

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 047**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/275** (2006.01)

**A61K 31/4164** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61K 31/277** (2006.01)

**A61K 31/4174** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2009 PCT/US2009/030771**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2009 WO09089545**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2009 E 09701279 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2252283**

54 Título: **Triterpenoides sintéticos y métodos de uso en el tratamiento de la enfermedad**

30 Prioridad:

**11.01.2008 US 20624 P**

**28.10.2008 US 109114 P**

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

**27.06.2019**

73 Titular/es:

**REATA PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**

**2801 Gateway Drive, Suite 150**

**Irving, TX 75063, US y**

**TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SPORN, MICHAEL;**

**LIBY, KAREN;**

**GRIBBLE, GORDON W.;**

**HONDA, TADASHI;**

**KRAL, ROBERT M. y**

**MEYER, COLIN J.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 718 047 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

Triterpenoides sintéticos y métodos de uso en el tratamiento de la enfermedad

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere generalmente a los campos de la biología y medicina. Más particularmente, se trata de un compuesto para usar en métodos para mejorar la función renal (riñón) y/o para tratar la enfermedad renal/riñón (RKD).

**Descripción de la técnica relacionada**

10 El fallo renal, que da lugar a un aclaramiento inadecuado de los productos metabólicos de deshecho de la sangre y a concentraciones anormales de electrolitos en la sangre, es un problema médico importante en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados. La diabetes y la hipertensión se encuentran entre las causas más importantes del fallo renal crónico, también conocida como enfermedad renal crónica (ERC), pero también se asocia con otras afecciones como lupus o enfermedad cardiovascular sistémica. La disfunción del endotelio vascular generalmente ocurre en tales afecciones y se cree que es un factor importante que contribuye al desarrollo de la enfermedad renal crónica. El fallo renal agudo puede surgir de la exposición a ciertos fármacos (*p. ej.*, acetaminofeno) o productos químicos tóxicos o por lesión de isquemia-reperfusion asociada con un shock o procedimientos quirúrgicos como trasplante, y en última instancia puede dar lugar a ERC. En muchos pacientes, la ERC avanza hacia la etapa final de la enfermedad renal (ESRD) en la que el paciente requiere trasplante renal o diálisis habitual para seguir viviendo. Ambos procedimientos son sumamente invasivos y asociados con efectos secundarios significativos y problemas de calidad de vida. Aunque existen tratamientos eficaces para algunas complicaciones del fallo renal, como el hiperparatiroidismo y la hiperfosfatemia, no se ha demostrado que el tratamiento disponible detenga o revierta la progresión subyacente de fallo renal.

Los triterpenoides, biosintetizados en plantas por la ciclación del escualeno, se usan con fines medicinales en muchos países asiáticos; y se sabe que algunos, como los ácidos ursólico y oleanólico, son antiinflamatorios y anticancerígenos (Huang *et al.*, 1994; Nishino *et al.*, 1988). Sin embargo, la actividad biológica de estas moléculas naturales es relativamente débil y, por lo tanto, se emprendió la síntesis de nuevos análogos para mejorar su potencia (Honda *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1998). Un esfuerzo en curso para mejorar la actividad antiinflamatoria y antiproliferativa de los análogos del ácido oleanólico y ursólico dio lugar al descubrimiento del ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-óico (CDDO) y compuestos relacionados (Honda *et al.*, 1997, 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2002; Suh *et al.*, 1998; 1999; 2003; Place *et al.*, 2003; Liby *et al.*, 2005). Se identificaron varios derivados potentes del ácido oleanólico, que incluyen el ácido metil-2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9-dien-28-óico (CDDO-Me; RTA 402). El RTA 402 suprime la inducción de varios mediadores inflamatorios importantes, como iNOS, COX-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en macrófagos inactivados. También se ha informado que el RTA 402 activa la vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE lo que da lugar a la producción de varias proteínas antiinflamatorias y antioxidantes, como hemo oxigenasa-1 (HO-1). Estas propiedades han convertido al RTA 402 en un candidato para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y proliferativas, como el cáncer. La capacidad de este compuesto y moléculas relacionadas para tratar y/o prevenir la enfermedad renal y la enfermedad cardiovascular aún no se ha probado.

El documento WO 2007/005879 informa que ratones knock-out *nrf2* padecen una variedad de sensibilidades aumentadas, por ejemplo, aumentada susceptibilidad al enfisema inducido por humo de cigarrillo y otras enfermedades relacionadas con los pulmones. El documento WO 2007/005879 propone aumentar la actividad biológica o la expresión de Nrf2 para el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo. Los compuestos contemplados para ser usados como agentes activadores de Nrf2 en este contexto son, entre otros, CDDO-Im y CDDO.

El documento WO 2005/042002 informa, por ejemplo, la inhibición de la actividad FLIP (proteína inhibidora de FLICE) usando oligonucleótidos antisentido. Se proponen métodos para tratar la artritis reumatoide y sus síntomas disminuyendo la actividad de FLIP usando una proteína, ácido nucleico o molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas para usar por esta publicación incluyen ciclohexamida, actinomicina D, 5-fluorouracilo, doxorubicina, cisplatino, butirato sódico, bisindolilmaleimidias, H7, calfostina C, cloruro de queleritrina, CDDO y PS-341.

Shin *et al.* (Mol. Cell Biol. 2007 Oct; 27(20): 7188-7197) informa que NRF2 regula la expresión del receptor de aril-hidrocarburo (AHR), posteriormente modula varios eventos corriente debajo de la cascada de señalización de AHR, que incluyen (i) control transcripcional de los genes del metabolismo xenobiótico *Cyp1a1* y *Cyp1b1* y (ii) inhibición de la adipogénesis en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Se ha informado que CDDO-Im induce Ahr en fibroblastos embrionarios de ratón *Nfr2<sup>+/+</sup>*, pero no en MEFs *Nfr2<sup>-/-</sup>*. Los autores especulan que se pueden usar los activadores NRF2 para influir en la adipogénesis.

55 El documento WO 2006/029221 describe compuestos triterpenoides con, entre otras, actividad anticancerígena. Los compuestos son obtenibles a partir de plantas de la familia sapindaceae, como *Xanthoceras sorbifolia*, otras fuentes naturales o síntesis química.



variaciones, el compuesto se dispersa en un liposoma, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.

5 En algunas realizaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 25 mg del compuesto. En otras variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 75 mg del compuesto. En aún otras variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 150 mg del compuesto. En variaciones adicionales, la dosis diaria es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 30 mg del compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 20 mg del compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 15 mg del compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg del compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg del compuesto.

15 En algunas realizaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz es una dosis diaria de 0,01 a 25 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,05-20 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,1-10 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,1-5 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,1-2,5 mg de compuesto por kg de peso corporal.

20 En algunas realizaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz se administra en una única dosis al día. En algunas realizaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz se administra en dos o más dosis al día.

En algunas realizaciones, el método de tratamiento comprende además una segunda terapia. En algunas variaciones, la segunda terapia comprende administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un segundo fármaco. En algunas realizaciones, el segundo fármaco es un fármaco que baja el colesterol, un anti-hiperlipidémico, un bloqueante del canal de calcio, un anti-hipertensivo o un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. Ejemplos no limitantes de segundos fármacos son amlodipino, aspirina, ezetimiba, felodipino, lacidipino, lercanidipino, nicardipino, nifedipino, nimodipino, nisoldipino y nitrendipino. Ejemplos no limitantes adicionales de segundos fármacos son atenolol, bucindolol, carvedilol, clonidina, doxazosina, indoramina, labetalol, metildopa, metoprolol, nadolol, oxprenolol, fenoxibenzamina, fentolamina, pindolol, prazosin, propranolol, terazosina, timolol y tolazolina. En algunas variaciones, el segundo fármaco es una estatina. Ejemplos no limitantes de estatinas son atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4). Ejemplos no limitantes de inhibidores de DPP-4 son sitagliptina, vidagliptina, SYR-322, BMS 477118 y GSK 823093. En algunas variaciones, el segundo fármaco es una biguanida. Por ejemplo, la biguanida puede ser metformina. En algunas variaciones, el segundo fármaco es una tiazolidinediona (TZD). Ejemplos no limitantes de TZDs son pioglitazona, rosiglitazona y troglitazona. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un derivado de sulfonilurea. Ejemplos no limitantes de derivados de sulfonil urea son tolbutamida, acetohexamida, tolazamida, cloropropamida, glipizida, gliburida, glimepirida y gliclazida. En algunas variaciones, el segundo fármaco es una meglitinida. Ejemplos no limitantes de meglitinidas incluyen repaglinida, mitiglinida y nateglinida. En algunas variaciones, el segundo fármaco es insulina. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un inhibidor de alfa-glucosidasa. Ejemplos no limitantes de inhibidores de alfa-glucosidasa son acarbosa, miglitol y voglibosa. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un análogo del péptido-1 de tipo glucagón. Ejemplos no limitantes de análogos de péptido-1 de tipo glucagón son exenatida y liraglutida. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un análogo del péptido inhibidor gástrico. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un agonista de GPR40. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un agonista de GPR119. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un agonista de GPR30. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un activador de la glucoquinasa. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un antagonista del receptor de glucagón. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un análogo de amilina. Un ejemplo no limitante de un análogo de amilina es pramlintida. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un antagonista del receptor de IL-1 $\beta$ . Un ejemplo no limitante de antagonista del receptor de IL-1 $\beta$  es anakinra. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un antagonista o agonista inverso del receptor de endocannabinoides. Un ejemplo no limitante de antagonista o agonista inverso del receptor de endocannabinoides es rimonabant. En algunas variaciones, el segundo fármaco es Orlistat. En algunas variaciones, el segundo fármaco es Sibutramina. En algunas variaciones, el segundo fármaco es un factor de crecimiento. Ejemplos no limitantes de factores de crecimiento son TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 1.2, VEGF, factor de crecimiento I o II de tipo insulina, BMP2, BMP4, BMP7, un análogo de GLP-1, un análogo de GIP, un inhibidor de DPP-IV, un agonista GPR119, un agonista GPR40, gastrina, EGF, betacelulina, KGF, NGF, insulina, hormona del crecimiento, HGF, un FGF, un homólogo de FGF, PDGF, Leptina, prolactina, lactógeno de la placenta, PTHrP, activina, inhibina e INGAP. Ejemplos no limitantes adicionales de factores de crecimiento son hormona paratiroidea, calcitonina, interleucina-6 e interleucina-11.

En algunas realizaciones, el sujeto es un primate. En algunas variaciones, el primate es un ser humano. En otras variaciones, el sujeto es una vaca, caballo, perro, gato, cerdo, ratón, rata o cobaya.

60 En algunas realizaciones, al menos una porción del CDDO-Me está presente como una forma polimérica, en donde la forma polimérica es una forma cristalina que tiene un patrón de difracción de rayos-X (CuK $\alpha$ ) que comprende picos de

difracción significativos a aproximadamente 8,8, 12,9, 13,4, 14,2 y 17,4°2 $\theta$ . En ejemplos no limitantes, el patrón de difracción de rayos-X (CuK $\alpha$ ) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 12A o la FIG. 12B. En otras variaciones, al menos una porción del CDDO-Me está presente como una forma polimórfica, en donde la forma polimórfica es una forma amorfa que tiene un patrón de difracción de rayos-X (CuK $\alpha$ ) con un pico en halo a aproximadamente 13,5 2 $\theta$ , sustancialmente como se muestra en la FIG. 12C y una T<sub>g</sub>. En algunas variaciones, el compuesto es una forma amorfa. En algunas variaciones, el compuesto es una forma sólida cristalina de CDDO-Me, que tiene un patrón de difracción de rayos-X en polvo con un pico en halo a aproximadamente 13,5 2 $\theta$ , como se muestra en la FIG. 12C y una T<sub>g</sub>. En algunas variaciones, el valor de T<sub>g</sub> cae dentro de un intervalo de aproximadamente 120°C a aproximadamente 135°C. En algunas variaciones, el valor de T<sub>g</sub> es de aproximadamente 125°C a aproximadamente 130°C.

En algunas variaciones de los métodos anteriores, el compuesto está sustancialmente libre de isómeros ópticos del mismo. En algunas variaciones de los métodos anteriores, el compuesto está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otras variaciones de los métodos anteriores, el compuesto no es una sal.

En algunas realizaciones, el compuesto se formula como una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto y (ii) un excipiente seleccionado del grupo que consiste en (A) un carbohidrato, derivado de carbohidrato o polímero de carbohidrato, (B) un polímero orgánico sintético, (C) una sal de ácido orgánico, (D) una proteína, polipéptido o péptido, y (E) un polisacárido de alto peso molecular. En algunas variaciones, el excipiente es un polímero orgánico sintético. En algunas variaciones, el excipiente se selecciona del grupo que consiste en una hidroxipropil metil celulosa, un poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno] o copolímero de éste y un copolímero de ácido metacrílico- metacrilato. En algunas variaciones, el excipiente es éster de hidroxipropil metil celulosa ftalato. En algunas variaciones, el excipiente es PVP/VA. En algunas variaciones, el excipiente es un copolímero de ácido metacrílico- etil acrilato (1:1). En algunas variaciones, el excipiente es copovidona.

Cualquier realización discutida en esta memoria con respecto a un aspecto de la invención se aplica también a otros aspectos de la invención, a menos que se indique específicamente.

#### Breve descripción de las figuras

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en esta memoria.

FIGS. 1a-d – RTA 402 reduce el daño renal después de la isquemia-reperfusión. Se les administró a los ratones RTA 402 a 2 mg/kg o simplemente el vehículo (aceite de sésamo) diariamente por sonda oral empezando el Día 2. En el Día 0, se colocó una pinza en la arteria renal izquierda durante 17 minutos y luego se retiró para inducir isquemia-reperfusión. (FIG. 1a) En el Día 1, se recogió sangre de animales que se sometieron al pinzamiento y animales control “simulados” que se sometieron a cirugía sin pinzamiento de la arteria renal. Se midieron los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) como un sustituto del daño renal. (FIGS. 1b-d) Se puntuaron las secciones de riñones de ratones tratados con RTA 402 o tratados con vehículo para determinar el daño histológico (FIGS. 1b & 1d) y la inflamación (FIG. 1c). (FIG. 1d) Las flechas negras (grupo del vehículo) muestran dos de los numerosos túbulos gravemente dañados en la médula externa. Las flechas rojas (grupo de RTA 402) muestran dos de los numerosos túbulos no dañados en la médula externa.

FIGS. 2a-c – RTA 402 reduce la toxicidad renal inducida por cisplatino. Se les administró a las ratas RTA 402 a 10 mg/kg o simplemente el vehículo (aceite de sésamo) todos los días por sonda oral empezando en el Día -1. En el Día 0, las ratas recibieron una inyección intravenosa de cisplatino a 6 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre en los días indicados y se midieron los niveles de creatinina (FIG. 2a) y de nitrógeno ureico en sangre (BUN) (FIG. 2b) como marcadores del daño renal. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con vehículo y el tratado con RTA 402 en el Día 3 (creatinina) y en el Día 5 (creatinina y BUN). (FIG. 2c). Se observa menos daño en los tubos proximales en animales tratados con RTA 402 en comparación con animales tratados con vehículo.

FIGS. 3a-d – RTA 402 reduce los niveles de creatinina sérica en monos, perros y ratas. (FIG. 3a) Se les administró a monos *Cynomolgus* RTA 402 por vía oral a las dosis indicadas una vez al día durante 28 días. Se muestra el porcentaje de reducción de creatinina sérica en el Día 28 en monos tratados con RTA 402 en relación con monos control tratados con vehículo. (FIG. 3b) Se administró por vía oral RTA 402 a perros Beagle a las dosis indicadas diariamente durante tres meses. Los animales control recibieron vehículo (aceite de sésamo). Se muestra el porcentaje de cambio en la creatinina sérica en el punto temporal de tres meses en relación con la línea de base. (FIG. 3c) Se les administró a ratas Sprague-Dawley RTA 402 por vía oral a las dosis indicadas una vez al día durante un periodo de un mes. Se muestra el porcentaje de reducción de la creatinina sérica al finalizar el estudio en ratas tratadas con RTA 402 en relación con las ratas de control tratadas con vehículo. Nota: en las FIGS. 3A, 3C y 3D, el “% de reducción” en el eje vertical indica el porcentaje de cambio. Por ejemplo, una lectura de -15 en este eje indica una reducción del 15% en la creatinina sérica.

FIGS. 4A-B – RTA 402 reduce los niveles de creatinina sérica y aumenta la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) en pacientes humanos con cáncer. FIG. 4A: Se midió la creatinina sérica en pacientes tratados con RTA 402

- inscritos en un ensayo clínico de Fase I para el tratamiento del cáncer. Se les administró a los pacientes RTA 402 (p.o.) una vez al día durante 21 días en dosis que variaron de 5 a 1.300 mg/día. Se muestra el porcentaje de reducción de la creatinina sérica en relación con los niveles basales para los días de estudio indicados. Se observaron disminuciones significativas en los niveles de creatinina sérica en los Días 15 y 21. FIG. 4B: Se calculó la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) para los pacientes en la FIG. 4A. Se observaron mejoras significativas en eGFR en ambos grupos. Todos los pacientes: n=24; pacientes con línea de base  $\geq 1,5$ : n=5. Para las FIGS. 4A y 4B, \* indica  $p \leq 0,04$ ; † indica  $p = 0,01$  y ‡ indica  $p \leq 0,01$ . Nota: en la FIG. 4A, el “% de reducción a partir de la Línea de Base” en el eje vertical indica el porcentaje de cambio. Por ejemplo, una lectura de -15 en este eje indica una reducción del 15% en la creatinina sérica.
- FIG. 5 – RTA 402 incrementa la GFR en pacientes humanos con cáncer. Se midió la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) en pacientes tratados con RTA 402 inscritos en un ensayo clínico de varios meses para el tratamiento del cáncer. Se incluyeron en el análisis todos los pacientes (n = 11) que recibieron dosis de hasta seis meses. La información de dosificación para estos pacientes se proporciona en el Ejemplo 5, a continuación.
- FIG. 6 – La actividad de RTA 402 se correlaciona con la gravedad. La reducción de la hemoglobina A1c se presenta como una fracción del valor de línea de base inicial. Los grupos con líneas de base más altas, p. ej., línea de base media  $\geq 7,0\%$  de A1c o  $\geq 7,6\%$  de A1c, mostraron una mayor reducción. El grupo de intención-de-tratar (ITT) incluye todos los pacientes (n = 53), que incluye aquellos que comienzan en un valor de A1c normal.
- FIG. 7 – La actividad de RTA 402 es dependiente de la dosis. Se presenta la reducción de la hemoglobina A1c en relación con el valor de línea de base inicial. El gráfico de barras muestra los resultados medios para todos los pacientes, todos los pacientes con valores de A1c de línea de base  $\geq 7,0\%$ , cohortes de dosis individuales a partir del grupo  $\geq 7,0\%$  y pacientes con enfermedad renal en la Etapa 4 (GFR de 15-29 ml/min), en donde n es el número de pacientes en cada grupo.
- FIG. 8. - RTA 402 reduce las células endoteliales circulantes (CECs) y las CESs positivas para iNOS. Se muestra el cambio en el número medio de CEC en células/ml para los grupos de intención-de-tratar (ITT) y con línea de base elevada, tanto antes como después del tratamiento de 28 días con RTA. La reducción para el grupo de intención-de-tratar fue de aproximadamente 20%, y la reducción en el grupo de línea de base elevada ( $>5$  CECs/ml) fue de aproximadamente 33%. La fracción de CECs positivas para iNOS se redujo aproximadamente el 29%.
- FIG. 9 – Aumento de GFR dependiente de la dosis reversible en 28 días. El tratamiento con RTA 402 aumenta la GFR de forma dependiente de la dosis. Se incluyeron todos los pacientes evaluables. Se observó una mejoría de  $> 30\%$  en pacientes con enfermedad renal en la Etapa 4.
- FIGS. 10A-B – Reducción de marcadores de gravedad y resultado de la nefropatía diabética. Mejoras en la Adiponectina (FIG. 10A) y Angiotensina II (FIG. 10B), que están elevadas en pacientes con nefropatía diabética (DN) y que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad renal. La adiponectina predice la mortalidad por todas las causas y la enfermedad renal en la etapa final en pacientes con DN. Se incluyen todos los datos disponibles.
- FIGS. 11A-C – RTA 402 reduce significativamente los solutos urémicos. Los gráficos presentan los cambios medios en BUN (FIG. 11A), fósforo (FIG. 11B) y ácido úrico (FIG. 11C) para todos los pacientes y para aquellos pacientes que muestran valores iniciales elevados de un soluto particular.
- FIGS. 12A-C – Espectros de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de las formas A y B de RTA 402. La FIG. 12A muestra la Forma A no micronizada; la FIG. 12B muestra la Forma A micronizada; la FIG. 12C muestra la Forma B.
- FIG. 13 – Curva de calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) de la Forma A de RTA 402. La sección de la curva que se muestra en la vista ampliada es consistente con una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).
- FIG. 14 – Curva de calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) de la Forma B de RTA 402. La sección de la curva que se muestra en la vista ampliada es consistente con una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).
- FIG. 15 – Mejorada biodisponibilidad de la Forma B (amorfa) en monos Cynomolgus. La figura muestra un gráfico representativo del área bajo la curva para la Forma A y la Forma B, después de una administración oral de 4,1 mg/kg a monos cynomolgus. Cada punto de datos representa la concentración plasmática media de éster metílico de CDDO en 8 animales. Las barras de error representan la desviación estándar dentro de la población muestreada.

