

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 134**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4706	(2006.01)	A61P 9/12	(2006.01)
A61K 31/4709	(2006.01)	A61P 9/04	(2006.01)
A61K 31/635	(2006.01)	A61P 13/12	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)	A61P 27/06	(2006.01)
G08B 13/14	(2006.01)	A61P 43/00	(2006.01)
A01N 43/00	(2006.01)		
A61K 31/675	(2006.01)		
A61K 31/706	(2006.01)		
A61K 31/47	(2006.01)		
A61P 7/10	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2005 PCT/US2005/047474**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2006 WO06072000**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2005 E 05857253 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 1851739**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas derivadas de ácido xanturénico y métodos relacionados con las mismas**

30 Prioridad:
29.12.2004 US 17131

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2018

73 Titular/es:
**NATURON, INC. (100.0%)
1300 VALLEY ROAD
NEW CANAAN CT 06840, US**

72 Inventor/es:
**SCHMERTZLER, MICHAEL;
MITCHNICK, MARK;
CAIN, CHRISTOPHER D.;
SHANKEL, STEWART y
BRICKER, NEAL**

74 Agente/Representante:
CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 671 134 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

Composiciones farmacéuticas derivadas de ácido xanturénico y métodos relacionados con las mismas

5 Antecedentes de la invención

Los diuréticos son un grupo de fármacos usados para tratar una diversidad de afecciones médicas, incluyendo insuficiencia cardiaca congestiva, hipertensión, ciertos tipos de enfermedades hepáticas y renales y el aumento de la presión intraocular. Los diuréticos actúan sobre el transporte de sodio (Na^+) por las nefronas del riñón para aumentar la excreción renal de Na^+ (y los iones asociados) y agua fuera del cuerpo y de este modo disminuir el volumen del líquido extracelular (FEC). Normalmente, el Na^+ ingresa al ECF a través de la dieta y se excreta en la orina en cantidades idénticas a la ingesta. En adultos normales, más del 99 % del sodio que ingresa en las nefronas de los dos riñones (a través de la filtración glomerular) se transporta a través de un proceso dependiente de la energía fuera del líquido tubular y de regreso al ECF. Cuando este equilibrio entre la ingesta y la excreción se altera (con una excreción que cae por debajo de la ingesta) se producirá retención de sal. Un mecanismo primario para tratar esta anomalía implica la administración de uno o más agentes que reducen la reabsorción de Na^+ y agua por los riñones y, por lo tanto, aumentan su excreción en la orina. Estos agentes, colectivamente, se conocen como diuréticos. De manera óptima, un diurético potente debería ser natriurético (inhibir la resorción de iones de sodio) pero no kaliurético (inhibir la resorción de iones de potasio) ya que la pérdida de potasio es un efecto secundario no deseado. Los fármacos principales que están incluidos en la categoría de "diuréticos" actúan inhibiendo el transporte de Na^+ (y agua) fuera del fluido tubular actuando sobre un "portador" específico en las células epiteliales tubulares en un sitio específico de la nefrona. El último varía con el diurético empleado.

Existen varias clases principales de diuréticos que incluyen diuréticos de asa, diuréticos de tipo tiazida y diuréticos ahorradores de potasio. Los diuréticos de asa, también conocidos como diuréticos de techo alto, actúan sobre el asa gruesa ascendente de Henle dentro del riñón. Los ejemplos incluyen furosemida, bumetanida y tosesemida. Los diuréticos de asa tienen un efecto diurético máximo mucho mayor que otras clases de diuréticos. Esta clase actúa para inhibir la reabsorción de electrolitos que da como resultado la excreción no solo de sodio, sino también de potasio, calcio y magnesio. Se considera que los diuréticos de asa "malgastan potasio". Por ejemplo, la furosemida se usa comúnmente para tratar la insuficiencia cardiaca, el edema pulmonar, la hipertensión y la intoxicación. Desafortunadamente, si el potasio en la dieta no es suficiente, puede producirse hipocalcemia y esto puede inducir arritmias cardiacas (Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics, 10ª Ed.; Hardman, Limbird & Gilman, Eds. MacGraw-Hill, pág. 772, 2001).

Los diuréticos de tipo tiazida actúan en el túbulo distal y el segmento de conexión de los riñones. Los ejemplos incluyen clorotiazida, clortalidona, hidroclorotiazida, indapamida y metolazona. Aunque las tiazidas causan menos distorsión de la composición electrolítica del líquido extracelular que otras clases de diuréticos, también hay una menor intensidad de diuresis producida por estos fármacos. Esta clase contiene muchas entidades químicas de sulfonamida y, por lo tanto, puede causar una reacción alérgica en aquellos con alergias a las sulfamidas. Aunque las tiazidas no causan la excreción de calcio, la excreción de potasio aumenta con la administración aguda. Las tiazidas también pueden inducir hiperglucemia y agravar la diabetes mellitus preexistente. Los diuréticos de tiazida también pueden causar aumento del colesterol sérico, lipoproteína de baja densidad (LDL) y concentración de triglicéridos. Las tiazidas también se consideran diuréticos "que malgastan potasio".

Los diuréticos ahorradores de potasio pueden actuar a través de cualquiera de varios mecanismos. Algunos tienen estructura esteroide y actúan en células sensibles a la aldosterona en el túbulo de conexión cortical en el riñón. Los miembros de esta clase de fármacos son antagonistas competitivos de esteroides mineralocorticoides endógenos tal como la aldosterona, que actúa para mejorar la absorción de sodio y la excreción de potasio. El receptor de aldosterona es una proteína citoplásmica soluble que se encuentra en varios tejidos, incluyendo las glándulas salivales, el colon y segmentos de nefronas en el riñón. La espironolactona, un miembro representativo de esta clase de fármacos, se une al receptor de aldosterona e impide que el receptor asuma una conformación activa. La espironolactona también aumenta la excreción de calcio. Los efectos secundarios comunes incluyen náuseas, calambres estomacales y diarrea. Otros efectos secundarios incluyen desequilibrios endocrinos, ginecomastia (agrandamiento anormal de uno o ambos senos en los hombres), libido alterada, impotencia o hirsutismo (exceso de vello corporal). El triamtereno y la amilorida son diuréticos ahorradores de potasio no esteroideos que inhiben la entrada electrogénica de sodio en los segmentos tardíos de la nefrona renal. El triamtereno y la amilorida causan un aumento en la excreción de sodio y cloruro, pero tienen poco efecto sobre la excreción de potasio. Los efectos secundarios del Triamtereno incluyen hipercalemia (aumento de la concentración sérica de potasio), náuseas, vómitos, calambres en las piernas y mareos. Los efectos secundarios de la Amilorida también incluyen hipercalemia,

náuseas, vómitos, diarrea y dolor de cabeza.

Otras clases de diuréticos incluyen los diuréticos osmóticos e inhibidores de la anhidrasa carbónica. Los diuréticos osmóticos, tal como manitol, se reabsorben mal por los túbulos renales. Esta clase de fármacos tiene una mala reabsorción neta de sales de sodio. Además, el manitol es mal absorbido por el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, debe administrarse por vía intravenosa. Otros diuréticos osmóticos incluyen glicerol, urea e isosorbida.

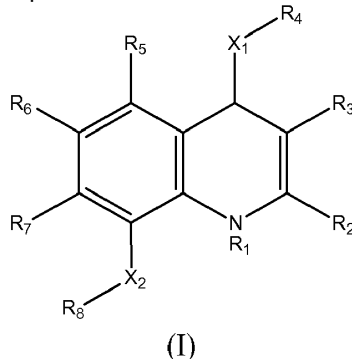
Los inhibidores de la anhidrasa carbónica, tales como la acetazolamida, causan una disminución modesta de la reabsorción de sodio y también pueden causar la pérdida de potasio y la acidosis metabólica debido a su mecanismo de acción.

Los diuréticos se usan para tratar la presión arterial alta (hipertensión), en solitario o en combinación con otros fármacos. La presión arterial alta se suma a la carga de trabajo del corazón y las arterias. Si la afección continúa durante un período prolongado de tiempo, la función cardíaca y arterial puede verse afectada. Esto puede dañar los vasos sanguíneos del cerebro, el corazón y los riñones, lo que puede ocasionar ictus, insuficiencia cardíaca o renal. La presión arterial alta también puede aumentar el riesgo de ataque cardíaco. Estos riesgos pueden reducirse si la presión arterial se controla adecuadamente. Las directrices de presión arterial alta del National Heart, Lung, and Blood Institute's (NHLBI) (JAMA, 21 de mayo de 2003; www.nhlbi.nih.gov) enfatizan la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos diuréticos sin los efectos secundarios de la farmacopea diurética que se ha mencionado anteriormente.

Resumen de la invención

La presente invención es como se expone en las reivindicaciones. Se proporciona cualquier realización o ejemplo que no esté dentro de las reivindicaciones como realizaciones o ejemplos ilustrativos.

En un aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I:



30

en la que R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_6 y R_7 son independientemente X_3R , donde R se selecciona del grupo que consiste en H, halo; sacárido, alifático, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos; $-P(O)(OR^a)(OR^b)$ y $-NR^aR^b$, donde R^a y R^b son independientemente H, alifático, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos;

35

X_1 , X_2 y X_3 son independientemente $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-OS(O)_y-$, $-S(O)_y-$, $-O-$, $-NHC(O)-$, $-NHC(O)O-$, $-S(O)_2NH-$, un enlace o están ausentes; donde y es un número entero de 0 a 3; y

40

R_4 y R_8 son independientemente H, (=O); hidroxilo; o sacárido, alifático, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos; o $-P(O)(OR^a)(OR^b)$ o $-NR^aR^b$, donde R^a y R^b son independientemente H, o alifático, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos; o un profármaco o sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción también describe métodos para tratar, controlar y prevenir hipertensión, edema, insuficiencia renal aguda, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal crónica, ascitis, aumento de la presión intraocular o síndrome nefrótico y otras enfermedades y afecciones relacionadas usando composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de fórmula I.

Una breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 muestra la excreción de Na⁺ en orina en respuesta a la administración intravenosa (i.v.) (dosis de 2 µg) de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético en una rata Sprague Dawley normal.
- La Figura 2 muestra la excreción de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a la administración i.v. (dosis de 2 µg) de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético en una rata normal Sprague Dawley.
- La Figura 3 muestra la concentración de Na⁺ y K⁺ en orina tras la administración i.v. (dosis de 2 µg) de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético en una rata normal Sprague Dawley.
- 10 La Figura 4 muestra el volumen de orina tras la administración i.v. (dosis de 2 µg) de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético en una rata normal Sprague Dawley.
- La Figura 5 muestra la excreción de Na⁺ en respuesta a la administración i.v. (dosis de 10 µg) de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético en una rata normal Sprague Dawley.
- La Figura 6 muestra la excreción de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a la administración i.v. (dosis de 10 µg) de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético en una rata normal Sprague Dawley.
- 15 La Figura 7 muestra la concentración de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a la administración i.v. (dosis de 10 µg) de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético en una rata normal Sprague Dawley.
- La Figura 8 muestra el volumen de orina tras la administración i.v. (dosis de 10 µg) de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético en una rata normal Sprague Dawley.
- 20 La Figura 9 muestra la excreción de Na⁺ en orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético (10 µg) seguido de furosemida (100 µg) en una rata normal Sprague Dawley, administración oral (p.o.).
- La Figura 10 muestra la excreción de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético (10 µg) seguido de furosemida (100 µg) en una rata normal Sprague Dawley, administración oral (p.o.).
- 25 La Figura 11 muestra la concentración de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético (10 µg) seguido de furosemida (100 µg) en una rata normal Sprague Dawley, administración oral (p.o.).
- La Figura 12 muestra el volumen de orina tras la administración de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético (10 µg) seguido de furosemida (100 µg) en una rata normal Sprague Dawley, administración oral (p.o.).
- 30 La Figura 13 muestra la excreción de Na⁺ en orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido aislado (3 µg) seguido de furosemida (20 µg) en una rata urémica Sprague Dawley, administración i.v.
- La Figura 14 muestra la excreción de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido aislado (3 µg) seguido de furosemida (20 µg) en una rata urémica Sprague Dawley, administración i.v.
- 35 La Figura 15 muestra la concentración de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido aislado (3 µg) seguido de furosemida (20 µg) en una rata urémica Sprague Dawley, administración i.v.
- La Figura 16 muestra el volumen de orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido aislado (3 µg) seguido de furosemida (20 µg) en una rata urémica Sprague Dawley, administración i.v.
- 40 La Figura 17 muestra la excreción de Na⁺ en orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico aislado (2 µg) en ratas urémicas Sprague Dawley, administración i.v.
- La Figura 18 muestra la excreción de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico aislado (2 µg) en ratas urémicas Sprague Dawley, administración i.v.
- 45 La Figura 19 muestra la concentración de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico aislado (2 µg) en ratas urémicas Sprague Dawley, administración i.v.
- La Figura 20 muestra el volumen de orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico aislado (2 µg) en ratas urémicas Sprague Dawley, administración i.v.
- La Figura 21 muestra la excreción de Na⁺ en orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico sintético (20,0 µg) en una rata normal Sprague Dawley por administración oral.
- 50 La Figura 22 muestra la excreción de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico sintético (20,0 µg) en una rata normal Sprague Dawley por administración oral.
- La Figura 23 muestra la concentración de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico sintético (20,0 µg) en una rata normal Sprague Dawley por administración oral.
- 55 La Figura 24 muestra el volumen de orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico sintético (20,0 µg) en una rata normal Sprague Dawley por administración oral.
- La Figura 25 muestra la excreción de Na⁺ y K⁺ en orina en una rata normal Sprague Dawley en respuesta a furosemida (0,5 mg, i.v.).
- La Figura 26 muestra la excreción en orina de una rata normal Sprague Dawley en respuesta a furosemida

(0,5 mg i.v.).

Descripción detallada de la invención

5 Como se usa en el presente documento, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se indique otra cosa.

La frase "opcionalmente sustituido" se usa de manera intercambiable con la frase "sustituido o sin sustituir". A menos que se indique lo contrario, un grupo opcionalmente sustituido puede tener un sustituyente en cada posición sustituable del grupo, y cada sustitución es independiente de cualquier otra. Además, solo se permiten las
10 combinaciones de sustituyentes o variables en caso de que dichas combinaciones den como resultado compuestos estables. Además, a menos que se indique lo contrario, los radicales del grupo funcional se seleccionan independientemente. Cuando "opcionalmente sustituido" modifica una serie de grupos separados por comas (por ejemplo, "A, B o C opcionalmente sustituidos", o "A, B o C opcionalmente sustituidos con"), se pretende que cada uno de los grupos (por ejemplo, A, B y C) esté opcionalmente sustituido.

15 El término "alifático" o "grupo alifático" como se usa en el presente documento significa una cadena hidrocarburo C₁₋₁₂ de cadena lineal o ramificada que está completamente saturada o que contiene una o más unidades de insaturación, o un hidrocarburo C₃₋₈ monocíclico o hidrocarburo C₈₋₁₂ bicíclico que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático (también denominado en el presente
20 documento "carbociclo" o "cicloalquilo"), que tiene un único punto de unión al resto de la molécula en donde cualquier anillo individual en dicho sistema anular bicíclico tiene 3-7 miembros. Por ejemplo, los grupos alquilo adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos lineales o ramificados o alquilo, alquenilo, alquinilo e híbridos de los mismos tales como (cicloalquil)alquilo, (cicloalquenil)alquilo o (cicloalquil)alquenilo.

25 Los términos "alcoxi", "hidroxialquilo", "alcoxialquilo" y "alcoxicarbonilo", usados en solitario o como parte de un resto mayor. incluyen tanto cadenas lineales como ramificadas que contienen de uno a doce átomos de carbono. Los términos "alquenilo" y "alquinilo" usados en solitario o como parte de un resto mayor incluirán tanto cadenas lineales como ramificadas que contienen de dos a doce átomos de carbono.

30 Los términos "haloalquilo", "haloalquenilo" y "haloalcoxi" significan alquilo, alquenilo o alcoxi, según el caso, pueden estar sustituidos con uno o más átomos de halógeno. El término "halógeno" o "halo" significa F, Cl, Br o I.

El término "heteroátomo" significa nitrógeno, oxígeno o azufre e incluye cualquier forma oxidada de nitrógeno y azufre, y la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico.

35 El término "arilo" usado en solitario o en combinación con otros términos, se refiere a sistemas anulares carbocíclicos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos que tienen un total de cinco a catorce miembros en el anillo, en donde al menos un anillo en el sistema es aromático y en el que cada el anillo en el sistema contiene de 3 a 8 miembros en el anillo. El término "arilo" puede usarse de forma intercambiable con el término "anillo de arilo". El
40 término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un arilo. El término "aralcoxi" se refiere a un grupo alcoxi sustituido con un arilo.

El término "heterocicloalquilo", "heterociclo", "heterociclilo" o "heterocíclico" como se usa en el presente documento significa sistemas anulares monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos que tienen de cinco a catorce miembros en el anillo
45 en los que uno o más miembros en el anillo son un heteroátomo, en donde cada anillo en el sistema contiene de 3 a 7 miembros en el anillo y no es aromático.

El término "heteroarilo", usado en solitario o en combinación con otros términos, se refiere a sistemas anulares monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos que tienen un total de cinco a catorce miembros en el anillo, y en donde: 1) al
50 menos un anillo en el sistema es aromático; 2) al menos un anillo en el sistema contiene uno o más heteroátomos; y 3) cada anillo en el sistema contiene de 3 a 7 miembros en el anillo. El término "heteroarilo" puede usarse indistintamente con el término "anillo de heteroarilo" o el término "heteroaromático". Los ejemplos de anillos de heteroarilo incluyen 2-furanilo, 3-furanilo, N-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 5-imidazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-oxadiazolilo, 5-oxadiazolilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 1-pirazolilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-pirimidilo, 3-piridazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 5-tetrazolilo, 2-triazolilo, 5-triazolilo, 2-tienilo, 3-tienilo, carbazolilo, benzimidazolilo, benzotienilo, benzofuranilo, indolilo, quinolinilo, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzooxazolilo, benzimidazolilo, isoquinolinilo, indazolilo, isoindolilo, acridinilo, y benzoisoxazolilo. El término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un heteroarilo. El término "heteroarilalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi

sustituido con un heteroarilo.

Un grupo arilo (incluyendo aralquilo, aralcoxi, ariloxialquilo y similares) o heteroarilo (incluyendo heteroaralquilo, heteroarilalcoxi y similares) puede contener uno o más sustituyentes. Los sustituyentes adecuados en el átomo de carbono insaturado de un grupo arilo, heteroarilo, aralquilo o heteroaralquilo se seleccionan de halógeno; haloalquilo; -CF₃; -R⁹; -OR⁹; -SR⁹; 1,2-metilendioxi; 1,2-etilendioxi; OH protegido (tal como aciloxi); fenilo (Ph); Ph sustituido con R⁹; -O(Ph); -O-(Ph) sustituido con R⁹; -CH₂(Ph); -CH₂(Ph) sustituido con R⁹; -CH₂CH₂(Ph); -CH₂CH₂(Ph) sustituido con R⁹; -NO₂; -CN; -NR⁹R¹⁰; -NR⁹C(O)R¹⁰; -NR⁹C(O)NR¹⁰R¹¹; -NR⁹CO₂R¹⁰; -NR⁹NR¹⁰C(O)R¹¹; -NR⁹-NR¹⁰ C(O)NR¹¹R¹²; -NR⁹NR¹⁰CO₂R¹¹; -C(O)C(O)R⁹; -C(O)CH₂C(O)R⁹; -CO₂R⁹; -C(O)R⁹; -C(O)NR⁹R¹⁰; -OC(O)NR⁹R¹⁰; -S(O)₂R⁹; -SO₂NR⁹R¹⁰; -S(O)R⁹; -NR⁹SO₂NR¹⁰R¹¹; -NR⁹SO₂R¹⁰; -C(=S)NR⁹R¹⁰; -C(=NH)-NR⁹R¹⁰; -(CH₂)_yNHC(O)R⁹; -(CH₂)_yR⁹; -(CH₂)_yNHC(O)NHR⁹; -(CH₂)_yNHC(O)OR⁹; -(CH₂)_yNHS(O)R⁹; -(CH₂)_yNHSO₂R⁹ o -(CH₂)_yNHC(O)CH(V)_z-R⁹(R¹⁰), en donde R⁹, R¹⁰, R¹¹ y R¹² se seleccionan independientemente de hidrógeno, alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido, un anillo de heteroarilo o heterocíclico sin sustituir de 5-6 miembros, fenilo (Ph), -O(Ph) o -CH₂(Ph)-CH₂(Ph), en donde y es 0-6; z es 0-1; y V es un grupo enlazador. Cuando R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es alifático C₁₋₆, puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de -NH₂, -NH(alifático C₁₋₄), -N(alifático C₁₋₄)₂, -S(O)(alifático C₁₋₄), -SO₂(alifático C₁₋₄), halógeno, (alifático C₁₋₄), -OH, -O-(alifático C₁₋₄), -NO₂, -CN, -CO₂H, -CO₂(alifático C₁₋₄), -O(halo alifático C₁₋₄), o -halo(alifático C₁₋₄); en donde cada alifático C₁₋₄ está sin sustituir.

