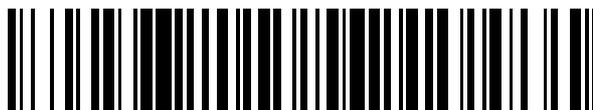


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 203**

51 Int. Cl.:

C07D 233/56 (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/4436 (2006.01)

A61K 31/4164 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2013** **E 13703675 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015** **EP 2807151**

54 Título: **Inhibidor de la quinasa reguladora de la señal de apoptosis**

30 Prioridad:

27.01.2012 US 201261591710 P

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

02.02.2016

73 Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

NOTTE, GREGORY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 558 203 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

Inhibidor de la quinasa reguladora de la señal de apoptosis

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por la ASK1. La invención se refiere también a productos intermedios para su preparación y a composiciones farmacéuticas que contienen dicho compuesto nuevo.

10

Antecedentes

La quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1 (ASK1) es un miembro de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos ("MAP3K) que activa la proteína quinasa c-Jun N-terminal ("JNK") y la quinasa p38 MAP (Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Dijke, PT, Saitoh, M., Moriguchi, T., Matsumoto, K., Miyazono, K., y Gotoh, Y. (1997) Science, 275, 90-94). La ASK1 es activada por varios estímulos incluyendo el estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno (ERO), LPS, TNF- α , FasL, estrés del RE y aumento de las concentraciones de calcio intracelular (Hattori, K., Naguro, I., Runchel, C., e Ichijo, H. (2009) Cell Comm. Signal 7, 1-10; Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I., e Ichijo, H. (2007) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 48: 1-8,27; Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K e Ichijo, I. (2007) J. Biochem. Mol. Biol. 40: 1-6). La fosforilación de la proteína ASK1 puede conducir a la apoptosis o a otras respuestas celulares dependiendo del tipo de célula. Se ha descrito que la activación de ASK1 y la señalización desempeñan un papel importante en una amplia gama de enfermedades incluyendo neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunitarias y trastornos metabólicos. Además, se ha implicado la participación de ASK1 en la mediación del daño en los órganos tras la isquemia y reperfusión del corazón, cerebro y riñón (Watanabe et al. (2005) BBRC 333, 562-567; Zhang et al., (2003) Life Sci 74-37-43; Terada et al. (2007) BBRC 364: 1043-1049).

Se ha descrito que las ERO están asociadas con aumentos de la producción de citoquinas inflamatorias, fibrosis, apoptosis y necrosis en el riñón. (Singh DK, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. Nat Rev Endocrinol 2011 Mar; 7(3): 176-184; Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 2001 Dec 13; 414(6865):813-820; Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. Nat Rev Nephrol 2010 Nov; 6(11):667-678).

Además, el estrés oxidativo facilita la formación de productos finales de glicación avanzada (PGA) que causan lesión renal adicional y la producción de ERO. (Hung KY, et al. N-acetylcysteine-mediated antioxidation prevents hyperglycemia-induced apoptosis and collagen synthesis in rat mesangial cells. Am J Nephrol 2009;29(3):192-202).

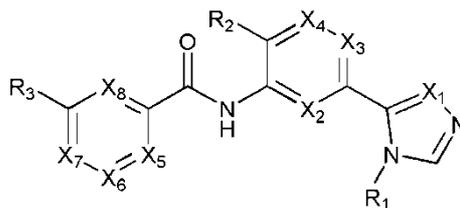
La fibrosis tubulointersticial en el riñón es un fuerte predictor de la progresión de la insuficiencia renal en pacientes con enfermedades renales crónicas (Schainuck LI, et al. Structural-functional correlations in renal disease. Part II: The correlations. Hum Pathol 1970; 1: 631-641.). La obstrucción ureteral unilateral (OUU) en ratas es un modelo ampliamente utilizado de fibrosis del túbulo intersticial. La OUU causa inflamación tubulointersticial, aumento de la expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la acumulación de miofibroblastos, que secretan proteínas de la matriz tales como colágeno y fibronectina. El modelo de la OUU se puede utilizar para analizar el potencial de un medicamento para tratar la nefropatía crónica mediante la inhibición de la fibrosis renal (Chevalier et al., Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy, Kidney International (2009) 75, 1145-1152).

Por lo tanto, los agentes terapéuticos que funcionan como inhibidores de la señalización de ASK1 tienen el potencial de remediar o mejorar la vida de los pacientes en necesidad de tratamiento para enfermedades o trastornos tales como trastornos neurodegenerativos, cardiovasculares, inflamatorios, autoinmunitarios y trastornos metabólicos. En particular, los inhibidores de ASK1 tienen el potencial para el tratamiento de enfermedades cardio-renales, incluyendo nefropatía, nefropatía diabética, nefropatía crónica, enfermedades fibróticas (incluyendo fibrosis pulmonar y renal), enfermedades respiratorias (incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y lesión pulmonar aguda), enfermedades hepáticas agudas y crónicas.

La publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2007/0276050 describe métodos para la identificación de inhibidores de ASK1 útiles para prevenir y/o tratar la enfermedad cardiovascular y métodos para prevenir y/o tratar la enfermedad cardiovascular en un animal.

El documento WO2009027283 divulga compuestos de triazolopiridina, métodos para la preparación de los mismos y métodos para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.

La solicitud de patente de los EE.UU. N° 2001/00095410A1, publicada el 13 de enero de 2011, divulga compuestos útiles como inhibidores de la ASK-1. La publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2001/00095410A1se refiere a compuestos de Fórmula (I):



(I)

en la que:

5

R₁ es alquilo, alqueniilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, o heterociclilo, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de halo, oxo, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, ariloxi, -NO₂, R⁶, -C(O)-R⁶, -OC(O)-R⁶, -C(O)-O-R⁶, -C(O)-N(R⁶)(R⁷), -OC(O)-N(R⁶)(R⁷), -S-R⁶, -S(=O)-R⁶, -S(=O)₂R⁶, -S(=O)₂-N(R⁶)(R⁷), -S(=O)₂-O-R⁶, -N(R⁶)(R⁷), -N(R⁶)-C(O)-R⁷, -N(R⁶)-C(O)-O-R⁷, -N(R⁶)-C(O)-N(R⁶)(R⁷), -N(R⁶)-S(=O)₂-R⁶, -CN y -O-R⁶,

10

en la que alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, fenilo, y fenoxi están opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de alquilo, cicloalquilo, alcoxi, hidroxilo, y halo;

15

en la que R₆ y R₇ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₅, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con 1-3 sustituyentes seleccionados de halo, alquilo, mono- o dialquilamino, alquilo o arilo o heteroarilo amida, -CN, alcoxi inferior, -CF₃, arilo, y heteroarilo; o R₆ y R₇ cuando se toman junto con el nitrógeno al que están unidos forman un heterociclo;

20

R² es hidrógeno, halo, ciano, alcoxi, o alquilo opcionalmente sustituido con halo ;

20

R³ es arilo, heteroarilo, o heterociclilo, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo, alcoxi, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterociclilo, heterocicilalquilo, halo, oxo -NO₂, haloalquilo, haloalcoxi, -CN, -O-R⁶, -O-C(O)-R⁶, -O-C(O)-N(R⁶)(R⁷), -S-R⁶, -N(R⁶)(R⁷), -S(=O)-R⁶, -S(=O)₂R⁶, -S(=O)₂-N(R⁶)(R⁷), -S(=O)₂-O-R⁶, -N(R⁶)-C(O)-R⁷, -N(R⁶)-C(O)-O-R⁷, -N(R⁶)-C(O)-N(R⁶)(R⁷), -C(O)-R⁶, -C(O)-O-R⁶, -C(O)-N(R⁶)(R⁷) y -N(R⁶)-S(=O)₂-R⁷, en la que el alquilo, alcoxi, cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo está además opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halo, oxo, -NO₂, alquilo, haloalquilo, haloalcoxi, -N(R⁶)(R⁷), -C(O)-R⁶, -C(O)-O-R⁶, -C(O)-N(R⁶)(R⁷), -CN, -O-R⁶, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo;

25

con la condición de que el resto heteroarilo o heterociclilo incluya al menos un átomo de nitrógeno en el anillo;

30

X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷ y X⁸ son independientemente C(R⁴) o N, en la que cada R⁴ es independientemente hidrógeno, alquilo, alcoxi, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, halo, -NO₂, haloalquilo, haloalcoxi, -CN, -O-R⁶, -S-R⁶, -N(R⁶)(R⁷), -S(=O)-R⁶, -S(=O)₂R⁶, -S(=O)₂-N(R⁶)(R⁷), -S(=O)₂-O-R⁶, -N(R⁶)-C(O)-R⁷, -N(R⁶)-C(O)-O-R⁷, -N(R⁶)-C(O)-N(R⁶)(R⁷), -C(O)-R⁶, -C(O)-O-R⁶, -C(O)-N(R⁶)(R⁷), o -N(R⁶)-S(=O)₂-R⁷, en la que el alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo está además opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halo, oxo, -NO₂, -CF₃, -O-CF₃, -N(R⁶)(R⁷), -C(O)-R⁶, -C(O)-O-R⁷, -C(O)-N(R⁶)(R⁷), -CN, -O-R⁶; o

35

X⁵ y X⁶ o X⁶ y X⁷ se unen para proporcionar opcionalmente arilo condensado opcionalmente sustituido o heteroarilo condensado opcionalmente sustituido; y

con la condición de que al menos uno de X², X³ y X⁴ sea C(R⁴);

al menos dos de X⁵, X⁶, X⁷ y X⁸ sea C(R⁴) y

al menos uno de X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷ y X⁸ sea N.

40

A pesar de las descripciones anteriores, hay una necesidad de compuestos que sean potentes y exhiban unos perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos mejorados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de la ASK1.

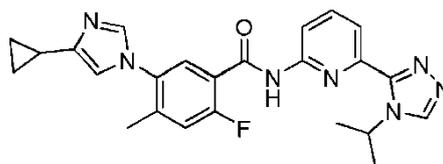
45

Sorprendentemente, los solicitantes han descubierto un nuevo compuesto dentro del alcance de la Publicación de Patente de los EE.UU. US2011/0009410A que exhibe buena potencia, unos perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos mejorados, en general, comparado con los compuestos descritos en la misma.

Sumario de la invención

50

La presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula:



(I),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En una realización, la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) en el tratamiento de una enfermedad en un paciente en necesidad de tratamiento con un inhibidor de la ASK1.

En otra realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 En otra realización, la invención es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método de tratamiento de la nefropatía diabética o complicaciones de la diabetes, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente en necesidad del mismo.

