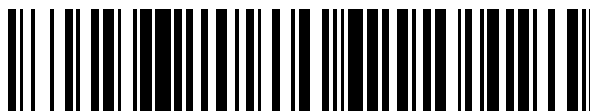


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 596**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/437** (2006.01)  
**C07D 471/04** (2006.01)  
**A61P 19/08** (2006.01)  
**A61P 19/10** (2006.01)  
**A61K 31/444** (2006.01)  
**A61K 31/565** (2006.01)  
**A61K 31/59** (2006.01)  
**A61K 31/663** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2012 PCT/IB2012/056286**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068972**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012 E 12798879 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2776027**

54 Título: **Inhibidores de la NADPH oxidasa 4 y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**11.11.2011 EP 11188782**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.10.2017**

73 Titular/es:

**GENKYOTEX SUISSE SA (100.0%)  
16, chemin des Aulx  
1228 Plan-les-Ouates, CH**

72 Inventor/es:

**BRANDES, RALF;  
SCHRÖDER, KATRIN;  
PAGE, PATRICK;  
LALEU, BENOÎT y  
GAGGINI, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

**LÓPEZ CAMBA, María Emilia**

ES 2 638 596 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**

Inhibidores de la NADPH oxidasa 4 y uso de los mismos

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a agentes útiles en el tratamiento y/o prevención de osteoporosis y/o una disfunción de osteoclastogénesis tal como una disfunción de osteoclastogénesis osteoporótica o preosteoporótica.

**10 Antecedentes de la invención**

El hueso es un órgano dinámico sometido a remodelación permanente dependiendo de las necesidades del organismo incluso en la edad adulta. La formación del hueso está mediada por los osteoblastos, mientras que los osteoclastos, que proceden del linaje mielóide, absorben el hueso. La osteoclastogénesis *in vivo* y en modelo de cultivo requiere los factores de diferenciación activador de receptor del ligando de factor nuclear kappa B (RANKL) de la superfamilia TNF- y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). El MCSF induce la expresión de RANK, el receptor de RANKL en células mieloides, mientras que la unión al ligando RANKL inicia el programa de osteoclastogénesis y la inducción de genes de osteoclastos tales como fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) y catépsina K. Incluso los osteoclastos maduros son activados por RANKL, que promueve su supervivencia e induce cambios estructurales que conducen a la resorción de hueso. La osteoclastogénesis puede ser promovida además por citocinas como TGFβ. TGFβ se ha relacionado con el estrés oxidativo ya que aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) e induce la expresión de NADPH oxidasa Nox4 (Sturrock y col., 2006, Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol., 290:L661-L673).

La disfunción de osteoclastogénesis se ha descrito extensamente como una dolencia que produce una pérdida progresiva de hueso (Silvestris y col., 2011, Adv. Exp. Med. Biol., 714:113-28; Maruotti y col., 2011, Clin. Exp. Med., 11(3):137-45; Wang y col., 2011, Oral Dis., 17(2):129-42), notablemente enfermedades activadas por los osteoclastos tales como destrucción por erosión de las articulaciones, reabsorción de la raíz dental o insuficiencia en la erupción de dientes primarios y las premisas para el desarrollo de osteoporosis. Por tanto, si se inactiva el proceso de la osteoclastogénesis afectaría a la causa de estas enfermedades, mientras que reforzar la función de los osteoblastos sólo afectaría al resultado clínico, aunque con el efecto secundario deseado de activar un aumento del metabolismo óseo y con el posible resultado de una arquitectura ósea menos favorable.

Las NADPH oxidasas (NOX) son proteínas que transfieren electrones a través de las membranas biológicas. En general, el aceptor de electrones es el oxígeno y el producto de la reacción de transferencia electrónica es el superóxido. La función biológica de las enzimas NOX es por tanto la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son pequeñas moléculas derivadas de oxígeno, que incluyen radicales de oxígeno (anión superóxido [ $\dot{O}_2^-$ ], hidroxilo [ $HO\dot{O}$ ], peróxido [ $ROO\dot{O}$ ], alcoxilo [ $RO\dot{O}$ ] e hidroperoxilo [ $HOO\dot{O}$ ]) y algunos no radicales que son agentes oxidantes y/o que se convierten fácilmente en radicales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Los agentes oxidantes que contienen nitrógeno, tales como el óxido nítrico, se conocen también como especies reactivas de nitrógeno (RNS). La generación de ROS es en general una cascada de reacciones que comienza con la producción de superóxido o peróxido de hidrógeno. El superóxido experimenta también una dismutación a peróxido de hidrógeno ya sea de forma espontánea, en especial a pH bajo o catalizado por la superóxido dismutasa. Otros elementos en la cascada de generación de ROS incluyen la reacción de superóxido con óxido nítrico para formar peroxinitrito, la formación catalizada por la peroxidasa de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrógeno, y la reacción Fenton catalizada por hierro que conduce a la generación de radical hidroxilo.

Las ROS interactúan de forma intensa con un gran número de moléculas que incluyen otras pequeñas moléculas inorgánicas, así como ADN, proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos. Esta reacción inicial puede generar un segundo radical, multiplicando así el daño potencial. Las ROS intervienen no sólo en los daños celulares y en la destrucción de patógenos, sino también en un gran número de procesos reguladores reversibles prácticamente en todas las células y tejidos. Sin embargo, a pesar de la importancia de las ROS en la regulación de procesos fisiológicos fundamentales, la producción de ROS puede también destruir o alterar irreversiblemente la función de la molécula diana. En consecuencia, las ROS se han identificado cada vez más como importantes entidades que contribuyen a los daños en los organismos biológicos, denominados "estrés oxidativo".

Aunque la única función conocida de las proteínas Nox es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), Nox4 difiere de las otras NADPH oxidasas en que produce hidrógeno peroxidasa en lugar de superóxido y en que la actividad de la enzima constitucionalmente activa está controlada por el nivel de expresión y no por vías de señalización que conducen a una activación aguda (Takac y col., 2011, J. Biol. Chem., 286:13304-13313; Helmcke y col., 2009, Antioxid. Redox. Signal., 11:1279-1287). La NADPH oxidasa Nox4 se expresa de forma ubicua en células diferenciadas y la inducción de Nox4 se ha relacionado con el proceso de diferenciación en células mesenquimatosas como miocitos cardíacos, adipocitos y células de músculo liso. El estrés oxidativo, por un aumento en la acción de osteoclastos, se ha implicado en un aumento de la resorción ósea y la osteoporosis y la

osteoclastogénesis en modelos de cultivo celular (Lee y col., 2005, *Blood*, 106:852-859; Sasaki y col., 2009, *J. Med. Invest.*, 56:33-41). Sin embargo, aunque se ha demostrado que las NADPH oxidasas se regulan por incremento durante la osteoclastogénesis y que la inhibición de un componente de todas las proteínas Nox, p22phox, impide la osteoclastogénesis (Sasaki y col., 2009, *ver antes*), el papel de cada una de las isoformas de Nox catalíticamente activas no estaba claro o era controvertido. Sasaki y col., 2009, *Free Radical Biology & Medicine*, 47, 189-199 aportaron evidencias de que deberían inhibirse Nox1 y Nox2 para limitar la osteoclastogénesis y de que la inhibición de Nox4 era ineficaz en el bloqueo de la producción de ROS y la formación de osteoclastos y Lee y col., 2005 *ver antes* concluyeron que es la Nox1 y no la Nox2 o la Nox4 la que era importante para la producción de ROS inducida por RANKL en las células de linaje de monocitos-macrófagos en la célula ósea.

10

Por tanto, sería muy conveniente desarrollar nuevos agentes activos para el tratamiento de la osteoporosis que se centraran en su acción sobre los osteoclastos, la resorción ósea y la osteoclastogénesis.

### Resumen de la invención

15

La presente invención se dirige hacia los hallazgos inesperados de que la delección de Nox4 genética conduce tanto a una menor expresión del receptor asociado a osteoclastos de proteínas marcadoras de osteoclastos (OSCAR) como a una mayor expresión de la proteína marcadora de osteoblastos osteopontina en huesos y como consecuencia de ello la Nox4 controla la masa de hueso mediante regulación de la osteoclastogénesis. En particular, la presente invención se dirige hacia los hallazgos inesperados de que la inhibición *in vivo* de Nox4 es capaz de prevenir pérdida de hueso. En particular, la presente invención se dirige a la capacidad de prevenir las consecuencias de la regulación ascendente de NOX4, en concreto la disfunción de osteoclastogénesis a través del uso de un inhibidor de NOX4 según la invención.

20

25 La presente invención se dirige a inhibidores de Nox4 útiles en el tratamiento y/o profilaxis de la osteoporosis, en particular disfunción de osteoclastogénesis osteoporótica o preosteoporótica. Especialmente, la invención está relacionada con nuevas moléculas útiles en la inhibición o reducción de la actividad de Nox4.

Un primer aspecto de la invención proporciona un inhibidor de Nox4 de la invención para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de una disfunción de osteoclastogénesis y/u osteoporosis.

30

Un segundo aspecto de la invención proporciona el uso de uno o más inhibidores de Nox4 de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis de osteoporosis.

35 Un tercer aspecto de la invención proporciona nuevos inhibidores de Nox4, así como tautómeros, isómeros geométricos, formas ópticamente activas y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a nuevos inhibidores de Nox4, así como tautómeros, isómeros geométricos, formas ópticamente activas y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso como un medicamento.

40

Un quinto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un inhibidor de Nox4 según la invención, así como tautómeros, isómeros geométricos, formas ópticamente activas y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable de los mismos.

45

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un inhibidor de Nox4 combinado con al menos un coagente útil en el tratamiento o prevención de osteoporosis y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable.

50

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un inhibidor de Nox4 para la preparación de una formulación farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de disfunción de osteoclastogénesis y/u osteoporosis.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un inhibidor de Nox4 para la preparación de una formulación farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de osteoclastogénesis osteoporótica y osteoclastogénesis preosteoporótica.

55

Un decimoprimer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de identificación de inhibidores de osteoclastogénesis.

60

A partir de la siguiente descripción detallada serán evidentes otras características y ventajas.

### Descripción de las figuras

65 La **Figura 1** muestra el efecto de la inactivación genética de Nox4 en la densidad ósea, el número de osteoclastos, la diferenciación y la formación de ROS en ratones. **A:** Densidad mineral del hueso trabecular medida en el Ejemplo

2; **B**: Imagen de cortes no descalcificados de fémur distal teñidos con técnica de von Kossa según se describe en von Kossa, 1901, *Beit. Path. Anat.*, 29:163; **C**: Fuerza final (Fmax) según se mide en el Ejemplo 2; **D**: Número de osteoclastos positivos a TRAP (N.Oc) contados en análisis histomorfométrico según se mide en el Ejemplo 3 y **E**: imágenes representativas de cortes teñidos con TRAP con contraindicación mediante hematoxilina de Mayer según se describe en Mukherjee y col., 2008, *J. Clin. Invest.*, 118:491-504 usando el protocolo 387A-1KT; Sigma-Aldrich (www.sigma-aldrich.com); **F**: Análisis de inmunotransferencia Western de lisados de fémur para el receptor asociado a osteoclastos de proteínas marcadoras de osteoclastos (OSCAR), el marcador de osteoblastos osteopontina y el control de carga GAPDH según se describe en Shen y col., 2005, *J. Biol. Chem.*, 280, 40589-98; **G, H**: Número (G) e imagen representativa (H) de osteoclastos diferenciados *ex vivo* de células de médula ósea identificadas por tinción de TRAP según se describe en el Ejemplo 3; **I**: Porcentajes de ROS en esplenocitos prediferenciados según se mide en el Ejemplo 3; n≥3; \*p<0,05.

La **Figura 2** muestra las concentraciones séricas de un marcador de formación de hueso (péptido de extremo N de procolágeno 1, PINP) (**A**) en comparación con las de los marcadores de resorción ósea (TRAP 5b) (**B**) y reticulaciones de colágeno en el terminal carboxi (CTX) (C) medido según se describe en el Ejemplo 3 en ratones sin modificación genética y Nox4-/-; n≥3; \*p<0,05.

La **Figura 3** muestra la histomorfometría de un fémur distal medido según se describe en el Ejemplo 2 de ratones sin modificación genética y Nox4 para (**A**) anchura trabecular y (**B**) grosor; n≥3; \*p<0,05.

La **Figura 4** muestra el papel de Nox4 en señalización inducida por RANKL y el efecto de un inhibidor de Nox4 en el mismo mediante la medida de Ca<sup>2+</sup> intracelular por fluorescencia Fura2 en células mononucleares procedentes de médula ósea cebadas con M-CSF pretratado con (RANKL) o sin RANKL (ctl) durante 30 horas según se describe en el Ejemplo 4. **A**: comparación de células de ratones sin modificación genética y Nox4; **B**: Efecto de un inhibidor de Nox4 (Compuesto (1) o disolvente en concentraciones de calcio en células naturales; n≥3; \*p<0,05.

La **Figura 5** muestra el papel de Nox4 para pérdida de hueso *in vivo* según se describe en el Ejemplo 5. **A**: Análisis estadísticos de la intensidad de tinción de Nox4 en material óseo humano de personas sanas y pacientes con osteoporosis o Morbus Paget n=3-4; \*p<0,05; **B, C**: Densidad de hueso trabecular del fémur distal 6 semanas después de ovariectomía. Comparación de animales sin modificación genética (sin etiqueta), animales sin modificación genética tratados con tamoxifeno (WT) y ratones Nox4-Flox-Flox-ERT2-Cre+/0 tratados con tamoxifeno (N4-Cre\*/\*). n=8-12; \*p<0,05 (**C**); Comparación de animales sin modificación genética tratados con disolvente (ctl) o un inhibidor de Nox4 n=11-14 durante 6 semanas (**D**).