### Descripción de realizaciones ilustrativas

#### 1. La presente invención

- La presente invención se refiere a un compuesto para usar en métodos para el tratamiento y prevención de la enfermedad renal.

#### III. Definiciones

Los átomos que forman los compuestos para usar de acuerdo con la presente invención pretenden incluir todas las

- formas isotópicas de dichos átomos. Los isótopos, como se usan en esta memoria, incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio, y los isótopos de carbono incluyen  $^{13}\text{C}$  y  $^{14}\text{C}$ . Del mismo modo, se contempla que puedan ser reemplazados uno o más átomo(s) de carbono de un compuesto por un átomo(s) de silicio.
- 5 Del mismo modo, se contempla que puedan ser reemplazados uno o más átomo(s) de oxígeno de un compuesto por un átomo(s) de azufre o selenio.
- Cualquier valencia no definida en un átomo de una estructura mostrada en esta solicitud representa implícitamente un átomo de hidrógeno unido al átomo.
- 10 El uso de la palabra “un” o “una”, cuando se usa junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.
- A lo largo de esta aplicación, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente del error para el dispositivo, siendo el método empleado para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.
- 15 Los términos “comprender”, “tener” e “incluir” son verbos de enlace abiertos. Cualquier forma o tiempos verbales de uno o más de estos verbos, como “comprende”, “que comprende”, “tiene”, “que tiene”, “incluye” y “que incluye” son también abiertos. Por ejemplo, cualquier método que “comprende”, “tiene” o “incluye” una o más etapas no se limita a poseer solamente aquellas una o más etapas y también abarca otras etapas no enumeradas.
- 20 El término “eficaz”, ya que ese término se usa en la especificación y/o reivindicaciones, significa que es adecuado para lograr un resultado deseado, esperado o interesado.
- El término “hidrato” cuando se usa como modificador de un compuesto significa que el compuesto tiene menos de una (*p. ej.*, hemihidrato), una (*p. ej.*, monohidrato) o más de una (*p. ej.*, dihidrato) moléculas de agua asociadas con cada molécula componente, como en formas sólidas del compuesto.
- 25 Como se usa en esta memoria, el término “IC<sub>50</sub>” se refiere a una dosis inhibidora que es el 50% de la respuesta máxima obtenida.
- Un “isómero” de un primer compuesto es un compuesto separado en el que cada molécula contiene los mismos átomos constituyentes que el primer compuesto, pero donde difiere la configuración de esos átomos en tres dimensiones.
- 30 Como se usa en esta memoria, el término “paciente” o “sujeto” se refiere a un organismo mamífero vivo, como un ser humano, mono, vaca, oveja, cabra, gato, ratón, cobaya o especies transgénicas de los mismos. En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto es un primate. Ejemplos no limitantes de sujetos humanos son adultos, jóvenes, niños y fetos.
- “Farmacéuticamente aceptable” significa aquello que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y no deseable ni biológicamente ni de otra manera e incluye aquella que es aceptable para uso veterinario así como para uso farmacéutico en seres humanos.
- 35 “Sales farmacéuticamente aceptables” significan sales de compuestos para usar de acuerdo con la presente invención que son farmacéuticamente aceptables, como se definió anteriormente, y que posean la actividad farmacológica deseada. Dichas sales incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o con ácidos orgánicos como ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido 4,4'-metileno-bis(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 4-metilbencilo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido acético, ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos sulfúricos alifáticos, ácidos sulfúricos aromáticos, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido canforsulfónico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido etanosulfónico, ácido fumárico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido hidroxinaftoico, ácido láctico, ácido laurilsulfúrico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido mucónico, ácido *o*-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido oxálico, ácido *p*-clorobencenosulfónico, ácidos alcanico fenil-sustituidos, ácido propiónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido terciariobutilacético, ácido trimetilacético y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición de bases que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido sódico, carbonato sódico, hidróxido potásico, hidróxido de aluminio e hidróxido cálcico. Bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, *N*-metilglucamina y similares. Debe reconocerse que el anión o catión particular que forma parte de cualquier sal de esta invención no es crítico, siempre que la sal, en su totalidad, sea farmacológicamente aceptable. Ejemplos adicionales de sales farmacéuticamente aceptables y sus métodos de preparación y uso se presentan en Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002).
- 55

5 “Prevención” o “que previene” incluye: (1) inhibir la aparición de una enfermedad en un sujeto o paciente que pueda estar en riesgo y/o predispuesto a la enfermedad pero aún no experimenta o muestra ninguna o toda la patología o sintomatología de la enfermedad, y/o (2) ralentizar la aparición de la patología o sintomatología de una enfermedad en un sujeto o paciente que pueda estar en riesgo y/o predispuesto a la enfermedad pero aún no experimenta o muestra ninguna o toda la patología o sintomatología de la enfermedad.

El término “saturado” cuando se refiere a un átomo significa que el átomo está conectado a otros átomos solo a través de enlaces simples.

10 Un “estereoisómero” o “isómero óptico” es un isómero de un compuesto dado en el que los mismos átomos están unidos a los otros mismos átomos, pero donde difiere la configuración de esos átomos en tres dimensiones. Los “enantiómeros” son estereoisómeros de un compuesto dado que son imágenes especulares entre sí, como las manos izquierda y derecha. Los “diastereoisómeros” son estereoisómeros de un compuesto dado que no son enantiómeros.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” significa aquella cantidad que, cuando se administra a un sujeto o paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad.

15 “Tratamiento” o “que trata” incluye (1) inhibir una enfermedad en un sujeto o paciente que experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad (*p. ej.*, detener el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología), (2) mejorar una enfermedad en un sujeto o paciente que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad (*p. ej.*, revertir la patología y/o sintomatología) y/o (3) efectuar cualquier disminución medible en una enfermedad en un sujeto o paciente que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad.

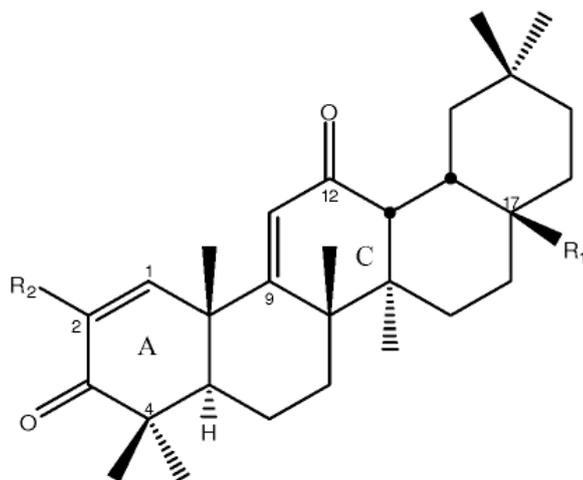
20 Como se usa en esta memoria, el término “soluble en agua” significa que el compuesto se disuelve en agua al menos en la medida de 0,010 moles/litro o se clasifica como soluble de acuerdo con la literatura precedente.

25 Otra abreviaturas usadas en esta memoria son las siguientes: DMSO, dimetil sulfóxido; NO, ácido nítrico; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; COX-2, ciclooxigenasa-2; NGF, factor de crecimiento nervioso; IBMX, isobutilmetilxantina; FBS, suero bovino fetal; GPDH, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa; RXR, receptor retinoide X; TGF- $\beta$ , factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; IFN $\gamma$  o IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; LPS, lipopolisacárido endotóxico bacteriano; TNF $\alpha$  o TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ , interleucina-1 $\beta$ ; GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; MTBE, metil-*tert*-butil éter; MTT, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio; TCA, ácido tricloroacético; HO-1, hemo oxigenasa inducible.

#### 30 IV. Triterpenoides sintéticos

Los triterpenoides, biosintetizados en plantas por la ciclación del escualeno, se usan con fines medicinales en muchos países asiáticos; y algunos, como los ácidos ursólico y oleánico, se sabe que son anti-inflamatorios y anti-cancerígenos (Huang *et al.*, 1994; Nishino *et al.*, 1988). Sin embargo, la actividad biológica de estas moléculas de origen natural es relativamente débil y por lo tanto se emprendió la síntesis de nuevos análogos para mejorar su potencia (Honda *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1998). La investigación posterior ha identificado una serie de compuestos sintéticos que tienen una actividad mejorada en comparación con los triterpenoides naturales.

40 Los esfuerzos en curso para la mejora de la actividad antiinflamatoria y antiproliferativa de los análogos de ácido oleanólico y ursólico llevaron al descubrimiento del ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO, RTA 402) y compuestos relacionados (*p. ej.*, CDDO-Me, TP-225, CDDO-Im) (Honda *et al.*, 1997, 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2002; Suh *et al.*, 1998; 1999; 2003; Place *et al.*, 2003; Liby *et al.*, 2005). En el caso de la inducción de genes citoprotectores a través de la señalización del elemento de respuesta (ARE) antioxidante Keap1-Nrf2, una evaluación reciente de la actividad de la estructura de 15 triterpenoides señaló la importancia de grupos aceptores de Michael en los anillos A y C, un grupo nitrilo en el C-2 del anillo A y que los sustituyentes en C-17 afectaron a la acción farmacodinámica *in vivo* (Yates *et al.*, 2007).



En general, CDDO es el prototipo para un gran número de compuestos en una familia de agentes que se han mostrado útiles en una variedad de contextos. Por ejemplo, se informa que CDDO-Me y CDDO-Im poseen la capacidad de modular la señalización del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad en varios tipos de células (Suh *et al.*, 2003; Minns *et al.*, 2004; Mix *et al.*, 2004). Se sabe que ambos son potentes inductores de la señalización de hemoxigenasa-1 y Nrf2/ARE (Liby *et al.*, 2005) y también se ha demostrado que una serie de análogos de triterpenoides (TP) sintéticos de ácido oleanólico son potentes inductores de la respuesta de fase 2, es decir, la elevación de la NAD(P)H-quinona oxidoreductasa y de la hemoxigenasa 1 (HO-1), que es el principal protector de las células frente al estrés oxidativo y electrófilo (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005). Al igual que los inductores de fase 2 identificados previamente, se demostró que los análogos de TP usan la vía de señalización del elemento de respuesta antioxidante-Nrf2-Keap1.

RTA 402 (metil bardoloxone), el compuesto para usar con los métodos de esta invención, es un Modulador de Inflamación Antioxidante (AIM) en el desarrollo clínico para la inflamación e indicaciones relacionadas con el cáncer que inhibe la inflamación inmuno-mediada restaurando la homeostasis redox en tejidos inflamados. Induce el factor de transcripción citoprotector Nrf2 y suprime las actividades de los factores de transcripción pro-oxidantes y pro-inflamatorios NF- $\kappa$ B y STAT3. *In vivo*, RTA 402 ha demostrado una actividad antiinflamatoria significativa de un solo agente en varios modelos animales de inflamación como del daño renal en el modelo de cisplatino y de daño renal agudo en el modelo de isquemia-reperfusión. Además, se han observado reducciones significativas en la creatinina sérica en pacientes tratados con RTA 402.

En un aspecto de la invención, el compuesto se puede usar para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad o afección renal causada por niveles elevados de estrés oxidativo en uno o más tejidos. El estrés oxidativo puede ir acompañado de inflamación aguda o crónica. El estrés oxidativo puede ser causado por la exposición aguda a un agente externo como la radiación ionizante o un agente de quimioterapia citotóxico (*p. ej.*, doxorubicina), por traumatismo u otra lesión tisular aguda, por isquemia-reperfusión, por mala circulación o anemia, por hipoxia o hiperoxia localizada o sistémica o por otros estados fisiológicos anormales como hiperglucemia o hipoglucemia.

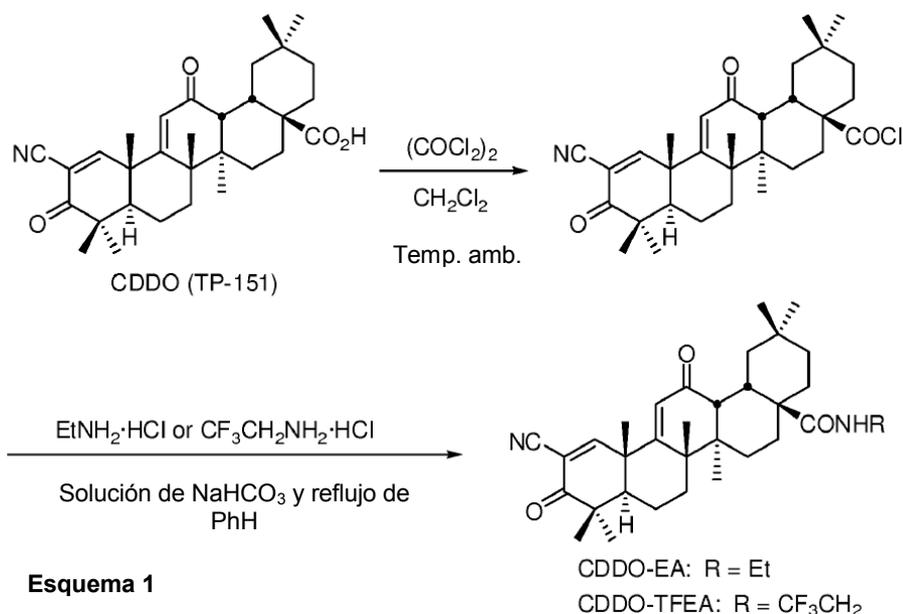
Por consiguiente, en patologías que implican estrés oxidativo solo o estrés oxidativo exacerbado por la inflamación, el tratamiento puede comprender administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, como los descritos anteriormente o a lo largo de esta especificación. El tratamiento se puede administrar preventivamente antes de un estado predecible de estrés oxidativo (*p. ej.*, trasplante de órganos o la administración de terapia a un paciente con cáncer) o se puede administrar terapéuticamente en entornos que implican estrés oxidativo establecido e inflamación.

La Tabla 1 resume los resultados *in vitro* para varios de los compuestos en los que los macrófagos RAW264.7 se trataron previamente con DMSO o fármacos a varias concentraciones (nM) durante 2 horas, luego se trataron con IFN $\gamma$  a 20 ng/ml durante 24 horas. Se determinó la concentración de NO en los medios usando un sistema de reactivo de Griess; se determinó la viabilidad celular usando el reactivo WST-1. NQO1 CD representa la concentración requerida para inducir una aumento de dos veces en la expresión de NQO1, una enzima antioxidante regulada por Nrf2, en células de hepatoma murino Hepalclc7 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005). Todos estos resultados son órdenes de magnitud más activas que, por ejemplo, la molécula de ácido oleanólico original.

Tabla 1. Supresión de la producción de NO inducida por IFN $\gamma$ 

ID de trabajo	RAW264.7 (20 ng/ml de IFN $\gamma$ )		Células Hepa1c1c7
	NO IC <sub>50</sub>	WST-1 IC <sub>50</sub>	NQO1 CD
RTA 401 (ejemplo comparativo)	~ 10 nM	> 200 nM	2,3 nM
RTA 402	2,2 nM	80 nM	1,0 nM
RTA 403 (ejemplo comparativo)	~ 0,6 nM	100 nM	3,3 nM
RTA 404 (ejemplo comparativo)	5,8 nM	100 nM	n/a
RTA 405 (ejemplo comparativo)	6 nM	~ 200 nM	n/a
TP-225 (ejemplo comparativo)	~ 0,4 nM	75 nM	0,28 nM

La síntesis de CDDO-MA se discute en Honda *et al.*, (2002). La síntesis de CDDO-EA y CDDO-TFEA se presentan en Yates *et al.*, (2007), que se muestra en el Esquema 1 a continuación.



5

#### V. Formas polimórficas de CDDO-Me

Las formas polimórficas del compuesto, *p. ej.*, Formas A y B de CDDO-Me, se pueden usar de acuerdo con las invenciones. La Forma B muestra una biodisponibilidad que es sorprendentemente mejor que la de la Forma A (FIG. 15). Específicamente la biodisponibilidad de la Forma B fue mayor que la de la Forma A CDDO-Me en monos cuando los monos recibieron dosis equivalentes de las dos formas por vía oral, en cápsulas de gelatina (Solicitud de EE.UU. N° 12/191.176, presentada el 13 de agosto de 2008).

