(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 385 443**

(21) Número de solicitud: 201031978

(51) Int. CI.:
C07D 239/54 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **28.12.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **25.07.2012**

(71) Solicitante/s:
CIBER DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
Recinto Hospital Joan March
Crta. de Soller Km. 12
07110 Palma de Mallorca, Illes Balears, ES;
SERVICIO CANARIO DE SALUD y
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

(72) Inventor/es:
VILLAR HERNÁNDEZ, JESÚS;
PADRÓN CARRILLO, JOSÉ MANUEL;
CASULA, MILENA;
CABRERA BENÍTEZ, NURIA ESTHER y
RAMOS NUEZ, ÁNGELA MARÍA

(74) Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

(54) Título: **USO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE UREA PIRIMIDÍNICA PARA LA ELABORACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS.**

(57) Resumen:
La presente invención es un compuesto derivado de urea pirimidínica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. El compuesto de la invención es útil para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de dichas enfermedades inflamatorias, preferiblemente, sepsis causada por bacterias Gram-negativas, artritis, infecciones renales, enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica, hepatitis aguda, disfunción miocárdica aguda inducida por shock séptico y enterecolitis necrotizante.

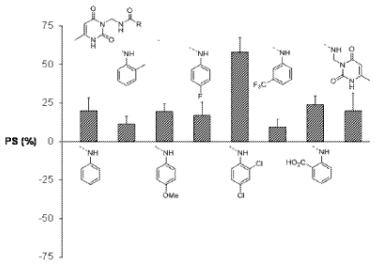


FIG. 5

ES 2 385 443 A1

DESCRIPCIÓN

USO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE UREA PIRIMIDÍNICA PARA LA ELABORACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a compuestos derivados de urea pirimidínica que tienen actividad anti-inflamatoria. Dichos compuestos son útiles para preparar composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, preferiblemente sepsis, artritis, infecciones renales, enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica, hepatitis aguda, disfunción miocárdica aguda inducida por shock séptico y enterecolitis necrotizante.

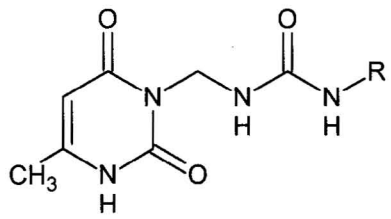
ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En la técnica existen diversos compuestos con capacidad para disminuir los efectos inflamatorios producidos por acción de los Lipopolisacáridos (LPS). Es el caso de la inosina, que reduce la toxicidad de las citoquinas en células pulmonares en experimentos in vitro y suprime la inflamación pulmonar inducida por LPS en experimentos in vivo.

Existen varios documentos que relacionan el uso de ureas con una posible acción anti-inflamatoria. El documento WO00/43384 describe ureas heterocíclicas aromáticas que inhiben la producción de citoquinas involucradas en los procesos inflamatorios. El documento US 2005/0239811 A1 explica el uso de ureas N-1, 1, 3 trisustituídas que inhiben la liberación de citoquinas por parte de los lipopolisacáridos. El documento US 2003/0216396 A1 describe el uso de compuestos ureas conteniendo una piridina, quinolina o isoquinolina y que funcionalmente serían de utilidad en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la osteoporosis o en los desórdenes patológicos relacionados con la angiogénesis.

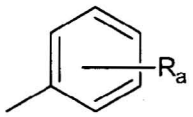
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención es un compuesto derivado de urea pirimidínica de fórmula (I):

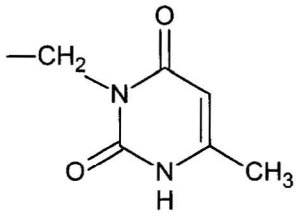


donde:

- R es



o



- donde R_a está seleccionado entre el grupo formado por H, carboxilo, CF_3, F, Cl, Br, I, éter de alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquilo C_3-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquenilo C_5-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquinilo C_8-C_{10} sustituido o no sustituido, arilo C_6-C_{10} sustituido o no sustituido, aralquilo C_7-C_{10} sustituido o no sustituido, heterociclilo de 3-10 miembros de anillo sustituido o no sustituido y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 2 a 10 átomos de carbono, y ambos heterociclos de 1 a 3 átomos diferentes al carbono,

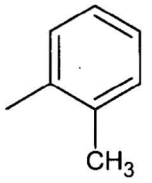
para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

En la presente invención, se entiende por "enfermedades inflamatorias" a enfermedades que cursan con inflamación. En este grupo se encuentran las infecciones causadas por bacterias que cursan con inflamación, como por ejemplo, la sepsis. También se encuentran dentro de este grupo la artritis, infecciones renales, enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica, hepatitis aguda, disfunción miocárdica aguda inducida por shock séptico y enterecolitis necrotizante.

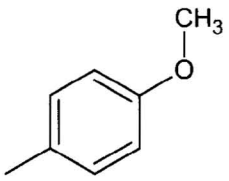
Los compuestos derivados de urea pirimidínica descritos en la presente invención poseen actividad anti-inflamatoria ya que son capaces de disminuir los efectos anti-proliferativos inducidos por LPS de bacterias Gram-negativas sobre la línea celular A549, inhibir el aumento de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 e IL-1β inducidas por LPS y de inhibir el aumento de expresión de la proteína receptora TLR4 y de inhibir la disminución de la proteína inhibidora del factor de transcripción NF-κB inducidos por LPS.

Una realización preferible es un compuesto de la invención, donde R es benceno

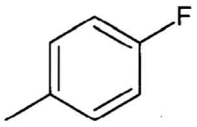
Otra realización de la invención es un compuesto de la invención, donde R es



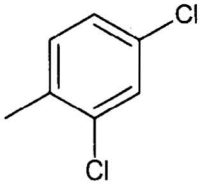
Otra realización de la invención es un compuesto de la invención, donde R es



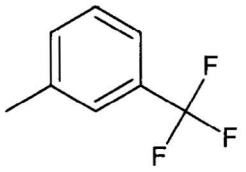
Otra realización de la invención es un compuesto de la invención, donde R es



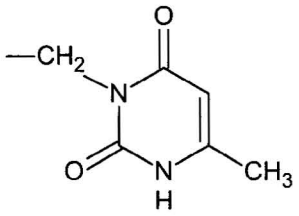
Otra realización de la invención es un compuesto de la invención, donde R es



Otra realización de la invención es un compuesto de la invención, donde R es



Otra realización de la invención es un compuesto de la invención, donde R es



Una realización preferible es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Otra realización más preferible es una composición farmacéutica de la invención en una unidad de dosificación. Y otra realización es que dicha unidad de dosificación sea un comprimido.

