

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 891**

51 Int. Cl.:

A61K 31/03 (2006.01)
A61K 31/121 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 11/04 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2002 E 02802394 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1450777**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene chalcona o derivados de la misma con actividad inhibidora de metaloproteinasas de matriz**

30 Prioridad:

01.11.2001 KR 2001067950

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2013

73 Titular/es:

**ANGIOLAB INC. (100.0%)
439-6, DOMA-2-DONG, SEO-GU
302-735 DAEJEON, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, MIN-YOUNG;
PARK, BYUNG-YOUNG;
KIM, KYOUNG-MI;
SUNG, NACK-DO y
MYUNG, PYUNG-KEUN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 422 891 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

Composición farmacéutica que contiene chalcona o derivados de la misma con actividad inhibidora de metaloproteinasas de matriz

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende chalcona o derivados de la misma, que presenta actividad inhibidora de las metaloproteinasas de matriz. Esta composición particular que comprende chalcona o derivados de la misma inhibe la actividad de las metaloproteinasas de matriz.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las chalconas (o derivados de chalcona) son compuestos que presentan la estructura básica C6-C3-C6 en la que los tres átomos de carbono intermedios no forman un anillo cerrado. Son precursores importantes en la síntesis de los pigmentos vegetales. Debido a que presentan un efecto antioxidante, pueden presentar una acción protectora frente a la dañina radiación UV (Woo W.S., Methodology of natural product chemistry (Seoul National University Publishing), páginas 131 a 137). Estos compuestos son abundantes en las plantas del género *Coreopsis*. Las chalconas en su origen natural incluyen 2',6'-dihidroxi-4-metoxichalcona, cartamina y buteína, y se han identificado de plantas tales como la canela, el pimiento rojo y la flor del cártamo. La dihidrochalcona se encuentra contenida en determinadas especies del género *Rosaceae* y *Rhododendron*, y la floridzina es uno de los componentes en las hojas del manzano (Hunter M.D., Phytochemistry (Oxford) 34:1251-1254, 1993). Las chalconas se conocen como inhibidores del transporte de la glucosa y el crecimiento de diversas células, incluyendo el cáncer, lo que permite su aplicación en la prevención del envejecimiento y/o el cáncer (Fuhrmann G.F., Demedde S. y Frenking G., Biochimica Biophysica Acta 1110:105-111, 1992; Kobori M. *et al.*, Cancer Lett. 119:207-212, 1997; Calliste C.A. *et al.*, Anticancer Res. 21:3949-3956, 2001).

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de más de 20 proteínas que son endopeptidasas, las cuales degradan o proteolizan los componentes de la matriz extracelular, tales como el colágeno, los proteoglicanos y la gelatina. Se clasifican en cuatro grupos: colagenasa, gelatinasa, estromelisinina y MMP de tipo membrana.

La colagenasa proteoliza el colágeno intersticial de triple hélice y la gelatina, y comprende la colagenasa intersticial (MMP-1), la colagenasa de neutrófilos (MMP-8) y la colagenasa-3 (MMP-13). Estos tres enzimas comparten una similitud de secuencias superior al 50%, presentando dos sitios de unión de cinc y uno o dos sitios de unión de calcio en su dominio nuclear (Borkakoti *et al.*, Nature Struct. Biol. 1:106-110, 1994; Bode *et al.*; EMBO J. 13:1263-1269, 1994; Lovejoy *et al.*, Science 263:375-377, 1994).

La gelatinasa puede degradar el colágeno desnaturalizado y el colágeno de tipos IV, V, VII y X. Existen dos gelatinasas, una es la gelatinasa-A de 72 kDa (MMP-2) secretada por fibroblastos, y la otra es la gelatinasa-B de 92 kDa (MMP-9) secretada por fagocitos mononucleares. Actúan específicamente sobre el colágeno de tipo IV, el componente principal de la membrana basal (Murphy G. *et al.*, Biochem. J. 258:463-472, 1989; Stetler-Stevenson W.G. *et al.*, J. Biol. Chem. 264:1353-1356, 1989). Estos enzimas resultan muy importantes en la invención del cáncer y la metástasis. En comparación con MMP-2, MMP-9 comprende secuencias adicionales con funciones desconocidas entre los dominios C-terminal y catalítico (Wilhelm S.M. *et al.*, J. Biol. Chem. 264:17213-17221, 1989).

Las estromelisininas muestran un espectro amplio de sustratos y la estromelisinina-1 (MMP-3), la estromelisinina-2 (MMP-10), la estromelisinina-3 (MMP-11) y la matrilisina (MMP-7) se clasifican como estromelisininas (Chin J.R. *et al.*, J. Biol. Chem. 260:12367-12376, 1985; Whitham S.E. *et al.*, Biochem. J. 240:913-916, 1986).

La metaloelastinasa (MMP-12) y las MMP de tipo membrana, tales como MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15) y MT3-MMP (MMP-16) también se identifican como enzimas de la familia de MMP.

Muchos enzimas en la familia de MMP presentan especificidad de sustrato. La expresión de MMP se induce bajo diversas circunstancias fisiológicas en el caso de que se requiera el remodelado de la matriz extracelular (Curry T.E. Jr., Osteen K.G., Biol. Repord. 64:1285-1296, 2001; Damjanovske S. *et al.*, Ann. NY Acad. Sci., 926:180-191, 2000; Ravanti L., Kahari V.M., Int. J. Mol. Med. 6:391-407, 2000).