La "Forma A" de CDDO-Me (RTA 402) no está solvatada (no hidratada) y se puede caracterizar por una estructura cristalina distintiva con un grupo espacial de P<sub>4</sub><sub>3</sub> 2<sub>1</sub>2 (n° 96) dimensiones de unidad celular de a= 14,2 Å, b= 14,2 Å y c= 81,6 Å y por una estructura de empaquetamiento en donde se empaquetan tres moléculas en forma helicoidal a lo largo del eje cristalográfico *b*. En algunas realizaciones, la Forma A también se puede caracterizar por un patrón de difracción de rayos X (XRPD) (CuK $\alpha$ ) que comprende picos de difracción significativos en aproximadamente 8,8, 12,9, 13,4, 14,2 y 17,4 °2 $\theta$ . En algunas variaciones, la difracción de rayos X en polvo de la Forma A es sustancialmente como se muestra en la FIG. 12A o en la FIG. 12B.

A diferencia de la Forma A, la "Forma B" de CDDO-Me está en una sola fase pero carece de una estructura cristalina definida. Las muestras de la Forma B no muestran una correlación molecular de largo alcance, *es decir*, por encima de aproximadamente 20 Å. Además, el análisis térmico de las muestras de la Forma B revela una temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) en un intervalo de aproximadamente 120°C a aproximadamente 130°C (FIG. 14). Por el contrario, un material nanocristalino desordenado no muestra una T<sub>g</sub> sino solo una temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), por encima de la

cual la estructura cristalina se convierte en un líquido. La Forma B está tipificada por un espectro de XRPD (FIG. 12C) que difiere del de la Forma A (FIG. 12A o FIG. 12B). Dado que no tiene una estructura cristalina definida, así mismo la Forma B carece de picos XRPD distintos, como los que tipifican la Forma A y en su lugar se caracteriza por un patrón de XRPD de "halo" general. En particular, la Forma B no cristalina cae en la categoría de sólidos "amorfo por rayos X" porque su patrón de XRPD muestra tres o menos halos de difracción primarios. Dentro de esta categoría, la Forma B es un material "vítreo".

La Forma A y la Forma B de CDDO-Me se preparan fácilmente a partir de una variedad de soluciones del compuesto. Por ejemplo, la Forma B se puede preparar por evaporación rápida o evaporación lenta en MTBE, THF, tolueno o acetato de etilo. La Forma A se puede preparar de varias maneras, incluso a través de evaporación rápida, evaporación lenta o enfriamiento lento de una solución de CDDO-Me en etanol o metanol. Las preparaciones de CDDO-Me en acetona pueden producir Forma A usando evaporación rápida, o Forma B usando evaporación lenta.

Se pueden usar varios medios de caracterización juntos para distinguir la Forma A y la Forma B de CDDO-Me entre sí y de otras formas de CDDO-Me. Ilustrativas de las técnicas adecuadas para este propósito son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en estado sólido, la difracción de rayos X en polvo (compárense las FIGS. 12A & B con la FIG. 12C), cristalografía por rayos X, Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (compárese la FIG. 13 con la FIG. 14), absorción/desorción dinámica de vapor (DVS), análisis de Karl Fischer (KF), microscopía de platina caliente, calorimetría diferencial de barrido modulada, FT-IR y espectroscopía de Raman. En particular, el análisis de los datos de XRPD y DSC pueden distinguir la Forma A de la Forma B y las formas de hemibencenato de CDDO-Me (Solicitud de EE.UU. Nº 12/191.176, presentada el 13 de agosto de 2008).

Se describen detalles adicionales con respecto a las formas polimórficas de CDDO-Me en la Solicitud Provisional de EE.UU. Nº 60/955.939 presentada el 15 de agosto de 2007 y la correspondiente Solicitud de EE.UU. no provisional Nº 12/191.176, presentada el 13 de agosto de 2008).

VI. Uso de triterpenoides para el tratamiento de la enfermedad renal crónica, diabetes insulino resistente y disfunción endotelial/enfermedad cardiovascular

El compuesto se puede usar para tratar diversos aspectos de la enfermedad renal/de riñón que incluye tanto indicaciones agudas como crónicas. En general, el método comprenderá administrar a los sujetos cantidades farmacéuticamente eficaces de un compuesto.

La inflamación contribuye significativamente a la patología de la enfermedad renal crónica (ERC). También existe un fuerte vínculo mecanístico entre el estrés oxidativo y la disfunción renal. La vía de señalización de NF- $\kappa$ B juega un papel importante en la progresión de la ERC ya que NF- $\kappa$ B regula la transcripción de MCP-1, una quimioquina que es responsable del reclutamiento de monocitos/macrófagos, lo que da como resultado una respuesta inflamatoria que finalmente lesiona el riñón (Wardle, 2001). La vía Keap1/Nrf2/ARE controla la transcripción de varios genes que codifican enzimas antioxidantes que incluye la hemo oxigenasa-1 (HO-1). La ablación del gen Nrf2 en ratones hembras da como resultado el desarrollo de nefritis glomerular de tipo lupus (Yoh *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2006). Además, varios estudios han demostrado que la expresión de HO-1 se induce en respuesta al daño renal y a la inflamación y que esta enzima y sus productos, la bilirrubina y el monóxido de carbono, desempeñan un papel protector en el riñón (Nath *et al.*, 2006).

El glomérulo y la cápsula de Bowman circundante constituyen la unidad básica funcional del riñón. La tasa de filtración glomerular (GFR) es la medida estándar de la función renal. El aclaramiento de creatinina se usa comúnmente para medir GFR. Sin embargo, el nivel de creatinina sérica se usa comúnmente como una medida sustitutiva del aclaramiento de creatinina. Por ejemplo, generalmente se aceptan niveles excesivos de creatinina sérica para indicar una función renal inadecuada y las reducciones de la creatinina sérica con el tiempo se aceptan como una indicación de una función renal mejorada. Los niveles normales de creatinina sérica son aproximadamente de 0,6 a 1,2 miligramos (mg) por decilitro (dl) en hombres adultos y de 0,5 a 1,1 miligramos por decilitro en hembras adultas.

La lesión renal aguda (AKI) puede ocurrir después de la isquemia-reperfusión, tratamiento con ciertos agentes farmacológicos como cisplatino y rapamicina e inyección intravenosa de medios de radiocontraste usados en las imágenes médicas. Al igual que en la ERC, la inflamación y el estrés oxidativo contribuyen a la patología de la AKI. No se conocen bien los mecanismos moleculares subyacentes a la nefropatía inducida por radiocontraste (RCN), sin embargo, es probable que una combinación de elementos que incluyen vasoconstricción prolongada, autorregulación renal alterada y toxicidad directa de los medios de contraste contribuyan todos al fallo renal (Tumlin *et al.*, 2006). La vasoconstricción produce una disminución del flujo sanguíneo renal y causa isquemia-reperfusión y la producción de especies reactivas de oxígeno. HO-1 se induce fuertemente bajo estas condiciones y se ha demostrado que previene el daño por isquemia-reperfusión en varios órganos diferentes que incluyen el riñón (Nath *et al.*, 2006). Específicamente, se ha demostrado que la inducción de HO-1 es protectora en un modelo de rata de RCN (Goodman *et al.*, 2007). La perfusión también induce una respuesta inflamatoria, en parte a través de la activación de la señalización de NF- $\kappa$ B (Nichols, 2004). Se ha propuesto como una estrategia terapéutica NF- $\kappa$ B como objetivo para prevenir el daño orgánico (Zingarelli *et al.*, 2003).

Sin estar limitado por la teoría, la potencia del compuesto RTA 402 se deriva en gran parte de la adición de grupos

carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados. En ensayos *in vitro*, la mayor parte de actividad de los compuestos se puede anular por la introducción de ditioneitol (DTT), N-acetil cisteína (NAC) o glutatión (GSH); restos que contienen tiol que interactúan con grupos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados (Wang *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2003; 2004; Shishodia *et al.*, 2006). Los ensayos bioquímicos han establecido que RTA 402 interactúa directamente con un residuo de cisteína crítica (C179) en IKK $\beta$  (véase más abajo) e inhibe su actividad (Shishodia *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2006). IKK $\beta$  controla la activación de NF- $\kappa$ B a través de la vía "clásica" que implica la degradación inducida por fosforilación de I $\kappa$ B lo que da como resultado la liberación de dímeros de NF- $\kappa$ B al núcleo. En los macrófagos, esta vía es responsable de la producción de muchas moléculas proinflamatorias en respuesta al TNF $\alpha$  y otros estímulos proinflamatorios.

RTA 402 también inhibe la vía de señalización JAK/STAT a múltiples niveles. Las proteínas JAK son reclutadas a los receptores transmembrana (*p. ej.*, IL-6R) tras la activación por ligandos como interferones e interleucinas. Después las JAKs fosforilan la porción intracelular del receptor causando el reclutamiento de factores de transcripción STAT. Los STATs se fosforilan después por las JAKs, forman dímeros y se translocan al núcleo donde activan la transcripción de varios genes implicados en la inflamación. RTA 402 inhibe la fosforilación de STAT3 constitutiva e inducida por IL-6 y la formación de dímeros y se une directamente a residuos de cisteína en STAT3 (C259) y en el dominio quinasa de JAK1 (C1077). Los ensayos bioquímicos también han establecido que los triterpenoides interactúan directamente con residuos de cisteína críticos en Keap1 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005). Keap1 es una proteína ligada a la actina que mantiene el factor de transcripción Nrf2 secuestrado en el citoplasma en condiciones normales (Kobayashi & Yamamoto, 2005). El estrés oxidativo da como resultado la oxidación de residuos de cisteína reguladores en Keap1 y provoca la liberación de Nrf2. Nrf2 luego se transloca al núcleo y se une a elementos de respuesta antioxidantes (AREs) lo que da como resultado la activación transcripcional de muchos genes antioxidantes e antiinflamatorios. Otra diana de la vía Keap1/Nrf2/ARE es hemo oxigenasa 1 (HO-1). HO-1 descompone el hemo en bilirrubina y monóxido de carbono y juega muchas funciones antioxidantes e antiinflamatorias (Maines & Gibbs, 2005). Se ha demostrado recientemente que HO-1 es potentemente inducido por triterpenoides (Liby *et al.*, 2005), que incluyen RTA 402. RTA 402 y muchos análogos estructurales también han demostrado ser potentes inductores de la expresión de otras proteínas de Fase 2 (Yates *et al.*, 2007).

RTA 402 es un potente inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B. Además, RTA 402 activa la ruta Keap1/Nrf2/ARE e induce la expresión de HO-1. Como se describe a continuación, RTA 402 ha demostrado actividad en dos modelos animales de AKI. Además, se han observado niveles reducidos de creatinina sérica y una mejoría en la filtración glomerular en la mayoría de los pacientes humanos que han sido tratados con RTA 402 (véanse los Ejemplos a continuación). Ahora se han observado mejoras significativas en un estudio de Fase II de pacientes con nefropatía diabética. Los hallazgos indican que RTA 402 se puede usar para mejorar la función renal en pacientes con nefropatía diabética mediante la supresión de la inflamación renal y la mejora de la filtración glomerular.

Como se señaló anteriormente, tanto la diabetes como la hipertensión esencial son importantes factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad renal crónica, y finalmente, para el fallo renal. Ambas condiciones, junto con los indicadores de enfermedad cardiovascular sistémica como hiperlipidemia, se presentan con frecuencia en el mismo paciente, especialmente si ese paciente es clínicamente obeso. Aunque no se comprenden completamente los factores unificadores, se ha implicado la disfunción del endotelio vascular como un factor patológico significativo en la enfermedad cardiovascular sistémica, la enfermedad renal crónica y la diabetes (véase *p. ej.*, Zoccali, 2006). Se ha implicado el estrés oxidativo agudo o crónico en las células endoteliales vasculares en el desarrollo de la disfunción endotelial y está fuertemente asociado con procesos inflamatorios crónicos. Por lo tanto, un agente capaz de aliviar el estrés oxidativo y la inflamación concomitante en el endotelio vascular puede aliviar la disfunción y restaurar la homeostasis endotelial. Sin estar limitados por la teoría, los compuestos para usar de acuerdo con la invención, estimulando mecanismos antioxidantes endógenos regulados por Nrf2, han demostrado la capacidad altamente inusual de mejorar parámetros relacionados con la función renal (*p. ej.*, creatinina sérica y tasa de filtración glomerular estimada), control glucémico y resistencia a la insulina (*p. ej.*, hemoglobina A1c) y enfermedad cardiovascular sistémica (*p. ej.*, células endoteliales circulantes) en pacientes que tienen valores clínicos anormales para estos parámetros. Actualmente, suele ser necesaria la terapia de combinación en tales pacientes para lograr mejoras en las medidas de control glucémico y enfermedad cardiovascular, que incluyen el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o bloqueantes del receptor de angiotensina II para aliviar la hipertensión y retardar la progresión de la enfermedad renal crónica. Al lograr mejoras simultáneas y clínicamente significativas en todos estos parámetros, especialmente en las medidas de la función renal, los compuestos para usar de acuerdo con la presente invención representan una mejora significativa sobre las terapias actualmente disponibles. En algunos aspectos, los compuestos para usar de acuerdo con la presente invención se pueden usar para tratar una combinación de las afecciones anteriores como una terapia única o en combinación con menos terapias adicionales que se usarían actualmente.

Estos hallazgos también indican que la administración de RTA 402 se puede usar para proteger a los pacientes del daño renal, como de la exposición a agentes de radiocontraste, como en el caso de la nefropatía inducida por radiocontraste (RCN), así como en otros contextos. En un aspecto, los compuestos para usar de acuerdo con esta invención se pueden usar para tratar el daño renal agudo inducido por isquemia-reperusión y/o por quimioterapia. Por ejemplo, los resultados mostrados en los Ejemplos 2 y 3 a continuación demuestran que RTA 402 es protector en modelos animales de daño renal agudo inducido por isquemia-reperusión y/o por quimioterapia.

Se ha medido la creatinina sérica en varios modelos animales tratados con RTA 402. Se han observado reducciones significativas de los niveles de creatinina sérica en relación con los niveles de línea de base o los niveles en animales control en monos cynomolgus, perros Beagle y ratas Sprague-Dawley (FIGs. 3A-D). Este efecto se ha observado en ratas con ambas formas de RTA 402 (cristalina o amorfa).

5 RTA 402 reduce la creatinina sérica en pacientes. Por ejemplo, se observaron mejoras en pacientes con cáncer que recibieron RTA 402. En seres humanos, la nefrotoxicidad es un efecto secundario limitante de la dosis del tratamiento con cisplatino. Se cree que el daño inducido por cisplatino a los túbulos proximales está mediado por un aumento de la inflamación, el estrés oxidativo y la apoptosis (Yao *et al.*, 2007). La creatinina sérica también se ha medido en  
10 pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) inscritos en un ensayo clínico abierto de Fase II de RTA 402 (Ejemplo 6). Este estudio se diseñó con múltiples puntos finales, en categorías de resistencia a insulina, disfunción endotelial/CVD y ERC, que incluyen mediciones de hemoglobina A1c (A1c), un punto final de fase 3 ampliamente usado para el control glucémico.

A1c es un componente menor de la hemoglobina a la que está unida la glucosa. A1c también se conoce como hemoglobina glicosilada o glucosilada. A1c se puede separar por carga y tamaño de los otros componentes de la  
15 hemoglobina A en sangre usando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Debido a que la A1c no se ve afectada por fluctuaciones a corto plazo en las concentraciones de glucosa en sangre, por ejemplo, debido a las comidas, se puede extraer sangre para la prueba de A1c sin tener en cuenta cuando se comió la comida. En pacientes sanos no diabéticos, el nivel de A1c es inferior al 7% de la hemoglobina total. El intervalo normal es de 4-5,9%. En la diabetes mal controlada, puede ser del 8,0% o superior. Se ha demostrado que las complicaciones de la diabetes se  
20 pueden retrasar o evitar si el nivel de A1c se puede mantener cerca del 7%.

Los agentes recientemente aprobados típicamente solo reducen los niveles de A1c en una cantidad de 0,4 a 0,80 durante seis meses de tratamiento, con mejoras de 28 días normalmente más pequeñas. La siguiente tabla muestra las reducciones de hemoglobina A1c durante seis meses por dos agentes aprobados, sitagliptina y acetato de pramlintida (Aschner *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2007; Pullman *et al.*, 2006).

Fármaco	Duración de DM (años)	Diseño de estudio	A1c medio	Cambio
Sitagliptina	4,3	+/placebo con A1c $\geq$ 7,0	8,0	-0,8
	4,4	+/metformina con A1c $\geq$ 7,5	8,9	-0,7
	6,1	pioglitazona+/sitagliptina; A1c $\geq$ 7,0	8,1	-0,7
Acetato de pramlintida	13	+/insulina	9,1	-0,4

25 En comparación, RTA 402 reduce A1c en 28 días en diabéticos refractarios además del estándar de atención. El tratamiento mostró una reducción de intención-de-tratar de 0,34 (n = 21) y una reducción de línea de base elevada ( $\geq$  7,0 en la línea de base) de 0,5 (n = 16). Estos resultados se presentan en mayor detalle en la sección de Ejemplos a continuación. Véanse también las FIGs 6 y 7.

30 Los compuestos para usar de acuerdo con esta invención se pueden usar para mejorar la función renal. Como se muestra en el Ejemplo 6, se ha demostrado que el tratamiento que usa RTA 402 mejora seis medidas de la función y del estatus renal, que incluyen la eGFR basada en la creatinina sérica, el aclaramiento de creatinina, BUN, Cistatina C, Adiponectina y Angiotensina II. Se demostró que RTA 402 aumenta la GRF de una manera dependiente de la dosis y con una alta tasa de respuesta (86%; n = 22). Como también se muestra en la FIG. 9, las mejoras en la GFR en 28  
35 días fueron reversibles después de que se retiró el fármaco.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento dan como resultado niveles mejorados de Adiponectina y/o Angiotensina II. La Adiponectina y la Angiotensina II suelen estar típicamente elevadas en pacientes con DN y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad renal. La Adiponectina (también conocida como Acrp30, apM1) es una hormona conocida por modular un número de procesos metabólicos que incluyen la regulación de la glucosa y el  
40 catabolismo de los ácidos grasos. La Adiponectina se secreta a partir del tejido adiposo al torrente sanguíneo y es abundante en plasma en relación con otras muchas hormonas. Los niveles de la hormona se correlacionan inversamente con el porcentaje de grasa corporal en adultos mientras que la asociación en lactantes y niños pequeños es más incierta. La hormona desempeña un papel en la supresión de los desequilibrios metabólicos que pueden dar como resultado la diabetes tipo 2, obesidad, aterosclerosis y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).  
45 La Adiponectina se puede usar para predecir la mortalidad por todas las causas y la enfermedad renal en la etapa terminal en pacientes con DN.

Se ha encontrado que los métodos de tratamiento reducen la metalopeptidasa 9 de matriz (MMP-9), moléculas de

adhesión solubles y factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) en la mayoría de los pacientes. Los altos niveles de estos suelen correlacionarse con malos resultados cardiovasculares.

#### VII. Formulaciones farmacéuticas y rutas de administración

5 La administración del compuesto a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de productos farmacéuticos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, del fármaco. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario.