Un grupo alifático o un anillo heterocíclico no aromático pueden contener uno o más sustituyentes. Los sustituyentes adecuados en el carbono saturado de un grupo alquilo o de un anillo heterocíclico no aromático se seleccionan entre los enumerados anteriormente para el carbono insaturado de un grupo arilo o heteroarilo y los siguientes: =O, =S, =NNHR¹³, =NNR¹³R¹⁴, =N-, =NNHC(O)R¹³, =NNHCO₂(alquilo), =NNHSO₂(alquilo), o =NR¹³, donde R¹³ y R¹⁴ se seleccionan independientemente de hidrógeno y un alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido. Cuando R¹³ o R¹⁴ es alifático C₁₋₆, puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de -NH₂, -NH(alifático C₁₋₄), -N(alifático C₁₋₄)₂, halógeno, -OH, -O-(alifático C₁₋₄), -NO₂, -CN, -CO₂H, -CO₂(alifático C₁₋₄), -O(halo alifático C₁₋₄) o -halo(alifático C₁₋₄); en donde cada alifático C₁₋₄ está sin sustituir.

Los sustituyentes en el nitrógeno de un anillo heterocíclico no aromático se seleccionan de -R¹⁵, -NR¹⁵R¹⁶, -C(O)R¹⁵, -CO₂R¹⁵, -C(O)C(O)R¹⁵, -C(O)CH₂C(O)R¹⁵, -SO₂R¹⁵, -SO₂NR¹⁵R¹⁶, -C(=S)NR¹⁵R¹⁶, -C(=NH)NR¹⁵R¹⁶ o -NR¹⁵SO₂R¹⁶; en donde R¹⁵ y R¹⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno, un alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido, fenilo opcionalmente sustituido (Ph), -O(Ph) opcionalmente sustituido, -CH₂(Ph) opcionalmente sustituido, -CH₂CH₂(Ph) opcionalmente sustituido, o un anillo de heteroarilo o heterocíclico sin sustituir de 5-6 miembros. Cuando R¹⁵ o R¹⁶ es un grupo alifático C₁₋₆ o un anillo de fenilo, puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de -NH₂, -NH(alifático C₁₋₄), -N(alifático C₁₋₄)₂, halógeno, -(alifático C₁₋₄), -OH, -O-(alifático C₁₋₄), -NO₂, -CN, -CO₂H, -CO₂(alifático C₁₋₄), -O(halo alifático C₁₋₄) o -halo(alifático C₁₋₄); en donde cada alifático C₁₋₄ está sin sustituir.

El término "sacárido" define un carbohidrato, o azúcar, formado por una o más unidades con la fórmula genérica empírica (CH₂O)_n. Un sacárido se clasifica además como un monosacárido, disacárido o polisacárido dependiendo del número de unidades o un aminosacárido si uno o más átomos de oxígeno se reemplazan por un átomo de nitrógeno. Un sacárido también puede clasificarse como un desoxisacárido si uno o más grupos hidroxilo se reemplazan por un átomo de hidrógeno.

Un sustituyente sacárido puede estar sustituido adicionalmente en cualquier grupo hidroxilo primario o secundario por, por ejemplo, un alquilo, alcoxilalquilo, arilo, heteroarilo, éter, éster, acetal, carbonato o carbamato.

El término "monosacárido" define un único carbohidrato, o unidad de azúcar. Dos familias de monosacáridos son aldosas o cetosas. Las aldosas tienen un grupo carbonilo en el extremo de la cadena de carbono como un aldehído, cuando el monosacárido está escrito en una fórmula lineal de cadena abierta. Si el carbonilo está en cualquier otra posición en la cadena de carbono, el monosacárido es una cetona y se conoce como cetosa. Los tres monosacáridos de carbono son triosas: gliceraldehídos, una aldosa y dihidroxiacetona, una cetosa. Los monosacáridos, a excepción de la dihidroxiacetona, tienen uno o más centros asimétricos. Los prefijos D o L se refieren a la configuración del átomo de carbono del carbono quiral más distante del carbono carbonílico. Los monosacáridos con 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono en su cadena principal se denominan tetrosas, pentosas, hexosas y heptosas, respectivamente. Cada uno de estos existe en dos series: aldotetrosas y cetotetrosas, aldopentosas y cetopentosas, aldohexosas y cetoheptosas, aldohexosas y cetoheptosas. Las tetrosas incluyen eritrosa y treosa. Las pentosas incluyen ribosa, arabinosa, xilosa y lixosa. Las hexosas incluyen alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa. Los monosacáridos con 5 o más carbonos en la cadena principal generalmente se presentan como estructuras cíclicas, o anulares, en las que el carbono carbonílico ha formado un enlace covalente

con uno de los grupos hidroxilo a lo largo de la cadena. Los compuestos anulares de seis miembros se denominan piranosas, los compuestos anulares de cinco miembros son furanosas. La formación de un anillo de seis miembros es resultado de la reacción de aldehídos y alcoholes para formar hemiacetales que contienen un átomo de carbono asimétrico. Una configuración en torno al carbono C-1 se describe como forma α y la otra se describe como la forma β .

El término "disacárido" se refiere a un resto molecular que contiene dos monosacáridos unidos covalentemente entre sí. Los disacáridos incluyen maltosa [glucosa-glucosa], lactosa [galactosa-glucosa] y sacarosa [fructosa-glucosa].

10 El término "polisacárido" incluye múltiples unidades de monosacárido unidas covalentemente entre sí. Los polisacáridos incluyen almidón, ácido hialurónico, amilosa, amilopectina, dextrano, ciclodextrina y glucógeno.

El término "aminosacárido" se refiere a una molécula de carbohidrato donde uno o más grupos hidroxilo están reemplazados por un grupo amino. Esto incluye los monosacáridos glucosamina y ácido murámico y el polisacárido
15 quitina. Los grupos amino pueden estar acetilados para incluir N-acetil-D-glucosamina y ácido N-acetil-D-murámico.

El término "desoxisacárido" se refiere a una molécula de carbohidrato donde uno o más grupos hidroxilo están reemplazados por hidrógeno. Estos incluyen, por ejemplo, L-ramnosa (6-desoxi-L-manosa), L-fucosa (6-desoxi-L-galactosa) y D-fucosa (rodeosa).

20 El término "tratamiento" se refiere a cualquier tratamiento de una afección patológica en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (i) prevenir que se produzca la afección patológica en un sujeto que puede estar predispuesto a la afección pero que aún no ha sido diagnosticado con la afección y, por consiguiente, el tratamiento constituye un tratamiento profiláctico para la afección; (ii) inhibir la condición patológica, es decir, detener
25 su desarrollo; (iii) aliviar la afección patológica, es decir, causando la regresión de la afección patológica; o (iv) aliviar las afecciones mediadas por la afección patológica.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto de la invención que es suficiente para efectuar el tratamiento, como se ha definido anteriormente, cuando se administra a un mamífero que
30 necesita dicho tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y la afección enfermedad que se trate, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la afección, la forma de administración y similares, que pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" incluye, pero sin limitación, sales bien conocidas por los expertos
35 en la técnica, por ejemplo, mono-sales (por ejemplo, sales de metales alcalinos y de amonio) y poli sales (por ejemplo, di- o tri-sales) de los compuestos de la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de fórmula I son cuando, por ejemplo, un grupo intercambiable, tal como hidrógeno en -OH o -NH- se reemplaza con un catión farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un ión de sodio, potasio o amonio) y puede prepararse convenientemente a partir de un compuesto correspondiente de fórmula I mediante reacción, por ejemplo, con una
40 base adecuada. En los casos en que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales de ácidos o bases estables o no tóxicos, la administración de los compuestos como sales puede ser apropiada. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, y α -glicerofosfato. También pueden formarse sales
45 inorgánicas adecuadas, incluyendo las sales de clorhidrato, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. Se pueden obtener sales farmacéuticamente aceptables usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporcione un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden preparar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

50 El término "enfermedad", "trastorno" o "afección" como se usa en el presente documento, significa cualquier enfermedad u otra afección o enfermedad perjudicial en la que se sabe que la administración terapéutica de un fármaco diurético, o composición farmacéutica, desempeña un papel en el tratamiento de la misma. Dichas enfermedades o afecciones incluyen, sin limitación, hipertensión, edema, insuficiencia renal aguda, insuficiencia
55 cardíaca congestiva, insuficiencia renal crónica, ascitis, presión intraocular o síndrome nefrótico y complicaciones debidas a o exacerbadas por estas afecciones.

El término "diurético", como se usa en el presente documento, significa un fármaco u otra sustancia que tiende a promover la formación y excreción de orina.

El término "hipertensión" como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno caracterizado por presión arterial elevada.

5 "Anticuerpo" se refiere a un miembro de una familia de proteínas glucosiladas llamadas inmunoglobulinas, que se pueden combinar específicamente con un antígeno.

"Antígeno" se refiere a un compuesto que dará lugar a la formación de anticuerpos.

10 El "determinante antigénico" o el "sitio determinante antigénico" se refiere al sitio real del reconocimiento del anticuerpo del antígeno. El término se usa de manera intercambiable con "epítipo".

"Vehículo" se refiere a un material polimérico de alto peso molecular (macromolecular), usualmente una proteína, a la que se puede unir un antígeno o hapteno o conjugarse para facilitar la formación de anticuerpos. Los vehículos
15 pueden incorporar etiquetas en su estructura, si se desea.

"Conjugado" se refiere a un antígeno o hapteno unido químicamente a un vehículo; un conjugado también puede contener otros grupos.

20 "ELISA" se refiere a un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas que emplea un anticuerpo o antígeno unido a una fase sólida y un conjugado enzima-antígeno o enzima-anticuerpo para detectar y cuantificar la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en una muestra. Se encuentra una descripción de la técnica ELISA en el Capítulo 22 de la 4ª Edición de Basic and Clinical Immunology de D. P. Sites et al, publicado por Lange Medical Publications of Los Altos, Calif., en 1982.

25 "EMIT" se refiere a una técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas que usa (1) un hapteno marcado con enzima, (2) un anticuerpo específico para el hapteno, (3) un reactivo de pretratamiento, (4) un sustrato de enzima tamponada, y (5) estándares para detectar la cantidad desconocida en una muestra. Una descripción de la técnica EMIT se encuentra en Enzyme Immunoassay, editado por E. T. Maggio, publicado en 1980 por CRC Press, Inc.,
30 Boca Raton, Fla., particularmente en las pags. 141-150, 234-5, y 242-3.

"Epítipo" se refiere a la porción de una molécula que se reconoce específicamente por un anticuerpo. También se denomina como un determinante.

35 "Fluoroinmunoensayo" se refiere a un ensayo basado en anticuerpos en el que la especie a medir se une, desplaza o compite por la unión con un material marcado con una especie fluorescente en un complejo anticuerpo-ligando. En algunos aspectos de este ensayo, el complejo se separa y la presencia o ausencia de especies fluorescentes proporciona una medida de la cantidad de especies medidas. En otros aspectos, el complejo tiene diferentes propiedades fluorescentes que las especies fluorescentes no complejadas de manera que la formación del complejo
40 puede detectarse sin separación del complejo. Una descripción de las técnicas de fluoroinmunoensayo se encuentra en "A Review of Fluoroimmunoassay and Immunofluorometric Assay", D. S. Smith et al. (1981) Ann. Clin. Biochem. (1981) 18: 253-274.

"Hapteno" se refiere a un compuesto, usualmente de bajo peso molecular, que cuando se une a una molécula más
45 grande puede dar lugar a la formación de anticuerpos.

"Marcador" se refiere a un grupo detectable en una molécula. Entre los marcadores comunes se encuentran especies radioactivas útiles en radioinmunoensayos, especies fluorescentes útiles en fluoroinmunoensayos, y especies enzimáticas útiles en los métodos ELISA y EMIT y similares.

50 "Ligando" se refiere a cualquier molécula que tiene un sitio de combinación de anticuerpo y puede unirse a un receptor.

"Estándar" se refiere a una muestra de una molécula específica presente en una concentración conocida usada para
55 cuantificar la misma molécula específica en una concentración desconocida de una muestra diferente.

Será evidente para un experto en la técnica que ciertos compuestos descritos en la presente descripción pueden existir en formas tautoméricas, estando todas estas formas tautómeras de los compuestos dentro del alcance de la descripción.

- A menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento también incluyen todas las formas estereoquímicas de la estructura; es decir, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales, así como las mezclas enantioméricas y diastereoméricas de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención. A menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir compuestos que difieren solo en presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto para el reemplazo de hidrógeno por un deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido con ^{13}C o ^{14}C , están dentro del alcance de esta invención.
- 10 Un aspecto de la presente descripción se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de fórmula I. En un aspecto de la presente descripción, la composición comprende compuestos de fórmula I en la que R_1 , R_3 , R_5 , R_6 y R_7 son independientemente H, halógeno o alquilo inferior. En otro aspecto de la presente descripción, X_1 está ausente y R_4 es (=O); o X_1 es un enlace y R_4 es hidroxilo. En otro aspecto de la presente descripción, X_1R_4 es $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$. En otro aspecto de la presente descripción, R_2 es $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$, donde R es opcionalmente H o alquilo opcionalmente sustituido donde alquilo puede ser metilo, etilo, butilo, octilo o undecilo. En otro aspecto de la presente descripción, R_2 es $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}$, donde R es opcionalmente H o alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos.
- 15
- 20 En un aspecto de la presente descripción, X_2 es -O- y R_8 es un sacárido opcionalmente sustituido, opcionalmente un monosacárido seleccionado de una aldohexopiranososa, aldopentopiranososa, aldopentofuranosa o cetosa. En otros aspectos de la descripción, R_8 es D-galactosa, D-mannosa, D-ribosa, D-fucosa o L-ramnosa. En un aspecto preferido de la presente descripción, R_8 es D-glucosa. En un aspecto de la presente descripción, el compuesto de fórmula I es ácido xanturénico 8-O- β -D-glucósido.
- 25
- En otro aspecto de la presente descripción, X_2 es -O- y R_8 es $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$ o $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHR}$, donde R es opcionalmente H o alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos.
- De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, la composición farmacéutica comprende un compuesto de fórmula I, donde X_2R_8 es un acilo, fosfato, ácido fosfónico, fosfonato de alquilo o un grupo sulfato. En un aspecto de la presente descripción, el compuesto es 8-O-sulfato de ácido xanturénico.
- 30
- La presente descripción proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la fórmula I en combinación con uno o más compuestos diuréticos o agentes cardiovasculares adicionales; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35
- Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son útiles para el tratamiento o prevención de hipertensión, edema, insuficiencia renal aguda, insuficiencia cardiaca congestiva, insuficiencia renal crónica, ascitis, presión intraocular o síndrome nefrótico y complicaciones debidas a o exacerbadas por estas afecciones.
- 40
- Dependiendo de la afección particular a tratar o prevenir, se pueden administrar agentes terapéuticos adicionales, que normalmente se administran para tratar o prevenir esa afección, junto con los compuestos de esta invención. En un aspecto de la presente descripción, en el tratamiento de la hipertensión, se pueden combinar uno o más compuestos diuréticos o agentes cardiovasculares adicionales con los compuestos de esta invención para tratar la hipertensión. El agente diurético adicional se selecciona del grupo que consiste en un diurético de asa, diurético de tiazida, diurético ahorrador de potasio, inhibidor de anhidrasa carbónica y diurético osmótico. El agente cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antagonista del receptor de angiotensina II, bloqueador beta-adrenérgico, bloqueador de los canales de calcio, fármaco que altera el colesterol, agente reductor de triglicéridos, agente reductor de la proteína c-reactiva, agente reductor de la homocisteína, aspirina y sus derivados, agente ionotrópico, agente antiarrítmico y diluyente de la sangre (anticoagulante). Estos agentes incluyen, sin limitación, furosemida, bumetanida, torsemida, ácido etacrínico, clorotiazida, clorhidrotiazida, espironolactona, amilorida, triamtereno, acetazolamida, metazolamida, diclorfenamida, hidroflumetiazida, meticloziazida, indapamida, metolazona, polítiazida, clortalidona, dorzolamida, brinzolamida, glicerol, manosa, urea, lisinopril, moexipril, enalapril, irbesartán, valsartán, losartán, nadolol, propranolol, atenolol, 55 timolol y bisoprolol.
- Los compuestos de fórmula I se pueden formular como composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped mamífero, tal como un paciente humano, en una diversidad de formas adaptadas a una vía de administración seleccionada, es decir, por vía oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea. Por lo tanto, los

presentes compuestos se pueden administrar por vía sistémica, por ejemplo, por vía oral, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina dura o blanda, pueden comprimirse en comprimidas, o pueden incorporarse directamente con el alimento a la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Dichas composiciones y preparaciones deberían contener al menos un 0,1 % de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60 % del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es de tal forma que se obtenga un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas, y similares, también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y puede añadirse un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente saporífero tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Pueden estar presentes diversos otros materiales como revestimientos o modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden revestirse con gelatina, cera, goma laca o azúcar, y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metilo y propilparabenos como conservantes, un colorante y saporífero, tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado para preparar cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo también se puede administrar por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo que están adaptados para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infundibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede producirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y las técnicas de liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones filtradas previamente estériles. Para la administración tópica, los presentes compuestos se pueden aplicar en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente será deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, junto con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

Los vehículos sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los vehículos líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en los que los presentes compuestos se pueden disolver o dispersar a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Se pueden añadir adyuvantes tales como fragancias y agentes

antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes se pueden aplicar a partir de almohadillas absorbentes, pueden usarse para impregnar vendas y otros apósitos, o se pulverizan sobre el área afectada usando pulverizadores de tipo bomba o aerosol.

- 5 Los espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados también se pueden emplear con vehículos líquidos para formar pastas extensibles, geles, ungüentos, jabones y similares, para su aplicación directa a la piel del usuario.

- 10 Los ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que se pueden usar para administrar los compuestos de la presente descripción a la piel se describen en Jacquet et al. (Patente de Estados Unidos N.º 4.608.392), Geria (Patente de Estados Unidos N.º 4.992.478), Smith et al. (Patente de Estados Unidos N.º 4.559.157) y Wortzman (Patente de Estados Unidos N.º 4.820.508).

- 15 Las presentes composiciones también pueden prepararse en formas adecuadas para su absorción a través de las membranas mucosas de la nariz y la garganta o los tejidos bronquiales, y pueden adoptar convenientemente la forma de pulverizaciones o inhalantes en polvo o líquido, grageas, pinturas para garganta, etc. Para un medicamento de los ojos u oídos, las preparaciones pueden presentarse en cápsulas individuales, en forma líquida o semisólida, o pueden usarse en forma de gotas, etc. Las aplicaciones tópicas pueden formularse en bases hidrófobas o hidrófilas como ungüentos, cremas, lociones, pinturas, polvos, etc.

- 20 Para la medicina veterinaria, la composición puede formularse, por ejemplo, como una preparación intramamaria en bases de acción prolongada o de liberación rápida.

- 25 Las dosificaciones útiles de los compuestos de la invención se pueden determinar comparando su actividad *in vitro*, y la actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones, y otros animales, a seres humanos son conocidos en la técnica; por ejemplo, véase la Pat. de Estados Unidos N.º 4.938.949.

- 30 Generalmente, la concentración del compuesto o compuestos de la presente descripción en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0,1-25 % en peso, opcionalmente de aproximadamente el 0,5-10 % en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida, tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5 % en peso, opcionalmente aproximadamente el 0,5-2,5 % en peso.

- 35 Las composiciones por dosificación unitaria, ya sean líquidas o sólidas, pueden contener del 0,1 % al 99 % de material activo (compuesto I o sales del mismo), siendo el intervalo preferido de aproximadamente el 10-60 %. La composición generalmente contendrá de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 1.500 mg en peso del principio activo basándose en el peso total de la composición; sin embargo, en general, es preferible emplear una cantidad de dosificación en el intervalo de aproximadamente 250 mg a 1.000 mg. En la administración parenteral, la dosificación unitaria suele ser el compuesto puro en una solución acuosa estéril ligeramente acidificada o en forma de un polvo soluble destinado a solución. Se pueden administrar dosis únicas para inyección, infusión o ingestión, es decir, 1-3 veces al día, para producir niveles de aproximadamente 0,5-50 mg/kg, para adultos.

Producción de anticuerpos

- 45 La presente descripción incluye además métodos para la producción de anticuerpos capaces de reconocer específicamente el ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido. Dichos anticuerpos pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Dichos anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, en la detección de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido en una muestra biológica, o, como alternativa, como un método para la inhibición de la actividad anormal de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido. Por lo tanto, dichos anticuerpos se pueden utilizar como parte de los métodos de tratamiento de la enfermedad, y/o se pueden usar como parte de técnicas de diagnóstico, por lo que los pacientes pueden someterse a una prueba para determinar los niveles anormales de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido.

- 55 Para la producción de anticuerpos, se pueden generar conjugados de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido con, por ejemplo, una proteína portadora tal como KLH u ovoalbúmina, por activación del grupo carboxilo de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido carboxilo con, por ejemplo, una carbodiimida soluble en agua, tal como EDC, para formar un inmunógeno bioconjugado de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido. Se pueden inmunizar diversos

animales huésped mediante inyección con el inmunógeno bioconjugado de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido en, por ejemplo, un protocolo adyuvante. Dichos animales huésped incluyen conejos, ratones, ratas, cabras y pollos, y similares. Se pueden usar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, pero sin limitación, geles minerales de Freund (completos e incompletos) tales como
 5 hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tal como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tal como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de
 10 animales inmunizados con un antígeno, tal como el inmunógeno bioconjugado de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido. Para la producción de anticuerpos policlonales, los animales huésped tales como los descritos anteriormente, se pueden inmunizar mediante inyección con inmunógeno bioconjugado de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido complementado con adyuvantes como también se ha descrito anteriormente.