Se observa una expresión o activación incrementada de las MMP en muchos estados patológicos, tales como la aterosclerosis, la restenosis, la osteopatía dependiente de MMP, la inflamación del sistema nervioso central, la enfermedad de Alzheimer, el asma, el envejecimiento de la piel, la artritis reumatoide, la osteoartritis, la artritis séptica, la osteoporosis, la endometriosis, sinequias de úlcera corneal, las enfermedades óseas, la proteinuria, el aneurisma aórtico abdominal, la pérdida regresiva de cartílago, la esclerosis múltiple, la pérdida de nervios mielinizados, la fibrosis hepática, la enfermedad nefroglomerular, las rupturas de membranas germinales, la enfermedad intestinal inflamatoria, la gingivitis, la enfermedad periodontal, la degeneración macular senil, la retinopatía diabética, la retinopatía proliferativa del cuerpo vítreo, la retinopatía del prematuro, la inflamación ocular,

la ulceración corneal, el síndrome de Sjögren, la miopía, los tumores oculares, el rechazo del implante corneal, la angiogénesis y la metástasis del cáncer (Woessner Jr., Ann. NY Acad. Sci. 732:11-21, 1994; Warner *et al.*, Am. J. Pathol. 158:2139-44, 2001; Stetler-Stevenson, Surg. Oncol. Clin. N. Am. 10:383-92, 2001).

5 Por ejemplo, es conocido que las estromelisininas son los enzimas principales de degradación del cartílago (Murphy G. *et al.*, Biochem. J. 248:265-268, 1987). Las colagenasas, gelatinasas y estromelisininas son responsables de la degradación de la matriz extracelular en muchas retinopatías (Bruns F.R. *et al.*, Invest. Ophthalmol. and Visual Sci. 32:1569-1575, 1989). Las colagenasas y las estromelisininas se identifican en fibroblastos de las encías inflamadas y la actividad de los enzimas es dependiente del grado de inflamación (Overall C.M. *et al.*, J. Periodontal Res. 22:81-88, 1987). La actividad de las MMP se incrementa en gran medida en respuesta a la infección bacteriana y a la inflamación en el líquido crevicular gingival obtenido de pacientes con enfermedad periodontal. La destrucción del colágeno en la matriz periodontal por las MMP conduce a la recesión gingival, a la formación de bolsillos y al movimiento dentario (Goulb L.D., Ryan M.E., Williams R.C., Dent. Today 17:102-109).

15 Unas publicaciones recientes también han demostrado que la actividad de MMP-1 resulta inducida en grado elevado en la enfermedad de Alzheimer y que MMP-1 y MMP-3 participan en la fisiopatología de la enfermedad (Leake A. *et al.*, J. Neurosci. Lett. 291:201-3, 2000; Yoshizawa Y. *et al.*, Acta Neuropathol. Berl. 99:91-5, 2000).

20 También se ha encontrado que MMP-9 es la MMP principal en el líquido de lavado broncoalveolar y en la mucosa bronquial en el asma y que MMP-2 y MMP-9 resultan cruciales para la inducción del asma bronquial (Mautina *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 104:530-533, 1999; Kumagai *et al.*, J. Immunol. 162:4212-4219, 1999; Bechy Kelly *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162:1157-1161, 2000).

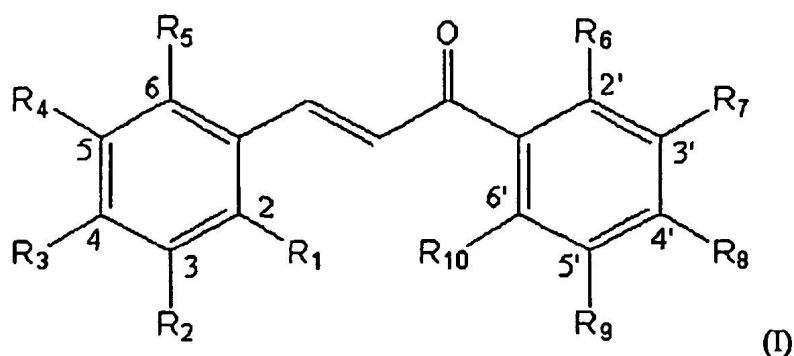
25 Las MMP también son responsables del daño de la piel inducido por la radiación solar de UV, afectando al tono y resiliencia de la piel, conduciendo al envejecimiento prematuro. Entre los síntomas del mismo se incluyen la textura de cuero, las arrugas, la pigmentación moteada y la laxitud. Por lo tanto, los inhibidores de MMP podrían incluirse en cosméticos para el tratamiento anti-fotoenvejecimiento o anti-arrugas (Hase T. *et al.*, Br. J. Dermatol. 142:267-273, 2000; Fisher G.J., Photochem. Photobiol. 69:154-157, 1999).

30 Debido a que los inhibidores de MMP pueden aplicarse en el tratamiento y prevención de muchas enfermedades, se espera el desarrollo de los inhibidores de MMP como nuevas terapéuticas. Estos inhibidores deben administrarse durante un tiempo prolongado, por lo que los inhibidores deseables no deberían presentar efectos tóxicos o adversos con un buen cumplimiento por parte del paciente.

