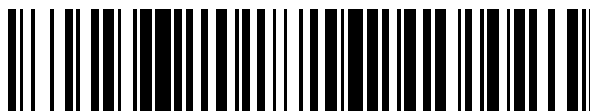


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 143**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4418** (2006.01)

**A61K 31/4412** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2009 E 09717144 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2262501**

54 Título: **Tratamiento de una septicemia con 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona**

30 Prioridad:

**07.03.2008 US 34614**

**11.09.2008 US 96132**

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

**17.10.2014**

73 Titular/es:

**SOLANAN, INC. (100.0%)**  
**9400 N. Central Expressway, Suite 305**  
**Dallas, TX 75231, US**

72 Inventor/es:

**GIRI, SHRI N.;**  
**GOUX, WARREN J. y**  
**MARGOLIN, SOLOMON B.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 509 143 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de una septicemia con 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona

## 5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un compuesto de piridona, 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona, a nuevos procedimientos para su síntesis y purificación, a composiciones farmacéuticas que lo contienen y a su uso en el tratamiento de una septicemia.

10

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0002]

15 La fig. 1 es una representación esquemática de la síntesis de la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona ("5-EPP").

La fig. 2 es una gráfica que representa una curva de supervivencia para ratones en modelo de septicemia por LPS/D-galactosamina tratada con 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona (5-EPP).

20 La fig. 3 es un dibujo de la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona ("5-EPP").

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0003] En la presente memoria descriptiva se describe un compuesto, la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona, y nuevos procedimientos para prepararlo, purificarlo, emplearlo en una composición farmacéutica para el tratamiento de una septicemia y usarlo.

[0004] El documento US-2008/025.986 (Ozes y col.) desvela procedimientos para tratar trastornos mediados por el TNF. El documento US-6.300.349 (Margolin) desvela procedimientos para la inhibición de TNF- $\alpha$ .

30

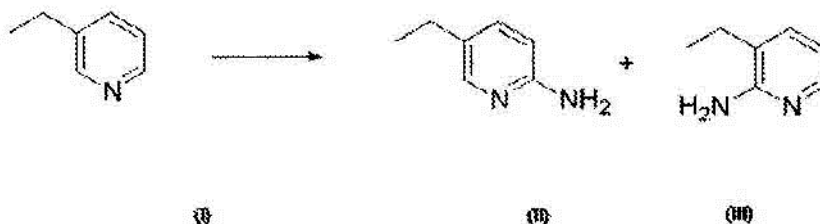
[0005] Aunque la estructura química de la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona ha sido especificada en las patentes y la literatura especializada anterior, hasta ahora no se conoce la descripción de una forma eficaz de preparar y purificar este compuesto.

35 [0006] A continuación se proporcionan procedimientos de síntesis eficaces para la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona a partir de un compuesto de partida, la 3-etilpiridina.

[0007] En la fig. 1 se proporciona un primer esquema de reacción útil para la síntesis de la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona.

40

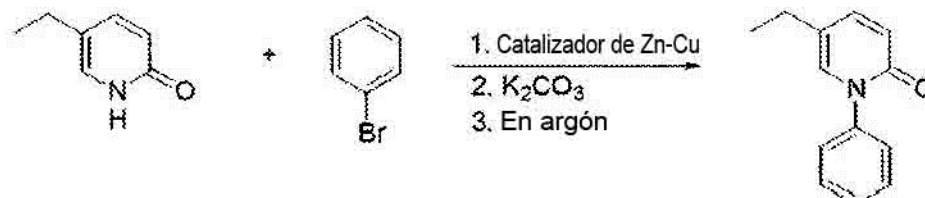
[0008] En dicho primer esquema de reacción, los autores de la invención han encontrado que la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona puede prepararse a partir de la 3-etilpiridina (disponible en Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) que se hace reaccionar con  $\text{NaNH}_2$  en presencia de una pequeña cantidad de ácido oleico como catalizador para acelerar la reacción. Se proporciona un esquema general de la reacción para obtener un isómero de 2-amino-5-etilpiridina a partir de 3-etilpiridina en la patente de EE.UU. 5.003.069 para McGill y col., "Reacción de Chichibabin", en el ejemplo 12. En esta reacción la 3-etilpiridina (I) se convierte en 2-amino-5-etilpiridina (II) así como en 2-amino-3-etilpiridina (III).



50

- [0009]** Después de destilación repetida, se obtiene el isómero deseado, 2-amino-5-etilpiridina (estructura II, anterior).
- [0010]** Los autores de la invención han encontrado que la 2-amino-5-etilpiridina puede convertirse en el producto deseado, 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona. En el procedimiento de la invención, primero se oxida el isómero 2-amino-5-etilpiridina para formar 5-etil-2-piridona.
- [0011]** En el procedimiento de oxidación preferido de la invención, se disuelve 2-amino-5-etilpiridina en ácido sulfúrico al 20 % ( $H_2SO_4$ , p/v) y se enfría detenidamente en un baño de hielo. A continuación se añade el reactivo preferido, una solución de nitrito de sodio ( $NaNO_2$ , p/v, 1,2 equivalentes en moles) durante 4-5 horas para oxidar la 2-amino-5-etilpiridina en 5-etil-2-piridona.
- [0012]** Después de la oxidación, se añade  $Na_2CO_3$  (2,0 equivalentes en moles) a la mezcla de reacción hasta que se alcanza un pH = 8-8,5, y se obtiene una mezcla de dos fases, con una fase orgánica superior de color amarillo oscuro y una fase acuosa inferior de color amarillo claro.
- [0013]** La fase acuosa se extrae con cloruro de metileno ( $CH_2Cl_2$ ) y se guarda en reserva con la fase orgánica. Después del secado, se obtiene un sólido amarillo claro que es la 5-etil-2-piridona.
- [0014]** A continuación se lleva a cabo una reacción de sustitución con el fin de sustituir un grupo fenilo en el N del anillo de piridona de la 5-etil-2-piridona por hidrógeno. La 5-etil-2-piridona se hace reaccionar preferentemente en presencia de un catalizador de cobre-cinc y carbonato de potasio con un halobenceno. Preferentemente el halobenceno se selecciona entre yodobenceno y bromobenceno. Con la máxima preferencia, se usa bromobenceno. Se forma así la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona y estará en la mezcla de reacción.
- [0015]** El procedimiento de la invención incluye purificación de la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona a partir de la mezcla de reacción. Después de la terminación de la reacción, según se comprobó por cromatografía en capa fina (TLC), el bromobenceno sin reaccionar se eliminó por destilación en alto vacío.
- [0016]** Se extrajo el resto de la solución con  $CH_2Cl_2$ . Se filtró el extracto al vacío a través de una columna corta de Celita para eliminar todas las partículas pequeñas.
- [0017]** Se trató el extracto anterior con carbón activado y se mantuvo en ebullición durante 10-15 minutos, a continuación se enfrió a temperatura ambiente antes de eliminar el carbón por filtrado al vacío a través de una segunda columna de Celita.
- [0018]** Se redujo el volumen de filtrado por evaporación rotatoria. Se secó el concentrado oleoso resultante a temperatura ambiente para producir un sólido marrón oscuro que contenía 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona al 75 %.
- [0019]** Se disolvió primero el sólido marrón oscuro en acetato de etilo caliente y a continuación se llevó a ebullición. Se añadió hexano a la solución en ebullición y se agitó de forma continua para separar la fase superior (rica en hexano) de la fase inferior (acetato de etilo).
- [0020]** Se vertió la fase superior en un vaso de precipitado y se dejó enfriar y asentarse primero, y a continuación se transfirió a una cubeta con recubrimiento de Teflón.
- [0021]** Después de evaporación y enfriamiento, se formaron cristales blancos de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona en toda la cubeta.
- [0022]** Los cristales blancos purificados después del secado produjeron un fino polvo cristalino blanco con un punto de fusión de 57-59 °C.
- [0023]** El análisis por HPCL de fase inversa y RMN reveló que el polvo contenía > 99 % de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona,
- [0024]** En un segundo esquema de reacción, se ha desarrollado también un procedimiento de síntesis de una etapa para preparar el compuesto 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona. El primer esquema de reacción expuesto anteriormente implica un procedimiento en tres etapas.

## Segundo esquema de reacción:



**[0025]** Los autores de la invención han encontrado que la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona puede prepararse a partir del material de partida, 5-etil-2-piridona (J & W Pharlab LLC, Levitton, PA). Se hace reaccionar 5-etil-2-piridona con bromobenceno en presencia de un catalizador de Cu-Zn en una capa de argón para producir 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona.

