

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 281**

21 Número de solicitud: 201131785

51 Int. Cl.:

A61K 31/40 (2006.01)

C07D 207/34 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

08.11.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.06.2013

Fecha de la concesión:

24.04.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

05.05.2014

73 Titular/es:

**CIBERES CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS (50.0%)**

**Ctra. de Sóller Km. 12, Recinto Hospital Joan
March**

07100 BUNYOLA (Illes Balears) ES;

SERVICIO CANARIO DE SALUD (25.0%) y

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (25.0%)

72 Inventor/es:

CABRERA BENÍTEZ, Nuria Esther;

RAMOS NUEZ, Ángela M^a;

VILLAR HERNÁNDEZ, Jesús y

PADRÓN CARRILLO, José Manuel

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **USO DE UN COMPUESTO QUÍMICO DERIVADO DE UN PIRROL 1,2,3,5-TETRASUSTITUIDO EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS QUE CURSAN CON PROCESOS APOPTÓTICOS CELULARES.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso de compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos junto con excipientes farmacéuticamente aceptables en la elaboración de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares, preferiblemente producidas por sepsis por bacterias Gram-negativas. Comprenden enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica o traumas. La invención también comprende la composición farmacéutica para el tratamiento de dichas enfermedades.

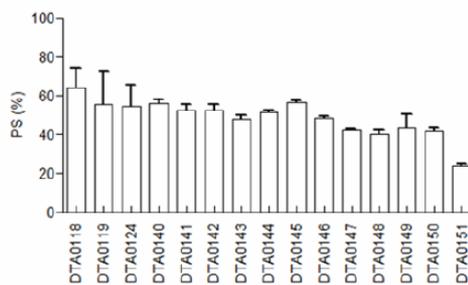


Fig. 1

ES 2 408 281 B1

DESCRIPCIÓN

Uso de un compuesto químico derivado de un pirrol 1,2,3,5-tetrasustituido en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares.

CAMPO DE LA INVENCÓN

5 La presente invención se refiere a unos compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos que han mostrado actividad anti-inflamatoria y anti-apoptótica. Se trata de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades que sintetizan mediadores celulares pro-inflamatorios y que cursan con apoptosis. La presente invención está comprendida en el campo de fármacos aptos para el tratamiento de dichas enfermedades, en medicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN

10 En la técnica existen diversos compuestos con capacidad para disminuir los efectos producidos por acción de los Lipopolisacáridos (LPS) de la bacteria E. Coli, agente causante y más frecuente del Síndrome de la Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) provocado por una infección (Sepsis). Es el caso del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) cuya formulación química es (3E, 4E)-3-bencilideno-4-(3,4,5-trimetoxibencilideno)idina pirrol-2,5-diona, que administrado anteriormente a la inyección de LPS protege contra sus efectos letales. Otro ejemplo puede encontrarse en los derivados benzofuranil-pirrol y benzotiofenilo-pirrol, que muestran un efecto inhibitorio en la proliferación de Linfocitos B inducida por LPS.

15 Un tercer ejemplo lo representa el compuesto Sunitinib (comercializado como Sutent) de formulación química N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-ildine)metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3 carboxamida, que ha sido empleado de manera simultánea para el tratamiento de carcinoma de células renales y para tumores de estroma gastrointestinal. En los modelos de cáncer, el fármaco es quien produce la apoptosis o muerte de la célula cancerosa, es pro-apoptótico; Sunitinib produce la apoptosis de carcinoma de células renales. En el modelo de la presente invención, el LPS de E. Coli es quien produce el proceso séptico y éste su vez el proceso inflamatorio, mientras que los compuestos pirrólicos son anti-apoptóticos, previenen el proceso apoptótico.

20 Las pirimidinas (imatinib, dasatinib, nilotinib y pazopanib), las piridinas (sorafenib) y los pirroles (sunitinib) son inhibidores Tirosin-kinasas con alta actividad hacia varias familias de Tirosin-kinasas receptoras y no-receptoras involucradas en angiogénesis, crecimiento tumoral y progresión del cáncer metastásico (Di Gion P, Kanefendt F et al, Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles. Clin Pharmacokinet. 2011;50(9):551-603). Con respecto al Sunitinib, que es un compuesto pirrólico, su mecanismo de acción radica en la inhibición de las señales celulares por unión a múltiples receptores de tirosina quinasa (RTKs) (Faivre S, Demetri G et al; Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. Nat Rev Drug Discov 2007;6(9):734-45).

25 Existen varios documentos que relacionan el uso de compuestos pirrólicos en la prevención y tratamiento de determinadas patologías. Las siguientes dos publicaciones suponen las divulgaciones de la técnica más cercanas a la invención.

30 La solicitud KR 2009/0058752 A describe el uso de unos compuestos pirrólicos para la prevención y tratamiento de las enfermedades bronquiales, inflamación, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis, dermatitis atópica, leucemia, cáncer, desórdenes cerebrales, depresión y enfermedad de Alzheimer. Los compuestos pirrólicos de la publicación actúan inhibiendo la Fosfodiesterasa-4 (PDE-4), una hidrolasa que cataliza la ruptura de los enlaces fosfodiéster, lo que supone un mecanismo de acción totalmente independiente del que presentan los compuestos descritos en la presente invención frente a enfermedades que cursan con apoptosis. Además de que los compuestos presentan distinta actividad, la generalidad de las enfermedades inflamatorias enumeradas en la publicación no anticipa el mecanismo particular de las que cursan con procesos apoptóticos. La actividad anti-apoptótica de los compuestos pirrólicos de la invención no está descrita en la publicación, cuyas enseñanzas divergen y por tanto no queda sugerido el uso descrito en la presente solicitud.

35 La solicitud internacional WO 2005054191 A describe la utilidad de unos compuestos pirrólicos en el tratamiento del dolor inflamatorio, el dolor neuropático, desórdenes renales, fiebre, enfermedades inmunológicas, enfermedades anormales de la función plaquetaria y enfermedades óseas por medio de una actividad antagónica de los receptores de las prostaglandinas PGE2. Las prostaglandinas son un conjunto de sustancias de carácter lipídico derivadas de los ácidos grasos eicosanoides, y el mecanismo de acción descrito en la publicación es de nuevo distinto al utilizado por los compuestos de la invención, que resulta muy exclusivo para enfermedades que cursan con apoptosis. La publicación internacional no describe que sus compuestos pirrólicos presenten ninguna actividad anti-apoptótica, ni queda sugerido para el experto el uso de los compuestos de la invención en los procesos antiapoptóticos descritos en la presente solicitud.

40 El problema que se plantea entonces en la técnica es encontrar una terapia farmacológica efectiva para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares y sepsis, ya que

actualmente la terapéutica del paciente séptico se restringe a pautas como la administración de oxígeno suplementario, intubación orotraqueal y ventilación mecánica, y todavía se desconoce una farmacología exclusiva. La solución que plantea la presente invención es la utilización de unos compuestos derivados pirrólicos que resultan eficientes para el tratamiento de este tipo de patologías.

5

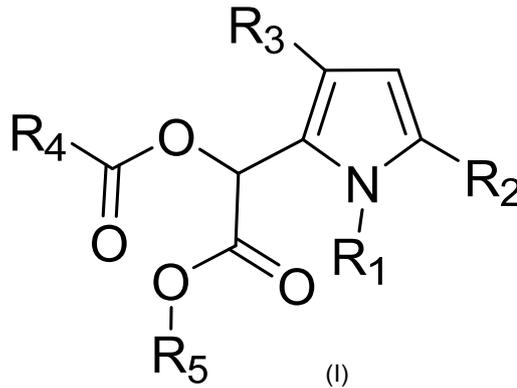
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención es el uso de un compuesto químico derivado de un pirrol 1,2,3,5-tetrasustituido de fórmula (I):

10

15

20



25 donde

- R1 es una cadena alifática C₁-C₄, sustituida o no sustituida, preferiblemente sustituida con un fenilo o con un grupo furano,
- R2 es un éster metílico o etílico,
- R3 es fenilo, bifenilo, metilfenilo, bencilfenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos, preferiblemente sustituido con un halógeno y más preferiblemente cloro,
- R4 es fenilo, bifenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos, preferiblemente sustituido con un halógeno y más preferiblemente cloro,
- R5 es H o un alquilo C₁-C₃, preferiblemente metilo,

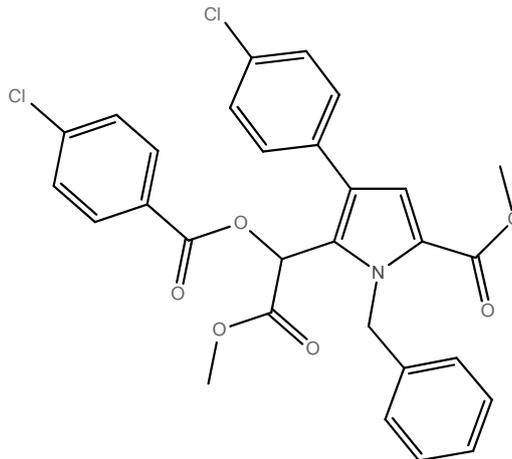
30

35

en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares, preferiblemente producidas por sepsis.

