(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 559 005**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/58 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2010** **E 10709529 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015** **EP 2411015**

(54) Título: **Derivados de 5-β, 14-β-androstano útiles para el tratamiento de la proteinuria, glomeruloesclerosis e insuficiencia renal**

(30) Prioridad:

23.03.2009 EP 09155834

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2016

(73) Titular/es:

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A. (100.0%)
Viale Shakespeare, 47
00144 Rome, IT

(72) Inventor/es:

FERRARI, PATRIZIA;
BIANCHI, GIUSEPPE y
FERRANDI, MARA

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 559 005 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

Derivados de 5-β, 14-β-androstano útiles para el tratamiento de la proteinuria, glomeruloesclerosis e insuficiencia renal

Campo de la invención

La presente invención se refiere a derivados de 17-β-(3-furil)-5β 14-β-androstano como agentes útiles para preparar un medicamento para la prevención y el tratamiento de la proteinuria, glomeruloesclerosis e insuficiencia renal en sujetos normotensos.

Antecedentes de la invención

El término proteinuria deriva de proteína y orina, y significa la presencia de un exceso de proteínas séricas en la orina. La proteinuria puede ser un signo de alteración renal (riñón), ya que las proteínas séricas se reabsorben fácilmente de la orina, y la presencia de proteínas en exceso indica una insuficiencia de la absorción o una filtración alterada.

La proteinuria puede ser una característica de las siguientes afecciones: Síndromes nefróticos (es decir, insuficiencia renal intrínseca); lesiones tóxicas de los riñones; Enfermedades vasculares del colágeno (p.ej., lupus eritematoso sistémico); Enfermedades glomerulares, tales como glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis focal y segmentaria; Ejercicio extenuante; Estrés; Diabetes mellitus; Fármacos (p.ej., NSAIDs, nicotina, penicilamina, oro y otros metales pesados, inhibidores de ACE, antibióticos, opiáceos especialmente heroína); Infecciones (p.ej., VIH, sífilis, hepatitis, infección post-estreptocócica); Aminoaciduria; Nefroesclerosis hipertensiva; Nefritis intersticial y Glomeruloesclerosis.

La glomeruloesclerosis es un término general para describir la esclerosis de los capilares de los riñones, los glomérulos, las unidades funcionales del riñón que filtran la orina a partir de la sangre. Muchos pacientes con glomeruloesclerosis empeoran gradualmente hasta que sus riñones fallan completamente. Esta afección se denomina enfermedad renal en etapa terminal o ESRD. Los pacientes con ESRD deben someterse a diálisis (hemodiálisis o diálisis peritoneal) para purificar su sangre o recibir un riñón nuevo por medio de un transplante.

El glomérulo renal es una estructura sumamente especializada que controla la ultrafiltración de las proteínas del plasma. La unidad celular específica que asegura este control es el podocito, cuya alteración está implicada en una pérdida masiva de proteínas en la orina (proteinuria). Se sabe bien que la función del podocito está estrictamente bajo el control de proteínas específicas que modulan el citoesqueleto de actina. Se sabe que las mutaciones en los genes que codifican tales proteínas de los podocitos están asociadas a alteraciones de la barrera de la membrana glomerular, y por lo tanto a proteinuria y daño renal masivo. Entre estas proteínas de los podocitos, la nefrina es un constituyente fundamental de la membrana de los poros en hendidura, y modula la dinámica del citoesqueleto por medio de la activación de una ruta de transducción de señales mediada por la tirosina quinasa Fyn que pertenece a la familia Src de quinasas (Trends Mol Med. 2007; 13: 396-403).

La aducina es una proteína citoesquelética implicada en la regulación de la dinámica de la actina-espectrina en todas las células. Se ha demostrado que los polimorfismos de los genes de aducina están asociados a hipertensión y progresión de la insuficiencia renal.

Los datos experimentales indican que la α y β aducina se expresan en el glomérulo, y sus polimorfismos están implicados en la expresión alterada de ciertas proteínas de los podocitos, proteinuria y progresión del daño renal en modelos animales independientemente de su tensión arterial. (J Hypertension 2003, 21 (Supl. 4), abs 4C.4).

En detalle, los ratones con inactivación génica de β aducina mutante, que son normotensos, muestran una expresión incrementada de proteínas de los podocitos, tales como nefrina, sinaptopodina, α-actinina, Fyn y ZO-1, y una reducción de proteínas urinarias (Fig. 1), en comparación con los ratones de control, lo que indica un posible papel de β aducina en la modulación de la permeabilidad glomerular independientemente del control de la tensión arterial.

En ratas NB congénicas normotensas, en las que el gen de β aducina mutante de la cepa MHS hipertensa parental (Q529R) se ha sometido a introgresión en el fondo genético MNS normotenso (*BBRC 2004; 324: 562-568*), se ha descubierto que se reduce la expresión de ciertas proteínas de los podocitos (nefrina, α-actinina, podocina y ZO-1) medida en podocitos cultivados (véase la Fig. 2) y se asocia a una proteinuria y daño renal masivo, tal como se indica mediante los datos de inmunofluorescencia (véase la Fig. 3) de las ratas adultas, en comparación con la cepa NA congénica normotensa que porta la variante de β aducina de tipo natural junto con la α mutada de la cepa MHS. Estos hallazgos sugieren, por lo tanto, un papel patológico de la β aducina mutante sobre la función renal, que es independiente de la tensión arterial y se modula mediante la variante α mutante.