**[0026]** Preparación del catalizador: se preparó un catalizador de cobre-cinc (Cu-Zn) inmediatamente antes de la reacción anterior. En primer lugar se lavó polvo de Zn finamente dividido (1,0 equivalentes en moles) de dos a cuatro veces con ácido clorhídrico al 3 % hasta que la solución se hizo transparente y se desarrolló gas de hidrógeno. A continuación se lavó el cinc dos veces con agua 18 M-ohm. Seguidamente, se añadió una solución acuosa de CuSO<sub>4</sub> al 2 % al polvo de Zn recién lavado con ácido y se mezcló la solución por medio de un agitador magnético hasta que se volvió incolora. Se decantó el sobrenadante incoloro y se añadió un segundo volumen de solución de CuSO<sub>4</sub> al 2 % al polvo de Zn. Se repitió este procedimiento varias veces hasta que la solución de CuSO<sub>4</sub> permaneció azul y el catalizador de Cu-Zn se convirtió en un polvo rojo. Finalmente, se deslavó el catalizador de Cu-Zn completado 3-4 veces con agua, seguido por 2-3 deslavados con metanol. A continuación se secó el polvo resultante de color rojo oscuro a bajo vacío durante al menos 2 horas a 40-50 °C,

**[0027]** La reacción química es como sigue: se combinaron 5-etil-2-piridona (≥ 96 %, 1,0 equivalentes en moles), y carbonato de potasio (1,2 equivalentes en moles) en un matraz de reacción de 5 litros montado en una manta calefactora. Seguidamente, se añadieron el bromobenceno (2,5 equivalentes en moles) y el catalizador de Cu-Zn (0,05 equivalentes en moles) al matraz. Se fijó un aparato de agitación y se limpió el matraz de reacción con gas argón durante varios minutos. Después de ajustar el aparato de agitación, se calentó la mezcla durante 60-90 min hasta que se sometió a reflujo lentamente con argón durante 48-72 horas. La formación de un sólido blanquecino en el lado del matraz indicó el inicio de la reacción. El avance de la reacción se verificó por cromatografía en capa fina (TLC) cada 24 horas. Cuando el análisis de TLC no detectó sustrato, se retiraron el aparato de agitación y la fuente de argón. Después de la terminación de la reacción, se eliminó el bromobenceno sin reaccionar de la mezcla de reacción por destilación en alto vacío.

**[0028]** Extracción, filtrado y concentración: después de dejar que el matraz se enfriara durante al menos 30 min, se añadieron 0,5-0,6 L de cloruro de metileno y 10-20 g de Norit en el matraz y se mezclaron detenidamente. Se filtró la fase líquida a través de una columna corta de Celita (tierra diatomea) para eliminar posibles partículas pequeñas. Se repitió esta extracción varias veces sin Norit y se guardó en reserva el filtrado en un matraz grande. Los sólidos restantes que quedaban se dejaron secar durante toda la noche, a continuación se pulverizaron y se extrajeron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los lavados resultantes se filtraron como anteriormente.

**[0029]** Más tarde se filtraron los filtrados en reserva y los lavados de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la columna de Celita a través de un papel de filtro plegado en un matraz de destilación rotatorio. Seguidamente, se destiló al vacío la solución de filtrado para eliminar todo el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A continuación se transfirió la solución viscosa parda resultante a una cubeta de hornear con recubrimiento de Teflón. Se deslavó la solución viscosa residual en el matraz con acetato de etilo y se transfirió a la cubeta de hornear y a continuación se secó durante toda la noche o más a temperatura ambiente en la campana para producir un sólido marrón oscuro que contenía 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona (5-EPP).

**[0030]** Recristalización y purificación: se disolvieron aproximadamente 100-150 g de 5-EPP en bruto con aproximadamente 100 ml de acetato de etilo en un vaso de precipitado de 1.000 ml (vaso-l). Se cubrió el vaso-l con papel de aluminio y se llevó el contenido lentamente a ebullición en una placa caliente en la campana. Después de

retirar el vaso de precipitado de la placa calefactora, se añadieron hexanos a la solución en ebullición mientras se agitaba continuamente con una varilla de agitación de Teflón. Cuando la fase superior enriquecida con hexanos empezó a separarse de la fase inferior (enriquecida con acetato de etilo), cesó toda agitación durante 5-10 minutos y se dejó que la solución se enfriara lentamente y se separara por completo. La fase superior era transparente y tenía un color naranja o amarillo pálido. Se vertió lentamente la fase superior en un segundo vaso de precipitado (vaso-II) y se dejó que esta solución se asentara sin agitación durante un cierto tiempo (< 5 min). Como sucede habitualmente, se separó una pequeña cantidad de un líquido amarillo oleoso de solución que formaba una capa distinta en la parte inferior del vaso-II. Se vertió cuidadosamente la fase superior en una cubeta de hornear con recubrimiento de Teflón colocada en la campana, dejando el contaminante oleoso amarillo en el fondo del vaso-II.

10 Se deslavó el vaso-II en el vaso-I con acetato de etilo, guardando en reserva los contenidos residuales y los deslavados con la solución original de acetato de etilo en el vaso-I. Se colocó de nuevo el vaso-I en la placa calefactora y a continuación se repitió la extracción tal como se ha descrito anteriormente. Se transfirieron todos los extractos enriquecidos con hexanos desde el vaso-II a la misma cubeta de hornear. Se repitió el procedimiento hasta que el volumen de solución en el vaso-I fue inferior a 10 ml y se volvió oscuro y oleoso. Cuando los hexanos y la solución de acetato de etilo se evaporaron de la cubeta de hornear, se formaron cristales amarillos o blancos de 5-EPP purificada en toda la cubeta. Se usó una espátula de Teflón para raspar suavemente los laterales y el fondo de la cubeta y para mezclar el contenido cristalizado. Después de una extracción cuidadosa del contenido del vaso-I, se dejó el contenido de la cubeta en la campana de humos durante 15-30 minutos para dejar que parte del disolvente se evaporara. Se mezcló y se raspó intermitentemente el contenido de la cubeta con el fin de permitir un contacto continuo entre el material cristalino y la fase líquida. Cuando el nivel de líquido se había reducido entre tercera parte y la mitad, se vertió el líquido restante en un vaso de precipitado de 1 l y se dejaron secar los cristales residuales en la campana durante varias horas.

**[0031]** Se han conseguido rendimientos superiores al 90 % después de una tanda de recristalización. Cuando la 5-EPP no es suficientemente pura después de una tanda de recristalización según se valora por el color de la 5-EPP, contaminantes oleosos visibles o análisis por TLC, a continuación puede repetirse el procedimiento de recristalización. El rendimiento de este procedimiento estuvo comprendido entre el 65 y el 80 %. Después de que se secase el sólido purificado durante toda la noche a temperatura ambiente, el procedimiento descrito produjo un polvo cristalino blanco con punto de fusión de 55-59 °C. El análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa y resonancia magnética nuclear (RMN) confirmó que este material contenía > 99 % de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona de la estructura mostrada en la fig. 3.

**[0032]** Se ha encontrado que la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona ("5-EPP") puede administrarse a mamíferos para el tratamiento de una septicemia. La septicemia es una dolencia médica causada por infección de la sangre o los tejidos de un mamífero por microorganismos como bacterias, virus u hongos. Septicemia es un término usado a menudo para indicar una infección rampante del organismo, detectable en el torrente sanguíneo. Si no se trata, la septicemia puede producir complicaciones graves o incluso la muerte.

**[0033]** La 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona puede administrarse a un mamífero con necesidad de tratamiento por septicemia o infección debida a microorganismos. Las vías de administración apropiadas son por inyección (intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.)), por vía oral o por cualquier otra vía que permita que el compuesto entre en el torrente sanguíneo. Preferentemente, se administra i.v., i.m., i.p. u oralmente. La 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona se formula preferentemente en un vehículo farmacéutico apropiado para la vía de administración. Preferentemente, el vehículo farmacéutico para 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona para inyección se selecciona entre suero salino isotónico y propilenglicol y combinaciones de los mismos. Con la máxima preferencia, la 5-EPP se añade a suero salino isotónico a una concentración de 20 mg/ml o menos para formar una composición incolora a temperatura ambiente.

**[0034]** Se ha encontrado que una cantidad eficaz de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona para tratar la septicemia está comprendida entre 5 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal al día, preferentemente de 10 mg/kg de peso corporal a 40 mg/kg de peso corporal al día. Para vías de administración distintas de la oral lo más preferido es aproximadamente 10-25 mg/kg de peso corporal al día. La cantidad eficaz puede suministrarse una vez al día o en múltiples dosis. En una realización preferida, se suministra una sola dosis por infusión i.v. una vez al día. Se ha encontrado que la cantidad eficaz bloquea los efectos letales del shock séptico en mamíferos.

