentada (véase el documento de patente WO 2005/067927 A2) y se opone a propiedades no enlazantes de otros metabolitos de nicotinamida no cargados, que no muestran ninguna actividad antitrombótica significativa.

Puede concluirse que es muy probable esperar una respuesta trombolítica fuerte para todos los productos catiónicos presentes en el termolisado de trigonelina. En el caso de dos compuestos, 1-metilpiridina y 1,4-dimetilpiridina, su unión a heparina está acompañada por un efecto antitrombótico *in vivo*. Aunque no puede esperarse la correlación sencilla entre estos efectos, los resultados obtenidos hasta la fecha indican la falta de respuesta trombolítica de compuestos que no se unen a heparina (tabla 2). El factor esencial en las interacciones electrostáticas no específicas de polianiones con el catión es la presencia de carga positiva en el átomo de nitrógeno del anillo de piridinio. Compuestos con sustituyentes estéricamente grandes en el nitrógeno del anillo, por ejemplo, grupos propilo o bencilo, se unen más débilmente con heparina en comparación con sus análogos sustituidos con N-metilo, o no se unen en absoluto. En el caso de compuestos iónicos bipolares (por ejemplo, trigonelina) la carga negativa de la molécula puede neutralizar el efecto de unión del anillo de piridinio cargado positivamente.

Ejemplo de referencia 3

Medición de efectos trombolíticos de termolisados de trigonelina

La actividad trombolítica se analizó mediante el procedimiento desarrollado originalmente por Gryglewski y col., (Gryglewski RJ, Korbut R, Ocetkiewicz A, Stachura J. *In vivo* method for quantitation for anti-platelet potency of drugs. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1978;302:25-30; Gryglewski RJ 1978, Gryglewski y col., 2001). El esquema del procedimiento se muestra en la Fig. 1.

Se anestesiaron (tiopental 95 mg/kg i.p.) ratas Wistar (peso corporal de 300 - 350 g) y se heparinizaron (800 UI/kg i.v.). Se dispusieron cánulas en arterias y se conectaron desde la vena-arteria carótida izquierda con un sensor de presión y desde la arteria carótida derecha mediante una línea calentada (37°C) a una bomba peristáltica. La sangre de la arteria carótida se bombeó a la circulación extracorporea donde superfundió (1,5 ml/min) una tira de colágeno de 3 cm excindida del tendón de Aquiles colgada en una palanca auxotónica equilibrado con muelle de un transductor isotónico Harvard 386 y el peso de la tira de colágeno se registró de forma continua. Después de la superfusión la sangre se llevó de nuevo a la circulación del animal. Durante la superfusión se formó en la superficie de la tira de colágeno un trombo compuesto por agregados de plaquetas apilados en la red de fibrina (visualizado microscópicamente por el procedimiento Weigert). Se registró la presión en el peso del trombo de forma continua.

Después de 20-30 min de superfusión el peso de trombo rico en plaquetas alcanza una meseta a un nivel de aproximadamente 70-100 mg, y este nivel se mantuvo durante 3-5 horas mientras duró la superfusión de sangre, a menos que el compuesto activo se inyectara intravenosamente. Después se inyectaron intravenosamente termolisado de trigonelina, 1-metilpiridina o 1,4-dimetilpiridina en la vena femoral (30 mg · kg⁻¹). Se observó un efecto trombolítico inducido por fármacos en forma de una disminución del peso del trombo.