La relevancia de los datos experimentales obtenidos en los modelos animales para la enfermedad humana se apoya por hallazgos clínicos recientes que demuestran que los pacientes con nefropatía por IgA tienen una progresión más rápida hacia la insuficiencia renal en etapa terminal cuando portan la mutación de β aducina (CT+TT) en interacción con la variante mutada de α aducina (Trp) (véase la Figura 4).

La ouabaína endógena (EO) se ha reconocido de manera generalizada como una hormona nueva capaz de controlar la tensión arterial a través de diferentes mecanismos, y principalmente a través de la modulación de la manipulación de Na renal. Se ha descubierto que los niveles circulantes elevados de EO están asociados a una tensión arterial elevada.

Los derivados de 17-(3-furil) y (4-piridazinil)-5-β, 14-β-androstano son compuestos conocidos.

El documento EP0583578B1 describe los derivados de β-androstano reivindicados en la presente solicitud, un proceso para su preparación y su uso para el tratamiento de trastornos cardiovasculares tales como insuficiencia cardiaca e hipertensión.

El documento EP0590271B1 describe derivados de 17-aril y 17-heterociclil-5-alfa, 14-β-androstano, androsteno y androstadieno, un proceso para su preparación y su uso para el tratamiento de trastornos cardiovasculares tales como insuficiencia cardiaca e hipertensión.

El documento EP0590272B1 describe derivados de 17-aril y 17-heterociclil-5-β, 14-β-androstano y su uso para el tratamiento de trastornos cardiovasculares tales como insuficiencia cardiaca e hipertensión.

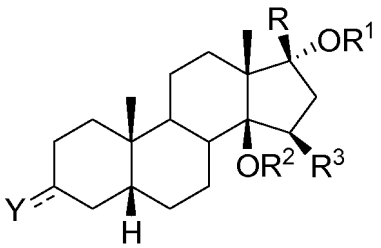
El documento WO2008148812 describe derivados de 17-β-(3-furil) y (4-piridazinil)-5-β, 14-β-androstano y su uso para el tratamiento de la reestenosis tras angioplastia o endarterectomía, y las enfermedades debidas a fibrosis de órganos.

Ninguna de las publicaciones anteriormente mencionadas describe el uso de los derivados de 5β, 14β-androstano para la prevención y/o el tratamiento de la proteinuria, glomeruloesclerosis e insuficiencia renal.

Ahora se ha descubierto que el 17-β-(3-furil) 5-β, 14-β-androstano según la presente invención es un agente útil para la prevención y el tratamiento de la proteinuria, glomeruloesclerosis e insuficiencia renal.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a la utilidad de un compuesto de fórmula (I),



(I)

en la que:

el símbolo ⎓ representa un enlace simple;

Y es OR^4 y tiene una configuración beta;

R es 3-furilo;

R^1 es hidrógeno;

R^2 es hidrógeno;

R^3 es hidrógeno;

R^4 es hidrógeno, en el tratamiento de sujetos normotensos.

También se incluyen en esta invención las sales farmacéuticamente aceptables de (I), que conservan la actividad biológica de la base y que derivan de ácidos farmacéuticamente aceptables conocidos, tales como ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, málico, tartárico, maleico, cítrico, metanosulfónico o benzoico.

La presente invención proporciona 17-β-(3-furil)-5-β-androstano-3-β, 14-β, 17-α-triol; para el uso como agente antiproteurémico en el tratamiento de sujetos normotensos.

El compuesto específico según la presente invención es 17-β-(3-Furil)-5-β-androstano-3-β, 14-β, 17-α-triol, mencionado en adelante como "rostafuroxina" o "PST 2238".

Un objetivo adicional es proporcionar un compuesto de fórmula (I) para el uso como agente antiglomeruloesclerótico en sujetos normotensos.

Un objetivo adicional es proporcionar un compuesto de fórmula (I) para el uso como agente anti-insuficiencia renal en sujetos normotensos.

Un objetivo adicional es proporcionar el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la proteinuria, glomeruloesclerosis e insuficiencia renal en sujetos normotensos.

Se describe un método para tratar a un mamífero que padece proteinuria, glomeruloesclerosis o insuficiencia renal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I). La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar o mejorar una enfermedad o afección seleccionada como objetivo, o para exhibir un efecto terapéutico detectable.

Para cualquier compuesto, se puede estimar inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz en ensayos con cultivos celulares o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos.

El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentraciones adecuado y la vía de administración. Tal información se puede usar después para determinar las dosis y vías útiles para la administración en seres humanos.

La cantidad eficaz exacta para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado patológico, la salud general del sujeto, la edad, el peso, y el sexo del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de la administración, la(s) combinación(es) de fármacos, la sensibilidad a la reacción, y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar mediante experimentación rutinaria, y está dentro del juicio del clínico. En general, una dosis eficaz diaria será de 0,05 mg a 20 mg, preferiblemente 0,5 mg a 15 mg, lo más preferiblemente 5 mg a 10 mg.

El tratamiento de dosificación puede ser un calendario de dosis individuales o un calendario de dosis múltiples, según el criterio del médico.

Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente, o se pueden administrar en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

El medicamento también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración de un agente terapéutico. Tales vehículos incluyen anticuerpos y otros polipéptidos, genes y otros agentes terapéuticos tales como liposomas, con tal de que el vehículo no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos hacia el individuo que recibe la composición, y que se pueda administrar sin una toxicidad indeseada.

Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas.

Una discusión minuciosa de los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables de las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Además, en tales composiciones puede haber presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares. Tales vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones, y similares, para la ingestión por parte del paciente.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, se pueden tratar sujetos humanos.

El medicamento de esta invención se puede administrar mediante cualquier vía que incluye, pero sin limitación, las aplicaciones oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica o transcutánea, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, rectal o localmente en el tejido enfermo tras operación quirúrgica. El compuesto de la invención también se puede aplicar (revestir) sobre una malla intravascular, incluso incorporarlo en una matriz de liberación controlada.

Discusión de los dibujos

La Figura 1 representa el nivel de excreción urinaria de proteínas (mg/6 h) en ratones que portan la inactivación génica (KO) de la β aducina en comparación con los controles de tipo natural (WT). Los ratones macho tenían una edad de 11 meses, y la excreción urinaria de proteínas se midió en la orina recogida durante 6 horas de cada ratón albergado en una jaula metabólica. Los datos son la media ± eem de 15 ratones WT y 19 KO. El análisis estadístico

se llevó a cabo mediante una prueba t de Student. La figura muestra que la excreción urinaria de proteínas de 6 horas disminuyó significativamente (un 30%) en los ratones KO de β aducina en comparación con los controles WT.

La Figura 2 representa la cantidad de proteínas de podocitos (nefrina, α-actinina, ZO-1, podocina, α-aducina y actina) expresadas en podocitos cultivados obtenidos de ratas neonatales (edad <10 días) de las cepas congénicas NB y NA. Las proteínas de los podocitos se cuantificaron en extractos de podocitos mediante transferencia de Western con anticuerpos adecuados (véanse los trazos representativos en la parte superior de las barras). Los datos se informan como la media ± eem de varios experimentos que oscilaron de 4 a 24 para cada cepa. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba t de Student. La figura muestra que las cantidades de Nefrina, α-Actinina, ZO-1, Podocina y α-Aducina están significativamente reducidas en los podocitos de ratas normotensas NB que portan la β-aducina mutante en comparación con los controles NA que portan la variante de tipo natural, mientras la proteína constitutiva actina es similar.

La Figura 3 representa la expresión de ciertas proteínas de podocitos (Nefrina, Sinaptopodina, α-Actinina, ZO-1, Fyn y Vimentina) como detectables mediante inmunofluorescencia en glomérulos renales de ratas normotensas NB que portan la β-aducina mutante en comparación con los controles NA que portan la variante de tipo natural. La figura muestra que la expresión de estas proteínas está reducida drásticamente en las ratas NB en comparación con las ratas NA, mientras Vimentina, un microfilamento localizado en el cuerpo de los podocitos, se expresa normalmente en las dos cepas.

La Figura 4 muestra la progresión de la insuficiencia renal determinada como el declive de la tasa de filtración glomerular (GFR) a lo largo del tiempo ($ml.min^{-1}.año^{-1}$) en pacientes afectados por nefropatía por IgA subdivididos en 4 grupos según los genotipos de α-aducina (ADD1, Gly460Tyr) y β-aducina (ADD2, C399T). Se descubrió que la interacción entre los dos genes sobre la velocidad de declive fue significativa.

La Figura 5 representa la cantidad de proteínas de podocitos (nefrina, ZO-1, podocina, α-aducina, sinaptopodina y actina) expresadas en podocitos cultivados obtenidos de ratas neonatales (edad <10 días) de la cepa NB congénica e incubadas durante 5 días con o sin Rostafuroxina 10^{-9} M. Las proteínas de los podocitos se cuantificaron en extractos de podocitos mediante transferencia de Western con anticuerpos adecuados. Los datos se informan como la media ± eem de varios experimentos. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba t de Student. La figura muestra que las cantidades de Nefrina, ZO-1, Podocina, α-Aducina y Sinaptopodina, pero no Actina, se incrementan en los podocitos cultivados en presencia de Rostafuroxina 10^{-9} M.

La Figura 6 representa la tensión arterial sistólica (SBP), la excreción urinaria de proteínas y la cantidad de Nefrina de la corteza renal de ratas con infusión crónica de ouabaína (OS) y tratadas con vehículo en comparación con las ratas de control infundidas con solución salina o las ratas OS tratadas de manera oral durante 8 semanas con 100 µg/kg/día de Rostafuroxina. Los datos se informan como la media ± eem de 8 ratas para cada grupo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba t de Student. La figura muestra que la Rostafuroxina redujo significativamente la SBP y la excreción urinaria de proteínas, mientras se incrementó la expresión de Nefrina en las ratas OS, por lo que se antagonizaron los efectos renales de ouabaína.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente la invención.

EJEMPLO 1

Para ensayar la actividad del compuesto de la invención para la prevención de la pérdida de proteínas de los podocitos, se usaron ratas NB congénicas que portaban la mutación de β aducina (*Tripodi G. et al. Effect of Add1 gene transfer on blood pressure in reciprocal congenic strains of Milan rats. BBRC 2004; 324: 562-568*). Dichas ratas NB son ratas no hipertensas, y están disponibles en el Instituto de Investigación Prassis, Sigma-tau, Italia.