**[0035]** El compuesto, 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona, puede proporcionarse también en una forma de dosis total oral en comprimidos o cápsulas (u otras formas en combinación con un vehículo farmacéutico que sea adecuado para administración oral a un animal) con el fin de proporcionar una dosis comprendida entre 5 mg/kg de peso

corporal y 200 mg/kg de peso corporal al día, preferentemente de 10 mg/kg de peso corporal a 80 mg/kg de peso corporal al día y con la máxima preferencia de 20 a 50 mg/kg de peso corporal al día. Preferentemente, la dosificación oral se administra en dosificaciones divididas. Con la máxima preferencia, la dosificación oral se administra en tres (3) dosis diarias en intervalos de 8 horas.

5

**[0036]** El síndrome séptico es una enfermedad compleja que se deriva de una respuesta sistémica del hospedador a una diversidad de agresiones, en particular infección, que se manifiestan en diversos grados de hipotensión, coagulopatía y disfunción multiorgánica. Los episodios fisiopatológicos tienen lugar en respuestas de fases tempranas y tardías. Las respuestas tempranas en la septicemia se caracterizan por la liberación de una serie de mediadores proinflamatorios que incluyen factor de necrosis tumoral-alfa, interleucina-6 e interleucina-12 (Dinarelli CA. Chest 2000; 118:503-508). Se describen los procedimientos para evaluar los efectos protectores de la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona (5-EPP) frente a la disfunción multiorgánica, y las concentraciones séricas de citocinas proinflamatorias y la mortalidad en varios modelos animales de septicemia. En la presente memoria descriptiva se desvela que la 5-EPP puede usarse como un agente de tratamiento en mamíferos para combatir el shock séptico.

10

15

**Ejemplo 1: Uso de 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP) para bloquear el shock letal causado por lipopolisacárido (LPS) y D-galactosamina**

20

**[0037]** Se trató a ratones con 5-EPP después de inducir un shock con lipopolisacárido (LPS) según modelos establecidos para shock letal inducido por LPS. Se siguió el procedimiento descrito por Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Proc Natl Acad Sci USA. 1919 Nov; 76 (11):5939-43. Se llevó un seguimiento de la supervivencia de los ratones después del tratamiento con diversas dosis del agente en el modelo de shock séptico por LPS/D-galactosamina. Todos los agentes se inyectaron simultáneamente a través de la vía intraperitoneal y se comparó la respuesta con un agente placebo (suero salino).

25

**[0038]** Todos los datos fueron analizados mediante la prueba exacta de Fisher (Prism™ para Windows 4.02, Graphpad Software, Inc., San Diego, CA). Se consideró que un valor de P < 0,05 era estadísticamente significativo.

30

**[0039]** La tabla 1 ilustra claramente que la 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP) protegía a los ratones del shock letal inducido por LPS/D-galactosamina 72 horas después del tratamiento.

**Tabla 1**

Grupo	Tratamiento	Resultado	(N)	Valor P
I	Control de suero salino	Mortalidad del 54 %	(21)	
II	25 mg/kg de 5-EPP	Mortalidad del 30 %	(20)	0,1277
III	50 mg/kg de 5-EPP	Mortalidad del 5 %	(20)	0,001
IV	100 mg/kg de 5-EPP	Mortalidad del 0 %	(20)	< 0,001

35

**[0040]** La mortalidad en los ratones de control se produjo en las 24 horas posteriores al tratamiento, mientras que las muertes en los grupos de tratamiento se produjeron ocasionalmente más allá de este punto temporal, en particular en el grupo de 25 mg/kg. Por tanto, los autores de la invención desvelan que dosis superiores de 5-EPP ofrecen un nivel de protección significativo y una protección completa en su dosis más elevada frente al shock séptico inducido por LPS/D-galactosamina y el retraso del inicio del shock letal en su dosis más baja.

40

**Ejemplo 2: Uso de 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP) para bloquear el shock letal causado por lipopolisacárido (LPS) y D-galactosamina**

45

**[0041]** La metodología usada en el ejemplo 1 se usó para tratar ratas. Se indujo shock séptico con LPS/D-galactosamina en ejemplares jóvenes de ratas Sprague-Dawley. Se llevó un seguimiento de los animales durante 66 horas después del tratamiento y se analizaron los datos resultantes mediante las mismas pruebas y criterios estadísticos que en el ejemplo 1. Tal como se muestra en la tabla 2, la 5-EPP también previno el desarrollo de shock letal en ratas.

Tabla 2

Grupo	Tratamiento	Resultados	(N)	Valor P
I	Control de suero salino	Mortalidad del 100 %	(8)	
II	75 mg/kg de 5-EPP	Mortalidad del 14,3 %	(7)	< 0,011
III	200 mg/kg de 5-EPP	Mortalidad del 12,5 %	(8)	< 0,001

5 [0042] Los datos de la tabla 2 muestran que en este modelo de shock séptico en ratas, la mortalidad tanto en el grupo de control como en los grupos tratados con fármacos se produjo en las primeras 42 horas después del tratamiento. Aunque en estos datos no se observó un efecto claro dosis-respuesta para 5-EPP, los resultados son totalmente coherentes con los de los experimentos con ratones ya que confirman que la 5-EPP puede proteger a los mamíferos del shock séptico inducido por endotoxinas.

10

#### Ejemplo 3: Uso de 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP) para bloquear el shock letal causado sólo por lipopolisacárido (LPS)

15 [0043] Se observó la supervivencia de ratones sometidos a tratamiento del agente y LPS en solitario según la metodología de Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Proc Natl Acad Sci USA. 1979 Nov; 76 (11):5939-43)paréntesis sin abrir. Según se cree este procedimiento evoca una respuesta fisiopatológica que es más similar a la observada durante el shock séptico que a la causada por el LPS y la galactosamina.

20 [0044] Todos los agentes se inyectaron simultáneamente a través de la vía intraperitoneal y se comparó la respuesta con un agente de placebo (suero salino).

25 [0045] Se realizó un seguimiento de los animales durante 4 días después del tratamiento y se analizaron los datos resultantes mediante la misma prueba de Fisher exacta y los criterios de antes. Tal como se muestra en la tabla 3, la 5-EPP previno parcialmente el desarrollo de shock letal en los ratones tratados sólo con LPS (30 mg/kg).

25

Tabla 3

Grupo	Tratamiento	Resultado	(N)	Valor P
I	Control de suero salino	Mortalidad del 100 %	(11)	
II	100 mg/kg de 5-EPP	Mortalidad del 30 %	(10)	P < 0,01

30 [0046] Todas las muertes en los grupos de control y de 5-EPP se observaron en el punto temporal de 42 h. Se encontró un efecto protector significativo de la 5-EPP frente al shock séptico inducido por LPS.

#### Ejemplo 4: Uso de 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP) para bloquear el aumento en las concentraciones de diversos biomarcadores séricos como un índice de disfunción multiorgánica en el modelo de septicemia por ligadura y punción cecal (LPC)

35

40 [0047] La ligadura y punción cecal (LPC) es un modelo más avanzado de shock séptico que los que se relacionan con lipopolisacáridos (LPS). En este modelo, tal como se describe en Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH (J Surg Res. 1980, 29; 189-201), se suministra a los ratones inyecciones intraperitoneales (IP) del compuesto de ensayo o suero salino (control) antes del inicio de la cirugía. A continuación se anestesia a los ratones y se realiza una laparotomía. Se aísla el ciego y se separa del resto de los intestinos mediante sujeción en su base con un hilo de sutura. A continuación se somete el ciego a punción con una aguja. Se facilita así la entrada de la microflora colónica en la cavidad abdominal, lo que produce una peritonitis inducida polimicrobiana. A diferencia del modelo de shock séptico por endotoxinas, que se inicia con productos de las paredes celulares bacterianas purificados, lipopolisacáridos (LPS), que simula un shock séptico agudo, el modelo de LPC emula de forma más estrecha los signos de shock séptico encontrados clínicamente que se observan en el ser humano según son desencadenados por bacterias vivas.

50 [0048] La alteración de los biomarcadores séricos es un índice contrastado de morbilidad general y disfunción orgánica específica. Por ejemplo, los aumentos en alanina-transaminasa (ALT) en suero indican por lo general disfunción hepática, en nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) apuntan a disfunción renal y en creatinina a daño muscular y disfunción renal. Durante el shock séptico las concentraciones de glucosa en suero están frecuentemente alteradas.

