

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 093**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/357** (2006.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2020** **E 20207534 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022** **EP 4000615**

54 Título: **Antagonistas de TNFR1 y agonistas de TNFR2 dobles para uso en enfermedades renales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.12.2022**

73 Titular/es:

**SERODUS ASA (100.0%)**  
**Bygdøy Alle 89**  
**0268 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**STEINESS, EVA y**  
**SKARSFELDT, TORBEN FRANK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 930 093 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

Antagonistas de TNFR1 y agonistas de TNFR2 dobles para uso en enfermedades renales

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere al descubrimiento de que ciertos 2,4-difenil-1,3-dioxanos son capaces de disminuir el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (sTNFR1) y son capaces de incrementar el receptor 2 del factor de necrosis tumoral (sTNFR2). Por lo tanto, el perfil mixto de reducción de sTNFR1 y aumento de sTNFR2 hace que esos compuestos sean candidatos prometedores de fármacos, para uso en el tratamiento de enfermedades renales, en particular en el tratamiento de ciertas subpoblaciones de pacientes que padecen una enfermedad renal, en donde la vía proinflamatoria de TNFR1 es muy elevada. Por tanto, la presente invención se refiere a ciertos 2,4-difenil-1,3-dioxanos para uso en el tratamiento de una enfermedad renal, en particular la nefropatía diabética, en una subpoblación de pacientes caracterizados por tener un nivel sérico de sTNFR1 > 2,9 ng/mL y/o ACR > 300 mg/g.

**Antecedentes de la invención**

15 La nefropatía diabética es un término médico que se utiliza para indicar enfermedades o lesiones en el riñón de pacientes diabéticos, que eventualmente conducen a una enfermedad renal crónica (ERC). Es una enfermedad progresiva y es más común en personas que han tenido diabetes de tipo 1 o tipo 2 durante un período de tiempo prolongado, como 10-20 años o más. La nefropatía diabética es relativamente común y se estima que alrededor del 40 por ciento de las personas que tienen diabetes de tipo 1 o 2, desarrollan alguna etapa de la ERC. Además, en 2019, la Federación Internacional de Diabetes estimaba que 463 millones de personas en todo el mundo padecen diabetes. La ERC se puede clasificar en cinco etapas, en donde la etapa 5 (insuficiencia renal o enfermedad renal en etapa terminal (ERET)) es la última, que es cuando el paciente requerirá una diálisis regular o trasplante de riñón. Las etapas están determinadas por la extensión del daño renal y la tasa de filtración glomerular (TFG). Los signos de daño renal se pueden ver en sangre, orina, en biopsias renales o mediante estudios de formación de imágenes, e incluyen la medición del índice albúmina/creatinina (ACR). Etapa 1: existe daño renal pero con una función renal normal o relativamente alta, con una tasa de filtración glomerular superior a 90; etapa 2: existe daño renal con cierta pérdida de la función renal; TFG entre 60 y 89, etapa 3: pérdida leve a grave de la función renal; TFG entre 30 y 59, etapa 4: pérdida grave de la función renal; TFG entre 15 y 29 y etapa 5: insuficiencia renal; TFG inferior a 15.

Según un informe reciente de los EE.UU. (U.S. Renal Data System Annual Data Report 2019, Centers for Medicare & Medicaid Services), se registraron 124.500 nuevos casos de ERET en el año 2017, y más de 746.557 estadounidenses estaban siendo tratados por ERET, de los cuales alrededor del 39% de los casos se debían a una nefropatía diabética. Los costes del tratamiento son asombrosos: en 2017, el tratamiento con hemodiálisis costaba un promedio de 91.795 USD por paciente anualmente en los Estados Unidos, lo que equivale a un coste anual total en hemodiálisis en los Estados Unidos de alrededor de 28 mil millones de USD; en 2017, el gasto total del servicio médico Medicare en pacientes con ERC y ERET superaba los 120 mil millones de USD. Además de los enormes costes económicos para la sociedad, los pacientes afectados por ERC o ERET también se ven seriamente impedidos personalmente en su vida diaria y, a menudo, tienen grandes dificultades para conservar trabajos ordinarios, ya que su enfermedad requiere graves restricciones en la dieta y, al final, una diálisis muy frecuente. Por lo general, cada tratamiento de diálisis dura unas cuatro horas y se realiza tres veces por semana.