15 Los métodos para generar anticuerpos policlonales para antígenos usando animales huésped son generalmente conocidos en la técnica. En una preparación típica, uno o más de los inmunógenos bioconjugados de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido se introduce en un huésped mamífero o aviar. Los huéspedes adecuados incluyen, por ejemplo, monos, ganado, conejos, ratas, ratones y similares. Esto se logra usualmente por inyección subcutánea como una solución en solución salina que se ha emulsionado con, por ejemplo, adyuvante completo de Freund. Los
 20 títulos de anticuerpos en animales pueden seguirse de ELISA. Después de varias semanas, un refuerzo de inmunógeno bioconjugado de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido en, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund, puede servir para aumentar el título de anticuerpo. Los anticuerpos se recogen por sangrado del animal después de aproximadamente un mes. La sangre completa se deja coagular a 25 grados C durante varias horas. Se añade una solución acuosa de sulfato de amonio para alcanzar un 40 % en peso de solución acuosa, y la fracción
 25 de IgG precipita. El precipitado se recoge por centrifugación y se suspende de nuevo en solución salina o tampón a la concentración deseada.

La fracción de anticuerpo purificada puede modificarse adicionalmente para su uso en sistemas de ensayo de diagnóstico. Dicha modificación puede incluir el enlace con enzimas tales como lipozima, lactoperoxidasa, fosfatasa
 30 alcalina y otras para su uso en ensayos ELISA. El anticuerpo puede modificarse con restos fluorescentes. De manera óptima, esta fluorescencia se puede extinguir o potenciar después de la unión del anticuerpo y el antígeno. Estas técnicas para ensayar el alcance de la interacción anticuerpo-antígeno se conocen en la técnica. El ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido, conjugados de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido y anticuerpos de esta descripción también son útiles en la detección y el diagnóstico de diversos trastornos de desequilibrio de sodio,
 35 particularmente al proporcionar materiales de alta pureza útiles para soluciones de calibración para técnicas de ensayo, tales como ELISA o EMIT.

Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un antígeno particular, pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante
 40 líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma de Köhler y Milstein, Nature, 256: 495-7 (1975); y la Patente de Estados Unidos N.º 4.376.110, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor et al., Immunology Today, 4: 72 (1983); Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026-30 (1983)), y la técnica EBV-hibridoma (Cole et al., en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., Nueva York, págs. 77-96 (1985)). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulinas incluyendo
 45 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. El hibridoma que produce el mAb de esta descripción se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. La producción de títulos elevados de mAbs *in vivo* hace que este sea el método de producción actualmente preferido.

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al.,
 50 Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855 (1984); Takeda et al., Nature, 314: 452-54 (1985)) mediante corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

55 Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de Estados Unidos N.º 4.946.778; Bird, Science 242: 423-26 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83 (1988); y Ward et al., Nature, 334: 544-46 (1989)) pueden adaptarse para producir los anticuerpos monocatenarios de genes. Los anticuerpos monocatenarios se forman típicamente uniendo los fragmentos de cadena pesada y

ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido monocatenario.

- Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero sin limitación: fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por la digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden generar al reducir los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión Fab (Huse et al., Science, 246: 1275-81 (1989)) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.
- 10 Las enzimas para su uso en los reactivos, estándares o kits de diagnóstico pueden variar ampliamente, dependiendo de la facilidad de conjugación, velocidad de renovación, y el fluido fisiológico en el que se va a medir lo desconocido (analito). Las enzimas representativas de elección incluyen hidrolisadas, nucleasas, amidasas, esterases y similares que se encuentran en la Patente de Estados Unidos N.º 3.817.837.
- 15 Los métodos y aparatos para marcar un anticuerpo como se describe en el presente documento para su uso en un reactivo, estándar o kit de diagnóstico se encuentran en la Patente de Estados Unidos N.º 4.366.241.

Diagnóstico

- 20 La presente descripción incluye además la cuantificación de ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido en fluidos humanos (sangre completa, orina, csf, suero, plasma, ocular, heces, sudor) que pueden usarse para correlacionarse con un trastorno de desequilibrio de sodio. Dichos trastornos pueden incluir hipertensión (baja renina, baja angiotensina), insuficiencia cardiaca congestiva (edema), síndrome nefrótico, cirrosis del hígado, edema premenstrual, edema cíclico y shock cardiogénico. Otras afecciones clínicas en las que la cuantificación del ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido puede demostrar ser útil incluyen ajustes postoperatorios, y ajustes de aplicación, donde al paciente se le administran demasiados líquidos; y ahorro de potasio junto con la administración de furosemida. La cuantificación de ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido también puede ser útil en el "síndrome de escape" donde un tumor aumenta inapropiadamente, afectando a la aldosterona; a continuación, la excreción de sodio disminuye causando un aumento de la retención de líquidos en dos litros en el sistema cardiovascular. En este punto, el "escape" se produce causando la pérdida de fluidos y sodio y, por lo tanto, mantener un estado sobrecargado de dos litros. Se propone que el estado fluido sobrecargado provoca un aumento en el ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido, que a su vez causa un "escape" al estimular la excreción de sodio y la pérdida de líquido concomitante.
- 30
- 35 Se pueden emplear una diversidad de métodos para diagnosticar enfermedades asociadas con un exceso o una deficiencia de ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido.

Los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico preempaquetados que comprenden al menos un reactivo de anticuerpo específico descrito en el presente documento, que pueden usarse de forma conveniente, por ejemplo, en entornos clínicos, para diagnosticar pacientes que presentan síntomas de enfermedad o en riesgo de desarrollar la enfermedad.

40

Se puede utilizar cualquier muestra o tejido biológico humano en los diagnósticos descritos a continuación. Por ejemplo, se pueden utilizar sangre completa, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, suero, plasma, fluido ocular, heces o sudor.

45

Los métodos de diagnóstico para la detección de ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido en muestras biológicas pueden implicar, por ejemplo, inmunoensayos tales como inmunoensayos enzimáticos heterogéneos que incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) en fase sólida; e inmunoensayos enzimáticos homogéneos en fase de solución que incluyen la técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT). El ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido se puede medir mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar (CE), o electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS) con pretratamiento opcional de, por ejemplo, un muestra de orina por extracción en fase sólida. Además, se pueden desarrollar técnicas de resonancia de plasmón superficial (SPR) en las que se usa un sistema de biosensor óptico basado en chip para investigar la naturaleza funcional del ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido que se une a moléculas de membrana diana en las que la fuente de ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido es de una mezcla impura, tal como medios de cultivo en suero, orina y células. Las técnicas de SPR serán útiles para encontrar y caracterizar los receptores de membrana para el ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido en diferentes tipos de células.

50

55

Los inmunoensayos para ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido comprenden típicamente incubar una muestra biológica, tal como un fluido biológico, un extracto de tejido, células recién cosechadas, o células que se han incubado en cultivo de tejidos, en presencia de un anticuerpo marcado de forma detectable capaz de identificar el ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido, y detectar el anticuerpo unido por cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en la técnica.

La muestra biológica puede ponerse en contacto e inmovilizarse sobre un soporte o vehículo en fase sólida tal como nitrocelulosa u otro soporte sólido que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. Después, el soporte puede lavarse con tampones adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo específico del gen marcado de forma detectable. El soporte en fase sólida puede lavarse entonces con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de etiqueta unida sobre soporte sólido puede detectarse entonces por medios convencionales.

Los términos "soporte o vehículo en fase sólida" pretenden incluir cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o a un anticuerpo. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble para los propósitos de la presente descripción. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Por lo tanto, la configuración de soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser plana, tal como una lámina, tira reactiva, etc. Los soportes preferidos incluyen perlas de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpo o antígeno, o podrán determinar los mismos mediante el uso de la experimentación de rutina.

En la práctica, las placas de microtitulación se utilizan convenientemente para muchos inmunoensayos. El componente anclado puede inmovilizarse mediante uniones no covalentes o covalentes. La unión no covalente se puede realizar simplemente revistiendo la superficie sólida con una solución bioconjugada de ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido y secado. Como alternativa, se puede usar un anticuerpo inmovilizado, opcionalmente un anticuerpo monoclonal, específico para el ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido para anclar la proteína a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse de antemano y almacenarse. Para realizar el ensayo, el componente no inmovilizado se añade a la superficie revestida que contiene el componente anclado. Después de que se completa la reacción, los componentes que no han reaccionado se eliminan (por ejemplo, mediante lavado) en condiciones tales que cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado en la superficie sólida. La detección de complejos anclados en la superficie sólida se puede lograr de varias maneras. Cuando el componente previamente no inmovilizado está previamente marcado, la detección de la etiqueta inmovilizada en la superficie indica que se formaron los complejos. Cuando el componente previamente no inmovilizado no está etiquetado previamente, se puede usar una etiqueta indirecta para detectar complejos anclados sobre la superficie; por ejemplo, usando un anticuerpo marcado específico para el componente no inmovilizado previamente (el anticuerpo, a su vez, puede marcarse directamente o marcarse indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado).

Por ejemplo, los ensayos de inhibición competitiva se usan a menudo para medir analitos pequeños, tales como ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido, ya que los ensayos de inhibición competitiva solo requieren la unión de un anticuerpo en lugar de dos como se usa en formatos estándar de ELISA. Debido a la probabilidad de que se produzca un impedimento estérico cuando dos anticuerpos intentan unirse a una molécula pequeña al mismo tiempo, un formato de ensayo tipo sándwich puede no ser factible, por lo tanto, puede ser preferible un ensayo de inhibición competitiva. En un ensayo de inhibición competitiva secuencial, la muestra y el analito conjugado se añaden en etapas como un ensayo tipo sándwich, mientras que en un ensayo de inhibición competitiva clásico, estos reactivos se incuban juntos al mismo tiempo.

En un formato de ensayo de inhibición competitiva secuencial, se recubre un anticuerpo monoclonal (MAb) sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos. Cuando se añade la muestra, el MAb captura el analito libre de la muestra. En la siguiente etapa, se añade una cantidad conocida de analito marcado con biotina o HRP. El analito marcado también tratará de unirse al MAb adsorbido en la placa, sin embargo, se inhibe la unión del analito marcado al MAb por la presencia del analito previamente unido de la muestra. Esto significa que el analito marcado no estará unido por el monoclonal en la placa si el monoclonal ya ha unido el analito no etiquetado de la muestra. La cantidad de analito no marcado en la muestra es inversamente proporcional a la señal generada por el analito marcado. Cuanto menor es la señal, más analito sin etiqueta hay en la muestra. Se puede construir una curva estándar usando diluciones en serie de un estándar de analito no etiquetado. Los valores de muestra posteriores se pueden leer entonces a partir de la curva estándar como se hace en los formatos de ELISA en sándwich.

El formato de ensayo de inhibición competitiva clásico requiere la adición simultánea de analito marcado (analito conjugado) y no marcado (de la muestra). Tanto el analito marcado como el no etiquetado compiten simultáneamente por el sitio de unión en el anticuerpo de captura monoclonal en la placa. Al igual que el formato de inhibición competitiva secuencial, la señal coloreada es inversamente proporcional a la concentración del analito diana no marcado en la muestra.

La detección del analito marcado puede hacerse usando un sustrato de peroxidasa tal como TMB, que puede leerse en un lector de placas de microtitulación. Por ejemplo, con una curva estándar (1 blanco y 7 patrones) y 3 controles, un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos puede analizar 21 muestras por triplicado y 37 muestras por duplicado.

Como otro aspecto de la presente descripción, se pueden usar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos útiles en la presente descripción para detectar cuantitativa o cualitativamente la presencia de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado con fluorescencia (véase a continuación) acoplado con detección microscópica de luz, citometría de flujo o fluorimetría.

Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) útiles en la presente descripción pueden emplearse, adicionalmente, histológicamente, como en inmunofluorescencia o microscopía de inmunoelectrones, para la detección *in situ* de ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido. La detección *in situ* puede realizarse eliminando un espécimen histológico de un paciente, y aplicando al mismo un anticuerpo marcado de la presente descripción. El anticuerpo (o fragmento) se aplica opcionalmente al recubrir el anticuerpo (o fragmento) marcado en una muestra biológica. A través del uso de tal procedimiento, es posible determinar no solo la presencia del ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido, sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente descripción, los expertos en la materia percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia diversidad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) puede modificarse para lograr tal detección *in situ*.

Los expertos en la técnica podrán determinar las condiciones de ensayo ópticas y operativas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

Una de las formas en que el anticuerpo específico del péptido del gen puede marcarse de forma detectable es unirlo a una enzima y usarlo en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, *Ric Clin Lab*, 8: 289-98 (1978) ["The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", *Diagnostic Horizons* 2: 1-7, 1978, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.]; Voller et al., *J. Clin. Pathol.*, 31: 507-20 (1978); Butler, *Meth. Enzymol.*, 73: 482-523 (1981); Maggio (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1980); Ishikawa et al., (eds.) *Enzyme Immunoassay*, Igaku-Shoin, Tokio (1981)). La enzima que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, opcionalmente un sustrato cromogénico, de tal manera que se produzca un resto químico que pueda detectarse, por ejemplo, por espectrofotometría, medios fluorimétricos o por medios visuales. Las enzimas que se pueden usar para marcar de forma detectable el anticuerpo incluyen, pero sin limitación, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección se puede lograr mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también se puede realizar por comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de forma similar.

La detección también puede realizarse usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiactivamente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, es posible detectar el ácido xanturénico-8-O-β-D-glucósido a través del uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o por autorradiografía.

También es posible marcar el anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado por fluorescencia se expone a la luz de la longitud de onda adecuada, su presencia puede detectarse entonces debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcado fluorescente más comúnmente utilizados están isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo también puede marcarse de forma detectable usando metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu , u otros de la serie de lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metales como ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) o ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA).

5 El anticuerpo también se puede marcar de manera detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado con quimioluminiscencia se determina entonces detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos marcados quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

10

Asimismo, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo de la presente descripción. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para el etiquetado son luciferina, luciferasa y aequorina.

15

Se pueden emplear técnicas de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT) debido al pequeño tamaño del ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido. Se podrían usar diversos métodos de EMIT en ensayos tanto cualitativos como cuantitativos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Dias, et al. (véase Dias et al., "The EMIT Cyclosporine Assay: development of application protocols for the Boehringer Mannheim Hitachi 911 and 917 analyzers" Clin. Biochem. 1997 Mar; 30(2): 155-62). Las ventajas de EMIT en el entorno clínico incluyen (1) preparación de muestra mínima o nula, (2) tamaño de muestra pequeño, (3) excelente correlación con otros métodos tales como HPLC y RIA, (4) tiempo rápido ya que no hay necesidad de separación de etiquetas de enzimas libres y unidas (menos de un minuto), facilidad de adaptación a la mayoría de los analizadores de química general.

25

La resonancia de plasmón superficial (SPR) también puede emplearse para detectar el ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido como un agente de interacción de la fase de solución con el anticuerpo específico de ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido inmovilizado. Las técnicas de McDonnell y de Rich et al. pueden emplearse para el desarrollo de métodos SPR (McDonnell, J.M., "Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. Current Opinion in Chemical Biology, 2001. 5(5): pág. 572-577; Rich, R.L., et al., "High-resolution and high-throughput protocols for measuring drug/human serum albumin interactions using BIACORE" Analytical Biochemistry, 2001. 296(2): pág. 197-207). Pueden construirse diversas celdas de circulación y colocarse en línea con instrumentos de biodetección SPR comercialmente disponibles, tales como aquellos de la marca comercial Biocore. En general, el anticuerpo específico puede inmovilizarse en un portaobjetos de vidrio recubierto de oro activo de SPR que forma una pared de una celda de flujo; y el analito ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido en una solución tampón acuosa se inyecta para fluir a través de la celda de flujo. Cuando la luz (visible o infrarrojo cercano) se ilumina a través del portaobjetos de vidrio y sobre la superficie dorada en ángulos y longitudes de onda cerca de la condición denominada "resonancia de plasmón superficial", la reflectividad óptica del oro cambia muy sensiblemente con la presencia de biomoléculas en la superficie de oro o en una fina capa sobre el oro. El grado de unión entre el agente de interacción en fase de solución y el anticuerpo inmovilizado se observa y se cuantifica fácilmente controlando este cambio de reflectividad.

40

Se puede emplear la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para detectar el ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido en la orina. Por ejemplo, se puede emplear la extracción en fase sólida de la muestra de orina en un cartucho C_{18} y el paso posterior sobre una columna de resina de intercambio catiónico. La detección de la muestra puede ser mediante técnicas UV, fluorescencia o dispersión de la luz (véase, por ejemplo, Marsilio et al., Clinical Chemistry. 1998; 44:1685-1691]. También puede emplearse electroforesis capilar (CE), o electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS) con pretratamiento opcional de muestra de orina por extracción en fase sólida para cuantificar el ácido xanturénico-8-O- β -D-glucósido en muestras biológicas. (He et al., J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999 Apr 30; 727(1-2): 43-52. Theodoridis et al., J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000 Aug 4; 745(1): 49-82).

45

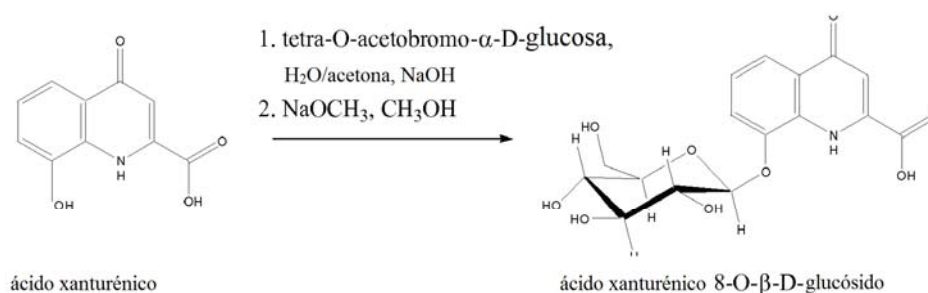
50

La invención se describirá ahora con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Cualquier ejemplo que no se incluya en las reivindicaciones se proporciona como ejemplos ilustrativos.

55

Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de ácido xanturénico 8-O- β -D-glucósido.

Esquema 1. Síntesis de ácido xanturénico 8-O- β -D-glucósido.

Etapa 1: Síntesis de ácido xanturénico 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetil 8-O- β -D-glucósido. (Véase, por ejemplo, Real, *et al.*, J. Biol. Chem., 1990, 265(13), 7407-7412)

5

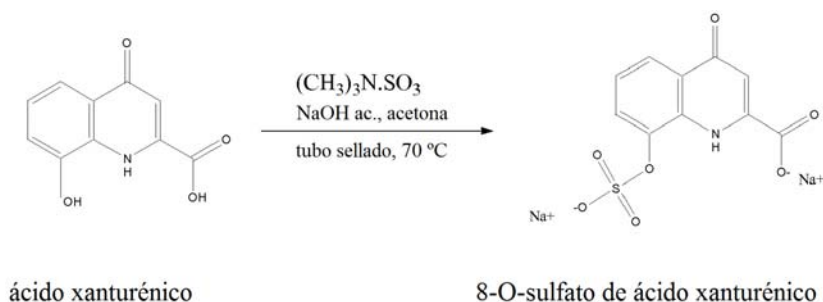
Se obtuvo en el mercado ácido xanturénico en Aldrich, Milwaukee, WI. Se enfrió ácido xanturénico (930 mg, 4,53 mmol) en NaOH acuoso 1 M (10 ml) a 10 °C. Se añadió gota a gota bromuro de 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetil 8- α -D-glucopiranosilo (2,03 g, 4,94 mmol) en acetona (16 ml) durante 10 minutos. La solución se dejó calentar a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió lentamente más cantidad de NaOH 1 M acuoso (3 ml) durante 30 minutos y la solución se agitó durante 30 minutos. La mezcla se extrajo con agua y éter dietílico. La porción acuosa se acidificó a pH 3,5 y se extrajo adicionalmente con 1:1 tetrahidrofurano/acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso saturado y se secaron sobre sulfato de magnesio. Tras la filtración, el intermedio de ácido xanturénico tetra-O-acetil 8- β -D-glucósido en bruto se concentró al vacío para dar aproximadamente 1 gramo de un residuo en bruto. El residuo se trituró con 4:1 dimetilsulfóxido/agua (28 ml), se filtró y se secó para devolver 215 mg de ácido xanturénico tetra-O-acetil 8- β -D-glucósido en forma de un intermedio sólido de color blanquecino. Las aguas madre se purificaron adicionalmente por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para recuperar 60 mg más del intermedio (C18, agua/acetoneitrilo con ácido trifluoroacético al 0,2 %; etapa de elución) para un rendimiento combinado del 11,5 %. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,97 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 4,05-4,30 (m, 3H), 5,07 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 5,23 (dd, *J* = 9,6, 7,8 Hz, 1 H), 5,44 (t, *J* = 9,60 Hz, 1H), 5,67 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 6,65 (s, 1H), 7,37 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,48 (dd, *J* = 7,5, 1,2 Hz, 1 H), 7,81 (dd, *J* = 8,1, 1,2 Hz, 1 H), 9,44 (s a, 1H). ESI-MS *m/z* 536,44 (M+H⁺).

Etapa 2: Ácido xanturénico 8-O- β -D-glucósido.

Se añadió ácido xanturénico 2,3,4,6-tetra-O-acetil 8-O- β -D-glucósido de la etapa 1 (190 mg, 0,35 mmol) a una solución de metóxido sódico al 95 % (40 mg, 0,7 mmol) en metanol (5 ml). La mezcla se agitó durante una hora. La mezcla se ajustó a pH 3,5 con HCl acuoso 1 M. La suspensión se diluyó con 20 ml de éter dietílico y se filtró. La torta de filtró se lavó con 1:1 de metanol/éter dietílico y se secó al vacío para dar 118 mg de ácido xanturénico 8-O- β -D-glucósido con un rendimiento del 82 %. FTIR (puro) 3000-3700 (s a), 3365, 2934, 1626, 1602 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,10-3,70 (m, 6 H y H₂O), 4,87 (d, *J* = 7,5 Hz, 1 H), 4,95 (m, 1 H), 5,16 (m, 1 H), 5,33 (m, 1 H), 5,81 (m, 1 H), 6,47 (s, 1H), 7,21 (t, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 8,07 (d, *J* = 7,2 Hz, 1 H), 8,24 (dd, *J* = 8,4, 1,0 Hz, 1 H), 8,47 (s, <1H, intercambio parcial), 10,47 (s a, 1 H). ¹³C RMN (75,4 MHz, DMSO-*d*₆) δ 60,74, 69,62, 73,49, 76,56, 77,66, 103,73, 107,73, 119,65, 122,72, 126,79, 132,00, 146,24, 147,05, 162,85, 166,88, 178,33. Espectros de masas de ionización por electronebulización (ESI-MS) *m/z* 368,31 (M+H⁺).