**[0049]** En ratones macho Swiss-Webster, de siete semanas de vida, se inyectó 5-EPP (200 mg/kg) o suero salino (control) por vía intraperitoneal dos horas antes del inicio de la cirugía. Se les anestesió mediante una mezcla de xilazina y ketamina, y se realizó una laparotomía. Se separó el ciego del resto del intestino, ligado con sutura, y a continuación se sometió a punción con una aguja de calibre 18. Se recogió sangre mediante punción cardiaca 3, 6 ó 12 horas después de LPC y se aisló el suero por centrifugado. Se llevó a cabo un análisis de transaminasas séricas, nitrógeno ureico sanguíneo, creatinina y glucosa a través de una empresa comercial (idexx Laboratories, West Sacramento, CA).

10 **[0050]** Los resultados se comunican como la media  $\pm$  error estándar de la media con el número de animales entre paréntesis para cada grupo. El análisis estadístico de las diferencias entre el control de ratones pretratados con suero salino y 5-EPP se realizó usando la prueba exacta de Fisher (Prism™ para Windows 4.02, Graphpad Software, Inc., San Diego, CA). Se consideró que un valor de  $P < 0,05$  era el nivel mínimo de significación estadística. Los valores de referencia se determinaron mediante análisis del suero de ratones a los que se inyectó suero salino pero no se sometieron al procedimiento de LPC.

15 **[0051]** Las tablas siguientes ilustran claramente que el pretratamiento con 5-EPP (200 mg/kg, ip) invirtió parcialmente los aumentos inducidos por LPC en varios biomarcadores séricos relacionados con shock séptico y se comparó el desequilibrio hemodinámico con el control de suero salino-LPC.

20

**Tabla 4**

<b>Efectos de pretratamiento con 5-EPP en la concentración sérica de alanina-transaminasa (ALT) como un índice de disfunción hepática en el modelo de referencia por LPC.</b> (Intervalo de referencia = 28,2-35,8 u/l)				
<b>Grupo de tratamiento</b>	<b>de</b>	<b>3 horas después de LPC</b>	<b>6 horas después de LPC</b>	<b>12 horas después de LPC</b>
<b>Control de suero salino</b>		109,3 $\pm$ 10,8 (11)	170,1 $\pm$ 24,0 (10)	159,0 $\pm$ 36,2 (10)
<b>200 mg/kg de 5-EPP</b>		159,1 $\pm$ 21,2 (11)	128,9 $\pm$ 28,7 (12)	148,2 $\pm$ 12,5 (12)
<b>Valor P</b>		> 0,05	> 0,05	> 0,05

25 **[0052]** Aunque las diferencias en los valores de ALT no fueron estadísticamente significativas entre los grupos de suero salino y 5-EPP, existía una tendencia a la reducción en este biomarcador en los ratones pretratados con 5-EPP.

**Tabla 5**

<b>Efectos de pretratamiento con 5-EPP en la concentración de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) como un índice de disfunción renal en el modelo de referencia por LPC.</b> (Intervalo de referencia: 16,2-18,5 mg/dl)				
<b>Grupo de tratamiento</b>	<b>de</b>	<b>3 horas después de LPC</b>	<b>6 horas después de LPC</b>	<b>12 horas después de LPC</b>
<b>Control de suero salino</b>		28,2 $\pm$ 2,0 (11)	34,5 $\pm$ 3,1 (10)	52 $\pm$ 1,0 (10)
<b>200 mg/kg de 5-EPP</b>		20,8 $\pm$ 0,1 (11)	19,4 $\pm$ 1,0 (12)	23 $\pm$ 2,3 (12)
<b>Valor P</b>		< 0,05	< 0,001	< 0,001

30

**[0053]** Los aumentos en BUN se usan sistemáticamente como un índice de disfunción renal en los centros clínicos. El pretratamiento con 5-EPP redujo significativamente los aumentos inducidos por LPC en BUN en todos los tiempos de la medida. De hecho, las concentraciones en los ratones pretratados con 5-EPP casi se sitúan dentro del intervalo de los valores de referencia.

35



Tabla 6

Efectos de pretratamiento con 5-EPP en la concentración sérica de creatincinasa como un índice de afectación muscular y renal en el modelo de referencia por LPC (Intervalo de referencia: (62,5-185,7 u/l))			
Grupo de tratamiento	3 horas después de LPC	6 horas después de LPC	12 horas después de LPC
Control de suero salino	3.235,5 ± 306,5 (11)	2.837,8 ± 355,9 (9)	3.432,6 ± 427,1 (9)
200 mg/kg de 5-EPP	2.790,4 ± 370,8 (11)	1.950,3 ± 244,1 (12)	778,5 ± 91,6 (12)
Valor P	> 0,05	> 0,05	< 0,001

5 [0054] El pretratamiento con 5-EPP redujo los aumentos inducidos por LPC en la concentración sérica de creatincinasa en los tres puntos temporales. No obstante sólo se observó una disminución significativa 12 horas después de LPC.

Tabla 7

10

Efectos de pretratamiento con 5-EPP en el nivel sérico de glucosa en el modelo de shock séptico por LPC (Intervalo de referencia: 62-175 mg/dl)			
Grupo de tratamiento	3 horas después de LPC	6 horas después de LPC	12 horas después de LPC
Control de suero salino	539,9 ± 23,7 (10)	202,2 ± 15,0 (9)	104,5 ± 8,5 (10)
200 mg/kg de 5-EPP	303,9 ± 30,8 (11)	116,7 ± 7,7 (12)	102,9 ± 5,9 (12)
Valor P	< 0,001	< 0,001	> 0,05

[0055] El pretratamiento con 5-EPP provocó descensos altamente significativos en los aumentos inducidos por LPC en las concentraciones séricas de glucosa 3 h y 6 h después del tratamiento. Las concentraciones de glucosa en los dos grupos de tratamiento revertieron al nivel de referencia 12 h después de LPC.

15

Tabla 8

Efectos de pretratamiento con 5-EPP en el volumen recuperable de suero sanguíneo como una indicación del desequilibrio hemodinámico en el modelo de referencia por LPC Volumen medio (microlitros) de suero			
Grupo de tratamiento	3 horas después de LPC	6 horas después de LPC	12 horas después de LPC
Control de suero salino	198,5 ± 21,52 (13)	161,9 ± 13,87 (13)	159,6 ± 16,18 (14)
200 mg/kg de 5-EPP	238,8 ± 20,11 (13)	219,6 ± 16,70 (12)	282,7 ± 27,70 (13)
Valor P	> 0,05	< 0,05	< 0,001

20 [0056] El volumen de suero obtenido de la sangre de ratones con LPC pretratados con suero salino fue invariablemente menor que el de ratones con LPC pretratados con 5-EPP. Aunque no existían diferencias significativas a las 3 h, el volumen sérico fue significativamente superior al de ratones pretratados con 5-EPP que en el control de suero salino tanto 6 como 12 horas después de la LPC.

25 [0057] Dado que no existía diferencia significativa en la relación suero-sangre (datos no mostrados) entre los dos grupos en ningún momento, esto indica que los animales de los dos grupos estaban hidratados de forma similar; y esta diferencia puede atribuirse en parte a la capacidad de la 5-EPP de prevenir el grado de desequilibrio hemodinámico resultante del shock séptico en los ratones con LPC de control de suero salino.

30 **Ejemplo 5: Uso de 5-etil-1-fenil-2-piridona para bloquear el aumento de las concentraciones séricas de alanina-transaminasa, aspartato-transaminasa y citocinas proinflamatorias en modelo de shock séptico de lipopolisacárido/D-galactosamina**

**[0058]** Se trató a ratones simultáneamente con LPS (10 µg/kg) y D-galactosamina (600 mg/kg) (Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Proc Natl Acad Sci USA. 1979, 76 (11):5939-43) y 5-EPP (200 mg/kg) por vía intraperitoneal en un conjunto separado de experimentos. Fueron anestesiados con halotano y se recogió sangre en diferentes momentos mediante punción cardíaca y se centrifugó para separar el suero. Las concentraciones séricas de alanina-transaminasa (ALT) y aspartato-transaminasa (AST) fueron medidas por una empresa comercial de diagnóstico (Idexx Laboratories). Las concentraciones séricas de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12) se determinaron con kits de ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para ratones disponibles comercialmente (BD BioSciences, San Jose, CA).

10 **[0059]** Se usó la metodología usada en el ejemplo 4 para medir y analizar los datos de enzimas séricas en términos de significación estadística. Se analizaron las concentraciones séricas de citocinas proinflamatorias entre los grupos tratados con 5-EPP y de control de suero salino en términos de su significación estadística mediante ANOVA unidireccional y una prueba de comparación múltiple de Tukey (Prism™ para Windows 4.02, Graphpad Software, Inc., San Diego, CA).

