(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 613 252**

(21) Número de solicitud: 201531677

(51) Int. CI.:

A61K 31/19 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A2

(22) Fecha de presentación:

19.11.2015

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

23.05.2017

(71) Solicitantes:

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (100.0%)
Avenida de los Reyes Católicos, 2
28040 Madrid ES

(72) Inventor/es:

ORTIZ ARDÚAN, Alberto;
SANZ BARTOLOMÉ, Ana;
SÁNCHEZ NIÑO, María Dolores y
RUIZ DE ANDRÉS, Olga

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

(54) Título: **DERIVADOS DEL CROTONATO PARA LA FABRICACIÓN DE UN MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y FRACASO RENAL AGUDO**

(57) Resumen:

Derivados del crotonato para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo y composición farmacéutica que comprende dichos compuestos.

ES 2 613 252 A2

DERIVADOS DEL CROTONATO PARA LA FABRICACIÓN DE UN MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y FRACASO RENAL AGUDO

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención pertenece al campo farmacéutico, en concreto para el tratamiento de enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo. La invención se refiere al uso de ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de estas enfermedades.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El tratamiento actual de la patología renal es insatisfactorio: no existe un tratamiento adecuado que disminuya la gravedad ni acelere la recuperación del fracaso renal agudo (FRA) La enfermedad renal crónica (ERC) fue la causa de muerte que más aumentó entre 1990 y 2013 a nivel global, después de la infección por HIV.

Las modificaciones post-traduccionales de histonas, tales como metilación, acetilación o fosforilación, juegan un papel clave en diversos procesos biológicos tales como el desarrollo, diferenciación celular, muerte celular o inflamación. Recientemente se identificó la crotonilación de lisinas como una nueva y evolutivamente conservada modificación post-traduccional de histonas, presente en varios tejidos somáticos de ratón adulto (Tan M. et al. Identification of 67 histone marks and histones lysine crotonylation as a new type of histone modification. Cell. 2011; 146(6): 1016-28. PMID: 21925322).

La crotonilación se lleva a cabo a través de una modificación química, muy similar al mecanismo de acetilación, catalizada por la crotonil/acetil-transferasa p300 y en la que se usa crotonil-CoA como cofactor. En esta reacción se añade un grupo crotonil a los aminoácidos lisina.

La crotonilación es una modificación que difiere en mecanismo y función de la acetilación y principalmente marca promotores activos y enhancers. Los puntos de crotonilación ocupan

lugares similares a los de acetilación de lisinas en histonas, pero se ha demostrado que crotonilación y acetilación de histonas difieren en mecanismo y función (Tan M. et al. Identification of 67 histone marks and histones lysine crotonylation as a new type of histone modification. Cell. 2011; 146(6): 1016-28. PMID: 21925322).

En el mercado no hay ningún producto para tratar (disminuir gravedad o acelerar recuperación) el fracaso renal agudo. Los IECAs/ARAII (fármacos para tratar la tensión arterial), único tratamiento eficaz e introducido hace más de 20 años, enlentecen la progresión de la enfermedad renal crónica, pero no la evitan y el número de pacientes en diálisis o trasplante continúa aumentando. El tratamiento del fracaso renal agudo se limita a sustituir la función renal mediante técnicas de diálisis hasta que el riñón se recupera espontáneamente. Sin embargo la diálisis es una técnica cara e invasiva que tiene su propia mortalidad y no modifica el problema subyacente (lesión renal que causa el fracaso renal agudo). Otro problema es la ausencia de marcadores adecuados de daño renal. Los niveles de creatinina y de nitrógeno ureico en sangre son los principales marcadores de función renal, pero estos se detectan cuando la función está por debajo del 50%, no existe ningún marcador precoz.

El epitelio tubular es una célula central en el daño renal. En efecto, su muerte juega un papel fundamental en el fracaso renal agudo, donde es el mejor correlato histológico de la disfunción renal, y su número tambien disminuye en la enfermedad renal crónica. El epitelio tubular contribuye al daño renal mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias, se desdiferencia y prolifera durante la regeneración que sigue a la necrosis tubular aguda y puede sufrir una diferenciación epitelio-mesenquimal, promoviendo así tanto la atrofia tubular como la fibrosis intersticial. Entre las moléculas inflamatorias liberadas por las células tubulares está CCL2, una quimioquina atrayente de macrófagos que promueve el infiltrado inflamatorio. Por otro lado, las células tubulares son ricas en mitocondrias y se ha visto que durante el fracaso renal agudo las mitocondrias sufren cambios funcionales y morfológicos. PGC-1α y Sirt3 son dos proteínas que se regulan mutuamente, modulan la biogénesis mitocondrial y tienen un papel protector durante el fracaso renal agudo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El problema técnico en vista del estado de la técnica más cercano puede definirse como la aportación de compuestos para el tratamiento del fracaso renal agudo y de la enfermedad renal crónica.