35 El documento nº WO 01 46110 A se refiere a chalconas y derivados de chalconas y análogos que resultan útiles como inhibidores de la angiogénesis. El documento nº WO 01 46110 A también se refiere a la utilización de las chalconas y análogos de las mismas como agentes antitumorales/anticáncer y para el tratamiento de varias condiciones o estados de enfermedad en los que la angiogénesis es un factor, incluyendo enfermedades angiogénicas de la piel, tales como la soriasis, el acné, la rosácea, las verrugas, el eccema, los hemangiomas, la linfangiogénesis, entre numerosas otras, así como enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis. Entre los derivados metoxi-chalcona se dan a conocer explícitamente 4,4'-dimetoxi-chalcona, 2,2',6,6'-tetrametoxi-chalcona, 2',6'-dimetoxi-chalcona, 2,6-dimetoxi-chalcona y 2,6-dicloro-2',6'-dimetoxichalcona.

45 El documento nº WO 99 00 114 A describe la utilización de chalconas y derivados de chalconas para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento o profilaxis de varias enfermedades graves, incluyendo: i) condiciones relacionadas con los efectos perjudiciales de las citoquinas inflamatorias, ii) condiciones que implican la infección por especies de *Helicobacter*, iii) condiciones que implican infecciones por virus, iv) trastornos neoplásicos, y v) condiciones provocadas por microorganismos o parásitos. Además, el documento nº WO 99 00 114 A se refiere a un método para el aislamiento de la fumarato reductasa de *Leishmania*; metodologías QSAR de selección de compuestos potentes para los fines anteriormente indicados.

50 Se muestran las chalconas o derivados de las mismas en la fórmula (I):



en la que R₁ a R₁₀ son H, OH, OCH₃ o Cl, respectivamente.

- 5 También se proporcionan, preferentemente, chalconas y derivados de chalcona de la invención tales como floretín(4-hidroxi, 2',4',6'-trihidroxi-chalcona), floridzina, dihidrochalcona, 2',6'-dihidro-4'-metoxichalcona, 2-hidroxi-chalcona, 4-hidroxi-chalcona, 4'-hidroxi-chalcona, 4-metoxi-chalcona, 4'-metoxi-chalcona, 2',4'-dimetoxi-chalcona, cartamina, buteína y mezclas de los mismos, más preferentemente chalcona, floretina, 2-hidroxi-chalcona, 4-hidroxi-chalcona, 4-metoxi-chalcona, 4'-metoxi-chalcona y 2',4'-dimetoxi-chalcona.

10

EXPOSICIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende un compuesto chalcona que presenta una actividad inhibidora de las metaloproteinasas de matriz (MMP) y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, en el que el compuesto chalcona que presenta actividad inhibidora de metaloproteinasas de matriz (MMP) se selecciona de entre el grupo que consiste de 4-metoxi-chalcona, 4'-metoxi-chalcona y 2',4'-dimetoxi-chalcona.

15

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona además una composición farmacéutica para inhibir la actividad de MMP, tal como MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13.

20

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende un compuesto chalcona que presenta una actividad inhibidora de las metaloproteinasas de matriz (MMP) y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, en el que el compuesto chalcona que presenta actividad inhibidora de metaloproteinasas de matriz (MMP) se selecciona de entre el grupo que consiste de 4-metoxi-chalcona, 4'-metoxi-chalcona y 2',4'-dimetoxi-chalcona para la utilización en un método de prevención y tratamiento del envejecimiento de la piel. No se busca protección para la prevención y tratamiento de otras enfermedades dependientes de MMP, tales como la aterosclerosis, la restenosis, la osteopatía dependiente de MMP, la inflamación del sistema nervioso central, la enfermedad de Alzheimer, el asma, la artritis reumatoide, la osteoartritis, la artritis séptica, la osteoporosis, la endometriosis, sinequias de úlcera corneal, las enfermedades óseas, la proteinuria, el aneurisma aórtico abdominal, la pérdida regresiva de cartílago, la esclerosis múltiple, la pérdida de nervios mielinizados, la fibrosis hepática, la enfermedad nefroglomerular, las rupturas de membranas germinales, la enfermedad intestinal inflamatoria, la gingivitis, la enfermedad periodontal, la degeneración macular senil, la retinopatía diabética, la retinopatía proliferativa del cuerpo vítreo, la retinopatía del prematuro, la inflamación ocular, la ulceración corneal, el síndrome de Sjögren, la miopia, los tumores oculares, el rechazo del implante corneal, la angiogénesis, la infiltración y la metástasis del cáncer.

25

30

35

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un uso de un compuesto chalcona que presenta una actividad inhibidora de las metaloproteinasas de matriz (MMP) y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, en el que el compuesto chalcona que presenta actividad inhibidora de metaloproteinasas de matriz (MMP) se selecciona de entre el grupo que consiste de 4-metoxi-chalcona, 4'-metoxi-chalcona y 2',4'-dimetoxi-chalcona para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y prevención del envejecimiento de la piel causado por una actividad anormal de las MMP.

40

A continuación se explica la presente invención en mayor detalle.

45

Los inventores han reconocido el efecto inhibidor de la chalcona o sus derivados sobre la actividad de las metaloproteinasas de matriz. Por lo tanto, la presente invención proporciona una chalcona o derivados de la misma para la prevención y el tratamiento de las enfermedades dependientes de MMP.

50

La chalcona o los derivados de la misma de la presente invención pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse mediante métodos convencionales.

Una chalcona de la invención o derivados de la misma pueden prepararse según la realización preferente siguiente.