15

**[0060]** Tal como se muestra en las tablas 9 y 10, la 5-EPP originó una reducción altamente significativa en las altas concentraciones séricas de ALT y AST 6 horas y 12 horas después del tratamiento con LPS/D-galactosamina, respectivamente. Sin embargo, a las 3 horas la 5-EPP provocó un aumento importante en las dos transaminasas en comparación con el grupo de control de suero salino.

20

**Tabla 9**

<b>Efectos de la 5-EPP en la concentración sérica de alanina-transaminasa (u/l) en el modelo de septicemia por LPS/D-galactosamina</b>					
<b>LPS/D-galactosamina</b>	<b>Suero salino</b>	<b>N</b>	<b>5-EPP</b>	<b>N</b>	<b>Valor P</b>
Después de 3 horas	67,5 ± 2,5	(8)	109,4 ± 6,1	(8)	< 0,05
Después de 6 horas	1415,9 ± 685,9	(7)	130,0 ± 8,9	(8)	< 0,001
Después de 12 horas	1177,2 ± 622,8	(5)	109,5 ± 8,3	(8)	< 0,001

**Tabla 10**

25

<b>Efectos de la 5-EPP en la concentración sérica de aspartato-transaminasa (u/l) en el modelo de septicemia por LPS/D-galactosamina</b>					
<b>LPS/D-galactosamina</b>	<b>Suero salino</b>	<b>N</b>	<b>5-EPP</b>	<b>N</b>	<b>Valor P</b>
<b>Después de 3 horas</b>	69,1 ± 3,5	(8)	131,3 ± 11,9	(8)	< 0,01
<b>Después de 6 horas</b>	657,6 ± 276,4	(7)	152,38 ± 14,4	(8)	< 0,001
<b>Después de 12 Horas</b>	577,2 ± 212,0	(5)	173,38 ± 13,0	(8)	< 0,001

**[0061]** El aumento en(de) las concentraciones de alanina-transaminasa y aspartato-transaminasa en suero se usa clínicamente como biomarcador de diagnóstico de disfunción hepática, que en general se encuentra en casos de shock séptico en el ser humano. Los hallazgos de los presentes estudios de que el tratamiento con 5-EPP reduce drásticamente las concentraciones elevadas de las dos transaminasas a las 6 horas y las 12 horas en el modelo de shock séptico por LPS/D-galactosamina en ratones sugieren el efecto protector de la 5-EPP frente al daño hepático causado por la septicemia.

30 **[0062]** El uso de 5-EPP redujo significativamente los aumentos inducidos por LPS/D-galactosamina en las concentraciones séricas de TNF-α (tabla 11), IL-6 (tabla 12) e IL-12 (tabla 13) 90 minutos después del tratamiento en una forma dependiente de la dosis.

35

Tabla 11

Efectos de la 5-EPP en la concentración sérica de TNF- $\alpha$ en modelo de septicemia por LPS/D-galactosamina			
Grupo I - control de suero salino	11.200 $\pm$ 2100 pg/ml	(9)	Valor P
Grupo II - 12,5 mg/kg	5.220 $\pm$ 1280 pg/ml	(8)	P < 0,01
Grupo III - 25 mg/kg	2.780 $\pm$ 481 pg/ml	(10)	P < 0,001
Grupo IV - 50 mg/kg	576 $\pm$ 79 pg/ml	(8)	P < 0,001
Grupo V - 100 mg/kg	340 $\pm$ 34 pg/ml	(8)	P < 0,001

5

Tabla 12

Efectos de la 5-EPP en la concentración sérica de IL-6 en el modelo de septicemia por LPS/D-galactosamina			
Grupo I - control de suero salino	12.474 $\pm$ 646 pg/ml	(7)	Valor P
Grupo II - 50 mg/kg	9.980 $\pm$ 564 pg/ml	(6)	< 0,05
Grupo III - 100 mg/kg	5.111 $\pm$ 343 pg/ml	(7)	< 0,001
Grupo IV - 200 mg/kg	3.578 $\pm$ 421 pg/ml	(7)	< 0,001

Tabla 13

Efectos de la 5-EPP en la concentración sérica de IL-12 en el modelo de septicemia por LPS/D-galactosamina			
Grupo I - control de suero salino	7.101 $\pm$ 307 pg/ml	(7)	Valor P
Grupo II - 50 mg/kg	2.809 $\pm$ 325 pg/ml	(6)	< 0,001
Grupo III - 100 mg/kg	1.371 $\pm$ 124 pg/ml	(7)	< 0,001
Grupo IV - 200 mg/kg	870 $\pm$ 99 pg/ml	(7)	< 0,001

10

**Ejemplo 6: Uso de 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP) en TNF- $\alpha$  secretado y asociado con células *in vitro* en células monocíticas humanas**

**[0063]** Se examinaron los efectos de la 5-EPP en TNF- $\alpha$  secretado y asociado con células *in vitro* usando células monocíticas humanas transformadas por acetato miristato de forbol (PMA; Sigma, St. Louis, MO), THP-1 (ATCC, Manassas, VA) según la técnica descrita por Grattendick y col. (International Immunopharmacology 2008, 8; 679-87). Brevemente, se incubaron células durante 3 h en placas de 96 pocillos con medio de cultivo, 1 ng/ml de LPS o 1 ng/ml de LPS + 0-200  $\mu$ g/ml de 5-EPP antes de que se recogieran medios de cultivo y se analizaran en términos de la presencia de TNF- $\alpha$  secretado por medio de un kit de ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) disponible comercialmente (BD Biosciences, San Diego, CA). Por separado, se lisaron células tratadas de forma idéntica y se determinaron sus concentraciones de TNF- $\alpha$  asociado con células por medio de ELISA. Todos los grupos de tratamiento se compararon simultáneamente usando ANOVA unidireccional y pruebas de comparación múltiple de Tukey.

25

**[0064]** Tal como se muestra en la tabla 14, el uso de 5-EPP redujo significativamente (P < 0,001) el TNF- $\alpha$  secretado y el asociado con células de una forma dependiente de la dosis en comparación con el control de 0  $\mu$ g/ml. Los valores se expresan en pg/ml como media  $\pm$  error estándar de la media para cuatro replicados en todas las concentraciones en cada caso.

Tabla 14

Efectos de la 5-EPP en TNF- $\alpha$ secretado y asociado con células en células THP-1 expuestas a LPS <i>in vitro</i>					
Concentración de 5-EPP	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	33 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$
TNF- $\alpha$ secretado	8.791,6 $\pm$ 185,9	5.382,8 $\pm$ 91,8	3.261,5 $\pm$ 94,1	2.073,7 $\pm$ 60,7	1.469,7 $\pm$ 58,9
TNF- $\alpha$ asociado con células	74,4 $\pm$ 7,5	35,4 $\pm$ 3,1	25,9 $\pm$ 1,6	19,0 $\pm$ 0,9	10,1 $\pm$ 1,3

5 **[0065]** Se realizó análisis de citotoxicidad en células THP-1 tratadas con varias concentraciones de 5-EPP usando el ensayo de MTS (sal interna de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) (Promega, Madison, WI). Este paso era necesario para demostrar que la reducción de TNF- $\alpha$  observada en las células tratadas con 5-EPP no se debía a muerte celular. Las células tratadas con LPS (1 ng/ml) y 5-EPP (0-500  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 12 horas no mostraron citotoxicidad hasta que se expusieron a al menos 300  $\mu\text{g/ml}$  de 5-EPP.

10

#### **Ejemplo 7: Uso de 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP) en mortalidad inducida por LPS/D-galactosamina**

**[0066]** Se investigaron los efectos del tratamiento con 5-EPP en la mortalidad inducida por LPS/D-galactosamina en ratones. Al menos 10 ratones de cada grupo se sometieron a provocación con una dosis letal de LPS (20  $\mu\text{g/kg}$ ) y D-galactosamina (600 mg/kg) o la misma dosis de LPS/D-galactosamina + diferentes dosis de 5-EPP por vía intraperitoneal y se llevó un seguimiento de la mortalidad en cada grupo en diferentes momentos durante 4 días con el fin de evaluar los efectos protectores de la 5-EPP frente a la mortalidad inducida por LPS/D-galactosamina.

20 **[0067]** La figura 2 muestra claramente que 20  $\mu\text{g/kg}$  LPS y 600 mg/kg de D-galactosamina causaron una mortalidad del 100 % antes de 72 horas tras el tratamiento. Sin embargo, la supervivencia de ratones tratados con 25 mg/kg de 5-EPP fue del 45 % y el 100 % a 50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg con  $p \leq 0,0001$  según se determinó mediante la prueba de chi cuadrado.