La solución a este problema consiste en proporcionar los compuestos definidos en las reivindicaciones de la presente solicitud.

Un aspecto de la presente invención es el uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA para la fabricación de un medicamento.

Este aspecto de la invención se puede formular de forma alternativa como un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo.

En la presente invención se ha demostrado que el crotonato aumenta la crotonilación de histonas en cultivos de células renales y en tejido renal in vivo; y que el aumento de la crotonilación de histonas tiene un efecto beneficioso en el fracaso renal agudo.

Por tanto, el crotonato puede usarse clínicamente para tratar pacientes con fracaso renal agudo, abriendo un nuevo tratamiento de esta enfermedad y para enlentecer la progresión de la enfermedad renal crónica.

Los niveles celulares de crotonilación de histonas son sensibles a cambios en la concentración celular de crotonil-CoA. El crotonato es el precursor para la síntesis del crotonil-CoA en células de mamíferos. El crotonato incrementa los niveles de crotonil-CoA que a su vez aumentan la crotonilación de histonas.

En la presente invención se ha demostrado el efecto de la administración de crotonato sobre la crotonilación de histonas en células renales. En la presente invención se ha demostrado que:

- La crotonilación de histonas está modificada durante el fracaso renal agudo experimental, y puede ser modificada terapéuticamente por la administración de crotonato.

- La administración de crotonato incrementa los niveles de crotonilación de histonas en riñón y tiene un efecto nefroprotector durante el fracaso renal agudo.

- La crotonilación de histonas está modificada en células renales cultivadas expuestas a mediadores del fracaso renal agudo, como la citoquina inflamatoria TWEAK, y puede ser modificada terapéuticamente por la administración de crotonato.

La administración de crotonato incrementa los niveles de crotonilación de histonas en células renales cultivadas y las protege del stress inducido por TWEAK.

Este aspecto de la invención se puede formular de forma alternativa como un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA para su uso en el tratamiento de enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo.

Este aspecto de la invención se puede formular también como un método de tratamiento de enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo en un sujeto humano que comprende administrar a dicho sujeto humano un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término “excipientes” hace referencia a compuestos que estabilizan y favorecen la absorción de los principios activos, colorantes, endulzantes, saborizantes, protectores frente al aire y/o humedad, aglutinantes, etc.

La composición farmacéutica puede ser formulada con excipientes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro tipo de portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con técnicas convencionales en la práctica farmacéutica.

La composición farmacéutica puede ser administrada por si sola o en combinación con otros principios activos.

La composición farmacéutica puede ser administrada en dosis simples o múltiples.

La composición farmacéutica del primer aspecto de la invención puede ser administrada por cualquier vía de administración (por ejemplo, oral, sublingual, perioral, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intranasal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, subcutánea, tópica, etc.) para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

La composición farmacéutica puede ser formulada para proporcionar la liberación controlada del ingrediente activo como por ejemplo liberación sostenida o prolongada de acuerdo con métodos que son bien conocidos en la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Las células tubulares renales fueron estimuladas con 50 o 100 mM crotonato durante 24h. La valoración de los niveles de crotonilación de histonas (Kcr) en estas células, se hizo mediante extracción de histonas y Western blot utilizando el anticuerpo anti-crotonyl-lysine (anti-kcr) y usando como control de carga la histona 3 (anti-H3). Los resultados obtenidos mostraron que la crotonilación de histonas aumenta con la administración de crotonato de manera dosis-dependiente. * P<0.05 vs crotonato 0 mM

Figura 2. El tratamiento con crotonato disminuye los niveles de citoquinas proinflamatorias como CCL2 células tubulares renales de manera dosis dependiente a las 24 horas. Media ± SEM de 4 experimentos independientes. * P<0.05 vs crotonato 0 mM

Figura 3. TWEAK aumenta la crotonilación de histonas en células tubulares renales estimuladas con 100 ng/ml TWEAK durante 6 y 24h. Media ± SEM de 4 experimentos independientes. * P<0.05 vs control.

Figuras 4A, 4B y 4C. La administración sistémica de crotonato produce una disminución de los niveles en sangre de nitrógeno ureico (BUN) (Figura 4A) y creatinina (Figura 4B) durante el fracaso renal agudo (FRA) experimental. El análisis de la tinción hematoxilina/eosina en el tejido de riñón (Figura 4C) revela que la extensión del daño tubular disminuye en los animales pretratados con crotonato frente a los animales con fracaso renal agudo no pretratados. Media ± SEM de 5 animales por grupo. # p<0,05 vs FRA 72h.

Figuras 5A, 5B y 5C. La administración sistémica de crotonato previene la disminución en el riñón de PGC-1α (Figura 5A) y SIRT3 (Figura 5B) durante el fracaso renal agudo (FRA), y previene el aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias como CCL2 (Figura 5C). Esto sugiere un efecto protector del crotonato in vivo, y por lo tanto de la crotonilación de histonas, frente a la inflamación y el estrés mitocondrial durante el FRA. Media ± SEM de 5 animales por grupo. *p<0,05 vs control, # p<0,05 vs FRA 72h.