10 El compuesto de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de métodos, *p. ej.*, por vía oral o por inyección (*p. ej.*, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, etc.). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. También se puede administrar por perfusión/infusión continua de una enfermedad o sitio de herida. Ejemplos específicos de formulaciones, que incluyen una dispersión de CDDO-Me basada en polímeros que mostraron una mejora de la biodisponibilidad oral, se proporcionan en la solicitud de EE.UU. N° 12/191.176, presentada el 13 de agosto de 2008. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden usar otros métodos de fabricación para producir dispersiones de la presente invención con propiedades y utilidad equivalentes (véase Repka *et al.*, 2002 y las referencias citadas en el mismo). Tales métodos alternativos incluyen, pero no se limitan a, evaporación de disolvente, extrusión, como extrusión por fusión en caliente y otras técnicas.

20 Para administrar el compuesto terapéutico por otra administración que no sea parenteral puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto terapéutico se puede administrar a un paciente en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen suero salino y soluciones tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua-en aceite-en agua, así como liposomas convencionales (Strejan *et al.*, 1984).

25 El compuesto terapéutico también se puede administrar parenteralmente, intraperitonealmente, intraespinalmente o intracerebralmente. Las dispersiones se pueden preparar en *p. ej.*, glicerol, polietilén glicoles líquidos, mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

30 Composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil aplicación en jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (como glicerol, propilén glicol y polietilén glicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o polialcoholes como manitol y sorbitol, en la composición. Se puede lograr la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

40 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto terapéutico en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto terapéutico en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo (*es decir*, el compuesto terapéutico) más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente estéril filtrada del mismo.

50 El compuesto terapéutico se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto terapéutico y otros ingredientes se pueden meter en una cápsula de gelatina de cáscara blanda o dura, comprimidos en tabletas o incorporados directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, el compuesto terapéutico se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas para la garganta, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. El porcentaje del compuesto terapéutico en las composiciones y preparaciones se pueden, por supuesto, variar. La cantidad del compuesto terapéutico en dichas composiciones terapéuticas útiles es tal para que se obtenga una dosis adecuada.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para la fácil administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en esta memoria se

refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; que contiene cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto terapéutico calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención se dictan y son directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto terapéutico y del efecto terapéutico particular a lograr y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto terapéutico para el tratamiento de una afección seleccionada en un paciente.

El compuesto terapéutico se puede también administrar por vía tópica a la piel, ojo o mucosa. Alternativamente, si se desea la distribución local a los pulmones, el compuesto terapéutico se puede administrar por inhalación en una formulación de polvo seco o aerosol.

Se puede determinar la cantidad de dosificación real de un compuesto de la presente invención o composición que comprende un compuesto de la presente invención administrado a un sujeto mediante factores físicos y fisiológicos como la edad, sexo, peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad a tratar, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del sujeto y la ruta de administración. Estos factores se pueden determinar por un experto en la técnica. El profesional responsable de la administración típicamente determinará la concentración de ingrediente(s) activo(s) en una composición y dosis apropiada(s) para el sujeto individual. La dosificación se puede ajustar por el médico individual en caso de cualquier complicación.

En algunas realizaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg de compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 300 mg de compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 200 mg de compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 25 mg de compuesto. En otras variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 75 mg de compuesto. En aún otras variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 150 mg de compuesto. En variaciones adicionales, la dosis diaria es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 30 mg de compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 20 mg de compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 15 mg de compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg de compuesto. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg de compuesto.

En algunas realizaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz es una dosis diaria de 0,01-25 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,05-20 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,1-10 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,1-5 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,1-2,5 mg de compuesto por kg de peso corporal.

En algunas realizaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz es una dosis diaria de 0,1-1000 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,15-20 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,20-10 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,40-3 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,50-9 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,60-8 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,70-7 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,80-6 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de 0,90-5 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a 5 mg de compuesto por kg de peso corporal.

Una cantidad eficaz variará típicamente de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,4 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 0,8 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 0,9 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg o de aproximadamente 10,0 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días (dependiendo, por supuesto, del modo de administración y de los factores discutidos anteriormente). Otros intervalos de dosis adecuados incluyen 1 mg a 10.000 mg por día, 100 mg a 10.000 mg por día, 500 mg a 10.000 mg por día y 500 mg a 1.000 mg por día. En algunas realizaciones particulares, la cantidad es menos de 10.000 mg por día con un intervalo, por ejemplo, de 750 mg a 9.000 mg por día.

La cantidad eficaz puede ser menos de 1 mg/kg/día, menos de 500 mg/kg/día, menos de 250 mg/kg/día, menos de 100 mg/kg/día, menos de 50 mg/kg/día, menos de 25 mg/kg/día, menos de 10 mg/kg/día o menos de 5 mg/kg/día. Alternativamente puede estar en el intervalo de 1 mg/kg/día a 200 mg/kg/día. Por ejemplo, respecto al tratamiento de pacientes diabéticos, la dosificación unitaria puede ser una cantidad que reduce la glucosa en sangre en al menos un 40% en comparación con un sujeto no tratado. En otra realización, la dosificación unitaria es una cantidad que reduce

la glucosa en sangre a un nivel que está dentro de  $\pm 10\%$  del nivel de glucosa en sangre de un sujeto no diabético.

En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración y cualquier intervalo derivable del mismo. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en esta memoria, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 1 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal, un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., basado en los números descritos anteriormente.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente invención comprende, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1% de un compuesto de la presente invención. En otras realizaciones, el compuesto de la presente invención puede comprender entre aproximadamente el 2% a aproximadamente el 75% del peso de la unidad o entre aproximadamente el 25% a aproximadamente el 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivado del mismo.

Se contemplan dosis únicas o múltiples de los agentes. Se pueden determinar los intervalos de tiempo deseados para la distribución de dosis múltiples por un experto en la técnica que no emplea más que la experimentación rutinaria. Como un ejemplo, se les puede administrar a los sujetos dos dosis diarias a intervalos de aproximadamente 12 horas. En algunas realizaciones, el agente se administra una vez al día.

El(los) agente(s) se pueden administrar en un horario de rutina. Como se usa en esta memoria, un horario de rutina se refiere a un periodo de tiempo designado predeterminado. El horario de rutina puede abarcar periodos de tiempo que son idénticos o que difieren en duración, siempre que el horario esté predeterminado. Por ejemplo, el horario de rutina puede implicar la administración dos veces al día, cada día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, todas las semanas, todos los meses o cualquier número establecido de días o semanas entre ellos. Alternativamente, el horario de rutina predeterminado puede implicar la administración con una frecuencia de dos veces al día durante la primera semana, seguido por una frecuencia de una vez al día durante varios meses, etc. En otras realizaciones, la invención proporciona que el(los) agente(s) se puedan tomar por vía oral y que el tiempo en que se hace es o no dependiente de la ingesta de alimentos. Así, por ejemplo, el agente se puede tomar cada mañana y/o cada tarde, independientemente de cuándo ha comido o comerá el sujeto.

Formulaciones específicas no limitantes incluyen dispersiones poliméricas de CDDO-Me (véase la Solicitud de EE.UU. N° 12/191.176, presentada el 13 de agosto de 2008). Algunas de las formulaciones informadas en ella exhibieron una mayor biodisponibilidad que las formulaciones de la Forma A micronizada o de la Forma A nanocristalina. Adicionalmente, las formulaciones basadas en la dispersión polimérica demostraron mejoras adicionales sorprendentes en la biodisponibilidad oral en relación con las formulaciones de la Forma B micronizada. Por ejemplo, las formulaciones de copolímero de ácido metacrílico, Tipo C y HPMC-P mostraron la mayor biodisponibilidad en sujetos monos.

#### VIII. Terapia de combinación

Además de ser usado como una monoterapia, el compuesto también puede encontrar uso en terapias de combinación. La terapia de combinación eficaz se puede lograr con una composición o formulación farmacológica única que incluye ambos agentes, o con dos composiciones o formulaciones distintas, administradas al mismo tiempo, en donde una composición incluye un compuesto para usar de acuerdo con la presente invención y el otro incluye el(los) segundo(s) agente(s). Alternativamente, la terapia puede preceder o continuar el tratamiento del otro agente en intervalos que varían de minutos a meses.

Se pueden emplear varias combinaciones, como cuando un compuesto de la presente invención es "A" y "B" representa un agente secundario, ejemplos no limitantes de los cuales se describen a continuación.

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B  
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A  
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Se contempla que se pueden usar otros agentes antiinflamatorios en conjunto con los tratamientos de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar otros inhibidores COX, que incluyen ácidos arilcarboxílicos (ácido salicílico, ácido acetil salicílico, diflunisal, trisalicilato de magnesio y colina, salicilato, benorilato, ácido flufenámico, ácido

mefenámico, ácido meclofenámico y ácido triflúmico), ácidos arilalcanoicos (diclofenaco, fenclofenaco, alclofenaco, fentiazaco, ibuprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, naproxeno, fenoprofeno, fenbufeno, suprofen, indoprofeno, ácido tiaprofenico, benoxaprofeno, piroprofeno, tolmetina, zomepiraco, clopinaco, indometacina y sulindaco) y ácidos enólicos (fenilbutazona, oxifenbutazona, azapropazona, feprazona, piroxicam e isoxicam. Véase también la Patente de EE.UU. 6.025.395.

Se cree que los suplementos dietéticos y nutricionales con beneficios informados para el tratamiento o prevención del Parkinson, el Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y todas las demás enfermedades cuya patogenia implica una producción excesiva de óxido nítrico (NO) o prostaglandinas, como acetil-L-carnitina, octacosanol, aceite de onagra, vitamina B6, tirosina, fenilalanina, vitamina C, L-dopa o una combinación de varios antioxidantes se pueden usar en conjunto con los compuestos de la presente invención.

Otras terapias secundarias particulares incluyen fármacos inmunosupresores (para trasplantes y la RKD relacionada con autoinmunidad), antihipertensivos (para la RKD relacionada con alta presión sanguínea, *p. ej.*, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y bloqueantes del receptor de angiotensina), insulina (para la RKD diabética), agentes reductores de lípidos/colesterol (*p. ej.*, inhibidores de la reductasa HMG-CoA como atorvastatina o simvastatina), tratamientos para la hiperfosfatemia o el hiperparatiroidismo asociado con la ERC (*p. ej.*, acetato de sevelamer, cinacalcet), diálisis y restricciones dietéticas (*p. ej.*, proteína, sal, fluidos, potasio, fósforo).

#### IX. Ejemplos

Los siguientes ejemplos están incluidos para demostrar realizaciones preferidas de la invención.

#### Ejemplo 1- Materiales y métodos

Productos químicos.

Los triterpenoides se sintetizaron como se describió previamente en Honda *et al.*, (1998), Honda *et al.*, (2000b), Honda *et al.*, (2002) y Yates *et al.*, (2007).

#### Ejemplo 2: Resultados de isquemia reperusión en ratón

En un modelo de ratón de fallo renal agudo isquémico, la arteria renal se pinza durante aproximadamente veinte minutos. Después de este tiempo, se elimina la pinza y se reperfusiona el riñón con sangre. La isquemia-reperusión da lugar a daño renal y función renal disminuida que se puede evaluar mediante los niveles del nitrógeno ureico en sangre (BUN), que se vuelven elevados después del daño renal. Como se muestra en las FIGs. 1a-d, la isquemia-reperusión inducida quirúrgicamente aumentó los niveles BUN por aproximadamente 2 veces. Sin embargo, en animales tratados con 2 mg/kg de RTA 402 por vía oral una vez al día empezando dos días antes de la cirugía, los niveles BUN se redujeron significativamente ( $p < 0,01$ ) en relación con animales tratados con vehículo y fueron similares a los niveles en animales que se sometieron a cirugías simuladas (FIGs. 1a-c). Las medidas histológicas del daño del riñón y de inflamación también se mejoraron significativamente por el tratamiento con RTA 402 (FIG. 1d). Estos datos indican que el RTA 402 es protector frente al daño tisular inducido por la isquemia-reperusión.

#### Ejemplo 3: Resultados del daño renal agudo inducido por quimioterapia en rata

En otro modelo de daño renal agudo, se inyectaron las ratas por vía intravenosa con el agente antineoplásico cisplatino. En seres humanos, la nefrotoxicidad es un efecto secundario limitante de la dosis del tratamiento con cisplatino. El daño inducido por cisplatino a los túbulos proximales se cree que está mediado por la inflamación aumentada, el estrés oxidativo y la apoptosis (Yao *et al.*, 2007). Las ratas tratadas con una única dosis de cisplatino de 6 mg/kg desarrollaron insuficiencia renal medida por los niveles de creatinina en sangre y de BUN aumentados. El tratamiento con 10 mg/kg de RTA 402 mediante sonda oral empezando un día antes del tratamiento con cisplatino y continuando cada día redujo significativamente los niveles de creatinina y BUN en sangre (FIGs 2a-b). La evaluación histológica de los riñones demostró una mejora en la extensión del daño del túbulo proximal en animales tratados con RTA 402 en comparación con animales tratados con vehículo (FIG. 2c).

#### Ejemplo 4: Reducción de los niveles de creatinina sérica en diversas especies

Se ha medido la creatinina sérica en varias especies animales tratados con RTA 402 en el transcurso de los estudios toxicológicos. Se han observado reducciones significativas de los niveles de creatinina sérica en relación con los niveles de línea de base o los niveles en animales control en monos cynomolgus, perros Beagle y ratas Sprague-Dawley (FIGs. 3a-d). Se ha observado este efecto en ratas con formas de RTA 402 cristalinas y amorfas.

#### Ejemplo 5: Creatinina sérica reducida y eGFR aumentada en pacientes con cáncer

También se ha medido la creatinina sérica en pacientes con cáncer inscritos en un ensayo clínico de Fase I de RTA 402. Estos pacientes recibieron RTA 402 una vez al día a dosis de 5 a 1.300 mg/día durante un total de veintidós días cada 28 días. Se observó una reducción de creatinina sérica de más del 15% tan pronto como a los ocho días después del tratamiento de iniciación y persistió hasta el final del ciclo (FIG. 4A). Esta reducción se mantuvo en aquellos

5 pacientes que recibieron seis o más ciclos de tratamiento con RTA 402. Un subgrupo de pacientes con daño renal preexistente (niveles de creatinina sérica basales de al menos 1,5 mg/dl) también tuvieron reducciones significativas en los niveles de creatinina sérica después del tratamiento con RTA 402. En estos pacientes, los niveles de creatinina sérica disminuyeron progresivamente a lo largo del ciclo de tal modo que los niveles del Día 21 eran aproximadamente un 25% más bajos que los niveles de línea de base (FIG. 4A). Estos resultados se pueden resumir como se muestra en la tabla a continuación.

	Todos los pacientes	Subgrupo con niveles de creatinina sérica basales elevados
Número de pacientes que recibieron fármaco durante al menos 3 semanas	45	8
% de pacientes con disminución en el Día 21	87%	100%
% de disminución de creatinina a partir del basal	-18,3%	-24,5%
Valor p (Basal frente al Día 21)	0,001	0,0007

La tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) mejoró significativamente en los pacientes tratados con RTA 402 (FIG. 4b).

10 La FIG. 5 muestra los resultados después de al menos seis meses de tratamiento con RTA 402 en once pacientes con cáncer, que muestran que la eGFR mejoró de una forma aproximadamente continua. Algunos de estos pacientes se inscribieron en un estudio de Fase I, mientras otros se inscribieron en un estudio con RTA 402 (en combinación con gemcitabina) en pacientes con cáncer pancreático. Estos resultados se pueden resumir como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

15

Tabla 2: eGFR en pacientes que reciben RTA 402 durante 6 ciclos

Ciclo (cada ciclo es de 28 días)	Estudio de tumor sólido										Estudio pancreático					
	ID del pac.:	402	406	408	409	410	421	427	1001	1104	1105	1106				
Dosis (mg)	5	80	150	150/300	300/600	1300/900	1300	150	300/150	300	300					
BL	109,7	94,2	73,2	48,4	49,9	52,5	70,1	68,8	67,3	82,4	89,0					
1	109,7	125,9	82,1	62,6	69,6	58,6	101,3	78,9	95,7	106,6	106,3					
2	109,7	107,9	77,4	62,6	63,4	66,2	78,3	109,9	71,6	89,3	106,3					
3	95,7	107,9	69,4	62,6	63,4	75,8	88,4	135,7	141,2	106,6	106,3					
4	95,7	125,9	77,4	57,0	69,6	N/A	101,3	175,5	95,7	106,6	131,2					
5	109,7	107,9	77,4	69,2	63,4	88,4	101,3	175,5	114,4	131,6	131,2					
6	95,7	125,9	87,4	69,2	69,6	75,8	101,3	135,7	114,4	170,3	131,2					

Ciclo 9 durante RTA 402 durante 6 ciclos

Ejemplo 6: Estudio de Fase 2 en pacientes con nefropatía diabética

También se ha medido la creatinina sérica en pacientes con enfermedad crónica renal (ERC) inscritos en un ensayo clínico de Fase II abierto de RTA 402. Estos pacientes recibieron RTA 402 una vez al día a tres niveles de dosis, 25 mg, 75 mg y 150 mg durante un total de 28 días.

- 5 El estudio se diseñó con múltiples puntos finales, en categorías de resistencia de insulina, disfunción endotelial /CVD y ERC. Estos se resumen como sigue:

<b>Resistencia a la insulina/ Diabetes</b>	<b>Disfunción endotelial/cardiovascular</b>	<b>Enfermedad renal crónica</b>
Hgb A1c	CECs	GFR
GDR/Pinzamiento euglucémico	Proteína C reactiva (PCR)	Creatinina sérica
Glucosa	E-selectina	Aclaramiento de creatinina
	VCAM	Cistatina C
	Citoquinas	Adiponectina
		Angiotensina II

- 10 Una medida de resultado primaria para este estudio es determinar los efectos del RTA 402 administrado por vía oral a las tres concentraciones de dosis en la tasa de filtración glomerular (según lo estimado por la fórmula MDRD) en pacientes con nefropatía diabética.

- 15 Una medida de resultado secundaria incluye: (1) una evaluación de la seguridad y tolerabilidad de la administración oral de RTA 402 a las tres dosis diferentes, en esta población de pacientes; (2) una evaluación de los efectos de la administración oral de RTA 402 a las tres concentraciones de dosis en el nivel de creatinina sérica, el aclaramiento de creatinina y la relación albúmina/creatinina en orina en pacientes con nefropatía diabética; (3) una evaluación de los efectos de la administración oral de RTA 402 a las tres concentraciones de dosis en la hemoglobina A1c en todos los pacientes inscritos y en la respuesta a insulina mediante la prueba del pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico en pacientes inscritos en uno solo de los centros de estudio; (4) una evaluación de los efectos de RTA 402 a las tres dosis diferentes en un panel de marcadores de inflamación, daño renal, estrés oxidativo y disfunción celular endotelial.