40 La ERC puede deberse a diferentes enfermedades renales, como la nefropatía diabética, la glomerulonefritis, la glomeruloesclerosis o la nefroesclerosis hipertensiva, a pesar de que la etiología y la patología causantes de las enfermedades renales difieren. La glomerulonefritis se refiere a una inflamación en los glomérulos (los pequeños capilares en el riñón rodeados por la cápsula de Bowman) y puede estar debida a una respuesta autoinmune o por infecciones y generalmente da lugar a uno o ambos síndromes nefróticos o nefríticos. La glomeruloesclerosis se refiere a una fibrosis o endurecimiento de los glomérulos y puede deberse a diferentes etiologías, como obesidad mórbida, infección por VIH, defectos de nacimiento, toxicomanía o causas genéticas. La nefroesclerosis hipertensiva se refiere a un daño en el riñón debido a presión arterial alta crónica que causa hiperfiltración, lo que da lugar a un endurecimiento y engrosamiento del tejido renal, incluidos los glomérulos, los túbulos renales y los tejidos intersticiales. La nefropatía diabética se refiere a un daño en los riñones de pacientes que padecen diabetes. Se cree que la fisiopatología de la nefropatía diabética implica una interacción entre factores hemodinámicos y metabólicos. Los factores hemodinámicos incluyen un aumento de la presión sistémica e intraglomerular, así como una sobreactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Debido a la mayor carga de glucosa filtrada en los pacientes diabéticos con un control insuficiente del azúcar en sangre, existe una regulación al alza del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT2) en los túbulos proximales, que cotransporta sodio y glucosa de vuelta a la circulación. Esto conduce a una disminución en el suministro de cloruro de sodio a la mácula densa en los túbulos distales. Las células de la mácula densa detectan el cambio en los niveles de cloruro de sodio y desencadenan una respuesta de autorregulación al liberar renina y sobreactivar el SRAA, lo que aumenta la presión arterial. Además, los factores metabólicos incluyen la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) debido a la mayor concentración de azúcar en sangre en los pacientes diabéticos, con un control insuficiente de la glucosa en sangre. Los productos AGEs formados activan los receptores RAGE, que es un receptor de transducción de señales que se encuentra en varios tipos de células, incluidos macrófagos, células endoteliales, células mesangiales renales y podocitos en el glomérulo. La activación de los receptores RAGE mejora la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) citosólicas y estimula las moléculas

intracelulares, como el factor nuclear kappa B (NF-kB). Esos factores provocan una lesión de los podocitos, estrés oxidativo, inflamación y fibrosis y, a su vez, una disminución de la función renal. La nefropatía diabética suele estar acompañada de albuminuria con hiperfiltración glomerular e hipertrofia renal en la etapa inicial, seguida de un aumento del contenido urinario en albúmina y una disminución gradual de la TFG, que a menudo muestra un curso de deterioro que conducirá a ERET. Los tratamientos actuales contra la nefropatía diabética incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para disminuir la presión arterial, medicamentos hipoglucemiantes para mantener un control estricto de la glucosa en sangre, así como medidas del estilo de vida que incluyen ejercicio y una dieta saludable. Recientemente, el tratamiento con empagliflozina (un inhibidor del transportador de glucosa 2 dependiente de sodio) también ha mostrado que estabiliza la función renal.