15 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método de tratamiento de la nefropatía, o nefropatía diabética que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente en necesidad del mismo.

20 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método de tratamiento de la fibrosis renal, fibrosis pulmonar o fibrosis pulmonar idiopática (FPI) que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente en necesidad del mismo.

25 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el método de tratamiento de la enfermedad renal diabética, nefropatía diabética, fibrosis renal, fibrosis hepática o fibrosis pulmonar, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o sal de fórmula (I), a un paciente en necesidad del mismo.

30 En otra realización, la invención se refiere a intermedios útiles para la síntesis del compuesto de fórmula (I).

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la nefropatía crónica.

35 En otra realización, la invención se refiere un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la nefropatía diabética.

40 En otra realización más, la invención se refiere al compuesto de fórmula (I) para su uso en terapia.

Descripción detallada de la invención

Figuras

45 La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los niveles de colágeno IV en la corteza renal de ratas sometidas a siete días de obstrucción ureteral unilateral y tratadas con un vehículo o con el compuesto de fórmula (I) a razón de 1, 3, 10 o 30 mg/kg dos veces al día.

50 La Figura 2 muestra imágenes representativas de cortes de la corteza renal teñidos con alfa-actina de músculo liso (un marcador de miofibroblastos activados) de ratas sometidas a siete días de obstrucción ureteral unilateral y tratadas con un vehículo o con el compuesto de fórmula (I) a razón de 1, 3, 10 o 30 mg/kg dos veces al día.

Definiciones y parámetros generales

55 Tal como se usa en la presente memoria, las siguientes palabras y frases están destinadas a tener los significados establecidos a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el que se utilizan indique lo contrario. Donde no se da ninguna indicación o definición, está implícito el sentido corriente de la palabra o frase que se encuentra en el correspondiente diccionario o en el uso común conocido para un experto en la técnica.

El término “nefropatía crónica”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la pérdida progresiva de la función renal a lo largo del tiempo, por lo general, meses o incluso años. La nefropatía crónica (NC) es diagnosticada por el médico competente utilizando la información apropiada, pruebas o marcadores conocidos para un experto en la técnica. La nefropatía crónica incluye implícitamente nefropatía.

5 El término “nefropatía diabética” como se usa en la presente memoria, se refiere a la enfermedad renal causada por la diabetes, exacerbada por la diabetes o co-presentada con diabetes. Es una forma de nefropatía crónica que ocurre en aproximadamente el 30 % de los pacientes con diabetes. Se define como diabetes con la presencia de albuminuria y/o insuficiencia renal (es decir, disminución de la tasa de filtración glomerular (Ver. de B, I, et al. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. JAMA 2011 Jun 22; 305(24):2532-2539).

15 El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a sales de compuestos farmacéuticos por ejemplo el compuesto de fórmula (I) que retienen la eficacia biológica y las propiedades del compuesto subyacente, y que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Hay sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos.

20 Ácidos y bases útiles para la reacción con un compuesto subyacente para formar sales farmacéuticamente aceptables (sales de adición de ácido o de bases, respectivamente) son conocidos para un experto en la técnica. Del mismo modo, los métodos de preparación de sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto subyacente (divulgado) son conocidos para un experto en la técnica y se describen en, por ejemplo, Berge, et al. Journal of Pharmaceutical Science, Ene 1977 vol. 66, Nº 1 y otras fuentes. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. 25 Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen, pero no se limitan a, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido p-tolueno-sulfónico y similares. Las bases útiles para la formación de sales de adición de base son conocidas para un experto en la técnica. Un ejemplo de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula (I) es la sal de hidrocloreuro del compuesto de fórmula (I).

30 Como se usa en la presente memoria, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye excipientes o agentes tales como disolventes, diluyentes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que no son perjudiciales para el compuesto de la invención o uso de los mismos. El uso de tales vehículos y agentes para preparar composiciones de sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Co., Philadelphia, PA 17th Ed. (1985) y Modern Pharmaceutics, Marcel Dekker, Inc. 3rd Ed. (G.S. Banker & C.T. Rhodes, Eds.)

40 El término “enfermedades cardio-renales” como se usa en la presente memoria se refiere a las enfermedades relacionadas con la función del riñón que son causadas o exacerbadas por problemas cardiovasculares, tales como, por ejemplo, la presión arterial alta o hipertensión. Se cree que la hipertensión es un factor importante que contribuye a la enfermedad renal.

45 El término “enfermedades respiratorias” como se usa en la presente memoria se refiere a enfermedades que incluyen enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

50 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad del compuesto de fórmula (I) que es suficiente para efectuar el tratamiento tal como se define a continuación, cuando se administra a un paciente (particularmente un ser humano) en necesidad de tal tratamiento en una o más dosis. La cantidad terapéuticamente eficaz variará, dependiendo del paciente, la enfermedad a tratar, el peso y/o la edad del paciente, la gravedad de la enfermedad, o la forma de administración, según lo determinado por un médico cualificado.

El término “tratamiento” o “tratar” significa la administración de un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de fórmula (I) con el propósito de:

55 (i) retrasar la aparición de una enfermedad, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen o retrasar el desarrollo de la misma;
 (ii) inhibir la enfermedad, es decir, detener el desarrollo de los síntomas clínicos y/o
 (iii) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de los síntomas clínicos o de la gravedad de los mismos.

60 En una realización preferida, la invención se refiere al compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la nefropatía crónica, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente en necesidad del mismo.

65 En otra realización preferida, la invención se refiere al compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la nefropatía diabética que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente en necesidad del mismo.

En otra realización preferida, la invención se refiere a compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la fibrosis pulmonar o renal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente en necesidad del mismo.

5 La concentración inhibidora semi-máxima (CI_{50}) de un agente terapéutico es la concentración de un agente terapéutico que es necesaria para producir un 50 % de la inhibición máxima contra una enzima diana. Es un objetivo deseable descubrir un agente terapéutico, por ejemplo, un compuesto que inhiba la quinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) con una CI_{50} baja. De esta manera, los efectos secundarios no deseables se reducen al mínimo gracias a la capacidad de utilizar una dosis más baja del agente terapéutico para inhibir la enzima ASK1.

10 Del mismo modo, es un objetivo deseable descubrir un agente terapéutico que tenga una constante de disociación baja (K_d). K_d se utiliza para describir la afinidad entre un ligando (tal como un agente terapéutico) y la correspondiente quinasa o receptor; es decir, una medida de la fuerza con la que un agente terapéutico se une a una quinasa particular, por ejemplo, la quinasa reguladora de la señal de apoptosis ASK1. Por lo tanto, en el desarrollo de fármacos generalmente se prefiere una K_d más baja.

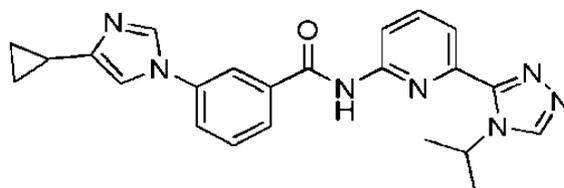
15 Del mismo modo, es un objetivo deseable descubrir un compuesto que tenga una CE_{50} baja. CE_{50} es la concentración de un fármaco que alcanza el 50 % de eficacia máxima en la célula. El valor CE_{50} se traduce en la concentración de un compuesto en el medio de ensayo necesaria para alcanzar el 50 % de la máxima eficacia. Así, en el desarrollo de fármacos generalmente se prefiere una CE_{50} más baja. Una unidad de medida útil asociada con la CE_{50} es la CE_{50} ajustada por la unión a proteínas ($CE_{50}UP_{aj}$) como se usa en la presente memoria). Este valor mide la cantidad de un fármaco, por ejemplo, compuesto de fórmula (I) correlacionada con la fracción del fármaco que no está unida a la proteína que proporciona 50 % de eficacia máxima. Este valor mide la eficacia del fármaco corregida para o correlacionada con la cantidad de fármaco que está disponible en el sitio diana de acción.

20 Otra propiedad deseable es tener un compuesto con una relación de flujo de salida de la membrana celular baja como se determina mediante los estudios de permeabilidad celular en células CACO. Se prefiere una relación de flujo de salida ($(B/A)/(A/B)$) de menos de 3,0. Se espera que un compuesto con una relación mayor de 3 sufra un flujo de salida activo rápido de la célula y no pueda permanecer el tiempo suficiente en la célula para conseguir una eficacia máxima.

25 Otro objetivo deseable es descubrir un fármaco que exhiba una mínima inhibición de otros sustratos. Es decir, se desea un fármaco que inhiba mínimamente las enzimas CYP450 (citocromo P450). Más particularmente, un fármaco que sea un inhibidor débil de CYP3A4, la más importante de las enzimas P450. Un inhibidor débil es un compuesto que causa al menos 1,25 veces, pero menos de 2 veces un incremento de los valores plasmáticos del AUC o 20 a 50 % de disminución en el aclaramiento (wikipedia.org/wiki/cyp3A4, visitado 11/12/11). En general, un compuesto que muestra una CI_{50} de CYP3A4 mayor de 10 μ M se considera un inhibidor débil.

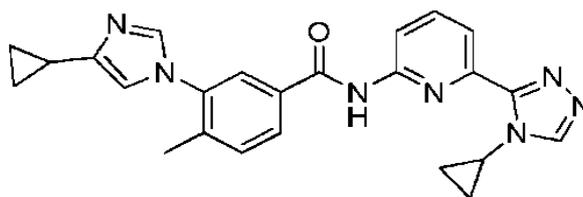
30 Una medida útil para comparar la inhibición del CYP3A4 entre los candidatos a fármaco es la relación entre la inhibición de CYP3A4 y la CE_{50} ajustada por la unión a proteínas. Este valor da una indicación del potencial relativo para la inhibición de cyp corregido para la CE_{50} ajustada por la unión a proteínas que es específica para cada fármaco. Se prefiere una proporción más alta en esta medida como indicativo de un menor potencial de inhibición de cyp3A4.

35 Inesperadamente y de forma ventajosa, los solicitantes han descubierto un compuesto (de fórmula (I) en la presente memoria) dentro del alcance genérico de la Publicación de Patente de los EE.UU. N° 2001/00095410A1 que proporciona ventajas en comparación con los compuestos estructuralmente cercanos (en la presente memoria designados como compuestos A y B) divulgados en la Publicación de Patente de los EE.UU. N° 2001/00095410A1



Compuesto A

50



Compuesto B

5 Por lo tanto, objetos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a la provisión de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y los métodos de uso del compuesto de fórmula (I) para el tratamiento de la nefropatía, nefropatía crónica, enfermedad renal diabética, nefropatía diabética, fibrosis renal o fibrosis pulmonar.