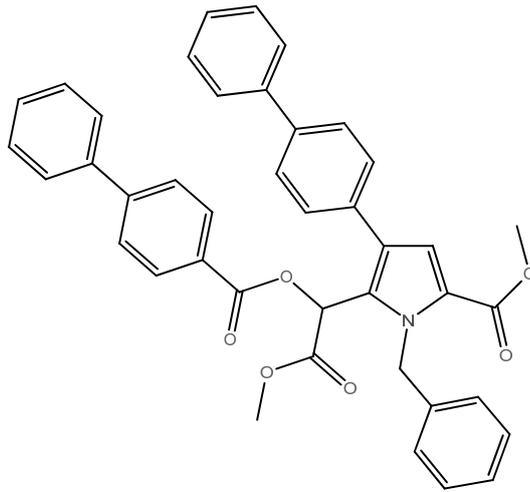
Una realización muy preferible es que el compuesto de la invención sea el metil 1-bencil-5-(1-(4-clorobenzoiloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0118**):

40

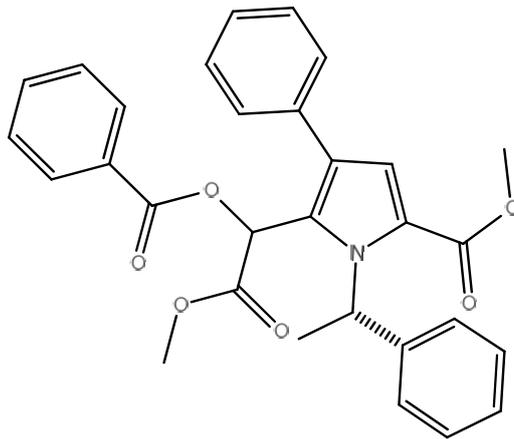


45

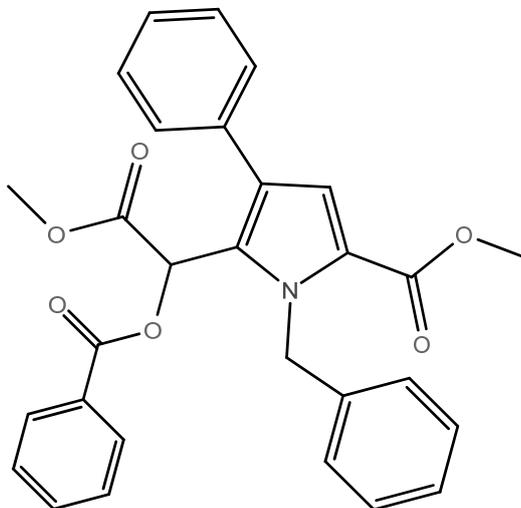
Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 1-bencil-4-(bifenil-4-il)-5-(1-(bifenilcarboniloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0119**):



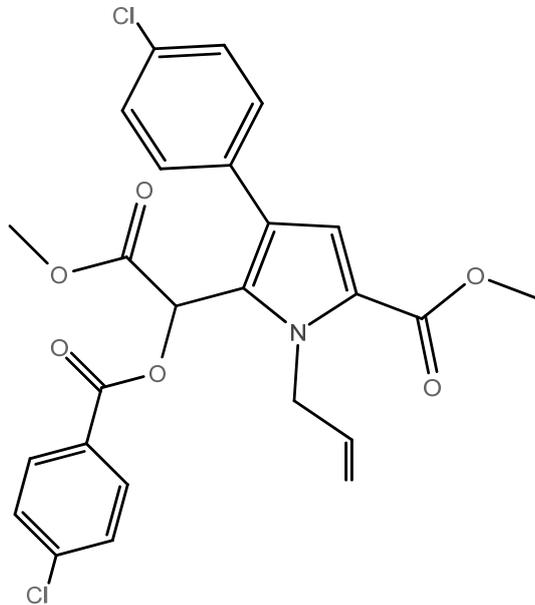
- 5 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 5-(1-(benzoiloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-4-fenil-1-((S)-1-feniletil)-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0124**):



- 10 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 5-(1-(benzoiloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-1-bencil-4-fenil-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0140**):

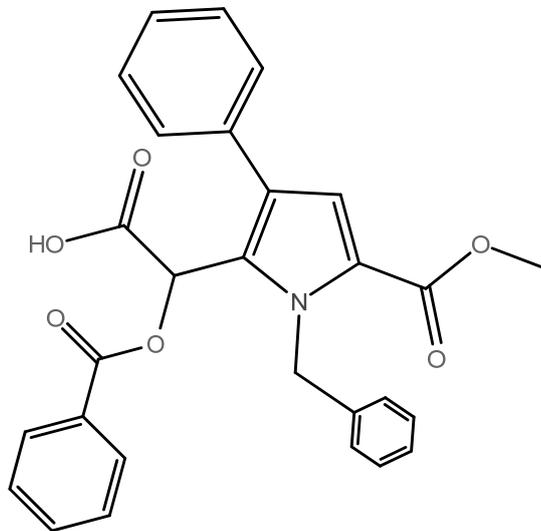


Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 1-aliil-5-(1-(4-clorobenzoiloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0141**):



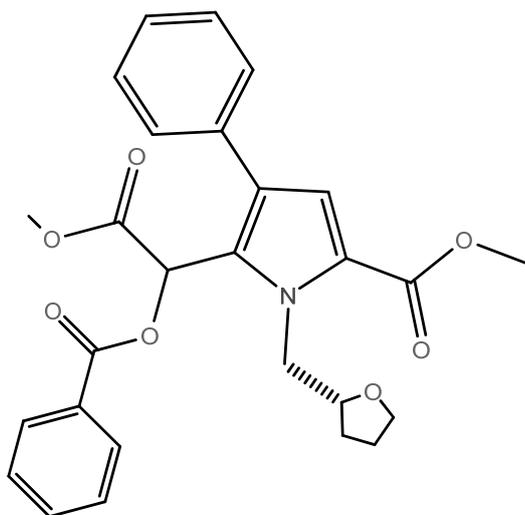
5

Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el ácido 2-(benzoiloxi)-2-(1-bencil-5-(metoxicarbonil)-3-fenil-1H-pirrol-2-il)acético (**DTA0142**):

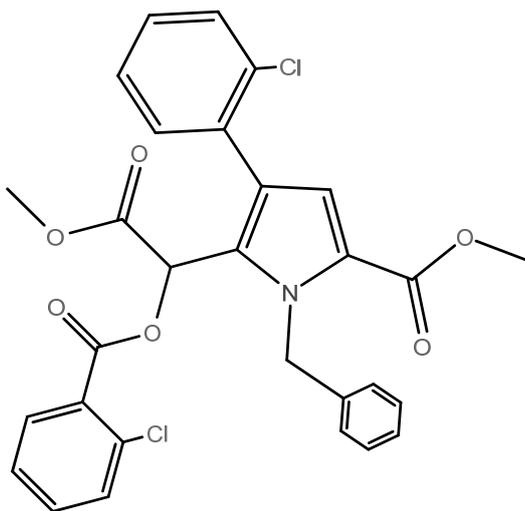


10

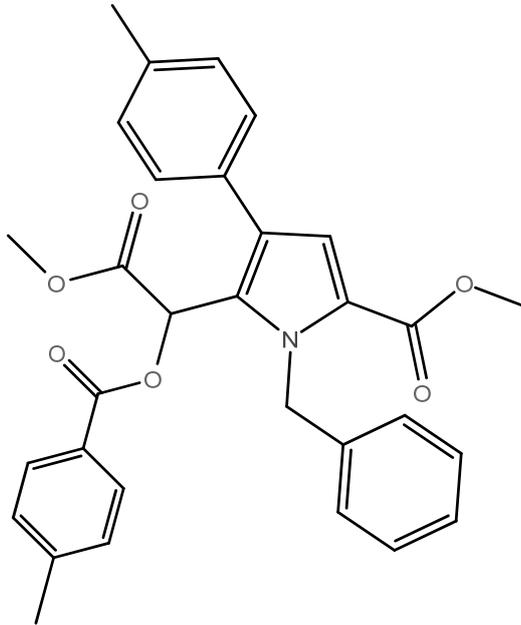
Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 5-(1-(benzoiloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-4-fenil-1-(((R)-tetrahidrofurano-2-il)metil)-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0143**):