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

Ejemplo 1. Resultados in vitro

Se cultivaron células murinas de túbulo proximal (MCTs) en medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de glutamina y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina), con 5% CO_2 a 37°C. Antes de ser estimuladas, las células fueron cultivadas en ausencia de suero fetal bovino durante 24 horas. La dosis utilizada de TWEAK recombinante humano (Millipore, Billerica, MA) fue 100 ng/ml. La dosis utilizada de crotonato (Sigma Aldrich) fue 50 mM y 100 mM. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 1, 2 y 3.

CCL2 (también llamada MCP-1) es una citoquina proinflamatoria que atrae a los monocitos a los sitios donde hay inflamación producida bien por un daño tisular o por una infección. Se usa como biomarcador de fracaso renal agudo, ya que media el daño renal agudo producido tanto por isquemia como por toxicidad.

Ejemplo 2. Resultados *in vivo*

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las guía NIH de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del IIS-FJD. El modelo animal se realizó con ratones hembra C57/BL6 (de entre 12 y 14 semanas de edad). Los riñones fueron perfundidos con salino frio antes de extraerlos. Un riñón se troceó y congelo en nitrógeno líquido para estudios de ARN y proteínas y el otro se fijó e incluyó en parafina. La sangre se recogió de la vena femoral antes de la perfusión.

La nefropatía por ácido fólico es un modelo clásico de fracaso renal agudo. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 250 mg/kg de ácido fólico (Sigma) en 0,3M de bicarbonato sódico o vehículo.

Otro grupo de ratones recibió una inyección intraperitoneal de crotonato (Sigma Aldrich) 12 mmol/kg o su vehículo (control salino), y otro grupo más fue tratado con 12 mmol/kg de crotonato previamente a la inyección de ácido fólico.

Todos los animales fueron sacrificados a las 72 horas. La dosis/tiempo de tratamiento del crotonato fue calculada basándose en experimentos previos *in vitro* para un volumen extracelular de 6,5 ml por ratón, y posteriormente refinada con estudios dosis/tiempo-respuesta *in vivo*.

Los resultados *in vivo* se muestran en las Figuras 4A, 4B, 4C, 5A, 5B y 5C.

PGC-1α (coactivador 1α del receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisoma) es una proteína que juega un importante papel en la regulación de la termogénesis, gluconeogénesis, biogénesis mitocondrial y respiración célular. Su expresión está disminuida durante el fracaso renal agudo.

SIRT3 (Sirtuina-3) es una deacetilasa de histonas que recientemente ha sido identificada también como una decrotonilasa. Es muy abundante en el riñón y otros tejidos metabólicamente activos y su expresión está disminuida durante el fracaso renal agudo. Bajo situaciones de estrés SIRT3 y PGC-1α se regulan mutuamente.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA para la fabricación de un medicamento.
2. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo.
3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizada por que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido crotónico, ácido metil-crotónico, ácido etil crotónico, sales de dichos ácidos, crotonil-CoA, metil-crotonil-CoA y etil-crotonil-CoA junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