5 Se suspende benzaldehído, benzaldehído sustituido, acetofenona o acetofenona sustituida e hidróxido sódico en solvente orgánico y se agita a una temperatura comprendida entre -20°C y 50°C, preferentemente de entre 10°C y 30°C, durante un periodo comprendido entre 1 y 24 horas, preferentemente de entre 3 y 10 horas. Seguidamente la mezcla se neutraliza con un ácido, tal como ácido clorhídrico, y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica extraída se elimina al vacío, seguido de la purificación en una columna cromatográfica de gel de sílice (eluyente: mezcla de n-hexano y acetato de etilo).

10 Los benzaldehídos sustituidos anteriormente indicados se seleccionan de entre el grupo que consiste de 2-hidroxibenzaldehído, 4-hidroxi-benzaldehído y similares, y la acetofenona sustituida se selecciona de entre el grupo que consiste de 4-metoxi-acetofenona, 2,4-dimetoxi-acetofenona y similares. El solvente orgánico se selecciona de entre el grupo que consiste de metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, éter y similares.

15 Al investigar el efecto de chalconas o derivados de las mismas sobre las MMP, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13, se observó que inhibía drásticamente la actividad de los cuatro enzimas. Sin embargo, el efecto inhibitorio de las chalconas y derivados de las mismas sobre las MMP no se encuentra limitado a dichos enzimas.

20 Las chalconas o derivados de las mismas también se ha demostrado que inhiben la angiogénesis al inhibir la actividad de las MMP.

25 Según otro aspecto de la presente invención se proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto chalcona que presenta una actividad inhibitoria de las metaloproteinasas de matriz (MMP) y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, en el que el compuesto chalcona que presenta actividad inhibitoria de metaloproteinasas de matriz (MMP) se selecciona de entre el grupo que consiste de 4-metoxi-chalcona y 4'-metoxi-chalcona de la presente invención para la utilización como ingrediente activo en un método para la prevención y tratamiento del envejecimiento de la piel.

30 La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse con otra u otras composiciones. La preparación que comprende chalcona o derivados de la misma puede contener entre aproximadamente 0,1% y 80% p/p, preferentemente entre 1% y 30% p/p de chalcona o derivados de la misma a modo de ingredientes activos. Entre las formulaciones tópicas de la chalcona o de derivados de la misma se incluyen crema, loción, pomada, aerosol, spray y pasta. La composición deseable de la chalcona o derivados de la misma en la formulación tópica es de entre 0,001% y 20%, preferentemente de entre 0,05% y 10%.

35 La composición farmacéutica puede encontrarse comprendida en diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y mezclas de los mismos, aunque no se encuentra limitada a ellos. Los diluyentes apropiados se listan en el texto escrito de Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Co., Easton PA).

40 Puede prepararse una formulación farmacéutica mediante la utilización de la composición según cualesquiera de los procedimientos convencionales. Durante la preparación de la formulación, el ingrediente activo preferentemente se mezcla o se diluye con un portador o se incluye dentro de un portador, que puede presentar la forma de una cápsula, sobre u otro recipiente. En el caso de que el portador sirva de diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúe como vehículo, excipiente o medio para el ingrediente activo.

45 Son ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes adecuados, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, almidones, goma acacia, alginatos, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoatos, propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones adicionalmente pueden incluir rellenos, agentes antiaglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes saborizantes, emulsionantes, conservantes y similares. Las composiciones de la invención pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo tras su administración en un paciente, mediante la utilización de cualesquiera de los procedimientos bien conocidos de la técnica.

50 Las formulaciones farmacéuticas que contienen chalcona o derivados de la misma pueden prepararse en cualquier forma, tal como una forma de dosificación oral (tableta, cápsula, cápsula blanda, medicina acuosa, jarabe, elixir, píldora, polvos, sobre, gránulos) o una preparación tópica (crema, pomada, loción, gel, bálsamo, parche, pasta, solución de spray, aerosol y similares) o una preparación inyectable (solución, suspensión o emulsión).

55 Las formulaciones farmacéuticas que comprenden chalcona o derivados de la misma de la presente invención pueden administrarse por diversas vías, incluyendo oral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, rectal, nasal, ocular y tópica. Resulta preferible una dosis diaria de una chalcona o

derivados de la misma de entre aproximadamente 5 mg y 2 g, más preferentemente de entre 10 y 1.000 mg. En general, pueden administrarse 0,1 a 200 mg/kg de chalcona o derivados de la misma en una única dosis o en 2-3 dosis divididas al día.

5 Puede aplicarse una composición farmacéutica de la invención de manera diferente según el propósito de la dosificación y la enfermedad. Debe entenderse que la cantidad de ingrediente activo debe determinarse según diversos factores. Entre estos factores se incluyen la gravedad de los síntomas del paciente, otros fármacos coadministrados (por ejemplo agentes quimioterapéuticos), la edad, el sexo, el peso corporal del paciente individual, la alimentación, el tiempo de dosificación, la vía de administración seleccionada y la proporción de la composición.

10 Por lo tanto, la dosis anteriormente indicada debe interpretarse como ilustración adicional de la presente invención sin limitación del alcance de la misma.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Lo anterior y otros objetivos y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción siguiente de la invención, considerada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

- 20 la fig. 1 es un gráfico que muestra la inhibición de MMP-1 por chalcona.
 La fig. 2 es un gráfico que muestra la inhibición de MMP-9 por chalcona.
 La fig. 3 es un dibujo que muestra la formación de tubos de HUVEC con el tratamiento de DMSO al 0,5%.
 La fig. 4 es un dibujo que muestra la formación de tubos de HUVEC con el tratamiento de chalcona.
 La fig. 5 es un dibujo que muestra la formación de tubos de HUVEC con el tratamiento de 4'-metoxi-chalcona.