Se usaron ratas NB con una edad de 7 a 10 días para el aislamiento y el cultivo de podocitos. Los podocitos de ratas NB se incubaron durante 5 días sin (control NB, n=4) y con Rostafuroxina a 10^{-9} M (NB n=5). Las proteínas de los podocitos se cuantificaron al final de los 5 días de incubación mediante transferencia de Western. La cuantificación mediante transferencia de Western se replicó de dos a tres veces para cada marcador de podocitos. Las Tablas 1A y 1B muestran el número final de muestras de podocitos analizadas para cada condición, como valores medios de los replicados (control NB, n=4; NB+Rostafuroxina, n=5). El análisis densitométrico se cuantificó como la densidad óptica, en unidades arbitrarias.

Aislamiento de podocitos y cuantificación de proteínas en podocitos cultivados

Se aislaron glomérulos de riñones NB mediante tamizado y purificación manual posterior. Los glomérulos se sembraron después en matraces de cultivo (Corning, Sigma-Aldrich, Milán, Italia), pre-revestidos con colágeno tipo IV (Sigma-Aldrich) a 37 °C en una atmósfera de un 5% de CO_2. En los días 4 a 5, comenzó el crecimiento de los podocitos y, en el día 8, se desprendieron los glomérulos mediante el uso de tripsina-EDTA. Los podocitos de segundo pase, que dieron como resultado una pureza >90%, tal como se determinó mediante inspección por microscopía óptica, se sembraron en matraces y portaobjetos con cámara. Se llevó a cabo la cuantificación de proteínas de podocitos (10 µg de proteína/carril) mediante la técnica de transferencia de Western mediante el uso de anticuerpos específicos hacia nefrina, podocina, ZO-1, aducina, sinaptopodina y actina.

Los resultados obtenidos se informan en las siguientes Tablas 1A, 1B y en la Figura 5.

Tabla 1A

Marcador de Podocitos	Número de muestra	Controles NB	Número de muestra	NB + Rostafuroxina	% frente a Ctrl.
Nefrina	1	19,21-19,27	1	24,53	
	-	-	2	27,06	
media		*19,24*		*25,8*	*+ 34*
ZO-1	1	7,69-7,68-5,38-1,16	1	17,3-17,8	
			2	6,38-7,5	
	2		3	8,73-13,33-15,79	
	3		4	11,67-16,05-19,98	
	4		5	12,78-19,06-20,13	
Media ± eem		*7,69±1,03*		*14,36±1,3*	*+86 p<0,001*
Podocina	1	18,32-14,8-4,6-4,85	1	23,4-49,06	
			2	13,3-19,07	
	2	11,9-14,38-12,23	3	16,81-18,63-21,42	
	3	14,15-16,57-21	4	18,78-23,84-36,51	
	4	19,63-22,76-20,3	5	21,53-23,65-27,62	
Media ± eem		*15,03 ±1,58*		*24,13 ± 2,6*	*+60 P< 0,01*

Tabla 1B

Marcador de Podocitos	Número de muestra	Controles NB	Número de muestra	NB + Rostafuroxina	% frente a Ctrl.
α-Aducina	1	4,42-2,10	1	22,23	
			2	6,06	
	2	4,38-6,02	3	5,70-6,77	
	3	5,17-3,91	4	8,06-7,53	
	4	4,47-6,75	5	9,33-7,07	
Media ± eem		*4,65 ± 0,49*		*9,09 ± 1,9*	*+95 P< 0,001*
Sinaptopodina	1	1,1	1	2,7	
			2	2,51	
	2	1,61	3	4,29	
	3	0,912	4	1,43	

	4	0,79	5	2,56	
Media ± eem		*1,10 ± 0,18*		*2,70 ± 0,45*	*+143 P< 0,02*
Actina	1	94,3-95-90 - 88,5	1	130,5	
			2	115-87,5-140,4	
	2	97,3-94,8-100-97	3	111-98-98,2-81,2	
	3	120,0-90,4-94-109,9	4	86,2-101,2-101-144,2	
	4	99,4-92,4-85,4-160,9	5	87,7-108-103-91,6	
Media ± eem		*100,5 ± 4,53*		*105,3 ± 4,75*	*ns*

Los resultados obtenidos indican que el compuesto de la invención es capaz de antagonizar la pérdida de proteínas de podocitos inducida por la mutación de β aducina, lo que favorece la función correcta de la barrera de filtración glomerular y reduce la proteinuria en un modelo experimental normotenso.

EJEMPLO 2

Para ensayar la actividad del compuesto de la invención en la prevención de la proteinuria y la pérdida de proteínas glomerulares renales, se utilizaron ratas con infusión crónica de ouabaína (ratas OS) o solución salina (ratas de control).

Se trató a dos grupos de ratas OS con una edad de 2 meses (n=8 cada uno) de manera oral mediante alimentación por sonda con vehículo (Methocel al 0,5%) o Rostafuroxina (100 µg/kg) durante 8 semanas. Se usó como control un grupo de ratas a las que se les infundió solución salina. Tras este periodo, se midió la tensión arterial sistólica y la excreción urinaria de proteínas en los tres grupos. Los animales de los tres grupos se sacrificaron después para la cuantificación de nefrina de microsomas de la corteza renal mediante transferencia de Western.