- 20 La población de pacientes seleccionada para este estudio tenían todos diabetes tipo 2 con ERC. La mayoría habían sido diagnosticados con pobre control glucémico durante dos décadas. La ERC se estableció a través de los niveles elevados de creatinina sérica (SCr). La mayoría de los pacientes habían sido diagnosticados con enfermedad cardiovascular (CVD) y la mayoría estaban recibiendo tratamiento estándar de cuidado asistencial (SOC) para la diabetes, ERC y CVD (p. ej., insulina, ACEI/ARB,  $\beta$ -bloqueante, diurético y estatina). La línea de base demográfica se puede resumir como sigue:

Edad	59
Duración de la diabetes (años)	15,4
Nefropatía diabética	100%
Complicaciones diabéticas no renales <sup>1</sup>	100%
Hipertensivos	100%
Hgb A1c (%)	7,9%
Antihiper glucémicos orales fallidos	90%
Uso de ACEI/ARB	80%
Uso de estatina	50%
<sup>1</sup> Incluye neuropatía y retinopatía	
Todos los valores representan la media; n = 10; 1 <sup>os</sup> 10 pacientes para completar el estudio	

Los criterios de inclusión de los pacientes fueron como sigue: (1) diagnóstico de diabetes tipo 2; (2) creatinina sérica en mujeres de 1,3 – 3,0 mg/dl (115 - 265  $\mu$ mol/l), inclusive, y en hombres de 1,5 – 3,0 mg/dl (133 - 265  $\mu$ mol/l), inclusive; (3) el paciente debe estar de acuerdo con la práctica de contracepción eficaz; (4) el paciente debe tener una prueba de embarazo en orina negativa dentro de las 72 horas antes de la primera dosis de la medicación de estudio; (5) el paciente está dispuesto y es capaz de cooperar con todos los aspectos del protocolo y puede comunicarse de manera eficaz; (6) el paciente está dispuesto y es capaz de proporcionar consentimiento informado escrito para participar en este estudio clínico.

Los criterios de exclusión de los pacientes fueron los siguientes: (1) pacientes que tienen diabetes tipo 1 (insulino-dependiente; inicio juvenil); (2) pacientes con enfermedad renal no diabética conocida (nefroesclerosis superpuesta a la nefropatía diabética aceptable) o con aloinjerto renal; (3) pacientes que tienen enfermedad cardiovascular como sigue: angina de pecho inestable dentro de los 3 meses de ingreso al estudio; infarto de miocardio, cirugía de injerto de bypass de arteria coronaria o angioplastia/stent coronaria transluminal percutánea dentro de los 3 meses de ingreso al estudio; ataque isquémico transitorio dentro de los 3 meses de ingreso al estudio; accidente cerebrovascular dentro de los 3 meses de ingreso al estudio; valvulopatía obstructiva o cardiomiopatía hipertrófica; bloqueo atrioventricular de segundo o de tercer grado no tratado con éxito con un marcapasos; (4) pacientes que necesitan terapia inmunosupresora crónica (> 2 semanas) que incluye corticoesteroides (excluyendo esteroides inhalados o nasales) dentro de los 3 meses de ingreso al estudio; (5) pacientes con evidencia de disfunción hepática que incluye bilirrubina total > 1,5 mg/dl (> 26 micromoles/l) o transaminasa hepática (aspartato aminotransferasa [AST] o alanina transferasa [ALT]) > 1,5 veces el límite superior de lo normal; (6) si es mujer, la paciente está embarazada, amamantando o planeando un embarazo; (7) pacientes con cualquier afección clínica concurrente que en el juicio de un investigador podría potencialmente representar un riesgo para la salud del paciente mientras participa en el estudio o podría influir en el resultado del estudio; (8) pacientes que tienen hipersensibilidad conocida a cualquier componente del fármaco de estudio; (9) pacientes que tienen alergia conocida al yodo; (10) pacientes que se hayan sometido a un procedimiento de diagnóstico o intervención que requiera un agente de contraste dentro de los últimos 30 días antes de ingresar al estudio; (11) pacientes con cambio o ajuste de dosis en alguno de los siguientes medicamentos: inhibidores de ACE, bloqueantes de angiotensina II, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) o inhibidores de COX-2 dentro de los 3 meses; otras medicaciones antihipertensivas y otras antidiabéticas dentro de las 6 semanas antes de ingresar en el estudio; (12) pacientes que tienen una historia de abuso de drogas o alcohol o que tienen resultados positivos en las pruebas de abuso de drogas (prueba de drogas positiva en orina y/o prueba de alcoholemia de alcohol); (13) pacientes que han participado en otro estudio clínico que implica productos de investigación o comercializados dentro de los 30 días antes del ingreso en el estudio o que participarían concomitantemente en dicho estudio; (14) pacientes incapaces de comunicarse o cooperar con el investigador debido a problemas de lenguaje, desarrollo mental deficiente o función mental alterada.

A finales de septiembre de 2008 había 32 de 60 pacientes incluidos en este estudio. Todos menos uno de los pacientes estaban recibiendo insulina y antihiperglucémicos orales estándar como norma de cuidado asistencial.

Se observó que el tratamiento con RTA 402 reducía el % de hemoglobina A1c en 28 días en diabéticos refractarios por encima de la norma de cuidado asistencial. El tratamiento mostró una reducción de intento-de-tratar de aproximadamente 0,25 (n = 56) y una reducción de la elevada línea de base ( $\geq 7,0$  en la línea de base) de 0,5 (n = 35). La reducción del % de hemoglobina A1c como una función de la severidad de la línea de base se muestra en la FIG. 6 y la reducción como una función de la dosificación se muestra en la FIG. 7. Los pacientes con enfermedad renal avanzada (Etapa 4) (GFR a partir de 15–29 ml/min) presentaron un % medio de reducción de Ac1 de aproximadamente 0,77. Todas las reducciones fueron estadísticamente significativas.

Los resultados de la prueba de pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico mostraron que el tratamiento de 28 días también mejoró el control glucémico y la sensibilidad a insulina en los pacientes según lo medido por la tasa de consumo de glucosa (GDR). Los pacientes mostraron mejoras en la GDR después del tratamiento de 28 días con pacientes más severamente dañados (GDR < 4) que mostraron mejoras estadísticamente significativas ( $p \leq 0,02$ ). La prueba del pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico se realizó al inicio del estudio (Día -1) y al final del estudio en el Día 28. La prueba mide la tasa de infusión de glucosa (GINF) necesaria para compensar un aumento del nivel de insulina sin causar hipoglucemia; este valor se usa para derivar la GDR.

En resumen, la prueba del pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico dura aproximadamente 2 horas. La insulina se infunde a través de una vena periférica a 10 – 120 mU por m<sup>2</sup> por minuto. Para compensar la infusión de insulina, se infunde glucosa al 20% para mantener los niveles de azúcar en sangre entre 5 y 5,5 mmol/l. La tasa de infusión de glucosa se determina revisando los niveles de azúcar en sangre cada 5 a 10 minutos. La tasa de infusión de glucosa durante los 30 últimos minutos de la prueba se usa para determinar la sensibilidad a insulina determinada por la tasa de metabolismo de la glucosa (M) en mg/kg/min.

Las siguientes pautas del protocolo están en el lugar para la prueba del pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico:

- 1) Sujeto en ayuno 8–10 horas antes del procedimiento del pinzamiento.
- 2) La mañana del pinzamiento medir signos vitales y peso.

- 3) Comenzar una vía retrógrada en una mano con un catéter de calibre 18-20 de 11/4" para extraer muestras.
- 4) Preparar el tubo IV con 2 llaves de tope de tres vías y un tubo de extensión en J. Pinchar el tubo a una bolsa de litro de NaCl al 0,9% para correr a KVO (mantener la vena abierta, aproximadamente a 10 cc/h) hasta el inicio del procedimiento.
- 5) 5) Aplicar una almohadilla térmica cubierta en una funda de almohada con una almohadilla que separa la almohadilla térmica de la mano del sujeto. (Permite la recolección de sangre arterializada derivada a partir del cateterismo venoso).
- 6) Monitorizar la temperatura (aproximadamente a 150°F / 65°C) generada por la almohadilla térmica antes y durante el pinzamiento para mantener la arterialización.
- 7) Iniciar otra vía opuesta al lado de extracción en el antebrazo distal con un catéter de calibre 18-20 de 11/4" para la vía de infusión. Preparar el tubo IV con 2 llaves de tope de tres vías.
- 8) Colgar una bolsa de 500 ml de dextrosa al 20% y fijarla al puerto en el lado de la infusión.
- 9) Preparar la infusión de insulina
  - a. Quitar 53 cc (50 cc de sobrellenado) de suero salino de una bolsa de 500 cc de NaCl al 0,9% y descartar
  - b. Extraer 8 cc de sangre del sujeto usando una técnica estéril e inyectar en un tubo con tope tigre
  - 15 c. Centrifugar el tubo con tope tigre. Retirar 2 cc de suero e inyectar en una bolsa de 500 cc de NaCl al 0,9%
  - d. Añadir 100 unidades de insulina a la bolsa con el suero y mezclar bien (0,2 U de insulina/ml)e. Conectar el tubo IV con perforador con doble ventilación en la bolsa de NaCl al 0,9%
  - f. Colocar en una bomba Baxter
- 10) Tomar el tiempo y extraer todas las muestras basales de sangre (Los valores basales de glucosa en sangre en ayunas se obtendrán antes de comenzar la administración de insulina)
- 11) Realizar los cálculos de la tasa de infusión de insulina para una dosis de cebado y una infusión de insulina de 60 mU/m<sup>2</sup>. Esta insulina de fondo es para suprimir la producción de glucosa hepática endógena. Los sujetos delgados se pueden suprimir con 40 mU/m<sup>2</sup>; los sujetos obesos insulino resistentes requieren 80 mU/m<sup>2</sup>. 60 mU/m<sup>2</sup> serían suficientes para suprimir la población de estudio sugerida con un BMI de 27–40 kg/m<sup>2</sup>. La infusión de insulina de 60 mU/m<sup>2</sup> sugerida puede necesitar ser ajustada si el BMI se modifica.
- 12) Se extraerán muestras de 0,5 ml cada cinco minutos y se usarán las lecturas a partir del Analizador de Glucosa en Sangre YSI para determinar/ajustar la tasa de infusión de glucosa (mg/kg/min). Cualquier prueba de laboratorio adicional requerida por el protocolo será adicional al volumen de sangre. El pinzamiento durará 120 minutos que se cree que es una duración suficiente para determinar la sensibilidad a la insulina.
- 13) Etiquetar y guardar todas las impresiones de YSI para documentos de origen.
- 14) Las tasas de infusión de glucosa a partir de los últimos 30 minutos del pinzamiento euglucémico se ajustarán usando corrección espacial. Esto se usará para determinar la tasa de metabolismo de la glucosa (M mg/kg/min) que representa la sensibilidad de los sujetos a la insulina.
- Como se muestra en la FIG. 8, RTA 402 reduce las células endoteliales circulantes (CECs). El número de CECs medio en células/ml se muestra para los grupos de intención-de-tratar (ITT) y de línea de base elevada, ambos antes y después del tratamiento con RTA de 28 días. La reducción para el grupo de intención-de-tratar fue de aproximadamente el 20% y la reducción en el grupo de línea de base elevada (>5 CECs/ml) fue de aproximadamente el 33%. La fracción de CECs iNOS-positivas se redujo aproximadamente el 29%. Se observó la normalización de los valores de CECs (≤5 células/ml) en 11 de los 19 pacientes con línea de base elevada.
- Las CECs se aislaron a partir de sangre total usando CD146 Ab (un anticuerpo frente al antígeno CD146 que se expresa en células endoteliales y leucocitos). Después del aislamiento de las CECs, se usó un CD105 Ab conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) para identificar las CECs usando un sistema CellSearch™. Se añadió un conjugado fluorescente de CD45 Ab para teñir los leucocitos y después estos se acotaron en ventanas. Para una visión general de este método véase Blann *et al.*, (2005). Las muestras de CEC también se evaluaron para la presencia de iNOS por inmunotinción. El tratamiento con RTA 402 redujo las CECs iNOS-positivas en aproximadamente el 29% indicando además que el RTA 402 reduce la inflamación en células endoteliales.
- Se muestra que RTA 402 mejora significativamente ocho medidas de la función y el estatus renal incluyendo la eGFR basado en la creatinina sérica (FIG. 9), aclaramiento de creatinina, BUN (FIG. 11A), fósforo sérico (FIG. 11B), ácido úrico sérico (FIG. 11C), Cistatina C, Adiponectina (FIG. 10A) y Angiotensina II (FIG. 10B). La Adiponectina predice la mortalidad por todas las causas y la enfermedad renal en la etapa final en pacientes con DN. La Adiponectina y la

Angiotensina II, que están elevadas en pacientes con DN, se correlacionan con la gravedad de la enfermedad renal (FIGs. 10A-B). Se muestran los efectos sobre el BUN, fósforo y ácido úrico en las FIGs. 11A-C.

5 Los pacientes tratados con dosis más altas (75 o 150 mg) de RTA 402 mostraron modestas elevaciones (aproximadamente del 20 al 25%) en la proteinuria. Esto es consistente con los estudios que indican que un mejor  
 10 rendimiento de GRF se correlaciona con proteinuria aumentada. Por ejemplo, en un estudio clínico a largo plazo de más de 25.000 pacientes, el tratamiento con ramipril (un inhibidor de la ACE) ralentizó la tasa de disminución de eGFR más eficazmente que el telmisartán (un bloqueante del receptor de angiotensina) o la combinación de ramipril y telmisartán (Mann *et al.*, 2008). A la inversa, la proteinuria se incrementó más en el grupo del ramipril que en los otros dos grupos. Los principales resultados renales también fueron mejores con cualquiera de los fármacos solo que en la  
 15 terapia de combinación, aunque la proteinuria aumentó menos en el grupo de la terapia de combinación. Otros estudios han mostrado que fármacos que reducen la GFR, como los inhibidores de ACE, también reducen la proteinuria (Lozano *et al.*, 2001; Sengul *et al.*, 2006). Otros estudios han mostrado que los fármacos que aumentan intensamente la GFR, como ciertos bloqueantes del canal de calcio, aumentan la proteinuria hasta un 60% durante la dosificación a corto  
 20 plazo (Agodoa *et al.*, 2001; Viberti *et al.*, 2002).

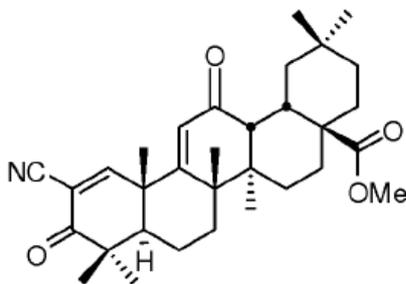
## 15 Referencias

- Patente de EE.UU. 6.025.395
- Patente de EE.UU. 6.326.507
- Patente de EE.UU. 6.974.801
- Patente de EE.UU. Prov. 60/955.939
- 20 Solicitud de Patente de EE.UU. 12/191.176
- Agodoa et al., JAMA, 285: 2719-2728, 2001.
- Ahmad et al., J. Biol. Chem., 281: 3576-3579, 2006.
- Aschner et al., Diabetes Care, 29(12): 2632-2637, 2006.
- Blann et al., Thromb. Haemost., 93: 228-35 (2005).
- 25 De Fronzo et al., Am. J. Physiol., 287(3): E214-223, 1979.
- Dinkova-Kostova et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(12): 4584-4589, 2005.
- Goldstein et al., Diabetes Care, 30(8): 1979-1987, 2007.
- Goodman et al., Kidney Int., 72: 945-953, 2007.
- Honda et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 12: 1027-1030, 2002.
- 30 Honda et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 19: 2711-2714, 1998.
- Honda et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 9: 3429-3434, 1999.
- Honda et al., J. Med. Chem., 43: 1866-1877, 2000a.
- Honda et al., J. Med. Chem., 43: 4233-4246, 2000b.
- Honda et al., Med. Chem. Lett., 7: 1623-1628, 1997.
- 35 Honda et al., Org. Biomol. Chem., 1: 4384-4391, 2003.
- Huang et al., Cancer Res., 54: 701-708, 1994.
- Ikeda et al., Cancer Res., 63: 5551-5558, 2003.
- Ikeda et al., Mol. Cancer Ther., 3: 39-45, 2004.
- Kobayashi & Yamamoto, Antiox. Redox. Signal., 7: 385-394, 2005.
- 40 Liby et al., Cancer Res., 65: 4789-4798, 2005.
- Liu, J. Ethnopharmacol., 49: 57-68, 1995.
- Lozano et al., Nephrol. Dial. Transplant., 16[Supl. 1]: 85-89, 2001.

- Ma et al., *Am. J. Pathol.*, 168: 1960-1974, 2006.
- Mann et al., *The Lancet*, 372: 547-553, 2008.
- Maines & Gibbs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338: 568-577, 2005.
- Minns et al., *Gastroenterology*, 127: 119-26, 2004.
- 5 Mix et al., *Mol. Pharmacol.*, 65: 309-318, 2004.
- Nath, *Kidney Int.*, 70: 432-443, 2006.
- Nichols, *Drug News Perspect.*, 17: 99-104, 2004.
- Nischino et al., *Cancer Res.*, 48: 5210-5215, 1998.
- Place et al., *Clin. Cancer Res.*, 9: 2798-2806, 2003.
- 10 Pullman et al., *Vasc. Health Risk Manag.*, 2(3): 203-212, 2006.
- Repka, MA, McGinity, JW, Zhang, F, Koleng, JJ. Hot-melt extrusion technology. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 2nd ed, New York, NY: Marcel Dekker, 2002: 203-206.
- Sengui et al., *Diab. Res. Clin. Pract.*, 71: 210-219, 2006.
- Shishodia et al., *Clin. Cancer Res.*, 12(6): 1828-1838, 2006.
- 15 Suh et al., *Cancer Res.*, 63: 1371-1376, 2003.
- Suh et al., *Cancer Res.*, 58: 717-723, 1998.
- Suh et al., *Cancer Res.*, 59(2): 336-341, 1999.
- Tumlin et al., *Am. J. Cardiol.*, 98: 14K-20K, 2006.
- Viberti et al., *Circulation*, 106: 672-678, 2002.
- 20 Wang et al., *Mol. Endocrinol.*, 14: 1550-1556, 2000.
- Wardle, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16: 1764-1768, 2001.
- Wermuth and Stahl, In: *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use-A Handbook*, Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002.
- Yao et al., *Am. J. Med. Sci.*, 334(2): 115-24, 2007.
- 25 Yates et al., *Mol. Cancer Ther.*, 6(1): 154-162, 2007.
- Yoh et al., *Kidney Int.*, 60, 1343-1353, 2001.
- Zingarelli et al., *Crit. Care Med.*, 31: S105-S111, 2003.
- Zoccali, *J. Amer. Soc. Nephrol.*, 17: S61-S63, 2006.

## REIVINDICACIONES

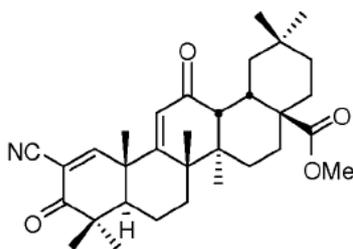
1. Un compuesto de la fórmula



para usar en un método de mejora de la función renal (riñón) en un sujeto.