Análisis estadístico: Todos los valores se expresan como media ± EEM. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido por prueba LSD post hoc. Un valor p de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo. WT: ratones sin modificación genética (wild tipo); N4-/-: ratones con genes inactivados Nox4.

La **Figura 6** muestra el papel de Nox4 para la pérdida de hueso *in vivo* según se describe en el Ejemplo 5 de animales sin modificación genética tratados con un inhibidor de Nox4 en comparación con animales con operación simulada, controles (es decir, animales sometidos a ovariectomía y tratados con disolvente (ctl)) y grupo de pamidronato, es decir, animales sometidos a ovariectomía y posterior tratamiento con pamidronato, 10 mg/kg, una vez a la semana. **A, B**: Densidad ósea total (**A**) y trabecular (**B**) del fémur distal 6 semanas después de la ovariectomía.; \*p<0,05; **C, D**: Recuperación de la densidad ósea total (**C**) y trabecular (**D**) del fémur distal 6 semanas después de la ovariectomía determinada por técnica microTC calibrada; **E**: resistencia a la rotura total (similar a la representada para la Fig. 1).

Análisis estadístico: Todos los valores se expresan como media ± EEM. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido por prueba LSD post hoc. Un valor p de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

### Descripción detallada de la invención

En los párrafos siguientes se proporcionan definiciones de las diversas fracciones químicas que conforman los compuestos según la invención y que pretenden aplicarse de manera uniforme a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, salvo que la definición indicada expresamente en sentido contrario proporcione una definición más amplia.

"Inhibidor de NOX4" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a cualquier sustancia que es capaz total o parcialmente de inhibir, bloquear, atenuar o interferir directamente con NOX4. El término directamente se define como que el compuesto afecta a la actividad enzimática de la enzima, la localización celular, la estabilidad de la proteína, la expresión del ARN mensajero o la proteína de Nox4. Preferentemente, un inhibidor de Nox4 debe ser capaz de disminuir la actividad enzimática y la producción de ROS en un ensayo libre de células que usa una membrana que expresa sólo la isoforma NOX de la proteína NOX4, tal como la proteína recombinante NOX4. Así, el término "inhibidores" pretende incluir, pero no se limita a, moléculas que inhiben total o parcialmente la actividad de NADPH oxidasa 4. Según una realización en particular, inhibidores de Nox4 tienen un importante componente de actividad inhibidora de Nox en comparación con las otras proteínas Nox, por ejemplo, con Nox2.

- Por ejemplo, los inhibidores de Nox4 incluyen sustancias que previenen o reducen la diferenciación de osteoclastos o reducen la población de osteoclastos que están en el origen de la degeneración ósea y que, así, previenen, reducen o impiden la disfunción de osteoclastogénesis. Por ejemplo, los inhibidores de Nox4 incluyen moléculas pequeñas, péptidos, peptidomiméticos, proteínas quiméricas, proteínas naturales o no naturales, polímeros derivados de ácidos nucleicos (tales como aptámeros de ADN y ARN, siRNA, shRNA, PNA o LNA), proteínas de fusión con actividades que antagonizan NOX4, antagonistas de anticuerpos tales como anticuerpos anti-NOX4 de neutralización o vectores de terapia génica que impulsan la expresión de dichos antagonistas de NOX4.
- 10 En particular, los inhibidores de Nox4 son agentes que presentan una constante inhibidora  $K_i$  de menos de 5 micromolar en un ensayo de producción de ROS funcional tal como se describe en Gaggini y col., 2011, *Bioorganic and Medicinal chemistry*, Vol. 19(23), 6989-6999. Por ejemplo, los inhibidores de Nox4 son agentes que inhiben la producción de ROS en un intervalo de 1 a 2 micromolar en un ensayo libre de células que usa una membrana que expresa sólo la isoforma NOX de la proteína NOX4, tal como la proteína recombinante NOX4.
- 15 El término "siRNA" se refiere a ARN de interferencias pequeño que son ARN bicatenarios (aproximadamente 19-23 nucleótidos) capaces de inactivar o silenciar un ARNm diana a partir de un gen diana. Los siRNA artificiales pueden ser sintetizados químicamente como oligonucleótidos o clonados en un plásmido o un vector vírico (adenovirus, retrovirus o lentivirus) como ARN de horquilla corta para generar una transfección transitoria o estable en cualquier tipo de células (Martín y col., 2007, *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 8:81-108; Huang y col., 2008, *Expert. Opin. Ther. Targets*, 12(5), 637-645).
- 20 El término "eficacia" de un tratamiento o procedimiento según la invención puede medirse basándose en cambios en el curso de la enfermedad o dolencia en respuesta a un uso o un procedimiento según la invención. Por ejemplo, la eficacia de un tratamiento o procedimiento según la invención puede medirse por la reducción de pérdida de hueso y/o el aumento de la densidad mineral ósea (medida por tomografía o densitometría o absorciometría de rayos X de energía dual) y cambios en los marcadores plasmáticos de recambio óseo tales como fragmentos de colágeno y/o un menor riesgo de fractura osteoporótica en pacientes osteoporóticos o por una reducción de pacientes en riesgo de desarrollar osteoporosis, en particular disfunción de osteoclastogénesis tal como en mujeres posmenopáusicas, en personas que presentan trastornos de la alimentación o por uso excesivo de medicaciones tales como corticoesteroides orales (es decir, hidrocortisona) o antiestrógenos. En un aspecto adicional, la eficacia de un tratamiento o procedimiento según la invención puede medirse por la medida de densidad ósea, mineralización ósea o la sección de marcadores de metabolismo óseo en sangre tales como fosfatasa alcalina, C-telopéptido de colágeno de tipo I (CTX) y osteocalcina.
- 30 El término "cantidad eficaz" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a una cantidad de al menos un inhibidor de NOX4 o una formulación farmacéutica del mismo según la invención que desencadena una reducción detectable de diferenciación de osteoclastos y/o recuentos de osteoclastos o de osteoclastogénesis.
- 35 El término "disfunción de osteoclastogénesis" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a cualquier dolencia relacionada con un aumento en el recambio óseo o resorción ósea de causa secundaria tal como enfermedad de Paget, pérdida de hueso resultante de inmovilización, metástasis óseas y tumores óseos osteolíticos.
- 40 El término "disfunción de osteoclastogénesis" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a cualquier dolencia relacionada con un aumento en la resorción ósea de causa secundaria tal como enfermedad de Paget, pérdida de hueso resultante de inmovilización, metástasis óseas y tumores óseos osteolíticos, tal como resorción ósea resultante de hiperactividad de los osteoclastos como consecuencia de un aumento en la formación de osteoclastos o un aumento en la actividad celular. En otra forma de realización, la disfunción de osteoclastogénesis incluye destrucción por erosión de las articulaciones tal como se encuentra en artritis (reumatoide), osteoartropatía en diabetes, metástasis óseas, reabsorción de la raíz dental o insuficiencia en la erupción de dientes primarios, hiperparatiroidismo secundario con pérdida de hueso y atrofia ósea debido a inactividad.
- 45 Normalmente, una disfunción de osteoclastogénesis en un sujeto puede detectarse midiendo la densidad ósea por medio de histología o determinación de medidas en plasma de enzimas de osteoclastos tales como fosfatasa alcalina resistente a tartrato.
- 50 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "tratamiento" y "tratar" y similares significan generalmente la obtención de un efecto farmacológico o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención o prevención parcial de una enfermedad, síntoma o dolencia de los mismos y/o puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o completa de una enfermedad, dolencia, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" tal como se usa en la presente memoria descriptiva cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero en particular un ser humano, e incluye: (a) prevención de la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero en el que todavía no se ha diagnosticado; (b) inhibición de la enfermedad, es decir, interrupción de su desarrollo; o alivio de la enfermedad, es decir, que provoca regresión de la enfermedad y/o sus síntomas o dolencias.
- 55
- 60
- 65

El término "sujeto" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a mamíferos. Por ejemplos, los mamíferos contemplados por la presente invención incluyen el ser humano, primates, animales domesticados como vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares.

- 5 El término "sales o complejos farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales o complejos de los compuestos de la invención especificados más adelante. Entre los ejemplos de dichas sales se incluyen, pero no se limitan a, sales de adición básica formadas por reacción de compuestos de la invención con bases orgánicas o inorgánicas tales como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico como los seleccionados en el grupo que consiste en metales alcalinos (sodio, potasio o litio), metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio o magnesio), o con una
- 10 alquilamina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Otros ejemplos de dichas sales incluyen, pero no se limitan a, sales de adición ácida formadas por reacción de compuestos de la invención con ácidos orgánicos o inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido oxálico o similares.

- "Derivado farmacéuticamente activo" se refiere a cualquier compuesto que, tras su administración al receptor, es
- 15 capaz de proporcionar directa o indirectamente, la actividad desvelada en la presente memoria descriptiva. El término "indirectamente" comprende también profármacos que pueden convertirse en la forma activa del fármaco por medio de enzimas endógenas o metabolismo. El profármaco es un derivado del compuesto según la invención y presenta NADPH oxidasa 4 que inhibe la actividad que tiene un grupo química o metabólicamente descomponible, y un compuesto que puede convertirse en un compuesto farmacéuticamente activo *in vivo* por solvólisis en
- 20 condiciones fisiológicas. La invención comprende además cualquier tautómero de los compuestos según la invención.

#### ***Inhibidores de Nox4 según la invención***

- 25 En una realización, la invención proporciona un inhibidor de NOX4 de la invención que presenta una constante inhibidora (Ki) para actividad de inhibidor de Nox4 comprendida entre 10 nM o menos de 500 nM en ensayo funcional de producción de ROS.

Un inhibidor de NOX4 se selecciona entre el grupo siguiente:

- 30 4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(4-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
4-(4-clorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
- 35 4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-5-[(2-metoxipiridin-4-il)metil]-4-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-metoxifenil)-4-metil-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
- 40 2-(2-clorofenil)-5-[(6-metoxipiridin-3-il)metil]-4-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
- 45 4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-metil-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
- 50 4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-metoxifenil)-4-(3-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
- 55 2-(2-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-metoxifenil)-4-(3-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-[(2-metoxipiridin-4-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
- 60 2-(2-clorofenil)-4-(2,6-difluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-metil-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-5-metil-4-[3-(metilamino)fenil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
- 65 2-(2-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;

- 2-(2-clorofenil)-4-(2,5-difluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(1,3-thiazol-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(3,5-diclorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 5 4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2,6-difluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2,5-difluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona; y  
 10 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona.

En otra realización en particular, se proporciona un inhibidor de NOX4 según la invención para su uso como un medicamento.

## 15 **Composiciones**

La invención proporciona agentes farmacéuticos o terapéuticos como composiciones y procedimientos para tratar a un paciente, preferentemente un paciente mamífero, y con la máxima preferencia un paciente humano que padece osteoporosis, en particular disfunción de osteoclastogenia.

20

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener uno o más inhibidores de Nox 4 en cualquier forma descrita en la presente memoria descriptiva. Las composiciones de la presente invención pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales farmacéuticamente aceptables, tales como alumbre, estabilizadores, agentes antimicrobianos, tampones, agentes colorantes, agentes saborizantes, adyuvantes y similares.

25

Los compuestos de la invención, junto con un adyuvante, soporte, diluyente o excipiente empleado convencionalmente pueden disponerse en la forma de composiciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias de los mismos, y en esta forma pueden emplearse en forma de sólidos, tales como comprimidos o cápsulas rellenas, o líquidos tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas con los mismos, todas para uso oral, o en forma de soluciones inyectables estériles para uso parenteral (lo que incluye subcutáneo). Dichas composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitaria de los mismos pueden comprender ingredientes en proporciones convencionales, con o sin principios o compuestos activos adicionales, y dichas formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del ingrediente activo proporcionado con el intervalo pretendido de dosificación diaria que se empleará. Las composiciones según la invención son preferentemente inyectables.

30

Las composiciones de la presente invención pueden ser también formulaciones líquidas, que incluyen, pero no se limitan a, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires. Las formas líquidas adecuadas para administración oral pueden incluir un vehículo acuoso o no acuoso adecuado con tampones, agentes de suspensión y dispensación, colorantes, saborizantes y similares.

40

Las composiciones pueden formularse también como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos, que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. Los agentes de suspensión incluyen, pero no se limitan a, jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas.

45

Los agentes emulsionantes incluyen, pero no se limitan a, lecitina, monooleato de sorbitano y acacia. Los vehículos no acuosos incluyen, pero no se limitan a, aceites comestibles, aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y alcohol etílico. Los conservantes incluyen, pero no se limitan a, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.

50

Los materiales adicionales, así como las técnicas de procesamiento y similares se exponen en la Parte 5 de Remington's Pharmaceutical Sciences, 21ª edición, 2005, University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, que se incorpora en la presente memoria descriptiva como referencia.

55

Las composiciones sólidas de la presente invención pueden estar en forma de comprimidos o tabletas formulados de manera convencional. Por ejemplo, los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes aglutinantes, rellenos, lubricantes, agentes de desintegración y agentes de humectación. Los agentes aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Los rellenos incluyen, pero no se limitan a, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio y sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y sílice. Los agentes de desintegración incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata y glucolato de almidón sódico. Los agentes de humectación incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato de sodio.

65

Los comprimidos pueden estar recubiertos de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

Las composiciones inyectables se basan normalmente en solución salina estéril inyectable o solución salina con tampón de fosfato u otros soportes inyectables conocidos en la técnica.