Infusión de ouabaína

Se implantó de manera subcutánea a ratas Sprague-Dawley macho con una edad de tres semanas (Harlan, IN), que pesaban 100-110 g, mini-bombas osmóticas, que liberaban 15 µg/kg/día de ouabaína (ratas OS, n=16) durante 14 semanas o solución salina estéril (ratas CS, n=8) (*Ferrari P. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998; 285: 83-94*). A la 6ª semana de infusión de ouabaína, las ratas OS se asignaron de manera aleatoria a dos grupos (n=8 cada uno): el primero (tratado con OS) recibió Rostafuroxina de manera oral a 100 µg/kg/día, suspendida en un 0,5% p/v de Methocel, y el segundo grupo (controles) solamente vehículo. Se midió semanalmente la tensión arterial sistólica (SBP) y la frecuencia cardiaca (HR) en ratas conscientes mediante pletismografía con manguito caudal (registrador BP, U. Basile, Italia).

Ensayos bioquímicos para la medida de los parámetros urinarios

Los parámetros urinarios se midieron en ratas OS y de control conscientes en la 12ª semana de tratamiento. Las ratas se albergaron en jaulas metabólicas individuales y se aclimataron durante un día. La recogida de orina de 24 horas comenzó a las 9 a.m. Durante la recogida de orina, las ratas tuvieron acceso libre a agua y alimento. Tras la centrifugación (4500 rpm durante 20 min; Varifuge 3.2 RS, Haereus Instruments, AHSI, Milán, Italia), se analizó el volumen urinario (ml) de las orinas de las ratas, cuantificado pesando el depósito urinario en una balanza de precisión Mettler; el pH urinario (pHM83, Radiometer, Copenhague) y la excreción urinaria total de proteínas (mg/24 h), medida con un equipo estándar de proteínas totales (Sentinel Diagnostics, Milán, Italia). Después se sacrificaron los animales de los tres grupos, se prepararon los microsomas corticales renales de cada rata y se cuantificó la nefrina, la proteína clave de la membrana de los diafragmas en hendidura, mediante transferencia de Western. Las muestras se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, se transfirieron y se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios específicos (anti-nefrina de Santa Cruz; anti-actina de Sigma-Aldrich), seguido de incubación de 1 h con anticuerpos secundarios fluorescentes (Alexa Fluor), después se analizaron y se cuantificaron mediante un sistema de detección por formación de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biosciences). La cuantificación de nefrina se expresa como la densidad óptica, en unidades arbitrarias.

Los resultados obtenidos se informan en las siguientes Tablas 2A; 2B; 2C; y la Figura 6.

Tabla 2A

Control de solución salina			
Control de solución salina	Tensión arterial sistólica mmHg	Proteinuria mg/24h	Nefrina densidad óptica unidades arbitrarias
1	140	31,63	64,51
2	150	45,06	64,3
3	150	28,2	79,92
4	145	51,6	52,88
5	135	29,16	66,06
6	145	21,95	58,92
7	150	25,44	45,91
8	140	45,44	-
media ± eem	*144 ± 1,2, n=8*	*34,9 ± 3,8, n=8*	*61,8 ± 4, n=7*

Tabla 2B

Ratas infundidas con ouabaína (OS): efecto del tratamiento con methocel (vehículo)			
Ratas OS	Tensión arterial sistólica mmHg	Proteinuria mg/24h	Nefrina densidad óptica unidades arbitrarias
1	170	35,41	51,4
2	180	79,3	49,7
3	170	42,3	35,9
4	170	37,8	41,9
5	165	57,07	47,0
6	160	45,2	52,3
7	175	47,19	44,3
8	170	60,3	52,2
media ± eem	*170 ± 2,1, n=8 p<0,01 frente a Solución salina*	*50,6 ± 5,1, n=8 p<0,05 frente a Solución salina*	*46,7 ± 2,1, n=8 p<0,02 frente a Solución salina*

Tabla 2C

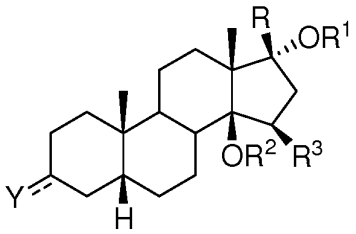
Ratas infundidas con ouabaína (OS): efecto del tratamiento con 100 µg/kg por vía oral de Rostafuroxina			
OS tratadas con Rostafuroxina	Tensión arterial sistólica mmHg	Proteinuria mg/24h	Nefrina densidad óptica unidades arbitrarias
1	135	53,07	64,7
2	150	20,14	54,8
3	155	55,34	51,4
4	145	29,02	50,8

5	155	39,7	76,1
6	145	40,68	57,4
7	155	20,85	48,8
8	150	48,88	53,8
media ± eem	*148,8±2,5, n=8 ns frente a Solución salina*	*38,54,9, n=8 ns frente a Solución salina*	*57,3 ± 3,1, n=8 ns frente a Solución salina*

Los resultados obtenidos indican que el compuesto de la invención es capaz de antagonizar los efectos patológicos de ouabaína sobre la tensión arterial, la excreción urinaria de proteínas y la pérdida glomerular de proteínas, por lo que disminuye la tensión arterial, se restablece la expresión de nefrina glomerular y se reduce la proteinuria.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I),



(I)

en la que:

el símbolo ⎓ representa un enlace simple;

Y es OR^4, y tiene una configuración beta;

R es 3-furilo;

R^1 es hidrógeno;

R^2 es hidrógeno;

R^3 es hidrógeno;

R^4 es hidrógeno;

para el uso en el tratamiento de la proteinuria en sujetos normotensos.