- 5 2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene enfermedad renal crónica (ERC) o muestra síntomas de enfermedad renal/de riñón (RKD).
3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene una nefropatía diabética (DN) o muestra síntomas de DN.
- 10 4. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde la función renal mejorada se refleja por una tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) mejorada.
5. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde la función renal mejorada se refleja por un nivel mejorado de creatinina sérica.
6. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene resistencia a la insulina o muestra uno o más síntomas de resistencia a la insulina.
- 15 7. El compuesto para el uso de la reivindicación 2, en donde el sujeto también tiene enfermedad cardiovascular (CVD) o muestra uno o más síntomas de CVD.
8. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, en donde el sujeto es un ser humano.
9. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8, en donde al menos una porción del compuesto está presente como una forma cristalina que tiene un patrón de difracción de rayos X (CuK $\alpha$ ) que comprende picos de difracción significativos a aproximadamente 8,8, 12,9, 13,4, 14,2 y 17,4 $^{\circ}$ 2 $\theta$ .
- 20 10. El compuesto para el uso de la reivindicación 9, en donde el patrón de difracción de rayos X (CuK $\alpha$ ) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 12A o en la FIG. 12B.
11. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8, en donde al menos una porción del compuesto está presente como una forma amorfa que tiene un patrón de difracción de rayos X (CuK $\alpha$ ) con pico en halo a aproximadamente 13,5 $^{\circ}$  2 $\theta$ , sustancialmente como se muestra en la FIG. 12C y una T $_g$  de 120 $^{\circ}$ C a 135 $^{\circ}$ C.
- 25 12. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en donde la T $_g$  es de 125 $^{\circ}$ C a 130 $^{\circ}$ C.
13. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, en donde el compuesto se formula para administración oral, intraarterial o intravenosa.
14. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, en donde el compuesto se formula como una cápsula o un comprimido duro o blando.
- 30 15. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, en donde el compuesto se formula como una dispersión polimérica.
16. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8, 13 y 14, en donde el compuesto se formula como un copolímero de ácido metacrílico/acrilato de etilo (1:1) como un excipiente.
- 35 17. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 16, en donde el compuesto se administra a una dosis diaria de 10 mg a 200 mg.
18. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 16, donde el compuesto se administra a una dosis diaria de 0,1 mg a 30 mg.

19. Un compuesto de la fórmula



para usar en un método de tratamiento de la enfermedad renal/de riñón (RKD) en un sujeto.

20. El compuesto para el uso de la reivindicación 19, en donde la RKD es nefropatía diabética (DN).

5 21. El compuesto para el uso de la reivindicación 19, en donde la RKD es RKD crónica.

22. El compuesto para el uso de la reivindicación 19, en donde el sujeto tiene RKD y diabetes.

23. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 22, en donde el sujeto es un ser humano.

24. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 23, en donde al menos una porción del compuesto está presente como una forma cristalina que tiene un patrón de difracción de rayos X (CuK $\alpha$ ) que comprende picos de difracción significativos a aproximadamente 8,8, 12,9, 13,4, 14,2 y 17,4 $^{\circ}$ 2 $\theta$ .

25. El compuesto para el uso de la reivindicación 24, en donde el patrón de difracción de rayos X (CuK $\alpha$ ) es sustancialmente como se muestra en la FIG. 12A o en la FIG. 12B.

26. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 23, en donde al menos una porción del compuesto está presente como una forma amorfa que tiene un patrón de difracción de rayos X (CuK $\alpha$ ) con pico en halo a aproximadamente 13,5 $^{\circ}$  2 $\theta$ , sustancialmente como se muestra en la FIG. 12C y una T $_g$  de 120 $^{\circ}$ C a 135 $^{\circ}$ C.

27. El compuesto para el uso de la reivindicación 26, en donde la T $_g$  es de 125 $^{\circ}$ C a 130 $^{\circ}$ C.

28. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 27, en donde el compuesto se formula para administración oral, intraarterial o intravenosa.

29. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 28, en donde el compuesto se formula como una cápsula o un comprimido duro o blando.

30. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 29, en donde el compuesto se formula como una dispersión polimérica.

31. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 23, 28 y 29, en donde el compuesto se formula como un copolímero de ácido metacrílico/acrilato de etilo (1:1) como un excipiente.

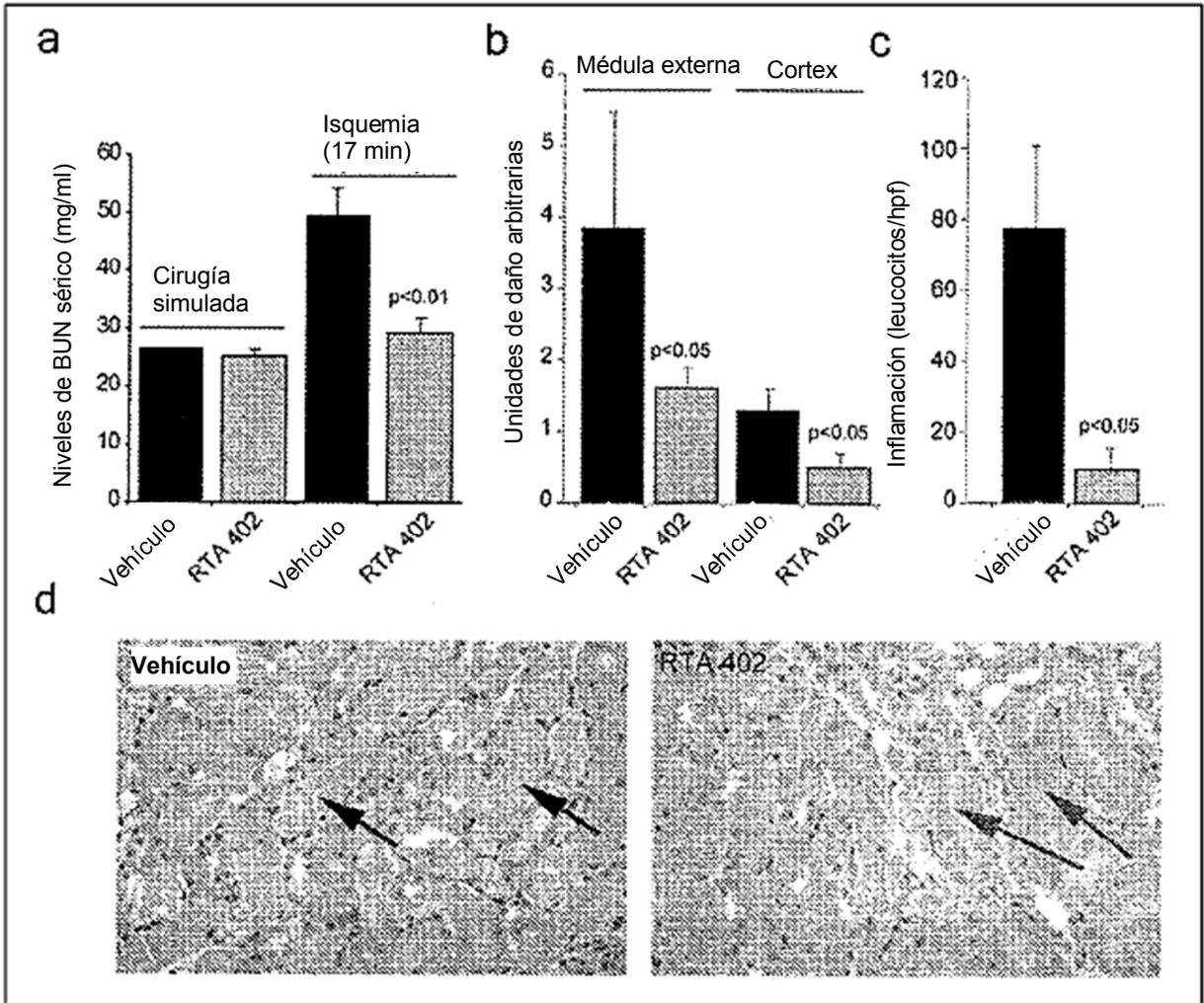
32. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 31, donde el compuesto se administra a una dosis diaria de 10 mg a 200 mg.

33. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 31, donde el compuesto se administra a una dosis diaria de 0,1 mg a 30 mg.

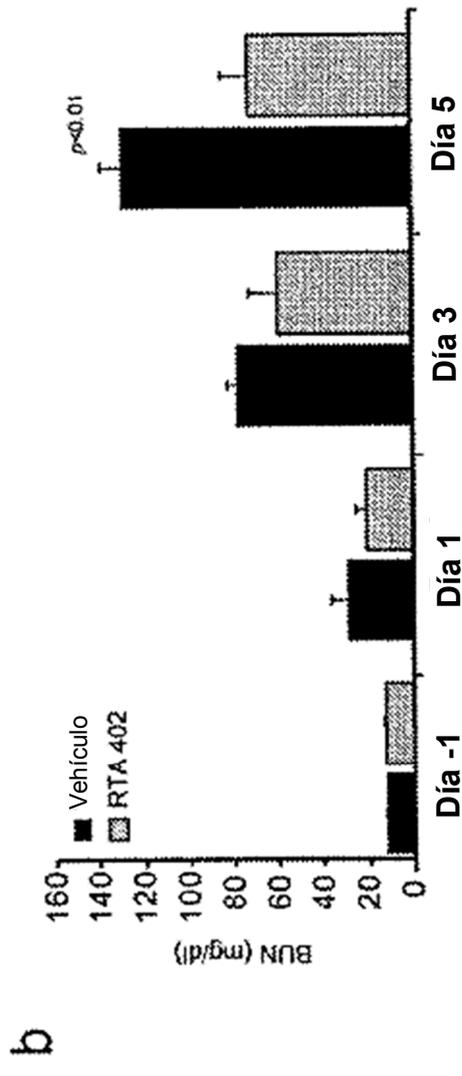
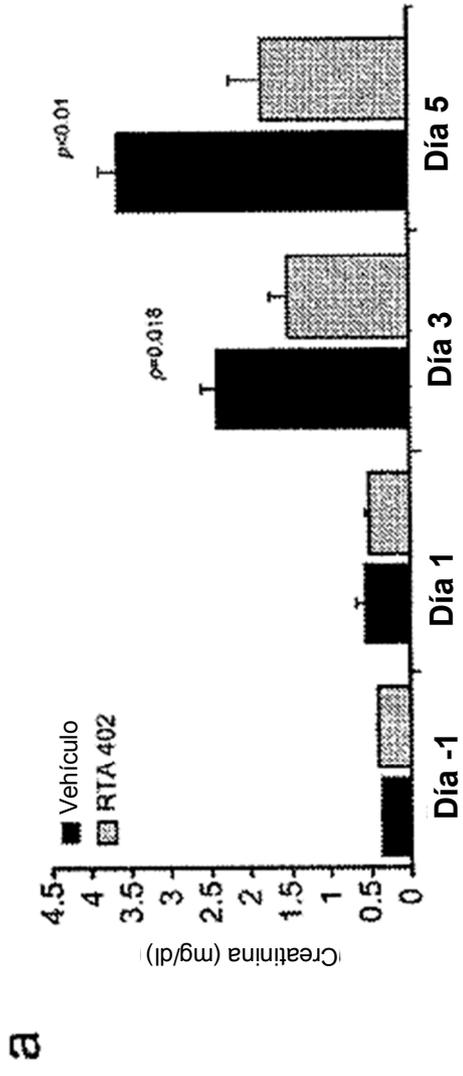
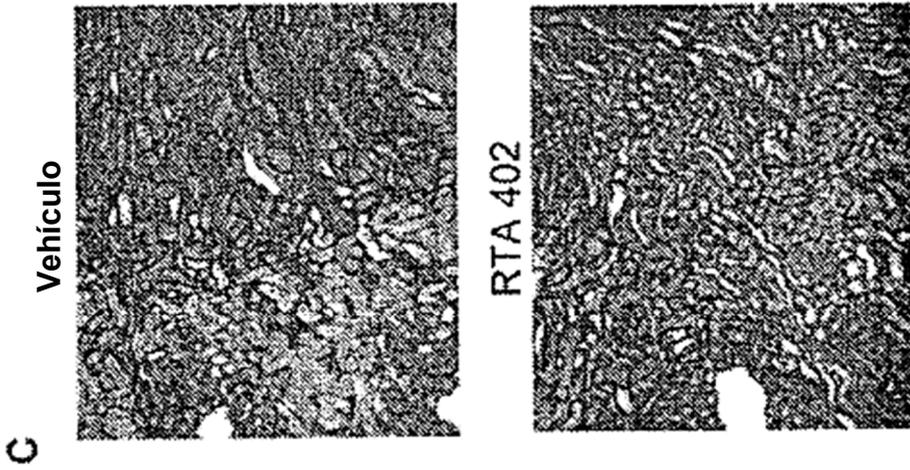
34. El compuesto para usar de la reivindicación 19 o 20, en donde el compuesto mejora la función renal.

35. El compuesto para usar de la reivindicación 34, en donde la función renal mejorada se refleja por una tasa de filtración glomerular estimada mejorada.

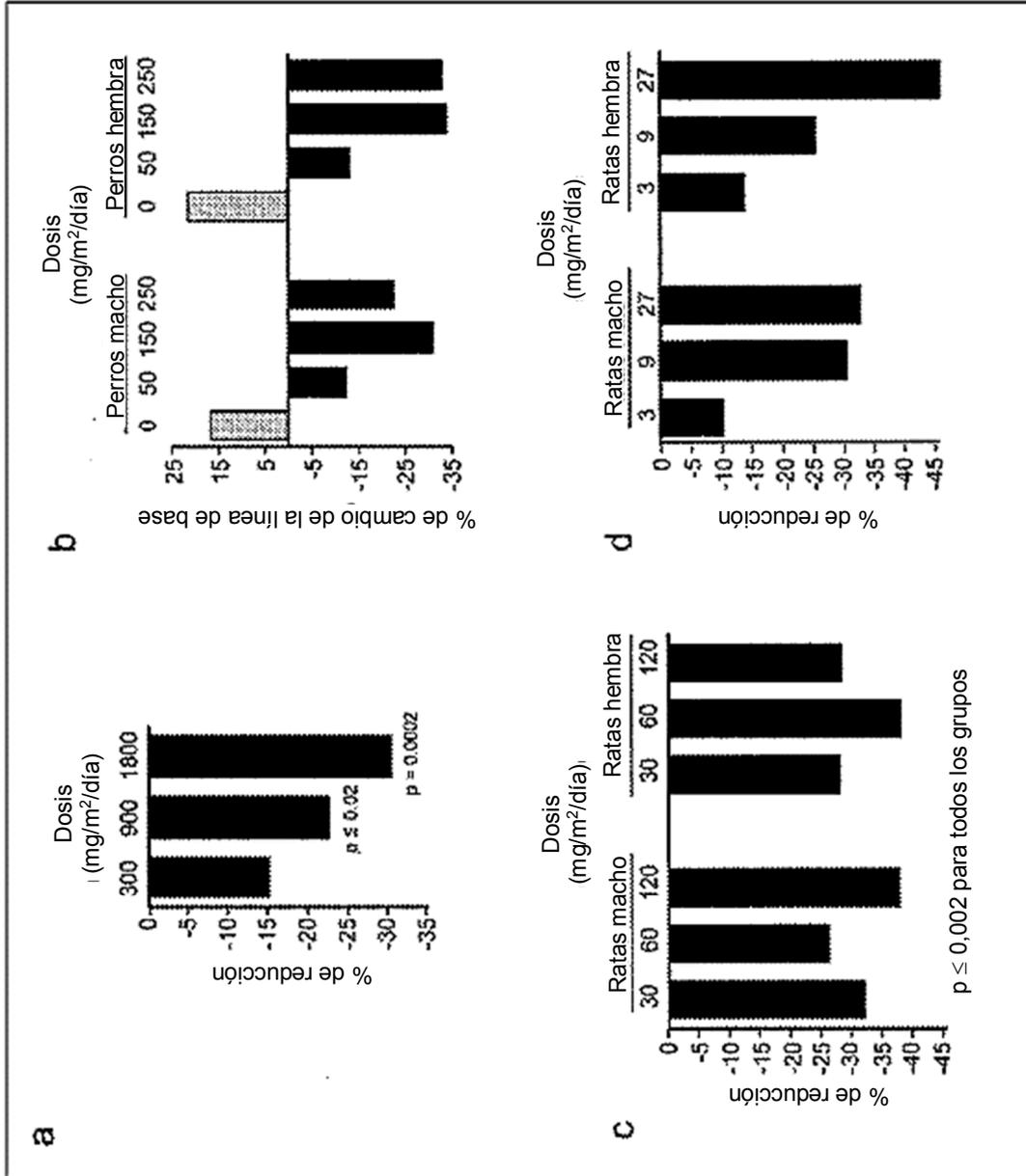
36. El compuesto para usar de la reivindicación 34, en donde la función renal mejorada se refleja por un nivel mejorado de creatinina sérica.



