

## **MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE UNA LESIÓN RENAL AGUDA**

### **REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud reivindica la Solicitud Provisional de Patente de EE.UU. N°. 62/404.390, presentada el 5 de octubre de 2016. La divulgación completa de la solicitud mencionada precedentemente se incorpora en la presente a modo de referencia.

### **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención está dirigida a métodos de tratamiento de un paciente humano con una lesión renal aguda.

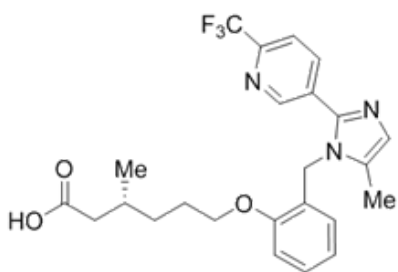
### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La lesión renal aguda (AKI), conocida anteriormente como insuficiencia renal aguda (ARF), es un síndrome clínico caracterizado por un deterioro rápido de la función renal que se produce en el transcurso de días. La característica principal de una AKI es un deterioro abrupto de la tasa de filtración glomerular (GFR), que da como resultado la retención de desechos nitrogenados (urea, creatinina). En la población mundial general, se producen anualmente 170-200 casos de una AKI severa por millón de integrantes de dicha población. Hasta la fecha, no hay un tratamiento específico para una AKI establecida. Se han encontrado varios fármacos que mejoran profilácticamente una AKI experimental tóxica e isquémica, que se manifiesta por niveles de creatinina en suero más bajos, un daño histológico reducido y una recuperación más rápida de la función renal en diferentes modelos de animales. Los mismos incluyen antioxidantes, bloqueantes de los canales de calcio, diuréticos, sustancias vasoactivas, factores de crecimiento, agentes antiinflamatorios y otros más. Sin embargo, estos fármacos se han estudiado en ensayos clínicos y no presentaron beneficios, y su uso en una AKI clínico aún no ha sido aprobado. Una vez que la AKI se ha desarrollado el tratamiento es aún más difícil.

Los compuestos que se divulgan en la presente son ejemplos de moduladores del receptor delta activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\alpha$ ). El PPAR $\alpha$  es un receptor nuclear que puede regular la biosíntesis de mitocondrias. Se ha demostrado que la modulación de la actividad del PPAR $\alpha$  es de utilidad para el tratamiento de enfermedades.

## RESUMEN DE LA INVENCION

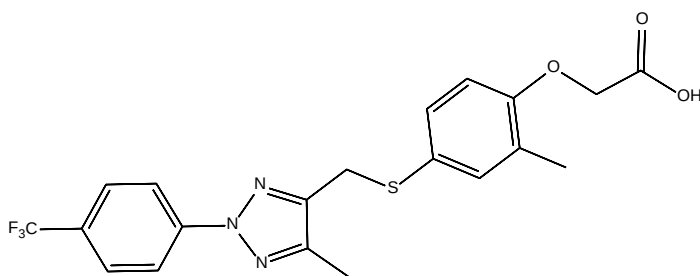
Se ha encontrado ahora que un compuesto, el ácido (*R*)-3-metil-6-(2-((5-metil-2-(6-(trifluorometil)piridin-3-il)-1*H*-imidazol-1-il)metil)fenoxi)hexanoico, representado por la siguiente fórmula estructural:



(de aquí en adelante “Compuesto A”)

redujo la lesión renal en un modelo de rata de enfermedad renal aguda (véase el Ejemplo 2). Específicamente, el Compuesto A redujo significativamente los niveles de creatinina en plasma, mejora la función renal y reduce el biomarcador temprano de una lesión renal NGAL, cuando se administra por vía intravenosa cuatro horas después de una inducir una lesión por reperfusión isquémica en los riñones de ratas de laboratorio.

También se ha encontrado que el Compuesto B, representado por la siguiente fórmula estructural:



(de aquí en adelante

“Compuesto B”)

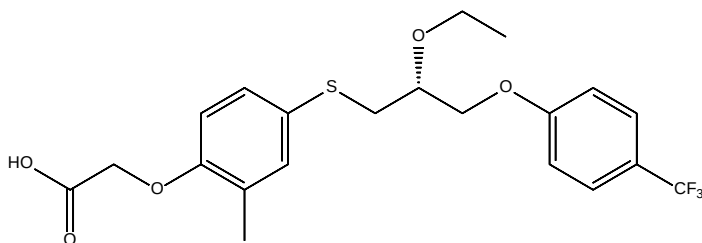
redujo la lesión renal en un modelo de rata de enfermedad renal aguda (véase el Ejemplo 3). Específicamente, el Compuesto B redujo significativamente los niveles de creatinina en plasma y mejora la función renal cuando se administra por vía oral cuatro horas después de inducir una lesión por reperfusión isquémica en los riñones de ratas de laboratorio.

En la presente se divulgan métodos de tratamiento de una lesión renal aguda sobre la base de estos descubrimientos.

Una forma de realización de la invención es un método de tratamiento de un paciente humano con una lesión renal aguda. El método comprende administrarle al paciente por vía intravenosa una cantidad eficaz del Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra forma de realización de la invención es un método de tratamiento de un paciente humano con una lesión renal aguda. El método comprende administrarle al paciente una cantidad eficaz del Compuesto B o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una forma de realización, el Compuesto B se administra por vía oral; en otra forma de realización, se administra por vía intravenosa.

Aún otra forma de realización de la invención es un método de tratamiento de un paciente humano con una lesión renal aguda. El método comprende administrarle al paciente una cantidad eficaz del Compuesto C:



(de aquí en adelante

“Compuesto C”);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una forma de realización, el Compuesto C se administra por vía oral; en otra forma de realización, se administra por vía intravenosa.

Otra forma de realización de la invención es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en el tratamiento por vía intravenosa de un paciente humano con una lesión renal aguda.