2. El uso del compuesto de fórmula (I) de la reivindicación 1, para preparar un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la proteinuria, y/o glomeruloesclerosis y/o insuficiencia renal en sujetos normotensos.

3. El uso según la reivindicación 2, en el que el compuesto se administra en una dosis de 0,05 mg a 20 mg al día.

4. El uso según la reivindicación 3, en el que el compuesto se administra en una dosis de 0,5 mg a 15 mg.

5. El uso según la reivindicación 3, en el que el compuesto se administra en una dosis de 5 mg a 10 mg.

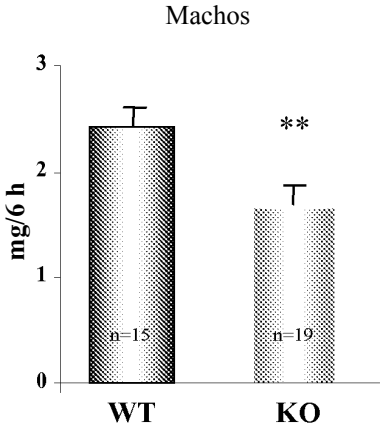
6. El uso según las reivindicaciones 3-5, en el que el compuesto se administra en un calendario de dosis individuales.

7. El uso según las reivindicaciones 3-5, en el que el compuesto se administra en un calendario de dosis múltiples.

8. El uso según la reivindicación 2, en el que el medicamento es para administración oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual o rectal.

Figura 1: Excreción urinaria de proteínas en ratones de tipo natural y con inactivación génica de β aducina.

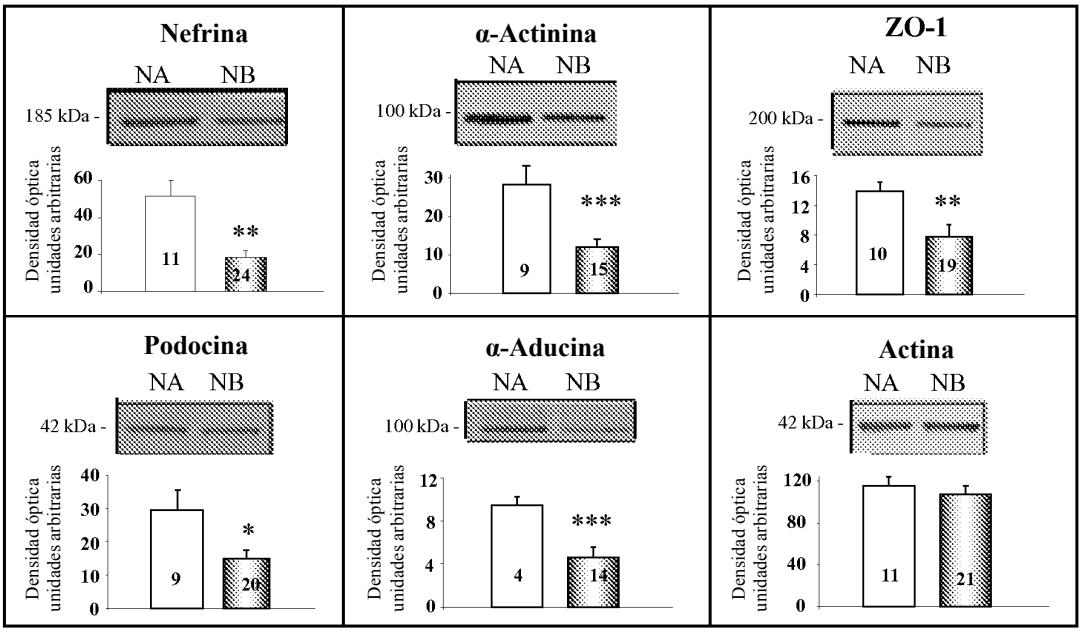
Proteinuria en ratones de tipo natural y con inactivación génica de β-aducina (edad de 11 semanas)



WT 2,43 ± 0,15 mg/6 h, n=15
KO 1,62 ± 0,16 mg/24 h, n=19, -30%, p<0,01

Figura 2: Cantidad de proteínas de podocitos cultivados de cepas de ratas congénicas NB y NA neonatales

Podocitos cultivados de ratas neonatales (<10 días)



* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Figura 3: Excreción urinaria de proteínas (mg/24 h) y cantidad de proteínas de podocitos detectada mediante inmunofluorescencia en cortes de riñón de ratas congénicas NB y NA normotensas

Análisis de inmunofluorescencia de proteínas de podocitos en cortes de riñón de ratas congénicas para α-Aducina (NA) y β-Aducina (NB)