Terapia de combinación

- 10 Los pacientes que reciben tratamiento para las enfermedades cardio-renales como la nefropatía crónica pueden beneficiarse de un tratamiento de combinación de fármacos. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención se puede combinar con uno o más de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) tales como enalapril, captopril, ramipril, lisinopril, quinapril o bloqueadores del receptor de angiotensina II (BRA-II), tales como losartán, olmesartán e irbesartán; o agentes antihipertensivos tales como amlodipino, nifedipino y felodipino. El
- 15 beneficio de la combinación puede ser aumentar la eficacia y/o reducir los efectos secundarios para un componente, ya que la dosis de ese componente puede ser ajustada a la baja para reducir sus efectos secundarios a la vez que se obtienen los beneficios de su mayor eficacia por la eficacia del compuesto de fórmula (I) y/u otro componente activo (s).
- 20 Los pacientes que presentan nefropatía crónica tratable con inhibidores de la ASK1 tal como el compuesto de fórmula (I), también pueden presentar trastornos que se benefician de la co-administración (como la prescrita por un médico cualificado) de un agente o agentes terapéuticos que son antibióticos, analgésicos, antidepresivos y/o agentes anti-ansiedad en combinación con el compuesto de fórmula (I). Los tratamientos de combinación pueden administrarse simultáneamente o uno después del otro dentro de intervalos según lo indicado por un médico
- 25 cualificado o por medio de una presentación en dosis fija (todos los principios activos se combinan en una forma farmacéutica unitaria, (por ejemplo, comprimido) de dos o más agentes activos.

Composiciones farmacéuticas y administración

- 30 El compuesto de la presente invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, el compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo diluyentes sólidos inertes y cargas, diluyentes, incluyendo solución acuosa estéril y diversos disolventes orgánicos, potenciadores de permeación, solubilizantes y adyuvantes.
- 35 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar solas o en combinación con otros agentes terapéuticos. Las composiciones se pueden preparar para la administración en forma de comprimidos sólidos, cápsulas, comprimidos oblongos, pomadas, parches dérmicos, comprimidos de liberación sostenida, de disgregación rápida, preparaciones para inhalación, etc. Las composiciones farmacéuticas típicas se preparan y/o administran usando métodos y/o procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica (véase, por ejemplo, Remington's
- 40 Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Co., Philadelphia, PA 17th Ed. (1985) y Modern Pharmaceutics, Marcel Dekker, Inc. 3rd Ed. (G.S. Banker & C.T. Rhodes, Eds.).

45 Las formulaciones para tratamientos de combinación que comprenden el compuesto de fórmula (I) se pueden presentar como formulaciones de dosis fijas, por ejemplo, comprimidos, elixires, líquidos, pomadas, inhalantes, geles, etc., usando procedimientos conocidos para un experto en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas del compuesto de fórmula (I) se pueden administrar en dosis únicas o múltiples por vías que incluyen, por ejemplo, rectal, bucal, intranasal y transdérmica; mediante inyección intra-arterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, oral, tópica, como inhalante, o mediante un dispositivo impregnado o revestido tal como un stent, por ejemplo, o un polímero cilíndrico insertado en la arteria.

50 Las vías de administración más preferidas incluyen la administración oral, parental e intravenosa.

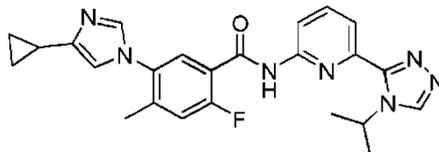
El compuesto de fórmula (I) se puede administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Para la administración oral, cada unidad de dosificación contiene preferiblemente de 1 mg a 500 mg del compuesto de fórmula (I). Una

55 dosis más preferida es de 1 mg a 250 mg del compuesto de fórmula (I). Se prefiere particularmente una dosis del compuesto de fórmula (I) que varía de aproximadamente 20 mg dos veces al día a aproximadamente 50 mg dos veces al día. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad de compuesto realmente administrada por lo general será

determinada por un médico a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo el trastorno a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto de co-administración en su caso, la edad, el peso, la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

5 Nomenclatura

El nombre del compuesto de la presente invención generado utilizando ChemBioDraw Ultra 11.



10 es 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-il)-2-fluoro-4-metilbenzamida también conocido como 5-((4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridina-2-il)-4-metilbenzamida.

15 Síntesis del Compuesto de Fórmula (I)

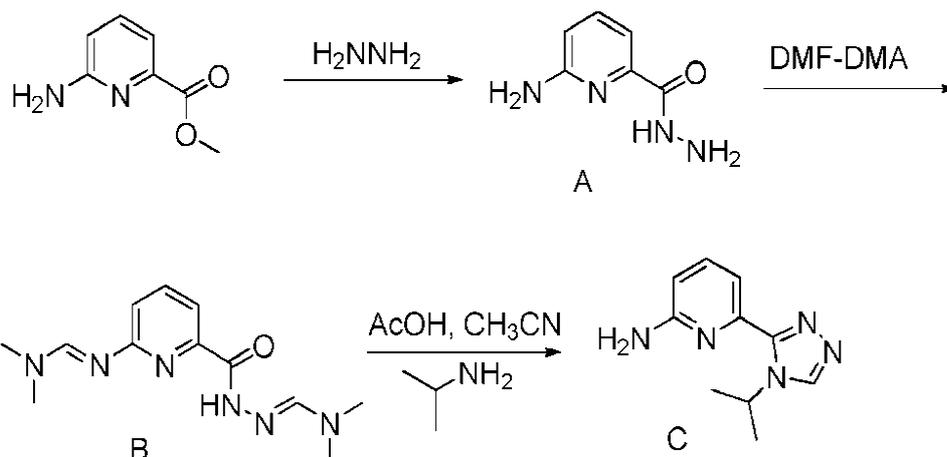
El compuesto de la invención puede prepararse usando los métodos divulgados en la presente memoria o modificaciones de los mismos que serán evidentes dada la divulgación en la presente memoria. La síntesis del compuesto de la invención puede llevarse a cabo como se describe en el siguiente ejemplo. Si están disponibles, los reactivos pueden ser adquiridos comercialmente, por ejemplo, en Sigma Aldrich o de otros proveedores de productos químicos. Alternativamente, los reactivos se pueden preparar utilizando esquemas de reacción y métodos conocidos para un experto en la técnica.

25 Parámetros de reacción sintética

Los términos “disolvente”, “disolvente orgánico inerte” o “disolvente inerte” se refieren a un disolvente inerte en las condiciones de la reacción con las que se describe (incluyendo, por ejemplo, benceno, tolueno, acetonitrilo, tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), cloroformo, cloruro de metileno (o diclorometano), éter dietílico, éter de petróleo (PE), metanol, piridina, acetato de etilo (EA) y similares. A menos que se especifique lo contrario, los disolventes utilizados en las reacciones de la presente invención son disolventes orgánicos inertes, y las reacciones se llevan a cabo bajo un gas inerte, preferiblemente nitrógeno.

Un método para preparar compuestos de fórmula (I) se muestra en los Esquemas de Reacción 1 y 2 a continuación.

Esquema 1



35

Preparación del compuesto A

40 A una solución de 6-aminopicolinato de metilo (432 g, 2,84 mol) en MeOH (5 l) se añadió NH₂NH₂.H₂O (284 g, 5,68 mol, 2,0 eq.). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado formado en la mezcla se recogió por filtración, se lavó con AE (2 x 2 l) y después se secó en vacío para dar el compuesto A (405 g, rendimiento 94 %) como un sólido blanco.

Preparación del compuesto B

Una mezcla del compuesto **A** (405 g, 2,66 mol) en dimetilformamida-dimetilacetil (DMF-DMA) (3,54 l) se calentó a reflujo durante 18 h, se enfrió a temperatura ambiente y después se concentró a presión reducida. El residuo se recogió en AE (700 ml) y se calentó a 50 °C durante 20 min. Después de enfriarse a temperatura ambiente, el sólido se recogió por filtración y se secó en vacío para dar el compuesto **B** (572 g, rendimiento 82 %) como un sólido blanco.

Preparación de C

A una solución del compuesto **B** (572 g, 2,18 mol) en una mezcla de CH₃CN-AcOH (3,6 l, 4:1) se añadió propan-2-amina (646 g, 5,0 eq). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 24 horas y después se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en agua (2,8 l) y se añadió NaOH acuoso 1 N a un pH de 8,0 H. El precipitado se recogió por filtración y el filtrado se extrajo con AE (500 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro Na₂SO₄ y después se concentraron hasta un volumen de 150 ml. A esta mezcla a 0 °C se añadió lentamente EP (400 ml) y la suspensión resultante se filtró. El sólido combinado se recristalizó en AE-EP para dar el compuesto **C** (253 g, rendimiento 57 %) en forma de sólido blanco mate.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8,24 (s, 1 H), 7,52 (m, 2 H), 6,51 (dd, J = 1,6, 7,2 Hz, 1 H), 5,55 (m, 1 H), 4,46 (sa, 2 H), 1,45 (d, J = 6,8 Hz, 6 H). MS (ESI +) m/z: 204 (M + 1)⁺. El compuesto **C** es un intermedio clave para la síntesis del compuesto de fórmula (I). Por lo tanto, un objeto de la presente invención es también la provisión del compuesto intermedio **C**,