Aún otra forma de realización de la invención es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en el tratamiento de un paciente humano con una lesión renal aguda. En una forma de realización, el Compuesto B es para una administración oral; en otra forma de realización, el Compuesto B es para una administración intravenosa.

Aún otra forma de realización de la invención es el Compuesto C, o una sal

farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en el tratamiento de un paciente humano con una lesión renal aguda. En una forma de realización, el Compuesto C es para una administración oral; en otra forma de realización, el Compuesto C es para una administración intravenosa.

Aún otra forma de realización de la invención es el uso del Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento para tratar por vía intravenosa a un paciente humano con una lesión renal aguda.

Aún otra forma de realización de la invención es el uso del Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento para tratar a un paciente humano con una lesión renal aguda. En una forma de realización, el Compuesto B es para una administración oral; en otra forma de realización, el Compuesto B es para una administración intravenosa.

Aún otra forma de realización de la invención es el uso del Compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento para tratar a un paciente humano con una lesión renal aguda. En una forma de realización, el Compuesto C es para una administración oral; en otra forma de realización, el Compuesto B es para una administración intravenosa.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1 a, b y c son gráficos de barra en las cuales se muestra el efecto terapéutico del Compuesto A administrado por vía intravenosa en un modelo de lesión renal aguda de rata. El gráfico de barra 1a muestra los niveles de creatinina en plasma expresados en mg/dl en ratas 24 horas después de la lesión renal. Las barras representan, de izquierda a derecha, los niveles de creatinina en plasma en ratas sin lesión renal que recibieron vehículo por vía intravenosa y en ratas con lesión renal que recibieron, por vía intravenosa, vehículo; 0,3 mpk del Compuesto A; 1 mpk del Compuesto A; y 3,0 mpk del Compuesto A. De manera similar, el gráfico de barra 1b muestra los niveles de depuración de creatinina, una estimación de la función renal o GFR (tasa de filtración glomerular) 24 horas después de la lesión renal y el gráfico de barra 1c muestra los niveles en orina de NGAL (lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos) 48 horas después de una lesión renal. La NGAL es un biomarcador

temprano de una lesión renal que a menudo se utiliza en la práctica clínica.

Las Figuras 2 a y b son gráficos de barra en las cuales se muestra el efecto terapéutico del Compuesto B en un modelo de lesión renal aguda de rata. El gráfico de barra 2a muestra los niveles de creatinina en plasma expresados en mg/dl en ratas 24 horas después de la lesión renal. Las barras representan, de izquierda a derecha, los niveles de creatinina en plasma en ratas sometidas a una cirugía simulada que recibieron dosis de 30 mpk de vehículo; ratas con una lesión renal aguda que recibieron dosis de 30 mpk de vehículo; y ratas con una lesión renal aguda que recibieron dosis de 30 mpk del Compuesto B. De manera similar, en el gráfico de barra 2b se muestran los niveles de depuración de creatinina, una estimación de la función renal o la GFR (tasa de filtración glomerular).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se proveen métodos para tratar una lesión renal aguda en un paciente humano. Dichos métodos comprenden administrar una cantidad eficaz del Compuesto A, del Compuesto B o del Compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto A, del Compuesto B o del Compuesto C, al paciente humano. En una forma de realización, el Compuesto A, el Compuesto B o el Compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto A, del Compuesto B o del Compuesto C, se administra después que el paciente humano hubiera desarrollado una lesión renal aguda. El Compuesto A preferiblemente se administra por vía intravenosa.

Según se usa en la presente, el término “lesión renal aguda” o “AKI”, denominada previamente “insuficiencia renal aguda” o “ARF”, se refiere a un síndrome clínico agudo caracterizado por un deterioro rápido de las funciones renales, que es causado por numerosos factores, tales como una reducción en el flujo sanguíneo renal, glomerulonefritis, el uso de antibióticos nefrotóxicos y agentes anticáncer.

La lesión renal aguda se define como una disminución abrupta de la función renal, y se puede diagnosticar en base a los cambios que presenta un paciente de uno o más entre el nivel de creatinina en suero, la tasa de filtración glomerular o producción de orina. Por ejemplo, una lesión renal aguda se puede caracterizar por un nivel de creatinina en suero de por lo menos 1,5 veces con respecto al nivel basal, en donde el

nivel basal se refiere al nivel de creatinina en suero de un paciente no más de 7 días antes. Por ejemplo, un paciente que tiene una lesión renal aguda puede tener un nivel de creatinina en suero de entre 1,5 y 1,9 veces el nivel basal, entre 2,0 y 2,9 veces el nivel basal o 3,0 o más veces el nivel basal. Como alternativa, la lesión renal aguda se puede caracterizar por un aumento de creatinina en suero de por lo menos 0,3 mg/dl o por lo menos 0,4 mg/dl.

Como alternativa, la lesión renal aguda se puede caracterizar por una tasa de filtración glomerular menor que 90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. Por ejemplo, un paciente que padece una lesión renal aguda puede tener una tasa de filtración glomerular de 60–89 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, 30–59 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, 15–29 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> o menor que 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.

Como alternativa, una lesión renal aguda se puede caracterizar porque el paciente tiene una producción de orina menor que 0,5 ml/kg durante 6 horas, menor que 0,5 ml/kg durante 12 horas, menor que 0,3 ml/kg durante 12 horas o anuria durante 12 o más horas.

La lesión renal aguda se puede observar en enfermedades renales específicas (por ejemplo, nefritis intersticial aguda, enfermedades renales glomerulares y vasculíticas agudas); condiciones no específicas (por ejemplo, isquemia, lesiones tóxicas); así como una patología extrarrenal (por ejemplo, azotemia prerrenal y una nefropatía obstructiva postrenal aguda). Más de una de estas condiciones puede coexistir en el mismo paciente y, más importante aún, la evidencia epidemiológica sustenta la noción que aún una AKI leve, reversible, tiene consecuencias clínicas importantes, incluido un mayor riesgo de muerte. Además, dado que las manifestaciones y las consecuencias clínicas de una AKI pueden ser bastante similares (hasta idénticas) independientemente de si la etiología es predominantemente del interior del riñón o si es predominantemente debido a algún estrés externo al riñón, el síndrome de AKI abarca tanto una lesión directa en el riñón así como deterioros agudos de la función.