5

Las composiciones de la presente invención pueden formularse también para administración parenteral, que incluyen, pero no se limitan a, inyección o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden estar en la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilización y dispersión. La composición

10

puede proporcionarse también en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado que incluye, pero no se limita a, agua estéril sin pirógenos.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse también como una preparación depot, que puede administrarse por implantación o por inyección intramuscular. Las composiciones pueden formularse con materiales

15

poliméricos o hidrófobos adecuados (como, por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable), resinas de intercambio iónico o como derivados apenas solubles (por ejemplo, una sal apenas soluble).

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse también en formas de liberación sostenida o a partir de sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida. Puede encontrarse también una descripción de

20

### **Modo de administración**

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en distintos modos, que incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral, sublingual, oral o combinaciones de las mismas. La administración parenteral incluye, pero no se limita a, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal e intraarticular.

25

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse también en forma de un implante, que permite la liberación lenta de las composiciones, así como una infusión i.v. lenta controlada.

30

En una realización en particular, uno o más inhibidores de Nox4 se administran oralmente.

La dosificación administrada, como dosis única o múltiples, a un individuo variará dependiendo de distintos factores, que incluyen las propiedades farmacocinéticas, las afecciones del paciente y sus características (sexo, edad, peso corporal, estado de salud, tamaño), la extensión de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

35

### **Combinación**

Según una realización de la invención, los inhibidores de Nox4 y las formulaciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse en solitario o en combinación con un coagente útil en la prevención y/o tratamiento de osteoporosis o una disfunción de osteoclastogénesis, como bisfosfonato, estrógeno o vitamina D.

40

La invención comprende un inhibidor de Nox4 de la invención o una formulación farmacéutica del mismo, en el que el inhibidor de Nox4 o la formulación farmacéutica del mismo debe administrarse a un individuo antes, a la vez o después de otros regímenes terapéuticos o coagentes útiles en el tratamiento de osteoporosis (por ejemplo, múltiples regímenes farmacológicos), en una cantidad terapéuticamente eficaz. Los inhibidores de Nox4 o las formulaciones farmacéuticas de los mismos que se administran simultáneamente con dichos coagentes pueden administrarse en la misma composición o en composiciones diferentes y mediante la misma vía de administración o vías de administración diferentes.

45

50

### **Pacientes**

En una realización, los pacientes según la invención son pacientes que padecen osteoporosis.

55

En una realización en particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen disfunción de osteoclastogénesis.

En otra realización en particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen pérdida de hueso resultante de hiperactividad de los osteoclastos como consecuencia de un aumento en la formación de osteoclastos o una mayor actividad celular.

60

En otra realización en particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen resorción ósea de causa secundaria seleccionada entre enfermedad de Paget, pérdida de hueso resultante de inmovilización, metástasis óseas y tumores óseos osteolíticos.

65



En otra realización en particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen disfunción de osteoclastogénesis que incluye destrucción por erosión de las articulaciones como se encuentra en artritis (reumatoide), osteoartropatía en diabetes, metástasis óseas, reabsorción de la raíz dental o insuficiencia en la erupción de dientes primarios, hiperparatiroidismo secundario con pérdida de hueso y atrofia ósea debido a inactividad. En otra realización en particular, los pacientes según la invención son pacientes en riesgo de desarrollar osteoporosis.

#### **Uso según la invención**

10 En otra forma de realización, la invención proporciona inhibidores de Nox4, así como tautómeros, isómeros geométricos, formas ópticamente activas y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de osteoporosis.

15 En una realización en particular, la invención proporciona inhibidores de Nox4 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de disfunción de osteoclastogénesis.

En otra forma de realización, la invención proporciona inhibidores de Nox4 para el tratamiento o profilaxis de osteoporosis.

20 En otra forma de realización, la invención proporciona inhibidores de Nox4 para el tratamiento o prevención de disfunción de osteoclastogénesis.

25 En otra forma de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que contiene al menos un inhibidor de Nox4 según la invención y un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable de los mismos.

30 En otra forma de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que combina al menos un inhibidor de Nox4 de la invención con al menos un coagente útil en el tratamiento de osteoporosis y un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable de los mismos.

35 En una realización en particular, los compuestos, la formulación farmacéutica y los procedimientos de la invención se contemplan para su uso en la prevención y/o tratamiento de una disfunción de osteoclastogénesis y/u osteoporosis de un paciente.

En una realización en particular, la invención proporciona inhibidores de Nox4 o un uso de los mismos y procedimientos según la invención en los que el inhibidor de Nox4 debe administrarse en combinación con un coagente útil en el tratamiento de osteoporosis o disfunción de osteoclastogénesis.

40 Los compuestos de invención se han denominado de acuerdo con las normas de la IUPAC usadas en el programa ACD/Name (versión de producto 10.01).

De hecho, para los expertos en la materia serán evidentes diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria descriptiva a partir de la descripción anterior y de los dibujos adjuntos.

45 Dichas modificaciones pretenden estar incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Una vez descrita la invención, se presentan los siguientes ejemplos a modo de ilustración, y no de limitación.

#### **EJEMPLOS**

50 La eficacia de la inhibición de Nox4 en el tratamiento de osteoporosis está apoyada por los siguientes experimentos.

**Las abreviaturas siguientes hacen referencia respectivamente a las definiciones mostradas a continuación:**

55 **eq.** (equivalente), **nm** (nanómetro), **BMNC** (células mononucleares de médula ósea), **BSA** (albúmina sérica bovina), **DCF** (2,7-diclorodihidrofluoresceína), **DCM** (diclorometano), **DMEM** (Medio Eagle modificado de Dulbecco), **DMSO** (Sulfóxido de dimetilo), **DAPI** (4,6-diamidino-2-fenilindol), **DPI** (Difenil-yodonio), **EA** (Acetato de etilo), **EDTA** (ácido etilendiamintetraacético), **EGF** (factor de crecimiento epidérmico), **EGTA** (ácido etilenglicoltetraacético), **FCS** (suero de ternera fetal), **GADPH** (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), **HBSS** (solución salina con tampón de Hank),  
60 **HEPES** (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanosulfónico), **H<sub>2</sub>DCF-DA** (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína), **M-CSF** (factor estimulante de colonias de macrófagos), **MEM** (medio esencial mínimo), **NADPH** (forma reducida de difosfato de nicotinamida adenina dinucleótido), **NBT** (Nitroazul de tetrazolio), **PE** (éter de petróleo), **TLC** (cromatografía de capa fina), **TGF-β** (factor de crecimiento tumoral beta), **ROS** (especies reactivas de oxígeno), **SOD** (Superóxido dismutasa), **SYBR** (Sybr Green™ N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ilo-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina).  
65

**Ejemplo 1: Medida de los niveles de especies reactivas de oxígeno en diferentes cultivos celulares**

La actividad de Nox4 de los inhibidores de Nox4 según la invención puede someterse a ensayo para conocer su actividad en la inhibición o reducción de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir de oxígeno en ensayos libres de células. Para caracterizar completamente los inhibidores de Nox4, se han desarrollado sistemas basados en membranas libres de células específicos de subunidades Nox y se han añadido proteínas recombinantes específicas a membranas que sobreexpresan de forma heteróloga su isoforma específica. Las enzimas Nox producen superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) como producto primario, aunque debido a la alta inestabilidad y reactividad de esta molécula que experimenta dismutación de forma natural en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), se usaron por tanto técnicas de lectura que emplean sondas que miden  $H_2O_2$  (por ejemplo, usando rojo Amplex como sonda con el fin de facilitar medidas consistentes y precisas). La actividad de los compuestos se somete a ensayo en el siguiente ensayo libre de células que usa las técnicas descritas a continuación:

*Material*

NADPH (A1395.0100) procedía de Axonlab. El rojo Amplex (A22177) fue adquirido en Invitrogen. La peroxidasa de rábano picante (HRP) (10108090001) se adquirió en Roche.

*Construcción de plásmidos*

Se clonaron los ADNc de Nox1 humana (NM\_007052.4), NOX2 humana (NM\_000397) y NOX5 humana (NM\_0245052244) en pcDNA5/TO (Invitrogen). Se clonó p22 humano (NM\_000101.2) en pcDNA3.1/Zeo (+) (Invitrogen) y NOXA1 humano (AY255769.1) y NOXO1 humano (AB097667) en el plásmido pVITRO1-neo-mcs bicistrónico (Invivogen).

*Cultivo celular*

Las células T-REx™-CHO transfectadas (R718-07) fueron adquiridas en Invitrogen y la línea celular T-REx™-293 que expresa hNOX4 (hNOX4 T-REx™-293) (Serrander y col., 2007, Biochem. J., 406, 105-114) se cultivó en DMEM y en medio F12 de Ham respectivamente. Los dos medios fueron suplementados con FBS al 10%, glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). La presión de selección se mantuvo mediante inclusión continua de blastocidina (5 µg/ml) y/o G418 (0,25 mg/ml), y/o higromicina (0,25 mg/ml) y/o zeocina (0,025 mg/ml).

*Generación de líneas celulares transfectadas estables*

Las células se transfectaron usando el procedimiento FuGENE 6. Las células que expresan de forma estable Nox1 humana funcional (hNOX1 T-REx™-CHO) se obtuvieron mediante cotransfección de células T-REx™-CHO con Nox1 humana, p22 humano, NOXA1 humana y NOXO1 humana. Las células que expresan de forma estable Nox2 humana funcional (hNOX2 T-REx™-CHO) se obtuvieron mediante cotransfección de células T-REx™-CHO con Nox2 humana, p22 humano y cofactores humanos. Las células que expresan de forma estable Nox5 (hNOX5 T-REx™-CHO) humana funcional se obtuvieron mediante transfección de células T-REx™-CHO con Nox5 humana. Las células cotransfectadas se seleccionaron con los antibióticos apropiados durante 10 días. Para la selección, se usó higromicina y G418 a 2 mg/ml y zeocina a 0,1 mg/ml. Para el establecimiento de cada línea celular transfectada de forma estable se generó una reserva de células resistentes a antibióticos. Las células se clonaron por dilución de limitación. Se establecieron e investigaron varios clones para producción de ROS tras la expresión de hNox inducida por tetraciclina usando un ensayo AR celular. La expresión de las NOX se realizó con tetraciclina (1 µg/ml) durante 24 h antes del ensayo.

*Preparación de membrana*

La expresión de Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 humanas se indujo con Tetraciclina (1 µg/ml) durante 24 h antes de la preparación de membrana. Las membranas se prepararon a partir de células transfectadas que sobreexpresan Nox1, Nox2, Nox4 o Nox5 tal como se describe anteriormente en Palicz y col., 2001, J. Biol. Chem., 76, 3090-3097. Después de resuspensión en tampón de sonicación (sacarosa al 11%, NaCl 120 mM, EGTA 1 mM en PBS, pH 7,4 para células que expresan Nox4 o NOX5) o en tampón de relax (Pipes 10 mM, NaCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM, KCl 0,1 M, pH 7,4), las células se fragmentaron por sonicación y se centrifugaron (200 g, 10 min). Se distribuyó el sobrenadante por capas en un gradiente de sacarosa discontinuo 17/40% (p/v) y se centrifugó (150.000 X g durante 60 min). Se recogieron las fracciones de membrana a partir de la interfaz 17/40% y se almacenaron a -80°C. La concentración de proteínas se determinó con el reactivo Bradford.

*Medida de la producción de ROS*

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por membranas que expresan Nox1 humana o Nox2 humana o Nox4 humana o Nox5 humana o por xantina/xantina oxidasa se midió usando el procedimiento de rojo Amplex (AR) siguiendo una versión ligeramente modificada del manual de instrucciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, las membranas o xantina se incubaron en PBS con rojo Amplex, peroxidasa de rábano picante (HRP) y

cofactores apropiados. La producción de ROS se indujo mediante la adición de NADPH a membrana que expresa NOX o mediante la adición de xantina a xantina oxidasa. Se midió una señal no específica en ausencia de membranas o en ausencia de xantina.

- 5 Se midió la actividad de antagonistas de compuestos en presencia de concentraciones crecientes comprendidas entre 1 nM y 100  $\mu$ M. Después de una incubación de 20 min en un agitador de placa y una incubadora (Titramax 1000, VWR) a 37°C con agitación débil (300 rpm), se midieron los niveles de ROS durante 10 min en un lector de microplacas BMG Fluostar con longitudes de onda de excitación y emisión de 544 nm y 590 nm respectivamente.
- 10 Los datos se analizaron usando Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Los valores de  $K_i$  se calcularon usando la ecuación de Cheng-Prusoff y representan el promedio de al menos tres experimentos individuales realizados por triplicado (Tabla 1). La inhibición de Nox4 se comparó con la medida para Simvastatina (Enzo Life Sciences, CAS Número 79902-63-9) usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por membranas que expresan Nox4 humana se midió usando el rojo Amplex (AR).