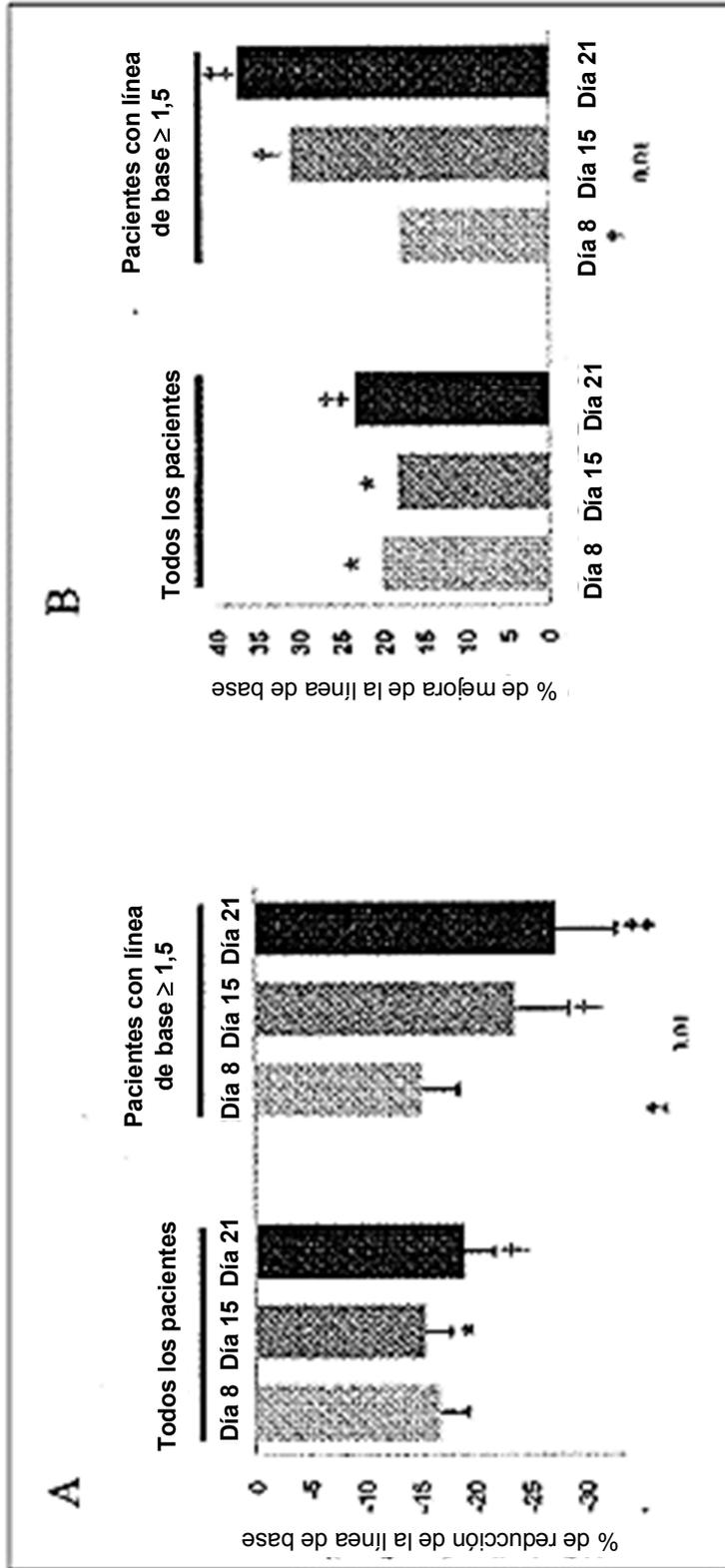
FIGS. 1a-d



FIGS. 2a-c



FIGS. 3a-d



FIGS. 4A-B

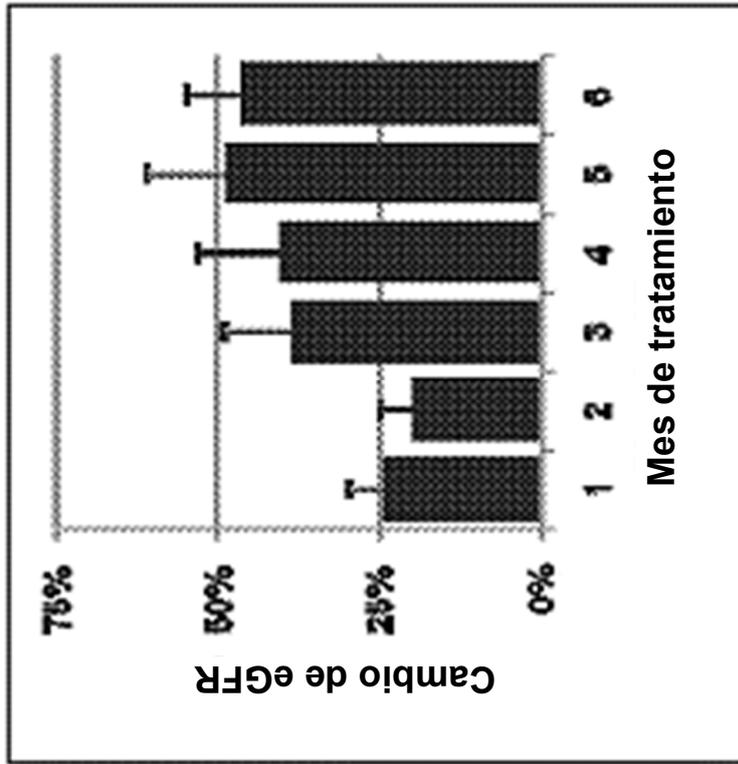


FIG. 5

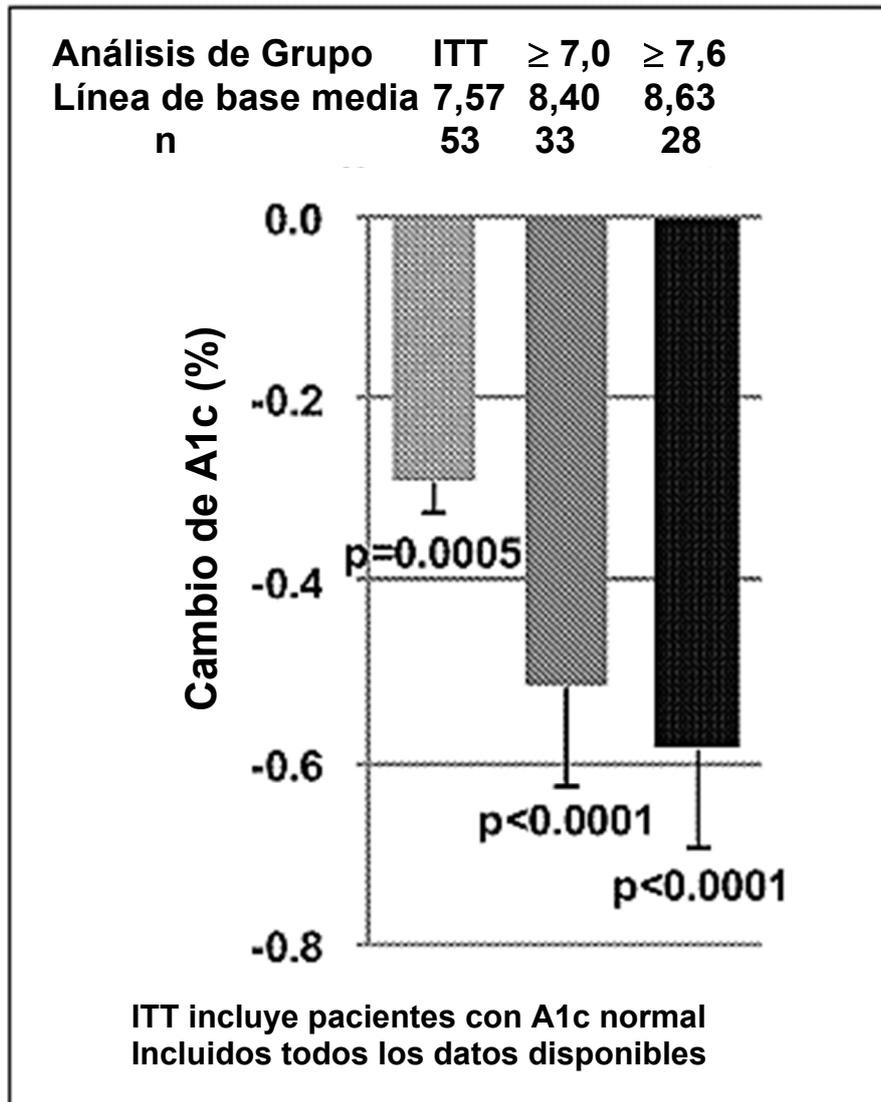


FIG. 6

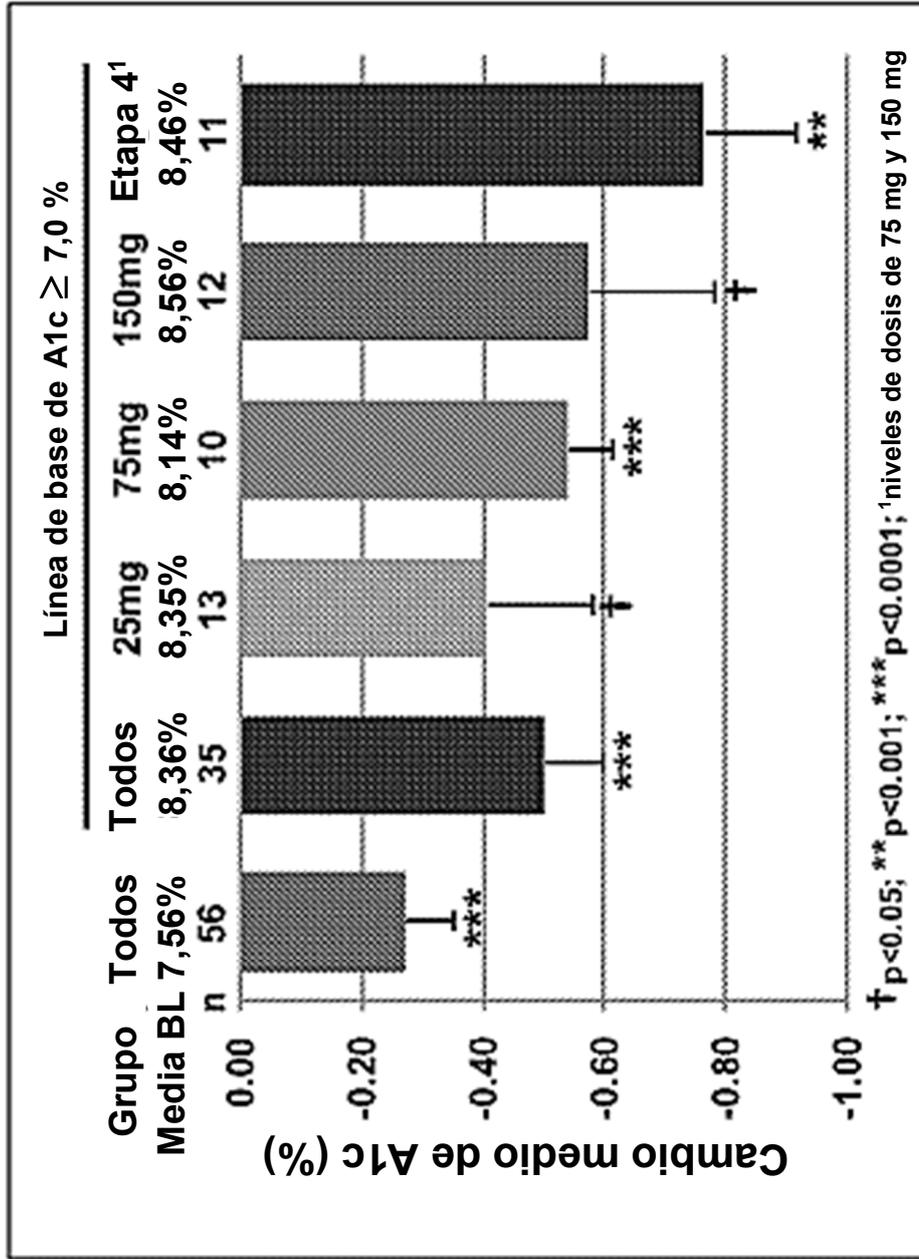


FIG. 7

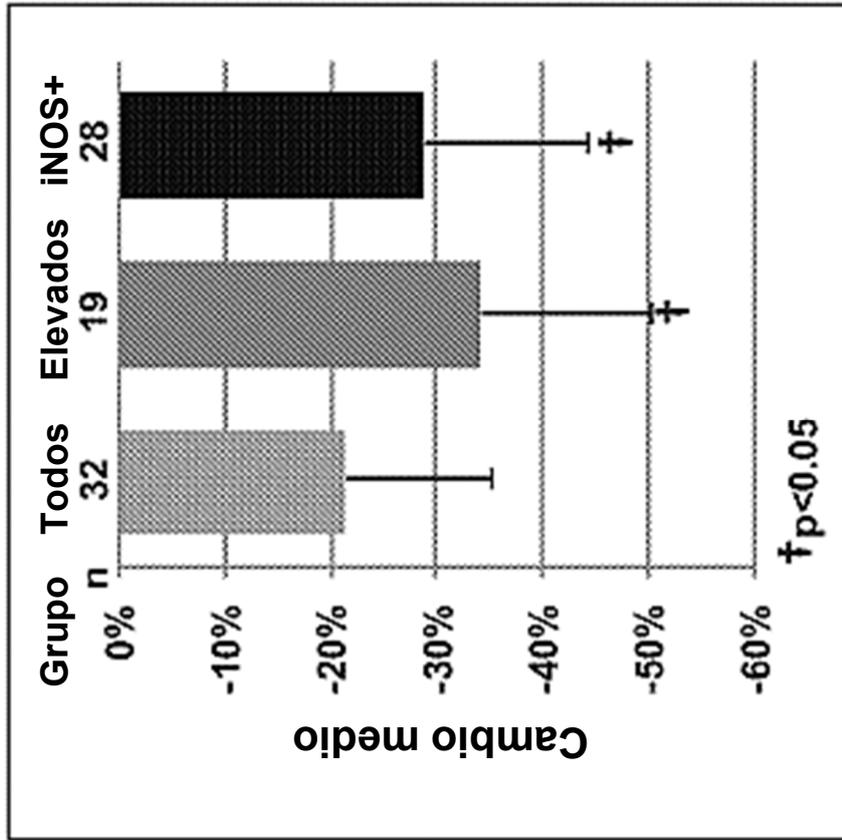


FIG. 8

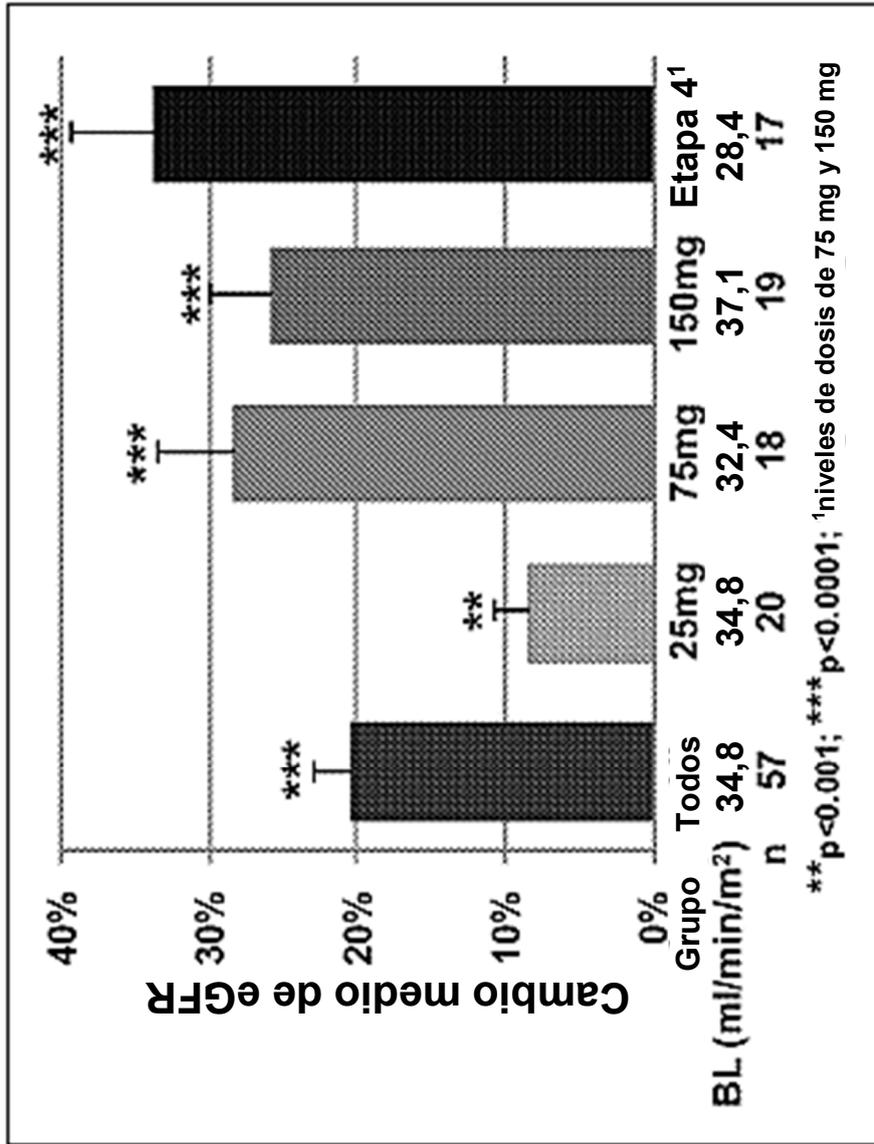
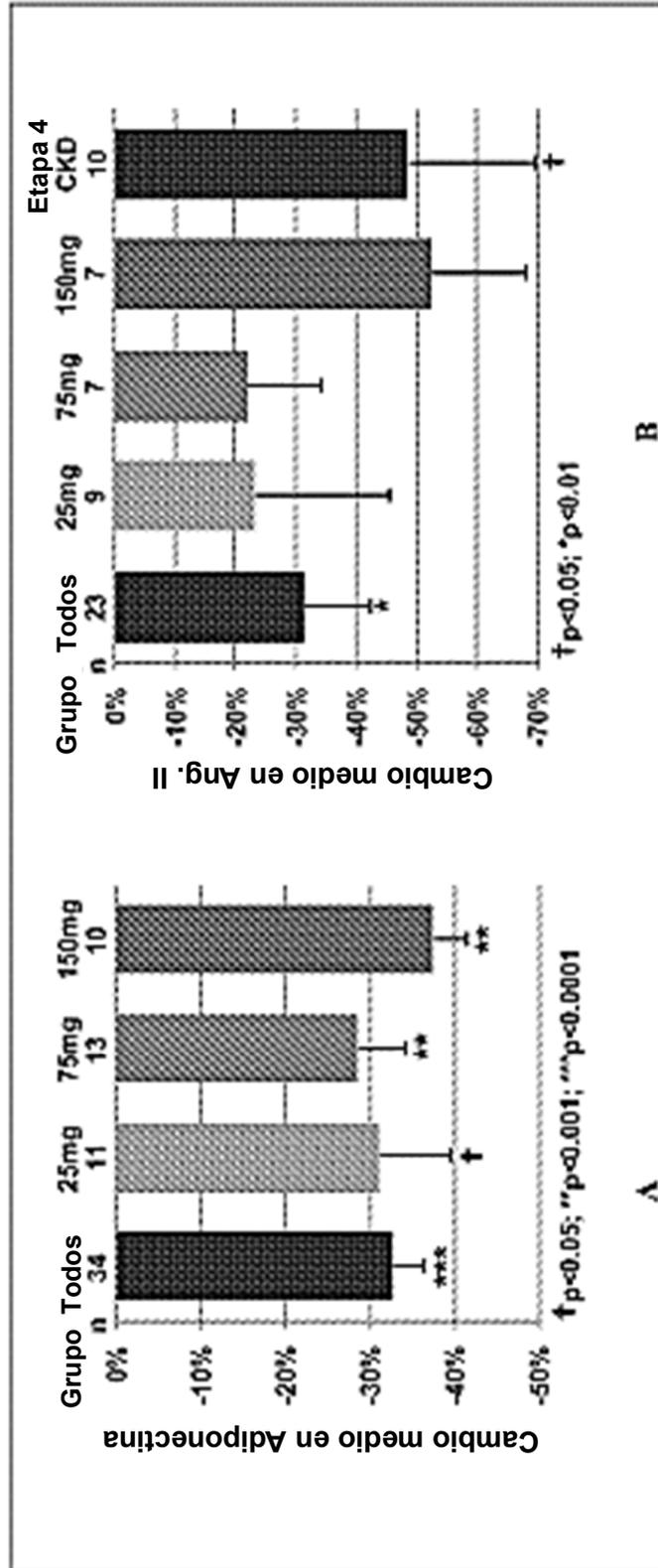
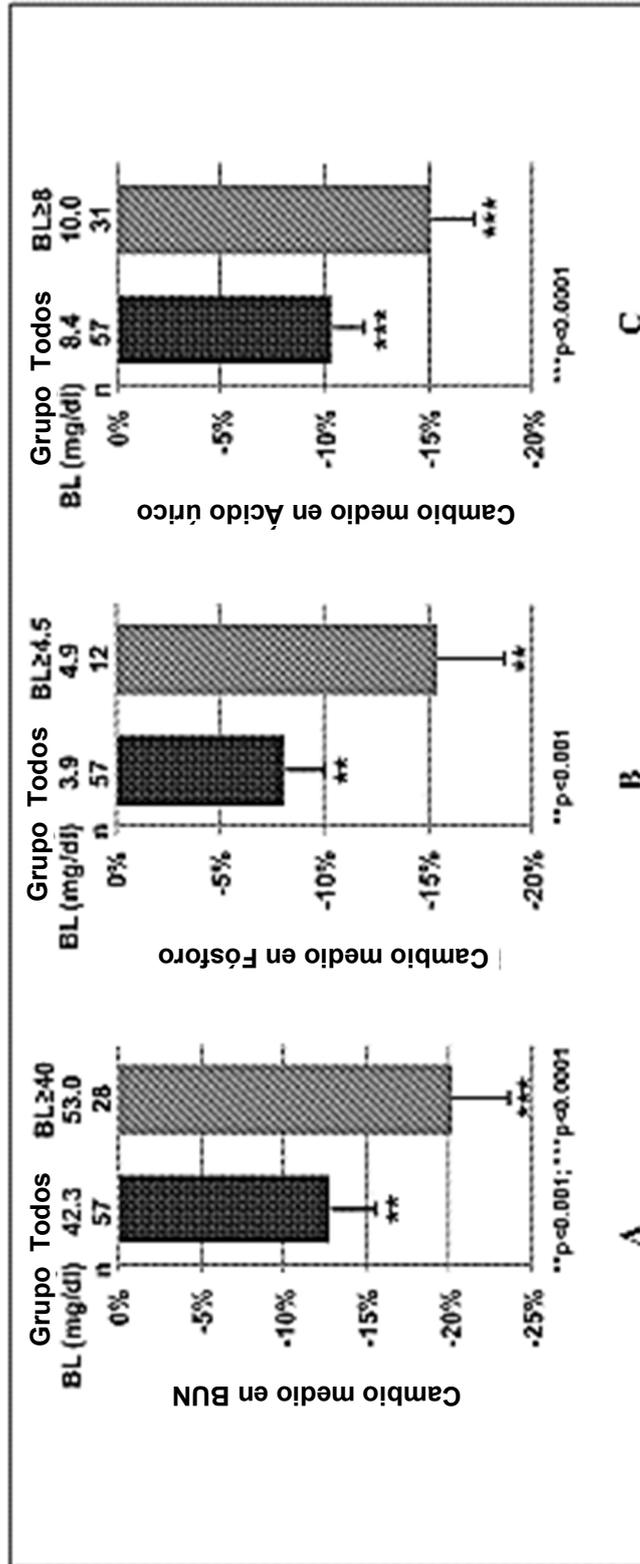