Una realización preferible es la composición farmacéutica de la invención, que se administra por vía oral. Y otra realización es que dicha composición se administra por vía intravenosa, muscular y/o intramuscular.

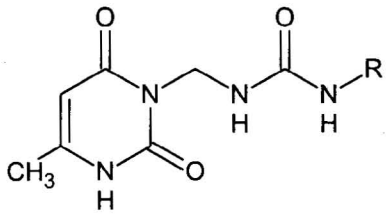
Una realización preferible es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables y al menos otro agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Otra realización más es la composición farmacéutica de la invención, donde dicha enfermedad inflamatoria está causada por bacterias. Y otra realización es que dichas bacterias sean bacterias Gram-negativas.

Una realización más es la composición farmacéutica de la invención, donde dicha enfermedad inflamatoria es una sepsis.

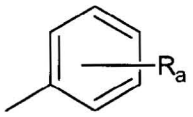
Una realización preferible es la composición farmacéutica de la invención, donde dicha enfermedad inflamatoria está seleccionada entre el grupo compuesto por la artritis, infecciones renales, enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica, hepatitis aguda, disfunción miocárdica aguda inducida por shock séptico y enterecolitis necrotizante.

Una realización preferible es el uso de un compuesto derivado de urea pirimidínica de fórmula (I):

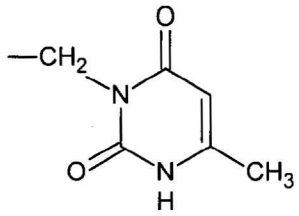


donde:

- R es



o

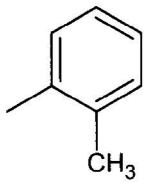


- donde R_a está seleccionado entre el grupo formado por H, carboxilo, CF_3, F, Cl, Br, I, éter de alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquilo C_3-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquenilo C_5-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquinilo C_8-C_{10} sustituido o no sustituido, arilo C_6-C_{10} sustituido o no sustituido, aralquilo C_7-C_{10} sustituido o no sustituido, heterociclilo de 3-10 miembros de anillo sustituido o no sustituido y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 2 a 10 átomos de carbono, y ambos heterociclos de 1 a 3 átomos diferentes al carbono,

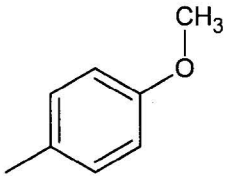
junto con excipientes farmacéuticamente aceptables para la elaboración de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Una realización preferible es el uso de la invención, donde R es benceno

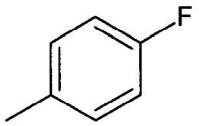
Otra realización es el uso de la invención, donde R es



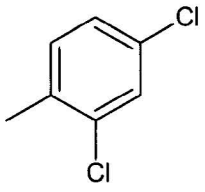
Otra realización es el uso de la invención, donde R es



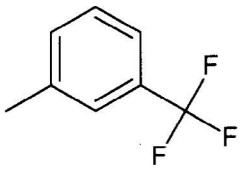
Otra realización es el uso de la invención, donde R es



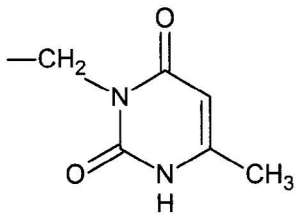
Otra realización es el uso de la invención, donde R es



Otra realización es el uso de la invención, donde R es



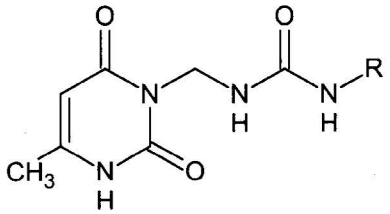
Otra realización es el uso de la invención, donde R es



Otra realización preferible es el uso de la invención donde dicho medicamento se administra en una unidad de dosificación. Y otra realización es que dicha unidad de dosificación sea un comprimido.

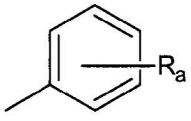
Una realización preferible es el uso de la invención, donde dicho medicamento se administra por vía oral. Y otra realización es que dicho medicamento se administra por vía intravenosa, muscular y/o intramuscular.

Una realización preferible es el uso de un compuesto derivado de urea pirimidínica de fórmula (I):

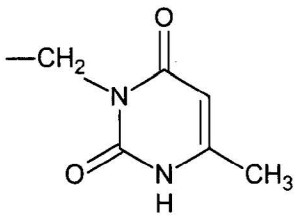


donde:

- R es



o



- donde R_a está seleccionado entre el grupo formado por H, carboxilo, CF_3, F, Cl, Br, I, éter de alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquilo C_3-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquenilo C_5-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquinilo C_8-C_{10} sustituido o no sustituido, arilo C_6-C_{10} sustituido o no

sustituido, aralquilo C_7-C_{10} sustituido o no sustituido, heterociclilo de 3-10 miembros de anillo sustituido o no sustituido y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 2 a 10 átomos de carbono, y ambos heterociclos de 1 a 3 átomos diferentes al carbono,

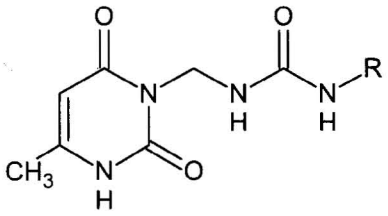
junto con excipientes farmacéuticamente aceptables y al menos otro agente terapéutico para la elaboración de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Otra realización más es el uso de la invención, donde dicha enfermedad inflamatoria está causada por bacterias. Y otra realización es que dichas bacterias sean bacterias Gram-negativas.

Una realización más es el uso de la invención, donde dicha enfermedad inflamatoria es una sepsis.

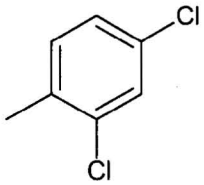
Una realización preferible es el uso de la invención, donde dicha enfermedad inflamatoria está seleccionada entre el grupo compuesto por la artritis, infecciones renales, enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica, hepatitis aguda, disfunción miocárdica aguda inducida por shock séptico y enterecolitis necrotizante.