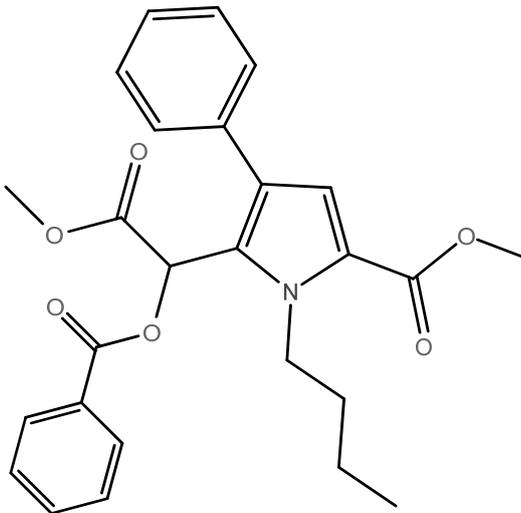
- 5 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 1-bencil-5-(1-(2-clorobenzoiloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-4-(2-clorofenil)-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0144**):



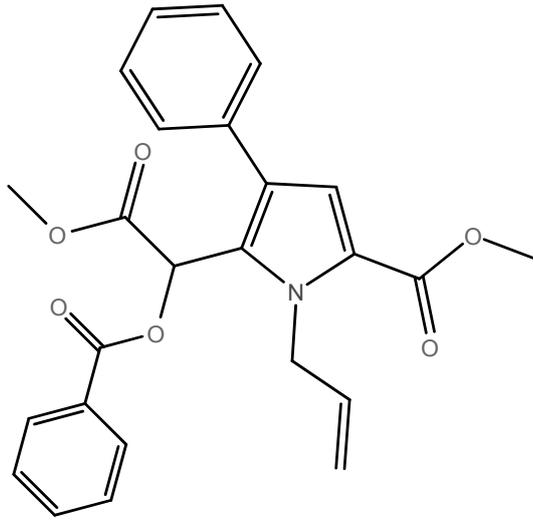
- 10 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 1-bencil-5-(2-metoxi-1-(4-metilbenzoiloxi)-2-oxoetil)-4-p-tolilo-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0145**):



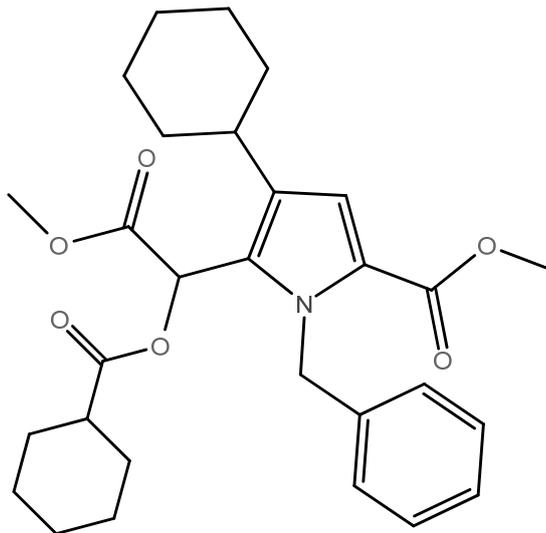
- 5 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 5-(1-(benzoiloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-1-butil-4-fenil-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0146**):



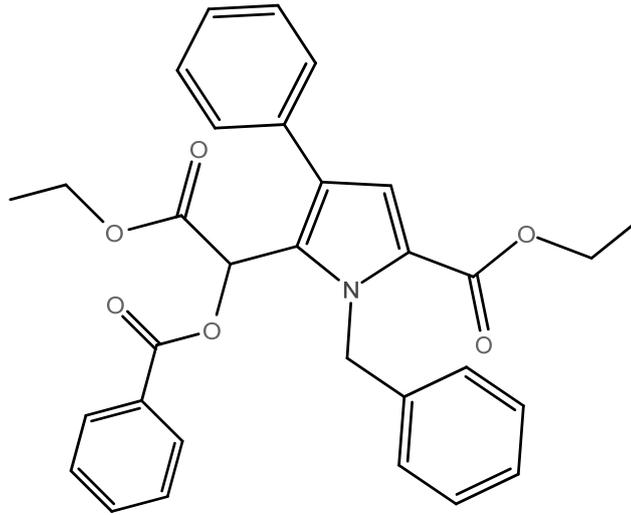
- 10 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 1-alilo-5-(1-(benzoiloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-4-fenil-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0147**):



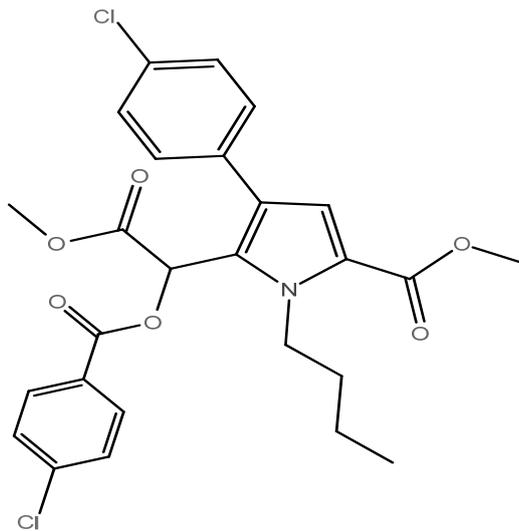
- 5 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 1-bencil-5-(1-(ciclohexanocarboxilo)-2-metoxi-2-oxoetil)-4-ciclohexil-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0148**):



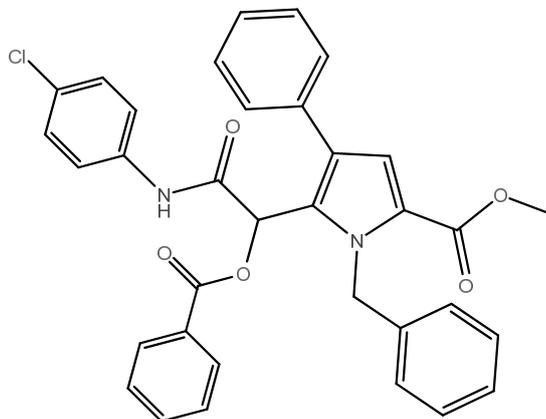
- 10 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el etil 5-(1-(benzoiloxi)-2-etoxi-2-oxoetil)-1-bencil-4-fenil-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0149**):



- 5 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 1-butil-5-(1-(4-clorobenzoiloxi)-2-metoxi-2-oxoetil)-4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0150**):



- 10 Otra realización muy preferible es que dicho compuesto sea el metil 5-(1-(benzoiloxi)-2-(4-clorofenilamino)-2-oxoetil)-1-bencil-4-fenil-1H-pirrol-2-carboxilato (**DTA0151**):



Los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos de la presente invención poseen actividad anti-inflamatoria y anti-apoptótica, y son capaces de disminuir los efectos anti-proliferativos, inflamatorios y apoptóticos inducidos por LPS de bacterias Gram-negativas sobre la línea celular A549. De la misma manera, la prevención al proceso apoptótico se acompañó de una inhibición del aumento de expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y una inhibición de la disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Asimismo, ninguno de los efectos inducidos por los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos de la invención en la inhibición del aumento de expresión de las proteínas TLR4 y Bax y la disminución de la proteína inhibidora del factor de transcripción NF-κB y de la proteína Bcl-2 inducidos por LPS se modificaron cuando estos compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos se usaron conjuntamente con el inhibidor Tirosin Kinasa (Genistein, Calbiochem®). Esto implica en el proceso el mecanismo de acción inflamatorio TLR4-IκBα y el mecanismo de acción apoptótico Bax-Bcl-2.

Una realización preferible es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según la invención, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares, preferiblemente producidas por sepsis.

La administración preferible de la composición farmacéutica de la invención es vía intravenosa, pero también se puede administrar por vía oral, muscular o intramuscular. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la invención está presentada en una unidad de dosificación.

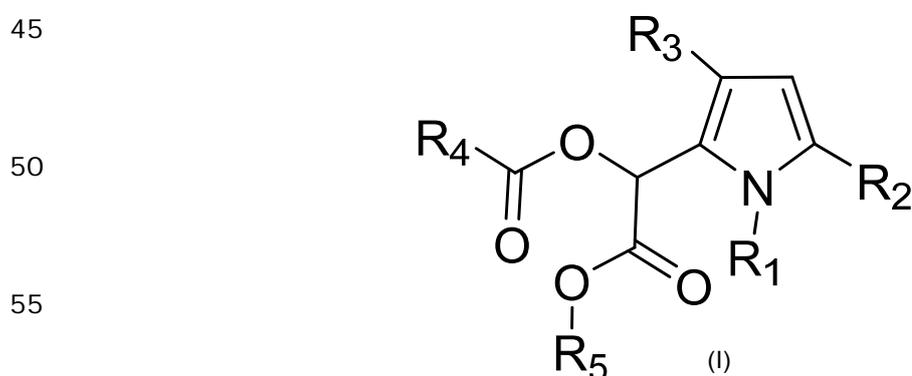
Otra realización preferible es la composición farmacéutica de la invención junto con excipientes farmacéuticamente aceptables y al menos otro agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares, más preferiblemente producidos por sepsis. En otra realización preferible más, dicha sepsis está causada por bacterias, preferiblemente bacterias Gram-negativas.