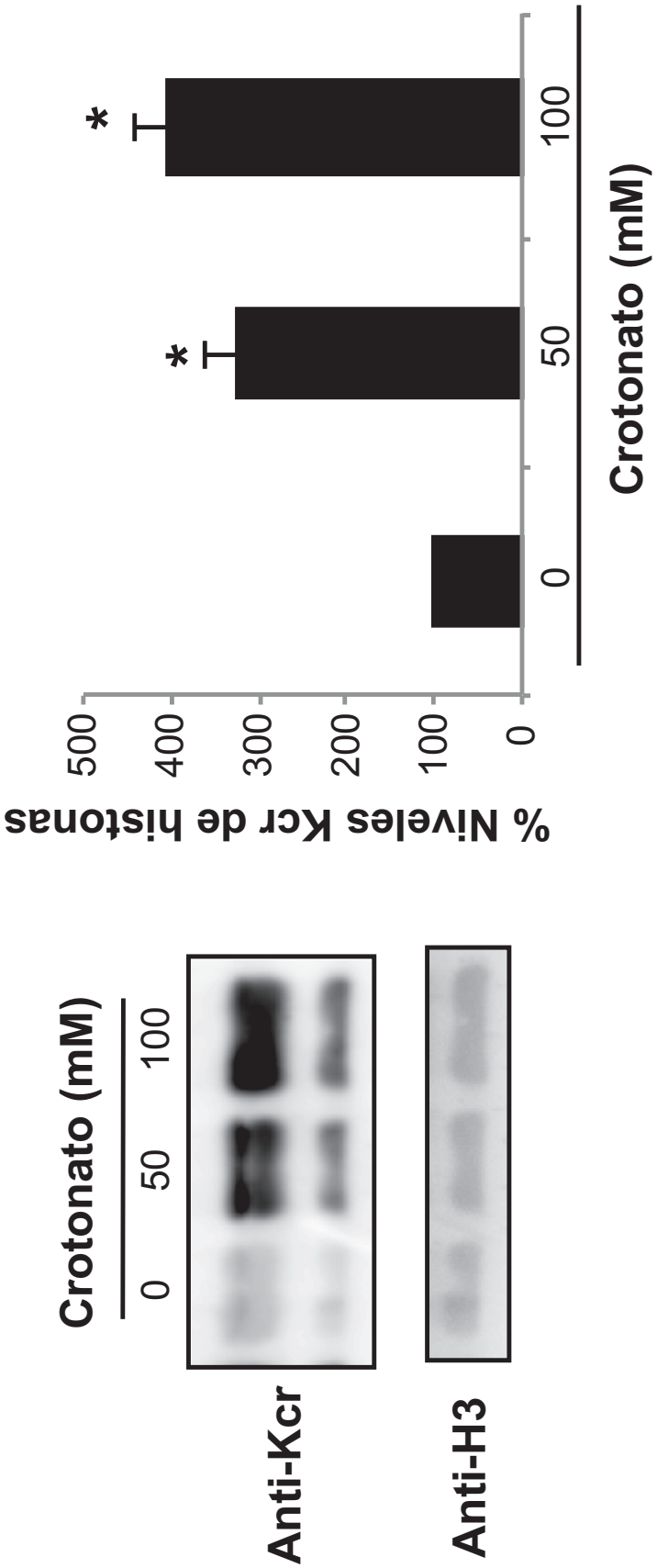

Crotonato (mM)
0
50
100
Anti-Kcr
Anti-H3
% Niveles Kcr de histonas
500
400
300
200