Actualmente, se utilizan dos pruebas para diagnosticar la ERC: eTFG (TFG estimada) basada en creatinina y ACR (índice albúmina-creatinina). La tasa de filtración glomerular (TFG) describe el volumen de líquido filtrado por unidad de tiempo en el riñón, desde los capilares glomerulares hacia la cápsula de Bowman. El aclaramiento de creatinina es el volumen de plasma sanguíneo del que se aclara la creatinina por unidad de tiempo y es una medida útil para aproximarse a la TFG, ya que la creatinina se filtra libremente a través de los glomérulos y no se reabsorbe en los túbulos. ACR es una medida del índice entre albúmina y creatinina en orina. La albúmina es una de las primeras proteínas que se detecta en la orina de pacientes con daño renal y también constituye la mayor proporción entre las proteínas excretadas. La albúmina es una proteína plasmática que está presente en altas concentraciones en la sangre, y cuando los riñones funcionan correctamente, prácticamente no hay albúmina presente en la orina. Sin embargo, si los riñones de una persona se dañan o enferman, a menudo pueden perder su capacidad para conservar la albúmina y otras proteínas.

Los pacientes a los que se ha diagnosticado nefropatía diabética presentan un deterioro renal progresivo. Progresa a un ritmo casi constante y lineal hasta que se alcanza la ERET, aunque con ritmos muy diferentes entre los individuos. Los métodos de diagnóstico actualmente empleados mencionados anteriormente, ACR y eTFG basada en creatinina, no pueden distinguir de manera segura qué disminuciones serán "muy rápidas", "rápidas", "moderadas" o "lentas". Por lo tanto, un aumento de la excreción urinaria de albúmina es un determinante importante de una progresión de la enfermedad nefropatía diabética, pero no explica por completo el fenómeno de por qué algunos grupos de pacientes tienen un deterioro renal progresivo más rápido, en comparación con otros grupos de pacientes, a pesar de tener inicialmente valores similares de ACR y/o de eTFG.

La superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) es una superfamilia de proteínas de receptores de citocina caracterizada por la capacidad de unirse a factores de necrosis tumoral (TNFs) a través de un dominio extracelular rico en cisteínas. La familia comprende el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1) y el receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR2), entre otros receptores. TNFR1 y TNFR2 existen en forma de receptores unidos a la membrana (mTNFR1 y mTNFR2) y como formas solubles (sTNFR1 y sTNFR2) y se activan mediante la unión de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , que participa en la inflamación sistémica. Por lo tanto, los niveles de TNFR1/2 medidos en suero u orina son las formas solubles (sTNFR1 y sTNFR2). TNF- $\alpha$  también existe tanto en forma soluble (sTNF- $\alpha$ ) como en forma unida a la membrana (mTNF- $\alpha$ ). Una evidencia ha demostrado que mTNFR1 se expresa de manera ubicua en casi todas las células, mientras que mTNFR2 muestra una expresión más limitada, predominantemente en los linfocitos T reguladores (Tregs). Los TNFRs tienen diferentes afinidades hacia el TNF- $\alpha$  soluble (sTNF- $\alpha$ ) y el TNF- $\alpha$  unido a la membrana (mTNF- $\alpha$ ). TNFR1 se une igual de bien a ambas formas, mientras que TNFR2 tiene una mayor afinidad hacia la forma unida a la membrana.