La realización más preferible de la invención es una composición administrada por vía intravenosa, que comprende al menos un compuesto derivado de urea pirimidínica de fórmula (I):



donde:

- R es



para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra el efecto de los compuestos 1-7 en la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 cuando la línea celular A549 fue estimulada con 300 microgramos/mililitro de LPS de *E. Coli* y tratada con 100 microMolar de los compuestos 1-7. Se muestran los resultados de las células control **(C)**, células A549 tratadas con LPS de *E. Coli* **(LPS)** y células A549 tratadas con LPS de *E. Coli* más 100 microMolar de los compuestos 1-7 **(Compuestos 1-7)**. En esta figura se representa la simbología estadística: ***p<0.001 vs. C; † p<0.001 vs. LPS.

La figura 2 muestra el efecto de los compuestos 1-7 en la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-1β cuando la línea celular A549 fue considerada como control **(C),** tratada con 300 microgramos/mililitro de LPS de *E. Coli* **(LPS)** y tratada con 300 microgramos/militro de LPS de *E. Coli* más 100 microMolar de los compuestos 1-7 **(Compuestos 1-7)**. En esta figura, **p<0.01 vs. C; ¶ p<0.01 vs. LPS.

La figura 3 muestra la bandas correspondientes a los ensayos de Western Blot tras la realización de la extracción de las proteínas totales de células A549 control **(C)**, células A549 bajo el tratamiento con 300 microgramos/mililitro de LPS de *E. Coli* **(LPS)** y bajo el tratamiento de 300 microgramos/mililitro de LPS de *E.Coli* más 100 microMolar de los compuestos 1-7 **(Compuestos 1-7)**. También se muestra la homogeneidad en la concentración proteíca de cada pocillo mediante la Beta-actina.

La figura 4 muestra los cambios de expresión de las proteínas TLR4 e IK$\beta\alpha$ (normalizados en función del control de carga Beta-actina) cuando células A549 se emplearon como control **(C)**, células A549 bajo el tratamiento con 300 microgramos/mililitro de LPS de *E. Coli* **(LPS)** y bajo el tratamiento de 300 microgramos/mililitro de LPS de *E. Coli* más 100 microMolar de los compuestos 1-7 **(Compuestos 1-7)**. En esta figura, ** p<0.01 vs. C; ***p<0.001 vs. C; † p<0.001 vs. LPS; ¶ p<0.05 vs. LPS.

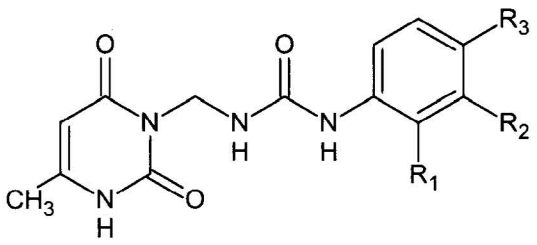
La figura 5 muestra los valores PS (%) y la estructura química de diferentes compuestos urea.

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos 1-7

Se sintetizaron los compuestos 1 a 7, derivados de urea pirimidínica, desde los compuestos (pirimidin-4-iloxi) - y (pirimidin-3-il) acetohidrazidas, tal y como se describe en Jakubkiene, V. *et al.*, Synthesis of (pyrimidin4-yloxy)-and (pyrimidin-3-yl)acetyl azides and their rearrangement to carbamates and ureas. *Arkivoc* 2010 (11) 39-48. Los compuestos puros fueron disueltos en dimetil sulfóxido.

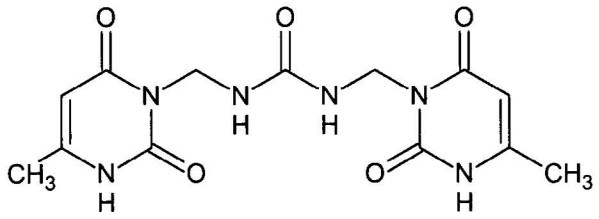
Los compuestos 1 a 6 tienen la fórmula:



siendo R_1, R_2, y R_3 los grupos que se especifican en la siguiente tabla:

Compuesto	R_1	R_2	R_3
1	H	H	H
2	CH_3	H	H
3	H	H	OCH_3
4	H	H	F
5	Cl	H	Cl
6	H	CF_3	H

El compuesto 7 tiene la fórmula:



Ejemplo 2. Actividad anti-microbiana, anti-fúngica y citotóxica de los compuestos

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), 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) y 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 epiteliar pulmonar).

Las especies bacterianas y fúngicas fueron crecidas en placas de agar a 35-37ºC. Después de 24 horas de incubación, las especies fueron resuspendidas en solución salina a una concentración aproximadamente de 5 x 10^5 cfu/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) para las especies bacterianas y 1-5 x 10^3 para las especies *Candida*. La actividad antimicrobiana de los compuestos fue determinada en placas de 96 pocillos usando el medio Mueller Hinton broth para las especies bacterianas y 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 microMolar. Las placas de 96 pocillos fueron incubadas a 35-37ºC en una cámara oscura y húmeda. Después de la incubación, las especies fueron precipitadas en 25 microlitros de 50% (peso/volumen) TCA (Ácido tricloroacético) y fijadas durante 60 minutos a 4ºC. 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 produjo la agitación de las placas de 96 pocillos y mediante espectrofotometría (BioTek´s PowerWave XS

Absorbance Microplate Reader) se obtuvieron valores de densidad óptica. Las placas de 96 pocillos correspondientes a las especies bacterianas fueron leídas a 630 nanómetros después de 24 horas de incubación. Las placas de 96 pocillos correspondientes a las especies fúngicas fueron leídas a 490 nanómetros después de 48 horas de incubación. Con los resultados obtenidos de la espectrofotometría se obtuvo el valor MCI (mínima concentración inhibitoria) y fue establecido como la concentración del compuesto que inhibió el crecimiento total cuando se comparó con las especies no tratadas.

Los compuestos 1 a 7 no presentaban actividad anti-microbiana sobre las bacterias y especies fúngicas ensayadas, ya que todos los compuestos fueron inactivos (valores MCI superiores a 100 microMolar).