15

**Tabla 1**

Compuesto n°	$K_i$ hNox4 (nM)	$K_i$ hNox2 (nM)
(1)	75	813
(2)	48	670
(3)	57	735
(4)	61	813
(5)	63	730
(6)	69	715
(7)	72	1.170
(8)	73	750
(9)	74	650
(10)	74	700
(11)	75	563
(12)	79	-
(13)	80	985
(14)	81	695
(15)	83	907
(16)	85	720
(17)	88	602
(18)	89	810
(19)	91	640
(20)	94	-
(21)	96	555
(22)	98	925
(23)	98	-
(24)	99	-
(25)	100	2.180
(26)	105	565
(27)	108	590
(28)	109	-
(29)	111	655
(30)	111	1.065
(31)	112	-
(32)	114	1.835
(33)	115	-
(34)	119	640
(35)	119	665
(36)	125	1.160
(37)	128	950
(38)	129	-
(39)	149	1.500
(40)	148	-
(41)	148	-
(42)	159	540
(43)	126	-
Simvastatina	> 133 $\mu$ M	> 162 $\mu$ M

Los valores de  $K_i$  confirman que la Simvastatina no es un inhibidor directo de NOX4 según la invención, lo que

confirma que las estatinas no pueden usarse como inhibidores de NADPH como ya se ha descrito anteriormente (Williams y col., 2007, J. Cardiovasc. Pharmacol., 50(1), 9-16). Se sabe que las estatinas tienen una acción antioxidante al prevenir la producción de ROS a través de la inhibición de la activación de Rac, pero se sabe que la actividad de NOX4 es completamente independiente de Rac.

5

### **Ejemplo 2: Efectos negativos de Nox4 en la densidad ósea en ratones aumentando el contenido de osteoclastos en el hueso**

Para determinar el papel de las NADPH oxidasas para la homeostasis del hueso, se comparó la densidad trabecular, medida por tomografía computarizada cuantitativa periférica según se describe más adelante, de líneas de ratones inactivados con sus compañeros naturales de camada, Nox4<sup>-/-</sup> mostró un aumento del 30% de densidad trabecular del fémur distal (Fig. 1A y B) mientras que este efecto no se observó en ratones Nox2y<sup>-/-</sup> (Nox2y<sup>+/+</sup>: 345,3 ± 12,5 Nox2y<sup>-/-</sup>: 329,0 ± 18,9 mg/m<sup>3</sup>) o Nox1y<sup>-/-</sup> (Nox1y<sup>+/+</sup>: 262,2 ± 19,7; Nox1: 268,7 ± 11,0 mg/m<sup>3</sup>) que, para la primera vez apoya que sólo Nox4 pero no los otros homólogos de Nox intervienen en la osteoporosis. También fue evidente una mayor densidad ósea de los ratones Nox4<sup>-/-</sup> en comparación con ratones sin modificación genética por una mayor anchura y grosor trabeculares, mientras que el número trabecular (4,3 ± 0,4 frente a 4,4 ± 0,3 No/mm<sup>2</sup>; naturales frente a Nox4<sup>-/-</sup>) y separación (217 ± 23 frente a 207 ± 14 mm; naturales frente a Nox4<sup>-/-</sup>) fueron similares entre ratones sin modificación genética y Nox4<sup>-/-</sup>. Como consecuencia funcional, la estabilidad del hueso (según se mide por las pruebas de unión de tres puntos según se describe más adelante) de ratones Nox4<sup>-/-</sup> fue significativamente superior a la que los ratones sin modificación genética (Figura 1C).

La densidad ósea más elevada de Nox4<sup>-/-</sup> en comparación con los compañeros de camada naturales sugiere que la Nox4 puede promover resorción ósea o puede inhibir la formación de hueso. Tal como se estima a partir del marcado con calceína según se describe más adelante, la tasa de formación de hueso fue similar entre los ratones sin modificación genética y Nox4<sup>-/-</sup> y por otra parte la tasa de aposición mineral y la superficie doblemente marcada no fueron diferentes entre ratones sin modificación genética y Nox4<sup>-/-</sup>. De forma continuada, los niveles plasmáticos de péptido del extremo N de procolágeno 1, un marcador de actividad de osteoblastos (medido por ensayo ELISA según se describe más adelante), fue similar en el plasma de ratones sin modificación genética y Nox4<sup>-/-</sup> (Figura 2A). Estos datos excluyen una inhibición de osteoblastos dependiente de Nox4 como mecanismo subyacente al aumento de densidad ósea de ratones Nox4<sup>-/-</sup> y apunta hacia un efecto de los osteoclastos.

De hecho, los marcadores de resorción ósea como TRAP 5b y reticulaciones de colágeno en el extremo carboxi (CTX) fueron significativamente inferiores en el plasma de Nox4<sup>-/-</sup> en comparación con ratones sin modificación genética (Figura 2B, C) que apunta hacia una mayor actividad de osteoclastos o abundancia en los animales sin modificación genética. De hecho, el análisis inmunohistoquímico para células positivas a TRAP según se describe más adelante en el hueso reveló que los ratones Nox4<sup>-/-</sup> tenían aproximadamente una reducción del 50% en el número de osteoclastos (N. Oc) en comparación con animales sin modificación genética (Figura 1D/E). En consecuencia, la comparación de las proteínas óseas reveló una menor expresión del receptor asociado a osteoclastos de proteínas de marcadores de osteoclastos (OSCAR) y mayor expresión de la proteína de osteoblastos osteopontina en los huesos de Nox4<sup>-/-</sup> en comparación con los animales sin modificación genética (Figura 1F).

Estas observaciones sugieren que la delección genética de Nox4 produce una menor formación o un aumento de la apoptosis de los osteoclastos.

45

#### *Procedimientos en ratones y animales*

Se generaron ratones sin Nox4 por delección dirigida del lugar de inicio de la traducción y los exones 1 y 2 del gen Nox4 (Genoway) según se describe en Zhang y col., 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 107:18121-18126. Brevemente, se aisló un fragmento de ADN genómico de Nox4 murino en 5' a partir de una biblioteca BAC de ADN 129sv y se usó para generar una construcción de direccionamiento que contenía exones 1 y 2 flanqueados por sitios loxP, una casete de toxina diftérica A de selección negativa y una casete de neomicina de selección positiva flanqueada por sitios diana de reconocimiento de Flippasa. La construcción de direccionamiento se sometió a electroporación en células madre embrionarias 129sv, clones recombinantes identificados por PCR y análisis por inmunotransferencia Southern, y se inyectó en blastocistos C57BL/6. Los ratones heterocigotos obtenidos de quimeras de línea germinal se cruzaron con ratones C57BL/6 Cre-deletor y ratones Flp-deletor para generar ratones heterocigotos con genes inactivados. Los animales sin Nox4 se obtuvieron mediante entrecruzamiento de la progenie y se sometieron a cruce retrógrado >10 generaciones con ratones C57BL/6.

Se estudió la composición del hueso después de 6 semanas. La formación del hueso fue determinada por el procedimiento de la calceína en el que se inyectó a los animales por vía subcutánea calceína (20 mg/kg de peso corporal) que se inyectó en los días 2 y 1 antes del sacrificio de los ratones.

#### *Bioquímica*

65

Se valoraron las concentraciones séricas de péptido en el extremo N de procolágeno 1 PINP (DRG Diagnostics),

TRAP-5b (DRG Diagnostics) y CTX (USCNK, Life Science Inc.) mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) específico para los ratones según las instrucciones del fabricante.

*Medidas de densidad mineral ósea (DOM)*

5

Se midió la DOM del fémur izquierdo por tomografía computarizada cuantitativa periférica (QCT) usando una máquina XCT Research QCT (Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Alemania). Se midió un corte (0,2 mm de grosor) en la parte media de la diáfisis del fémur y 3 cortes en la metáfisis del fémur distal situados a 1,5, 2 y 2,5 mm proximales a la superficie articular de la articulación de la rodilla. Los valores de DOM de la metáfisis femoral distal se calcularon como la media de 3 cortes. Se usó un tamaño de vóxel de 0,070 mm y un umbral de 710 mg/cm<sup>3</sup> para el cálculo de la DOM según se describe en Hofbauer y col., 2009, *Arthritis Rheum.*, 60(5):1427-1437.

10

*Histología e histomorfometría del hueso*

15 El procesamiento de las muestras de hueso y la histomorfometría del hueso esponjoso en la metáfisis femoral distal se realizó en cortes de hueso calcificado de la metáfisis femoral distal y se cuantificó usando el software OsteoMeasure 3.0 (Osteometrics, Atlanta, GA) y AxioVision 4.6 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) para análisis de imágenes según se describe en Reim y col., 2008, *J. Bone Miner. Res.*, 23(5): 694-704.

20 *Análisis de la biomecánica del hueso*

Se trataron los fémures hasta carga de fallo mediante pruebas de flexión de 3 puntos usando una máquina de prueba de materiales Zwick Z020/TN2A (Zwick, Ulm, Alemania) con un detector de fuerza de 1 kN y una resolución de fuerza de 0,01 N. La distancia entre los soportes inferiores para las pruebas de flexión fue de 5 mm. La velocidad del cabezal de movimiento transversal durante la prueba fue de 0,2 mm/minuto para todas las medidas. A partir de los datos de desplazamiento de fuerza, se calculó la fuerza final (Fmax; en N) según se describe en Binder y col., 2009, *Nature Medicine*, 15:417-424.

25

**Ejemplo 3: Aumento de la formación de ROS durante la osteoclastogenia de forma dependiente de Nox4**

30

Para estudiar el papel de Nox4 en la formación de osteoclastos, se determinó la expresión de Nox4 en el curso de la diferenciación, así como el efecto de inactivación genética de Nox4 en el proceso de diferenciación en un ensayo de diferenciación *ex vivo* murino según se describe más adelante.

35 Cuando las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se diferenciaron en osteoclastos, se observó un aumento dependiente del tiempo en la expresión de Nox1 y Nox4 durante el protocolo de 21 días (Figura 3).

La osteoclastogenia *in vitro* se realizó estimulando las células mononucleares de la médula ósea (BMNC) con M-CSF y RANKL según se describe más adelante y los osteoclastos diferenciados se identificaron por tinción TRAP según se describe en Mukherjee y col., 2008, *J. Clin. Invest.*, 118:491-504 usando el protocolo 387A-1KT; Sigma-Aldrich ([www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)). Este enfoque produjo una formación de osteoclastos aproximadamente el 50% menor en las células Nox4<sup>-/-</sup> que en el grupo natural (Figura 1G, H). Esto sugiere que el menor número de osteoclastos en los cortes de hueso se debe a un deterioro en la diferenciación. Con el fin de proporcionar algunas evidencias funcionales sobre el papel de Nox4, se midió la formación de ROS. Como ya se ha sugerido por el aumento en la expresión de Nox4 durante la diferenciación de PBMC humanas, aumentó la formación de ROS después de la estimulación de BMNC cebada con RANKL (Figura 1I).

40

45

Es importante observar que este efecto fue mucho menos pronunciado y que no alcanzó significación estadística en células procedentes de ratones Nox4<sup>-/-</sup>, lo que muestra claramente que Nox4 está actuando como mediadora en el aumento en la formación de ROS como respuesta a RANKL en el curso de la diferenciación.

50

*Cultivo celular*

Los osteoclastos humanos se generaron según se describe en Rauner y col., 2011, *Endocrinology* 2011;152(1):103-112. Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recogieron a partir de capas leucoplaquetarias proporcionadas por el banco de sangre local usando centrifugación de Ficoll (1,077 g/ml, 95 Biochrom). Después de la fijación en  $\alpha$ -MEM (Invitrogen) que contenía FCS al 10% (PAA) y penicilina/estreptomicina al 1%, el medio se sustituyó con medio basal suplementado con 25 ng/ml de M-CSF (R&D Systems) durante 3 días. Posteriormente, las células se cultivaron durante hasta 21 días en medio de diferenciación que contenía 25 ng/ml de M-CSF y 50 ng/ml de RANKL (R&D Systems) para osteoclastogenia. Para inducir una diferenciación osteoblástica, las células se cultivaron en medio de crecimiento suplementado con fosfato de L-ascorbato (100  $\mu$ M), fosfato de  $\beta$ -glicerol (10 mM) y dexametasona (10 nM).

55

60

*Diferenciación de osteoclastos murinos ex vivo*

65

Se cortaron los extremos epifisarios de los fémures y las tibias y se lavó la médula ósea con DMEM que contenía

FCS al 10%. Se recogieron células estromales de la médula ósea y se sembraron en placa a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> en  $\alpha$ -MEM que contenía FCS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Después de la fijación, se sustituyó el medio por medio basal suplementado con 25 ng/ml M-CSF (R&D Systems) durante 2 días. Posteriormente, se cultivaron las células durante 6 días más en medio de diferenciación que contenía 25 ng/ml de M-CSF y 50 ng/ml de RANKL (R&D Systems). Se realizó tinción TRAP usando el kit de fosfatasa ácida leucocitaria (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante según Mukherjee y col., 2008, más arriba.

#### Ensayo con rojo Amplex para producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

10 La producción de ROS se estimó según Schröder y col., 2006, Circ. Res., 105(6):537-544 con modificaciones menores. Se cultivaron las células en placas de 12 pocillos y se diferenciaron con o sin RANKL según se describe anteriormente. Después de una etapa de lavado se incubaron las células con HEPES Tyrode que contenía rojo Amplex (50  $\mu$ mol/L, Invitrogen), peroxidasa de rábano picante (2 U/mL) y no BSA. Después de 45 min se transfirió el sobrenadante a placas de 96 pocillos y se midió la oxidación dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de rojo Amplex en un fluorímetro de microplacas (excitación 540 nm, emisión 580 nm). Los experimentos se realizaron en presencia y ausencia de catalasa (50 U/mL). La formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinó como la parte sensible a la catalasa de la oxidación con rojo Amplex.

#### PCR cuantitativa

20 Se aisló ARN usando el kit de extracción de ARN HighPure de Roche según el protocolo del fabricante. Se sometieron a transcripción inversa 500 ng de ARN usando Superscript II (Invitrogen) y posteriormente se usó para reacciones de PCR en tiempo real basadas en SYBR Green™ usando un protocolo estándar (Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes (5'-3'):

25  ***$\beta$ -actina de ratón directa:*** gatctggcaccacacctct, inversa: ggggtgtgaaggtctcaaa;  
***nox4 directa:*** tctcaggtgtgcatgtagcc, inversa: ttctgggatcctcattctgg;  
***Nox1 directa:*** 5' aaagccattgcatcacaacc 3'  
***Nox1 inversa:*** 5' cagaagcgagagatccatcc 3'.