100
0
*
*
0
50
100
Crotonato (mM)

Fig. 1

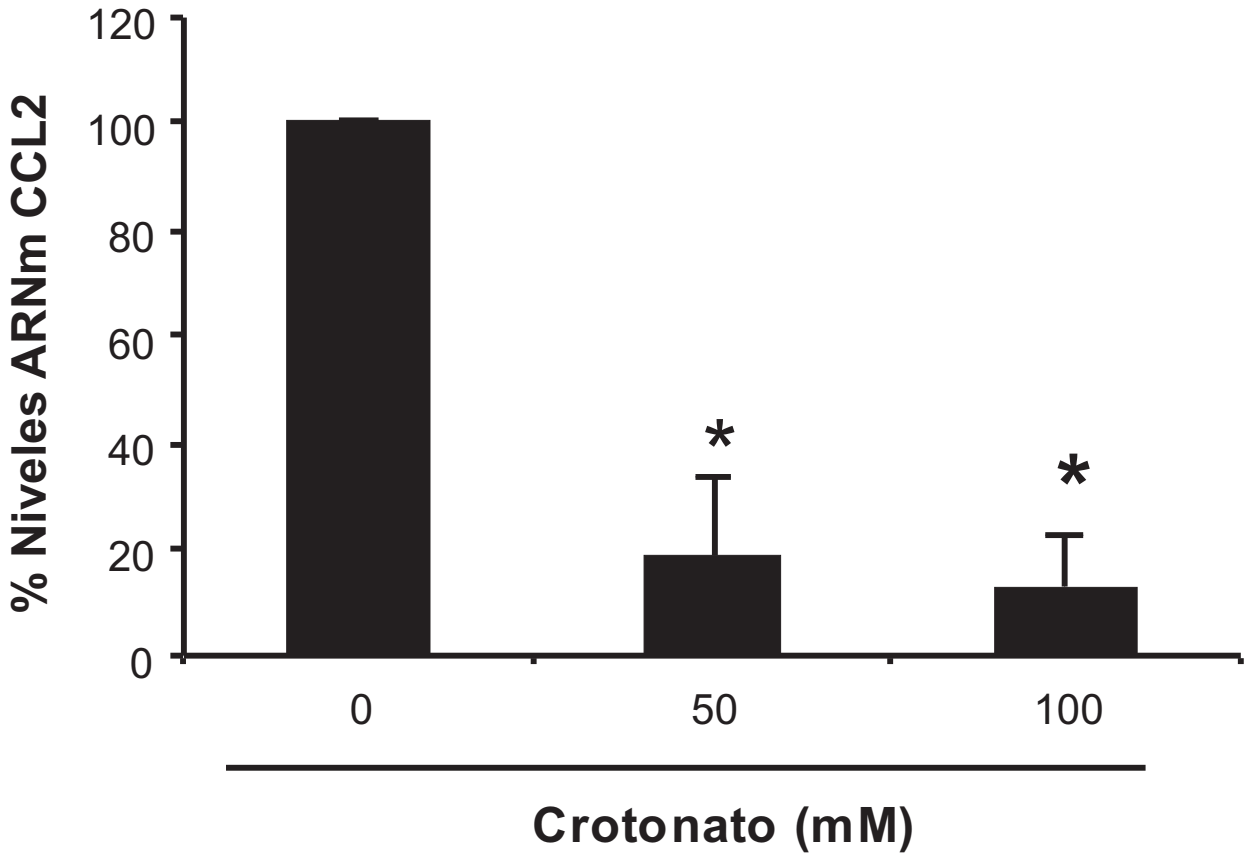
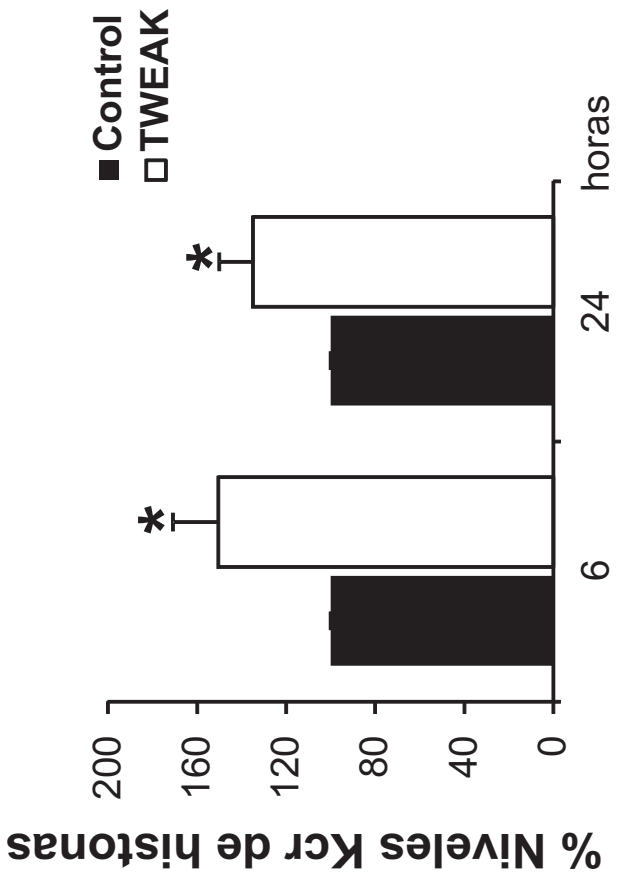