35

Ejemplo 2. Síntesis de 8-O-sulfato de ácido xanturénico.



Esquema 2: Síntesis de 8-O-sulfato de ácido xanturénico.

A una solución de ácido xanturénico (300 mg, 1,46 mmol) en 2,9 ml de NaOH 1 N y 2,1 ml de dH₂O (agua desionizada) se le añadieron trimetilamina de trióxido de azufre (407 mg, 2,92 mmol) y 5 ml de acetona a temperatura ambiente. El reactor (tubo de 20 x 125 mm) se selló en una atmósfera de nitrógeno y se agitó a 70 °C durante 16 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se lavó con acetona, acetonitrilo, diclorometano, acetato de etilo y después éter dietílico consecutivamente. El sólido recogido se puso al vacío durante una noche. El sólido se disolvió en 3 ml de dH₂O, se cargó en una columna Sephadex SP-C25 (4 x 11 cm, 40-125 μ) y se eluyó con dH₂O para proporcionar la sal sódica del compuesto del título (474 mg, 1,44 mmol) con un rendimiento del 98,8 % en forma de un polvo de color pardo brillante con p.f. >250 °C (dec.). ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 6,67 (s a, 1 H), 7,28 (dd a, J = 8,1, 7,8 Hz, 1 H), 7,56 (d a, J = 7,8 Hz, 1 H), 7,79 (d a, J = 8,1 Hz, 1 H). ¹³C RMN (75 MHz, D₂O) δ 108,5, 122,1, 124,9 125,6, 126,1, 132,6 140,7, 144,7, 166,3, 181,0. IR (sólido, cm⁻¹) 2835, 2545, 1687, 1601, 1372, 1372, 1254.

15 Ejemplo 3. Aislamiento de 8-O-sulfato de ácido xanturénico y ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido.

Se recogieron muestras de orina de pacientes urémicos humanos durante periodos de 24 horas. El volumen de recolección típico era de 2-3 litros por paciente. Las muestras individuales se liofilizaron a sequedad y se reconstituyeron con 100 ml de agua desionizada. Las muestras reconstituidas (volumen de carga de 25 ml) se fraccionaron por tamaño usando cromatografía en columna Sephadex G-25 de filtración en gel con elución por acetato de amonio 10 mM, pH 6,8 a 10 °C y controlada por UV a 285 nm y conductividad. Posteriormente se cribaron fracciones de 10 ml de elución (pico posterior a la sal) con actividad UV y osmolalidad <100 mOsm para determinar su actividad biológica con el ensayo de piel de rana de Bricker et al. (Kidney International Vol 44 (1993) Nov; 44 (5): 937-47). Las fracciones con actividad (10 ml cada una) se concentraron por liofilización y se reconstituyeron con 1 ml de agua desionizada.

Las fracciones de Sephadex G-25 reconstituidas con actividad biológica se fraccionaron adicionalmente con cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC; volumen de carga de 1 ml) sobre una columna de HPLC semipreparativa de octadecilsililo (Phenomenex SphereClone ODS2, 35 °C) a 4 ml/minuto con un gradiente de acetato de piridinio 0,1 M:metanol; metanol al 0-40 %/11 minutos con la recolección de fracciones de 2 ml. La elución se controló mediante fluorescencia (excitación 332 nm, emisión a 430 nm) y UV (338 nm). Las fracciones con un tiempo de retención (TR) de 12,4 minutos se combinaron de múltiples ejecuciones y se concentraron aproximadamente 10 veces. Las fracciones se volvieron a aplicar al sistema de HPLC anterior con un volumen de inyección de 1 ml ejecutado en modo isocrático con metanol 0,1 M al 92 %/8 % a 4 ml/minuto. La fluorescencia se controló con excitación 332 nm, emisión 430 nm. La UV se controló a 338 nm. Estos máximos son para el ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido. El eluato entre 10-13 minutos se recogió en fracciones de 12 segundos (0,8 ml). Las fracciones que eluyeron entre 11,2-11,6 minutos de TR contenían ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido; las fracciones que eluyeron entre 12,0-12,5 minutos contenían 8-O-sulfato de ácido xanturénico. Las fracciones que contenían el ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido o el 8-O-sulfato de ácido xanturénico se agruparon por separado y se concentraron en un Savant Speed-Vac Plus (SC210A) con calor medio. Los grupos se volvieron a someter a HPLC isocrática en una escala analítica usando una columna de HPLC C-18 de fase inversa: Phenomenex P/N0 00G-4375-E0, SYNERGI 4u Hydro-RP 80A 250 x 4,6 mm, 4 micrómetros. La purificación por HPLC se realizó en modo isocrático a 1 ml/minuto con metanol al 8 % y acetato de piridinio 0,1 M al 0,1 % a 35 °C. La elución se controló mediante absorbancia UV a 338 nm y detección por fluorescencia con excitación 332 nm, emisión 430 nm. Las fracciones que contenían ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido tenían un TR = 10,2-10,6 minutos. Las fracciones de realizaciones de 8-O-sulfato de ácido xanturénico separadas tenían un TR = 11 -11,5 minutos. Las fracciones se combinaron y se concentraron en una Speed-Vac, con adición ocasional de piridina para aumentar el pH. El ácido

xanturénico 8-O-β-D-glucósido purificado se volvió a aplicar a la misma columna analítica y se eluyó con metanol al 20 % en agua para eliminar el acetato de piridio. El ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido formó cristales al concentrarse por esta técnica. Para el ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido aislado (C₁₆H₁₇NO₉): ESI-MS (m/z) 367,09, 368,094 (M+H) y 229 (M -glucosa + Na⁺); ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ 3,58 (dd, J = 9, 9,5 Hz, 1 H), 3,65 (dd, J = 9, 9,5 Hz, 1 H), 3,67 (m, 1 H), 3,80 (dd, 1H), 3,81 (dd, J = 8, 9,5 Hz), 3,95 (dd, 1H), 5,24 (d, J = 8 Hz, 1H), 6,93 (s, 1H), 7,47 (t, J = 8 Hz, 1 H), 7,59 (dd, J = 8, 2 Hz, 1H), 7,90 (dd, J = 8, 2 Hz) ppm; ¹³C RMN (126 MHz, D₂O/CD₃OD) δ 60,8, 69,7, 72,9, 75,7, 76,7, 101,2, 108,1, 117,9, 118,2, 124,5, 125,2, 130,6, 143,9, 145,5, 165,9, 180,3 ppm. Para el 8-O-sulfato de ácido xanturénico aislado (C₁₀H₇NO₇S): ESI-MS (m/z) 284,994, 285,998 (M+H⁺).

10 Ejemplo 4. Respuesta natriurética al ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético (2 μg i.v.) en una rata Sprague Dawley normal.

Se anestesió una rata Sprague Dawley hembra (250 g) ligeramente con éter y se colocó un catéter de vena de la cola usando un tubo PE10. Además, se insertó un catéter de uretra usando gel de KY y lidocaína al 2 % como lubricante. La rata se contuvo en un tubo de plexiglás modificado para que la orina se pudiera recoger en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. La infusión salina comenzó en el momento cero a 0,02 ml/min durante la duración del ensayo. Se usó el mismo catéter i.v. para inyectar el compuesto de ensayo. El ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético, 2 μg, se inyectó en el momento indicado en un volumen de 1 ml en una solución salina durante el transcurso de 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm para separar cualquier RBC de la orina. Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en la orina se midieron con respectivos electrodos selectivos de iones. Las tasas de excreción de Na⁺ y K⁺ se calcularon por: (volumen de orina/tiempo de período de recolección) x (concentración de iones en orina). Los resultados se muestran en las Figuras 1-4. El ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético a 2 μg i.v. causó una respuesta natriurética sostenida en una rata normal. La excreción de Na⁺ se debió más al aumento de la concentración en orina en Na⁺ que al aumento del volumen de orina como se muestra en las Figuras 3 y 4. Dado un volumen extracelular de 50 ml en una rata de 250 g, la concentración del compuesto de ensayo fue de 10⁻⁶ M, una posible dosis mínima. En un experimento similar; el ácido xanturénico sintético no derivatizado a 2 μg i.v. no aumentó la excreción de Na⁺. Sin embargo, la administración posterior de ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético causó natriuresis.

30 Ejemplo 5. Respuesta natriurética al ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético (10 μg i.v.) en una rata Sprague Dawley normal.

Se anestesió una rata Sprague Dawley hembra (250 g) ligeramente con éter y se colocó un catéter de vena de la cola usando un tubo PE10. Además, se insertó un catéter de uretra usando gel de KY y lidocaína al 2 % como lubricante. La rata se contuvo en un tubo de plexiglás modificado para que la orina se pudiera recoger en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. La infusión salina comenzó en el momento cero a 0,02 ml/min durante la duración del ensayo. Se usó el mismo catéter i.v. para inyectar el compuesto de ensayo. El ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético, 10 μg i.v., se inyectó en el momento indicado en un volumen de 1 ml en una solución salina durante el transcurso de 10 minutos. En el momento indicado, la infusión de solución salina se multiplicó por diez hasta 0,2 ml/min durante diez minutos y se devolvió a 0,02 ml/min durante todo el ensayo. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm para separar cualquier RBC de la orina. Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en la orina se midieron con respectivos electrodos selectivos de iones. Las tasas de excreción de Na⁺ y K⁺ se calcularon por: (volumen de orina/tiempo de período de recolección) x (concentración de iones en orina). Los resultados se muestran en las Figuras 5-8. El ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético a 10 μg i.v. causó una respuesta natriurética sostenida en la rata normal. La excreción de K⁺ no aumentó en respuesta al ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido. La respuesta natriurética inicial en la Figura 6 (10-20 min) se debió al aumento en el volumen de orina que se muestra en la Figura 8, y no a la concentración de Na⁺ en orina mostrada en la Figura 7. Sin embargo, 60-90 minutos después de la administración se debió a la natriuresis a la concentración urinaria de Na⁺ aumentada como se muestra en la Figura 7.

50 La producción de orina disminuyó 140 minutos después de la administración dando como resultado una disminución de la natriuresis. Sin embargo, cuando la infusión salina se multiplicó por diez hasta 0,2 ml/min durante 10 minutos, la tasa de excreción de Na⁺ aumentó de 2 uEquiv./min a 10 uEquiv./min, como se muestra en la Figura 6. Estos datos son consistentes con la idea de que el ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido inhibió la reabsorción de Na⁺ en el túbulo distal causando la excreción de Na⁺, pero solo si la hidratación y la GFR fueron suficientes para que llegue suficiente líquido al túbulo distal.

Ejemplo 6. Respuesta natriurética a ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético (10 μg) seguido de furosemida (100 μg) en una rata normal Sprague Dawley, (administración oral).

Una rata Sprague Dawley hembra (250 g) se anestesió ligeramente con éter y se insertó un catéter de uretra usando gel de KY y lidocaína al 2 % como lubricante. La rata se contuvo en un tubo de plexiglás modificado para que la orina se pudiera recoger en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. No se administró una infusión de solución salina. El ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético se inyectó con una aguja de alimentación en el momento indicado en un volumen de 1 ml de agua durante el transcurso de 1 minuto. Sesenta minutos después, se administraron 100 µg de furosemida de manera similar con una aguja de alimentación. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm para separar cualquier RBC de la orina. Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en la orina se midieron con respectivos electrodos selectivos de iones. Las tasas de excreción de Na⁺ y K⁺ se calcularon por: (volumen de orina/tiempo de período de recolección) x (concentración de iones en orina). Los resultados se muestran en las Figuras 9-12. El ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido sintético (10 µg) se activó por vía oral provocando una respuesta natriurética en una rata normal. Sesenta minutos después de la administración oral, la furosemida (100 µg) provocó la excreción sostenida de Na⁺ observada en las Figuras 9-11. El pretratamiento con ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido seguido por furosemida permitió una mayor excreción de Na⁺, pero no aumentó la excreción de K⁺ en la Figura 10. La furosemida en solitario causó excreción tanto de Na⁺ como de K⁺ (datos no mostrados). El pretratamiento con ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido inhibió la excreción de K⁺ inducida por furosemida.

Ejemplo 7. Respuesta natriurética a ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido aislado (3 µg) seguido de furosemida (20 µg) en ratas urémicas Sprague Dawley (i.v.).

La rata hembra Sprague-Dawley, que pesaba 225 g, se hizo urémica uniendo un riñón y el 30-50 % del segundo riñón. Dos semanas después, la rata estaba lista para evaluar la actividad natriurética. La rata se anestesió ligeramente con éter y se colocó un catéter de vena de la cola usando un tubo PE10. Además, se insertó un catéter de uretra usando gel de KY y lidocaína al 2 % como lubricante. La rata se contuvo en un tubo de plexiglás modificado para que la orina se pudiera recoger en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. La infusión salina comenzó en el momento cero a 0,02 ml/min durante la duración del ensayo. Se usó el mismo catéter i.v. para inyectar ácido xanturénico 8-O-β-glucósido aislado en el momento indicado en un volumen de 1 ml en solución salina durante el transcurso de 10 minutos. Después de 2 horas, se inyectaron 20 µg de furosemida de la misma manera. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm para separar cualquier RBC de la orina. Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en la orina se midieron con respectivos electrodos selectivos de iones. Las tasas de excreción de Na⁺ y K⁺ se calcularon por: (volumen de orina/tiempo de período de recolección) x (concentración de iones en orina).

Los resultados se muestran en las Figuras 13-16. El ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido aislado a 3 µg i.v. causó una respuesta natriurética sostenida en la rata urémica. El transcurso del tiempo de la excreción de Na⁺ alcanzó su punto máximo a los 70 minutos en la rata urémica como se muestra en la Figura 13, que es un transcurso de tiempo similar al ácido xanturénico 8-O-β-glucósido sintético en la rata normal que se muestra en la Figura 1. La excreción de K⁺ en la Figura 14 y 15 no aumentó en respuesta a ácido xanturénico 8-O-β-glucósido aislado. La respuesta diurética a la furosemida fue clásica en términos de su transcurso temporal, así como la excreción de Na⁺. Normalmente, la furosemida también causa la excreción de K⁺ en la medida en que la complementación con K⁺ es necesaria en el uso clínico de la furosemida. Un efecto similar en ratas normales se ilustra en la Figura 25 (solo furosemida). El pretratamiento con ácido xanturénico 8-O-β-glucósido seguido de furosemida evitó el aumento típico en la excreción de K⁺ en este ensayo mostrado en las Figuras 14 y 15.

Ejemplo 8. Excreción de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico aislado (2,0 µg) en ratas urémicas Sprague Dawley (administración i.v.).

Una rata hembra Sprague-Dawley, que pesaba 225 g, se hizo urémica uniendo un riñón y el 30-50 % del segundo riñón. Dos semanas después, la rata estaba lista para evaluar la actividad natriurética. La rata se anestesió ligeramente con éter y se colocó un catéter de vena de la cola usando un tubo PE10. Además, se insertó un catéter de uretra usando gel de KY y lidocaína al 2 % como lubricante. La rata se contuvo en un tubo de plexiglás modificado para que la orina se pudiera recoger en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. La infusión salina comenzó en el momento cero a 0,02 ml/min durante la duración del ensayo. Se usó el mismo catéter i.v. para inyectar el compuesto de ensayo. Se inyectó 8-O-sulfato de ácido xanturénico aislado, 2 µg, en el momento indicado en un volumen de 1 ml en solución salina durante el transcurso de 10 minutos. Después, la infusión de solución salina se devolvió a 0,02 ml/min durante la duración del ensayo. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm para separar cualquier RBC de la orina. Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en la orina se midieron con respectivos electrodos selectivos de iones. Las tasas de excreción de Na⁺ y K⁺ se calcularon por: (volumen de orina/tiempo de período de recolección) x (concentración de iones en orina).

Los resultados se muestran en las Figuras 17-20. El 8-O-sulfato de ácido xanturénico aislado (2 µg, i.v.) provocó una respuesta natriurética sostenida en la rata urémica. El transcurso de tiempo de la natriuresis alcanzó su máximo en 30 minutos y después se acercó a los niveles de control dentro en los 70 minutos de tratamiento, visto en las Figuras 17 y 18. La excreción de K⁺ no aumentó en respuesta al 8-O-sulfato de ácido xanturénico aislado, mostrado en las Figuras 18 y 19.

Ejemplo 9. Excreción de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a 8-O-sulfato de ácido xanturénico sintético (20 µg) en una rata normal Sprague Dawley (administración oral).

10 Una rata Sprague Dawley hembra (250 g) se anestesió ligeramente con éter y se insertó un catéter de uretra usando gel de KY y lidocaína al 2 % como lubricante. La rata se contuvo en un tubo de plexiglás modificado para que la orina se pudiera recoger en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. No se administró una infusión de solución salina. Se inyectó 8-O-sulfato de ácido xanturénico con una aguja de alimentación en el momento indicado en un volumen de 1 ml de agua durante el transcurso de 1 minuto. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm para separar cualquier RBC de la orina. Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en la orina se midieron con respectivos electrodos selectivos de iones. Las tasas de excreción de Na⁺ y K⁺ se calcularon por: (volumen de orina/tiempo de período de recolección) x (concentración de iones en orina). Los resultados se muestran en las Figuras 21-24. El 8-O-sulfato de ácido xanturénico (20 µg) no era oralmente activo con respecto a causar una respuesta natriurética en una rata normal. En particular, la concentración en orina de Na⁺ se mantuvo por debajo de 50 mM en la Figura 21, mientras que en el 8-O-sulfato de ácido xanturénico administrado i.v., la concentración en orina de Na⁺ aumentó de 60 mM a 160 mM en la Figura 19. Además, el ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido fue oralmente activo en una rata normal aumentando la concentración en orina de Na⁺ a 160 mM en la Figura 11.

Ejemplo 10. Protocolo para la producción de anticuerpos policlonales contra ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido y 8-sulfato de ácido xanturénico.

El siguiente protocolo describe la producción de anticuerpos policlonales para el ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido en el desarrollo de un ensayo ELISA para detectar y medir el ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido en orina y plasma. El ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido está unido covalentemente a la proteína grande KLH para provocar una respuesta inmune en conejos. Además, se usa ASBA como un brazo espaciador (12 Å) entre el ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido y KLH. El brazo espaciador permite una mejor presentación del ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido en la respuesta inmune. En el cribado de la respuesta de anticuerpos, el ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido se une de forma similar a BSA, que luego se recubre sobre pocillos de ELISA. El suero de conejo se criba entonces para detectar anticuerpos de ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido incubando el suero de conejo con BSA conjugado con ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido. Estos anticuerpos de conejo se detectan mediante la unión de anticuerpos anti-conejo de cabra que están conjugados con la enzima indicadora peroxidasa de rábano picante (HRP). El sustrato, tetrametilbencidina (TMB) se incuba con HRP y el producto se mide a 400 nm.

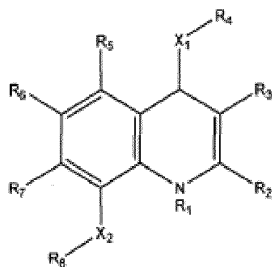
Una vez que se determina el título del antisuero contra el ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido, las muestras de orina se ensayan para detectar la presencia de ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido mediante ELISA competitivo usando el anticuerpo policlonal específico. La validación del ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido por ELISA se realizará mediante el método de HPLC actual con detección fluorescente. Este método de HPLC se desarrolló inicialmente en el aislamiento del ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido en orina humana. El espectro UV del ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido también se puede examinar en las muestras de orina. Mediante el método actual de HPLC, el límite de detección del ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido en la orina es de 2,7 µM sin extracción en fase sólida (SPE). Se espera que SPE reduzca los límites de detección de HPLC a nM.

Los niveles clínicos de plasma y orina de ácido xanturénico 8-O-beta-D-glucósido y 8-sulfato de ácido xanturénico se establecerán mediante técnicas tanto ELISA como SPE/HPLC.