En el ámbito de la presente invención, se entiende por enfermedades inflamatorias "que cursan con procesos apoptóticos celulares" a aquellas enfermedades que en las que dicho proceso apoptótico es uno de los factores determinantes y causa preferente de la patogénesis de la enfermedad. Por "apoptosis" se entiende "muerte celular programada".

De forma que una realización más de la invención es que dichas enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos comprenden la sepsis en patologías de infecciones renales, peritonitis séptica, hepatitis aguda, disfunción miocárdica aguda inducida por shock séptico o enterocolitis necrotizante; enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica o traumas. Todas ellas son patologías con un proceso inflamatorio severo pudiéndose originar daño alveolar difuso, perjuicio en la perfusión ventilatoria, severa hipoxemia y disminución de la capacidad pulmonar.

En el ámbito de la presente invención se entiende por "hipoxemia" a la disminución anormal de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial.

Otra realización más de la invención es un compuesto químico derivado de un pirrol 1,2,3,5-tetrasustituído de fórmula (I):



donde

- R1 es una cadena alifática C₁-C₄, sustituida o no sustituida, preferiblemente sustituida con un fenilo o con un grupo furano,
- R2 es un éster metílico o etílico,
- R3 es fenilo, bifenilo, metilfenilo, bencilfenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos, preferiblemente sustituido con un halógeno y más preferiblemente cloro,
- R4 es fenilo, bifenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos, preferiblemente sustituido con un halógeno y más preferiblemente cloro,

- R5 es H o un alquilo C₁-C₃, preferiblemente metilo, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares, preferiblemente producidas por sepsis.

- 5 Otra realización de la invención es un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria que comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la invención a un sujeto, preferiblemente humano, en necesidad de dicho tratamiento.

10 Los compuestos de la invención son útiles para preparar composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades que sintetizan mediadores celulares pro-inflamatorios y que cursan con apoptosis, como es el caso de sepsis, enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica, traumas. Recientes estudios han proporcionado la información de que un incremento del proceso apoptótico celular seguido de un proceso inflamatorio son pasos esenciales en el desarrollo de patologías como la Lesión Pulmonar Aguda (ALI) y Síndrome del Distrés Respiratorio Agudo (ARDS). Está documentado clínicamente el desarrollo patológico de ALI seguido a trauma, shock séptico y neumonía (Chopra M, Reuben JS, Sharma AC; Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. *Exp Biol Med* (Maywood) 2009 234(4):361-71). ALI es una complicación frecuente seguida del proceso séptico en pacientes críticos pertenecientes a las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y puede asociarse a elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992 20:864-874).

25 La actividad de Tirosin-kinasas se ha implicado en la patofisiología de muchas enfermedades asociadas a inflamación local como arteroescloeriosis o psoriasis, o sistémicas incluyendo sepsis y shock séptico (Levitzki and Gazit A; Tyrosine kinase inhibition: An approach to drug development. *Science* 1995; 267:1782-8). Como en la técnica ya está descrito que el compuesto denominado Sunitinib N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-ildine)metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3 carboxamida inhibe las señales celulares por unión a múltiples receptores de tirosina quinasa (RTKs), los inventores trataron la línea celular A549 con Genistein (Calbiochem, Darmstadt), que inhibe proteínas Tirosin-kinasas. El resultado fue que los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos actúan por un mecanismo independiente a inhibidores Tirosin-kinasas en la prevención de los efectos inducidos por LPS de *E. Coli*, tal como se muestra en el Ejemplo 8 de la presente solicitud.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **Figura 1:** Muestra el porcentaje de supervivencia por los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos de la invención. La línea celular A549 (línea celular humana epitelial pulmonar) fue cultivada en Multiwell de 96 pocillos y tratada durante 18 horas con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* sólo o en combinación con 100 microM de cada uno de los pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos (Compuestos 1-15). Los resultados están expresados como la media de todos ellos más la desviación estándar. Una vez transcurridos 18 horas de tratamiento, el conteo celular fue estimado por medio del ensayo Sulforodamina B siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. El porcentaje de supervivencia celular es expresado como el porcentaje de células tratadas con LPS de *E. Coli* y células tratadas con LPS de *E. Coli* más cada uno de los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos. Cada punto representa la media ± S.E.M. procedente de cuatro Wells idénticas.

Figura 2: muestra las formulaciones químicas de las quince realizaciones preferibles de los pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos según la invención.

45 **Figura 3:** muestra los cambios morfológicos de la línea celular A549 tratada o no con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* sólo o en combinación con 100 microM del compuesto DTA0118 como representativo. Los paneles superiores corresponden al objetivo 10X y los paneles inferiores corresponden al objetivo 20X. C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas; DTA0118 = Línea celular A549 tratada con 300 µgr/ml de LPS de *E. Coli* más 100µM de DTA0118 durante 18 horas.

50 **Figura 4:** muestra el ensayo de las concentraciones de Interleukina-6 (**4a**) e Interleukina-8 (**4b**) en el sobrenadante de las células A549 tratadas o no durante 18 horas con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* sólo o en combinación con 100 microM de cada uno de los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos (Compuestos 1-15), expresados los resultados como la media de todos ellos más la desviación estándar, por medio del ensayo CBA siguiendo las normas del fabricante. Los datos son representados como la media ± S.E.M. procedente de tres experimentos diferentes. C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas; Compuestos 1-15= Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* más 100 microM de los 15 compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos objeto de la presente invención durante 18 horas. ** p<0.01 vs. C; # p<0.05 vs. LPS.

60 **Figura 5:** muestra cómo los cambios en la expresión de las proteínas TLR4 e Iκβα inducidos por LPS de *E. Coli* son inhibidos por los compuestos pirrólicos 1,2,3,5-tetrasustituídos. La línea celular A549 fue incubada durante 18 horas con o sin 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* en combinación o no con 100 microM de los 15 compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos (Compuestos 1-15) objeto de la presente invención. Seguido a los tratamientos, las proteínas totales fueron preparadas para su análisis empleando Western Blot y usando anticuerpos dirigidos contra

las proteínas TLR4, I κ B α , β -actina (usada como control de carga proteica). **(5a)** Electroforesis representativas de las proteínas TLR4 e I κ B α en cada una de las condiciones experimentales. **(5b)** Histogramas que muestran los cambios en los niveles de expresión de las proteínas TLR4 e I κ B α normalizados en función del control de carga β -actina. Los resultados mostrados proceden de 3 experimentos independientes. C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas; Compuestos 1-15= Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* más 100 microM de los 15 compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos objeto de la presente invención durante 18 horas. *** p<0,001 vs. C; ¶ p<0,001 vs. LPS de *E. Coli*.

Figura 6: muestra la prevención en el proceso apoptótico de los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos (Compuestos 1-15), inducida por 300 microg/ml de LPS de *E. Coli*. **(6a)** Diagramas representativos usando el compuesto DTA0118 mostrando poblaciones celulares apoptóticas y bajo muerte celular detectadas por tinción AnexinaV-FITC (Anexina V) e Ioduro de Propidio (IP). **(6b)** Porcentajes de apoptosis temprana y muerte de las células A549 bajo todas las condiciones experimentales. **(6c)** Análisis de microscopía fluorescente de células apoptóticas teñidas con Hoechst 33258. Las células A549 tratadas con 300 microg/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas mostraron una condensación de la cromatina nuclear y fragmentación nuclear que fue prevenida por el co-tratamiento con los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos. Las imágenes fueron captadas mediante objetivo 40x. **(6d)** Cuantificación de apoptosis que muestra el porcentaje de células apoptóticas en cada condición experimental. C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas; Compuestos 1-15= Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* más 100 microM de los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos objeto de la presente invención durante 18 horas. DTA0118= Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* más 100 microM del compuesto DTA0118 durante 18 horas. ** p<0,01 vs. C; *** p<0,001 vs. C; # p<0,05 vs. LPS de *E. Coli*; ¶ p<0,001 vs. LPS de *E. Coli*.

Figura 7: muestra electroforesis representativas **(7a)** y los valores densitométricos de las proteínas Bax y Bcl-2 normalizados en función del control de carga β -actina **(7b)** cuando las células A549 fueron tratadas o no durante 18 horas con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* sólo o en combinación con 100 microM de los 15 compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos (Compuestos 1-15) objeto de la presente invención. **(7c)** Alteraciones en el rango de las proteínas Bax/Bcl-2 normalizadas en función de β -actina en todas las condiciones experimentales objeto de estudio. No hay diferencias estadísticas entre los grupos experimentales. C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas; Compuestos 1-15= Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* más 100 microM de los 15 compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos objeto de la presente invención durante 18 horas. ** p<0.01 vs. C; *** p<0,001 vs. C; ¶ p<0.01 vs. LPS de *E. Coli*.