25 MEJOR MODO DE PONER EN PRÁCTICA LA INVENCION

Los ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de ilustrar adicionalmente la presente invención. Sin embargo, estos ejemplos se muestran únicamente para una mejor comprensión de la presente invención, sin limitar el alcance de la misma.

30 Ejemplo 1: síntesis de 4-metoxi-chalcona (1-fenil-3-(4-metoxifenil)profenona)

Se suspendieron acetofenona (0,5 g) e hidróxido sódico (0,17 g) en 15 ml de metanol preenfriado a -10°C. Se añadió a lo anterior p-anisaldehído (0,57 g) y se agitó durante 10 horas a temperatura ambiente. Tras neutralizar con solución de ácido clorhídrico al 5%, el producto se extrajo con 100 ml de acetato de etilo. La fase orgánica extraída se secó con sulfato de magnesio anhidro y se concentró en un evaporador al vacío. El compuesto purificado se obtuvo mediante elución con n-hexano:acetato de etilo (v/v, 1:7) mediante cromatografía de columna de gel de sílice (5x3 cm, Merck) y se identificó de la manera siguiente:

40 p.f.=68~70°C
 RMN-¹H (CDCl₃/TMS) δ (ppm): 3,85(s, 3H), 6,9~7,0(d, 2H), 7,4 ~ 7,6(m, 6H), 7,7~7,8(d, 1H), 7,9~8,0(m, 2H)

Ejemplo 2: síntesis de 2-hidroxi-chalcona (1-fenil-3-(2-hidroxifenil)profenona)

45 Se disolvieron 2-hidroxibenzaldehído (2 g) e hidróxido sódico (0,72 g) en 30 ml de tolueno anhidro y se sometieron a reflujo durante 3 horas. La sal resultante se filtró por un filtro de vidrio y se secó por completo. La sal preformada (2 g) y cloruro de metoximetilo (1,29 g) se suspendieron en 30 ml de tolueno anhidro y después se agitó durante 5 horas. El producto extraído con 100 ml de acetato de etilo se secó con sulfato de magnesio anhidro y se concentró en un evaporador al vacío. El producto fueron 2,5 g de fase líquida incolora de 2-metoximetil-oxibenzaldehído.

50 El producto anteriormente indicados se mezcló con acetofenona (2 g), se suspendió en metanol a -10°C y se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Tras neutralizar con solución de ácido clorhídrico al 5%, el producto se extrajo con 200 ml de acetato de etilo. La fase orgánica extraída se secó con sulfato de magnesio anhidro y la 1-fenil-3-(2-metoximetiloxifenil)-profenona resultante se hidrolizó con solución alcalina diluida. La mezcla de reacción se extrajo con 200 ml de acetato de etilo. La fase orgánica extraída se secó con sulfato de magnesio anhidro y se evaporó al vacío. Se obtuvieron aproximadamente 0,9 g de sólido blanco y se sometieron a cromatografía de columna de gel de sílice (5x3 cm, Merck). Tras eluir con n-hexano:acetato de etilo (v/v, 1:7), se recuperaron 0,7 g de compuesto purificado, identificado de la manera siguiente:

55 p.f.=148~149°C,
 RMN-¹H (CDCl₃/TMS) δ (ppm): 6,6~6,8(m, 2H), 6,9~7,05(t, 1H), 7,2~7,4(m, 5H), 7,4~7,6(d, 1H), 7,7~7,8(m, 2H), 9,4 (s, 1H); Mass (m/z, intensidad relativa) : 225(5, M+), 77(100)

Ejemplo 3: síntesis de 4-hidroxi-chalcona (1-fenol-3-(4-hidroxifenil)profenona)

El presente compuesto se preparó con 4-hidroxibenzaldehído siguiendo el mismo procedimiento que el indicado

anteriormente, en el Ejemplo 2. El compuesto purificado (0,7 g) se identificó de la manera siguiente: p.f.=182°C~183°C; RMN ¹H (CDCl₃/TMS) δ (ppm): 3,5(s, 1H), 6,9(d, 2H), 7,5~7,7(m, 5H), 7,7~7,8(d, 1H), 8,0~8,1(m, 2H); masa (m/z), intensidad relativa) : 225(55, M+), 77(100)

5

Ejemplo 4: síntesis de 4'-metoxi-chalcona (1-(4-metoxifenil)-3-fenilprofenona)

Se suspendieron 4-metoxiacetofenona (1,4 g) e hidróxido sódico (0,2 g) en 15 ml de metanol preenfriado a -10°C. La solución se mantuvo durante 1 hora a 0°C bajo agitación. Se añadió benzaldehído (1 g) a lo anterior y se sometió a reflujo durante 10 horas a temperatura ambiente bajo agitación. Tras neutralizar con solución de ácido clorhídrico al 5%, el producto se extrajo con 100 ml de acetato de etilo. La fase orgánica extraída se secó con sulfato de magnesio anhidro y se evaporó al vacío. Los 1,3 g resultantes de polvos blancos se purificaron mediante cromatografía de columna de gel de sílice (5x3 cm, Merck), los cuales se eluyeron con n-hexano:acetato de etilo (v/v, 1:7). El compuesto purificado se identificó de la manera siguiente: p.f.=98°C~100°C;