30 Las condiciones de PCR fueron 95°C durante 10 min seguido por 30 ciclos con 95°C durante 10 s y 56°C durante 60 s. Los niveles de expresión se normalizaron a  $\beta$ -actina.

#### Ejemplo 4: Papel de Nox4 en señalización RANK

35 Para determinar los mecanismos subyacentes a la osteoclastogenia reducida en ratones Nox4<sup>-/-</sup>, se investigó el papel de esta NADPH oxidasa en la señalización RANK. La expresión de receptor de RANK no fue diferente entre BMNC cebadas con M-CSF y los ratones sin modificación genética y Nox4<sup>-/-</sup> que apuntaran hacia diferencias mediadas por Nox4 en señalización RANKL entre ratones sin modificación genética y Nox4<sup>-/-</sup>.

40 Se investigó el papel de Nox4 para el aumento inducido por RANKL en el Ca<sup>2+</sup> citosólico mediante fluorescencia FURA2 según se describe más adelante. Una incubación de BMNC cebadas con M-CSF murinas con RANKL (30 horas) indujo un aumento acusado en las Ca<sup>2+</sup> citosólicas en células de ratones sin modificación genética. En cambio, este efecto no se observó en las células obtenidas de animales deficientes en Nox4 (Figura 4A).

45 La inhibición farmacológica de Nox4 se consiguió mediante un inhibidor de NOX4, 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona que presentaba una CI<sub>50</sub> aproximadamente 10 veces superior para Nox4 que para Nox2 y ausencia de actividad antioxidante medida en un ensayo del Ejemplo 1 (60 mg/kg/día) que se administró mediante alimentación forzada diaria durante 6 semanas mientras que la delección genética de Nox4 se indujo mediante inyección de tamoxifeno (40 mg/kg por vía intraperitoneal durante 3 días consecutivos, antes de ovariectomía según se describe anteriormente). El grupo de control recibió diariamente alimentación forzada por el disolvente.

55 La inhibición farmacológica de Nox4 por el inhibidor de NOX4 (20  $\mu$ mol/L), cuando se coaplicó con RANKL durante la estimulación evitó el aumento inducido por RANKL en Ca<sup>2+</sup> citosólico (Figura 4B), de forma similar a la delección genética de Nox4, lo que muestra claramente que la falta de actividad de Nox4, pero no algunas peculiaridades genéticas son definidas de los ratones Nox4<sup>-/-</sup> es responsable de la deficiencia en la señalización RANKL en células Nox4<sup>-/-</sup>.

60 La diferenciación de osteoclastos en respuesta al calcio está mediada por el factor de transcripción NFAT1c que está translocado en el núcleo después de la activación por la calcineurina fosfatasa sensible al calcio o la escisión parcial por la proteasa activada por calcio m-calpaína. El análisis de inmunotransferencia Western según se describe más adelante mostró que la abundancia de m-calpaína activa aumentó en respuesta a RANKL en BMNC murinas cebadas con M-CSF que se produjo en paralelo con una acumulación nuclear de NFAT1c. Es importante observar 65 que este efecto estuvo ausente en las células obtenidas para ratones Nox4<sup>-/-</sup>, mientras que el nivel de calcineurina

fue similar entre las células obtenidas de ratones sin modificación genética y Nox4<sup>-/-</sup>. Estos datos muestran que Nox4, por medio de su acción de calcio intracelular es un mediador central de señalización RANK y es necesario para la expresión génica inducida por NFAT1c.

#### 5 Medida de Ca<sup>2+</sup>

Se cultivaron células en placas de 96 pocillos y se diferenciaron con o sin RANKL según se describe anteriormente. Después de una etapa de lavado se cargaron las células con 1,5  $\mu$ M de Fura-2 (Invitrogen) durante 60 min. Después de otra etapa de lavado se midió Fura-2 libre y Fura-2 unida a Ca<sup>2+</sup> intracelulares a la longitud de onda de 340 y 380 nm mediante ELISA Reader EnVision (PerkinElmer) en 100  $\mu$ l de HEPES Tyrode. Las medidas se repitieron 3 veces después de la adición por pasos de 40  $\mu$ L de ionomicina 20  $\mu$ M, EGTA 100 mM y MnCl<sub>2</sub> saturado. Finalmente, el Ca<sup>2+</sup> intracelular se calculó según se describe en Grynkiewicz y col., 1985, J. Biol. Chem., 260(6):3440-3450.

#### 15 Inmunotransferencia

Se realizaron análisis de inmunotransferencia Western con un sistema de detección basado en infrarrojo (Odyssey, Licor, Bad Homburg, Alemania). Todos los anticuerpos primarios se adquirieron en Señalización celular y anticuerpos secundarios conjugados con tinte fluorescente de infrarrojo se obtuvieron en Licor (Bad Homburg). Se usó el siguiente tampón de lisis (pH 7,4, concentraciones en mmol/l): Tris-HCl (50), NaCl (150), pirofosfato de sodio (10), fluoruro de sodio (20), nonidet P40 (1%), desoxicolato de sodio (0,5%), inhibidor de la proteinasa mix, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1), ortovanadato (2), ácido okadaico (0,00001).

#### 25 Ejemplo 5: Aumento de Nox4 en osteoporosis humana y efecto de inhibición de NOX4 en la prevención de osteoporosis en ratones

La osteoporosis es la consecuencia de un desequilibrio entre la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos. Dado que los datos anteriores respaldan el papel de Nox4 en la actividad osteoclástica, se investigó la posible función de esta NADPH oxidasa en la osteoporosis humana. Las muestras de hueso humano de pacientes sanos y pacientes osteoporóticos o pacientes con enfermedad de Paget (se sabe que estos dos trastornos están asociados con una alta actividad de osteoclastos) se tiñeron para Nox4 y posteriormente se sometieron a análisis de imágenes según se describe más adelante.

La intensidad de la tinción para Nox4 fue significativamente superior en hueso osteoporótico en comparación con el hueso sano y en pacientes de Paget que en el grupo sano (Figura 5A). Estos datos sugieren que Nox4 también contribuye a la pérdida de hueso en los seres humanos y es un mediador de la osteoporosis.

Para estudiar este último efecto, se sometió a ratones hembra a ovariectomía para inducir osteoporosis y se estudió el efecto de la inhibición farmacológica de Nox4 con un inhibidor de Nox4, así como la inactivación genética aguda de la proteína. Para ello, se sometió a los ratones hembra a ovariectomía 8 semanas después de nacer y el tratamiento a 60 mg/kg con un inhibidor de Nox4 de la invención se inició 2 días después de la operación y se mantuvo durante todo el estudio (6 semanas). Como se esperaba, 6 semanas después de la ovariectomía la densidad ósea se redujo en los ratones de control. Los ratones que recibieron inhibición farmacológica mostraron una densidad ósea significativamente mayor que los que recibieron tratamiento con disolvente (Figura 5C).

45 Tal como se muestra en la Figura 6, el tratamiento de ratones con un inhibidor de Nox4 según la invención (compuesto 1) a 20 y 60 mg/kg realizado en las mismas condiciones descritas anteriormente produjo también características del hueso más favorables: como control positivo se usó el bisfosfonato pamidronato, obtenido de medac GmbH, Fehlandstr. 3, Hamburgo que bloquea completamente la actividad de los osteoclastos. En todos los compuestos se incrementó la densidad ósea absoluta (Fig. 6A) así como la densidad ósea absoluta de hueso trabecular (Fig. 6B) para producir una inhibición relativa de casi el 50% de pérdida de hueso total inducida por ovariectomía (Fig. 6C) y una inhibición relativa de aproximadamente el 60% de pérdida de hueso trabecular (Fig. 6D), medida por tecnología microTC calibrada. Para ello, se examinaron los huesos con skyscan 1176 y se analizó la densidad ósea con el software integrado usando dos imágenes fantasmas con 0,25 g/cm<sup>3</sup> y 0,75 g/cm<sup>3</sup> como referencia. Se analizó una porción de 2 mm del fémur a partir de la meseta tibial para determinar la densidad ósea total y del hueso trabecular mediante el software proporcionado por el fabricante de la máquina. La resistencia a la rotura del hueso se redujo mediante por ovariectomía y el tratamiento con el Compuesto 1 produjo para la máxima concentración un aumento significativo en la resistencia a la rotura del hueso determinado por la prueba de fractura en 3 puntos (Fig. 6E), realizada de forma similar a la Fig. 1C. Para este procedimiento, se sometió a los fémures a insuficiencia por carga mediante pruebas de flexión de 3 puntos usando una máquina de prueba de materiales Zwick Z020/TN2A (Zwick, Ulm, Alemania) con un detector de fuerza de 1 kN, y una resolución de fuerza de 0,01 N. La distancia entre los soportes inferiores para las pruebas de flexión fue de 5 mm. La velocidad del cabezal de movimiento transversal durante la prueba fue de 0,2 mm/minuto para todas las medidas. A partir de los datos de desplazamiento de fuerza se calculó la fuerza final (F<sub>max</sub>; en N).

65 Para determinar los cambios en la actividad de Nox4 que pueden ser útiles terapéuticamente en la osteoporosis, se inactivó de forma aguda Nox4 en ratones Nox4-Flox-Flox cruzados con ratones deletor ERT2-Cre-tamoxifeno según

se describe más adelante del modo siguiente: se sometió a los animales a ovariectomía, se trataron con 3 inyecciones de tamoxifeno (40 mg/kg disueltos en aceite de maíz estéril, i.p.) dos días antes de la operación y se analizaron los huesos 6 semanas después. Como se indicó anteriormente, a consecuencia de la actividad agonista parcial del tamoxifeno en el receptor de estrógenos, el tamoxifeno en sí atenuó la pérdida de densidad trabecular. A pesar de ello, la inactivación adicional de Nox4 tuvo un efecto beneficioso aditivo (Figura 5C).

En conjunto los resultados anteriores proporcionan soporte a un enlace directo inesperado entre Nox4 y pérdida de hueso mostrando que la expresión de Nox4 está regulada por aumento en cortes de hueso osteoporótico humano y que la inhibición *in vivo* de Nox4 previene (farmacológica o genéticamente) la pérdida de hueso en el modelo de ovariectomía en ratones. Por tanto, respalda que la pérdida de masa ósea en la osteoporosis podría prevenirse o al menos reducirse inhibiendo la Nox4.

*Inmunotinción del hueso*

Los cortes histológicos de biopsia de hueso humano anónimo obtenidos para fines diagnósticos se tiñeron mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-Nox4 (Szöcs y col., 2002, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 22:21-7). Para ello, se seccionaron cortes de parafina de hueso descalcificado en 5µ-metro, se desparafinizaron, se rehidrataron y después de desmascaramiento con antígeno mediante cocción en tampón de citrato (Sigma-Aldrich) se incubaron con el anticuerpo primario (diluido 1:300, disuelto en solución salina con tampón de fosfato que contenía Tween al 0,5%) durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó el anticuerpo y las muestras y se desarrolló la tinción con el kit HRP de tinción de vector ABC (VECTOR) y se corrigió la tinción con tinte de hematoxilina.

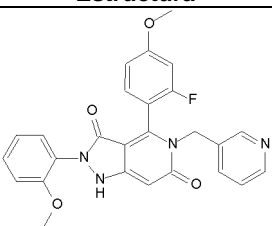
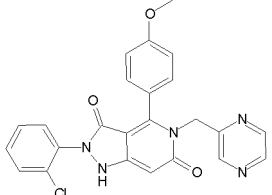
*Procedimientos con ratones y animales*

Se generaron ratones sin Nox4 mediante delección dirigida del sitio de inicio de traducción y exones 1 y 2 del gen Nox4 (Genoway) según se describe en Zhang y col., 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 107:18121-18126. Brevemente, se aisló un fragmento de ADN genómico de Nox4 murino 5' a partir de una biblioteca BAC de ADN 129sv y se usó para generar una construcción de direccionamiento que contenía exones 1 y 2 flanqueados por sitios loxP, una casete de toxina diftérica A de selección negativa y una casete de neomicina de selección positiva flanqueadas por sitios de diana de reconocimiento de Flippasa. La construcción de direccionamiento se sometió a electroporación en células madre embrionarias 129sv, clones recombinantes identificados por PCR y análisis por inmunotransferencia Southern, y se inyectó en blastocistos C57BL/6. Los ratones heterocigotos obtenidos de quimeras de línea germinal se cruzaron con ratones C57BL/6 Cre-deletor y ratones Flp-deletor para generar ratones heterocigotos con genes inactivados. Los animales sin Nox4 se obtuvieron mediante entrecruzamiento de la progenie y se sometieron a cruce retrógrado >10 generaciones con ratones C57BL/6.