La inyección intravenosa de termolisado de trigonelina, preparada tal como se ha descrito en el ejemplo 1, indujo una respuesta trombolítica en ratas Wistar con circulación extracorporea. Siguiendo a una única inyección de termolisado de trigonelina (30 mg/kg), se observó una respuesta trombolítica, que alcanzó una meseta del 35 ± 3,5 % después de 30 min y se mantuvo a aproximadamente este nivel durante 2-3 horas. La 1-metilpiridina (30 mg/kg), que es un componente principal de termolisado de trigonelina, también indujo una respuesta trombolítica moderada. La 1,4-dimetilpiridina indujo una respuesta trombolítica que fue similar en magnitud y patrón a la inducida por el termolisado de trigonelina. En contraste con el termolisado de trigonelina, 1-metilpiridina y 1,4-dimetilpiridina, la trigonelina por sí misma (30 mg/kg) no indujo una respuesta trombolítica significativa. Las respuestas trombolíticas de nicotinamida o ácido nicotínico fueron de corta duración (inferior a 15-20 min) y su máximo fue de sólo el 9 ± 0,6 % y el 5 ± 0,9 %, respectivamente. No se observó una respuesta trombolítica de la trigonelina. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Fig 2 a 5.

Ejemplo de referencia 4

Los efectos antidiabéticos de termolisado de trigonelina en el modelo de rata de ratas obesas Zucker (fa/fa) con síndrome metabólico representa ampliamente el modelo usado de obesidad determinada genéticamente, síndrome metabólico y dislipidemia que imita el síndrome metabólico (también llamado síndrome de resistencia a la insulina) que conduce a un desarrollo de diabetes de tipo 2 evidente. El síntoma de diagnóstico de resistencia a la insulina es la hiperglucemia postprandial elevada que pudo inducirse experimentalmente por inyección de glucosa. En seres humanos, la hiperglucemia postprandial elevada precede al desarrollo de diabetes de tipo 2 y representa un factor de pronóstico para complicaciones cardiovasculares de diabetes. Puede observarse hiperglucemia postprandial elevada también en ratas grasas Zucker (fa/fa).

- 5 Se trataron ratas obesas Zucker (fa/fa) (Crl:ZUC(Orl) - Lepra) de una edad de 10 semanas durante 7 días con termolisado de trigonelina (100 mg/kg) (obtenido tal como se ha descrito en el ejemplo 1), con metformina (500 mg/kg) o permanecieron no tratadas (n=3-4 ratas en cada grupo experimental). Después de 7 días se inyectó glucosa a 2 g/kg (i.p.) y se analizó la hiperglucemia postprandial en los periodos siguientes: 0, 15, 30, 60 y 90 minutos después de la inyección de glucosa. Tal como se muestra en la Fig. 6, el tratamiento con termolisado de trigonelina (100 mg/kg) redujo la hiperglucemia postprandial inducida por la inyección de glucosa a un grado similar al caso con metformina (500 mg/kg). En consecuencia, el termolisado de trigonelina posee propiedades antidiabéticas.

- 10 El tratamiento con termolisado de trigonelina no tuvo ningún efecto en los niveles en plasma de triglicéridos o ácidos grasos libres fueron $3,5 \pm 0,2$, $1,3 \pm 0,09$ mmol/l y $4,1 \pm 0,3$, $1,4 \pm 0,07$ mmol/l para ratas control y ratas tratadas con termolisado de trigonelina, respectivamente.

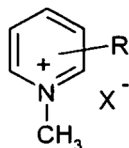
Ejemplo 5

Efectos hepatoprotectores de cloruro de 1,4-dimetilpiridinio en modelo de ratones con lesión hepática aguda.

- 25 Se trataron ratones Balb/c de 2 meses de edad durante 7 días con cloruro de 1,4-dimetilpiridinio (100 mg/kg, por vía oral) o se mantuvieron no tratados y después se inyectó a los ratones concanavalina A (ConA) que induce hepatitis mediada por linfocitos T. Se inyectó ConA intravenosamente a una dosis de 20 mg/kg y 8 horas después se evaluó la lesión hepática sobre la base del nivel de transaminasas (AST) en plasma. Tal como muestra la Fig. 7, el tratamiento con cloruro de 1,4-dimetilpiridinio (100 mg/kg) previno el aumento de niveles de AST después de la inyección de ConA. En consecuencia, el 1,4-dimetilpiridinio posee actividad hepatoprotectora.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I)



(I)

5 en la que R representa un átomo de hidrógeno o CH₃, y X representa un contraión fisiológicamente aceptable, para la preparación de un medicamento hepatoprotector para el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones asociadas con una lesión hepática.