En algunas formas de realización, el paciente bajo tratamiento por una AKI padece diabetes, una insuficiencia renal subyacente, síndrome nefrítico, enfermedad

aterosclerótica, sepsis, hipotensión, hipoxia, mioglobulinuria-hematuria o una enfermedad hepática. En otras formas de realización, el paciente es de edad avanzada, una mujer embarazada, un paciente quirúrgico o ha estado expuesto a un agente nefrotóxico.

En una forma de realización específica, el paciente bajo tratamiento por una AKI es un paciente quirúrgico. Por lo tanto, en determinadas formas de realización, el compuesto será administrado a un paciente quirúrgico después de la cirugía.

En otra forma de realización, el paciente bajo tratamiento por una AKI ha estado expuesto a un agente nefrotóxico. Un agente nefrotóxico es un fármaco o una sustancia química capaz de causar una AKI. Los fármacos o las sustancias químicas capaces de causar una lesión renal aguda incluyen, pero en un sentido no taxativo, cisplatino; gentamicina; cefaloridina; ciclosporina; anfotericina; tetracloruro de carbono; tricloroetileno y dicloroacetileno.

Como tal, un paciente con AKI debida a cualquiera de las condiciones mencionadas en los tres párrafos anteriores se pueden tratar con el Compuesto A, el Compuesto B o el Compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto A, del Compuesto B o del Compuesto C, de acuerdo con los métodos divulgados.

Las sales farmacéuticamente aceptables del Compuesto A, del Compuesto B y del Compuesto C se pueden usar en los métodos divulgados. El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a las sales farmacéuticas que, dentro del juicio médico reconocido, son apropiadas para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores, sin una toxicidad, irritación o respuesta alérgica inapropiadas, y que satisfagan una relación de beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en el arte. Por ejemplo, S. M. Berge, *et al.*, describen sales farmacéuticamente aceptables en *J. Pharm. Sci.*, 1977, **66**: 1-19. Pueden ser sales formadas por adición con ácidos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido bencensulfónico, ácido benzoico, ácido metansulfónico, ácido *p*-toluensulfónico y ácido de meglumina; y por adición con bases, por ejemplo, sales de amonio, sales de metales alcalinos (tales como sales de sodio y potasio), sales de metales alcalino-térreos (tales como sales de magnesio y calcio) y sales de bases orgánicas (tales como sales de

meglumina y L-lisina).

#### *Composiciones farmacéuticas y su administración*

El Compuesto A, el Compuesto B o el Compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto A, del Compuesto B o del Compuesto C, se pueden usar en combinación con otros agentes conocidos por ser beneficiosos para una AKI.

La cantidad precisa del Compuesto administrado para proporcionar una “cantidad eficaz” al sujeto dependerá del modo de administración, el tipo y la severidad de la enfermedad y/o condición y de las características del sujeto, tal como el estado de salud general, la edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El especialista podrá determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores. El término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad que cuando se administra al sujeto permitirá obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos, por ejemplo, que inhibe, suprime o reduce los síntomas de la condición bajo tratamiento en el sujeto en comparación con un control. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede comprender entre 0,1 mg y aproximadamente 50 g por día.

Los términos "administrar", "administrando", "administración" y semejantes, según se usan en la presente, se refieren a métodos que se pueden usar para suministrar composiciones en el sitio deseado para la acción biológica. Estos métodos incluyen, pero en un sentido no taxativo, una administración intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, oral, tópica, intratecal, por inhalación, transdérmica, rectal y semejantes. Comúnmente se utiliza una administración oral e intravenosa, por ejemplo, cuando la condición bajo tratamiento es una lesión renal aguda. Las técnicas de administración que se pueden emplear con los agentes y métodos que se describen en la presente se pueden consultar, por ejemplo, en Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edición actual; Pergamon; y Remington's, *Pharmaceutical Sciences* (edición actual), Mack Publishing Co., Easton, Pa.

Las composiciones farmacéuticas usadas en los métodos divulgados incluyen el Compuesto A, el Compuesto B o el Compuesto C, o una sal farmacéuticamente

aceptable del Compuesto A, del Compuesto B o del Compuesto C, y típicamente por lo menos una sustancia adicional, tal como un excipiente, un agente terapéutico conocido distinto de aquellos de la presente divulgación, y combinaciones de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en los métodos divulgados se formulan para que sean compatibles con su ruta de administración pretendida. En una forma de realización, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica e sujetos humanos.

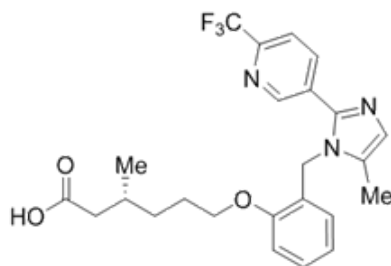
La administración de los agentes terapéuticos mediante una formulación intravenosa es bien conocida en la industria farmacéutica. Las formulaciones intravenosas comprenden el agente farmacéuticamente activo (por ejemplo, el Compuesto A, el Compuesto B o el Compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto A, del Compuesto B o del Compuesto C) disuelto en un solvente o una solución farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, soluciones salinas normales, Ringer lactato u otras soluciones de sales tal como una solución de Ringer. La formulación debería promover la estabilidad global de uno o más de los ingredientes activos, además, la elaboración de la formulación debería ser efectiva en cuanto al costo. Todos estos factores determinarán finalmente el éxito general y la utilidad de una formulación intravenosa.