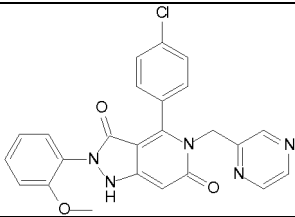
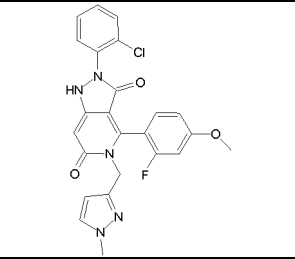
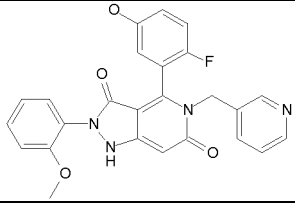
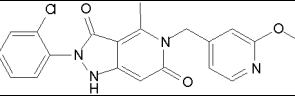
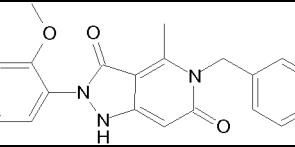
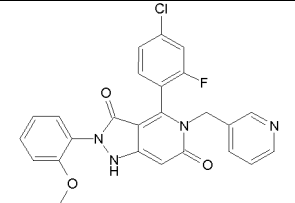
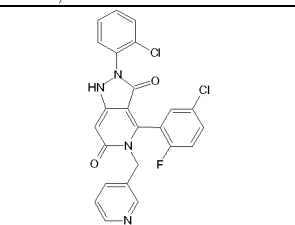
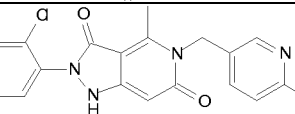
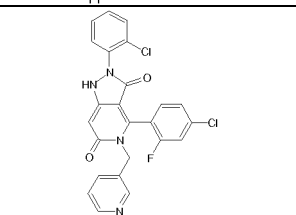
**Ejemplo 6: inhibidores de Nox4**

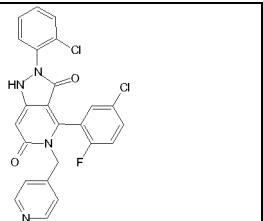
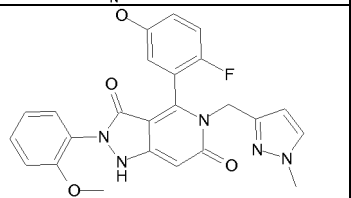
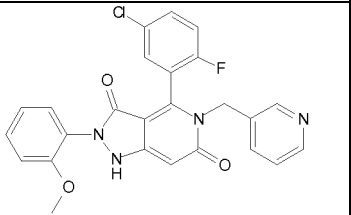
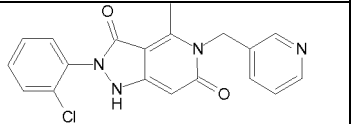
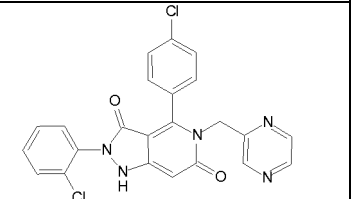
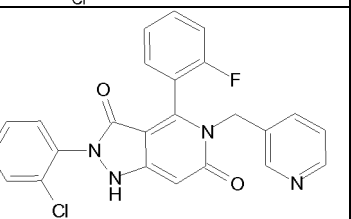
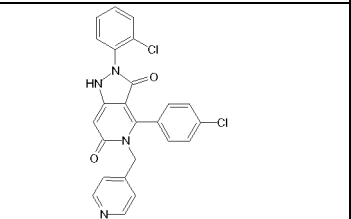
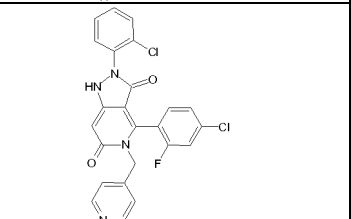
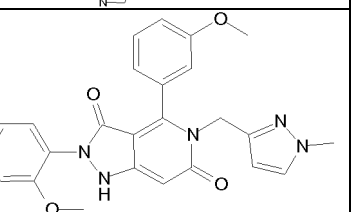
Los compuestos siguientes recogidos en la Tabla 2 mostrada a continuación son ejemplos de inhibidores de Nox4 que podrían usarse de acuerdo con la invención:

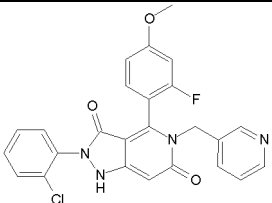
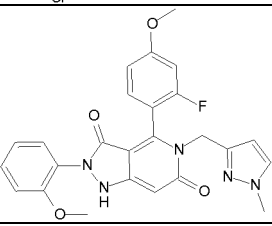
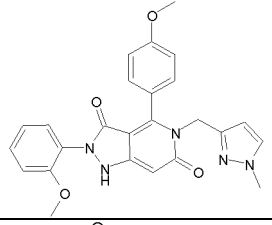
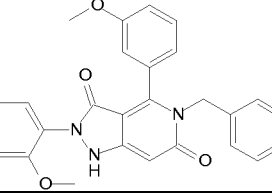
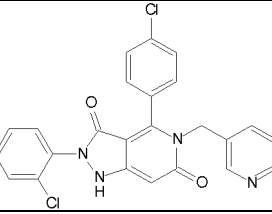
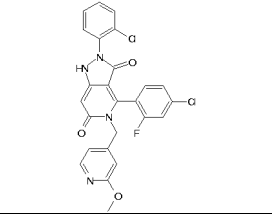
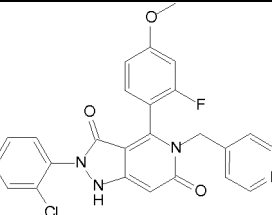
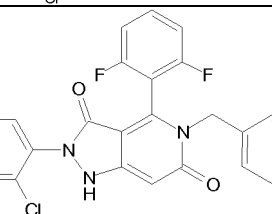
**Tabla 2**

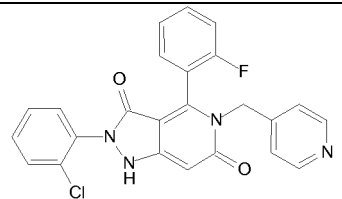
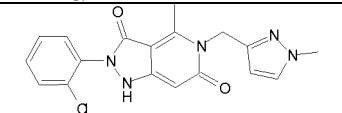
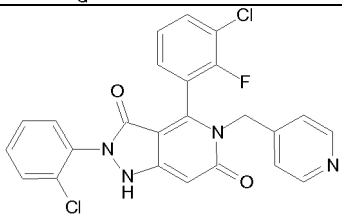
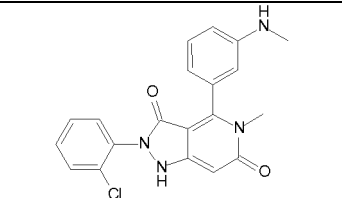
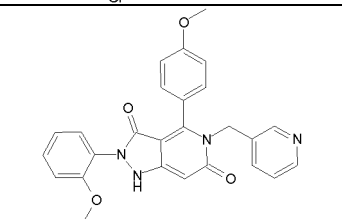
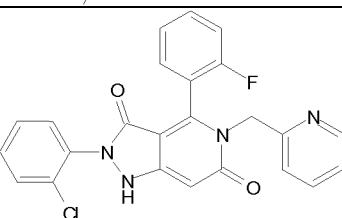
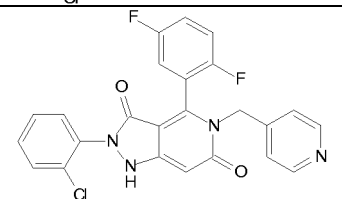
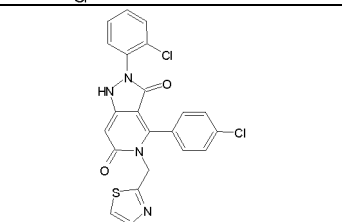
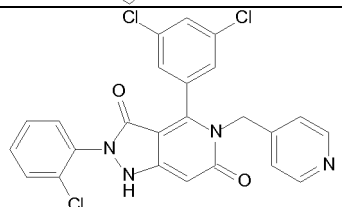
Compuesto	Estructura	Nombre
1		4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
2		2-(2-clorofenil)-4-(4-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona

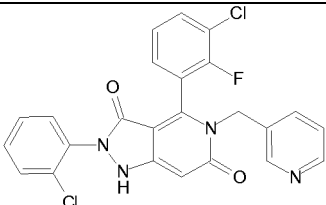
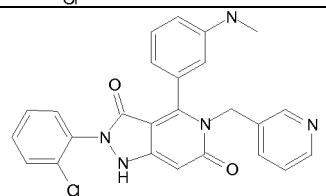
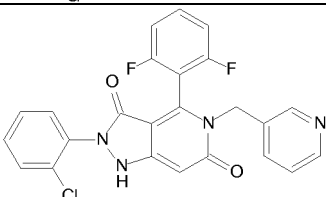
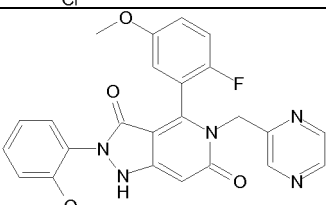
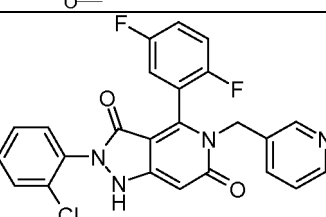
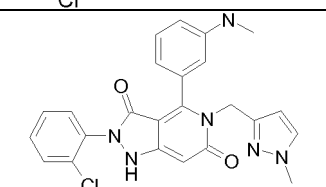


3		4-(4-clorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
4		2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
5		4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
6		2-(2-clorofenil)-5-[(2-metoxipiridin-4-il)metil]-4-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
7		2-(2-metoxifenil)-4-metil-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
8		4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
9		4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
10		2-(2-clorofenil)-5-[(6-metoxipiridin-3-il)metil]-4-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
11		4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona

12		4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
13		4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
14		4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
15		2-(2-clorofenil)-4-metil-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
16		2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
17		2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
18		2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
19		4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
20		2-(2-metoxifenil)-4-(3-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona

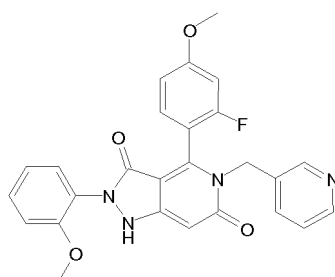
21		2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
22		4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
23		2-(2-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
24		2-(2-metoxifenil)-4-(3-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
25		2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
26		4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-[(2-metoxipiridin-4-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
27		2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
28		2-(2-clorofenil)-4-(2,6-difluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona

29		2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
30		2-(2-clorofenil)-4-metil-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
31		4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
32		2-(2-clorofenil)-5-metil-4-[3-(metilamino)fenil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
33		2-(2-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
34		2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
35		2-(2-clorofenil)-4-(2,5-difluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
36		2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(1,3-thiazol-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
37		2-(2-clorofenil)-4-(3,5-diclorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona

38		4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
39		2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
40		2-(2-clorofenil)-4-(2,6-difluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
41		4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
42		2-(2-clorofenil)-4-(2,5-difluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
43		2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona

#### Síntesis de inhibidores de Nox4

- Los inhibidores de Nox4 anteriores pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles que usan el siguiente procedimiento para el compuesto (1) detallado a continuación. Se observará que cuando se proporcionan condiciones experimentales típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempo, moles de reactivos, disolventes etc.), pueden usarse también otras condiciones experimentales salvo que se especifique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o disolventes concretos, pero dichas condiciones pueden ser determinadas por el experto en la materia, usando procedimientos de optimización de rutina.
- Si el procedimiento de síntesis mostrado a continuación no es aplicable y/o se necesitan productos intermedios para la síntesis de compuestos deben usarse los procedimientos de preparación adecuados conocidos por un experto en la materia. En general, las vías de síntesis para cualquier compuesto individual dependerán de los sustituyentes específicos de cada molécula y de la fácil disponibilidad de productos intermedios necesarios; de nuevo, dichos factores serán valorados por los expertos en la materia. Para todos los procedimientos de protección y desprotección, véase Philip J. Kocienski, en "Protecting Groups", Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2005 y Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts en "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley Interscience, 4ª edición 2006. Los compuestos de la presente invención pueden aislarse en asociación con moléculas de disolvente mediante cristalización a partir de la evaporación de un disolvente apropiado.
- 20 Formación de 4-(2 fluoro-4-metoxi fenil)-2-(2-metoxi fenil)-5-(piridin-3-il metil)-1H-pirazolo [4,3-c]piridina-3,6 (2H,5H)-diona (Compuesto 1)**



(1)

a) **Cloruro de 2-fluoro-4-metoxibenzoilo (Compuesto B)**

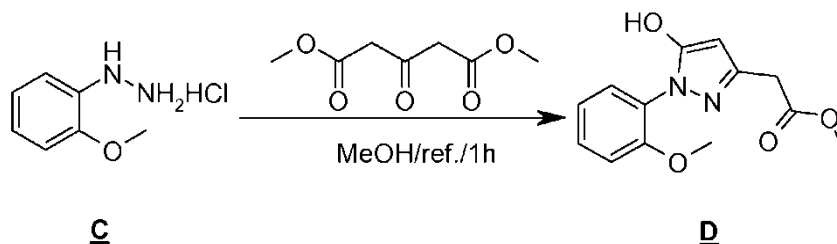


5

El compuesto de partida A (ácido 2-fluoro-4-metoxibenzoico, Aldrich) (350 g, 2,06 mmol) en  $\text{SOCl}_2$  (2.500 ml) se sometió a reflujo en  $\text{N}_2$  durante toda la noche. Se vigiló la reacción por TLC (72 h). Se destiló el producto intermedio deseado B a partir de la mezcla de reacción ( $140^\circ\text{C}$ , 10 mmHg) como un sólido blanco (365 g, rendimiento: 94%).