2. Uso según la reivindicación 1 en el que dicha lesión hepática es insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática crónica o cirrosis hepática.

10 3. Uso según la reivindicación 1 en el que dicha lesión hepática es una lesión hepática inducida por fármacos, una lesión hepática inducida por alcohol, una lesión hepática tóxica o una lesión hepática provocada por hepatitis vírica.

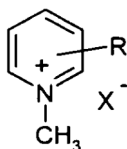
4. Uso según la reivindicación 1 en el que dicho medicamento es para administración oral.

5. Uso según la reivindicación 1 en el que dicho medicamento es para administración parenteral.

6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 del compuesto de la fórmula (I) en la que R representa un átomo de hidrógeno o CH₃ en la posición 2 ó 4 del anillo de piridina.

15 7. Uso según la reivindicación 6 en el que R representa CH₃ en la posición 4 del anillo de piridina.

8. Un compuesto de fórmula (I)



(I)

en la que R representa un átomo de hidrógeno o CH₃, y X representa un contraión fisiológicamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones asociadas con una lesión hepática.

20 9. El compuesto tal como se reivindica en reivindicación 8 en el que dicha lesión hepática es insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática crónica o cirrosis hepática.

10. El compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 8 en el que dicha lesión hepática es una lesión hepática inducida por fármacos, una lesión hepática inducida por alcohol, una lesión hepática tóxica o una lesión hepática provocada por hepatitis vírica.

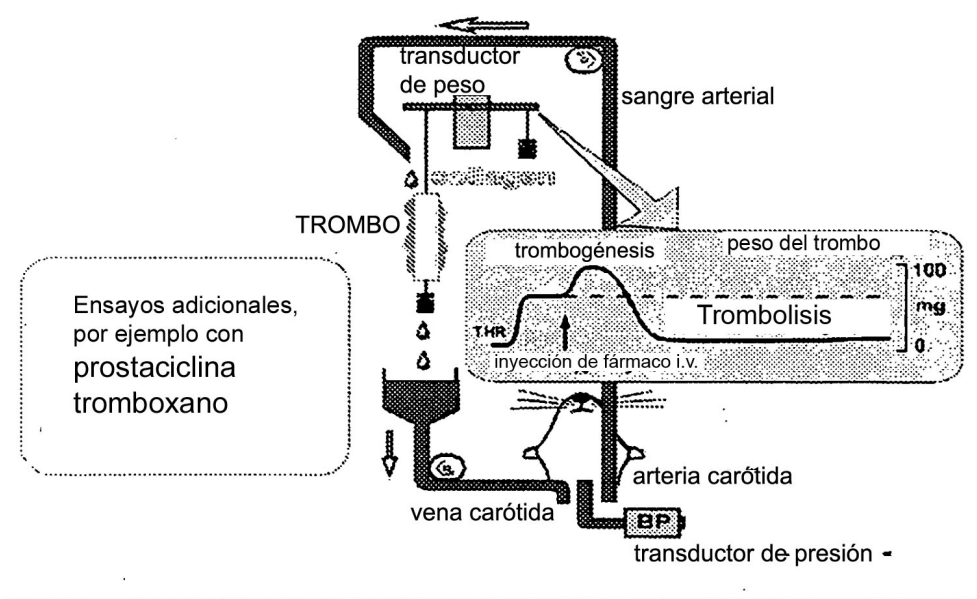
25 11. El compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 8 en el tratamiento o la prevención por administración oral.

12. El compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 8 en el tratamiento o la prevención por administración parenteral.