#### **25 Ejemplo 8: Determinación de la estimación de DL<sub>50</sub> después de una dosis única de 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP)**

**[0068]** Se obtuvieron ratones macho Swiss-Webster de fuentes comerciales estándar de 7 semanas de vida, se mantuvieron en el laboratorio durante al menos 1 semana antes de su uso y se les proporcionó dieta estándar chow para ratones y agua *ad libitum*. Se sometió a los animales a un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas/12 horas.

**[0069]** A seis grupos de ratones se les inyectó por la vía intraperitoneal 5-EPP (250-500 mg/kg) disuelta en suero salino isotónico estéril, se los devolvió inmediatamente a sus jaulas y a continuación se los observó detenidamente durante las 6-8 horas siguientes. Se estimó un valor de DL<sub>50</sub> a partir de los datos de mortalidad mediante un programa de ajuste de curva no lineal (Prism™ para Windows 4.02).

**[0070]** En un plazo de 5 minutos se observó ataxia, pérdida del reflejo de enderezamiento y respiración laboriosa con las dosis más elevadas (450-500 mg/kg), y la muerte sobrevino en 10-60 minutos después de la inyección. Los animales expuestos a dosis más bajas parecieron seguir un ciclo entre estados de acicalamiento, deambulación y acicalamiento hiperactivos y un estado de aparente estupor. Los síntomas para estas dosis se redujeron gradualmente durante 1-2 horas hasta un punto en el que los animales parecieron no estar afectados y reanudaron los niveles normales de actividad.

**[0071]** El ajuste de curva no lineal para una curva de dosis-respuesta sigmoidea produjo un valor de DL<sub>50</sub> de 380 mg/kg (log 2,581 con un error estándar de log 0,03367) con  $R^2 = 0,949$ . Los datos de mortalidad en bruto mostraron una DL<sub>100</sub> = 450-500 mg/kg. Además, el rápido inicio de los síntomas que se observó en este caso y en otros estudios relacionados sugiere que la 5-EPP es absorbida y distribuida rápidamente a través de la barrera hematoencefálica cuando se administra por la vía intraperitoneal.

#### **50 Ejemplo 9: Solubilidad de la 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP)**

**[0072]** La 5-EPP es soluble en agua y en suero salino a 20 mg/mL a temperatura ambiente, formando

soluciones incoloras y totalmente transparentes. Así, la 5-EPP puede formularse en solución isotónica para infusión I.V. Este compuesto parecía ser igualmente soluble en agua o en suero salino. Concentraciones más elevadas del compuesto ( $\geq 30$  mg/ml) no se disuelven completamente y pueden formar un residuo débil en tubos de ensayo de poliestireno.

5

**[0073]** Todas las soluciones se prepararon pesando el producto químico, transfiriendo este sólido a un tubo de polipropileno o un tubo de poliestireno y a continuación añadiendo agua o suero salino al volumen deseado final. Se disolvió el compuesto mediante mezclado intermitente con un agitador vorticial, calentando lentamente en un baño de agua caliente (40-45 °C) y sonicación (3 x 15 min.).

10

**[0074]** Una vez que el sólido se hubo disuelto por completo, no se observó precipitación después de volver a temperatura ambiente. Incluso después de mantener a temperatura ambiente durante toda la noche o después de refrigeración, no se observó precipitación.

15

**[0075]** El pH de dos soluciones preparadas nuevas del compuesto, cada una a una concentración de 20 mg/ml, se midió con un pH-metro Mettler MP-220 calibrado equipado con un electrodo de pH (modelo 413). El pH de la solución preparada en agua tuvo un valor promedio de 7,4 en comparación con soluciones preparadas en suero salino isotónico en las que el pH tuvo un valor promedio de 6,21, usando muestras por triplicado en cada caso, tal como se recoge en la tabla mostrada a continuación.

20

Tabla 15

Solubilidad de la 5-EPP en agua desionizada destilada y suero salino isotónico					
Disolvente	Volumen añadido (ml)	C-4 (mg)	[C-4] mg/ml final	Resultados	pH
Agua DI	10	0	0,0		7,56
Agua DI	10,1	202,1	20,0	soluble	7,24
Agua DI	10,1	202,1	20,0	soluble	7,29
Suero salino isotónico	10	0	0,0		6,27
Suero salino isotónico	10	201,3	20,1	soluble	6,20
Suero salino isotónico	10	200,1	20,0	soluble	6,13

#### Ejemplo 10: Síntesis y purificación de la 5-etil-1-fenil-2(1H)-piridona (5-EPP)

25

**[0076]** En una realización preferida del procedimiento de síntesis se realizó el siguiente procedimiento de ejemplo. Se combinó una mezcla de 3-etilpiridina (2,0 kg), ácido oleico (1,8 ml) y  $\text{NaNH}_2$  (878,7 g en una mezcla al 50 % en peso en tolueno) en un reactor de bomba de acero inoxidable de 20 litros de Parr (reactor agitador de acero inoxidable de 20 litros (cinco galones) Modelo 4555M con control maestro de serie 1760HC de Parr Instrument Company, Moline, IL).

30

**[0077]** Una vez que se selló el reactor y se conectó a 2 fuentes de gas, se arrancó el motor del reactor para agitar la mezcla. Se cerró el orificio de salida del gas, y se presurizó el reactor inicialmente a 206,8 kPa (30 psi) con amoníaco gaseoso y a continuación a 1.378,9 kPa (200 psi) con gas nitrógeno antes de que se cerrara el orificio de entrada. Al mismo tiempo, se hizo circular un flujo de agua de refrigeración para enfriar el motor de agitación y permitir el control de la temperatura del reactor. Se calentó el reactor gradualmente hasta un máximo de 180 °C durante 90 minutos. Se purgó el gas hidrógeno generado cuando la presión del reactor se elevó por encima de 2.206,3 kPa (320 psi).

35

40

**[0078]** La producción de gas hidrógeno cesó después de aproximadamente 4,5 horas lo que indicaba que la reacción había cesado. En este tiempo, el control de la temperatura del reactor se reajustó a 30 °C para permitir el enfriamiento continuo del reactor y se dejó enfriar el reactor sellado durante toda la noche con agitación. Después de la descompresión del reactor, se añadieron 3 litros de agua de grado reactivo al reactor. En seguida se volvió a sellar el reactor y se dejó enfriar durante toda la noche.

45

**[0079]** Al tercer día, se cerraron los sistemas de agitación y refrigeración durante dos horas para permitir la separación de fases de la mezcla de reacción. Se retiró una fase acuosa pesada por medio de una válvula situada en la parte inferior del reactor y se extrajo una vez con 0,5 litros de tolueno. Se añadió de nuevo este extracto de tolueno a la fase orgánica original y se secó la mezcla resultante sobre sulfato de magnesio anhidro ( $\text{MgSO}_4$ ).