50

REIVINDICACIONES

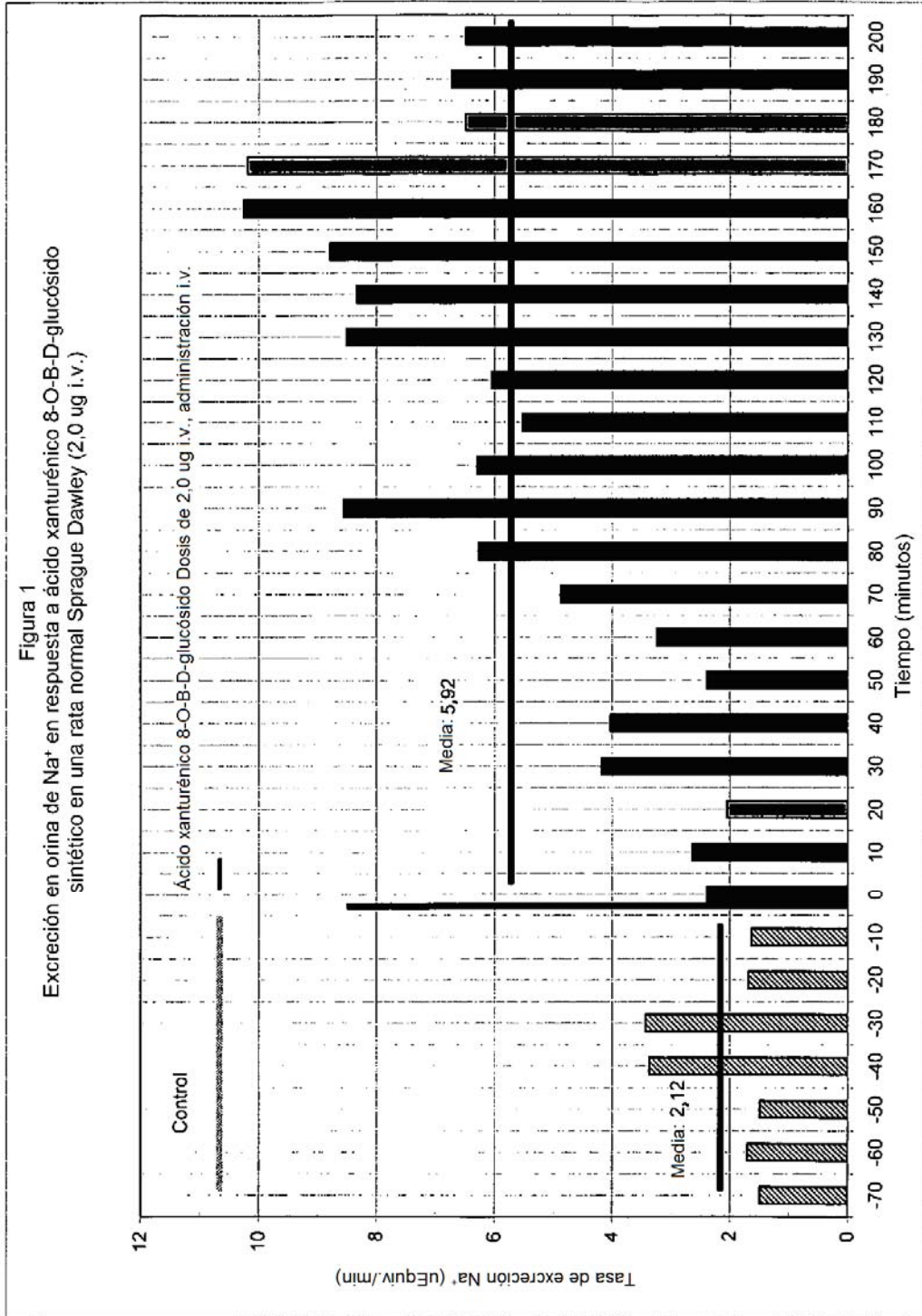
1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de hipertensión, edema, insuficiencia renal aguda, insuficiencia cardiaca congestiva, insuficiencia renal crónica, ascitis, aumento de la presión intraocular o síndrome nefrótico, comprendiendo la composición farmacéutica una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I:

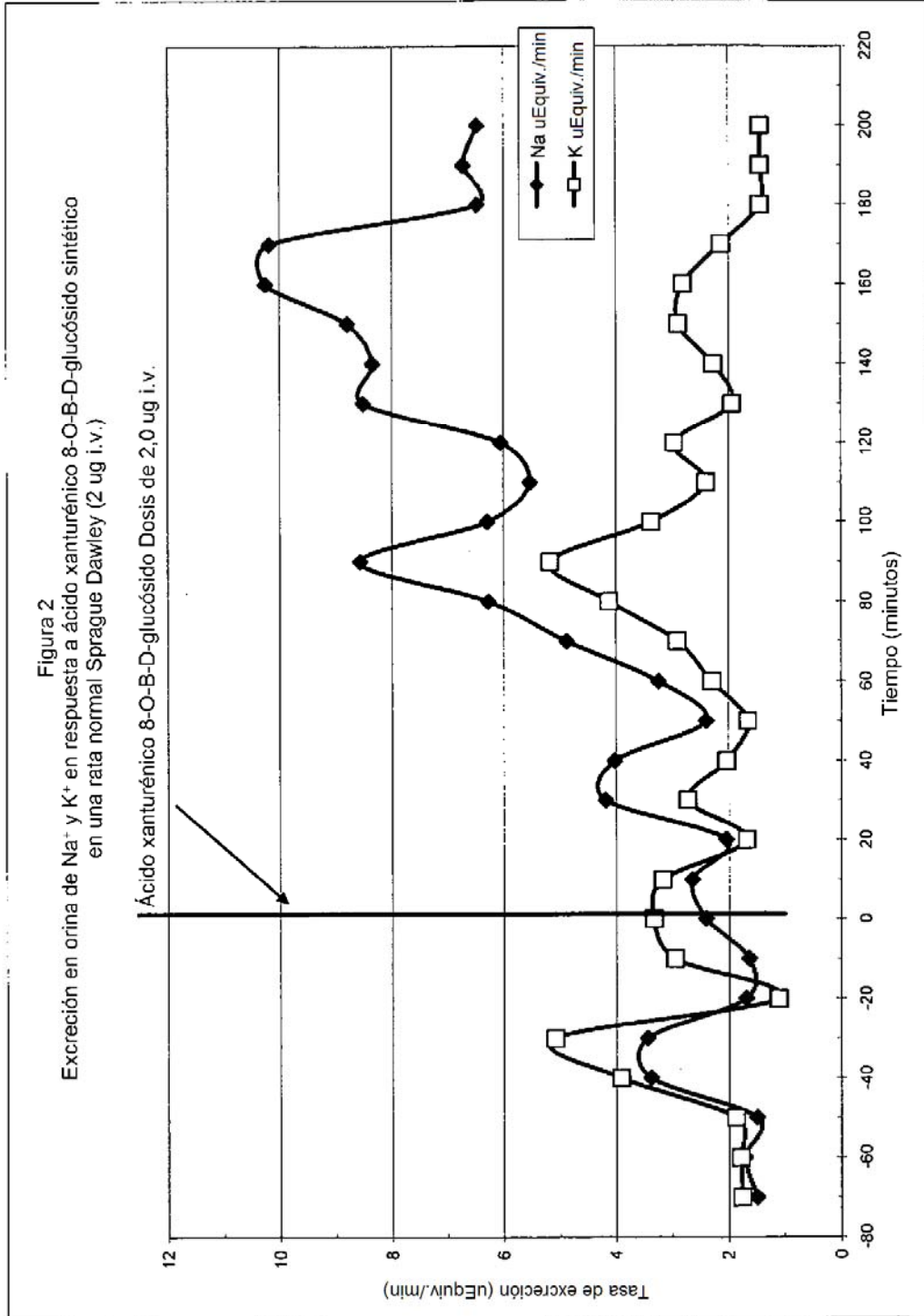


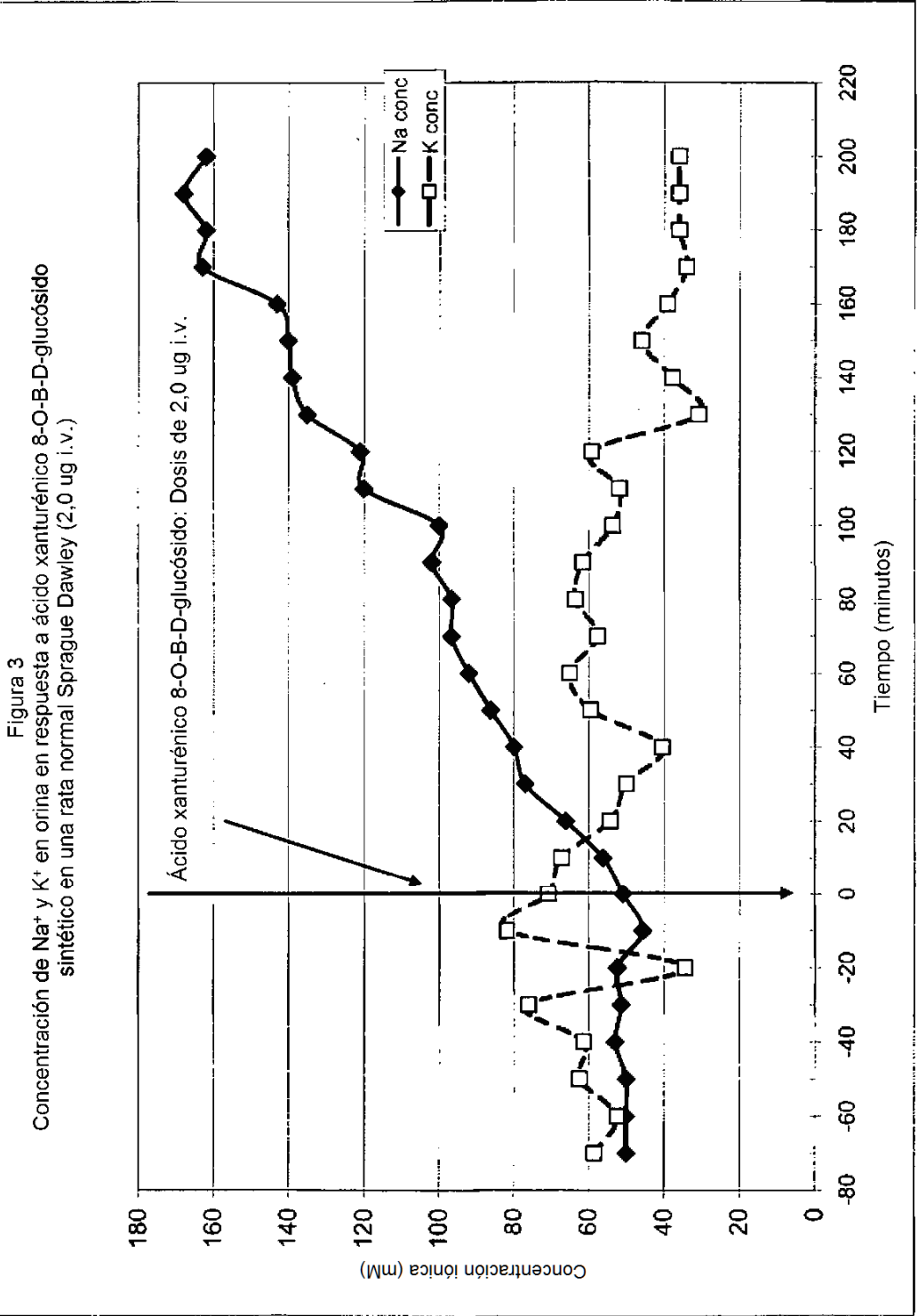
(I)

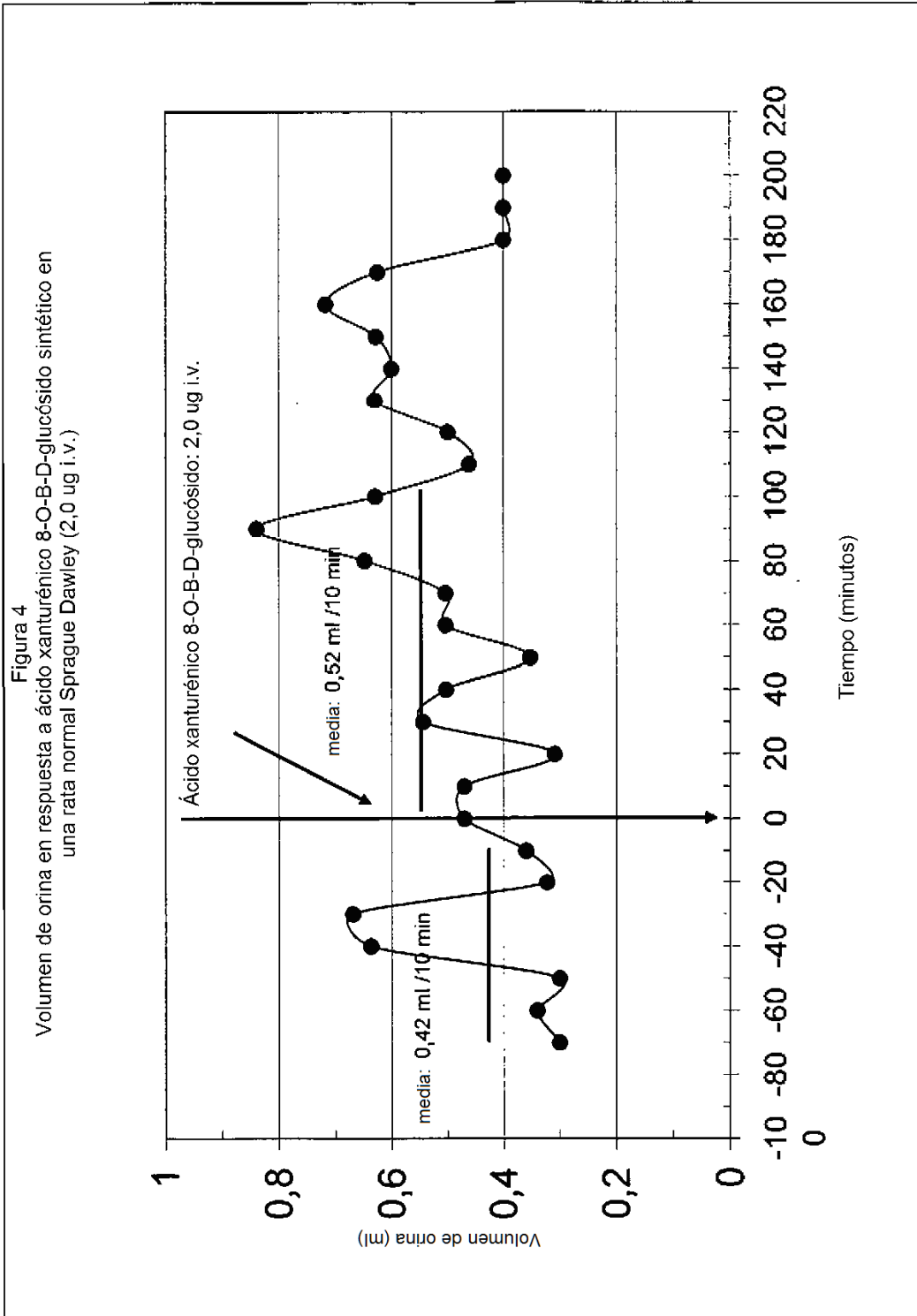
- 10 A) en la que R₂ es COOR; donde R se selecciona del grupo que consiste en:
- H, halo, sacárido, alifático, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo opcionalmente sustituidos, -P(O)(OR^a)(OR^b) y -NR^aR^b, donde R^a y R^b son independientemente H, alifático, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos;
- 15 R₁, R₃, R₅, R₆ y R₇ son H o halógeno;
X₁-R₄ es (=O) o hidroxilo;
X₂ es -O-; y
R₈ es H, una aldohexopiranososa, aldopentopiranososa, aldopentofuranosa o cetosa, o D-glucosa; o
- 20 B) en la que el compuesto de fórmula I es ácido xanturénico 8-O-sulfato; o
una sal farmacéuticamente aceptable de A) o B); y
un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, parte A), en la que el
25 compuesto de fórmula I es ácido xanturénico 8-O-β-D-glucósido.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica comprende además uno o más compuestos diuréticos o compuestos cardiovasculares adicionales.
- 30 4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el compuesto diurético adicional se selecciona del grupo que consiste en un diurético de asa, diurético de tiazida, diurético ahorrador de potasio, inhibidor de anhidrasa carbónica y diurético osmótico.
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el compuesto
35 diurético adicional se selecciona de furosemida, bumetanida, torsemida, ácido etacrínico, clorotiazida, hidroclorotiazida, espironolactona, amilorida, triamtereno, acetazolamida, metazolamida, diclorfenamida, hidroflumetiazida, meticlotiazida, indapamida, metolazona, politiazida, clortalidona, dorzolamida, brinzolamida, glicerol, manosa y urea.
- 40 6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el compuesto diurético adicional es furosemida.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el agente cardiovascular adicional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de
45 angiotensina, un antagonista del receptor de angiotensina II y un bloqueador beta-adrenérgico.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el agente cardiovascular adicional es lisinopril, moexipril, enalapril, irbesartán, valsartán, losartán, nadolol, propranolol, atenolol, timolol o bisoprolol.