10

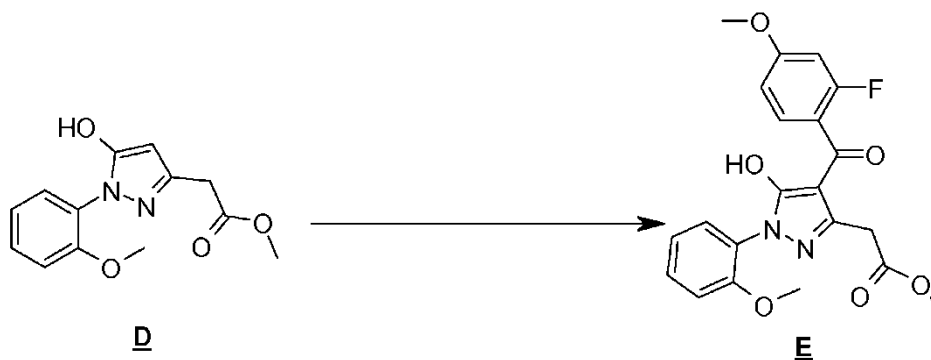
b) **[5-hidroxi-1-(2-metoxifenil)-1H-pirazol-3-il]acetato de metilo (Compuesto D)**



15 A una solución de compuesto de partida C (clorhidrato de 2-metoxifenilhidracina, Aldrich) (350 g, 1 eq.) en MeOH (2 L) se le añadió éster dimetílico de ácido 3-oxo-pentanoico (Aldrich) (1,2 eq.) en  $\text{N}_2$ , se sometió a reflujo esta solución durante 1 h, la TLC mostró que no había STM. Se extrajo el disolvente por evaporación y se purificó el residuo mediante columna de sílice (DCM/MeOH 200:1~50:1) para proporcionar el producto intermedio deseado D como un sólido blanco. (360 g, rendimiento 68%).

20

c) **{4-[(2-fluoro-4-metoxifenil)carbonil]-5-hidroxi-1-(2-metoxifenil)-1H-pirazol-3-il}acetato de metilo (Compuesto E)**

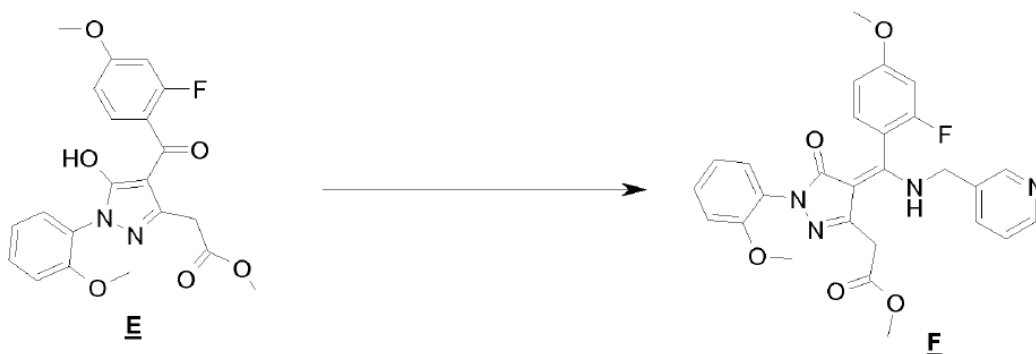


25

El producto intermedio D (20 g, 1 eq.) obtenido anteriormente se suspendió en dioxano (1.200 ml) y a continuación se añadió  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (15 eq.) en  $\text{N}_2$ . Se calentó la mezcla de reacción hasta  $110^\circ\text{C}$ , a continuación, el cloruro de 2-fluoro-4-metoxibenzoilo (compuesto B, 0,9 eq.) obtenido anteriormente se disolvió en dioxano (100 mL) y se añadió a la mezcla gota a gota. Se agitó la reacción a  $110^\circ\text{C}$  y se vigiló mediante LCMS hasta la desaparición del material

de partida (t=4 h). Se filtró la mezcla y se lavó el residuo con acetato de etilo (5\*150 mL). Se concentró el filtrado combinado y se recrystalizó con PE para producir un producto intermedio en bruto **E** como un polvo amarillo sin purificación adicional (11,3 g, rendimiento: 36,9%).

5 **d) [(4E)-4-{(2-fluoro-4-metoxifenil)[(piridin-3-ilmetil)amino]metiliden}-1-(2-metoxifenil)-5-oxo-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il]acetato de metilo (Compuesto F)**



- 10 El producto intermedio E obtenido anteriormente (20 g, 1 eq.) se disolvió en tolueno (500 mL), se añadió  $\text{TiCl}_4$  (2 mL) y AcOH (100 ml) a  $90^\circ\text{C}$  en  $\text{N}_2$ . Después de la adición de 1-piridin-3-il-metanamina (2,0 eq.) (Aldrich), se agitó la mezcla de reacción a  $100^\circ\text{C}$  y se vigiló mediante LCMS que mostró la desaparición del material de partida (1,5 h). Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad. Se disolvió el residuo en EA (500 ml), se lavó con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secó en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró. Se produjo un sólido blanco de compuesto **F** por
- 15 recristalización a partir de DCM y PE (9,5 g, rendimiento: 37,9%).

e) **4-(2-fluoro-4-metoxi fenil)-2-(2-metoxi fenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo [4,3-c]piridina-3,6 (2H,5H)-diona (Compuesto 1)**

- 20 El producto intermedio de enamina **F** obtenido anteriormente (160 g, 1 eq.) se trató con MeONa de nueva preparación en MeOH (2 M, 1.000 ml), se agitó la solución a temperatura ambiente hasta desaparición de la enamina de partida (t=1 h). Se concentró la mezcla de reacción para eliminar MeOH y se disolvió el producto en bruto en agua (800 ml), se extrajo con DCM (300 ml\*6). A continuación, se acidificó la fase acuosa con HCl ac. a pH=5~6 y se extrajo con DCM (300 ml\*3). Se secó la fase orgánica combinada sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se concentró al vacío
- 25 para proporcionar el compuesto del producto final (1) como un sólido amarillo (110 g, rendimiento: 68%).

**REIVINDICACIONES**

1. Un inhibidor de Nox4 (NADPH oxidasa 4) para el uso en la prevención y/o tratamiento de una disfunción de osteoclastogenia relacionada con un aumento de recambio óseo o resorción ósea de causa secundaria y/u osteoporosis, en el que dicho inhibidor de Nox4 se selecciona entre el grupo siguiente:
  - 4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(4-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(4-clorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 10 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-5-[(2-metoxipiridin-4-il)metil]-4-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-metoxifenil)-4-metil-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 15 4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-5-[(6-metoxipiridin-3-il)metil]-4-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 20 4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-metil-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 25 2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-metoxifenil)-4-(3-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 30 2-(2-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-metoxifenil)-4-(3-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-[(2-metoxipiridin-4-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 35 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(2,6-difluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-metil-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 40 2-(2-clorofenil)-5-metil-4-[3-(metilamino)fenil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(2,5-difluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(1,3-thiazol-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 45 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(3,5-diclorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(2,6-difluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 50 4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;
  - 2-(2-clorofenil)-4-(2,5-difluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona; y
  - 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona, así como tautómeros, isómeros geométricos, formas ópticamente activas y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 55 2. Un inhibidor de Nox4 según la reivindicación 1 para su uso en la prevención y/o tratamiento de una disfunción de osteoclastogenia osteoporótica o preosteoporótica.
3. Un inhibidor de Nox4 según la reivindicación 1 para su uso en la prevención y/o tratamiento de resorción ósea de causa secundaria seleccionada entre enfermedad de Paget, pérdida de hueso resultante de inmovilización, metástasis óseas y tumores óseos osteolíticos.
- 60 4. Un inhibidor de Nox4 según la reivindicación 1 para su uso en la prevención y/o tratamiento de destrucción por erosión de las articulaciones, osteoartropatía en diabetes, metástasis óseas, reabsorción de la raíz dental o insuficiencia en la erupción de dientes primarios, hiperparatiroidismo secundario con pérdida de hueso y atrofia ósea debido a inactividad.
- 65



## 5. Un inhibidor de Nox4 seleccionado entre el grupo siguiente:

- 4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 5 2-(2-clorofenil)-4-(4-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(4-clorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-5-[(2-metoxipiridin-4-il)metil]-4-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 10 2-(2-metoxifenil)-4-metil-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-5-[(6-metoxipiridin-3-il)metil]-4-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 15 4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-  
 diona;  
 4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-metil-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 20 2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-metoxifenil)-4-(3-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 25 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-  
 diona;  
 2-(2-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-metoxifenil)-4-(3-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 30 2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-[(2-metoxipiridin-4-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluoro-4-metoxifenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2,6-difluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 35 2-(2-clorofenil)-4-metil-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-5-metil-4-[3-(metilamino)fenil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2-fluorofenil)-5-(piridin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 40 2-(2-clorofenil)-4-(2,5-difluorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(4-clorofenil)-5-(1,3-thiazol-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(3,5-diclorofenil)-5-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-(2-clorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 45 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2,6-difluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 4-(2-fluoro-5-metoxifenil)-2-(2-metoxifenil)-5-(pirazin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona;  
 2-(2-clorofenil)-4-(2,5-difluorofenil)-5-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona; y  
 2-(2-clorofenil)-4-[3-(dimetilamino)fenil]-5-[(1-metil-1H-pirazol-3-il)metil]-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona,  
 50 así como tautómeros, isómeros geométricos, formas ópticamente activas y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

## 6. Un inhibidor de Nox4 según la reivindicación 5 para su uso como un medicamento.

55 7. Una composición farmacéutica que contiene al menos un inhibidor de Nox4 según la reivindicación 5, y un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Un inhibidor de Nox4 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el inhibidor de Nox4 debe administrarse con al menos un coagente útil en el tratamiento o prevención de osteoporosis.

60

9. Un inhibidor de Nox4 para su uso según la reivindicación 8 en el que el coagente se selecciona entre bisfosfonato, estrógeno y vitamina D.

10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7 en el que dicho al menos un inhibidor de  
 65 Nox4 se combina con al menos un coagente útil en la prevención y/o tratamiento de una disfunción de osteoclastogénesis relacionada con un aumento en el recambio óseo o resorción ósea de causa secundaria y/u

osteoporosis, y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable.

11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10 en el que el coagente se selecciona entre bisfosfonato, estrógeno y vitamina D.