Fig. 2


Control
TWEAK
% Niveles Kcr de histonas
200
160
120
80
40
0
6
24
horas
*
*

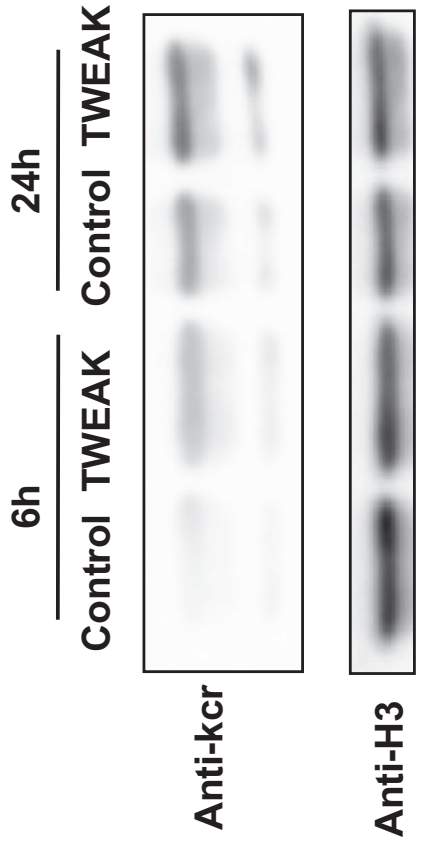

6h
24h
Control
TWEAK
Control
TWEAK
Anti-kcr
Anti-H3

Fig. 3

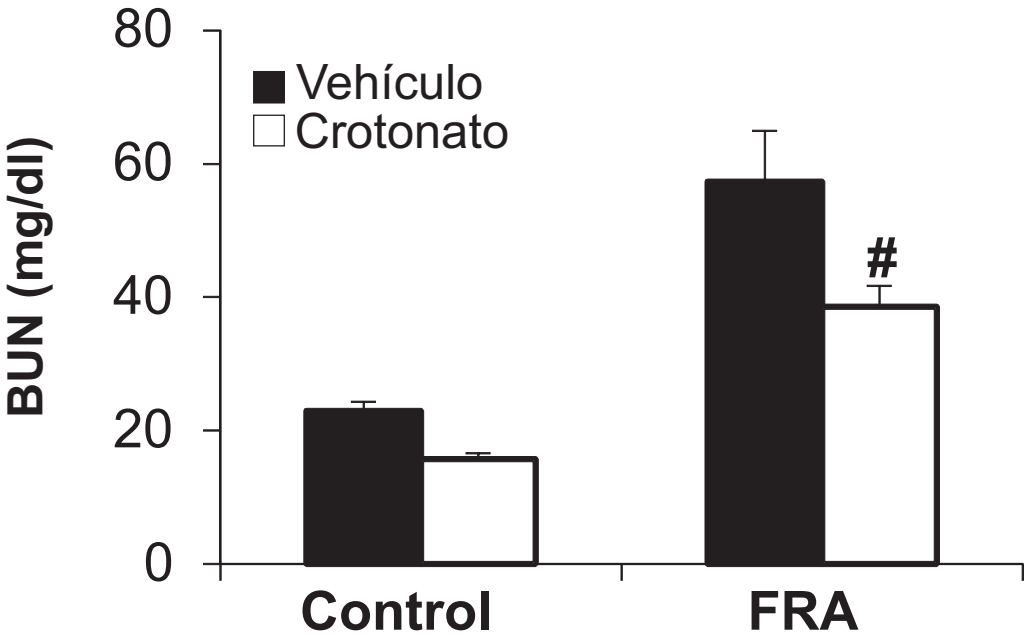

80
60
40
20
0
BUN (mg/dl)
Vehículo
Crotonato
#
Control
FRA

Fig. 4A

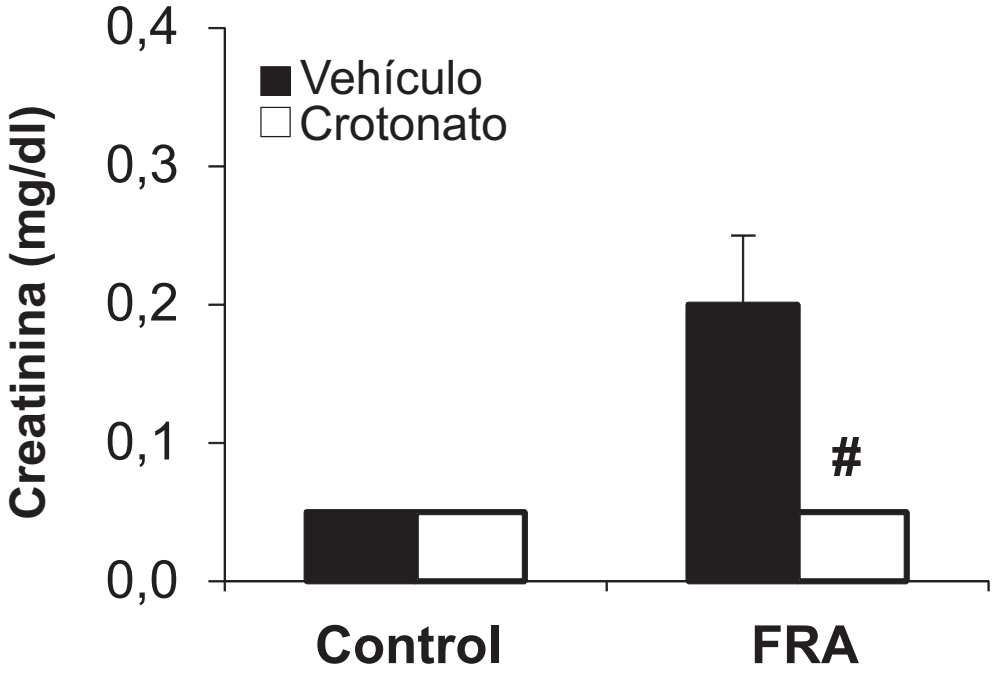

0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Creatinina (mg/dl)
Vehículo
Crotonato
#
Control
FRA