30 13. El compuesto tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 en el que R representa un átomo de hidrógeno o CH₃ en la posición 2 ó 4 del anillo de piridina.

14. El compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 13 en el que R representa CH₃ en la posición 4 del anillo de piridina.

Fig. 1: Esquema de procedimiento de detección de la acción trombólíca de fármacos *in vivo* en ratas (según Grylewski y col.)



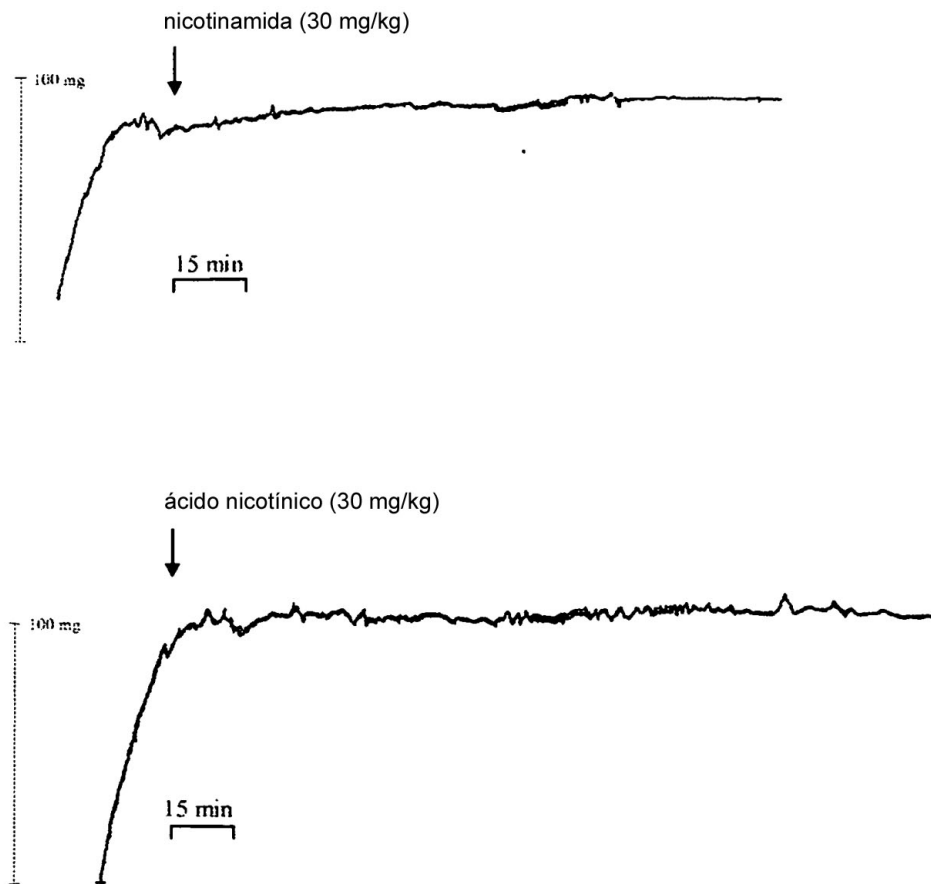


Fig. 2: Efecto de la administración intravenosa *in vivo* de nicotinamida y ácido nicotínico (30 mg/kg)