10

15

RMN ¹H (CDCl₃/TMS) δ (ppm): 3,85~3,9(s, 3H), 6,95~7,05(d, 2H), 7,4~7,45(m, 3H), 7,5~7,6(d, 1H), 7,6~7,7(m, 2H), 7,75~7,85(d, 1H), 8,0~8,1(m, 2H); masa (m/z, intensidad relativa): 239(14, M+), 77(100)

Ejemplo 5: síntesis de 2',4'-dimetoxi-chalcona (1-(2,4-dimetoxifenil)-3-fenilprofenona)

Se preparó con 2,4-dimetoxibenzaldehído siguiendo el mismo procedimiento que el indicado anteriormente en el Ejemplo 4. El compuesto purificado se identificó de la manera siguiente:

20

RMN-¹H (CDCl₃/TMS) δ (ppm): 3,8~3,95(m, 6H), 6,45~6,6(m, 2H), 7,3~7,4(m, 4H), 7,5~7,65(m, 3H), 7,7~7,8(m, 2H); masa (m/z, intensidad relativa) : 269(9, M+), 165(100)

25

Ejemplo experimental 1: efecto de los derivados de chalcona sobre la actividad de las metaloproteinasas de matriz

(1) Preparación de MMP

Se clonaron MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13 y se prepararon a partir de células de insecto (células de insecto Sf21) mediante la utilización de un sistema de baculovirus.

30

Cada ADNc para las MMP correspondientes se clonó en un vector de transferencia pBlueBac4.5 (Invitrogen, n° de cat. V1995-20) y después se transfectó en células Sf21 con un kit de transfección Bac-N-Blue (Invitrogen, n° de cat. K855-01). Las células Sf21 se incubaron con un medio TNM-FH (Sigma, St. Louis, MO, USA) que contenía suero de feto bovino al 10% a 27°C, después se recolectaron y se resuspendieron a una densidad de 10⁷ células/ml. La suspensión celular se incubó con un virus que contenía el gen clonado, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células Sf21 infectadas se cultivaron durante 72 horas y se recuperó el medio y se purificó la MMP. Se recuperaron MMP-2 (GeneBank n° XM-048244) y MMP-9 (GeneBank n° XM_009491) de una columna de afinidad de gelatina-sefarosa (Sigma, G5384) mediante elución con tampón que contenía DMSO al 5%. Se purificaron MMP-1 (GeneBank n° XM_040735) y MMP-13 (GeneBank n° NM_002427) con una columna cromatográfica de SP-sefarosa (Pharmacia, 17-02729-01).

35

40

(2) Inhibición de la actividad de MMP

Con el fin de investigar la inhibición de las MMP por chalconas o derivados de las mismas, se sometió a ensayo la actividad enzimática de MMP mediante un método espectrofluorimétrico utilizando un Perkin-Elmer LS50B.

45

Se utilizaron MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13 purificados tras la activación con APMA 1 mM antes del ensayo.

50

El sustrato para MMP-1 era 2,4-dinitrofenil-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-OH (Calbiochem) y se utilizó 2,4-dinitrofenil-Pro-Leu-Met-Trp-Ser-Arg-OH (Calbiochem) para el ensayo de actividad de MMP-2 y MMP-9. Como sustrato para MMP-13, se utilizó MCA-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH₂ (Calbiochem) [MCA=metil-coumarilamida; Cha=L-ciclohexilalanina; Nva=L-norvalina; Dpa=ácido 3-(2,4-dinitrofenil)-L-2,3-diaminopropiónico].

55

A modo de control se prepararon en una cubeta 2 ml de tampón de reacción (Tricina 50 mM, pH 7,5; CaCl₂ 10 mM; NaCl 200 mM) que comprendía DMSO, 10 nM de enzima y 10 mM de sustrato. Se midió la intensidad de la fluorescencia durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente con un espectrofluorímetro.

60

Se añadió chalcona o derivados de la misma a un tampón de reacción que contenía un sustrato y enzima, y se midió la intensidad de la fluorescencia de la misma manera.

Las figuras 1 y 2 son diagramas de actividad de MMP-1 y MMP-9. Tal como se muestra en estas figuras, aproximadamente 75% de la actividad de MMP-1 y 76% de la actividad de MMP-9 resultó inhibida por la chalcona. La chalcona también inhibió la actividad de MMP-2 y MMP-13 en aproximadamente 80%. El grado de inhibición de

MMP por cada derivado resultó similar o superior al del compuesto parental chalcona. En la Tabla 1 se resumen los resultados de inhibición de MMP-2 y MMP-13.

[Tabla 1] Actividad de inhibición de MMP de chalcona o derivados de la misma

Compuesto (50 μ M)	Inhibición de MMP-2 (% de inhibición)	Inhibición de MMP-13 (% de inhibición)
Control (DMSO)	0	0
Chalcona (Indofine Chemical Co.)	79,9	80,0
Floretina (Sigma Chemical Co.)	87,2	77,0
4-metoxi-chalcona ($R_3=CH_3O$)	92,7	83,9
2-hidroxi-chalcona ($R_1=OH$)	90,4	89,9
4-hidroxi-chalcona ($R_3=OH$)	95,9	94,5
4'-metoxi-chalcona ($R_8=CH_3O$)	99,1	86,8
2',4'-dimetoxi-chalcona ($R_6=CH_3O$, $R_8=CH_3O$)	92,5	83,4

5

Ejemplo experimental 2: efecto de chalcona o derivados de la misma sobre la formación de tubos de HUVEC

Se investigó el efecto de chalcona o derivados de la misma sobre las células endoteliales humanas con el fin de evaluar el efecto biológico de las chalconas como inhibidores de las MMP. Debido a que las MMP son responsables de la degradación de la matriz extracelular, las chalconas o derivados de las mismas pueden inhibir la formación de la red tubular de vasos, que representa la migración y diferenciación de las células endoteliales.