- [0080]** Se eliminó el  $\text{MgSO}_4$  de la fase de tolueno mediante filtrado por gravedad. Posteriormente, se eliminó el tolueno al vacío por medio de un evaporador giratorio. Este procedimiento produjo aproximadamente 2,2 litros de un líquido marrón oscuro en bruto, que comprendía el producto de reacción.
- 5
- [0081]** Posteriormente, se destiló al vacío el líquido marrón oscuro en bruto recuperado de la reacción de Chichibabin inicial en lotes de 500 ml a través de una columna de destilación Vigreux de 60 cm con el fin de aislar y concentrar destilados del isómero de 2-amino-5-etilpiridina deseado. Cada lote de destilación se repitió a temperaturas de columna comprendidas en el intervalo 85-105 °C. Cada fracción contenía al menos el 85 % del isómero de 2-amino-5-etilpiridina, tal como se determinó mediante HPLC de fase inversa y estas fracciones se guardaron en reserva.
- 10
- [0082]** Se enfriaron detenidamente 300 g aproximadamente del concentrado sintético de 2-amino-5-etilpiridina (> 88 % por HPLC) en ácido sulfúrico al 20 % ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , p/v) en agua de grado reactivo en un baño de hielo colocado en una campana de humos. A la vez que la mezcla se agitó constantemente, se añadió una solución acuosa de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ , p/v, 1,2 equivalentes en moles) al 30 % durante 4-5 horas.
- 15
- [0083]** Después de completar la adición de la solución de  $\text{NaNO}_2$ , se añadió cuidadosamente  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2,0 equivalentes en moles) a la mezcla de reacción hasta que se alcanzó un pH = 8-8,5. A continuación se separó esta mezcla de reacción resultante en dos fases: una fase orgánica superior de color amarillo oscuro y una fase acuosa inferior de color amarillo claro. Se transfirió la mezcla a un embudo de decantación y a continuación se separaron las dos fases.
- 20
- [0084]** Después de la separación, se extrajo la fase acuosa tres veces con cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 800 ml x 3). Se guardaron en reserva las tres fases de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  con la fase orgánica original y se secó la mezcla en reserva resultante sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro durante toda la noche. Después de retirar el  $\text{MgSO}_4$  mediante filtrado por gravedad, se retiró el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  por evaporación rotatoria. Se secó al vacío el material resultante para obtener un sólido amarillo claro. Esta reacción tuvo un rendimiento aproximado del 87 %.
- 25
- [0085]** Catalizador: se preparó un catalizador de cobre-cinc (Cu-Zn) inmediatamente antes de la reacción anterior. Se lavó el polvo de cinc (0,05 equivalentes en moles) dos veces con ácido clorhídrico al 3 % (p/v) y a continuación se lavó dos veces con agua de grado reactivo. Seguidamente, se añadió una parte de solución acuosa de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , p/v) al 2 % al polvo de cinc lavado con ácido y se mezcló detenidamente el contenido por agitación hasta que la fase líquida se hizo incolora. Se decantó la solución incolora y se añadió una segunda parte de solución de  $\text{CuSO}_4$  al 2 % al polvo de cinc antes de volver a agitar la mezcla. Se repitió este procedimiento hasta que la solución de  $\text{CuSO}_4$  permaneció azul, y el polvo de cinc gris se convirtió en un polvo rojo. Seguidamente, se filtró el catalizador de Zn-Cu completado y a continuación se lavó varias veces con agua purificada, seguido de múltiples deslavados con metanol. A continuación se secó el polvo rojo oscuro resultante al vacío durante al menos dos horas.
- 30
- 35
- 40
- [0086]** Se preparó una solución de 5-etil-2-piridona (~ 300 g, 1,0 equivalentes en moles) en bromobenceno (2,5 equivalentes en moles) y se añadió el catalizador de Zn-Cu (0,05 equivalentes en moles) y carbonato de potasio (1,2 equivalentes en moles).
- 45
- [0087]** A continuación se sometió esta mezcla de reacción a reflujo lentamente en argón. Se comprobó con frecuencia el avance de la reacción por cromatografía en capa fina (TLC) cada 24 horas. Cuando la reacción estuvo completa, se retiró el bromobenceno sin reaccionar de la mezcla de reacción por destilación en alto vacío.
- 50
- [0088]** Procedimiento de purificación: se extrajo la solución residual tres veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 L x 3) para aislar la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona. Se filtró al vacío cada extracto a través de una columna corta de Celita (tierra diatomea) para eliminar todas las partículas pequeñas. Después de guardar en reserva todos los lavados de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en un vaso, se añadieron 40 g de carbón activado, y se llevó la solución a ebullición a aproximadamente 40 °C. Después de ebullición durante 10-15 minutos, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente antes de que se retirara el carbón por filtrado al vacío a través de una segunda columna de Celita.
- 55
- [0089]** Se redujo el volumen de solución de filtrado por evaporación rotatoria para eliminar las trazas residuales de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Posteriormente, se transfirió el concentrado oleoso resultante a una cubeta con recubrimiento de Teflón y se secó durante toda la noche a temperatura ambiente en la campana para producir un sólido marrón oscuro que contenía 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona.

5 **[0090]** Se añadieron aproximadamente 100 ml de acetato de etilo a un vaso de precipitado de vidrio de 1 l (vaso-I) que contenía 200 g del sólido marrón oscuro aislado en la cubeta con recubrimiento de Teflón. Se colocó el vaso-I en una placa caliente en la campana, se calentó para disolver el sólido en bruto y a continuación se llevó la solución de acetato de etilo a ebullición. Después de retirar el vaso de precipitado de la placa calefactora, se añadieron hexanos a la solución en ebullición mientras se agitaba el contenido de forma continua. Cuando la fase superior (rica en hexanos) empezó a separarse de la fase inferior (principalmente acetato de etilo), cesó toda la agitación durante 5-10 minutos y se permitió que las dos fases se separaran por completo. La fase superior parecía transparente. Sin embargo, algunas tandas produjeron un color naranja o amarillo pálido.

10 **[0091]** Se vertió cuidadosamente la fase superior (rica en hexanos) en un segundo vaso de precipitado (vaso-II) y se dejó enfriar esta solución durante varios minutos para que se sedimentara sin agitación. Se transfirió cuidadosamente la fase superior a una cubeta con recubrimiento de Teflón colocada en la campana de humos, dejando los contaminados oleosos amarillos en el fondo del vaso-II.

15 **[0092]** Cuando las soluciones combinadas decantadas desde el vaso II se evaporaron, se formaron cristales blancos o amarillos fríos de 5-etil-1-fenil-2-piridona en toda la cubeta. Se recrystalizaron cristales blanquecinos o de color para mejorar la pureza y se sometieron a ensayo por observación y por TLC. Después de que el sólido purificado se secase durante toda la noche a temperatura ambiente, el procedimiento descrito produjo un polvo cristalino blanco con un punto de fusión de 57-59 °C. El análisis HPLC de fase inversa y la RMN confirmaron que este material contenía > 99 % de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona tal como se muestra en la fig. 3.

#### **Ejemplo 11: Tratamiento de un paciente humano con necesidad de tratamiento**

25 **[0093]** Un paciente hospitalizado se presenta en la Unidad de Cuidados Intensivos para tratamiento de shock séptico.

30 **[0094]** El shock séptico puede ser consecuencia de una infección bacteriana adquirida durante procedimientos quirúrgicos o de otro tipo, o por otra etiología. El paciente puede ser tratado con una infusión intravenosa de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona purificada (5-EPP) a (5-40 mg/kg), preferentemente (10-25 mg/kg).

#### **Ejemplo 12: Tratamiento de un paciente humano con necesidad de tratamiento con 5-EPP en combinación con antibióticos**

35 **[0095]** Se presenta una situación similar a la descrita en el ejemplo 11, aunque además de con 5-EPP, el paciente es tratado con una infusión intravenosa de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona purificada (5-40 mg/kg), preferentemente (10-25 mg/kg) en conjunción con infusión intravenosa de antibióticos.

#### **Ejemplo 13: Tratamiento de un paciente equino con necesidad de tratamiento con 5-EPP**

40 **[0096]** En un caballo se diagnostica un cólico debido a traumatismo o infección gastrointestinal y puede infundírsele una infusión intravenosa de 5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona (10-25 mg/kg) purificada con o sin antibióticos.

#### **45 Ejemplo 14 Inhibición de secreción de TNF- $\alpha$ y TNF- $\alpha$ asociado con células**

**[0097]** Las enfermedades asociadas con TNF- $\alpha$  se tratan por administración de la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona (10-25 mg/kg) (5-EPP) por infusión iv u otra vía. Este tratamiento es eficaz para inhibir la secreción de TNF- $\alpha$  y la concentración de TNF- $\alpha$  asociado con la membrana celular.

50

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de una septicemia en un mamífero, comprendiendo la composición 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona.
- 5 2. Una composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el tratamiento de una septicemia comprende la administración de una cantidad eficaz de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona a un mamífero con necesidad de dicho tratamiento, en la que dicha cantidad eficaz es inyectada en dicho mamífero por medio de una vía seleccionada entre las vías intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y oral.
- 10 3. Una composición para su uso según la reivindicación 2, en la que dicha vía se selecciona entre inyección intravenosa e infusión intravenosa.
4. Una composición para su uso según la reivindicación 2, en la que dicha cantidad eficaz es aproximadamente de 5 mg/kg de peso corporal a 200 mg/kg de peso corporal al día de dicho mamífero.
- 15 5. Una composición para su uso según la reivindicación 4, en la que dicha cantidad eficaz se administra en una dosis única o en dosis múltiples.
- 20 6. Un producto farmacéutico para su uso en el tratamiento de una septicemia, que comprende 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona purificada.
7. El producto farmacéutico para su uso según la reivindicación 6, que comprende además un vehículo farmacéutico.
- 25 8. El producto farmacéutico para su uso según la reivindicación 7, en el que dicha 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona purificada se disuelve en un vehículo farmacéutico y es adecuada para su administración por medio de una vía seleccionada entre inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección intravenosa e infusión intravenosa en un mamífero.
- 30 9. El producto farmacéutico para su uso según la reivindicación 8 en el que dicho vehículo se selecciona entre suero salino, propilenglicol y combinaciones de los mismos.
10. El producto farmacéutico para su uso según la reivindicación 9, en el que dicho vehículo es suero salino isotónico y dicha 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona tiene una concentración de 20 mg/mL o menos y es incolora a temperatura ambiente.
- 35 11. El producto farmacéutico para su uso según la reivindicación 7, que comprende 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona purificada y un diluyente en forma de suero salino, en el que la concentración de dicha solución es 20 mg/mL, y en el que dicha solución **se caracteriza por** ser transparente a temperatura ambiente sin ningún precipitado visible.
- 40 12. El producto farmacéutico para su uso según la reivindicación 7, en el que dicho vehículo es suero salino; y en el que la concentración de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona es aproximadamente 20 mg/ml.
- 45 13. El producto farmacéutico destinado a su uso según la reivindicación 7, que comprende una solución que es incolora y no precipita a temperatura ambiente, y que se prepara según las etapas de: añadir una cantidad de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona sólida a un tubo hecho de un material seleccionado entre el grupo que consiste en polipropileno y poliestireno; añadir una cantidad de diluyente en forma de suero salino a dicha 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona sólida hasta el volumen final deseado; disolver la 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona por mezclado intermitente con un agitador vorticial, calentar dicho tubo a una temperatura de entre 40 °C y 45 °C y aplicar sonicación (3 x 15 min) a dicho tubo hasta que tiene lugar la disolución completa; permitir que dicha solución regrese a la temperatura ambiente a la cual se forma dicha solución de 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona que es incolora y no precipita a temperatura ambiente; en el que la concentración de dicha 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona es 20 mg/ml.
- 50 55 14. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el producto farmacéutico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en la que la composición o producto comprende 5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona como único agente terapéutico.
- 60