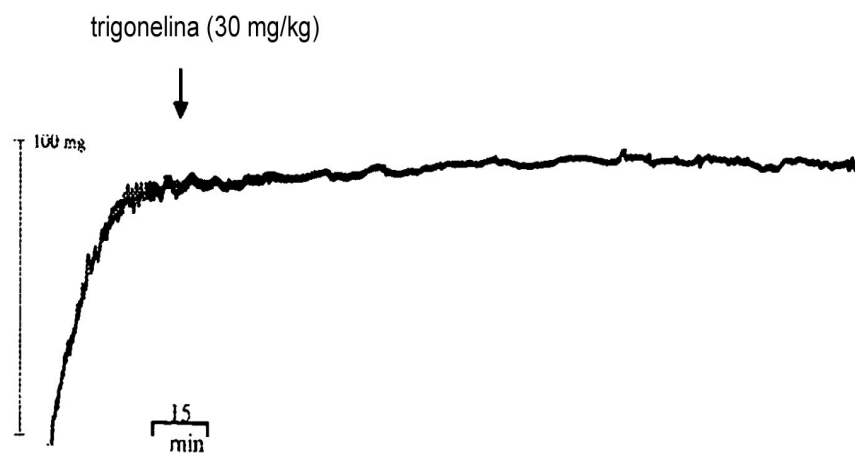


Fig. 3: Efecto de la administración intravenosa *in vivo* de trigonelina (30 mg/kg)

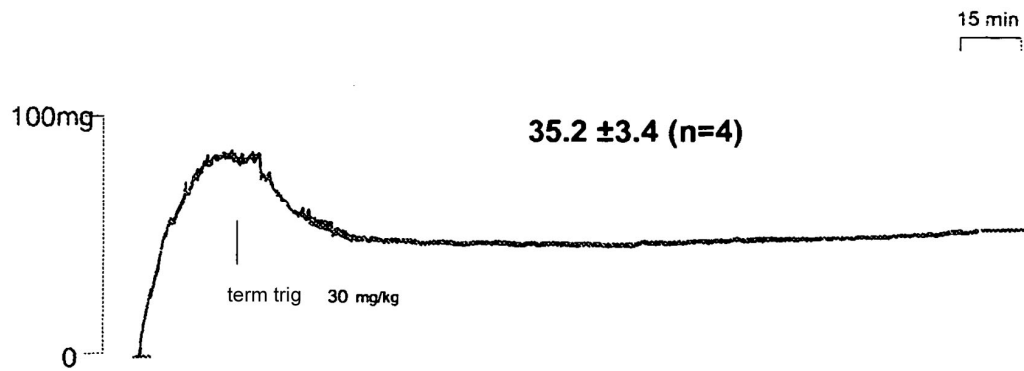


Fig. 4: Respuesta trombolítica inducida por la administración intravenosa *in vivo* de termolisado de trigonelina (30 mg/kg)

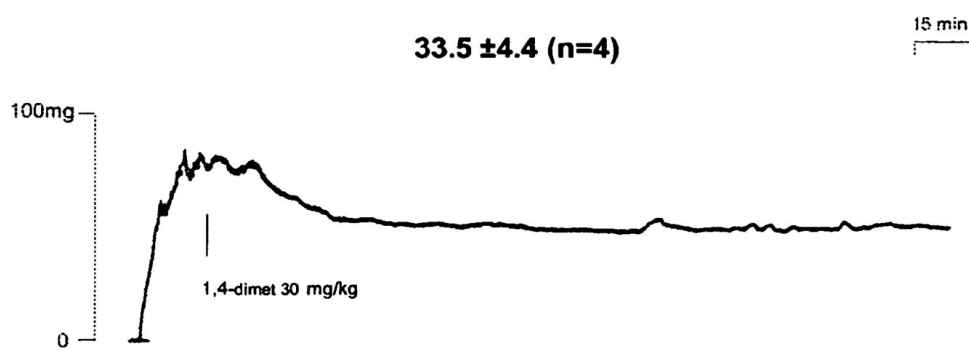
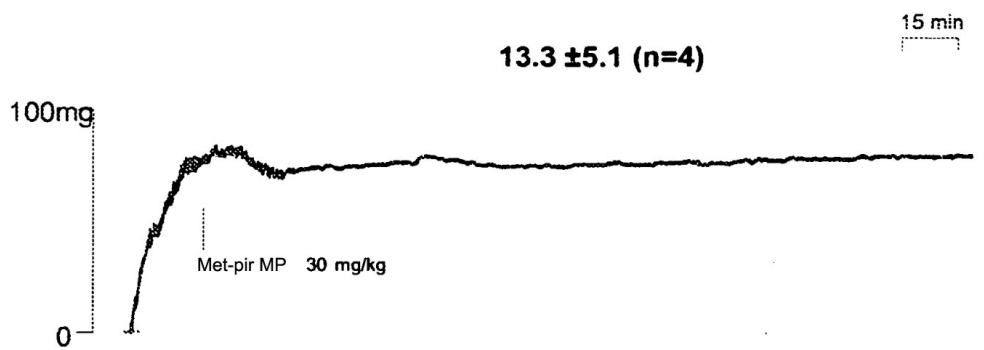