Una formulación oral típicamente se prepara como una preparación comprimida, por ejemplo, en la forma de un comprimido o una píldora. Un comprimido puede contener, por ejemplo, aproximadamente 5-10% del ingrediente activo (por ejemplo, el Compuesto A, el Compuesto B o el Compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto A, del Compuesto B o del Compuesto C), aproximadamente 80% entre rellenos, desintegrantes, lubricantes, deslizantes y aglutinantes; y 10% de compuestos que aseguren una fácil desintegración, desagregación y disolución del comprimido en el estómago o el intestino. Las píldoras se pueden recubrir con azúcar, barniz o cera para enmascarar el sabor.

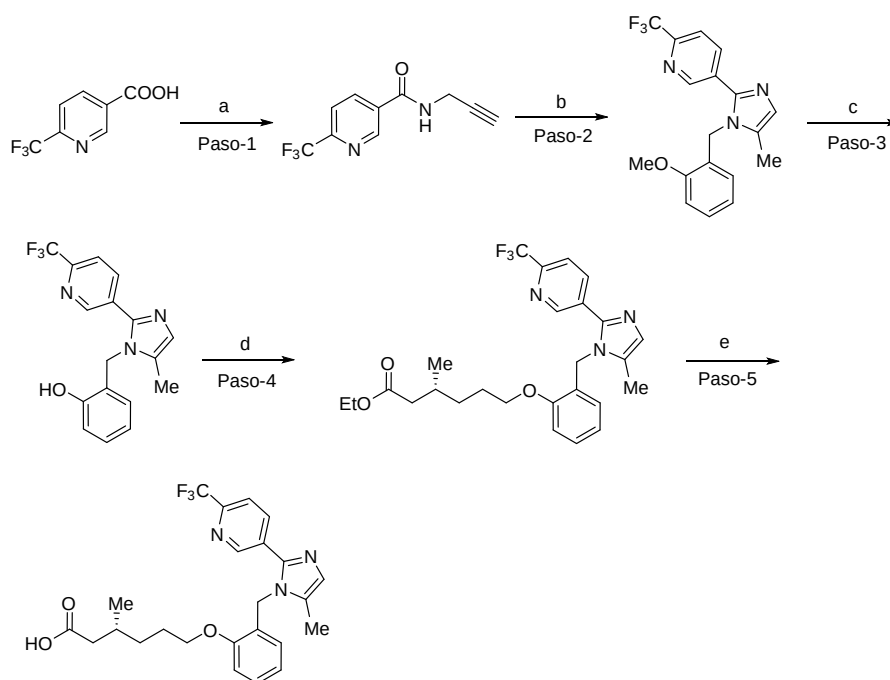
## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1**

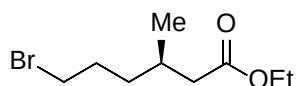
**Síntesis de ácido (R)-3-metil-6-(2-((5-metil-2-(6-(trifluorometil)piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)metil)fenoxi)hexanoico (Compuesto A)**



**Esquema:**



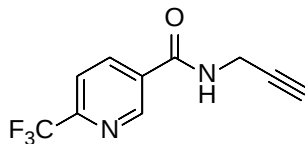
**Síntesis de (R)-6-bromo-3-metilhexanoato de etilo:**



En un balón de 1 l, se trató una solución de (R)-6-hidroxi-3-metilhexanoato de etilo (65,0 g, 373,56 mmol) en diclorometano (650 ml) con  $\text{PBr}_3$  (101,0 g, 373,56 mmol) a temperatura ambiente (RT). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 3 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la mezcla de reacción se diluyó con agua (500 ml) y se extrajo con dietiléter (3 x 500 ml). El extracto orgánico se separó y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. El solvente se eliminó bajo presión reducida

para obtener el compuesto del título (57,12 g).

*Paso 1: Síntesis de N-(prop-2-en-1-il)-6-(trifluorometil)nicotinamida:*

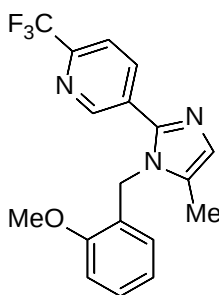


En un balón de 100 ml, se trató una solución agitada de ácido 6-(trifluorometil)nicotínico (3 g, 15,70 mmol) y prop-2-en-1-amina (1,05 g, 18,84 mmol) en dimetilformamida (DMF: 50 ml) con hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridinio (7,2 g, 18,84 mmol) y trietilamina (3,1 ml, 23,55 mmol) a RT bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción resultante se agitó a RT durante 3 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la mezcla de reacción se diluyó con agua fría y se filtró el sólido precipitado, se lavó con agua y se secó bajo presión reducida para dar el compuesto del título (2,6 g, 72,6%).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9,08 (d,  $J$  = 2,1 Hz, 1H), 8,32 (dd,  $J$  = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 7,78 (d,  $J$  = 7,8 Hz, 1H), 6,62 (brs, 1H), 4,30-4,28 (m, 2H), 2,33 (t,  $J$  = 2,4 Hz, 1H).

LCMS (ESI+,  $m/z$ ): 229,2 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

*Paso 2: Síntesis de 5-(1-(2-metoxibencil)-5-metil-1H-imidazol-2-il)-2-(trifluorometil)piridina:*

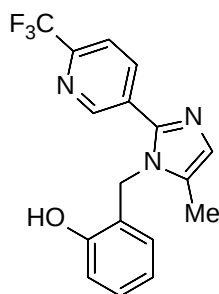


En un tubo resellable de 50 ml, se trató una solución de N-(prop-2-en-1-il)-6-(trifluorometil)nicotinamida (1,0 g, 4,38 mmol) y 2-metoxifenilbencilamina (1,2 g, 8,77 mmol) en tolueno (10 ml) con trifluorometansulfonato de zinc (0,16 g, 0,43 mmol) a RT bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 12 h.

Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). El extracto orgánico se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La solución se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (elución, 25% de EtOAc en hexanos) para dar el compuesto del título (0,8 g, 52,6%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,79 (s, 1H), 8,07 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,68 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,31 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,09 (s, 1H), 6,94-6,87 (m, 2H), 6,56 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,16 (s, 2H), 3,87 (s, 3H). LCMS (ESI+, *m/z*): 348,3 (M+H)<sup>+</sup>.