Figura 8: muestra el efecto de Genistein (Gen) sólo o en combinación con los compuestos pirrólicos 1,2,3,5-tetrasustituidos (Compuestos 1-15, C1-15), a su vez, en combinación o no con LPS de *E. Coli* en los niveles de expresión de las proteínas TLR4, I κ B α , Bax y Bcl-2 de células A549 tratadas con las condiciones experimentales mencionadas durante 18 horas. En el panel **(8a)** se muestran geles representativos correspondientes a las proteínas de estudio (TLR4, I κ B α , Bax y Bcl-2) y en el panel **(8b)** se muestran los histogramas mostraron los cambios en los niveles de expresión de las proteínas TLR4, I κ B α , Bax y Bcl-2 normalizados en función del control de carga β -actina. En esta figura, la línea celular A549 se trató con el inhibidor Genistein (30 μ M) durante 30 min a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se incubó con LPS de *E. Coli* (300 μ g/ml) sólo o en combinación con compuestos pirrólicos 1,2,3,5-tetrasustituidos objeto de la presente invención (100 μ M) durante 18 horas. Los datos se expresan como media \pm S.E.M. de determinaciones triplicadas y se expresan en función de las células control (sin tratamiento y sin estimulación con LPS de *E. Coli*). C=Control línea celular A549; GEN= Línea celular A549 tratada con 30 microM del inhibidor Genistein durante 30 minutos; C+=Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas; +GEN= Línea celular A549 tratada con 30 microM del inhibidor Genistein durante 30 minutos y posteriormente con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas; +Compuestos 1-15= Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* más 100 μ M de los 15 compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos objeto de la presente invención durante 18 horas; +GEN+Compuestos 1-15= Línea celular A549 tratada con 30 microM del inhibidor Genistein durante 30 minutos y posteriormente con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* en combinación con 100 μ M de los 15 compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos objeto de la presente invención durante 18 horas. ** p<0.01 vs. C; *** p<0,001 vs. C; # p<0.05 vs. LPS; ¶ p<0,001 vs. LPS.

Figura 9: muestra los cambios morfológicos de la línea celular A549 tratada o no con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* sólo o en combinación con 30 microM de Genistein, a su vez, sólo o en combinación con 100 microM del compuesto DTA0118. Los paneles superiores corresponden al objetivo 20X y los paneles inferiores corresponden al objetivo 40X. En esta figura, C=Control línea celular A549; GEN= Línea celular A549 tratada con 30 microM del inhibidor Genistein durante 30 minutos; C+=Línea celular A549 tratada con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas; +GEN= Línea celular A549 tratada con 30 microM del inhibidor Genistein durante 30 minutos y posteriormente con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas; +DTA0118= Línea celular A549 tratada con 300 microg/ml de LPS de *E. Coli* más 100 microM del compuesto +GEN+DTA0118 = Línea celular A549 tratada con 30 microM del inhibidor Genistein durante 30 minutos y posteriormente con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* en combinación con 100 microM del compuesto representativo DTA0118 durante 18 horas.

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE**Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos.**

Se sintetizaron los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos a partir del método simple publicado en el trabajo desarrollado por D. Tejedor et al. "From conjugated tertiary skipped diynes to chain-functionalized tetrasubstituted pyrroles" (Chemistry: A European Journal, 2009, 15(4), 838-842). En este artículo se explica la síntesis de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos con cadenas funcionalizadas mediante un proceso secuencial que supone una aza-adición de Michael, una ciclación 5-endo-digonal y un reordenamiento [3,3]-sigmatrópico, a partir de alquil propiolatos, cloruros de ácido y aminas primarias.

Ejemplo 2. Actividad antimicrobiana de los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos.

Se determinó la actividad anti-microbiana en bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y bacterias Gram-negativas *Escherichia Coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Las especies bacterianas fueron crecidas en placas de agar a 37°C. Después de 24 horas de incubación, las especies fueron resuspendidas en solución salina a una concentración de 5×10^5 cfu/ml. La actividad antimicrobiana de los compuestos pirrólicos fue determinada en placas de 96 pocillos usando el medio Mueller Hinton broth (Dalhoff A, Stubbings W, Schubert S. Comparative in vitro activities of the novel antibacterial flinofloxacin against selected Gram-positive and Gram-negative bacteria tested in Mueller-Hinton broth and synthetic urine. Antimicrob Agents Chemother 2011 55(4):1814-8). Se incluyeron controles estériles y con crecimiento adecuado. Cada compuesto pirrólico fue testado por duplicado a ocho diferentes soluciones seriadas desde 0,05 a 100 microM. Las placas de 96 pocillos fueron incubadas a 37°C en una cámara oscura y húmeda. Después de la incubación, las especies fueron precipitadas en 25 microlitros de TCA (Ácido tricloroacético) al 50% w/v y fijadas durante 60 minutos a 4°C. Después, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan, P. et al., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990 (82) 1107-1112. Después del ensayo se agitaron las placas y mediante espectrofotometría (BioTek's PowerWave XS Absorbance Microplate Reader) se obtuvieron valores de densidad óptica a 630 nanómetros después de 24 horas de incubación. Con los resultados obtenidos de la espectrofotometría se obtuvo el valor MCI (mínima concentración inhibitoria) establecido como la concentración del compuesto que inhibió el crecimiento total cuando se comparó con las especies no tratadas. Todos los compuestos derivados de pirroles sustituidos resultaron inactivos, con valores MCI superiores a 100 microM.

Ejemplo 3. Actividad antifúngica de los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos.

Se determinó la actividad anti-fúngica en las especies fúngicas *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida nivariensis* (5937-63) y *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Las especies fúngicas fueron crecidas en placas de agar a 37°C. Después de 24 horas de incubación, fueron resuspendidas en solución salina a una concentración de 1×10^3 a 5×10^3 . La actividad antifúngica de los compuestos fue determinada en placas de 96 pocillos usando el medio RPMI-1640 tamponado con solución MOPS para las especies fúngicas. Se incluyeron controles estériles y con crecimiento adecuado. Cada compuesto fue testado por duplicado a ocho diferentes soluciones seriadas desde 0,05 a 100 microM. Las placas de 96 pocillos fueron incubadas a 37°C en una cámara oscura y húmeda. Después de la incubación, las especies fueron precipitadas en 25 microlitros de TCA al 50% w/v y fijadas durante 60 minutos a 4°C. Después, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan et al. según el Ejemplo 2. Después del ensayo, se agitaron las placas y mediante espectrofotometría (BioTek's PowerWave XS Absorbance Microplate Reader) se obtuvieron valores de densidad óptica a 490 nanómetros después de 48 horas de incubación. Con los resultados obtenidos de la espectrofotometría se obtuvo el valor MCI. Todos los compuestos derivados de pirroles sustituidos resultaron inactivos, con valores MCI superiores a 100 microM.

Ejemplo 4: Actividad citotóxica de los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos.

Se determinó la actividad citotóxica en las líneas celulares HeLa (línea celular humana de cáncer de cérvix), Ishikawa (línea celular humana de cáncer de endometrio uterino), SW1573 (línea celular humana de cáncer epitelial pulmonar), T-47D (línea celular humana de cáncer de pecho), WiDr (Línea celular humana de cáncer de colon) y A549 (línea celular humana procedente del epitelio alveolar pulmonar). Las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo celular de 25 cm² en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con el 5% de suero fetal bovino y 2 milim de glutamina en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire húmedo. Las células en crecimiento exponencial fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo que contiene 100 unidades de penicilina y 0,1 miligramos de estreptomycin por mililitro. Se contó la suspensión celular con un porcentaje superior al 97% de viabilidad por la técnica de exclusión y de tinción Azul Tripán. Después del conteo, se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10^4 (para la línea celular SW1573), $1,5 \times 10^4$ (para las líneas celulares HeLa, Ishikawa y T-47D) y 2×10^4 (para la línea celular WiDr) células por pocillo. Cada compuesto fue testado por triplicado a diferentes diluciones en el rango de 1-100 microM. El tratamiento de los compuestos en los cultivos celulares comenzó un día después de la siembra. El tiempo de incubación de los compuestos fue de 48 horas, después del cual las células fueron precipitadas en 25 microlitros de TCA al 50% w/v y fijadas durante 60 minutos a 4°C. Después, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan según el Ejemplo 2. La densidad óptica de cada pocillo se leyó a

492 nanómetros empleando el espectrofotómetro BioTek's PowerWave XS Absorbance Microplate Reader. El porcentaje de crecimiento (PG) fue calculado con respecto a las células control no tratadas (C) en cada una de las concentraciones de los compuestos basándose en la diferencia de la densidad óptica al comienzo (T_0) y al final (T) de la exposición de los compuestos, según las fórmulas descritas en A. Monks et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J. Natl. Cancer Inst. 1991 (83) 757-766. Se empleó la fórmula $PG = 100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$ cuando T es mayor o igual a T_0 , y la fórmula $PG = 100 \times [(T - T_0)/(T_0)]$ cuando T es menor que T_0 . La concentración a la cual PG es +50, 0 y -50 representa, respectivamente, un 50% de inhibición del crecimiento (GI50), inhibición total del crecimiento (TGI) y 50% de muerte celular (LC50). Por tanto, un valor PG de 0 corresponde a la cantidad de células presente en el comienzo de la exposición al compuesto y valores negativos de PG denotan muerte celular neta. Todos los compuestos derivados de pirroles sustituidos resultaron inactivos, con valores MCI superiores a 100 microM.