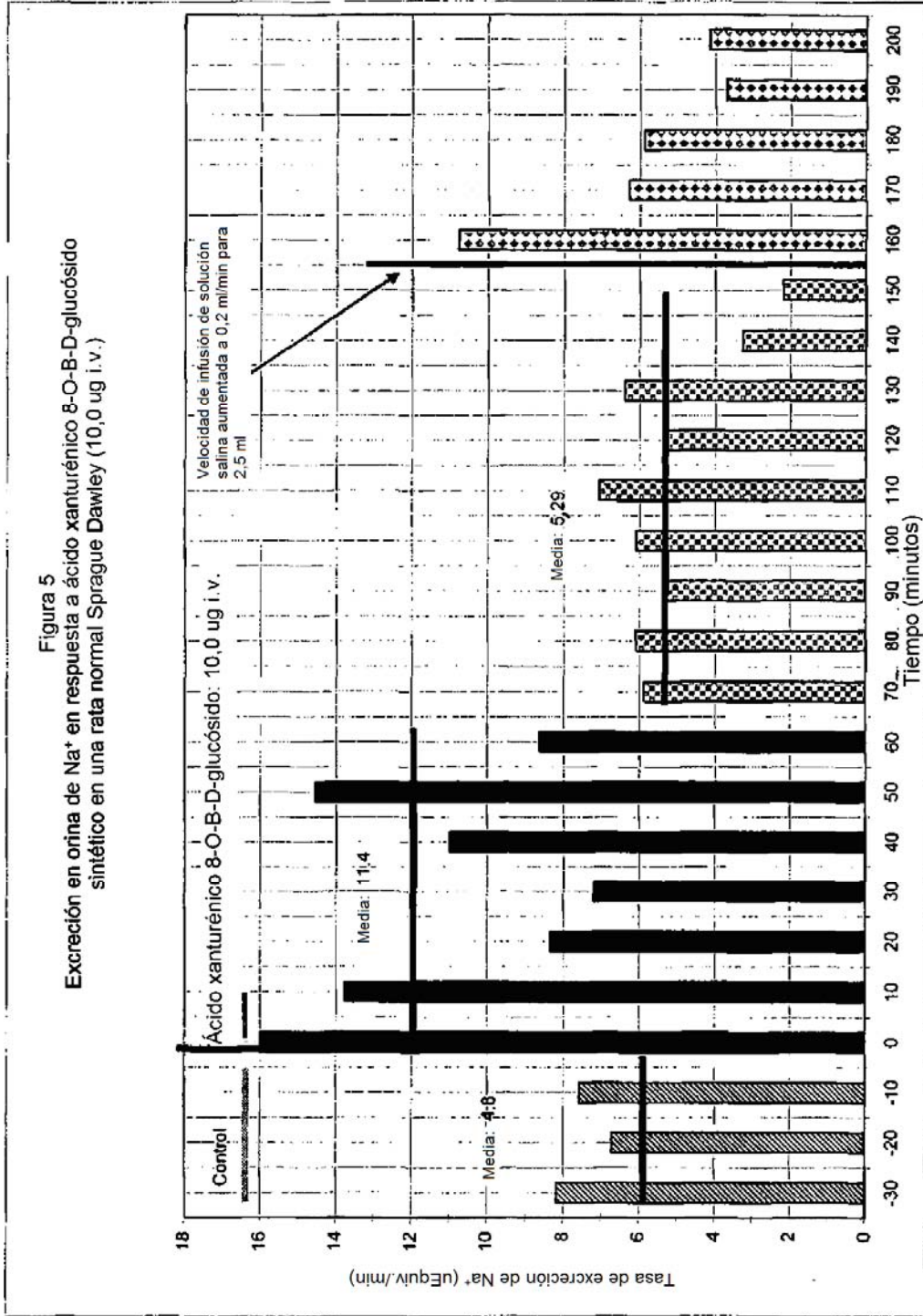
50

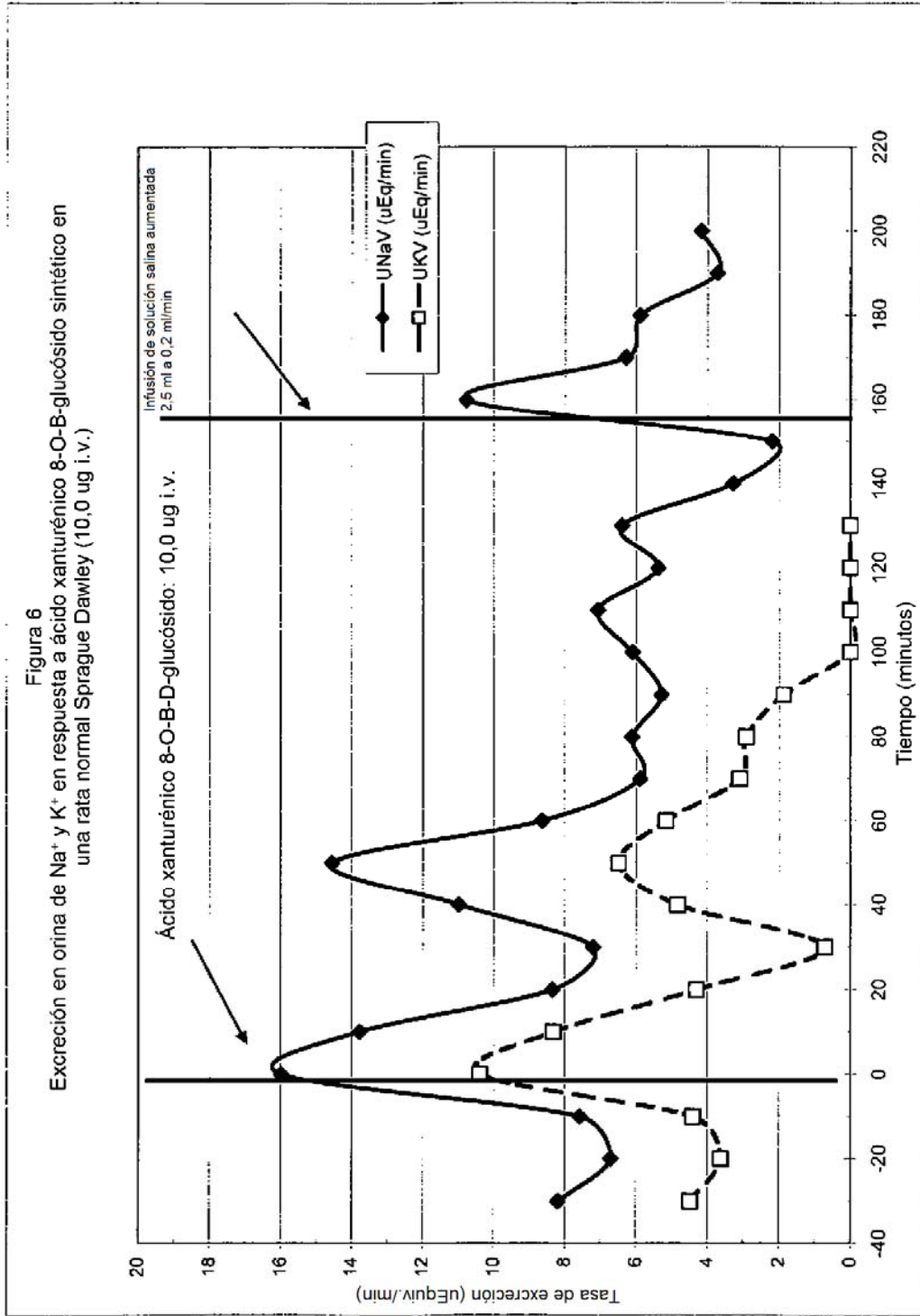


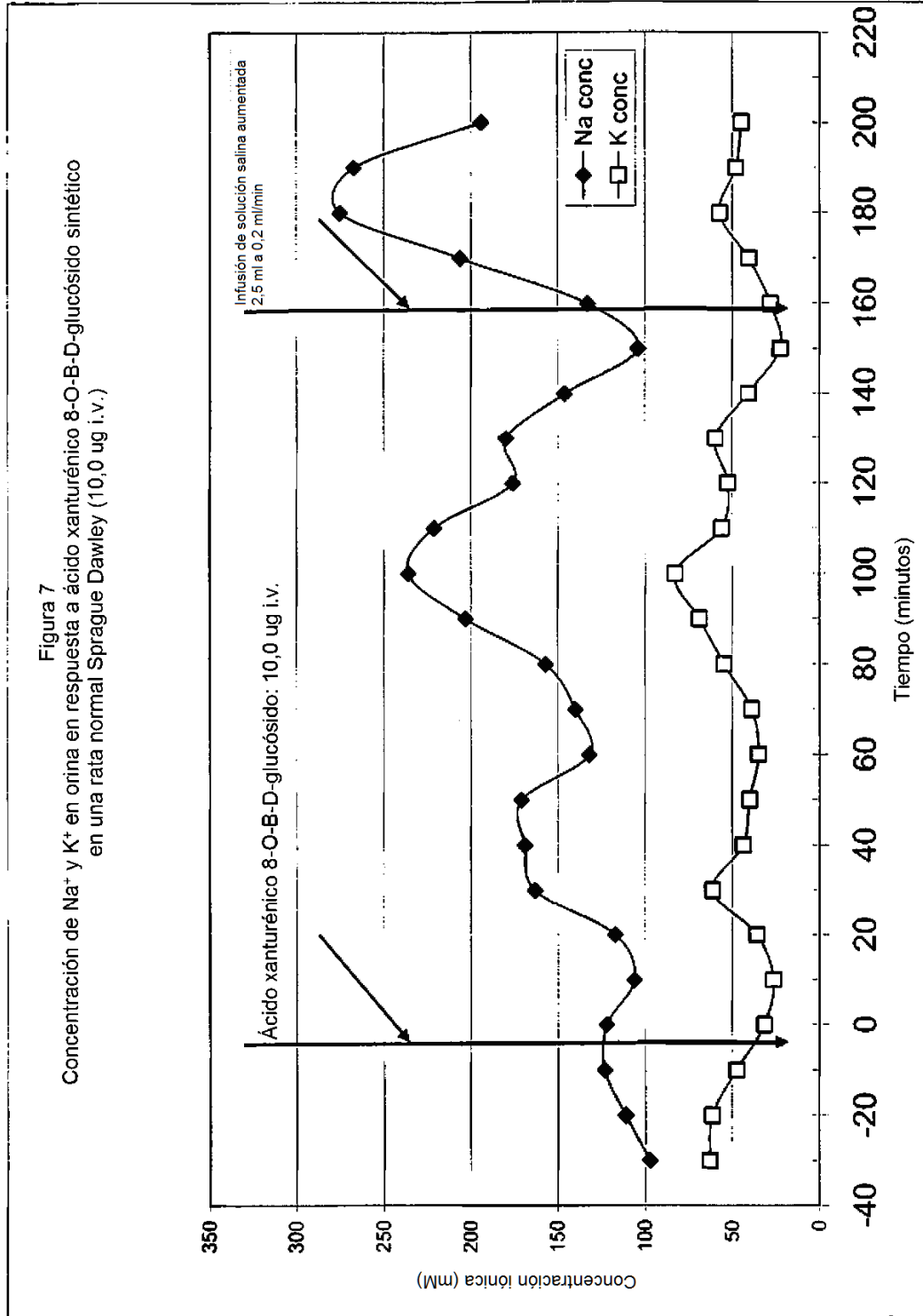


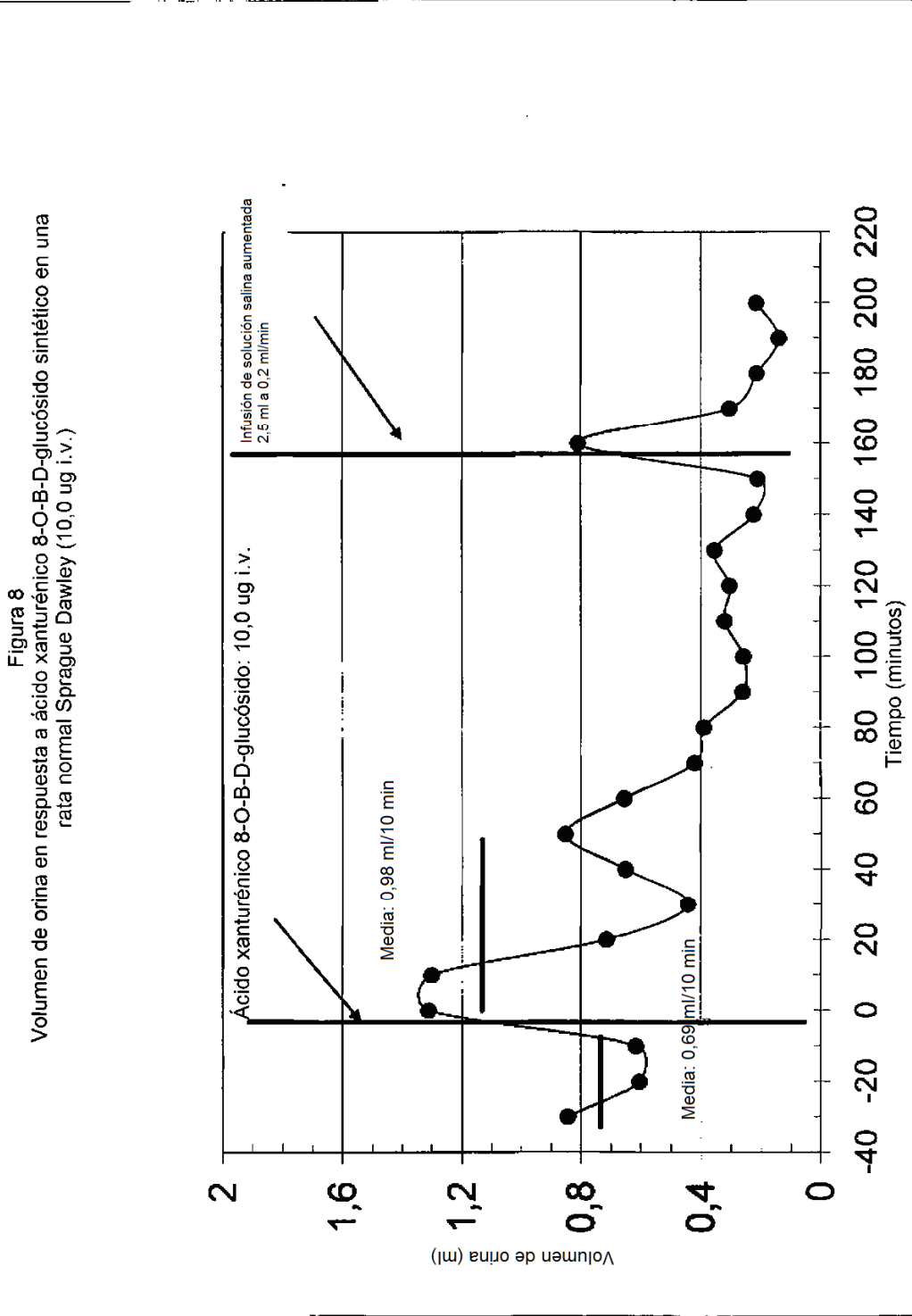


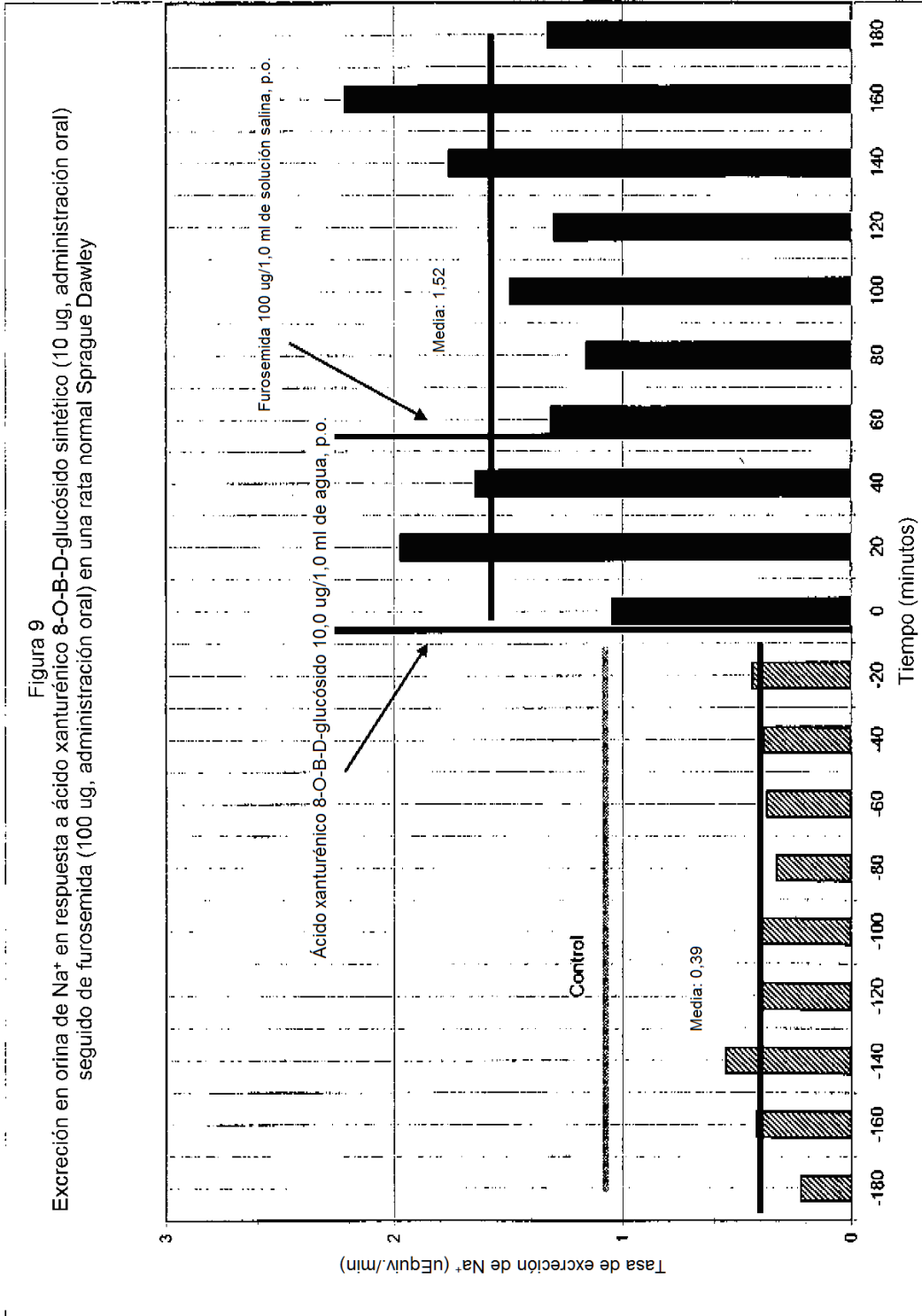


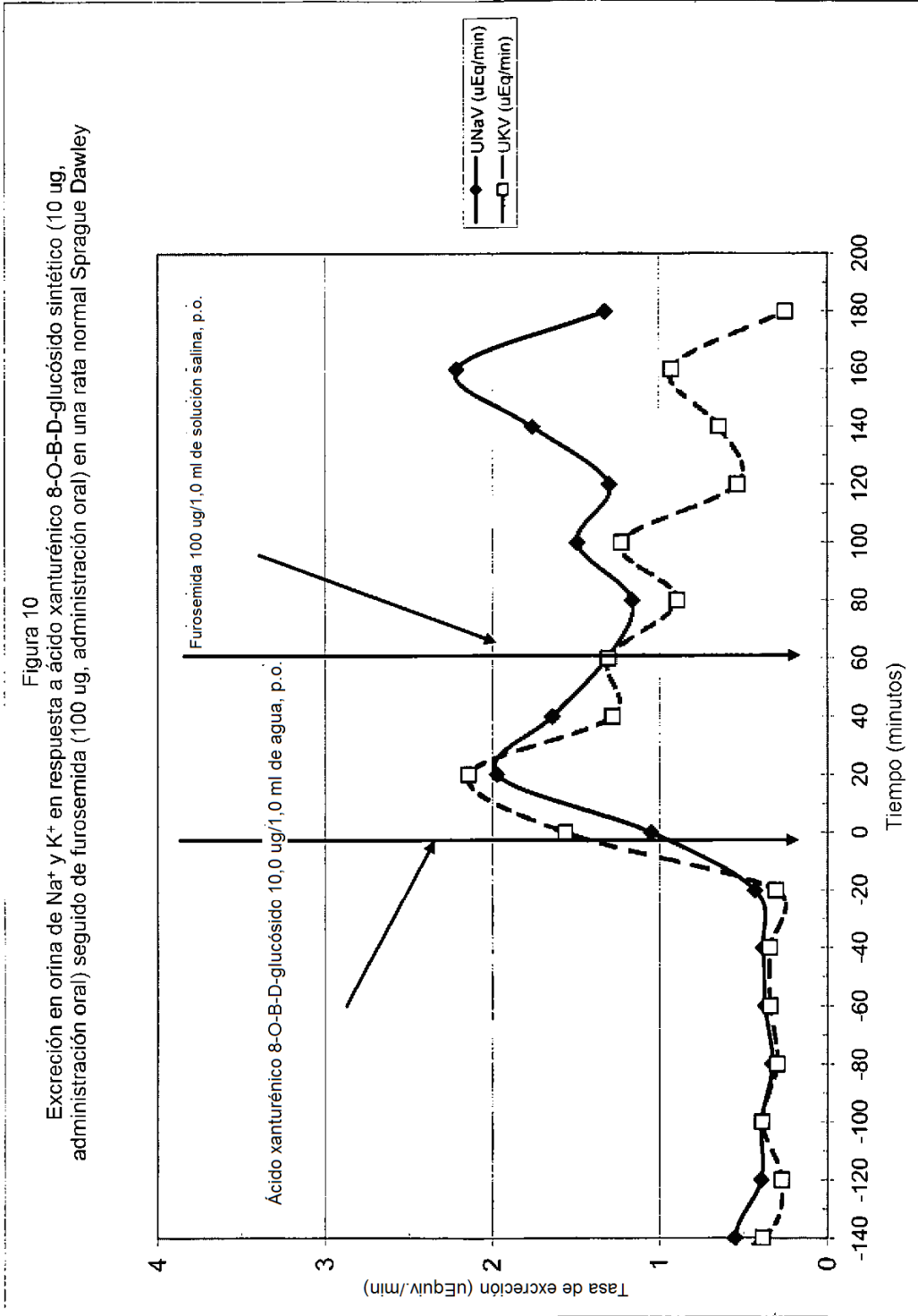


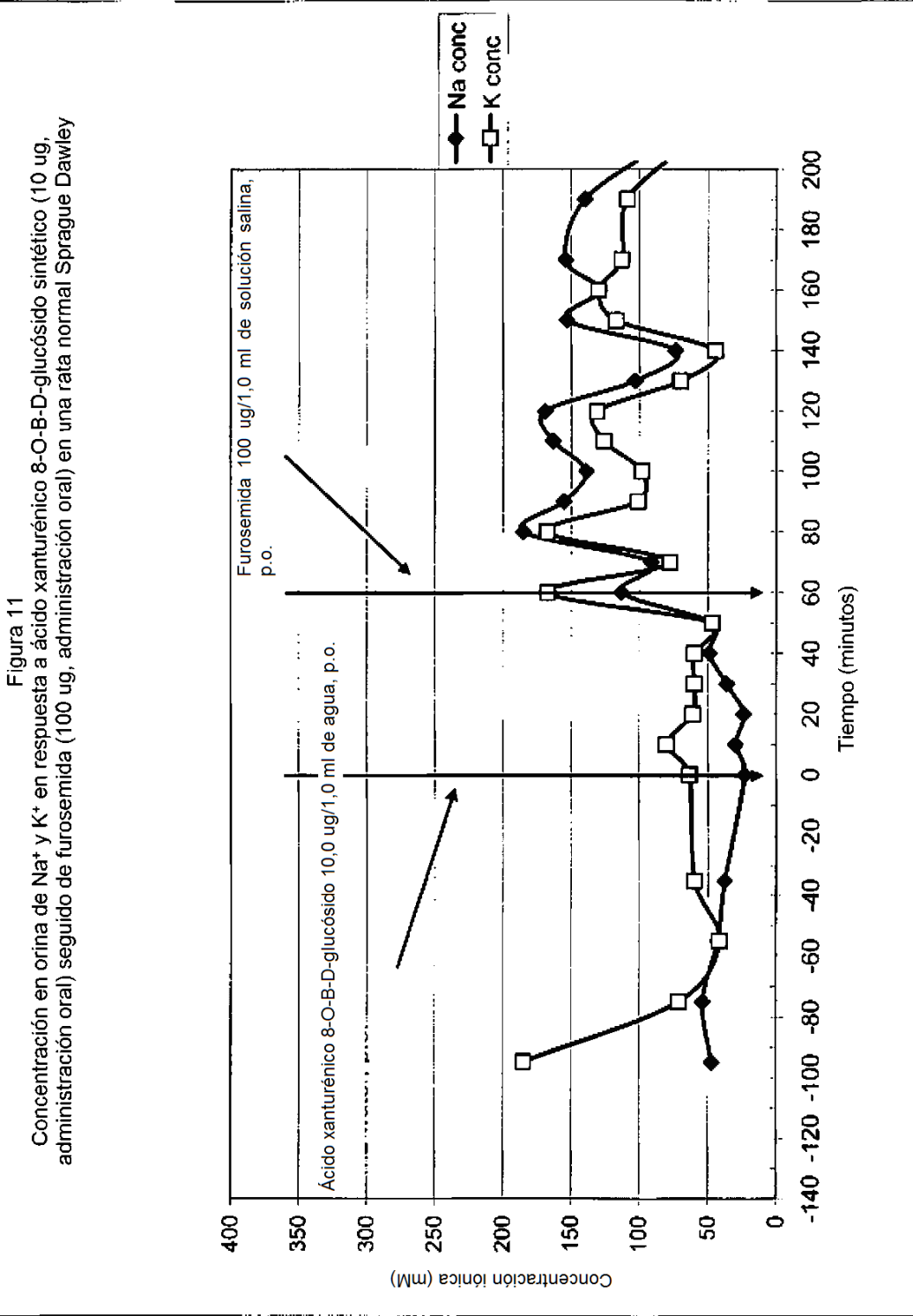


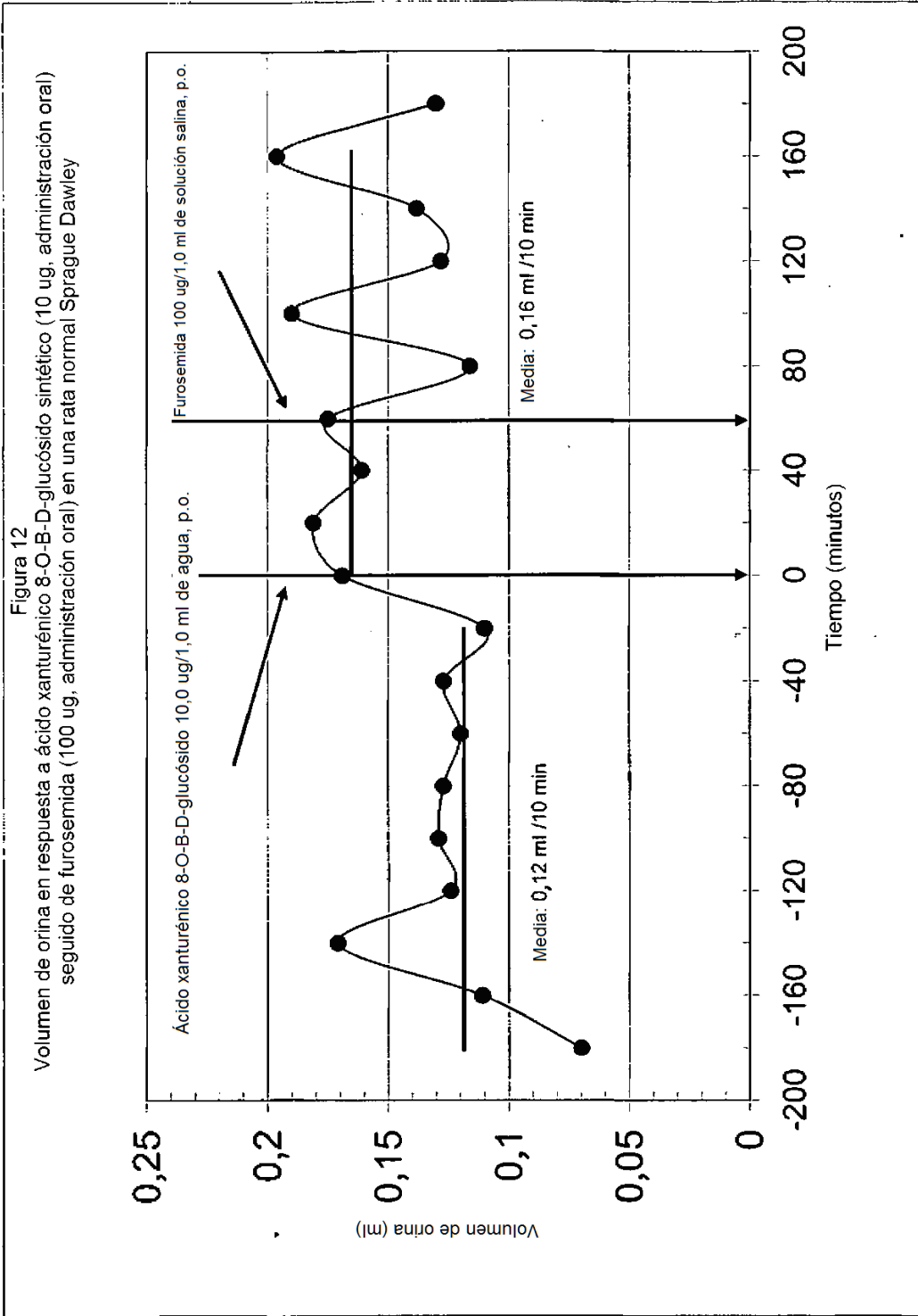












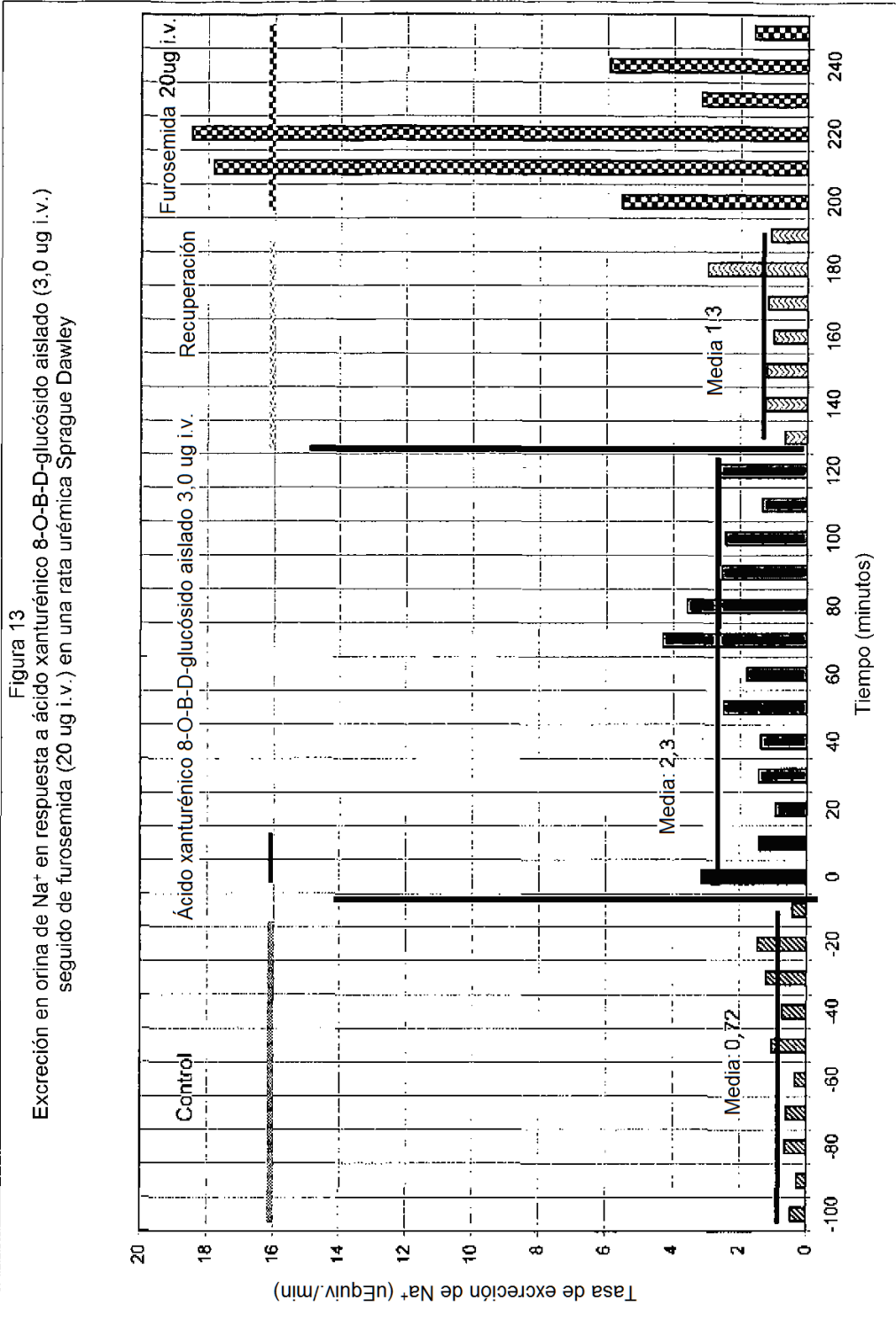


Figura 14
Excreción en orina de Na⁺ y K⁺ en respuesta a ácido xanturénico 8-O-B-D-glucósido aislado (3,0 ug i.v.) seguido de furosemida (20 ug i.v.) en una rata urémica Sprague Dawley

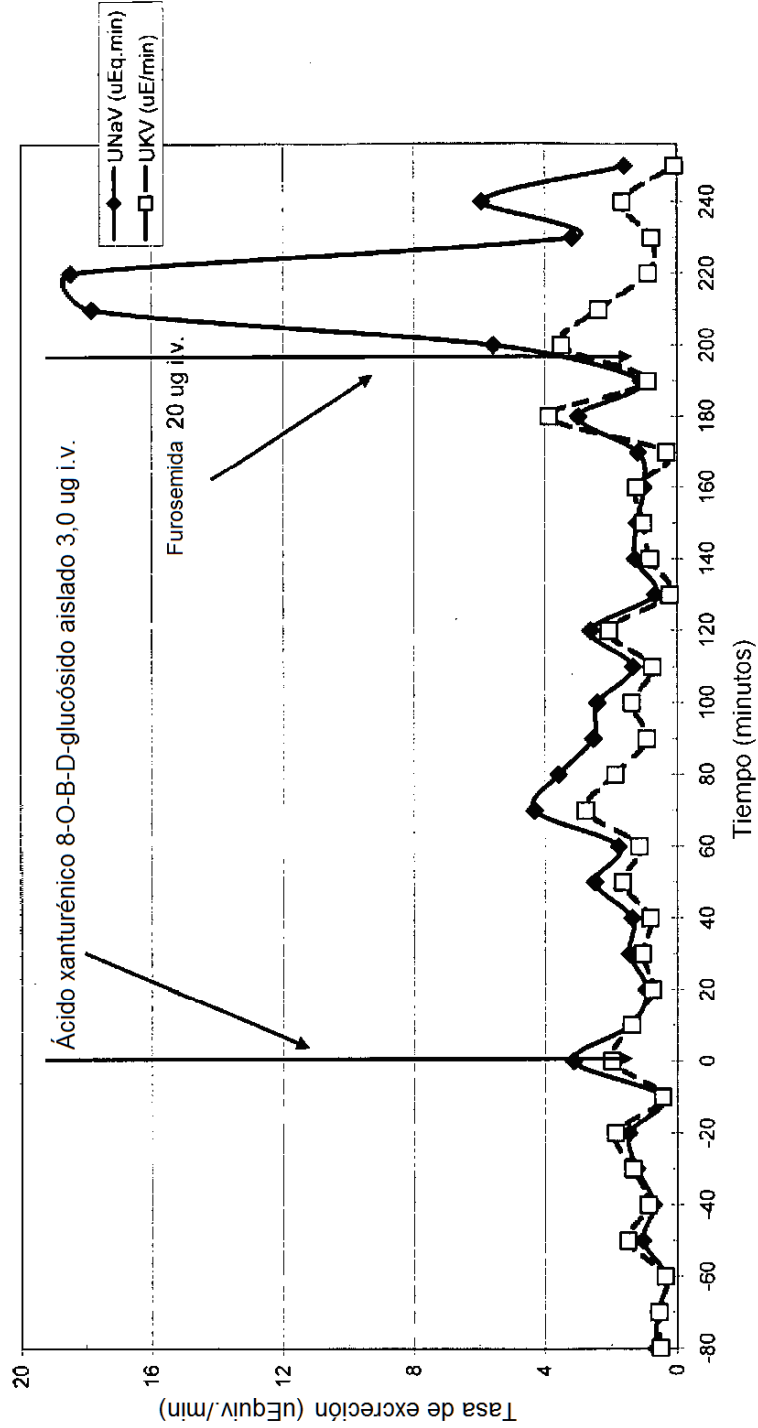


Figura 15