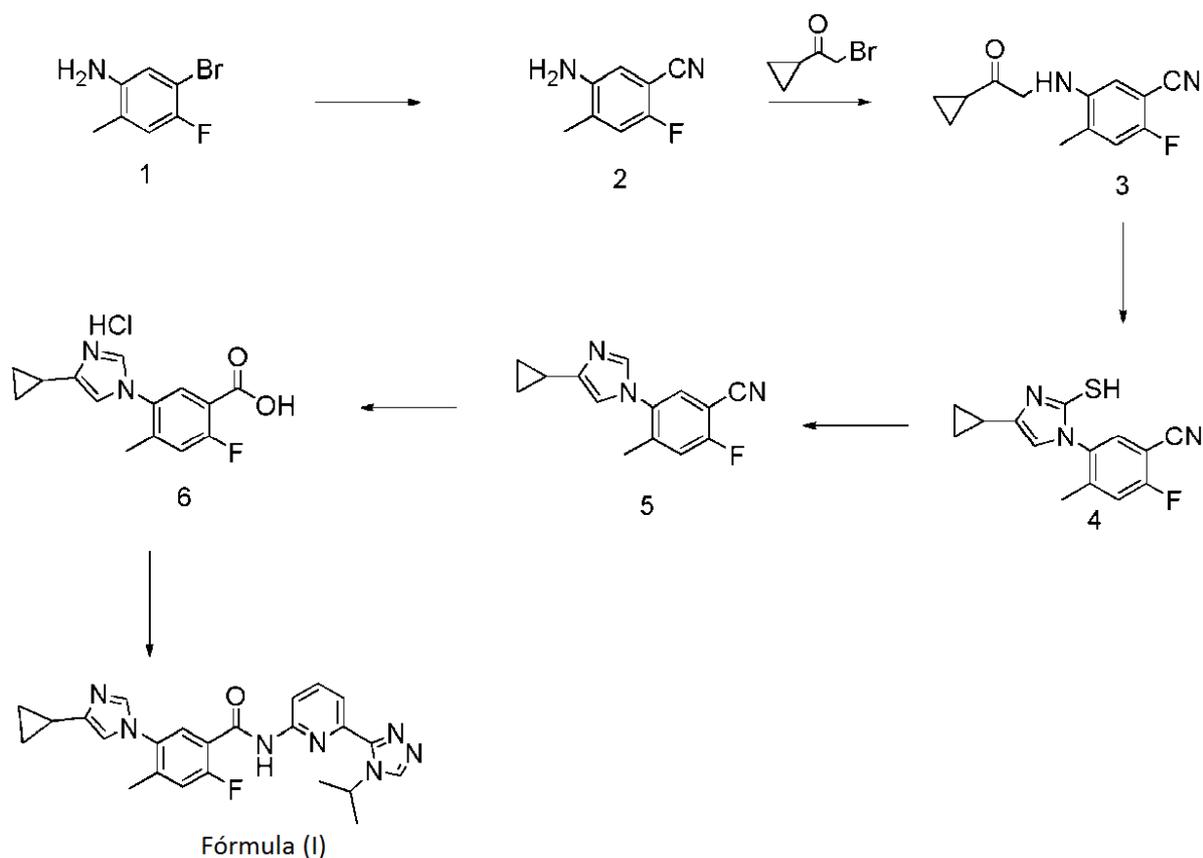


sales o formas protegidas del mismo, para la preparación del compuesto de fórmula (I). Un ejemplo de una sal del compuesto **C** es la sal de adición de HCl. Un ejemplo de una forma protegida del compuesto **C** es el compuesto de carbamato tal como el obtenido con Cbz-Cl. Los grupos protectores, su preparación y usos se enseñan en Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, Projective Groups in Organic Chemistry, 2nd edition, 1991, Wiley and Sons, Publishers.

30

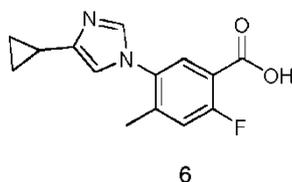
Esquema 2

Preparación del compuesto de fórmula (I) siguiente:



El compuesto 6 es un intermedio clave para la síntesis del compuesto de fórmula (I). Por lo tanto un objeto de la presente invención es también la provisión del compuesto intermedio 6,

5



sales o formas protegidas del mismo, para la preparación del compuesto de fórmula (I). Un ejemplo de una sal del compuesto 6 es la sal de adición de HCl. Un ejemplo de una forma protegida del compuesto 6 es un éster (por ejemplo, ésteres de metilo, etilo o bencilo) o el compuesto de carbamato tal como el obtenido con Cbz-Cl. Los grupos protectores, su preparación y usos se enseñan en Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, Projective Groups in Organic Chemistry, 2ª edición, 1991, Wiley y Sons, Publishers

10

Etapa 1 - Preparación de 5-amino-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo – Compuesto (2)

15

El 5-bromo-4-fluoro-2-metil-anilina (1) de partida (20 g, 98 mmol) se disolvió en 1-metilpirrolidiona anhidra (100 ml) y cianuro de cobre (I) (17,6 g, 196 mmol). La reacción se calentó a 180 °C durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se añadió agua (300 ml) e hidróxido amónico concentrado (300 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos y se extrajo con AE (3 x 200 ml). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo aceitoso se lavó con hexanos (2 x 100 ml) y el sólido se disolvió en diclorometano y se cargó en una columna de gel de sílice. La elución con 0 a 25 % de AE en gradiente de hexanos proporcionó 5-amino-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (10,06 g, 67,1 mmol). LC/MS (m/z: 151 M⁺).

20

Etapa 2 - Preparación de 5-(2-ciclopropil-2-oxoetilamino)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo - Compuesto (3)

25

Se disolvió 5-amino-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (12 g, 80 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (160 ml) en atmósfera de nitrógeno y se añadieron carbonato de potasio (13,27 g, 96 mmol) y yoduro de potasio (14,61 g, 88 mmol) en forma de sólidos con agitación. La reacción se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente y después se añadió bromometil ciclopropilcetona (20,24 ml, 180 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 3 horas, y luego los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se disolvió en AE (400 ml) y se lavó con

30

400 ml de agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se volvió a disolver en una cantidad mínima de AE y se añadieron hexanos para llevar la solución a 3:1 hexanos:AE en volumen. El producto precipitó de la solución y se recogió por filtración para proporcionar 5-(2-ciclopropil-2-oxoetilamino)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (14,19 g, 61,2 mmol). LC/MS (m/z: 233, M⁺)

5

Etapa 3 - Preparación de 5-(4-ciclopropil-2-mercapto-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo - Compuesto (4)

Se disolvió 5-(2-ciclopropil-2-oxoetilamino)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (14,19 g, 61,2 mmol) en ácido acético glacial (300 ml). Se añadió tiocianato de potasio (11,9 g, 122,4 mmol) como un sólido con agitación. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 4 horas momento en el cual el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se recogió en diclorometano (200 ml) y se lavó con 200 ml de agua. El extracto acuoso se extrajo con (2 x 200 ml) de diclorometano adicional, los extractos orgánicos se combinaron y se secaron sobre sulfato de magnesio. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo oleoso se volvió a disolver en AE (50 ml) y se añadieron 150 ml de hexanos. Al matraz se añadieron una capa oscura formada y una barra de agitación. La agitación vigorosa provocó la precipitación del producto como un sólido de color melocotón. El producto se recogió por filtración, obteniéndose el 5-(4-ciclopropil-2-mercapto-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (14,26 g, 52,23 mmol). Anal. LC/MS (m/z: 274, M⁺).

10

15

20

Etapa 4 - Preparación de 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo - Compuesto (5)

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 ml se colocó ácido acético (96 ml), agua (19 ml) y peróxido de hidrógeno (30 %, 7,47 ml, 65,88 mmol). La mezcla se calentó a 45 °C con agitación bajo nitrógeno mientras se controla la temperatura interna. A continuación se añadió 5-(4-ciclopropil-2-mercapto-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (6,00 g, 21,96 mmol), como un sólido en pequeñas porciones durante 30 minutos mientras se mantiene una temperatura interna por debajo de 55 °C. Cuando la adición de tioimidazol se completó, la reacción se agitó durante 30 minutos a una temperatura de 45 °C y después se enfrió a temperatura ambiente y se añadió lentamente una solución de sulfito de sodio al 20 % en p/p en agua (6 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se suspendió en 250 ml de agua y se añadió hidróxido de amonio acuoso 4N para llevar el pH a -10. La mezcla se extrajo en diclorometano (3 x 200 ml), los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en 20 ml de AE y se añadieron 80 ml de hexanos con agitación. Los disolventes se decantaron quedando un residuo aceitoso. Este proceso se repitió y el producto, 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo, se obtuvo como un aceite viscoso (5,14 g, 21,33 mmol) Anal. LC/MS (m/z: 242, M⁺).

25

30

35

Etapa 5 - Preparación de hidrocloreuro del ácido 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzoico (6)

El 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzonitrilo (11,21 g, 46,50 mmol) se colocó en un matraz de fondo redondo equipado con un condensador de reflujo y se suspendió en ácido clorhídrico 38 % (200 ml). La mezcla se calentó a 100 °C durante 4,5 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un sólido de color rosa, al que se añadió 100 ml de AE. El producto sólido se recogió por filtración y se lavó con 3 x 100 ml de AE. Al producto sólido se añadió 100 ml de metanol 10 % en diclorometano, la mezcla se agitó y el filtrado se recogió. Esto se repitió con 2 porciones más de 100 ml de metanol 10 % en diclorometano. Los filtrados se combinaron y el disolvente se eliminó a presión reducida, para proporcionar hidrocloreuro del ácido 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzoico. No se llevó a cabo purificación adicional (11,13 g, 37,54 mmol). Anal. LC/MS (m/z: 261, M⁺).

40

45

50

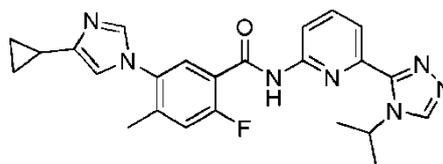
Etapa 6 - Preparación de 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-il)-4-metilbenzamida - Fórmula (I)

Se suspendió hidrocloreuro del ácido 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzoico (1,5 g, 5,07 mmol) en 1,2-diclorometano anhidro (25 ml) a temperatura ambiente. Se añadió cloruro de oxalilo (0,575 ml, 6,59 mmol) con agitación bajo nitrógeno, seguido de N,N-dimetilformamida (0,044 ml, 0,507 mmol). La mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente y después el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en 25 ml de diclorometano anhidro. Se añadieron rápidamente 6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-amina (1,13 g, 5,58 mmol) (compuesto C) y 4-dimetilaminopiridina (0,62 g, 5,07 mmol) añadido con agitación bajo nitrógeno. La reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y NaHCO₃ acuoso saturado (15 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, las capas se separaron y la capa acuosa se lavó 1 x 20 ml de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH₃CN y se añadió agua lentamente hasta que los sólidos precipitaron de la mezcla. El sólido se recogió por filtración y se secó para dar 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-il)-4-metilbenzamida con ~ 96 % de pureza (1,28 g, 2,88 mmol). Anal. LC/MS (m/z: 446, M⁺). El material se purificó adicionalmente mediante RP-HPLC (HPLC de fase inversa) para obtener una muestra analíticamente pura como la sal HCl.

55

60

65



5 $C_{24}H_{24}FN_7O \cdot HCl$. 446,2 (M+1). RMN de 1H (DMSO): δ 11,12 (s, 1H), 9,41 (s, 1H), 9,32 (s, 1H), 8,20 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,07 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 7,95 (d, J = 6,4 Hz, 1H), 7,92 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,59 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 5,72 (sept, J = 6,8 Hz, 1H), 2,29 (s, 3H), 2,00-2,05 (m, 1H), 1,44 (d, J = 6,8 Hz, 6H), 1,01-1,06 (m, 2H), 0,85-0,89 (m, 2H).