Fig 5: Respuesta trombolítica *in vivo* inducida por la administración intravenosa de cloruro de 1-metilpiridinio (30 mg/kg) (registro inferior) y cloruro de 1,4-dimetilpiridinio (30 mg/kg) (registro superior)

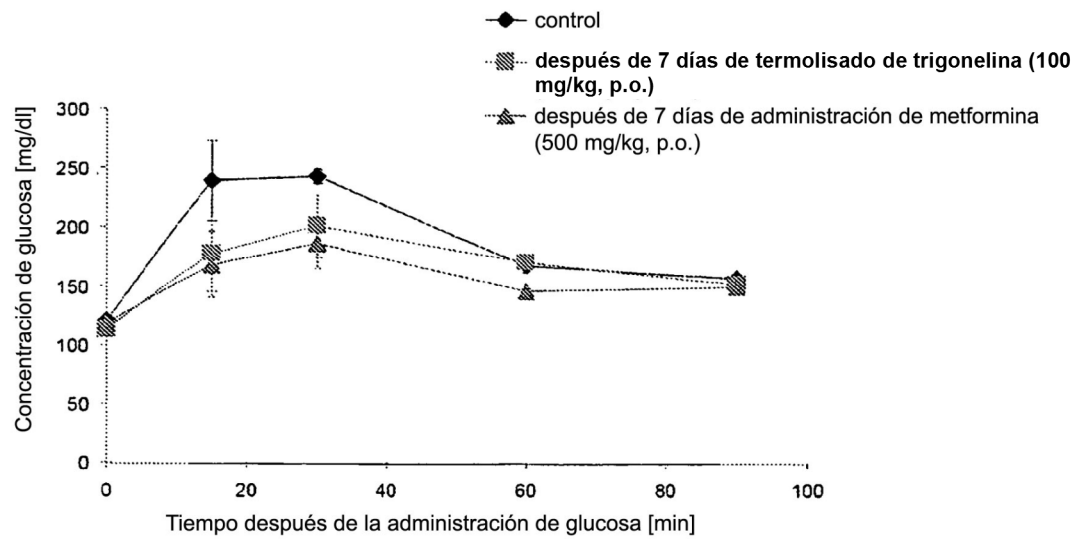


Fig. 6: Efecto de termolisado de trigonelina sobre la hiperglucemia postprandial en comparación con metformina y control no tratado

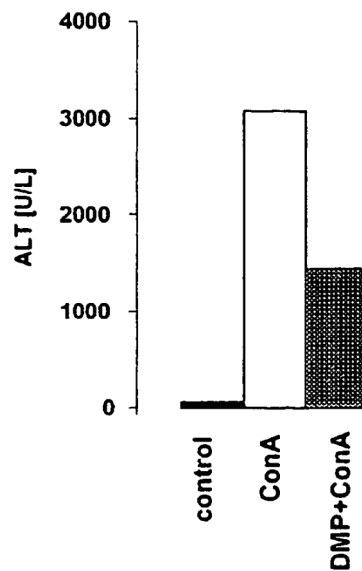


Fig. 7: Efecto hepatoprotector de cloruro de 1,4-dimetilpiridinio *in vivo*