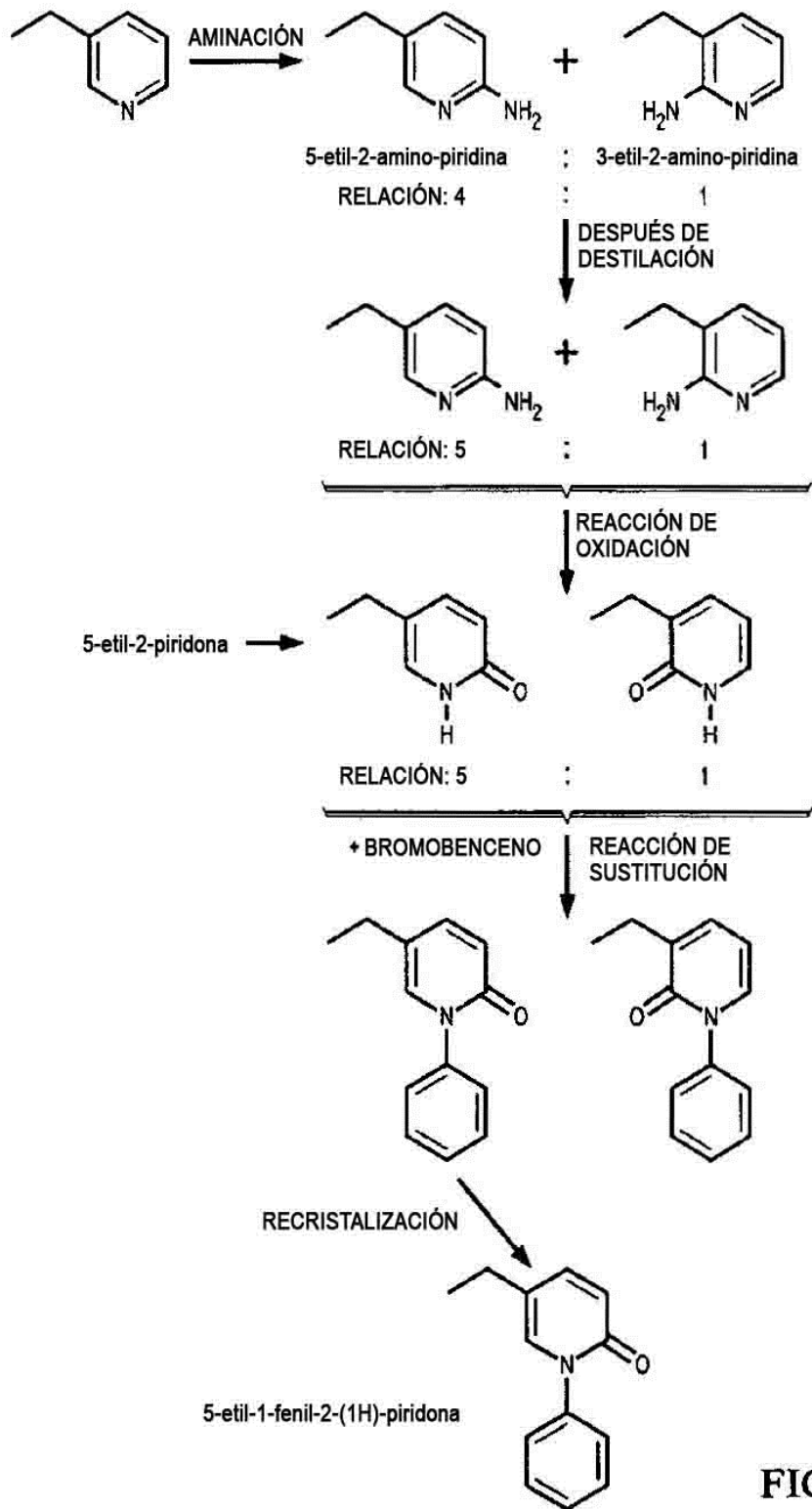
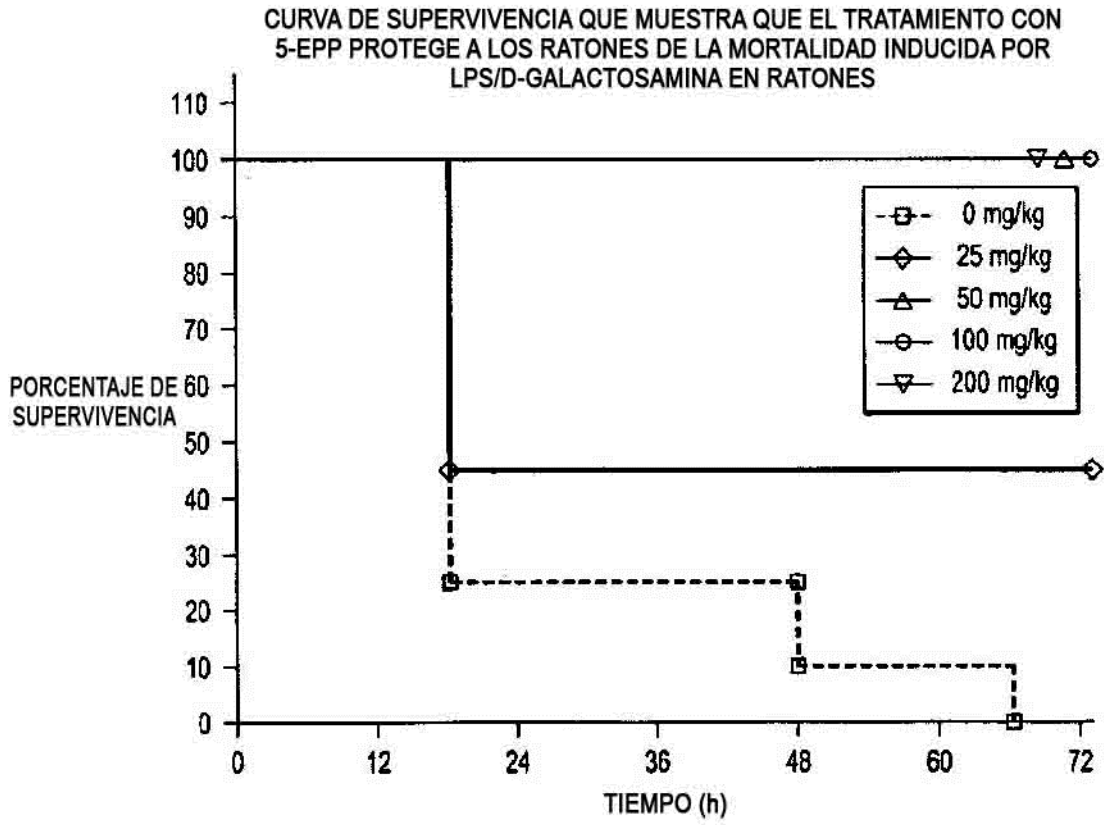
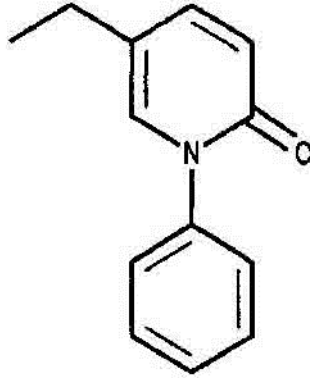


FIG. 1



**FIG. 2**



5-etil-1-fenil-2-(1H)-piridona ("5-EPP")

**FIG. 3**