Ensayos biológicos

10 Ensayo de quinasa mediante TR-FRET de la ASK1 (Quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1) (Cl_{50} bioquímica)

15 La capacidad de los compuestos para inhibir la actividad de la quinasa ASK1 se determinó usando un ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia en tiempo resuelto [TR-FRET] biotinilado utilizando proteína básica de mielina biotinilada [biotina-MBP] como el sustrato de proteína. Se utilizó un robot de manipulación de líquidos Beckman Biomek FX para transferir 2 μ l/pocillo de compuestos en DMSO acuoso al 2,44 % en placas de polipropileno de 384 pocillos de bajo volumen [Nunc, # 267460] para dar una concentración final de entre 100 μ M y 0,5 nM en el ensayo de quinasa. Se usó un Deerac Fluidics Equator para dispensar 3 μ l/pocillo de 0,667 ng/ μ l [Upstate Biotechnologies, # 14-606 o la proteína equivalente preparada internamente] y 0,1665 ng/ml de biotina-MBP [Upstate Biotechnologies, # 13-111] en tampón (MOPS 85 mM, pH 7,0, Mg-acetato 8,5 mM, glicerol 5 %, NP-40 0,085 %, DTT 1,7 mM y BSA 1,7 mg/ml) en las placas que contienen los compuestos transferidos.

25 Se dejó preincubar la enzima con el compuesto durante 20 minutos antes de iniciar la reacción de la quinasa con la adición de 5 μ l/pocillo de ATP 300 μ M en tampón (MOPS 50 mM, pH 7,0, Mg-acetato 5 mM, DTT 1 mM, DMSO 5 %) usando el Deerac Fluidics Equator. Las reacciones de la quinasa tuvieron lugar durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se detuvieron con la adición de 5 μ l/pocillo de EDTA 25 mM usando el Deerac Fluidics Equator. A continuación, el Biomek FX se utilizó para transferir 1 μ l/pocillo de cada reacción de quinasa completada a los pocillos de una placa de poliestireno blanco OptiPlate-1536 [PerkinElmer, # 6004299] que contenía 5 μ l/pocillo de reactivos de detección (anticuerpo anti-fosfotreonina marcado con Eu-W1024 1,11 nM [PerkinElmer, # AD0094] y estreptavidina alofocianina 55,56 nM [PerkinElmer, # CR130-100] en 1x tampón de detección LANCE [PerkinElmer, # CR97-100]). A continuación, la señal de TR-FRET se leyó en un lector de placas Perkin Elmer Envision después de incubar las placas a temperatura ambiente durante 2 horas.

35 Los pocillos de control positivo de 100 % de inhibición se generaron cambiando el orden de adición de las soluciones de EDTA y ATP descritas anteriormente. Estos pocillos y los pocillos de 0 % que contenían manchas de DMSO 2,44 % al inicio del ensayo se utilizaron en el cálculo del % de inhibición de los compuestos de ensayo.

Resultado

40 El compuesto de fórmula (I) inhibió ASK1 con una Cl_{50} de 3,0 nM. Estos datos sugieren que el compuesto de fórmula (I) es un potente inhibidor de la ASK1 en presencia del ligando competitivo ATP.

45 En una versión actualizada del ensayo anterior, se examinó la actividad inhibidora del compuesto de la invención contra ASK1 usando un ensayo de TR-FRET de la ASK1 que determinó la cantidad de fosfato transferido a un sustrato peptídico a partir de ATP.

Materiales y métodos

Reactivos

50 La quinasa ASK1 humana recombinante defosforilada era de Gilead Sciences. El inhibidor de la quinasa de molécula pequeña estaurosporina (Catálogo # S6942) y ditiotreitol (DTT, catálogo # 43815-5G) se obtuvieron en Sigma Chemicals (St. Louis, MO). El ATP (catálogo # 7724) era de Affymetrix (Santa Clara, CA) y el compuesto de fórmula (I) era de Gilead Sciences. El kit HTRF KinEASE™-STK S3 se obtuvo en Cisbio (Bedford, Mass). Todos los demás reactivos eran de la más alta calidad disponible comercialmente.

Ensayos

60 El ensayo mide el nivel de fosforilación de un sustrato peptídico biotinilado por la quinasa ASK1 usando la detección HTRF (6.1). Este es un inmunoensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia en tiempo resuelto [TR-FRET], basado en el manual HTRF® KinEASE™-STK de Cisbio (6.1). El compuesto de ensayo, el

5 sustrato peptídico STK3 1µM y ASK1 quinasa 4 nM se incuban con tampón de MOP 10 mM, pH. 7,0 que contiene Mg-acetato 10 mM, NP-40 0,025 %, DTT 1 mM, BSA 0,05 % y glicerol 1,5 % durante 30 minutos y después se añade ATP 100 µM para iniciar la reacción de quinasa y se incuban durante 3 h. El anticuerpo peptídico marcado con 1X tampón Eu³⁺ Criptato que contiene EDTA 10 mM y estreptavidina XL665 125 nM se añaden para parar la reacción y el sustrato peptídico fosforilado se detectó usando un lector Envision 2.103 Multilabeled de PerkinElmer. La fluorescencia se mide a 615 nm (criptato) y a 665 nm (XL665) y se calcula una relación de 665 nm/615 nm para cada pocillo. El nivel de TR-FRET resultante (una proporción de 665 nm/615 nm) es proporcional al nivel de fosforilación. En estas condiciones de ensayo, el grado de fosforilación del sustrato peptídico era lineal con el tiempo y la concentración de la enzima. El sistema de ensayo produjo resultados consistentes con respecto a K_m y actividades específicas para la enzima. Para los experimentos de inhibición (valores CI₅₀), las actividades se realizaron con concentraciones constantes de ATP, péptido y varias concentraciones fijas de inhibidores. La estaurosporina, el inhibidor no selectivo de la quinasa, se utilizó como control positivo. Todos los datos de la actividad de la enzima se dan como un promedio de la determinación por cuadruplicado.

15 Análisis de los datos

Los valores de CI₅₀ se calcularon con la siguiente ecuación:

$$y = \text{Intervalo} / \{1 + (x/CI_{50})^s\} + \text{Fondo}$$

20 Donde x e y representan la concentración de inhibidores y la actividad de la enzima, respectivamente. La actividad enzimática se expresa como la cantidad de fosfato incorporado en el sustrato peptídico a partir de ATP. El rango es el rango máximo y (sin inhibidor, control de DMSO) y s es un factor de pendiente (6,2).

25 Resultados

El compuesto de fórmula (I) presentaba una CI₅₀ de 3,2 nM en esta condición de ensayo. Los datos demuestran que el compuesto de fórmula (I) es un potente inhibidor del receptor de la ASK-1.

30 Ensayo basado en células HEK293 de la ASK1 (quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1) (CE₅₀ celular)

35 La potencia celular de los compuestos se ensayó en células que expresan de forma estable una construcción AP-1:indicador de luciferasa (293/AP1-Luc cells - Panomics Inc., 6519 Dumbarton Circle, Fremont, CA). Las células fueron infectadas con un adenovirus que expresa la quinasa activa ASK1 (631-1381 de ADNc de ASK1 de rata), que activará el factor de transcripción AP-1 y aumenta la expresión de la luciferasa. Los inhibidores de la ASK1 disminuirán la actividad enzimática de ASK1 y por lo tanto disminuirán la actividad del factor de transcripción de AP-1 y la expresión de la luciferasa.

40 1. MATERIALES REQUERIDOS PARA ESTE PROTOCOLO

Medios y Reactivos	Compañía de origen	Nº de catálogo
AP-1 Reporter 293 Stable Cell Line	Panomics	Desconocido
DMEM (con/alta glucosa, con/sin L-glutamina, con piruvato, con HEPES)	MediaTech	15-018-CM
DMEM (con/alta glucosa, con/sin L-glutamina, con/sin piruvato, con/sin HEPES, con/sin rojo fenol)	Invitrogen	31053-028
HEPES, 1M	Invitrogen	15630-080
Piruvato de sodio, 100 mM	Invitrogen	11360-070
Suero Bovino Fetal, "SBF"	Hyclone	SH30088.03
Pen-Strep-Glut "PSG"	Invitrogen	10378-016
Higromicina B	Calbiochem	400052
PBS de Dulbecco (estéril)	MediaTech	21-030-CM
Tripsina-EDTA (0,25 %)	Invitrogen	25200-056
Sistema de ensayo de luciferasa Steady-Glo	Promega	E2550
Material de laboratorio	Fuente	Nº de catálogo
Matraces (recubiertos con poli-D-lisina, 150 cm ² , tapa ventilada)	BD Biosciences	356538
Placas (recubiertas con poli-D-lisina, de 384 pocillos, blancas/transparentes, estériles TCT)	Greiner (a través de VWR Scientific)	781944 (82051-354)
Cinta blanca	PerkinElmer	6005199

Coladores celulares (40 µm nylon, anillo azul, se adapta a viales cónicos de 50 ml)	VWR Scientific	21008-949
---	----------------	-----------

2. MATERIALES DE REFERENCIA

Prospecto del producto línea celular estable Panomics 293/AP1-Luc.

5

Prospecto del producto sistema de ensayo Promega Steady-Glo Luciferase Assay System.

3. MEDIOS NECESARIOS

10 Medio completo de crecimiento, "CGM"

DMEM (MediaTech)

SBF 10 %

PSG 1 %

Higromicina B 100 µg/ml

15 Medio de Ensayo, "AM"

DMEM (Invitrogen)

HEPES 25 mM

Piruvato sódico 1 mM

PSG 1%

20

4. MÉTODOS

Mantenimiento:

25 293/AP1-Luc Mantener las células 293/A según las instrucciones del vendedor; cosechar las células a ~ 80 % de confluencia en matraces T150 de la siguiente manera:

Aspirar los medios, lavar suavemente con ~ 12 ml de D-PBS estéril, aspirar.

Añadir 5 ml de tripsina-EDTA, inclinar suavemente para recubrir el matraz e incubar ~ 5 min. a 37 °C.

30 No dar golpes al matraz; añadir 5 ml de CGM, lavar el matraz 4X con suspensión celular, transferir a un vial cónico de 50 ml, centrifugar 5 min. a 1200 rpm.

Aspirar los medios del sedimento celular, añadir 20 ml a 30 ml de CGM, resuspender el sedimento pipeteando 6X, pasar a través de un filtro de células para dispersar los grumos (si es necesario), y contar las células con hemocitómetro.

35

Ensayo Día 1:

Cosechar las células como se explica anteriormente, con excepción de la resuspensión del sedimento celular.