De la misma manera, las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo celular de 25 cm^2 en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con el 5% de suero fetal bovino y 2 miliMolar de glutamina en un incubador con las siguientes condiciones experimentales: 37ºC, 5% de CO_2 y 95% de aire húmedo. Células en crecimiento exponencial fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo que contiene antibióticos (100 unidades de penicilina y 0,1 miligramos de estreptomicina por mililitro). La suspensión celular con un porcentaje superior al 97% de viabilidad por la técnica de exclusión y de tinción Azul Tripán fue contada. Después del contaje, se realizaron las diluciones celulares para su inoculación en placa de 96 pocillos. Las células fueron sembradas a una concentración de 1 x 10^4 (para la línea celular SW1573), 1,5 x 10^4 (para las líneas celulares HeLa, Ishikawa y T-47D) y 2 x 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 microMolar. 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 50% (peso/volumen) TCA (Ácido tricloroacético) y fijadas durante 60 minutos a 4ºC. Después, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan, P. *et al.* 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_o) y

al final de la exposición de los compuestos (T), 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 X [(T-T_o)/(C-T_o)] cuando T es mayor o igual a T_o, y la fórmula PG= 100 X [(T-T_o)/(T_o)] cuando T es menor que T_o. La concentración a la cual PG es +50, 0 y -50 representa, respectivamente, un 50% de inhibición del crecimiento (GI_{50}), inhibición total del crecimiento (TGI) y 50% de muerte celular (LC_{50}). 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.

Los compuestos empleados en la presente invención no poseían actividad citotóxica sobre las líneas celulares ensayadas ya que todos los compuestos fueron inactivos (valores de inhibición del crecimiento GI_{50} superiores a 100 microMolar).

Ejemplo 3. Determinación de los niveles de expresión de IL-8, IL-1β, TLR4 e IKβα .

Se cultivó la línea celular A549 (línea celular humana epiteliar pulmonar) 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 distribuible comercialmente por la compañía Sigma-Aldrich ®) junto con 100 microMolar de los productos de síntesis descritos en la presente invención durante 18 horas. Pasado el tiempo de tratamiento, se recogió el medio de cultivo en tubos de ensayo Falcon 15 mililitros estériles y se centrifugaron a 1.200 RPM (revoluciones por minuto) 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 eppendorf 1,5 mililitros estériles. Dichos tubos eppendorf se conservaron en congelación (-80°C) hasta su uso.

Posteriormente, se añadieron 200 microlitos 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-8 e IL-1β mediante ensayo ELISA a un rango de longitud de 633 nanómetros.

Los niveles de expresión de la proteína de receptor de membrana denominada TLR4 y la proteína inhibidora del factor de transcripción denominado Factor nuclear kappa B (NF-κB) se midieron mediante Western Blot. Para ello, se realizó electroforesis de cada una de las muestras en geles de SDS-PAGE (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 el tampón TBST (del inglés *Tris-buffered saline Tween-20*) más 10% de leche carente de contenido graso. Los anticuerpos anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) y anti-proteína inhibidora NF-κB (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.). La detección de las bandas se llevó a cabo por sistema quimioluminiscente con el kit de GE Healthcare "Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent". Posteriormente, se densitometró cada banda proteíca mediante el software público Scion Image. Cada Western Blot se realizó tres veces con las mismas condiciones experimentales nombradas.

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 (de la compañía Cell Signaling 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 denominado Factor nuclear kappa B.

Todos los datos relacionados con la actividad anti-inflamatoria de los compuestos objeto de la presente invención son expresados como media de los resultados obtenidos para cada compuesto ± error estándar y los análisis estadísticos fueron llevados a cabo empleando los Test de Fisher y la T de Student para datos emparejados y datos no emparejados 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 proteíca Beta-actina. Los efectos se consideraron significantes cuando $p<0.05$.

Basados en los ensayos de medición de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el sobrenadante de la línea celular A549, la figura 1 muestra que los compuestos 1-7 fueron capaces de reducir los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 inducidos bajo el tratamiento de LPS de *E. Coli* ($p<0.001$) de una manera significativa ($p<0.001$). La figura 2 muestra que los compuestos 1-7 objeto 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-1β ($p<0.01$).

Basados en los ensayos de Western Blot, las figuras 3 y 4 muestran 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 1-7 ($p<0.001$) y también muestran que la expresión de la proteína inhibidora del factor de transcripción denominado Factor nuclear kappa B se redujo bajo el tratamiento con LPS de *E. Coli* de manera significativa ($p<0.01$) y que los compuestos 1-7 objeto de la presente invención produjeron un aumento en los niveles de expresión de la proteína IK$\beta\alpha$ cuando se comparó este resultado con el tratamiento de LPS de *E. Coli* ($p<0.05$).

Ejemplo 4. Los compuestos 1 a 7 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 (100 microMolar).

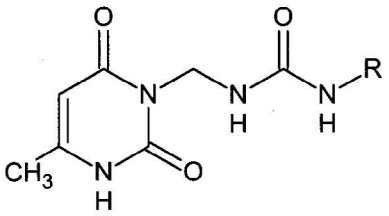
El tiempo de incubación de los compuestos fue de 18 horas, después del cual las células fueron precipitadas en 25 microlitros de 50% (peso/volumen) TCA (Ácido tricloroacético) y fijadas durante 60 minutos a 4ºC. Después, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan, P. et al., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990 (82) 1107-1112. 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 x [(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 muerte celular neta.

En la figura 5 se detallan valores PS correspondientes a diversos derivados de ureas. De los resultados obtenidos, como se muestra en esta figura, se podría concluir que todos los compuestos ensayados poseen la habilidad para disminuir los efectos de LPS producidos en la línea celular A549. Los mejores resultados se alcanzaron con el compuesto 5 donde se alcanzó un valor de PS de 58%.

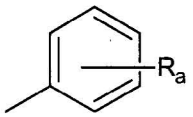
REIVINDICACIONES

1. Compuesto derivado de urea pirimidínica de fórmula (I):

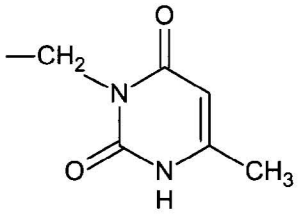


donde:

- R es



o

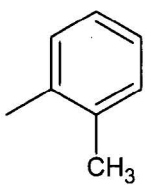


donde R_a está seleccionado entre el grupo formado por H, carboxilo, CF_3, F, Cl, Br, I, éter de alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquilo C_3-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquenilo C_5-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquinilo C_8-C_{10} sustituido o no sustituido, arilo C_6-C_{10} sustituido o no sustituido, aralquilo C_7-C_{10} sustituido o no sustituido, heterociclilo de 3-10 miembros de anillo sustituido o no sustituido y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 2 a 10 átomos de carbono, y ambos heterociclos de 1 a 3 átomos diferentes al carbono,

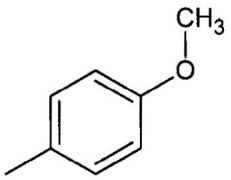
para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