Ejemplo 5. Los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos disminuyen los efectos de LPS producidos en la línea celular A549.

Se estimuló la línea celular A549 con 300 microgramos/mililitro de LPS de *E. Coli* en combinación con cada uno de los compuestos a una dosis simple de 100 microM. El tiempo de incubación de los compuestos fue de 18 horas, después del cual las células fueron precipitadas en 25 microlitros de TCA al 50% w/v y fijadas durante 60 minutos a 4°C. Después, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan et al. citado en el Ejemplo 2. La densidad óptica de cada pocillo se leyó a 492 nanómetros empleando el espectrofotómetro BioTek's PowerWave XS Absorbance Microplate Reader y se determinó el porcentaje de supervivencia (PS) con respecto a las células no tratadas (control negativo) y las células tratadas con 300 microgramos/mililitro de LPS de *E. Coli* (control positivo, T_{LPS}) de cada concentración de compuesto (T). Por tanto, el cálculo se desarrolló de la siguiente manera: $PS = 100 \times [(T - T_{LPS})/(C - T_{LPS})]$. Con este cálculo, un valor de PS de 0 corresponde a células tratadas solamente con LPS de *E. Coli* presente al final de la exposición, mientras valores positivos de PS denotan supervivencia celular neta.

De la misma manera, se realizaron nuevos ensayos para comprobar cambios morfológicos inducidos por todos los tratamientos. Para ello, se cultivó la línea celular A549 con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* sólo o en combinación con los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos (Compuestos 1-15) durante 18 horas y se empleó microscopio de contraste de fase (Olympus CK40, Tokyo, Japan) para visualizar los cambios morfológicos.

A partir de los resultados mostrados en la Figura 1 se concluye que todos los compuestos ensayados poseen la capacidad de disminuir los efectos de LPS producidos en la línea celular A549. Los mejores resultados se alcanzaron con los compuesto DTA0118 y DTA0119 con valores de PS de 64% y 55%, respectivamente.

En la Figura 3 se muestra cómo el co-tratamiento con el compuesto DTA0118 previno los cambios morfológicos sufridos por las células A549 tras la incubación con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli*.

Ejemplo 6. Determinación de los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8, IL-1 β y de las proteínas TLR4, IK β , Bax y Bcl-2.

Se cultivó la línea celular A549 en medio de cultivo enriquecido con el 2% de suero fetal bovino durante 24 horas. Posteriormente, se trató el cultivo celular con 300 microgramos/mililitro de LPS de *E. Coli* (serotipo 055: B5, Sigma-Aldrich[®]) junto con 100 microM de los compuestos de la presente invención, durante 18 horas. Pasado ese tiempo se recogió el medio de cultivo en tubos de ensayo Falcon 15 mililitros estériles y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 minutos a 4°C. Después, se recogieron los sobrenadantes de los tubos Falcon 15 mililitros y se añadieron en forma de alícuotas de 500 microlitros en tubos estériles de 1,5 ml. Estos tubos eppendorf se conservaron en congelación a -80°C hasta su uso. Posteriormente, se añadieron 200 microlitros de este medio de cultivo en una placa de ensayo de 96 pocillos y se añadieron los anticuerpos y reactivos del kit comercial de BD Biosciences "Cytometry-based bead array system". El último paso consistió en medir los niveles de expresión de IL-6 e IL-8 mediante ensayo ELISA a un rango de longitud de 633 nanómetros. Los niveles de expresión de la proteína de receptor de membrana TLR4 de la proteína inhibidora del factor de transcripción NF- κ B se midieron mediante Western Blot. Para ello, se realizó electroforesis de cada una de las muestras en geles de SDS-PAGE al 10% durante 2 horas. Después de ello, se realizó la transferencia de los geles SDS-PAGE en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón TBST (*Tris-buffered saline Tween-20*) más 10% de leche carente de contenido graso. Los anticuerpos anti-TLR4 y anti-proteína inhibidora NF- κ B, anti-Bax y anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) se incubaron durante 2 horas en TBST más 5% de leche carente de contenido graso. Después de la incubación durante 2 horas con el anticuerpo primario, se realizó la incubación durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (*Goat Anti-rabbit IgG-HRP*; Santa Cruz Biotechnology Inc.) Se llevó a cabo la detección de las bandas por sistema quimioluminiscente con el kit de GE Healthcare "Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent". Posteriormente, se densitómetró cada banda proteica mediante el software público Scion Image. Cada Western Blot se realizó tres veces con las mismas condiciones experimentales. Para comprobar la homogeneidad de la carga proteica en cada uno de los pocillos, las mismas membranas PVDF se re-incubaron con el anticuerpo primario Beta-actina (Cell Signalling Technology) durante 2 horas y con el mismo anticuerpo secundario y las mismas condiciones experimentales de los anticuerpos anti-TLR4 y anti-proteína inhibidora del factor de transcripción NF- κ B, anti-Bax y anti-Bcl-2. Todos los datos

relacionados con la actividad anti-inflamatoria y anti-apoptótica de los compuestos objeto de la presente invención son expresados como media de los resultados obtenidos para cada compuesto \pm S.E.M. ("Standard error of the mean") y los análisis estadísticos fueron llevados a cabo empleando análisis de la varianza (one-way ANOVA) corregido mediante Test de Bonferroni y empleando el software SPSS (versión 15.0 para Windows). Para los análisis estadísticos de los ensayos Western Blot se empleó la misma metodología pero los datos fueron normalizados en función del control de carga proteica Beta-actina. Los efectos se consideraron significantes cuando $p < 0,05$.

La figura 4a muestra que los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos (Compuestos 1-15) fueron capaces de reducir los niveles en el sobrenadante de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 inducida bajo el tratamiento de LPS de *E. Coli* ($p < 0,01$) de una manera significativa ($p < 0,05$). La Figura 4b muestra que los compuestos de la presente invención fueron capaces de prevenir completamente los efectos producidos por el tratamiento de LPS de *E. Coli* en los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 ($p < 0,05$).

La Figura 5b muestra según los ensayos de Western Blot que la expresión de la proteína TLR4 se incrementó de manera significativa bajo el tratamiento con LPS de *E. Coli* ($p < 0,001$), incremento que fue reducido bajo el co-tratamiento de los compuestos derivados de pirroles (Compuestos 1-15) en comparación con el tratamiento único de 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas ($p < 0,001$). También muestra que la expresión de la proteína inhibidora del factor de transcripción NF- κ B se redujo bajo el tratamiento con LPS de *E. Coli* de manera significativa ($p < 0,001$) y que estos compuestos produjeron un aumento en los niveles de expresión de la proteína I κ B α cuando se comparó este resultado con el tratamiento de LPS de *E. Coli* ($p < 0,001$), mostrando que los compuestos derivados de pirroles podrían inhibir los efectos producidos por LPS de *E. Coli* en la vía de señalización TLR4-NF κ B.

Ejemplo 7. Los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos inhiben la apoptosis producida por LPS.