*Paso 3: Síntesis de 2-((5-metil-2-(6-(trifluorometil)piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)metil)fenol:*

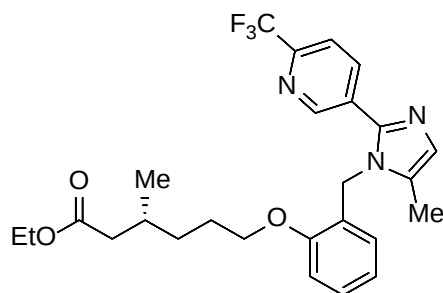


En un balón de 100 ml, se trató una solución de 5-(1-(2-metoxibencil)-5-metil-1H-imidazol-2-il)-2-(trifluorometil)piridina (0,8 g, 2,31 mmol) en diclorometano (300 ml) con BBr<sub>3</sub> (0,8 ml, 2,31 mmol) por gotas a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 2 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la mezcla de reacción se alcalinizó (pH ~ 9) con NaHCO<sub>3</sub> acuoso y se extrajo con acetato de etilo (EtOAc). El extracto orgánico se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró bajo presión reducida para obtener el compuesto del título (0,5 g, 65,1%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  9,92 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,12 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,94 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 7,02 (s, 1H), 6,87 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 6,73 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,37 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 5,20 (s, 2H), 2,15 (s, 3H).

LCMS (ESI+, *m/z*): 334,3 (M+H)<sup>+</sup>.

*Paso 4: Síntesis de (R)-3-metil-6-(2-((5-metil-2-(6-(trifluorometil)piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)metil)fenoxi)hexanoato de etilo:*

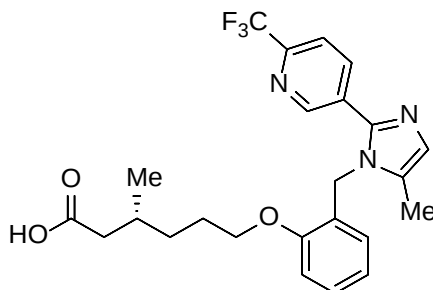


En un balón de 50 ml, se trató una solución agitada de 2-((5-metil-2-(6-(trifluorometil)piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)metil)fenol (0,5 g, 1,50 mmol) en DMF (10 ml) con  $K_2CO_3$  (0,41 g, 3,00 mmol) y (R)-6-bromo-3-metilhexanoato de etilo (0,710 g, 3,00 mmol) a RT bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción resultante se calentó a 60 °C durante 12 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la reacción se detuvo con agua helada y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (75 ml X 3). El extracto orgánico combinado se lavó con salmuera, se secó sobre  $Na_2SO_4$  anhidro y se concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente, 15-30% de EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto del título (0,45 g, 61,3%).

Rendimiento: 0,45 g (61,3%).

LCMS (ESI+,  $m/z$ ): 491,0 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

*Paso 5: Síntesis de ácido (R)-3-metil-6-(2-((5-metil-2-(6-(trifluorometil)piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)metil)fenoxi)hexanoico (Compuesto A):*



En un balón de 250 ml, se trató una solución agitada de (R)-3-metil-6-(2-((5-metil-2-(6-(trifluorometil)piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)metil)fenoxi)hexanoato de etilo (0,45 g, 0,92 mmol) en tetrahidrofurano (THF; 5 ml), etanol (2,5 ml) y agua (2,5 ml),

con hidróxido de litio monohidrato (16,0 g, 74,33 mmol) a RT. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 12 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido se lavó con EtOAc, se diluyó con agua fría y se acidificó (pH ~5) con HCl 1 N. El sólido se filtró y se secó bajo presión reducida para dar el compuesto del título (0,166 g, 39,2 %).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11,96 (brs, 1H), 8,79 (s, 1H), 8,05 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 7,90 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 7,24 (t,  $J$  = 7,6 Hz, 1H), 7,02 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 7,00 (s, 1H), 6,84 (t,  $J$  = 7,6 Hz, 1H), 6,43 (d,  $J$  = 7,2 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 3,98 (t,  $J$  = 6,0 Hz, 2H), 2,19-2,14 (m, 1H), 2,13 (s, 3H), 2,03-1,94 (m, 1H), 1,85-1,80 (m, 1H), 1,68-1,66 (m, 2H), 1,38-1,36 (m, 1H), 1,28-1,18 (m, 1H), 0,85 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 3H).

$^{19}\text{F}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  66,46.

LCMS (ESI+,  $m/z$ ): 462,3 ( $M+H$ ) $^+$ .

HPLC: 95,11 % (210 nm).

### **Preparación de la sal de meglumina del Compuesto A**

Se usaron dos métodos separados para generar una sal meglumina del Compuesto A.

#### *Método 1*

El Compuesto A (102,7 mg) se combinó con meglumina (43,7 mg) y con 2 ml de 2-propanol en un vial de vidrio de 4 ml. El vial se selló con una tapa y el contenido fue sometido a sonicación a 25 °C durante 20 minutos seguido por agitación a 50 °C durante 60 minutos. Luego el vial se llevó a otra placa de agitación y se agitó la lechada del vial a 25 °C.

#### *Método 2*

El Compuesto A (102,2 mg) se combinó con meglumina (43,2 mg) y 2 ml de acetonitrilo en un vial de vidrio de 4 ml. El vial se selló con una tapa y el contenido fue sometido a sonicación a 25 °C durante 20 minutos seguido por agitación a 50 °C durante 60 minutos. Luego el vial se llevó a otra placa de agitación y se agitó la lechada del vial a 25 °C.

En ambos método 1 y método 2, después de 2 días de agitación a 25 °C, se

centrifugaron ambas muestras, se descartaron los sobrenadantes y se secaron los sólidos al aire.