Fig. 4B

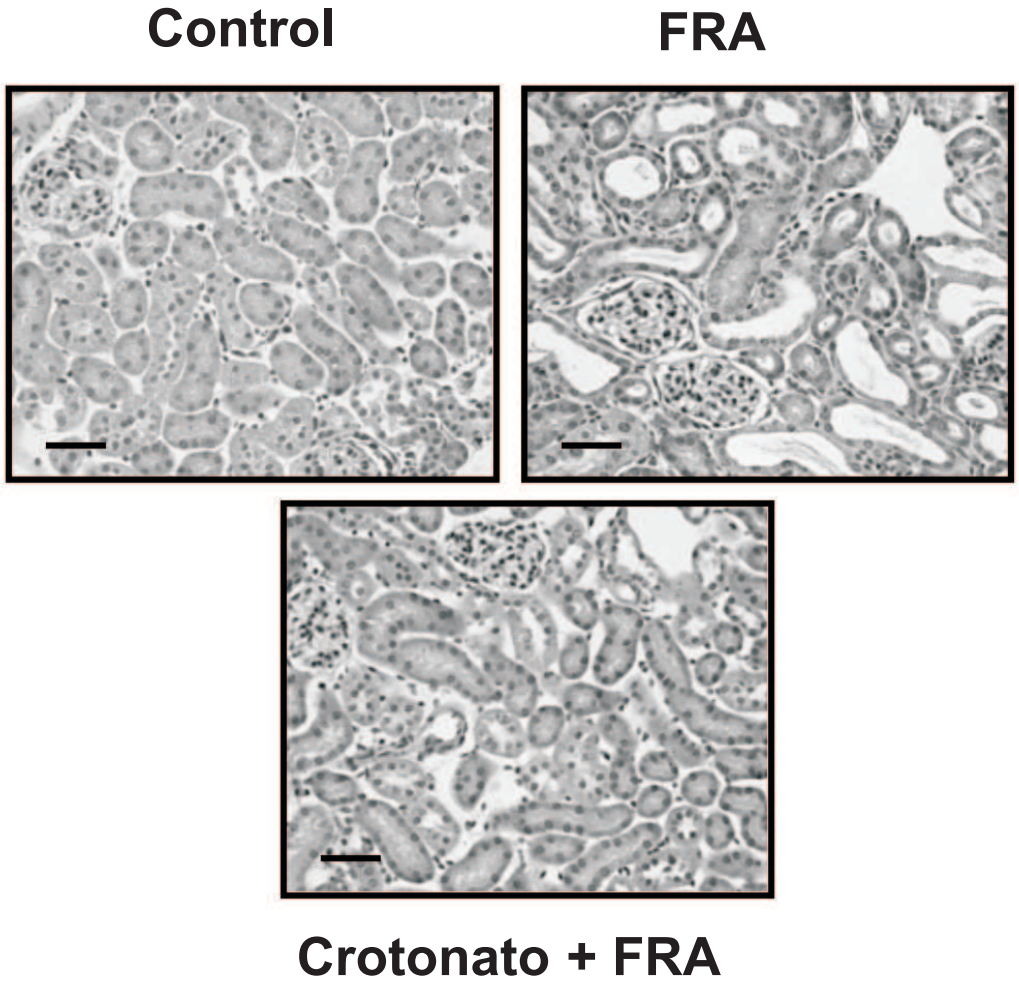


Fig. 4C

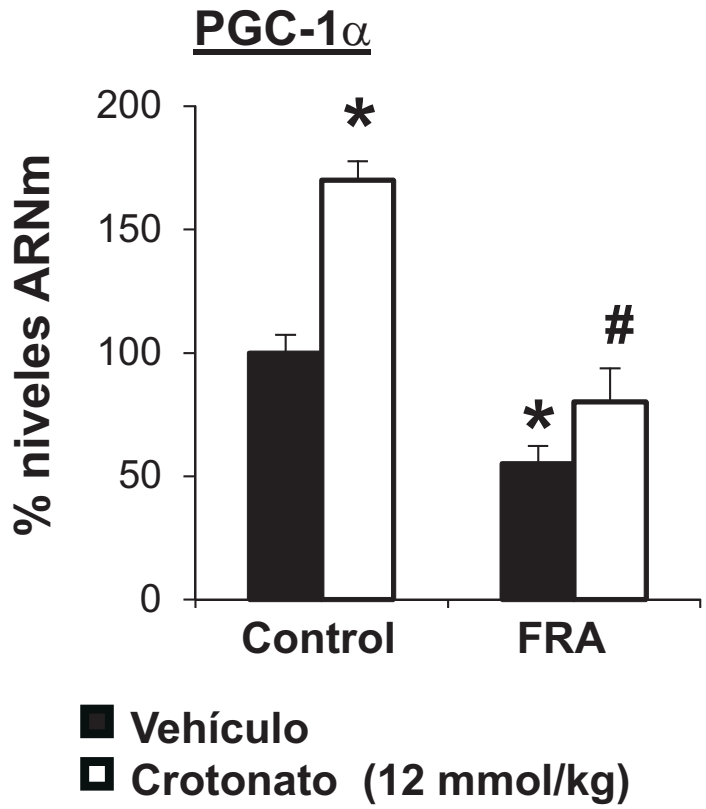

PGC-1α
200
150
100
50
0
% niveles ARNm
*
*
#
Control
FRA
Vehículo
Crotonato (12 mmol/kg)