Se empleó el kit de detección de la apoptosis basado en Anexina V-FITC (Beckton Dickinson Pharmingen™) y el citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson Pharmingen™) para medir la apoptosis temprana y la muerte celular acorde con las instrucciones del fabricante. Para estos ensayos, células A549 se cultivaron a una densidad de 2×10^6 en medio DMEN suplementado con 2% FBS y 1% de antibióticos durante 24 horas. Seguidamente, las células se trataron durante 18 horas con o sin 300 μ g/ml LPS de *E. Coli* sólo o en combinación de 100 microM de los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos. Seguidamente a estos tratamientos, las células A549 fueron resuspendidas para incubación con 100 μ l de solución 1X compuesta de 0,1 M HEPES/NaOH (0,1 M, pH 7, 4), NaCl (1,4 M), CaCl₂ (25 mM) vinculante donde se añadió 5 microlitros de Anexina V-FITC y 5 microlitros de yoduro de propio a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, se añadió 400 microlitros de la solución vinculante y la mezcla se analizó en el citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson Pharmingen™) usando un detector de señal FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) denominado FL1 y un fluorocromo de yoduro de propio a 488 nanómetros detectable por FL3. Los experimentos fueron repetidos por triplicado. Los datos fueron analizados acorde con 100.000 células como un porcentaje de apoptosis temprana acorde con esta fórmula: (%) = $\frac{\text{Anexina V-FITC}^+ \text{IP}^-}{\text{IP}^-}$ donde $\text{IP}^- = \text{Anexina V-FITC}^- \text{IP}^- + \text{Anexina V-FITC}^+ \text{IP}^-$. La tinción Anexina V-FITC⁺ IP⁺ fue considerado como el porcentaje de apoptosis tardía y necrosis o muerte celular. Los datos se analizaron usando el software WinDI 2.8 (Scripps Institute). De la misma manera, para estudiar los cambios morfológicos inducidos por LPS se llevó a cabo la tinción del ADN nuclear mediante tinción denominada trihidro bis-Benzimidazol-cloruro (Hoechst 33258). Para ello se cultivó la línea celular A549 a una densidad de 1×10^6 en medio de cultivo DMEN suplementado con el 2% FBS y el 1% de antibióticos durante 24 horas, para posteriormente tratarse durante 18 horas con o sin 300 μ g/ml LPS de *E. Coli* sólo o en combinación con 100 microM de los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron con solución salina PBS y se fijaron con el 4% de paraformaldehído disuelto en PBS a temperatura ambiente y durante 10 minutos. Después del proceso de fijación, las células se lavaron con solución salina PBS y se tiñeron con 80 microg/ml de Hoechst en PBS a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Finalmente, los núcleos teñidos fueron visualizados bajo microscopio de fluorescencia (Leica DM2000) para la detección de los cambios morfológicos y para la realización del conteo del porcentaje de los núcleos apoptóticos en cada condición experimental. Se consideró célula apoptótica aquella que presentaba tres o más cuerpos apoptóticos y/o presentaba cromatina condensada en la periferia del núcleo. Para evaluar el mecanismo de prevención del proceso apoptótico inducido por los compuestos objeto de la presente invención, se llevaron a cabo nuevos ensayos Western Blot empleando las mismas condiciones experimentales usadas para los anticuerpos primarios anti-TLR4 y anti-proteína inhibidora del factor de transcripción NF- κ B, pero para estos nuevos ensayos se empleó los anticuerpos primarios anti-Bax y anti-Bcl-2, indicadores del proceso apoptótico. Basados en los ensayos de estudio de apoptosis empleando citometría de flujo y la tinción Anexina V-Ioduro de propidio, se cuantificaron los porcentajes de apoptosis en el total de las poblaciones celulares.

La Figura 6 muestra cómo, después de la incubación con 300 microg/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas, el porcentaje de apoptosis temprana y muerte celular (Anexina V⁺/IP⁻ y Anexina V-FITC⁺ IP⁺, respectivamente) estaban incrementados comparados con células control ($p < 0,001$ en ambos casos, Figura 6b). Estos porcentajes de apoptosis fueron prevenidos mediante el co-tratamiento con los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituídos ($p < 0,001$ en todos los casos). Estos hallazgos fueron completados mediante la tinción nuclear empleando la Bis-

Benzimida. De tal manera que células A549 tratadas con 300 microg/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas mostraron núcleos fragmentados o “cuerpos apoptóticos” y cromatina condensada, características clásicas de células apoptóticas. Esta presencia de cuerpos apoptóticos y condensación de la cromatina nuclear fue prevenido mediante los co-tratamientos de los derivados pirrólicos objeto de la presente invención (Figura 6c y 6d). En las Figuras 6a y 6c se muestra el compuesto DTA0118 como representativo de la prevención del proceso apoptótico.

Para evaluar el mecanismo de prevención inducido por los compuestos pirrol, se llevaron a cabo nuevos ensayos de Western Blot. La Figura 7a muestra que el tratamiento con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* mostró un aumento de la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax ($p < 0,001$, Figura 7b) cuando se comparó con células control. Este aumento de la expresión fue inhibido por el co-tratamiento de los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos comparado con células control ($p < 0,01$, Figure 7b). Además, el tratamiento de la línea celular A549 con 300 microgramos/ml durante 18 horas de LPS de *E. Coli* indujo una disminución significativa de los niveles de expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 ($p < 0,01$, Figura 7b). Esta disminución en los niveles de expresión fue inhibido por el co-tratamiento de LPS de *E. Coli* más 100 microM de los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos (Compuestos 1-15) comparado con células tratadas con LPS de *E. Coli* durante 18 horas ($p < 0,01$, Figura 7b). Un aumento de la apoptosis (el ratio entre las proteínas Bax y Bcl-2) se observó en células A549 tratadas con 300 microgramos/ml de LPS de *E. Coli* durante 18 horas. Este aumento fue prevenido con el co-tratamiento de LPS de *E. Coli* y los compuestos derivados de pirroles durante 18 horas (Figura 7c). Estos resultados indican que los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos son efectivos en la prevención de la apoptosis inducida por LPS de *E. Coli* en la línea celular A549.

Ejemplo 8. Los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos actúan por un mecanismo independiente a Inhibidores de Tirosin Kinasas en la prevención de los efectos inducidos por LPS de *E. Coli*

La Línea celular A549 se cultivó en Dulbecco’s modified Eagle’s médium (DMEM) suplementado con el 2% de FBS. Las células se cultivaron en placas P-100 durante 24 horas. Seguidamente se añadió medio de cultivo fresco sin FBS conteniendo 30 microM de inhibidor Genistein, y se incubó durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se añadió medio de cultivo suplementado con 2% FBS que contenía 300 microg/ml LPS de *E. Coli* sólo o en combinación con 100 microM de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos (Compuestos 1-15), durante 18 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se realizaron las metodologías de Western blot como se describió en párrafos anteriores para el estudio de las proteínas TLR4, $\text{I}\kappa\beta\alpha$, Bax y Bcl-2. Asimismo, mediante microscopía de contraste de fases se visualizaron sin tinción y se fotografiaron con cámara digital todas las condiciones experimentales que se detallan.

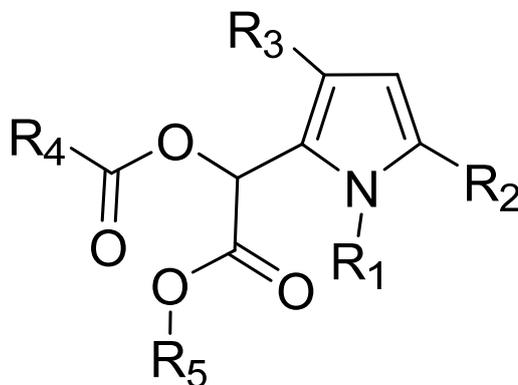
La Figura 8 muestra cómo el tratamiento con 300 microg/ml de LPS de *E. Coli* provocó un aumento de la expresión de las proteínas TLR4 y Bax, y una disminución de la expresión de $\text{I}\kappa\beta\alpha$ y Bcl-2, tal y como han mostrado también las figuras anteriores. Estos efectos fueron prevenidos por el pre-tratamiento con 30 microM de Genistein (Figura 8). La prevención fue superior cuando la línea celular A549 fue tratada con 300 microg/ml de LPS de *E. Coli* en combinación con compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos (Compuestos 1-15; C1-15) durante 18 horas pero el pre-tratamiento con 30 microM de Genistein durante 30 minutos no modificó la magnitud de la prevención inducida por los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos objeto de la presente invención en los efectos inducidos por LPS de *E. Coli* en los cambios de expresión de las proteínas TLR4, $\text{I}\kappa\beta\alpha$, Bax y Bcl-2.

La Figura 9 muestra resultados similares, donde después de la incubación con 300 microg/ml de LPS de *E. Coli*, las células A549 mostraron cambios morfológicos, como alargamientos, que fueron prevenidos sólo parcialmente mediante el pre-tratamiento con el inhibidor Genistein y totalmente con los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos. Como representativo se muestra el compuesto pirrólico 1,2,3,5-tetrasustituido denominado DTA0118. Asimismo, el pre-tratamiento con 30 microM de Genistein durante 30 minutos no modificó la magnitud de la prevención inducida por los compuestos pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos en los efectos inducidos por LPS de *E. Coli* (Figura 9).

Estos resultados indican que los inhibidores Tirosin Kinasas no podrían emplearse en combinación con los compuestos derivados de pirroles 1,2,3,5-tetrasustituidos en la prevención de los efectos inducidos por LPS de *E. Coli* en la línea celular A549.