2. Un compuesto según reivindicación 1, donde R es benceno.

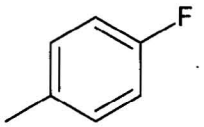
3. Un compuesto según reivindicación 1, donde R es



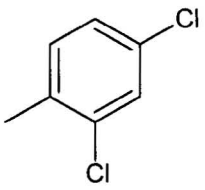
4. Un compuesto según reivindicación 1, donde R es



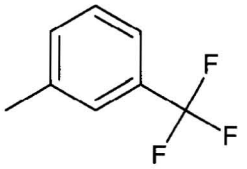
5. Un compuesto según reivindicación 1, donde R es



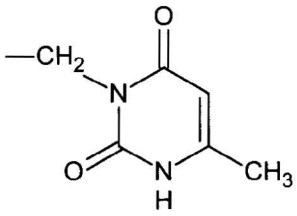
6. Un compuesto según reivindicación 1, donde R es



7. Un compuesto según reivindicación 1, donde R es



8. Un compuesto según reivindicación 1, donde R es



9. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 9, en una unidad de dosificación.

11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, donde dicha unidad de dosificación es un comprimido.

12. Una composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 10 ó 11, que se administra por vía oral.

13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 9, que se administra por vía intravenosa, muscular y/o intramuscular.

14. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables y al menos otro agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

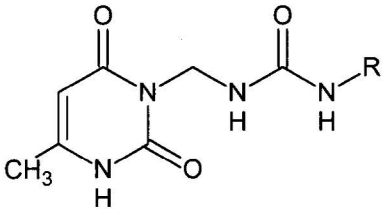
15. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde dicha enfermedad inflamatoria está causada por bacterias.

16. Una composición farmacéutica según reivindicación 15, donde dichas bacterias son bacterias Gram-negativas.

17. Una composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 15 ó 16, donde dicha enfermedad inflamatoria es una sepsis.

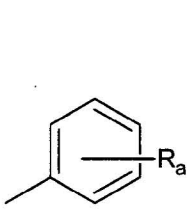
18. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde dicha enfermedad inflamatoria está seleccionada entre el grupo compuesto por la artritis, infecciones renales, enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica, hepatitis aguda, disfunción miocárdica aguda inducida por shock séptico y enterecolitis necrotizante.

19. Uso de un compuesto derivado de urea pirimidínica de fórmula (I):

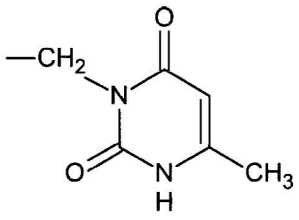


donde:

- R es



o



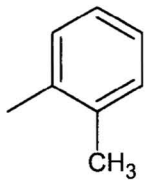
- donde R_a está seleccionado entre el grupo formado por H, carboxilo, CF_3, F, Cl, Br, I, éter de alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquilo C_3-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquenilo C_5-C_{10} sustituido o no sustituido,

cicloalquinilo C_8-C_{10} sustituido o no sustituido, arilo C_6-C_{10} sustituido o no sustituido, aralquilo C_7-C_{10} sustituido o no sustituido, heterociclilo de 3-10 miembros de anillo sustituido o no sustituido y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 2 a 10 átomos de carbono, y ambos heterociclos de 1 a 3 átomos diferentes al carbono,

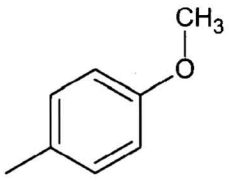
junto con excipientes farmacéuticamente aceptables para la elaboración de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

20. Uso según reivindicación 19, donde R es benceno.

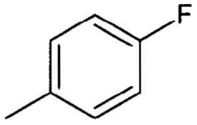
21. Uso según reivindicación 19, donde R es



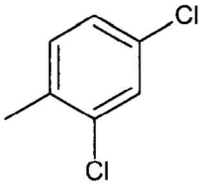
22. Uso según reivindicación 19, donde R es



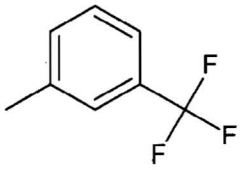
23. Uso según reivindicación 19, donde R es



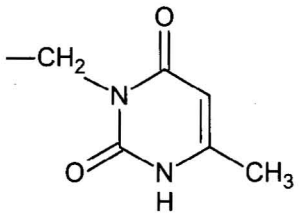
24. Uso según reivindicación 19, donde R es



25. Uso compuesto según reivindicación 19, donde R es



26. Uso según reivindicación 19, donde R es



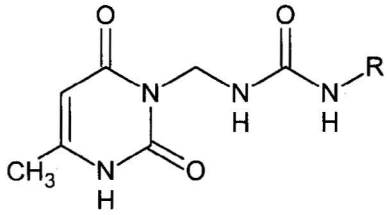
27. Uso según la reivindicación 19, donde dicho medicamento se administra en una unidad de dosificación.

28. Uso según la reivindicación 27, donde dicha unidad de dosificación es un comprimido.

29. Uso según una de las reivindicaciones 27 ó 28, donde dicho medicamento se administra por vía oral.

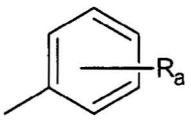
30. Uso según la reivindicación 19, donde dicho medicamento se administra por vía intravenosa, muscular y/o intramuscular.

31. Uso de un compuesto derivado de urea pirimidínica de fórmula (I):

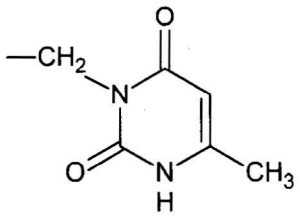


donde:

- R es



o



- donde R_a está seleccionado entre el grupo formado por H, carboxilo, CF_3, F, Cl, Br, I, éter de alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, éter de alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquilo C_3-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquenilo C_5-C_{10} sustituido o no sustituido, cicloalquinilo C_8-C_{10} sustituido o no sustituido, arilo C_6-C_{10} sustituido o no sustituido, aralquilo C_7-C_{10} sustituido o no sustituido, heterociclilo de 3-10 miembros de anillo sustituido o no sustituido y heteroarilalquilo sustituido o no

sustituido de 2 a 10 átomos de carbono, y ambos heterociclos de 1 a 3 átomos diferentes al carbono,

junto con excipientes farmacéuticamente aceptables y al menos otro agente terapéutico para la elaboración de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31, donde dicha enfermedad inflamatoria está causada por bacterias.