### **Preparación del hidrato de la sal de meglumina del Compuesto A**

En un balón de 500 ml, se trató una solución agitada del Compuesto A (20 g, 43,33 mmol) en THF (100 ml) y agua (100 ml) con meglumina (8,45 g, 43,33 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a RT durante 6 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el sólido obtenido se secó bajo presión reducida (3 h) para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (28,5 g, 98,95%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8,75 (s, 1H), 8,02 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 7,82 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 7,26 (t,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,99 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 6,85 (t,  $J$  = 7,6 Hz, 1H), 6,50 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1H), 5,25 (s, 2H), 4,09-3,99 (m, 3H), 3,97-3,77 (m, 2H), 3,74-3,61 (m, 3H), 3,29-3,06 (m, 2H), 2,64 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 2,18-2,14 (m, 1H), 1,99 - 1,94 (m, 2H), 1,83 - 1,75 (m, 2H), 1,51 - 1,38 (m, 1H), 1,32-1,22 (m, 1H), 0,86 (d,  $J$  = 6,0 Hz, 3H).

$^{19}\text{F}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  69,39.

Análisis elemental: Calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_8$ . Hallado: C, 55,18; H, 6,72; N, 8,30. Hallado: C, 54,95; H, 6,89; N, 8,07.

Contenido de humedad (Karl Fischer): 2,33%

### **Ejemplo 2**

#### **El Compuesto A reduce la lesión por reperusión isquémica cuando se administra por vía intravenosa en un modelo en animales de lesión renal aguda**

*Animales, cirugía y dosificación:* En estos experimentos se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente 280-300 g, con acceso *ad libitum* a alimento estándar y agua. Las ratas ( $n$  = 8/grupo) se anestesiaron con isoflurano y se colocaron sobre su lado ventral sobre una plataforma quirúrgica caliente a temperatura controlada. Se practicó una incisión en la piel sobre la superficie dorsal, exponiendo ambos riñones mediante incisiones en los flancos. Se aplicaron clips vasculares a ambos pedículos renales y la oclusión duró 45 minutos. Después de 45 min, se retiraron los clips, se monitorearon los riñones por una reperusión exitosa y luego se suturaron

los sitios quirúrgicos. El grupo simulado (n = 4 ratas) fue sometido a procedimientos quirúrgicos similares, excepto que no se aplicaron los sujetadores [*clamps*] oclusivos. El Compuesto A se formuló como una solución traslúcida preparada diariamente de la forma hidratada de la sal de meglumina del Compuesto A (1,5 equivalentes molares del Compuesto A) en 5% de dextrosa. El Compuesto A se administró como una dosis IV por la vena de la cola a razón de 3 mg/kg, 1 mg/kg o 0,3 mg/kg a las 4 horas después que los animales despertaran de la cirugía y la cirugía simulada y los animales control con IRI recibieron dosis similares de vehículo.

*Recolección de sangre:* A las veinticuatro (24) horas después de la reperfusión, se recolectó sangre en tubos EDTA K2 mediante sangrado retroorbital de todos los grupos bajo una anestesia con isoflurano suave. El plasma se separó mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

*Recolección de orina.* Todos los grupos de animales del estudio fueron colocados en jaulas metabólicas inmediatamente después de su recuperación de la cirugía y se recolectó orina durante 24 ó 48 horas. Se midió cuidadosamente el volumen de orina y luego se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar los sedimentos.

Se analizó la creatinina en plasma y orina usando un analizador de bioquímica clínica completamente automático (Siemens Dimension ® Xpand ® Plus Integrated Chemistry System). Se analizó la NGAL en orina usando un kit para ELISA BioPorto. La depuración de creatinina se calculó de la siguiente manera:

*Depuración de creatinina*

$$= \left( \frac{\left( Creatinina\ urinaria \left( \frac{mg}{dl} \right) \times Volumen\ urinario\ (ml) \right)}{\left( Creatinina\ sérica \left( \frac{mg}{dl} \right) \times 1440\ min\ (24\ hr) \right)} \right) / (100\ g\ de\ peso\ corporal)$$

*Análisis de datos y análisis estadístico:*

Se usó el software GraphPad Prism, Versión 6.05, para los gráficos y las pruebas estadísticas. Se evaluó la distribución normal para creatinina en todos los grupos por medio de la prueba de normalidad ómnibus de D'Agostino-Pearson y una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. La significancia estadística (p<0,05) se determina

mediante un ANOVA común de una vía seguido por la comparación múltiple de Dunnett usando el grupo tratado con IRI como grupo control. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$  versus IR-vehículo.

*Resultados:* Los datos se muestran en la Figura 1. El Compuesto A, administrado como dosis IV a las 4 horas después de la isquemia, reduce la lesión renal. El Compuesto A reduce significativamente la creatinina en plasma, mejora la función renal y reduce el biomarcador temprano de una lesión renal NGAL cuando se administran dosis de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg.

### **Ejemplo 3**

#### **El Compuesto B reduce la lesión por reperfusión isquémica cuando se administra por vía oral en un modelo en animales de lesión renal aguda**

*Animales, cirugía y dosificación:* En estos experimentos se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente 280-300g, con acceso *ad libitum* a alimento estándar y agua. Las ratas ( $n = 8/\text{grupo}$ ) se anestesiaron con isoflurano y se colocaron sobre su lado ventral sobre una plataforma quirúrgica caliente a temperatura controlada. Se practicó una incisión en la piel sobre la superficie dorsal, exponiendo ambos riñones mediante incisiones en los flancos. Se aplicaron clips vasculares a ambos pedículos renales y la oclusión duró 45 minutos. Después de 45 min, se retiraron los clips, se monitorearon los riñones por una reperfusión exitosa y luego se suturaron los sitios quirúrgicos. El grupo simulado ( $n = 4$  ratas) fue sometido a procedimientos quirúrgicos similares, excepto que no se aplicaron los sujetadores [*clamps*] oclusivos. El Compuesto B se formuló como una suspensión preparada diariamente en 0,25% de carboximetilcelulosa de sodio, 0,25% de Tween-80 en agua purificada. El Compuesto B se administró como una dosis oral a razón de 30 mg/kg a las 4 horas después que los animales despertaran de la cirugía y la cirugía simulada y los animales control con IRI recibieron dosis similares de vehículo.