40 Contar las células y diluir hasta $1,5 \times 10^5$ células por ml; añadir adenovirus, de tal modo que haya 5 unidades formadoras infecciosas por célula. Cebar (20 a 30 ml) y sembrar las células en placas de 384 pocillos recubiertos con poli-D-lisina Greiner a razón de $1,2 \times 10^4$ células por pocillo usando BioTek uFill (80 µl por pocillo). Añadir inmediatamente a las placas 0,4 µl de la serie de dosis del compuesto (en DMSO al 100 %), incubar 24 horas en incubador humidificado (37 °C, 5 % de CO₂).

45

Ensayo Día 2:

Placas de proceso (según las instrucciones del fabricante) como sigue:

50 Colocar las placas en una campana de flujo laminar y destapar durante 30 minutos a temperatura ambiente para enfriar.

Retirar 60 µl de AM de los pocillos de ensayo

Añadir 20 µl por pocillo de sustrato Steady-Glo Firefly, dejar reposar durante 10-20 minutos a temperatura ambiente

55 Cubrir la parte inferior de las placas de ensayo con cinta blanca.

Adquirir datos en un lector de placas de fluorescencia

Los pocillos de control positivo de inhibición de 100 % se generaron mediante la infección de células con un adenovirus que expresa catalíticamente el mutante de ASK1 inactivo que tiene la mutación de sustitución de lisina por arginina en el residuo 709.

60

Resultado

El compuesto de fórmula (I) exhibe una CE₅₀ de 2,0 nM.

Determinación de K_dEnsayos de quinasa

5 Las cepas de fago T7 con etiqueta quinasa se prepararon en un hospedador de E. coli derivado de la cepa BL21. E. coli se hizo crecer hasta la fase log y se infectó con fago T7 y se incubó con agitación a 32 ° C hasta la lisis. Los lisados se centrifugaron y se filtraron para eliminar los restos celulares. El resto de quinasa se produjeron en células HEK-293 y posteriormente se etiquetaron con ADN para la detección por qPCR. Las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina se trataron con ligandos de moléculas pequeñas biotiniladas durante 30 minutos a temperatura ambiente para generar resinas de afinidad para los ensayos de quinasa.

15 Las perlas con ligando se bloquearon con un exceso de biotina y se lavaron con tampón de bloqueo (SeaBlock (Pierce), (seroalbúmina bovina) 1%, Tween 20 0,05 %, DTT (ditiotreitól) 1 mM) para eliminar el ligando no unido y para reducir la unión no específica. Las reacciones de unión se ensablaron mediante la combinación de quinasa, perlas de afinidad con ligando y los compuestos de ensayo en 1x tampón de unión (SeaBlock 20 %, 0,17x PBS, Tween 20 0,05 %, DTT 6 mM). Todas las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos de poliestireno a un volumen final de 0,135 ml. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora y las perlas de afinidad se lavaron con tampón de lavado (PBS 1x, Tween 20 0,05 %). Las perlas se resuspendieron en tampón de elución (1x PBS, Tween 20 0,05 %, ligando de afinidad no biotinilado 0,5 μM) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. La concentración de quinasa en los eluidos se midió por qPCR.

Las constantes de unión (K_d) se calcularon con una curva de dosis-respuesta estándar usando la ecuación de Hill.

25 Resultado

El compuesto de fórmula (I) mostró una K_d de 0,24 nM. Estos datos sugieren que el compuesto de fórmula (I) se une potentemente al receptor ASK1 en ausencia de ATP.

30 **Determinación del porcentaje de compuesto unido al plasma**Diseño experimental:

35 En estos experimentos se usaron 1 ml de celdas de diálisis de teflón de Harvard Apparatus (Holliston, Massachusetts, EE.UU.). Antes del estudio, la membrana de diálisis se empapó durante aproximadamente una hora en tampón fosfato 0,133 M, pH 7,4. Se añadió una concentración nominal de 2 μM de compuesto a 1 ml de plasma o 1 ml de medio de cultivo celular. El volumen total de líquido en cada lado de la celda fue de 1 ml. Después de 3 horas de equilibración en un baño de agua a 37 °C, las muestras de cada lado de la celda se dividieron en partes alícuotas en los viales adecuados que contienen ya sea 1 ml de plasma humano (medio de cultivo celular) o tampón.

40 Los viales de la muestra se pesaron y se registraron. Una parte alícuota de 100 μl se eliminó y se añadió a 400 μl de solución de extinción (50 % de metanol, 25 % de acetonitrilo, 25 % de agua y patrón interno). Las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 G. Se eliminaron 200 μl del sobrenadante y sembraron en una nueva placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 μl adicionales de ACN:agua 1:1. La placa se agitó con vórtex y se sometió a análisis por LC-MS. El porcentaje no unido de un analito en plasma se calculó utilizando las siguientes ecuaciones

$$\% \text{ No unido} = 100(C_f/C_t)$$

donde C_f y C_t son las concentraciones de tampón y plasma después de la diálisis, respectivamente.

50

Resultados

El porcentaje no unido medido en el plasma humano del compuesto de fórmula (I) es 11,94 %

55 **Determinación de la relación de salida en células CACO-2**Diseño experimental:

60 Las células Caco-2 se mantuvieron en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con piruvato de sodio, Glutmax suplementado con penicilina/estreptomina 1 %, NEAA 1 % y suero bovino fetal 10 % en un incubador a 37 °C, 90 % de humedad y 5 % de CO₂. Las células Caco-2 entre el paso 62 y 72 se sembraron a 2100 células/pocillo y se cultivaron hasta confluencia durante al menos 21 días en placas de 24 pocillos de PET (tereftalato de polietileno) (BD Biosciences). El pocillo receptor contenía tampón HBSS (HEPES 10 mM, glucosa 15 mM con pH ajustado a pH 6,5) suplementado con BSA 1 % y el pH se ajustó a pH 7,4. Después de un equilibrado inicial con tampón de transporte, se leyeron los valores de TEER para demostrar la integridad de la membrana. Se añadieron tampones que contienen los compuestos de ensayo y se extrajeron 100 μl de solución 1 y 2 horas desde el compartimento

65

receptor. El tampón eliminado se sustituyó con tampón fresco y se aplicó una corrección a todos los cálculos para el material eliminado. El experimento se llevó a cabo por duplicado. Todas las muestras se recogieron inmediatamente en 400 µl de ácido acetonitrilo 100 % para precipitar la proteína y estabilizar los compuestos de ensayo. Las células se dosificaron en el lado apical o basolateral para determinar la permeabilidad directa (de A a B) e inversa (de B a A). La permeabilidad a través de un *transwell* libre de células también se determina como una medida de la permeabilidad celular a través de la membrana y la unión no específica. Para determinar la unión no específica y la inestabilidad del compuesto, se determina el porcentaje de recuperación. Las muestras se analizaron por LC/MS/MS.

10 La permeabilidad aparente, P_{ap} y el % de recuperación se calcula como sigue:

$$P_{ap} = (dR/dt) \times V_r / (A \times D_0)$$

$$\% \text{ Recuperación} = 100 \times ((V_r \times R_{120}) + (V_d \times D_{120})) / (V_d \times D_0)$$

15 donde,
 dR/dt es la pendiente de la concentración acumulativa en el compartimento receptor frente al tiempo en µM/s basado en las concentraciones del receptor medidas a 60 y 120 minutos.
 V_r y V_d es el volumen en el compartimento receptor y donante en cm³, respectivamente.
 20 A es el área de la monocapa celular (0,33 cm²).
 D_0 y D_{120} es la concentración de donante medida al principio y al final del experimento, respectivamente.
 R_{120} es la concentración de receptor en el final del experimento (120 minutos).

Absorción y clasificación de la salida:

$P_{ap} (A \text{ a } B) \geq 1,0 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$	Alta
$1,0 \times 10^{-6} \text{ cm/s} > P_{ap} (A \text{ a } B) \geq 0,5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$	Media
$P_{ap} (A \text{ a } B) < 0,5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$	Baja
$P_{ap} (B \text{ a } A) / P_{ap} (A \text{ a } B) \geq 3$	Salida significativa
% De recuperación < 20 %	Puede afectar la permeabilidad medida
P_{ap} libre de células < 15	Puede afectar la permeabilidad medida

25 Resultado

Se observó que el compuesto de fórmula (I) tenía un valor CACO A → B de 27 y un valor CACO B → A de 35, lo que da como resultado una relación de flujo de salida (B → A)/(A → B) de 1,3.

30 **Determinación de la estabilidad metabólica en la fracción microsomal hepática:**

Diseño experimental:

35 La estabilidad metabólica se evaluó tanto mediante cofactores del metabolismo oxidativo (NADPH) como de la conjugación (ácido UDP glucurónico (UDPGA)). Se añadieron alícuotas por duplicado del compuesto de fórmula (I) (3 µl de solución madre de DMSO 0,5 mM) o patrones de estabilidad metabólica (buspirona) a una solución madre de microsomas diluidos con tampón de fosfato de potasio, pH 7,4, para obtener una concentración de proteína de 1,0 mg/ml y que contiene alameticina como un agente permeabilizante. Las reacciones metabólicas se iniciaron mediante la adición de sistema de regeneración de NADPH y el cofactor UDPGA. La composición final de cada mezcla de reacción fue: compuesto de ensayo 3 µM, 1 mg de proteína microsomal/ml, UDPGA 5 mM, alameticina 23,4 µg/ml, NADP 1,25 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM, glucosa-6 fosfato deshidrogenasa 0,4 U/ml y MgCl₂ 3,3 mM en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,4. A 0, 2, 5, 10, 15, 30 45, y 60 min, se transfirieron alícuotas de 25 µl de la mezcla de reacción a placas que contienen 250 µl de IS/Q (solución de extinción que contiene patrón interno).
 45 Después de la inactivación, las placas se centrifugaron a 3000 × g durante 30 minutos y se analizaron alícuotas de 10 µl del sobrenadante mediante LC/MS para obtener las relaciones de área de pico analito/patrón interno.