33. Uso según reivindicación 32, donde dichas bacterias son bacterias Gram-negativas.

34. Uso según una de las reivindicaciones 32 ó 33, donde dicha enfermedad inflamatoria es una sepsis

35. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 34, donde dicha enfermedad inflamatoria está seleccionada entre el grupo compuesto por la artritis, infecciones renales, enfermedades pulmonares agudas inducidas por sepsis, síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, peritonitis séptica, hepatitis aguda, disfunción miocárdica aguda inducida por shock séptico y enterecolitis necrotizante

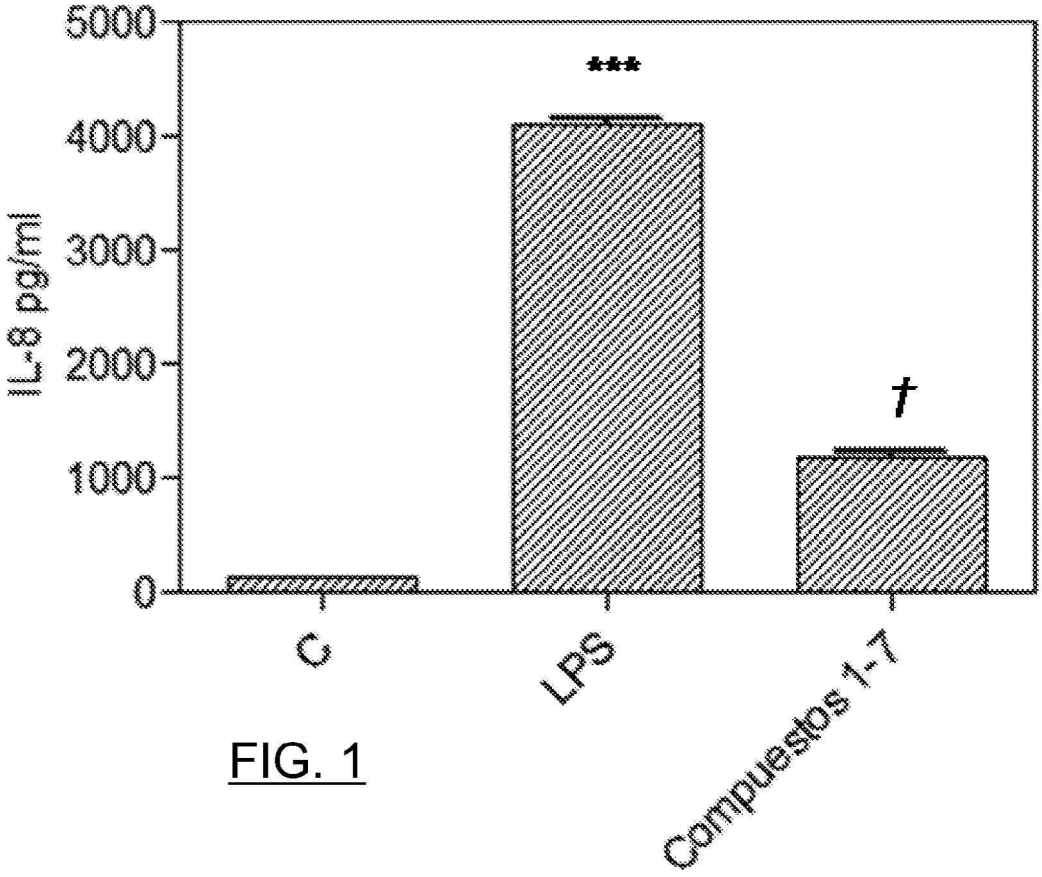

5000
4000
3000
2000
1000
0
IL-8 pg/ml
***
†
C
LPS
Compuestos 1-7

FIG. 1

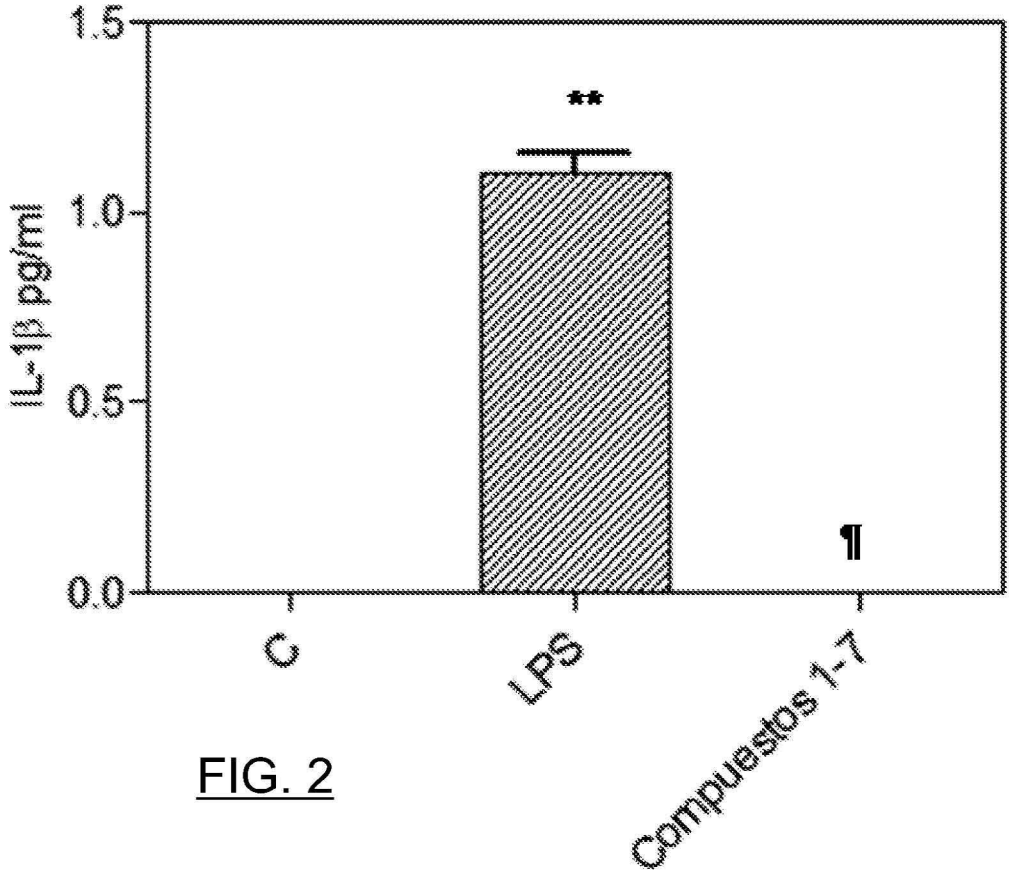

1.5
1.0
0.5
0.0
IL-1β pg/ml
**
¶
C
LPS
Compuestos 1-7

FIG. 2

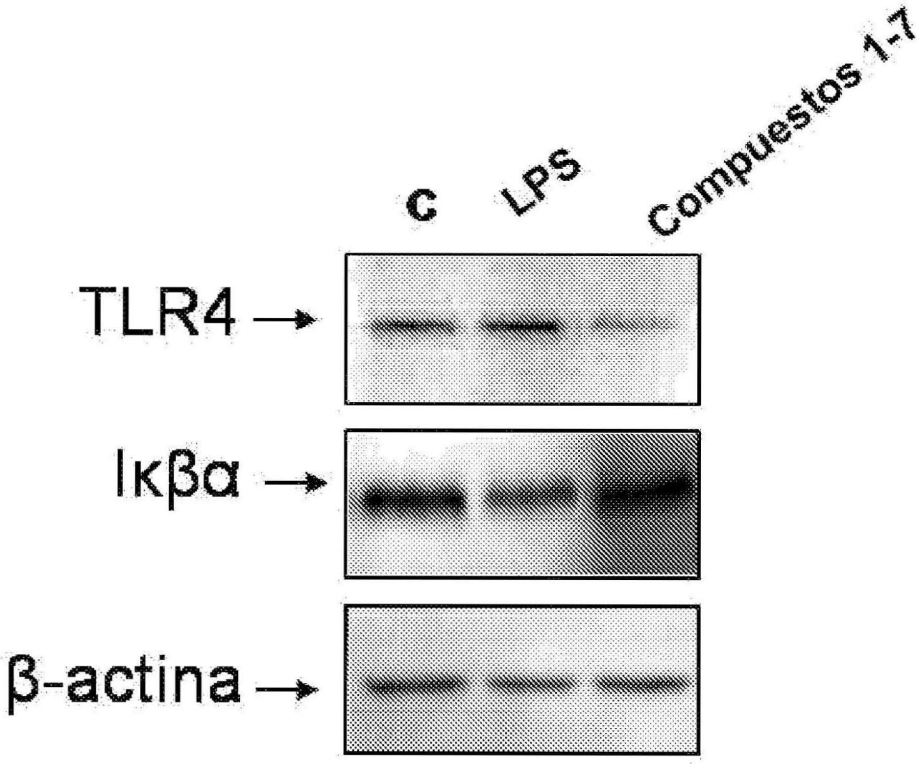


FIG. 3

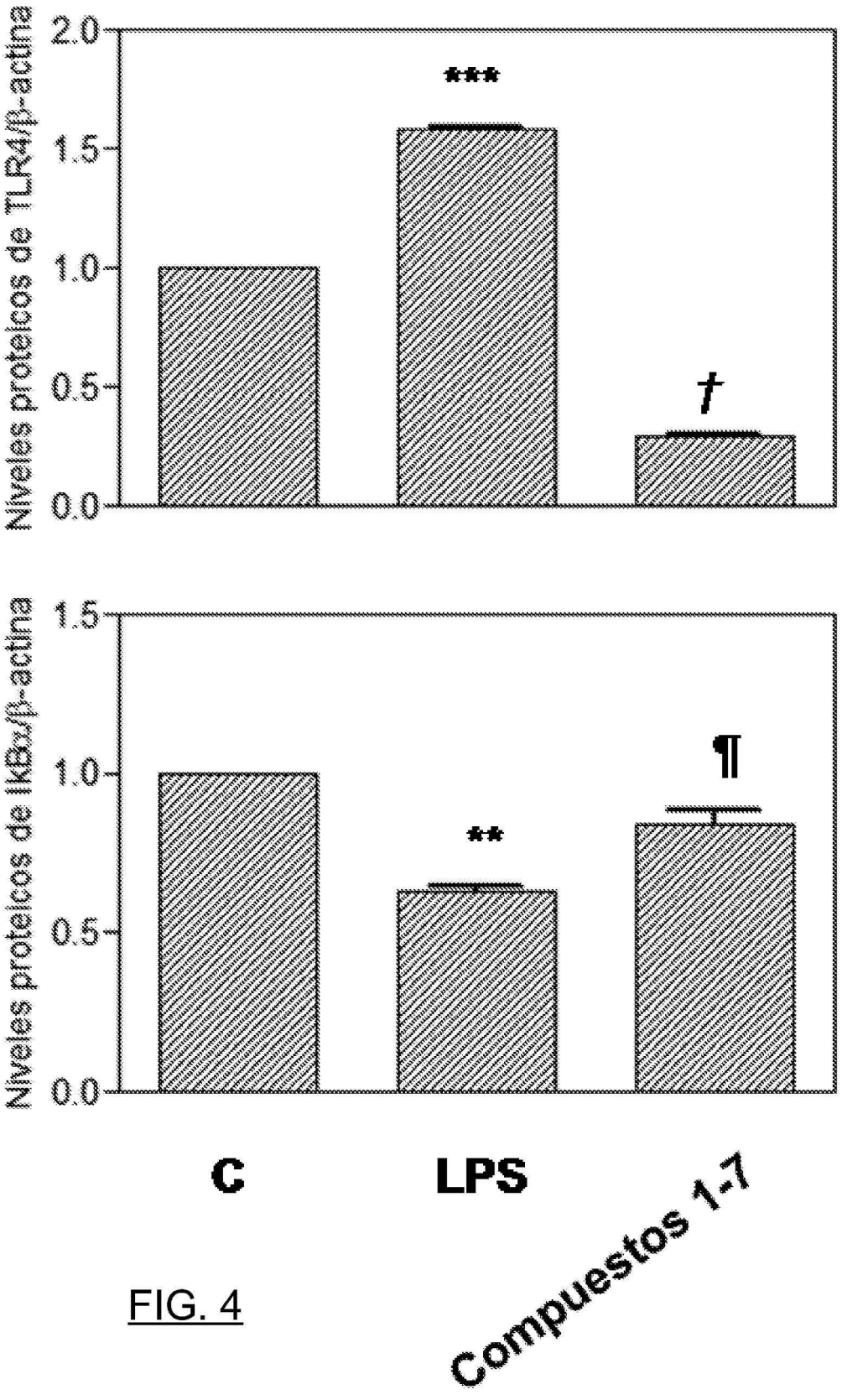

Niveles proteicos de TLR4/β-actina
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
†
Niveles proteicos de IκBα/β-actina
1.5
1.0
0.5
0.0
**
¶
C
LPS
Compuestos 1-7