10

Se aislaron células endoteliales de los vasos sanguíneos y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) a partir de cordones recién obtenidos tras la sección cesárea según el método de Grants (Grants D.S. *et al.*, Cell 58:933-943, 1989). Se identificaron mediante tinción inmunocitoquímica con anticuerpo anti-Factor VIII. Se trataron células HUVEC cultivadas en Matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) con 50 mM de chalcona o derivados de la misma, y se incubaron adicionalmente a 37°C durante 8 a 16 horas. A modo de control se repitió el procedimiento con el solvente de los compuestos anteriormente indicados.

15

La fig. 3 muestra que se forma una red tubular como proceso de neovascularización al cultivarse sobre Matrigel. Sin embargo, la red microvascular resultó desconectada al cultivar las HUVEC sobre Matrigel tratado con 50 mM de chalcona (fig. 4) ó 4'-metoxi-chalcona (fig. 5). Estos datos demuestran que la chalcona o derivados de la misma pueden inhibir la angiogénesis mediante inhibición de la actividad de las MMP.

20

25 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Tal como se ha indicado anteriormente, la chalcona o los derivados de la misma de la presente invención inhiben la actividad de las metaloproteinasas de matriz. Basándose en lo anterior, puede utilizarse la chalcona y derivados de la misma como nuevo fármaco para el tratamiento y prevención de las enfermedades dependientes de MMP.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende un compuesto chalcona que presenta una actividad inhibidora de las metaloproteinasas de matriz (MMP) y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, en el que el compuesto chalcona que presenta actividad inhibidora de metaloproteinasas de matriz (MMP) se selecciona de entre el grupo que consiste de 4-metoxi-chalcona, 4'-metoxi-chalcona y 2',4'-dimetoxi-chalcona.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicha metaloproteinasas de matriz (MMP) se selecciona de entre el grupo que consiste de MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2 para la utilización a modo de medicamento.
- 15 4. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 3 en un método para el tratamiento o la prevención del envejecimiento de la piel.
5. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 4, en la que el envejecimiento de la piel está causado por una actividad anormal de las MMP.
- 20 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, o composición farmacéutica para la utilización según las reivindicaciones 3 a 5, para la aplicación oral, la aplicación tópica o la aplicación mediante inyección.