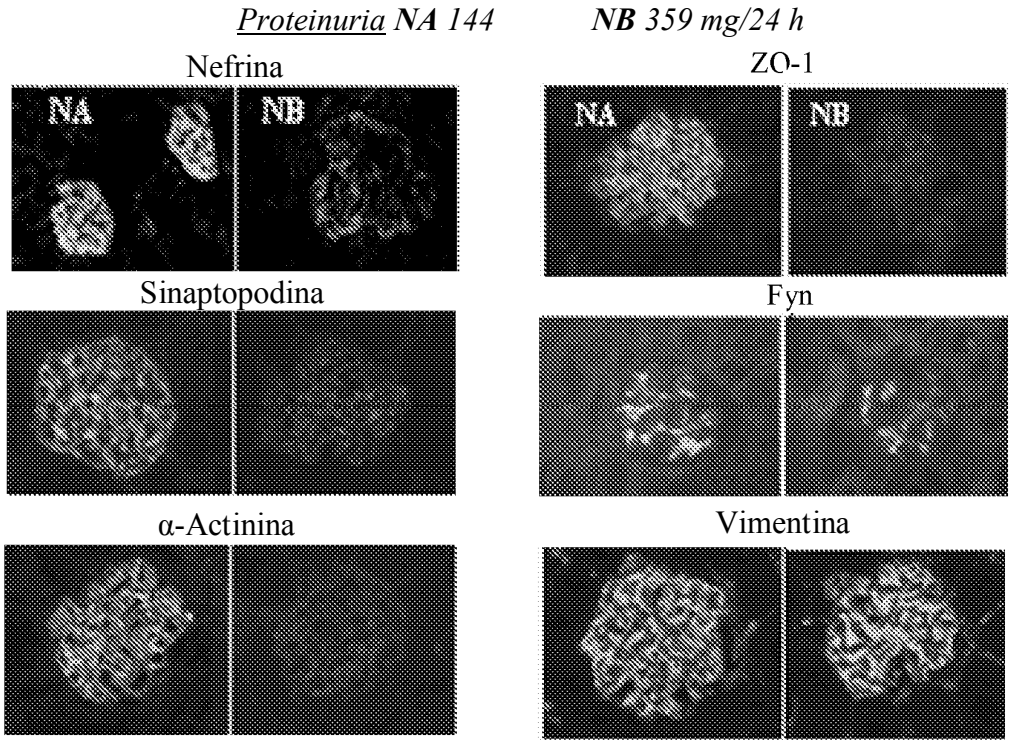


Figura 4: Declive de GFR a lo largo del tiempo en pacientes afectados de nefropatía por IgA en función del genotipo de β y α aducina

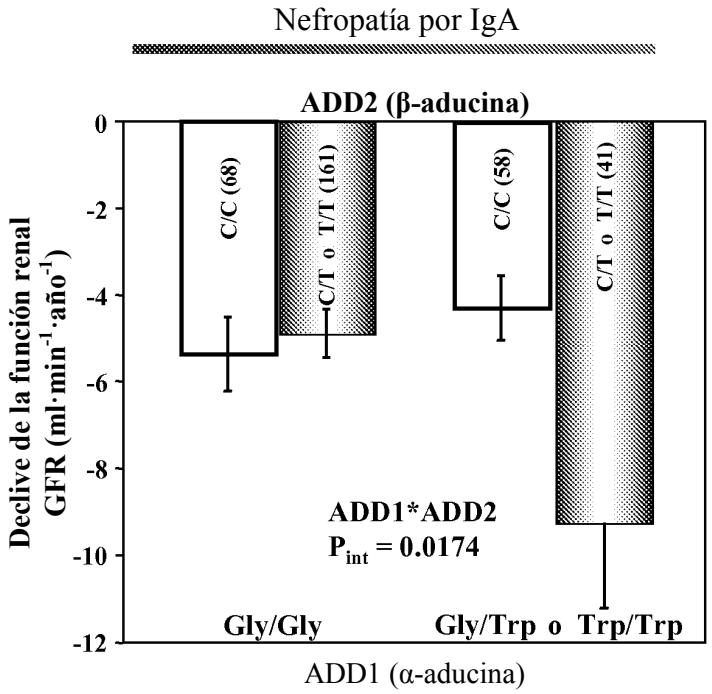


Figura 5: Podocito cultivado de ratas NB: cantidad de proteínas mediante transferencia de Western. Efecto de Rostafuroxina 10^{-9} M

Podocitos cultivados de ratas congénicas neonatales: efecto de Rostafuroxina 10^{-9} M