FIG. 4

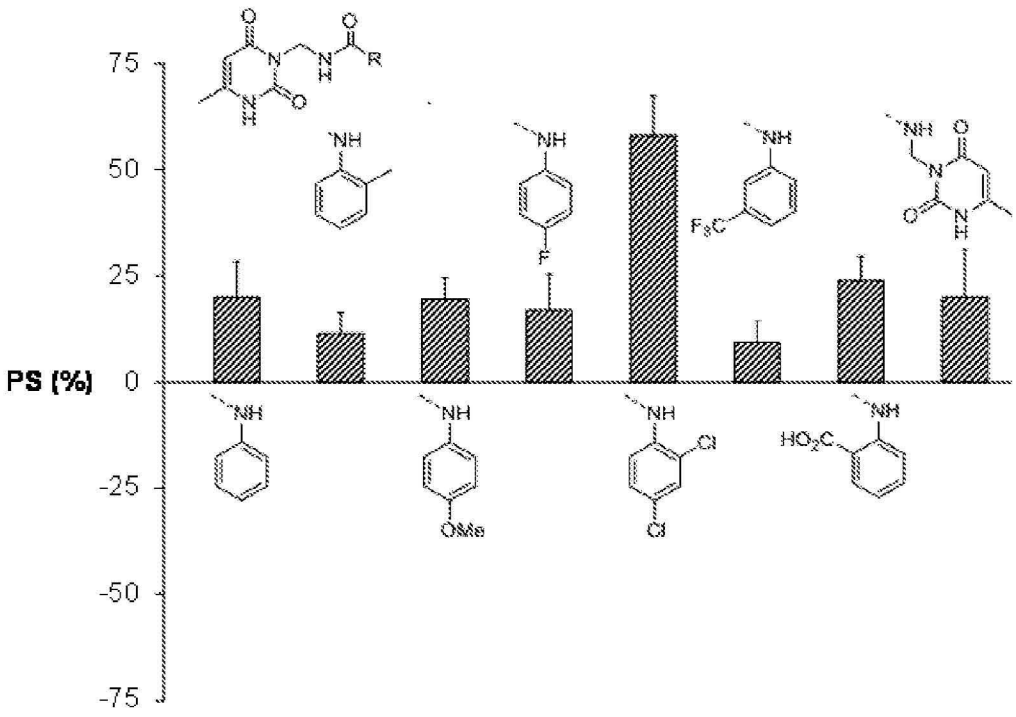


FIG. 5

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201031978

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2010

(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	JAKUBNIENE, V. et al. "Synthesis of (pyrimidin-4-yloxy)- and (pyrimidin-3-yl)acetyl azides and their rearrangement to carbamates and ureas". ARKIVOC, Volumen 2010, Parte (xi), páginas 39-48. [Publicado el 06.09.2010]. Ver página 40, esquema 1; página 41, esquema 2; página 42, esquema 3.	1-8
A	MAIER, J.A. et al. "Development of N-4,6-pyrimidine-N-alkyl-N'-phenylureas as orally Active inhibitors of lymphocyte specific tyrosine kinase." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2006, Volumen 16, páginas 3646-3650. [Disponible en línea el 08.05.2006]. Ver página 3646, figura 1; página 3647, tabla 1; página 3650, columna 2, párrafo 3.1.	1-35
A	BRUGEL, T.A. et al. "Development of N-2,4-pyrimidine-N-alkyl-N'-phenylureas as inhibitors of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) synthesis. Part 1." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2006, Volumen 16, páginas 3510-3513. [Disponible en línea el 02.05.2006]. Ver página 3510, columna 1, párrafo 1; página 3511, tabla 1.	1-35
A	EP 1466906 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMACEUTICALS INC.) 13.04.2004, párrafos [0001],[0023]; fórmula 1.	1-35
A	LATTHE, P.R. et al. "Curtius rearrangement reactions of 3-(4-azidocarbonyl) phenylsydnone. Synthesis of 4-(sydnon-3-yl) phenyl carbamates, N-aryl-N'-[4-(sydnon-3-yl)] phenyl ureas and their antimicrobial and insecticidal activities". Journal of Chemical Sciences 2006, Volumen 118, Número 3, páginas 249-256. Ver página 249, resumen; página 250, esquema 1.	1-35

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	Examinador	Página
04.04.2012	G. Esteban García	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D239/54 (2006.01)
A61K31/505 (2006.01)
A61P29/00 (2006.01)

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

C07D, A61K, A61P

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

EPODOC,WPI, REGISTRY,HCAPLUS,MEDLINE,BIOSIS,XPESP,NPL,EMBASE,CHEMSPIDER,PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.04.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	9-35	**SI**
	Reivindicaciones	1-8	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	9-35	**SI**
	Reivindicaciones	1-8	**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	JAKUBNIENE, V. et al. ARKIVOC, Vol. 2010, Parte (xi), pp. 39-48	06.09.2010

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

El objeto de la invención es un compuesto derivado de urea pirimidínica de fórmula (**I**) para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (**I**) y el uso de dicho compuesto de fórmula (**I**) para la elaboración de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

El documento D01 divulga una serie de ureas que comprenden un grupo pirimidina, que se obtienen por reagrupamiento de acilazidas y reacción de los isocianatos resultantes con aminas (ver página 40, esquema 1; página 41, esquema 2; página 42, esquema 3). Entre los compuestos divulgados se encuentran las ureas pirimidínicas **15** (R es fenilo en el compuesto (**I**) de la invención), **16** (R es o-metilfenilo en el compuesto de la invención), **17** (R es *p*-metoxifenilo), **18** (R es *p*-fluorofenilo), **19** (R es *o,p*-diclorofenilo), **20** (R es *m*-trifluorometilfenilo) y **21** (R es 6-metil-2,4-dioxo-dihidropirimidin-3(4*H*)-il), que son idénticos a los compuestos de la invención. Los compuestos divulgados tienen potenciales actividades biológicas (página 40, párrafo 1), por lo que se ensayaron como agentes antiproliferativos, si bien resultaron inactivos (página 42, párrafo 3).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-8** no es nuevo según lo divulgado en el documento D01 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera conducir a la invención objeto de las reivindicaciones 9-18, que se refieren a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (**I**), ni a las reivindicaciones **19-35**, relativas al uso de dicho compuesto de fórmula (**I**) para la elaboración de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **9-35** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.