Fig. 5A

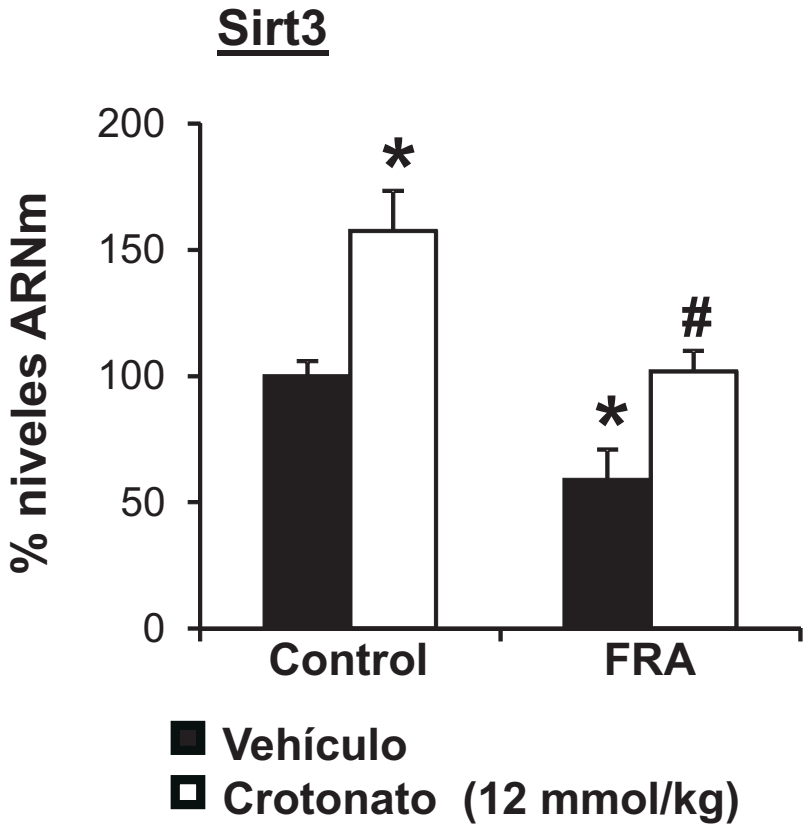

Sirt3
200
150
100
50
0
% niveles ARNm
*
*
#
Control
FRA
Vehículo
Crotonato (12 mmol/kg)

Fig. 5B

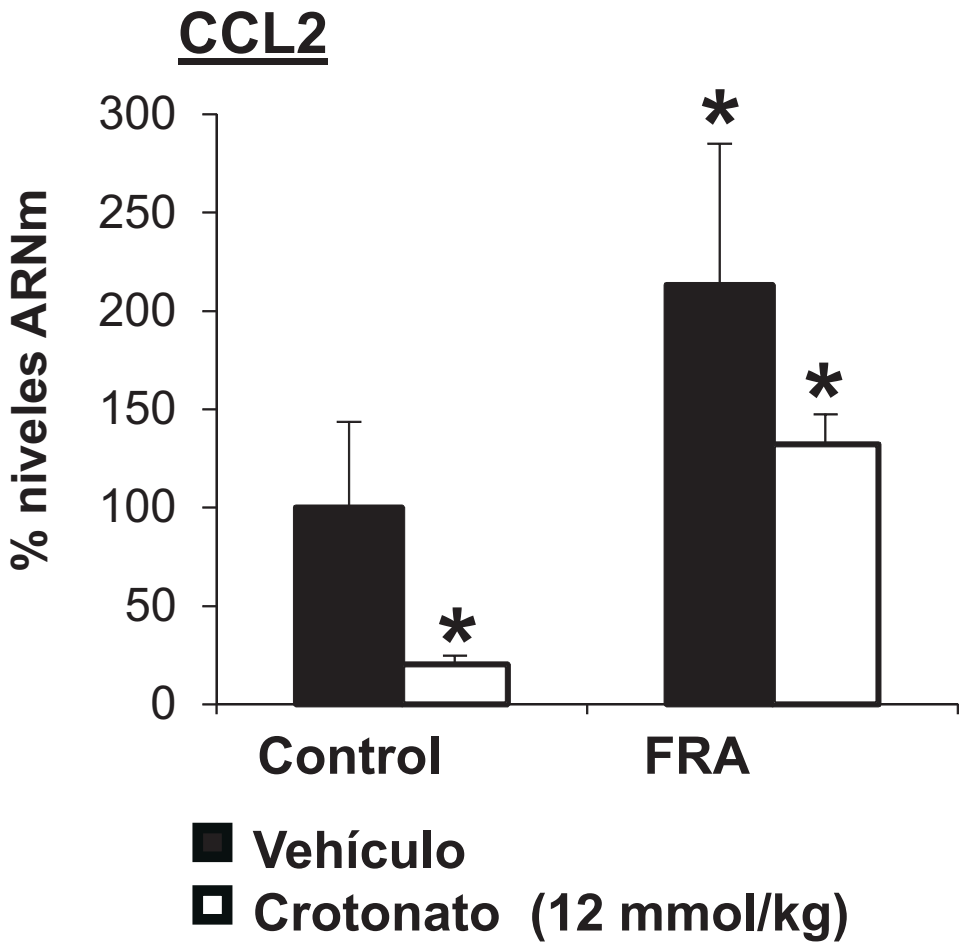

CCL2
% niveles ARNm
300
250
200
150
100
50
0
*
*
*
Control
FRA
Vehículo
Crotonato (12 mmol/kg)

Fig. 5C