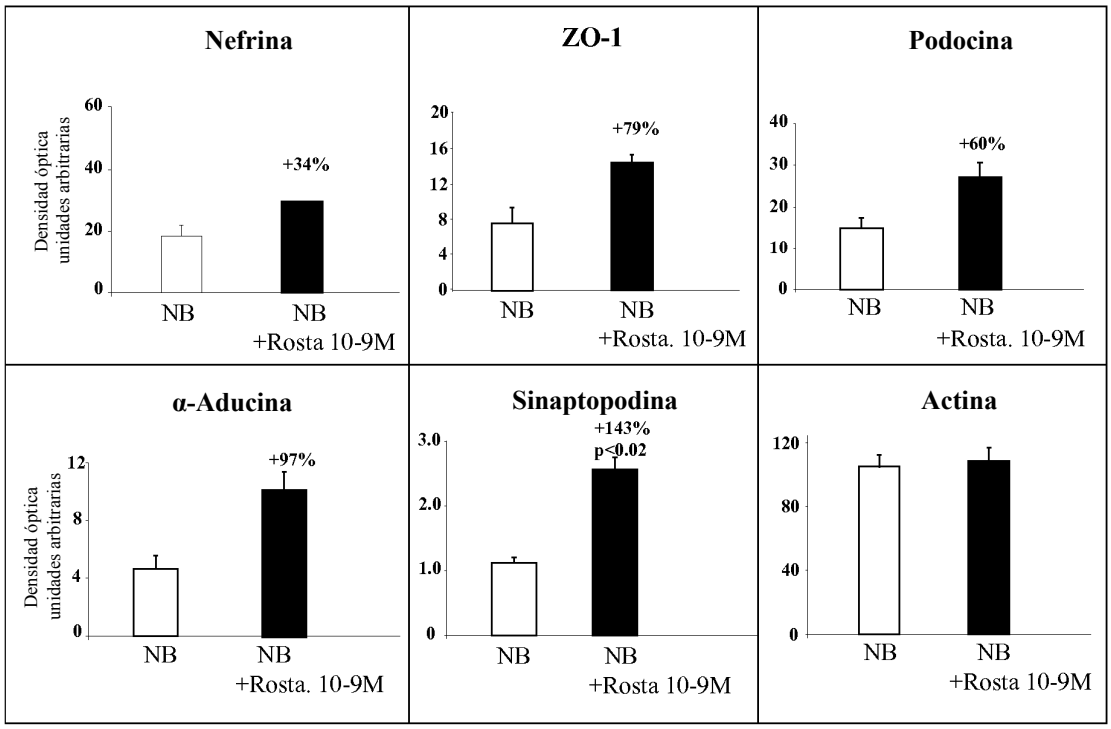
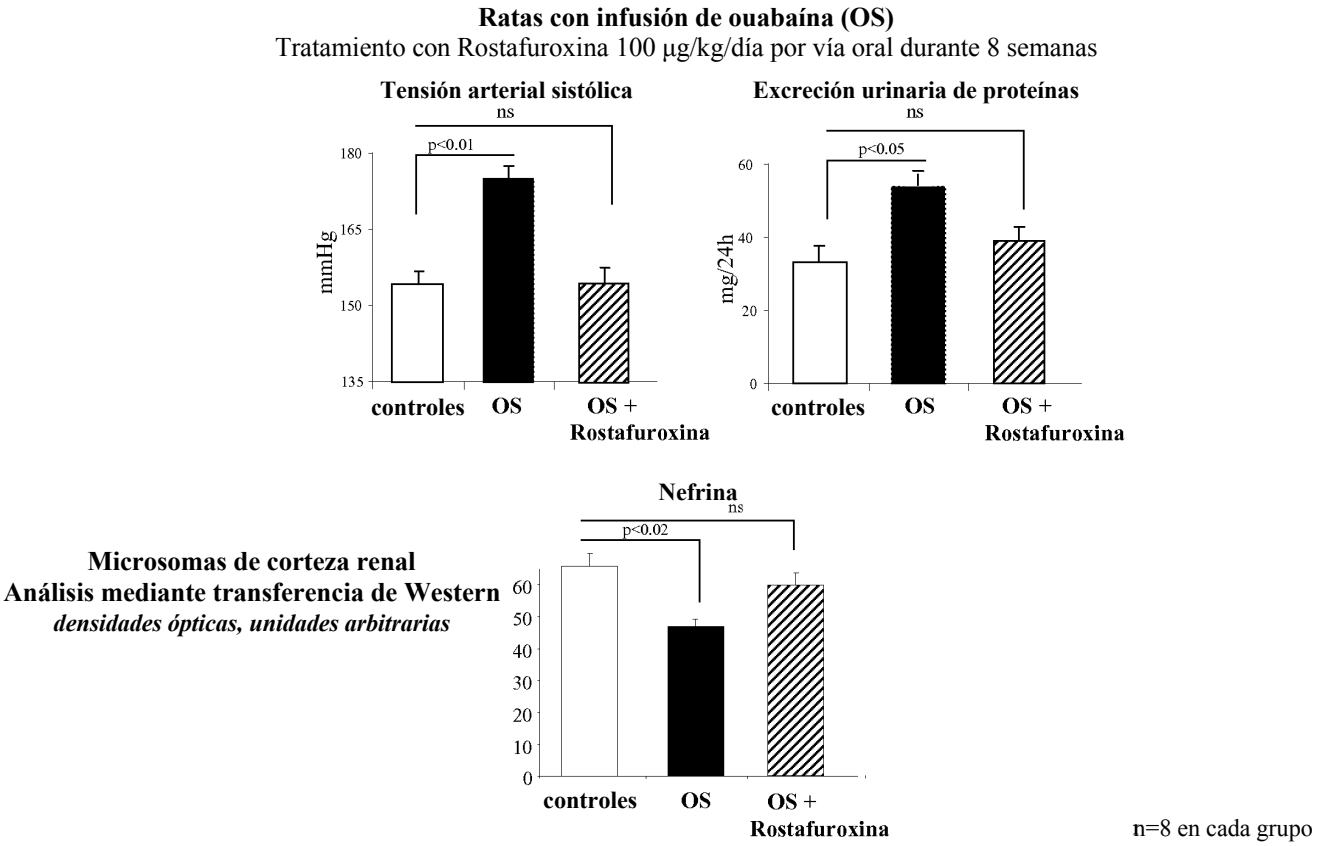



Figura 6: Tensión arterial sistólica, excreción urinaria de proteínas y cantidad de nefrina en la corteza renal de ratas con infusión de ouabaína (OS): efecto del tratamiento oral con 100 µg/kg de Rostafuroxina durante 8 semanas