*Recolección de sangre:* A las veinticuatro (24) horas después de la reperfusión, se recolectó sangre en tubos EDTA K2 mediante sangrado retroorbital de todos los grupos bajo una anestesia con isoflurano suave. El plasma se separó mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

*Recolección de orina.* Todos los grupos de animales del estudio fueron colocados en jaulas metabólicas inmediatamente después de su recuperación de la cirugía y se recolectó orina durante 24 horas. Se midió cuidadosamente el volumen de orina y luego se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar los sedimentos.

Se analizó la creatinina en plasma y orina usando un analizador de bioquímica clínica completamente automático (Siemens Dimension ® Xpand ® Plus Integrated Chemistry System). La depuración de creatinina se calculó de la siguiente manera:

*Depuración de creatinina*

$$= \left( \frac{\left( \text{Creatinina urinaria} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) \times \text{Volumen urinario (ml)} \right)}{\left( \text{Creatinina sérica} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) \times 1440 \text{ min (24 hr)} \right)} \right) / (100 \text{ g de peso corporal})$$

*Análisis de datos y análisis estadístico:*

Se usó el software GraphPad Prism, Versión 6.05, para los gráficos y las pruebas estadísticas. Se evaluó la distribución normal de los datos en todos los grupos por medio de la prueba de normalidad ómnibus de D'Agostino-Pearson y una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los datos con una distribución normal fueron sometidos a una prueba t de dos colas, no apareado. Los datos con una distribución no normal fueron sometidos a la prueba de Mann-Whitney (no paramétrica). La significancia estadística se determina mediante un valor de  $p < 0,05$  de los grupos de IRI-vehículo en comparación con los grupos tratados con los compuestos. \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  versus IR-vehículo.

**Resultados:** El Compuesto B, administrado a las 4 horas después de la isquemia, reduce la lesión renal. El Compuesto B (Figura 2) reduce la creatinina en plasma y mejora la función renal cuando se administra por vía oral. El gráfico de barra 1a muestra que los niveles de creatinina en plasma expresados en mg/dl en ratas 24 horas después de la lesión renal reduce la creatinina en plasma cuando se administra por vía oral. Las barras representan, de izquierda a derecha, los niveles de creatinina en plasma en ratas sometidas a una cirugía simulada que recibieron dosis de vehículo; ratas con una lesión renal aguda que recibieron dosis de vehículo; y ratas con una lesión renal

aguda que recibieron dosis de 30 mpk del Compuesto B (Figura 2 a). De manera similar, en el gráfico de barra b se muestran los niveles de depuración de creatinina, una estimación de la función renal o la GFR (tasa de filtración glomerular) (Figura 2 b).