REIVINDICACIONES

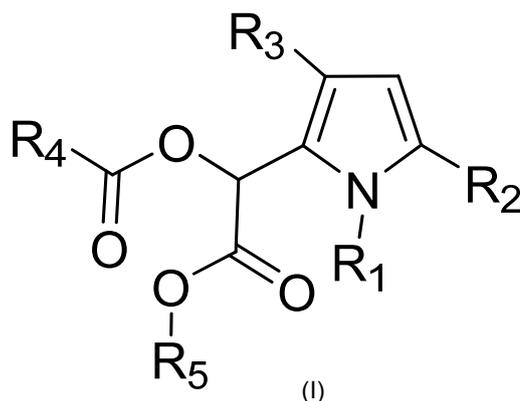
1. Uso de un compuesto químico derivado de un pirrol 1,2,3,5-tetrasustituido de fórmula (I):



(I)

donde

- 15
- R1 es una cadena alifática C₁-C₄, sustituida o no sustituida,
 - R2 es un éster metílico o etílico,
 - R3 es fenilo, bifenilo, metilfenilo, bencilfenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos,
 - R4 es fenilo, bifenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos,
 - R5 es H o un alquilo C₁-C₃,
- 20 en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares.
- 25
- 2. Uso según la reivindicación 1, en que dicha cadena alifática de R1 está sustituida con un fenilo.
 - 3. Uso según la reivindicación 1, en que dicha cadena alifática de R1 está sustituida con un grupo furano.
 - 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho radical R3 está sustituido por un halógeno.
 - 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que dicho radical R4 está sustituido por un halógeno.
 - 6. Uso según la reivindicación 5, en que dicho halógeno es cloro.
 - 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en que dicho radical R5 es metilo.
- 30
- 8. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto derivado de un pirrol 1,2,3,5-tetrasustituido de fórmula (I)



10 donde

R1 es una cadena alifática C₁-C₄, sustituida o no sustituida,

R2 es un éster metílico o etílico,

R3 es fenilo, bifenilo, metilfenilo, bencilfenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos,

R4 es fenilo, bifenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos,

15 R5 es H o un alquilo C₁-C₃,

junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares.

9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8, que se administra por vía intravenosa.

20 10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8, que se administra por vía oral, muscular o intramuscular.

11. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en una unidad de dosificación.

12. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, junto con al menos otro agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares.

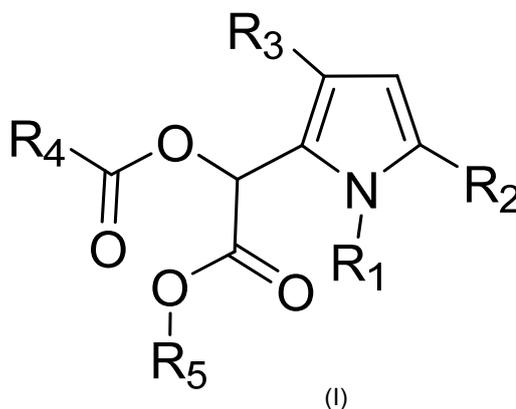
25 13. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en que dichos procesos apoptóticos celulares son producidos por sepsis.

14. Una composición farmacéutica según la reivindicación 13, en que dicha sepsis está causada por bacterias.

15. Una composición farmacéutica según la reivindicación 14, en que dichas bacterias son bacterias Gram-negativas.

30 16. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, donde dicha enfermedad inflamatoria está seleccionada entre el grupo compuesto por sepsis, enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica y traumas.

17. Compuesto químico derivado de un pirrol 1,2,3,5-tetrasustituido de fórmula (I):



10 donde

R1 es una cadena alifática C₁-C₄, sustituida o no sustituida,

R2 es un éster metílico o etílico,

R3 es fenilo, bifenilo, metilfenilo, bencilfenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos,

R4 es fenilo, bifenilo o ciclohexilo, sustituidos o no sustituidos,

15 R5 es H o un alquilo C₁-C₃,

para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares.

18. Compuesto químico según la reivindicación 17, en que dicha cadena alifática de R1 está sustituida con un fenilo.

20 19. Compuesto químico según la reivindicación 17, en que dicha cadena alifática de R1 está sustituida con un grupo furano.

20. Compuesto químico según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en que dicho radical R3 está sustituido por un halógeno.

25 21. Compuesto químico según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en que dicho radical R4 está sustituido por un halógeno.

22. Compuesto químico según la reivindicación 21, en que dicho halógeno es cloro.

23. Compuesto químico según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en que dicho radical R5 es metilo.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131785

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.11.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TEJEDOR DAVID et al. From conjugated tertiary skipped diynes to chain-functionalized tetrasubstituted pyrroles. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 2009 VOL: 15 No: 4 Pags: 838-842 ISSN 1521-3765 (Electronic) Doi: doi:10.1002/chem.200802262 pubmed:19086044, página 839, esquema 1, tabla 1, compuesto 1 y página 840, esquema 2.	17,18,23
A	TEJEDOR DAVID et al. A diversity-oriented strategy for the construction of tetrasubstituted pyrroles via coupled domino processes. Journal of the American Chemical Society 14.07.2004 VOL: 126 No: 27 Pags: 8390-8391 ISSN 0002-7863 (Print) Doi: pubmed:15237991, esquemas 1 y 2.	1-23
A	PADRON J M et al. Synthesis and anti-breast cancer activity of tetrasubstituted pyrrolederivatives. Letters in Drug Design and Discovery 11.2005 VOL: 2 No: 7 Pags: 529-532 ISSN 1570-1808 (print) Doi: doi:10.2174/157018005774479122, página 531, columna 2 y tabla 1.	1-23
A	PADRON J M et al. Antiproliferative activity in HL60 cells by tetrasubstituted pyrroles: a structure-activity relationship study. BIOORGANIC MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, 16.05.2005 VOL: 15 No: 10 Pags: 2487-2490 ISSN 0960-894X, página 2488, tabla 1, página 2489, columna 2.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

11.02.2013

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/40 (2006.01)

C07D207/34 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07D, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, XPESP2, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.02.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16, 19-22	SI
	Reivindicaciones 17, 18, 23	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16, 19-22	SI
	Reivindicaciones 17, 18, 23	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TEJEDOR DAVID et al. From conjugated tertiary skipped diynes to chain-functionalized tetrasubstituted pyrroles. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 2009 VOL: 15 No: 4 Pags: 838-842 ISSN 1521-3765 (Electronic) Doi: doi:10.1002/chem.200802262 pubmed:19086044, página 839, esquema 1, tabla 1, compuesto 1 y página 840, esquema 2.	30.11.2008
D02	TEJEDOR DAVID et al. A diversity-oriented strategy for the construction of tetrasubstituted pyrroles via coupled domino processes.. Journal of the American Chemical Society 14.07.2004 VOL: 126 No: 27 Pags: 8390-8391 ISSN 0002-7863 (Print) Doi: pubmed:15237991, esquemas 1 y 2.	14.07.2004
D03	PADRON J M et al. Synthesis and anti-breast cancer activity of tetrasubstituted pyrrolederivatives. Letters in Drug Design and Discovery 11.2005 VOL: 2 No: 7 Pags: 529-532 ISSN 1570-1808 (print) Doi: doi:10.2174/157018005774479122, página 531, columna 2 y tabla 1.	31.10.2005
D04	PADRON J M et al. Antiproliferative activity in HL60 cells by tetrasubstituted pyrroles: a structure-activity relationship study. BIOORGANIC MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, 16.05.2005 VOL: 15 No: 10 Pags: 2487-2490 ISSN 0960-894X, página 2488, tabla 1, página 2489, columna 2.	16.05.2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere al uso de un compuesto químico derivado de un pirrol 1, 2, 3, 5 tetrasustituido de fórmula I en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos celulares. Se reivindican así mismo los compuestos químicos y las composiciones farmacéuticas que los contienen.

El documento D1 se refiere a la síntesis de compuestos derivados de pirrol tetrasustituido de fórmula 1 (ver página 839, tabla 1 y esquema 2 de la página 840). Las reivindicaciones de compuesto de la presente solicitud 17, 18 y 23 citan compuestos con la misma estructura que los del documento D1, cuando el radical R1 de la fórmula I de la reiv. 17 es una cadena alquílica sustituida por fenilo (reiv. 18) y cuando el radical R5 es metilo (reiv. 23).

Por lo tanto, a la vista del documento D1 las reivindicaciones 17, 18 y 23 carecen de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.

Los documentos D2 a D4 se refieren a compuestos derivados del pirrol tetrasustituidos en posiciones 1, 2, 3 y 4 del anillo de pirrol por lo que difieren de los compuestos reivindicados en la presente solicitud. En los documentos D3 y D4 se cita la actividad antiproliferativa de estos compuestos.

En consecuencia a la vista de los documentos citados si bien, se conocen los compuestos de fórmula I, no se han referido en el estado de la técnica sus composiciones farmacéuticas ni el uso reivindicado, por lo tanto la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-16 tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.

En cuanto a las reivindicaciones 19-22, las sustituciones de los grupos fenilo por halógeno o de cadenas alquilo por furano, no se hayan descritas en el documento D1. Por lo tanto dichas reivindicaciones presentan novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.