Concentración de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-B-D-glucósido aislado (3,0 ug i.v.)
seguido de furosemida (20 ug i.v.) en una rata urémica Sprague Dawley

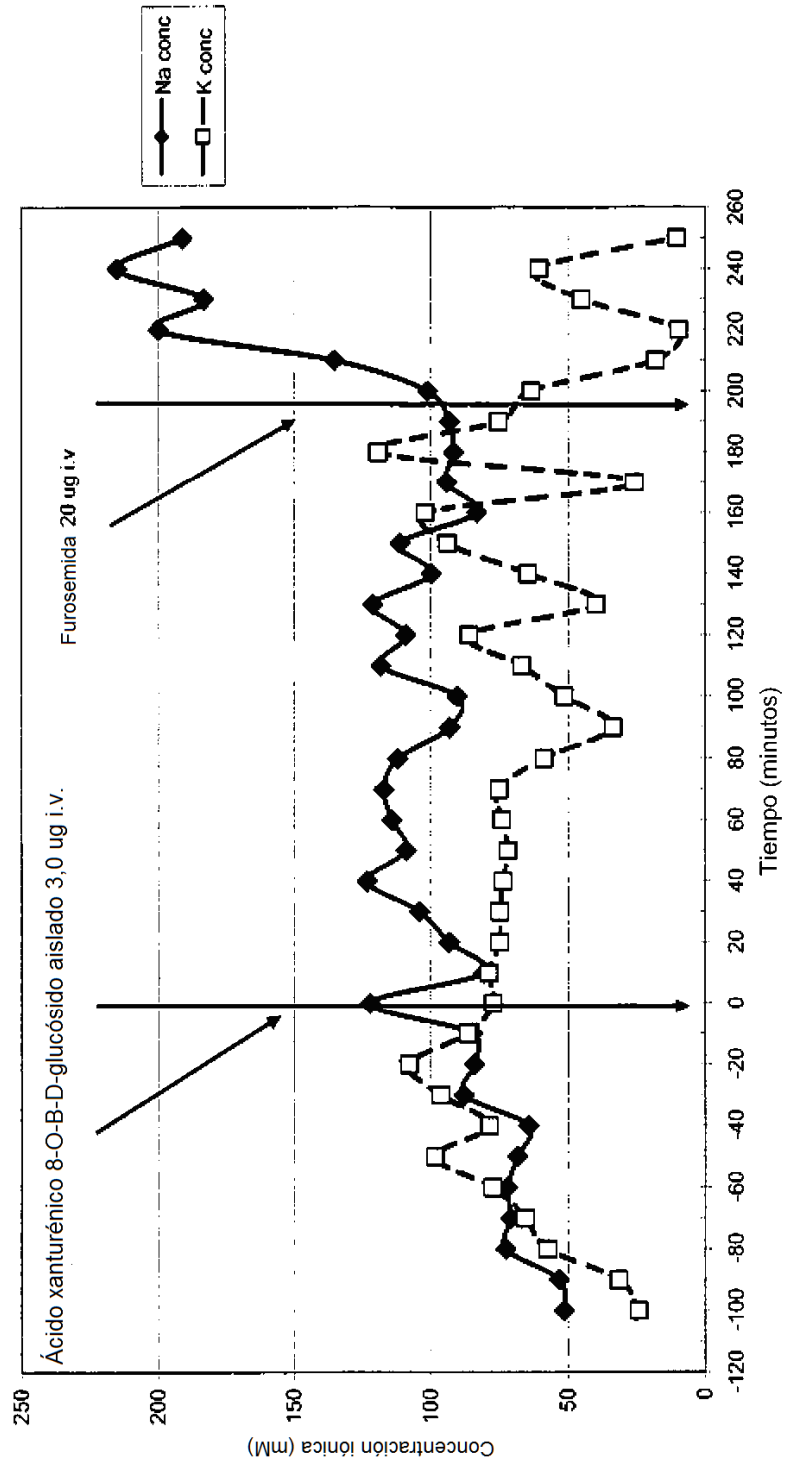
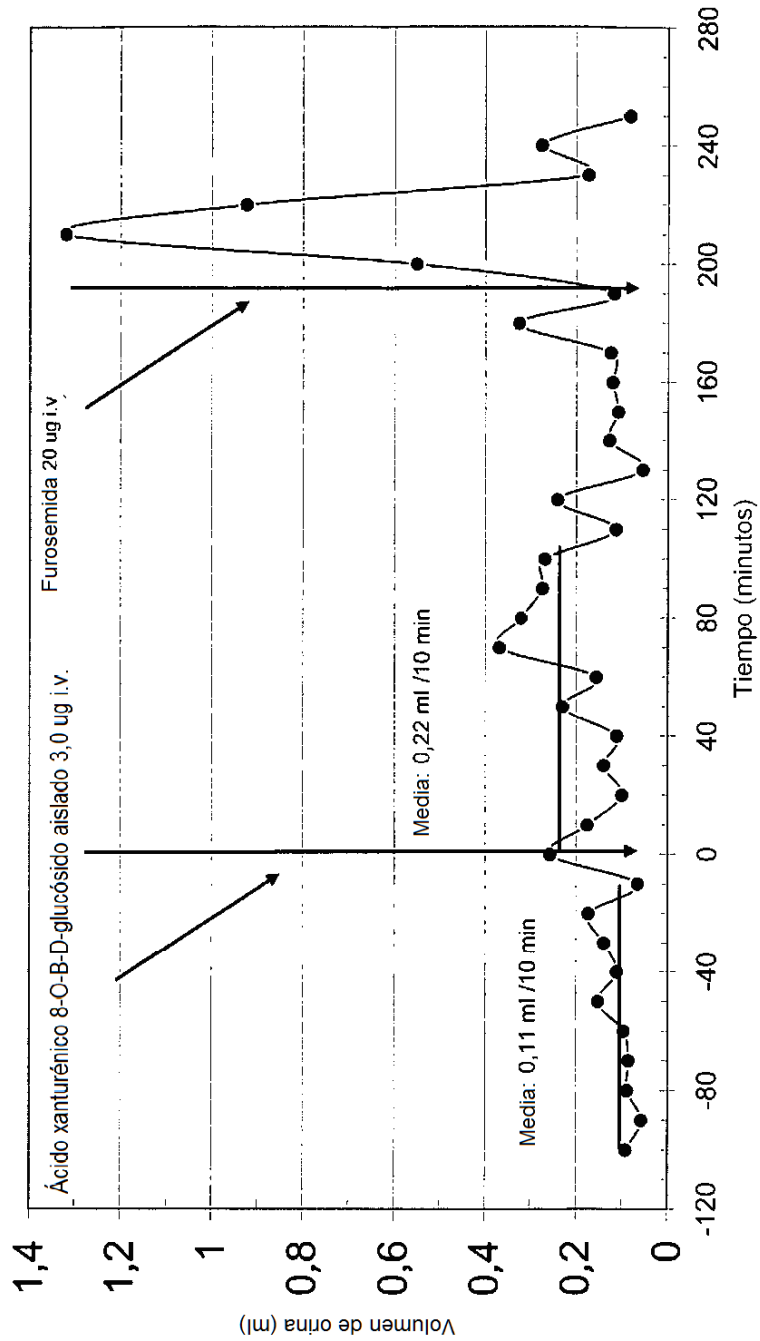


Figura 16
 Volumen de orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-B-D-glucósido aislado (3,0 ug i.v.) seguido de furosemida (20 ug i.v.) en una rata urémica Sprague Dawley



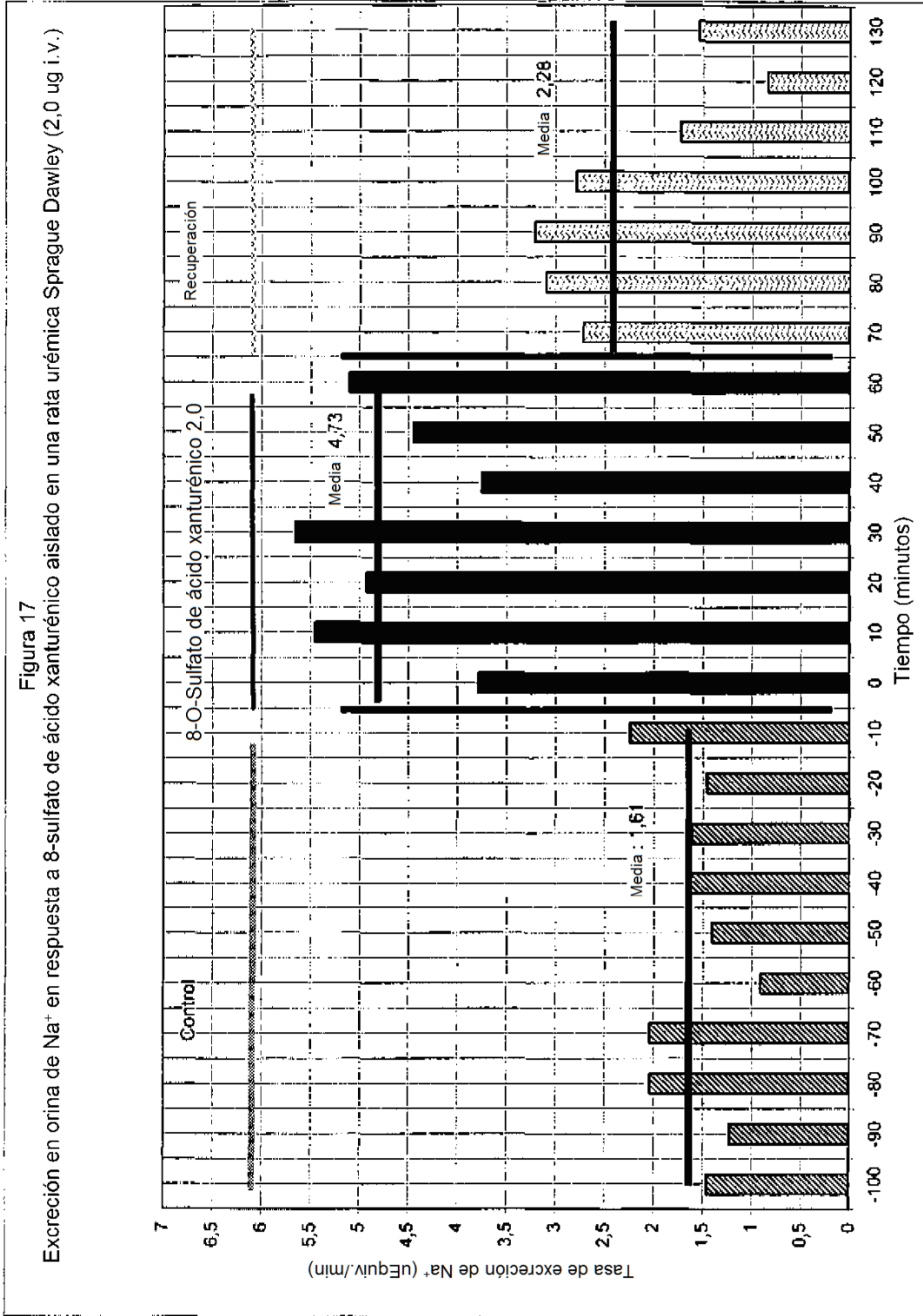


Figura 18
Excreción en orina de Na⁺ y K⁺ en respuesta a 8-sulfato de ácido xanturénico aislado en una rata urémica Sprague Dawley (2,0 ug i.v.) en una rata Sprague Dawley (2,0 ug i.v.)