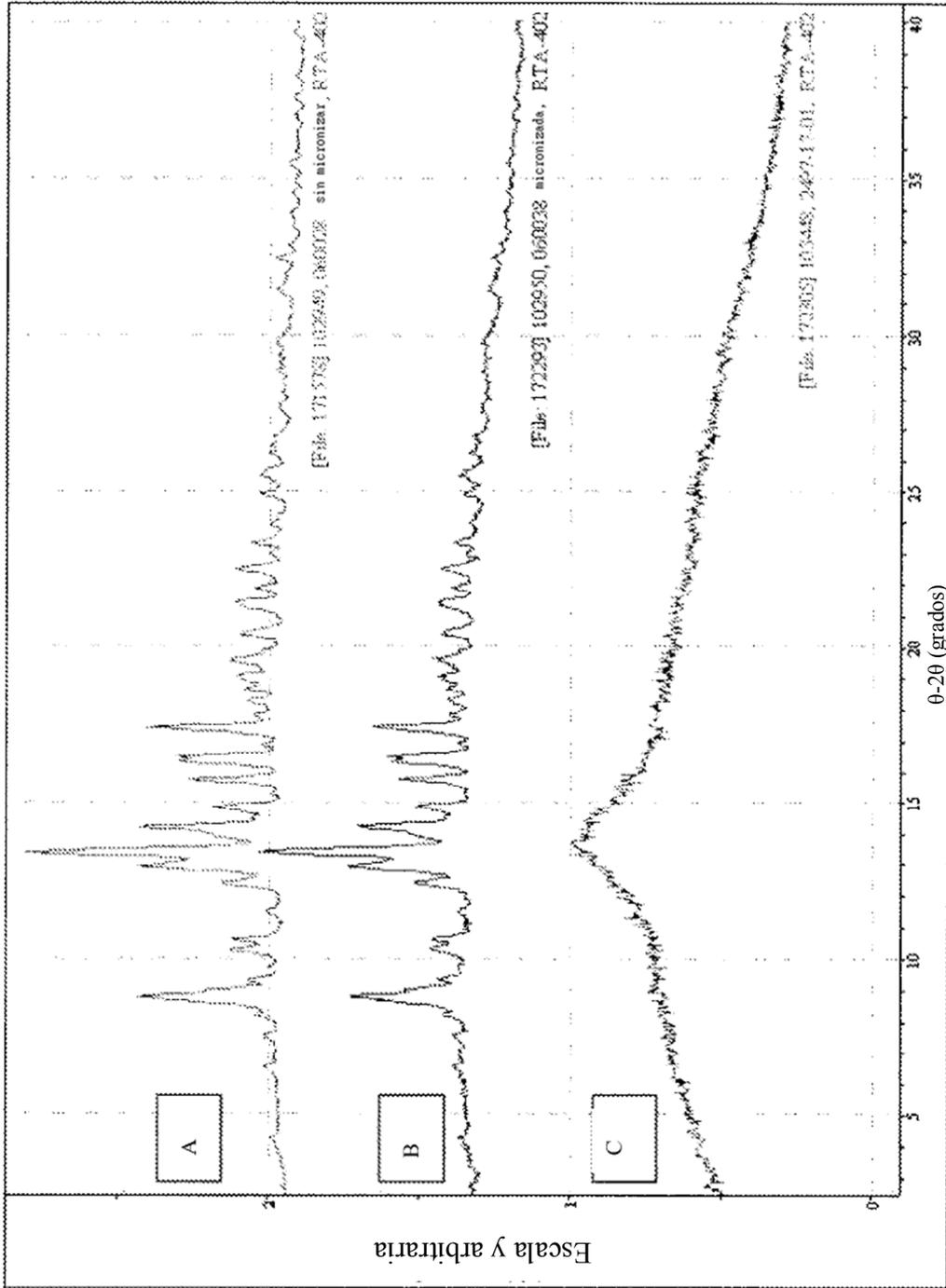
FIG. 9



FIGS. 10A-B



FIGS. 11A-C



FIGS. 12A-C

Muestra: RTA-402  
Tamaño: 4.4000 mg  
Método: 25-250-10  
Comentario: 102949, 060028 unmicronized, C, 10°C/min, 2429-98-02, r1, p1

Archivo: I:\JMS\EP20060937\DSC\181883.dsc  
Operador: kal  
Fecha de realización: 2006-07-27 13:28  
Instrumento: DSC Q1000 V9.0 Build 275

DSC

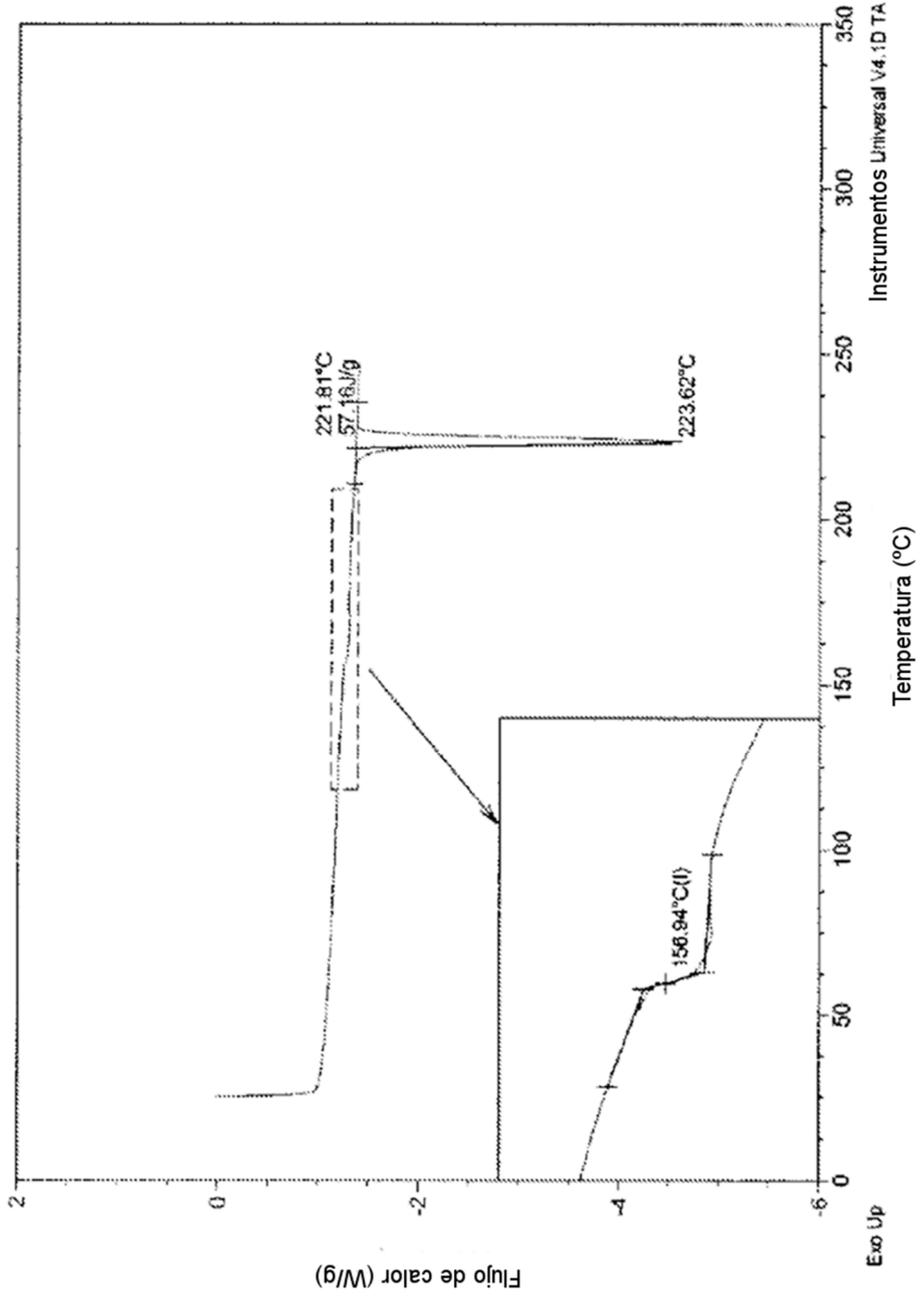


FIG. 13

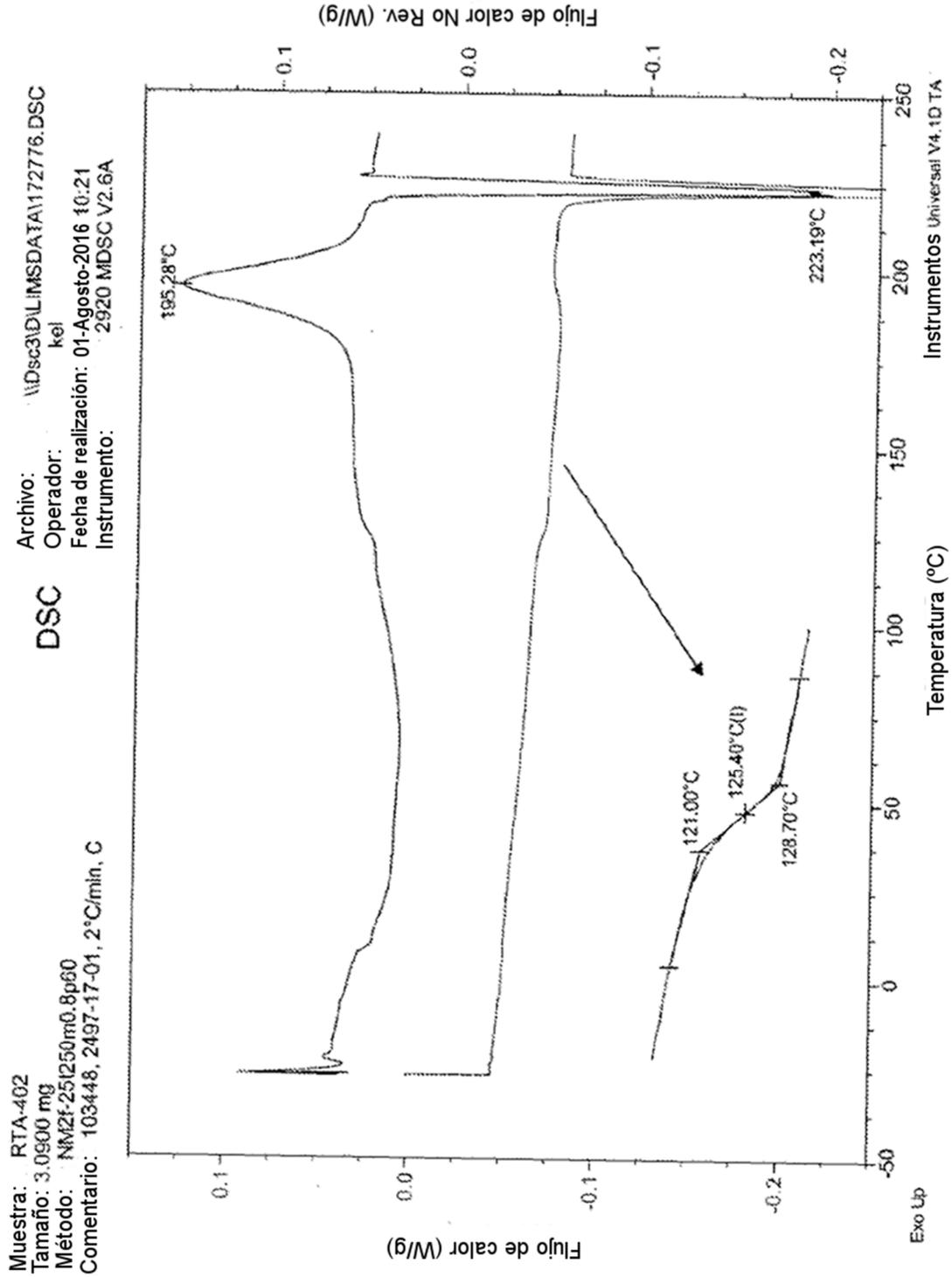


FIG. 14

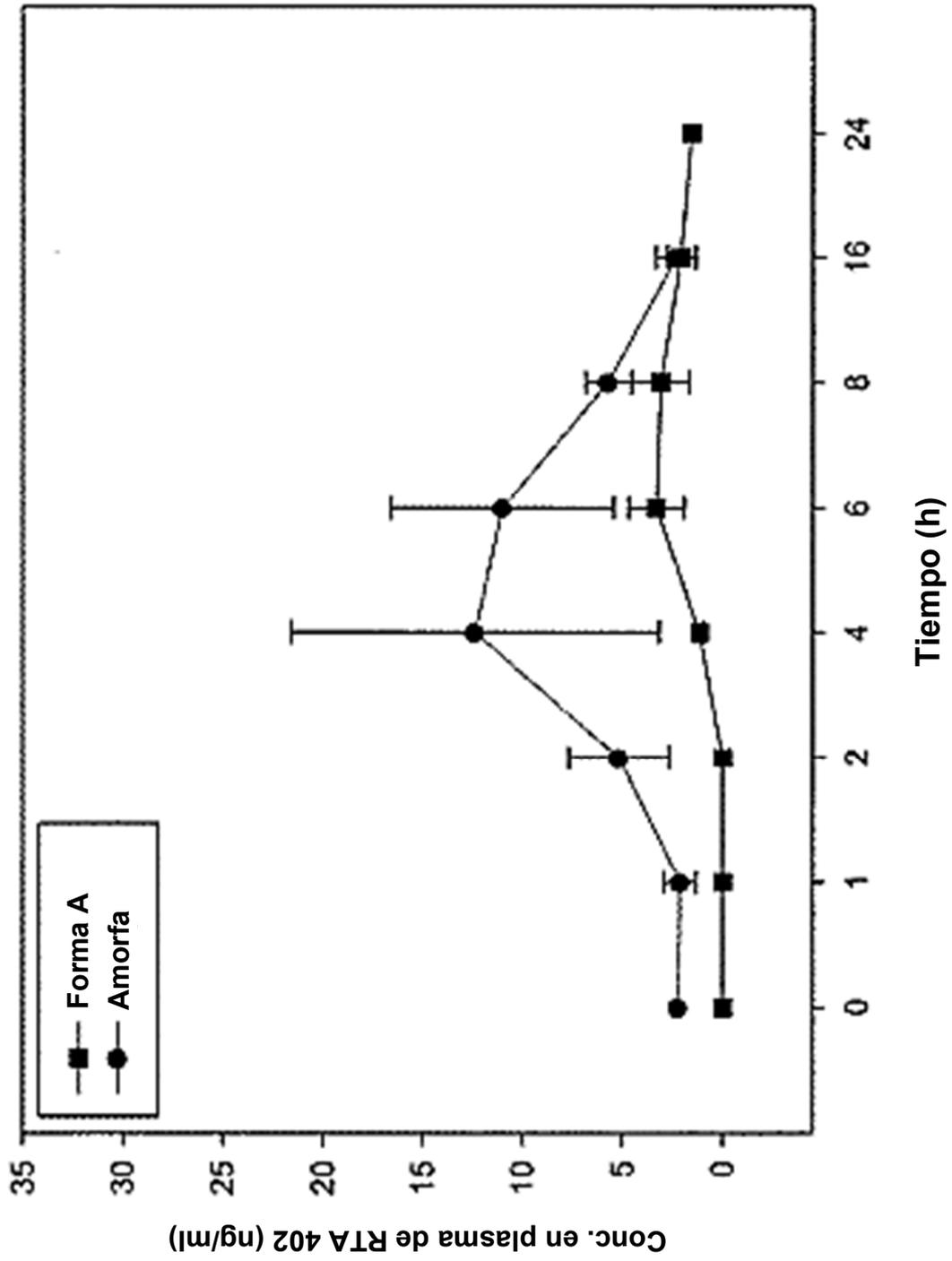


FIG. 15