La estabilidad metabólica en las fracciones microsomas se determinó midiendo la velocidad de desaparición del compuesto de fórmula (I). Los datos (% del compuesto original restante) se representaron en una escala semilogarítmica y se ajustaron utilizando un ajuste exponencial:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-K \cdot t} \quad \vee \quad T_{1/2} = \ln 2 / K$$

55 donde
 C_t % del compuesto original restante en el tiempo = t

- C₀ % del compuesto original restante en el tiempo = 0
 t Tiempo (h)
 5 K Constante de la velocidad de eliminación de primer orden (h⁻¹)
 T_{1/2} Semivida in vitro (h)

El aclaramiento hepático predicho se calculó como sigue {referencia 1):

10

$$CL_{int} = K \cdot V \cdot Y_P / P \quad \text{o} \quad CL_{int} = K \cdot V \cdot Y_H / H$$

CL_h = (CL_{int} • Q_h)/(CL_{int} + Q_h), donde

15 CL_h Aclaramiento hepático predicho (l/h/kg de peso corporal)

CL_{int} Aclaramiento hepático intrínseco (l/h/kg de peso corporal)

20 V Volumen de incubación (L)

Y_P Rendimiento de proteína microsomal (mg de proteína/kg de peso corporal)

Y_H Rendimiento de hepatocitos (millones de células/kg de peso corporal)

25 P Masa de proteína en la incubación (mg)

H Número de hepatocitos en la incubación (millones)

30 Q_h Flujo sanguíneo hepático (l/h/kg de peso corporal)

A continuación, la extracción hepática predicha se calculó por comparación del aclaramiento hepático predicho con el flujo sanguíneo hepático. Un compuesto se consideraba estable si la reducción de la concentración de sustrato era <10 % en el transcurso de la incubación (lo que corresponde a una semivida extrapolada de > 395 min en las fracciones microsomales y > 39,5 h en los hepatocitos).

35

Los valores utilizados para el cálculo del aclaramiento hepático predicho se muestran en las tablas siguientes:

Tabla 1. Valores utilizados para el cálculo del aclaramiento hepático predicho a partir de la estabilidad microsomal

Especie	Microsomos hepáticos			Q _h (L/kg)
	V (L)	P (mg)	Y (mg/kg)	
Rata	0,001	1,0	1520	4,2
Mono cinomolgo	0,001	1,0	684	1,6
Mono Rhesus	0,001	1,0	1170	2,3
Perro	0,001	1,0	1216	1,8
Ser humano	0,001	1,0	977	1,3

40

Resultado:

El aclaramiento hepático predicho en seres humanos como se determina en los experimentos *in vitro* en fracciones microsomales es 0,1 l/h/kg.

45

Determinación de la CL y V_{ss} en rata para los compuestos de ensayo

Farmacocinética de los compuestos de ensayo tras una infusión IV de 1 mg/kg y una dosis PO de 5,0 mg/kg en ratas

50 Artículo de ensayo y formulación

Para la administración IV, el compuesto de ensayo se formuló en PEG 400:agua 60:40 con 1 equivalente de HCl a 0,5 mg/ml. La formulación era una solución.

55 Para la administración PO (oral), el compuesto de ensayo se formuló en etanol/PG/solutol/agua 5/75/10/10 a 2,5 mg/ml. La formulación era una solución.

Animales utilizados

Los grupos de administración IV y PO consistía cada uno en 3 ratas macho SD. En el momento de la administración, los animales generalmente pesaban entre 0,317 y 0,355 kg. Los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche antes de la administración de la dosis y hasta 4 horas después de la administración.

Administración

En el grupo de infusión IV, el compuesto de ensayo se administraba por infusión intravenosa durante 30 minutos. La velocidad de infusión se ajustó según el peso corporal de cada animal para administrar una dosis de 1 mg/kg a 2 ml/kg. En el grupo de administración oral, el artículo de ensayo se administró por sonda oral a 2 ml/kg para una dosis de 5,0 mg/kg.

Recogida de muestras

Se extrajeron muestras de sangre venosa en serie (aproximadamente 0,4 ml cada una) en los puntos de tiempo especificados después de la administración a cada animal. Las muestras de sangre se recogieron en tubos Vacutainer™ (Becton-Disckinson Corp, Nueva Jersey, EE.UU.) que contenían EDTA como anticoagulante y se colocaron inmediatamente en hielo húmedo hasta la centrifugación del plasma.

Determinación de las concentraciones del compuesto de Fórmula (I) en plasma

Se usó un método LC/MS/MS para medir la concentración de compuesto de ensayo en plasma.

Cálculos

El análisis farmacocinético no compartimental se realizó en los datos de concentración plasmática-tiempo.

Resultados

El compuesto de fórmula (I) mostraba una CL de 0,09 l/h/kg; una biodisponibilidad oral de 75 %; $t_{1/2}$ de 5,07 h y V_{ss} de 0,55 l/kg en ratas.

Ensayo de Inhibición de Cyp

Objetivo

Evaluar el potencial del compuesto de ensayo para inhibir las principales isoformas del citocromo P450, CYP1A, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 (2 sustratos).

Determinación de la CI_{50} del citocromo P450 (8 Isoformas, 9 Sustratos)

Resumen del protocolo

El compuesto de ensayo (0,1 μ M - 25 μ M) se incubó con microsomas hepáticos humanos y NADPH en presencia de un sustrato de sonda específico de la isoforma del citocromo P450. Para las reacciones específicas de CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4, los metabolitos se controlan por espectrometría de masas. La actividad de CYP1A se controla midiendo la formación de un metabolito fluorescente. Se usa una disminución en la formación del metabolito en comparación con el vehículo control para calcular un valor de CI_{50} (concentración de compuesto de ensayo que produce una inhibición del 50 %).

Requisitos de ensayo

500 μ l de una solución de compuesto de ensayo 10 mM en DMSO.

Procedimiento experimentalInhibición de CYP1A

Se incuban seis concentraciones de compuesto de ensayo (0,1, 0,25, 1, 2,5, 10, 25 μ M en DMSO, concentración final de DMSO = 0,3 %) con microsomas de hígado humano (0,25 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda etoxiresorufina (0,5 M) durante 5 min a 37 °C. El inhibidor selectivo de CYP1A, alfa-naftoflavona, se selecciona junto con los compuestos de ensayo como un control positivo.

Inhibición de CYP2B6

Se incuban seis concentraciones de compuesto de ensayo (0,1, 0,25, 1, 2,5, 10, 25 µM en DMSO, concentración final de DMSO = 0,3 %) con microsomas de hígado humano (0,1 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda bupropiona (110 µM) durante 5 min a 37 °C. El inhibidor selectivo de CYP2B6, ticlopidina, se selecciona junto con los compuestos de ensayo como un control positivo.

5

Inhibición de CYP2C8

Se incuban seis concentraciones de compuesto de ensayo (0,1, 0,25, 1, 2,5, 10, 25 µM en DMSO, concentración final de DMSO = 0,3 %) con microsomas de hígado humano (0,25 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda paclitaxel (7,5 µM) durante 30 min a 37 °C. El inhibidor selectivo de CYP2C8, montelukast, se selecciona junto con los compuestos de ensayo como un control positivo.

10

Inhibición de CYP2C9

Se incuban seis concentraciones de compuesto de ensayo (0,1, 0,25, 1, 2,5, 10, 25 µM en DMSO, concentración final de DMSO = 0,25 %) con microsomas de hígado humano (0,1 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda tolbutamida (120 µM) durante 60 min a 37 °C. El inhibidor selectivo de CYP2C9, sulfafenazol, se selecciona junto con los compuestos de ensayo como un control positivo.

15

20 Inhibición de CYP2C19

Se incuban seis concentraciones de compuesto de ensayo (0,1, 0,25, 1, 2,5, 10, 25 µM en DMSO, concentración final de DMSO = 0,25 %) con microsomas de hígado humano (0,5 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda mefenitoína (25 µM) durante 60 min a 37 °C. El inhibidor selectivo de CYP2C19, tranilcipromina, se selecciona junto con los compuestos de ensayo como un control positivo.

25

Inhibición del CYP2D6

Se incuban seis concentraciones de compuesto de ensayo (0,1, 0,25, 1, 2,5, 10, 25 µM en DMSO, concentración final de DMSO = 0,25 %) con microsomas de hígado humano (0,5 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda dextrometorfano (5 µM) durante 5 min a 37 °C. El inhibidor selectivo de CYP2D6, quinidina, se selecciona junto con los compuestos de ensayo como un control positivo.

30

Inhibición de CYP3A4 (midazolam)

Se incuban seis concentraciones de compuesto de ensayo (0,1, 0,25, 1, 2,5, 10, 25 µM en DMSO, concentración final de DMSO = 0,26 %) con microsomas de hígado humano (0,1 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda midazolam (2,5 µM) durante 5 min a 37 °C. El inhibidor selectivo de CYP3A4, ketoconazol, se selecciona junto con los compuestos de ensayo como un control positivo.

35

40 Inhibición del CYP3A4 (testosterona)

Se incuban seis concentraciones de compuesto de ensayo (0,1, 0,25, 1, 2,5, 10, 25 µM en DMSO, concentración final de DMSO = 0,275 %) con microsomas de hígado humano (0,5 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda testosterona (50 µM) durante 5 min a 37 °C. El inhibidor selectivo de CYP3A4, ketoconazol, se selecciona junto con los compuestos de ensayo como un control positivo.

45

Para las incubaciones de CYP1A, las reacciones se terminaron con metanol y la formación del metabolito, resorufina, se monitoriza por fluorescencia (longitud de onda de excitación = 535 nm, longitud de onda de emisión = 595 nm). Para las incubaciones de CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4, las reacciones se terminaron con metanol. Las muestras se centrifugaron a continuación, y los sobrenadantes se combinan, para el análisis simultáneo por LC-MS/MS de 4-hidroxitolbutamida, 4-hidroximefenitoína, dextrofrano y 1-hidroximidazolam. La hidroxibupropiona, el 6α-hidroxi paclitaxel y la 6β-hidroxitestosterona se analizan por separado por LC-MS/MS. Se añade ácido fórmico en agua desionizada (concentración final = 0,1 %) que contiene patrón interno a la muestra final antes del análisis. Una disminución en la formación de los metabolitos en comparación con el control del vehículo se utiliza para calcular un valor de CI50 (concentración de compuesto de ensayo que produce una inhibición del 50 %).

50

55

Resultados

Isoforma CYP450	Sustrato	Metabolito	CI ₅₀ calculada
1A	Etoxi-resorufina	Resorufina	> 25 M
1A2	Fenacetina	Acetaminofeno	> 25 M
2B6	Bupropiona	Hidroxibupropiona	19,2 M
2C8	Paclitaxel	6α-Hidroxi paclitaxel	21,6 M
2C9	Tolbutamida	4-Hidroxitolbutamida	> 25 M

2C19	S-mefenitoína	4-Hidroxifenitoína	> 25 M
2D6	Dextrometorfano	Dextrorfano	17,7 M
3A4	Midazolam	Hidroximidazolam	2.7 M
3A4	Testosterona	6β-Hidroxitestosterona	10,5 M

Diseño del estudio general para el modelo de obstrucción ureteral unilateral (OUU) en rata de fibrosis renal.