Fig. 1

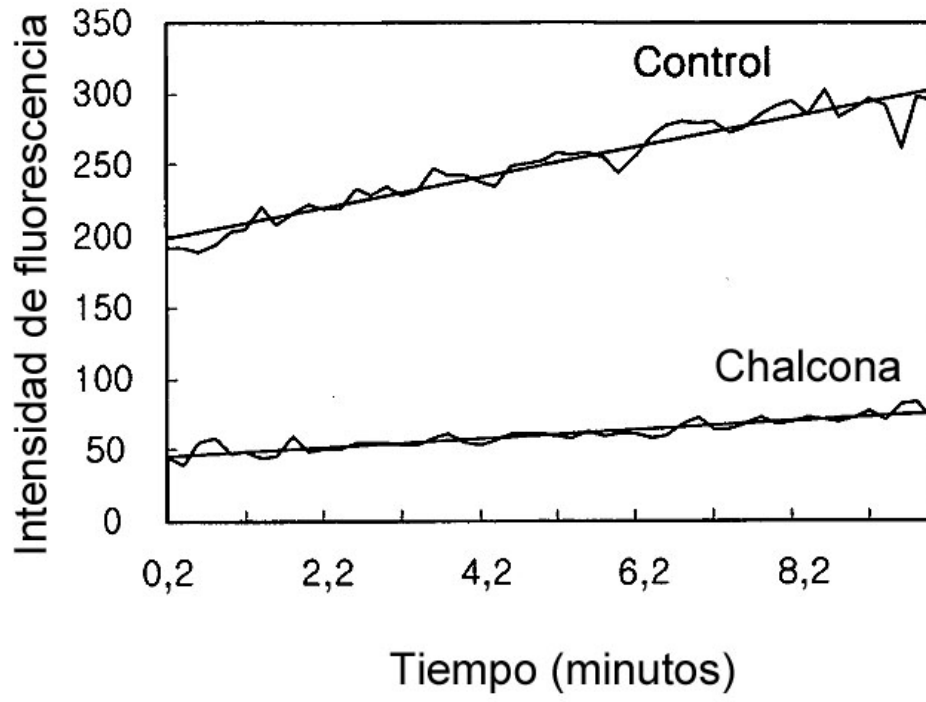


Fig. 2

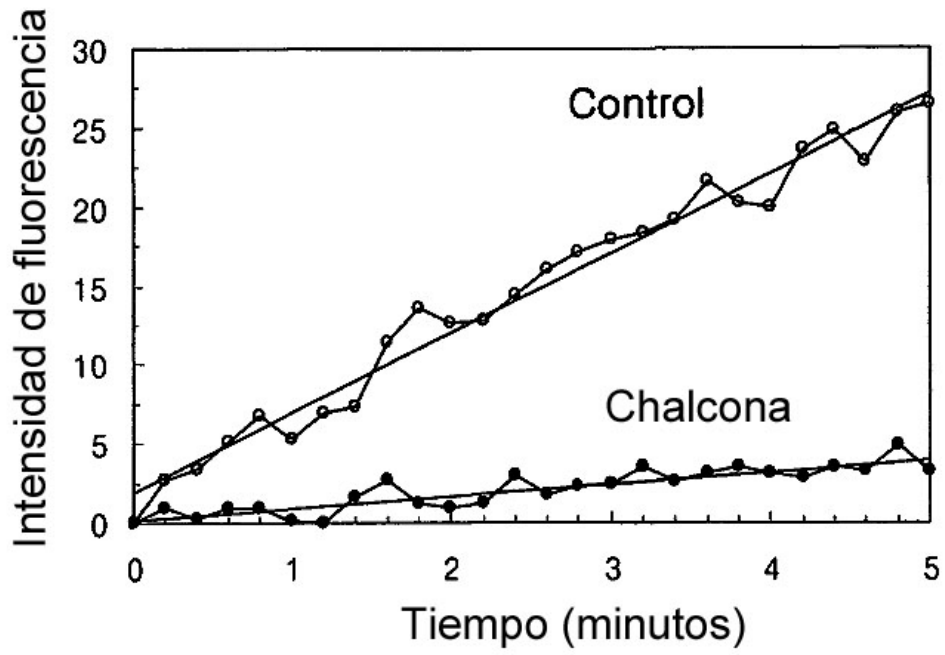


Fig. 3

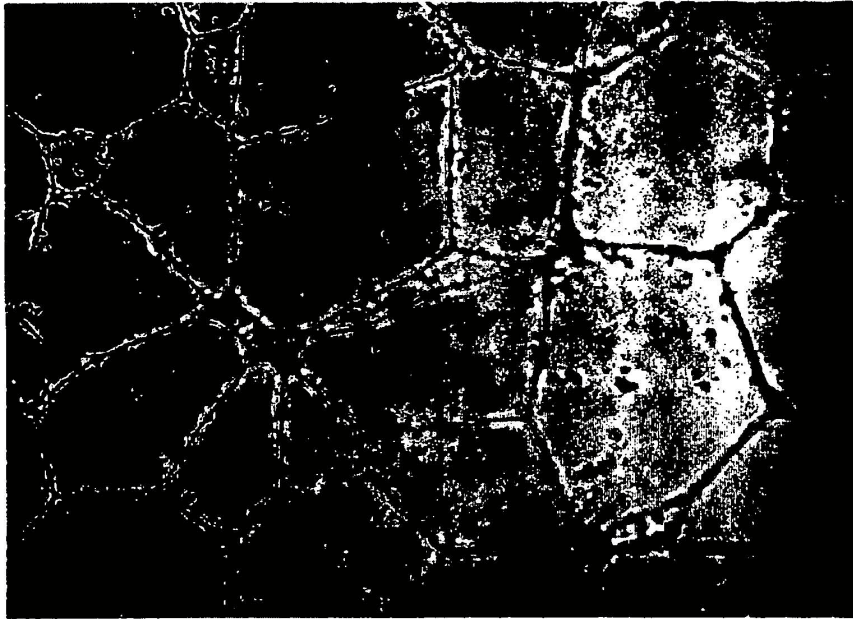


Fig. 4

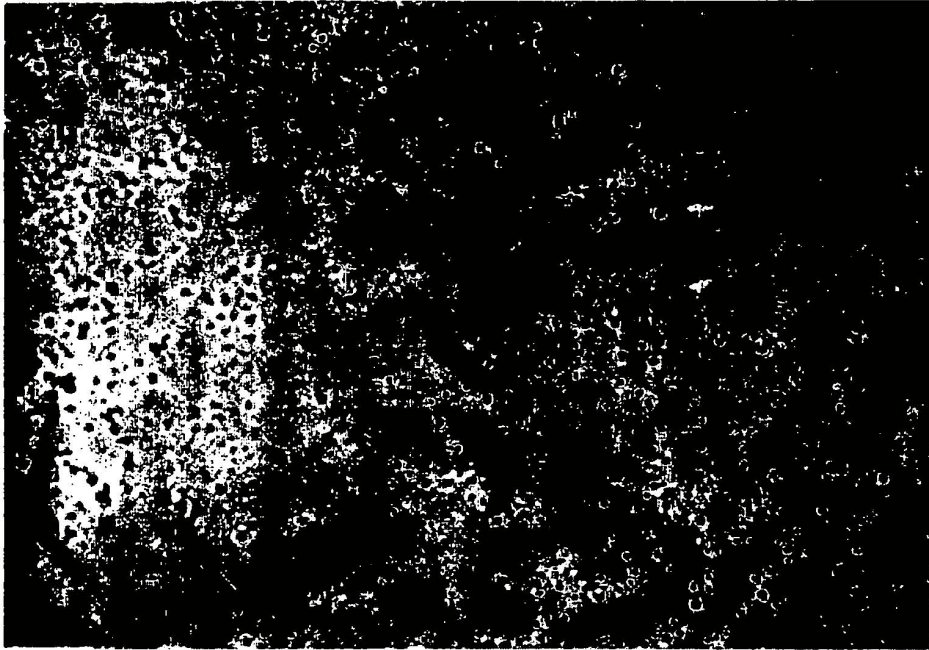


Fig. 5