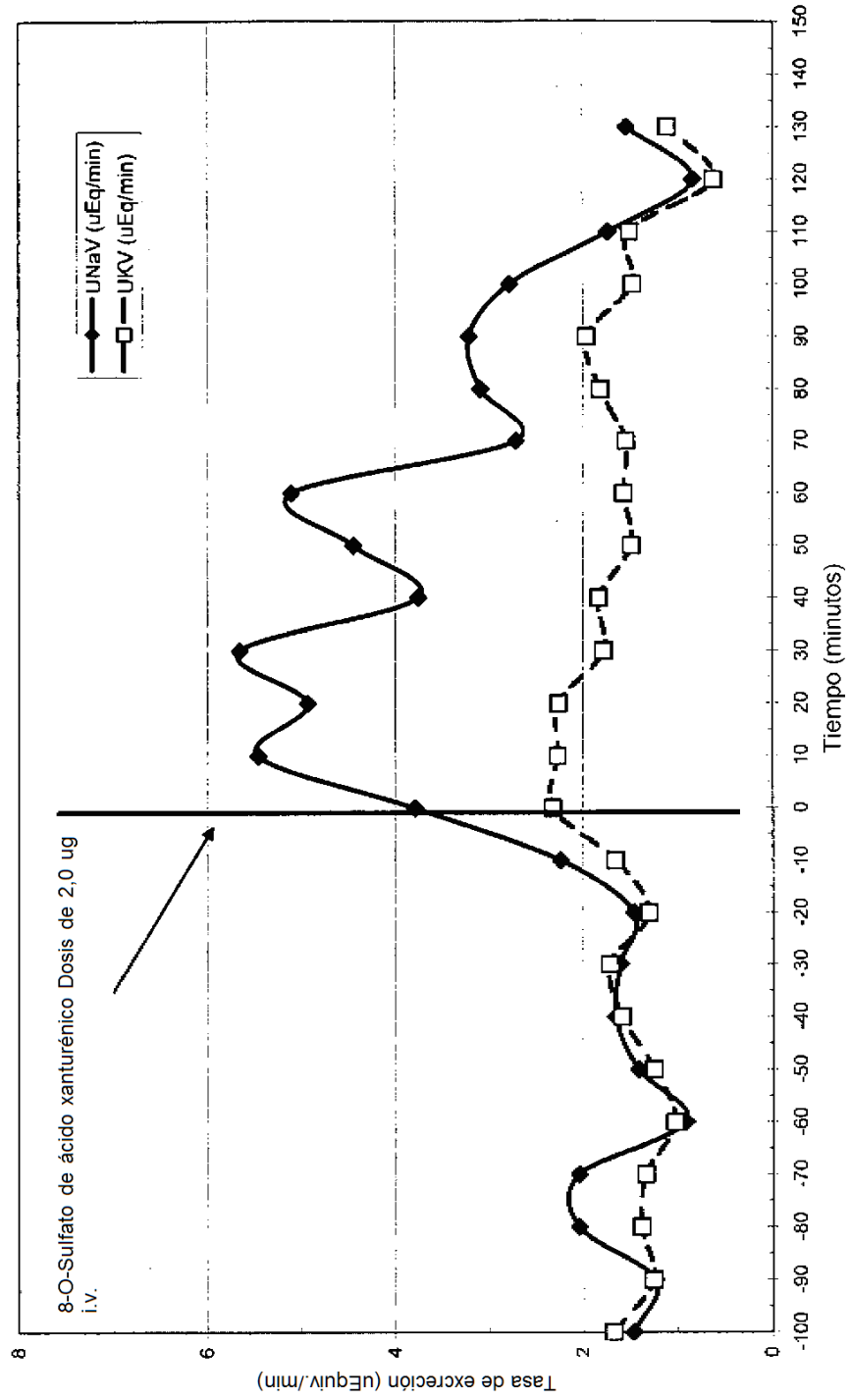
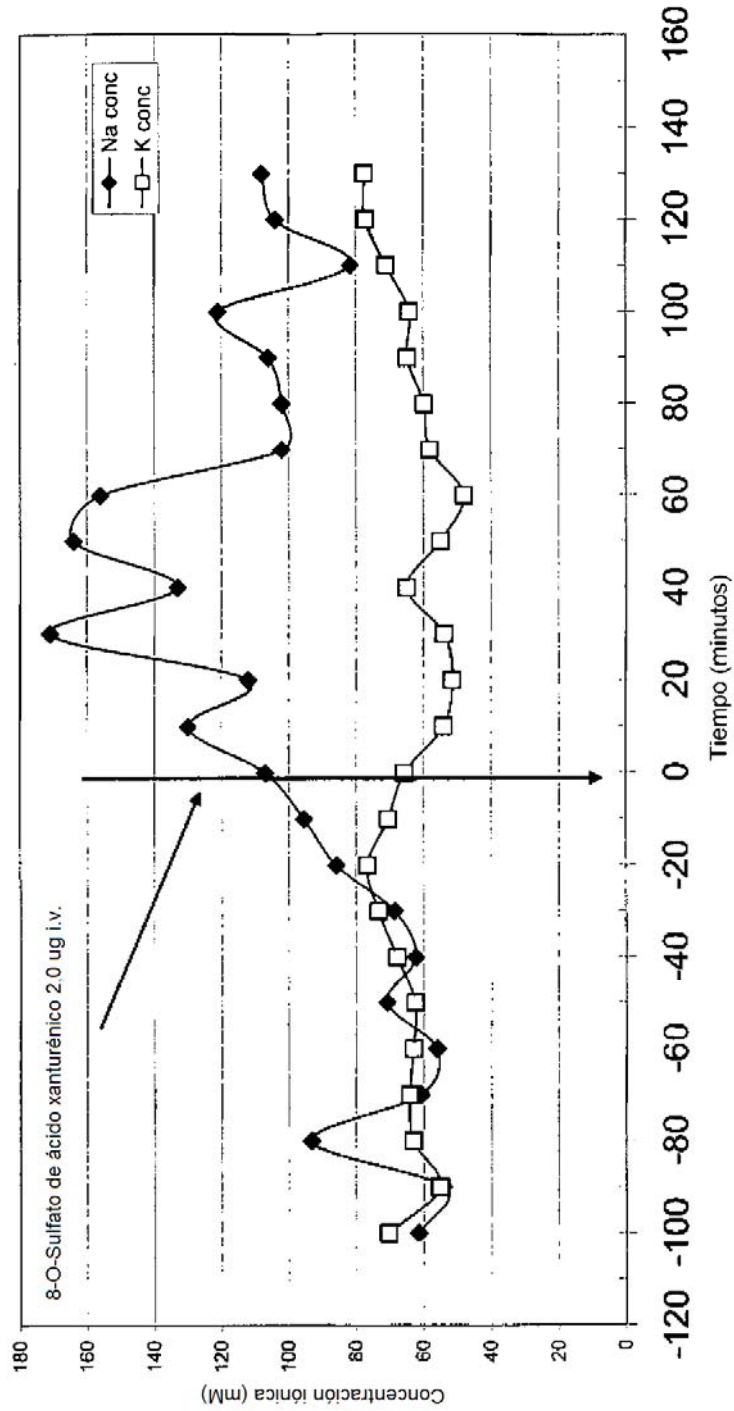
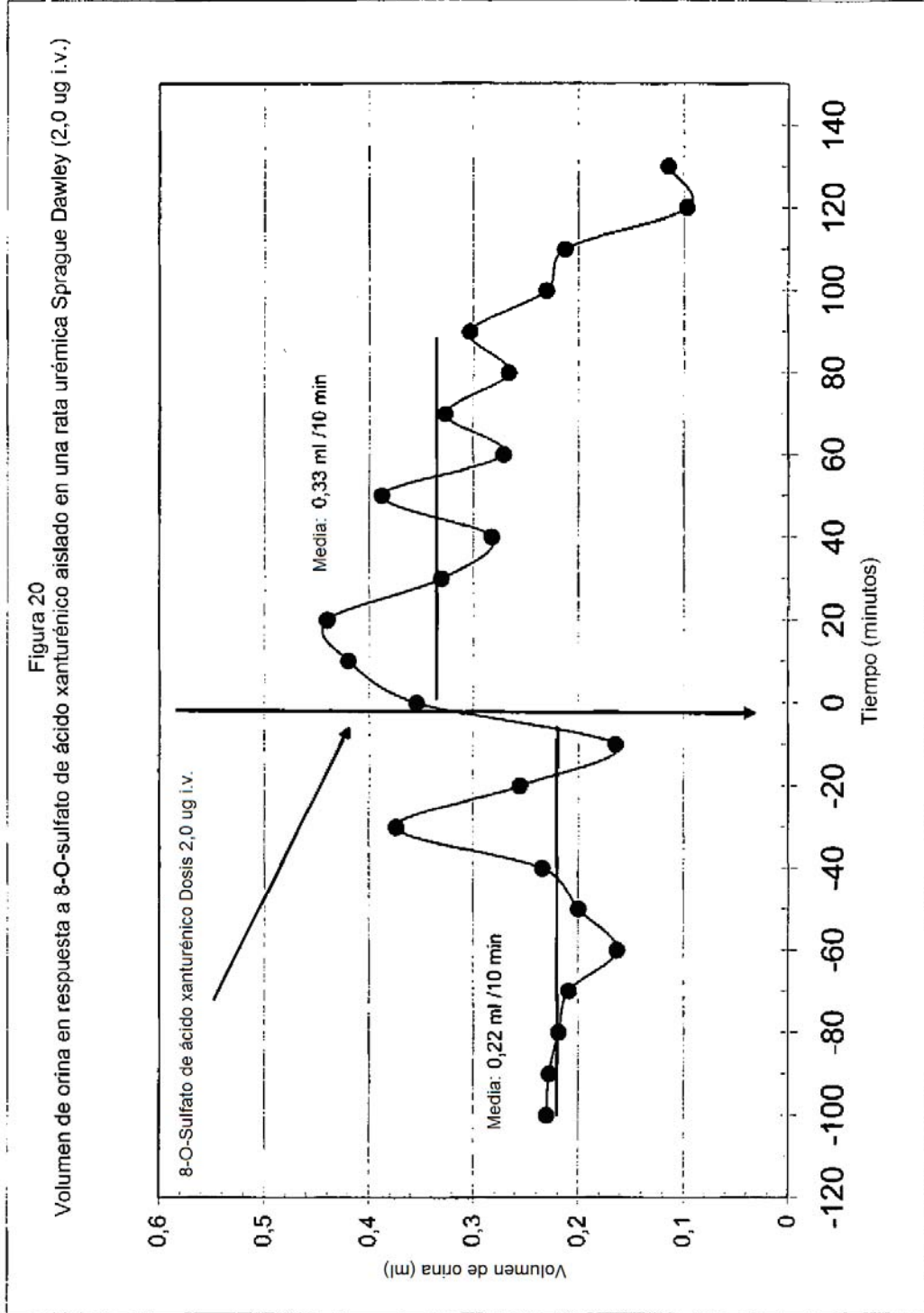
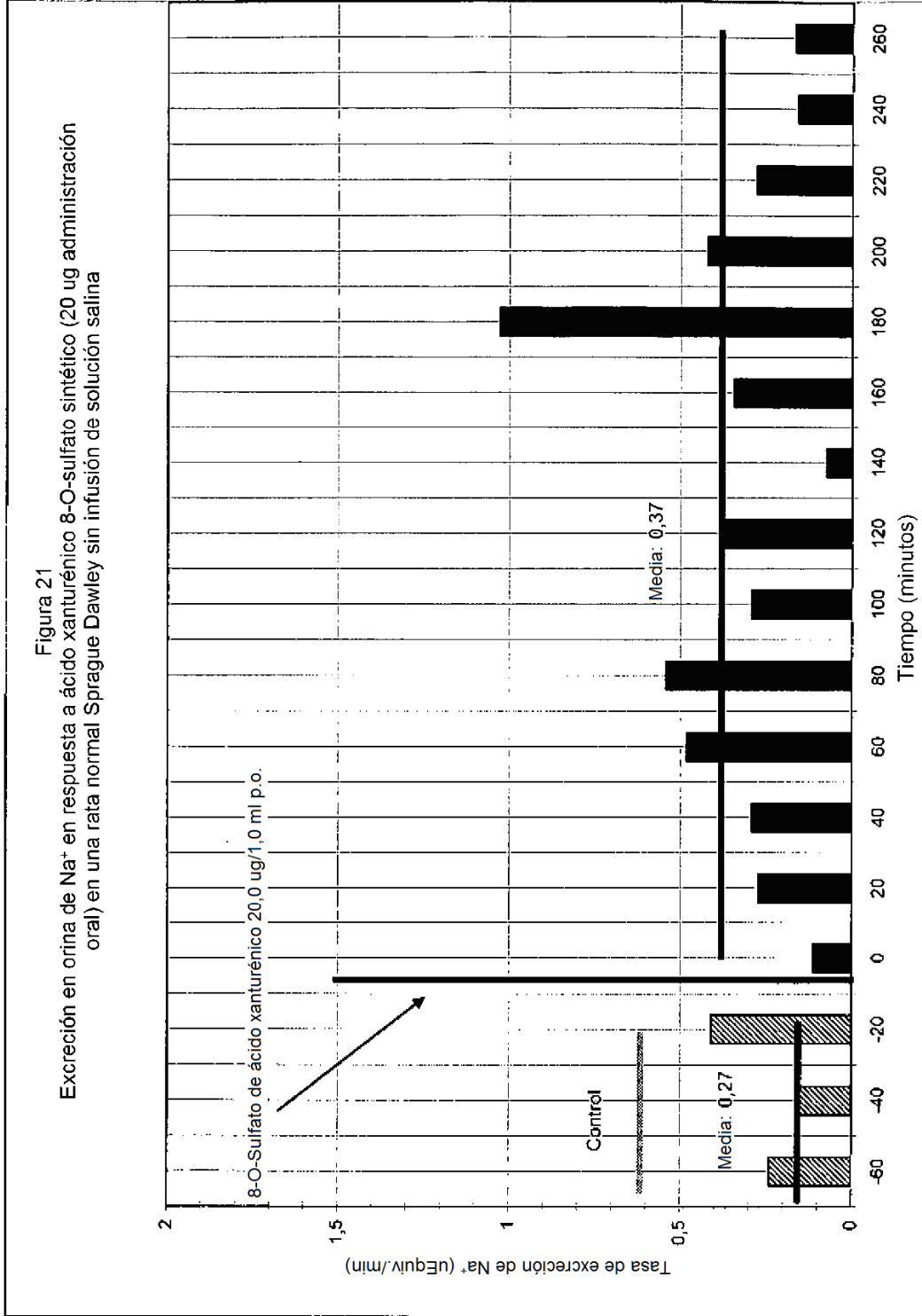


Figura 19
Concentración de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a 8-sulfato de ácido xanturénico aislado
en una rata urémica Sprague Dawley (2,0 ug i.v.)







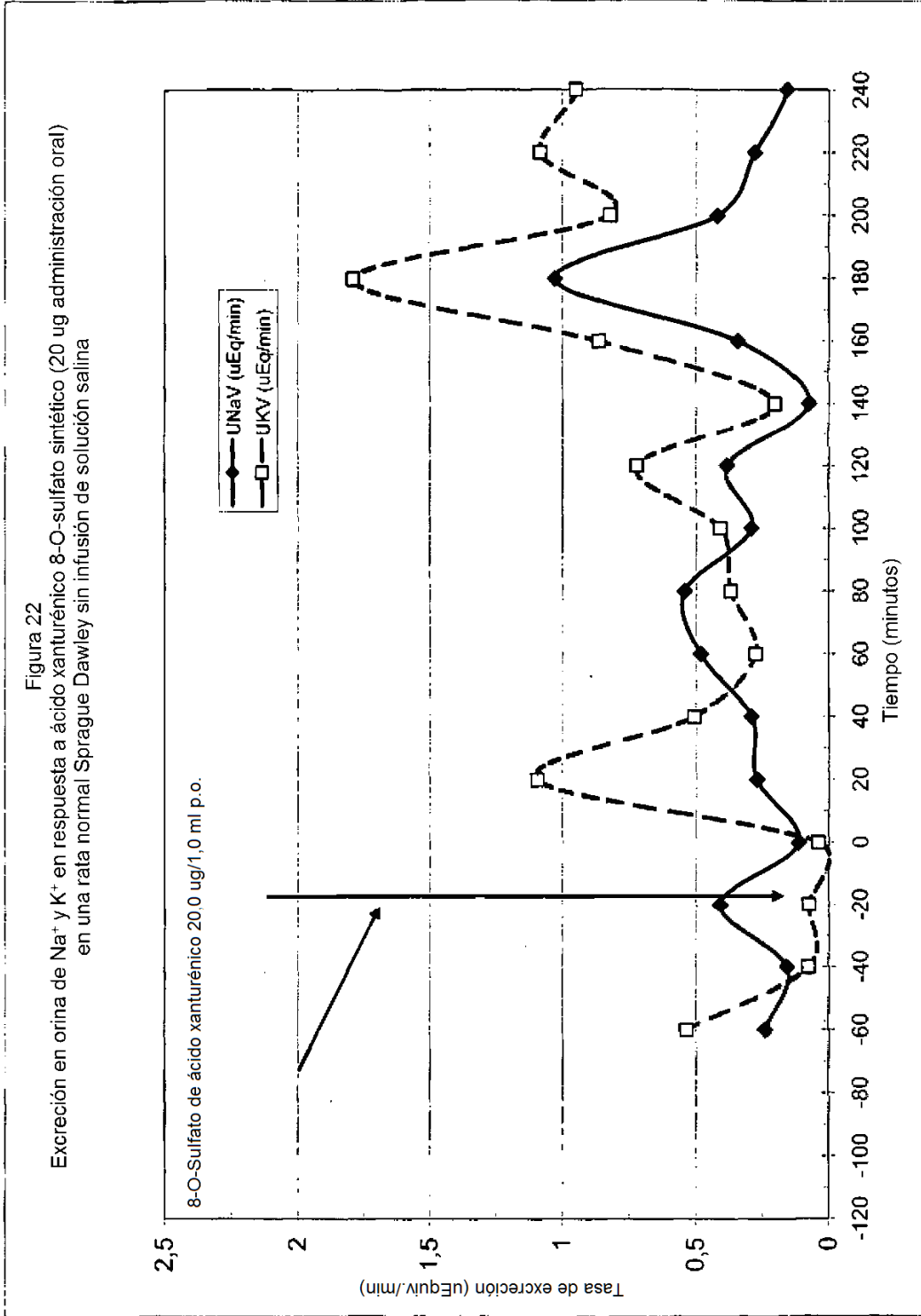


Figura 23
 Concentración de Na⁺ y K⁺ en orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-sulfato sintético (20 ug administración oral) en una rata normal Sprague Dawley sin infusión de solución salina

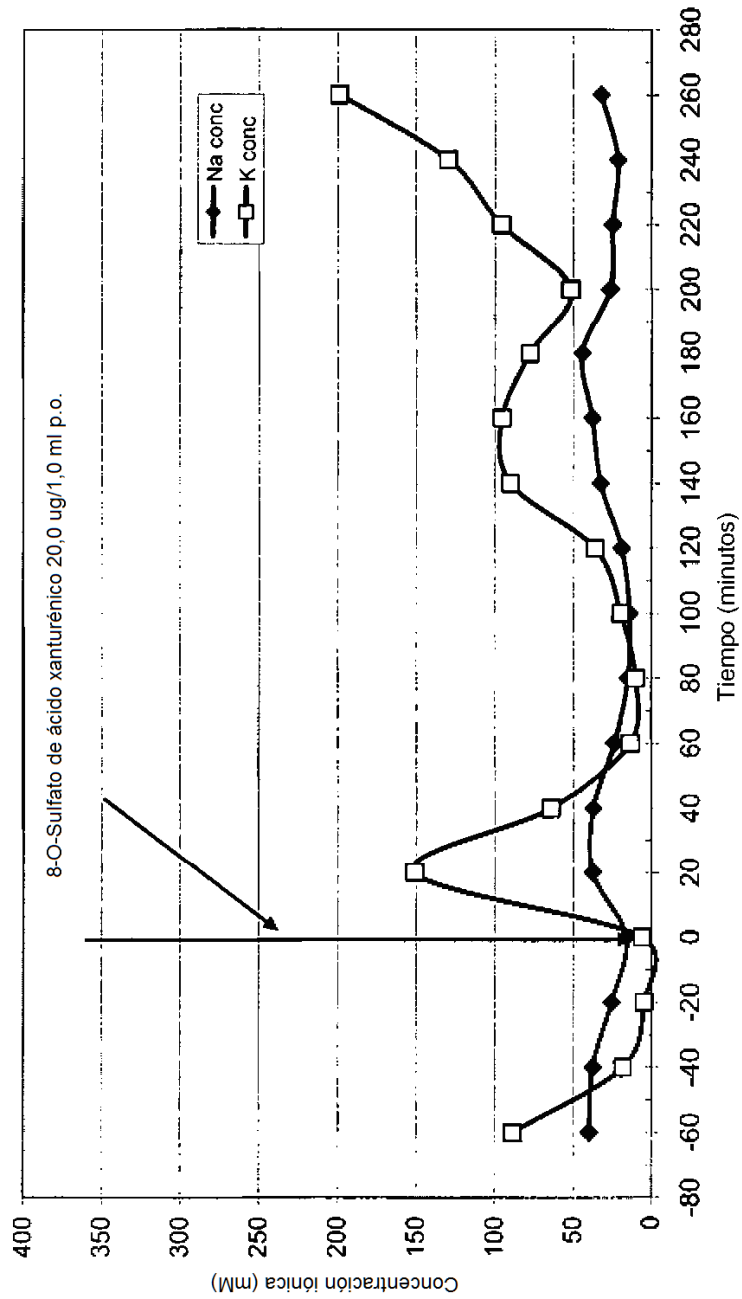


Figura 24
 Volumen de orina en respuesta a ácido xanturénico 8-O-sulfato sintético (20 ug administración oral)
 en una rata normal Sprague Dawley sin infusión de solución salina