5 Ratas macho Sprague-Dawley fueron alimentadas con pienso normal, se alojaron en condiciones estándar y se dejaron aclimatar durante al menos 7 días antes de la cirugía. Al inicio del estudio, las ratas se colocaron en grupos emparejados por peso y se les administró (2 ml/kg PO 2/día) mediante vehículo en la sonda oral, uno de cuatro niveles de dosis de los compuestos (1, 3, 10, o 30 mg/kg). Las ratas se anestesiaron con anestesia con isoflurano a través de un cono nasal y se realizó la laparotomía. Las ratas se sometieron a una obstrucción completa del uréter derecho (OUU) usando instrumentos esterilizados térmicamente y una técnica quirúrgica aséptica. A las ratas se les administró 50 µl de penicilina G (i.m.) inmediatamente después de la operación. Las ratas se dejaron recuperar en un jaula limpia calentada antes de ser devueltas a las condiciones normales de terrario. A las ratas se les administraron los compuestos a la dosis anteriormente descrita dos veces al día (a intervalos de 12 horas) durante los 7 días posteriores. El día 7 después de la cirugía, las ratas se anestesiaron con isoflurano y se recogió el suero, plasma y orina. Los animales fueron a continuación sacrificados, se extirparon los riñones y se realizaron biopsias de la corteza renal para análisis morfológico, histológico y bioquímico. Todos los tejidos para el análisis bioquímico se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C, los tejidos para el análisis histológico se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 %.

20 La fibrosis renal se evaluó midiendo la cantidad de colágeno IV en el riñón por un método ELISA y examinando la acumulación de miofibroblastos positivos para alfa-actina de músculo liso en el riñón por inmunohistoquímica. En el primer caso, se transfirió un trozo pequeño de corteza renal congelada homogenizada en tampón RIPA y después se centrifugó a 14.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió en tubos pre-refrigerados y se determinó la concentración de proteína. Una cantidad equivalente de proteína total se sometió a un ensayo de ELISA Col IV (Exocell) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 Se tiñó tejido renal fijado con formol y embebido en parafina con una alfa-actina de músculo liso como se ha descrito previamente (Stambe et al., The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Renal Fibrosis J Am Soc Nephrol 15: 370-379, 2004).

30 Resultados:

Se observó que el compuesto de fórmula (I) reducía significativamente la inducción de colágeno IV renal (Figura 1) y la acumulación de miofibroblastos positivos para alfa-actina de músculo liso (Figura 2) a dosis de 3 a 30 mg/kg.

35 Datos comparativos para el Compuesto de Fórmula (I) y compuestos de referencia

40 La siguiente tabla proporciona los resultados comparativos para el compuesto de fórmula (I) y los compuestos de referencia A y B divulgados en la Solicitud de Patente de los EE.UU. Nº 2001/00095410A1, publicada el 13 de enero de 2011. Los solicitantes señalan que los experimentos para los que se compararon los resultados a continuación se realizaron en condiciones similares, pero no necesariamente de forma simultánea.

Tabla

	Compuesto de fórmula (I)	Compuesto A	Compuesto B
Cl ₅₀ (nM)	3	5	6,5
CE ₅₀ (nM)	2	3,4	18 (9X)
CE ₅₀ UPaj (nM)	17	71 (4X)	563 (33X)
CACO (A/B, B/A)	27/35	3,1/18,5	0,26/4
Relación de flujo de salida (B/A)/(A/B)	1,3	6,0	15,4
fu	12	4,8	3,2
CYP3A4 Cl ₅₀ Testosterona (TST) (µM)	11	1,1 (10X)	4 (2,8X)
Cl ₅₀ de CYP3A4/CE ₅₀ UPaj	647	15 (43x)	7 (92X)
Vss (l/kg) en ratas	0,55	0,17 (3,2X)	0,54
CL (l/h/kg) en ratas	0,11	0,30 (2,7X)	0,39 (3,6X)

ES 2 558 203 T3

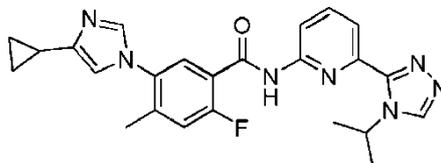
% F en ratas	75	11 (6,8x)	50 (1,5X)
t ½ en ratas (h)	5,07	0,59 (8,6x)	1,3 (3,9x)
() los valores entre paréntesis representan el número de veces que el compuesto de fórmula (I) muestra una mejora sobre el compuesto indicado para el parámetro indicado.			

A continuación se puede deducir de los datos comparativos lo siguiente:

- 5 El compuesto de fórmula (I) tiene una CE₅₀ que es comparable a la del compuesto A.
 El compuesto de fórmula (I) tiene una CI₅₀ funcional que es comparable a la CI₅₀ para los compuestos A y B.
- El compuesto de fórmula (I) tiene una CE₅₀ ajustada para unión a proteínas que es 4 veces inferior a la del compuesto A y 33 veces inferior a la del compuesto B.
- 10 El compuesto de fórmula (I) es un inhibidor de CYP3A4 más débil en comparación con los compuestos A y B.
- El compuesto de Fórmula (I) tiene un valor de CI₅₀ de CYP3A4/CE₅₀ UPaj. que es 43 veces mayor que el del compuesto de fórmula A y 92 veces mayor que para el compuesto de fórmula B.
- 15 El compuesto de fórmula (I) tiene un valor CL en rata que es de 2,7 veces menor que el del compuesto de fórmula A y 3,6 veces menor que el del compuesto de fórmula B.
- El compuesto de fórmula (I) tiene un porcentaje de biodisponibilidad en ratas que es 6,8 veces mayor que el del compuesto A y 1,5 veces mayor que el del compuesto B.
- 20 El compuesto de fórmula (I) tiene una semivida en ratas que es 8,6 veces más larga que la del compuesto A y 3,9 veces más larga que la del compuesto B.
- 25 Los datos anteriores sugieren que el compuesto de fórmula (I) tiene unas propiedades inesperadas y ventajosas en comparación con los compuestos de fórmula A y B y que el compuesto de fórmula (I) es probablemente un mejor candidato para el posterior desarrollo para el tratamiento de la nefropatía crónica, la fibrosis pulmonar y/o renal y/o las enfermedades cardio-renales.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)

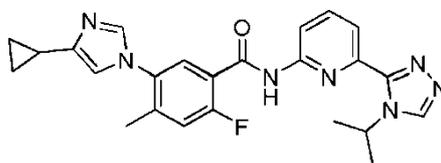


(I)

5

concretamente, 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-il)-2-fluoro-4-metilbenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 2. El compuesto de fórmula (I)



(I)

15

concretamente, 5-((4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-N-(6-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)piridin-2-il)-4-metilbenzamida.

3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o de la sal de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 4. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la nefropatía crónica.

25

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la nefropatía diabética

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la fibrosis renal, la fibrosis hepática o la fibrosis pulmonar

30

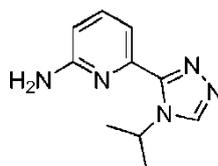
8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la nefropatía diabética.

35 9. El compuesto o la sal de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la nefropatía crónica.

10. El compuesto o la sal de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en terapia.

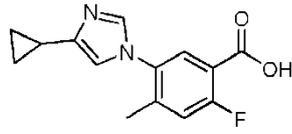
11. Un compuesto intermedio de fórmula:

40



concretamente, 2-amino, 5-(4-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il) piridina o una sal o una forma protegida del mismo

45 12. Un compuesto intermedio de fórmula



concretamente, ácido 5-(4-ciclopropil-1H-imidazol-1-il)-2-fluoro-4-metilbenzoico, una sal o una forma protegida del mismo.

5

Figura 1

Proteína del colágeno IV de riñón

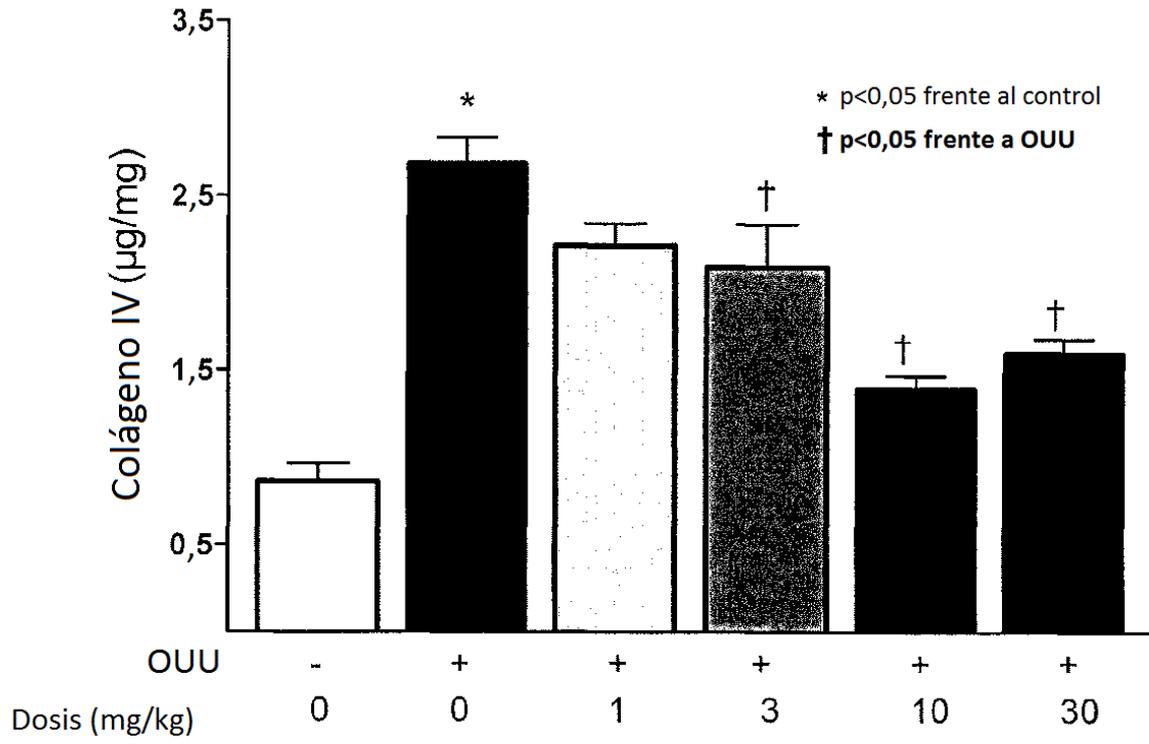


Figura 2