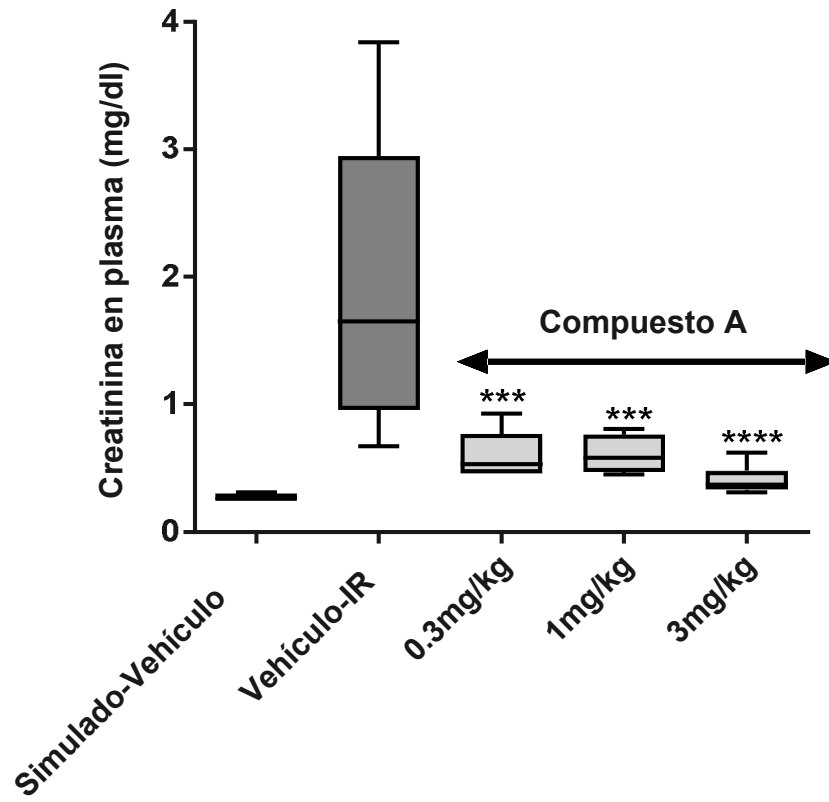


Figura 1a

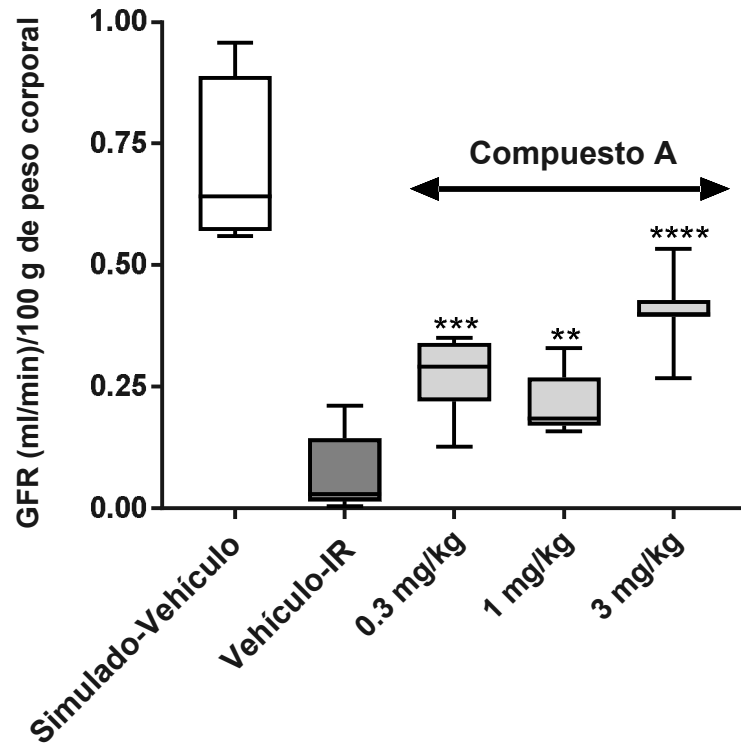


Figura 1b

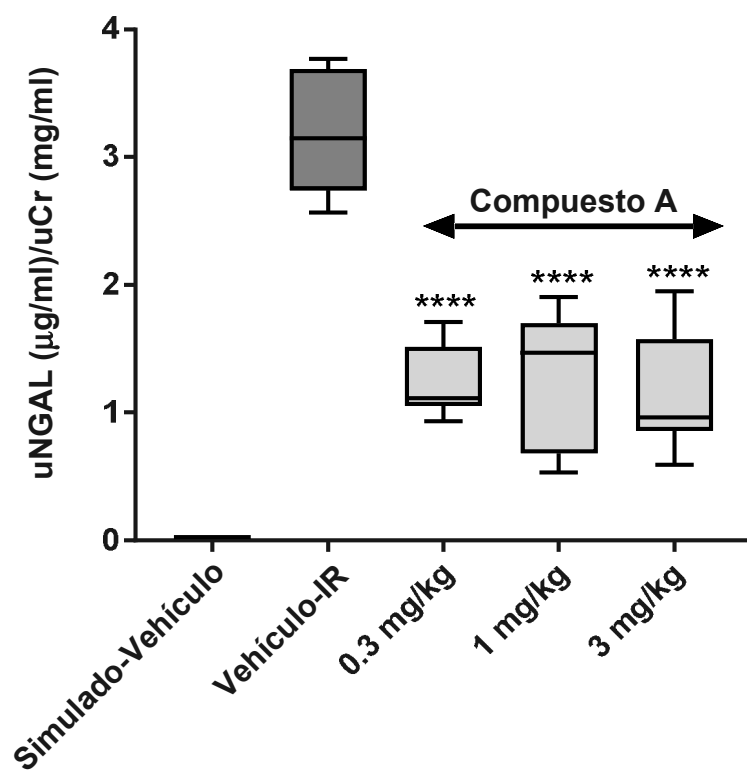


Figura 1c

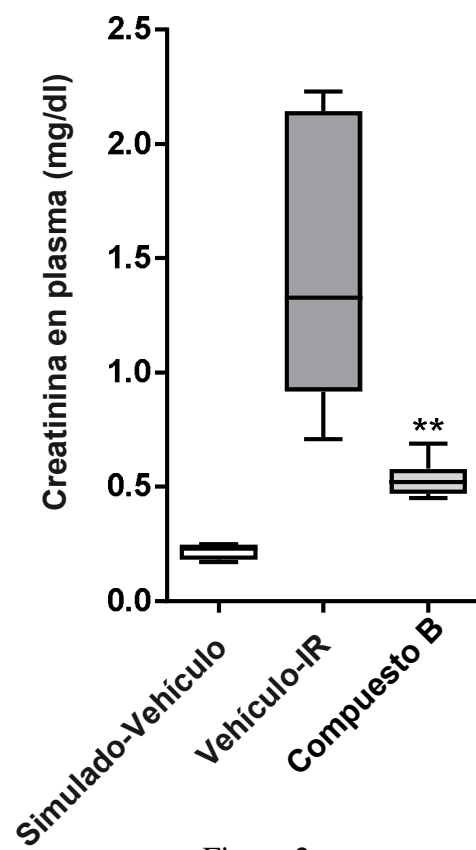


Figura 2a

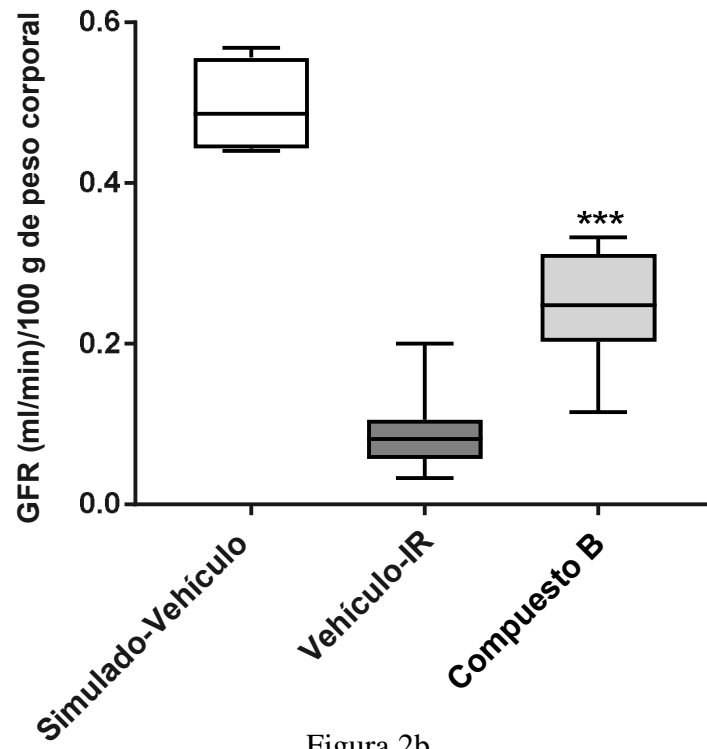


Figura 2b