5

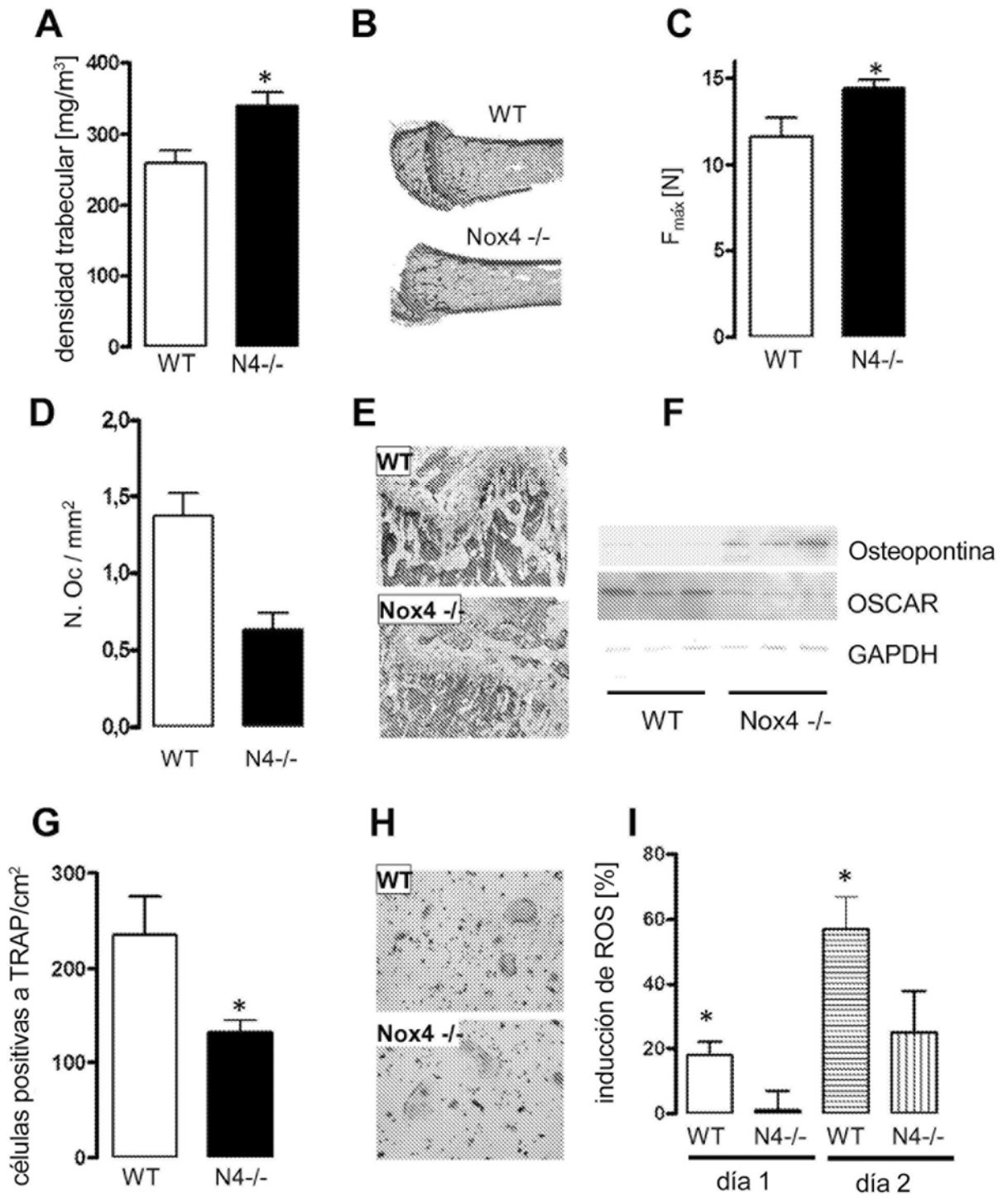


Figura 1

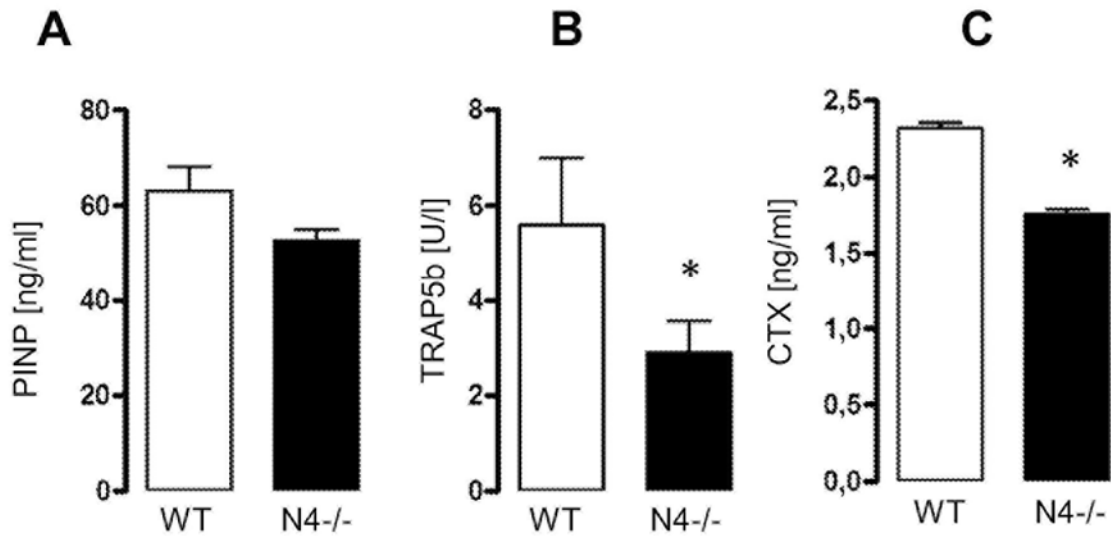


Figura 2

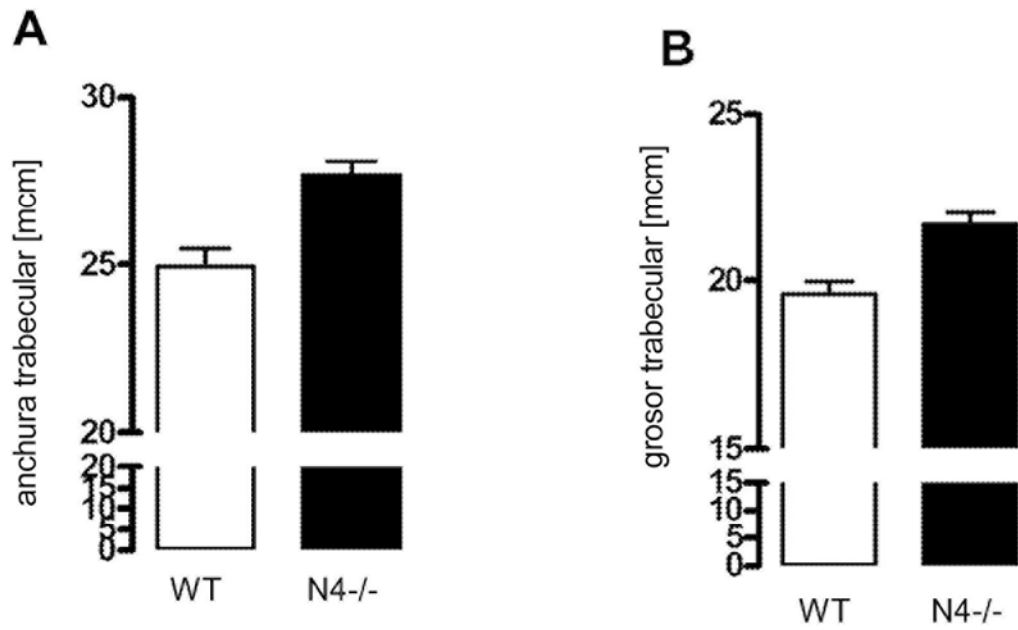


Figura 3

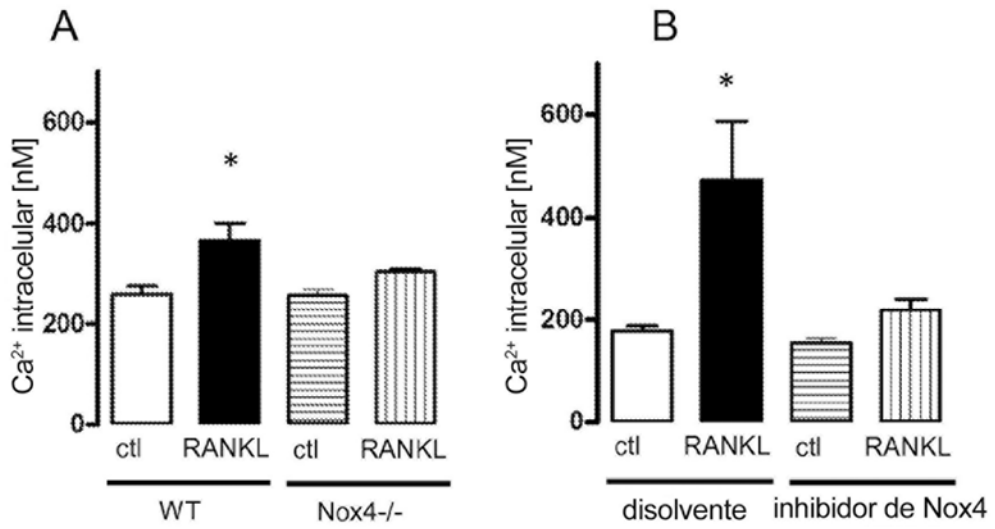


Figura 4

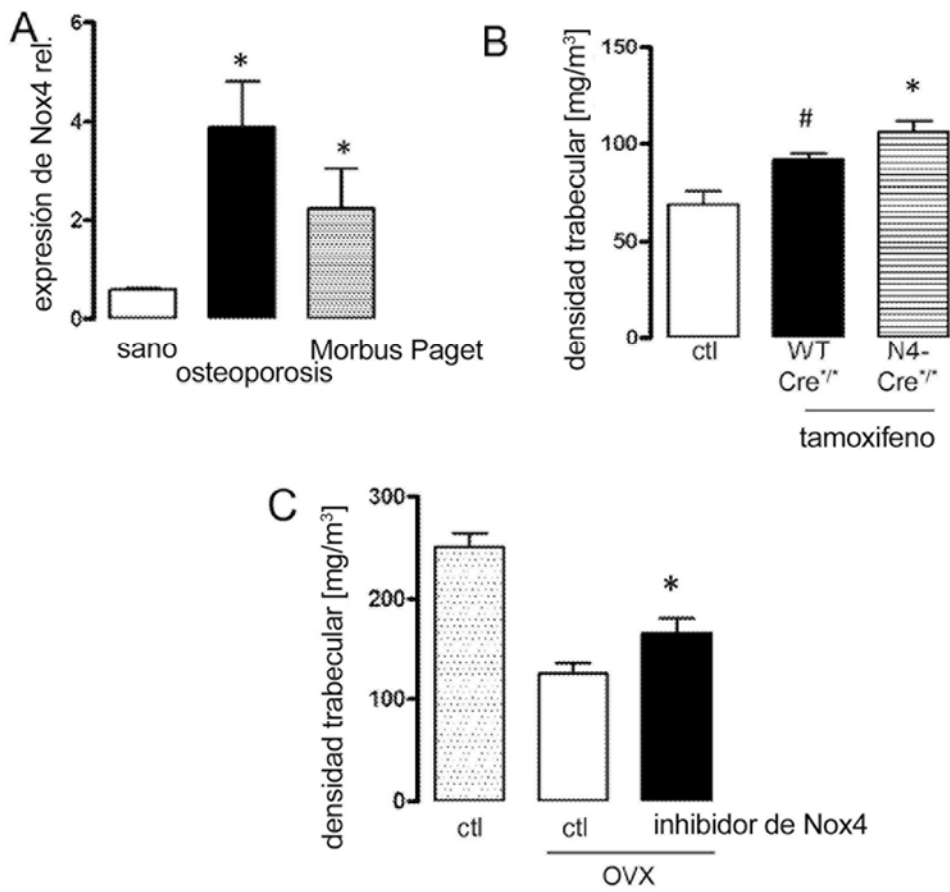


Figura 5

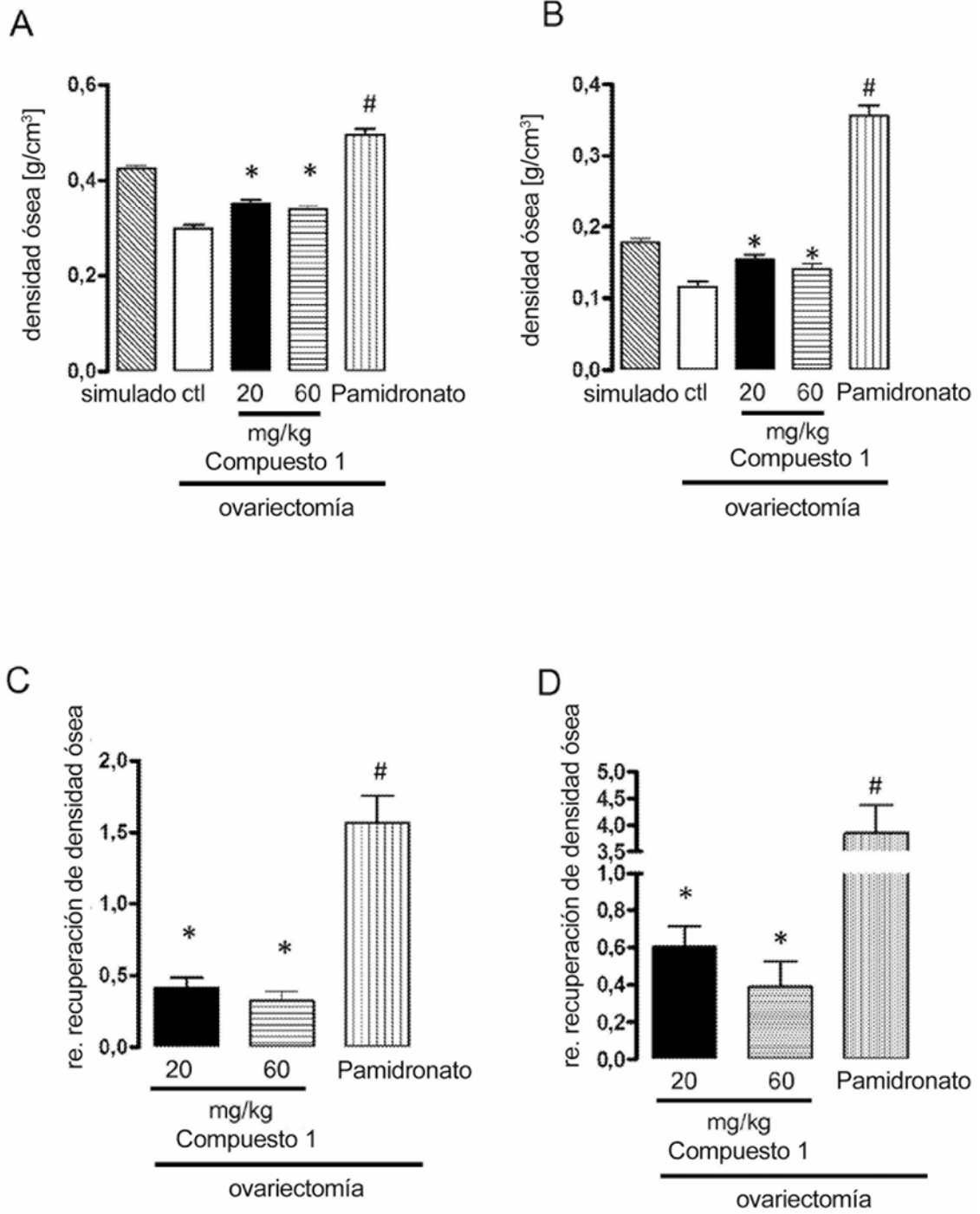


Figura 6

E

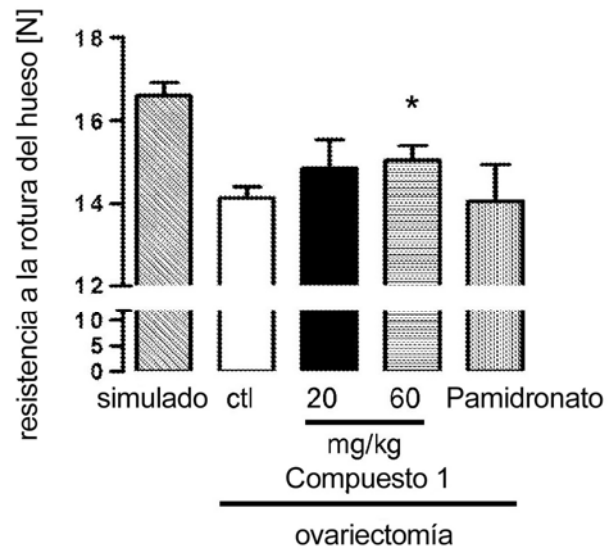


Figura 6 (continuación)