En los últimos años, A. Krolewski y sus colaboradores han propuesto un nuevo modelo de nefropatía diabética en la diabetes de tipo 1 y tipo 2 (*Diabetes Care* 2015; 38:954-962 y *Kidney Int.* Junio 2017; 91(6): 1300-1311) según el cual la característica clínica predominante de las etapas temprana y tardía de una nefropatía diabética es la tasa de deterioro renal progresivo (pendiente de eTFG medida en mL/min/1,73 m<sup>2</sup>/año). Krolewski et al. descubrieron que, si bien la tasa de deterioro renal de un individuo es constante, la pendiente de eTFG varía ampliamente entre los individuos, de -72 a -3,0 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>/año, dependiendo de los niveles séricos de sTNFR1, incluso si los individuos inicialmente tenían valores similares de ACR y/o TFG. Krolewski et al. dividieron a los pacientes en personas con deterioro "muy rápido", "rápido", "moderado" y "lento" y demostraron que las personas con deterioro "rápido" y "muy rápido" sufrían un deterioro desde una eTFG normal a ERET en 2 a 10 años (véase la Fig. 1). Se encontró que el riesgo acumulativo más alto de ERET en los 3 años de seguimiento era para pacientes con sTNFR1 sérico basal > 4,3 ng/mL, independientemente de los valores de otros marcadores como ACR y TFG. Los resultados se resumen en la Fig. 1. El grupo de alto riesgo de los pacientes con nefropatía diabética (el grupo de deterioro renal "rápido") se distingue así de otros grupos de pacientes con nefropatía diabética (como los de deterioro renal "moderado" o "lento"), cuyo deterioro renal progresa más lentamente. Esos grupos de pacientes - con deterioro rápido y moderado - constituyen por tanto grupos distintos de pacientes caracterizados por su estado fisiológico y/o patológico específico al tener valores elevados de sTNFR1 en suero. El hallazgo de que un sTNFR1 sérico elevado determina la tasa de deterioro renal progresivo, sugiere que la vía proinflamatoria del TNFR1 tiene un papel crucial y que los nuevos tratamientos deberían al menos tener como objetivo antagonizar/reducir el TNFR1 para retardar la progresión de la enfermedad.

Hallazgos recientes apuntan a la importancia de los niveles circulantes solubles de sTNFR1 y sTNFR2 en lugar de la transducción de señales celulares a través de los receptores mTNFR1 y mTNFR2 unidos a la membrana. Sin embargo, los mecanismos de regulación de sTNFR aún no se han entendido completamente. Algunos estudios han sugerido

que el TNF- $\alpha$  es el principal regulador, ya que esa citocina induce el desprendimiento de los TNFRs de la membrana. También en la orina, el aumento de la excreción de sTNFRs refleja una mayor eliminación de los TNFRs desde las membranas celulares, lo que puede interpretarse como un marcador del aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  en las células renales activadas. Además, se ha mostrado que existe una fuerte correlación entre los sTNFRs en suero y los sTNFRs en orina. Por lo tanto, niveles altos de sTNFRs en suero corresponden a niveles altos de sTNFRs en orina y viceversa. Aunque el papel fisiológico exacto de los sTNFRs aún se desconoce, recientemente se ha sugerido una participación específica de las vías mediadas por TNFR, en lugar de una inflamación general, en el desarrollo de una pérdida temprana y tardía de la función renal en la diabetes de tipo I y tipo II.

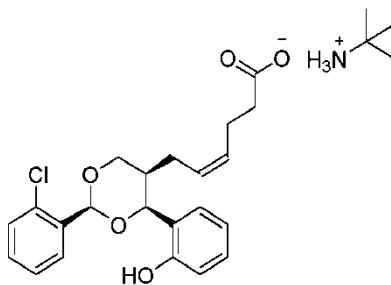
Se sabe que la unión de sTNF- $\alpha$  a través de TNFR1 desencadena principalmente vías proinflamatorias, mientras que la unión de mTNF- $\alpha$  a través de TNFR2 desencadena una modulación inmunitaria y regeneración tisular. Por lo tanto, una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades inflamatorias sería bloquear selectivamente la vía sTNF- $\alpha$ /TNFR1 mediante la administración de inhibidores/depuradores de sTNF- $\alpha$ , antagonistas de TNFR1 o reduciendo los niveles séricos de sTNFR1, manteniendo la vía de señalización de TNFR2 intacta. Otra estrategia prometedora sería basarse en los agonistas de TNFR2 o aumentar los niveles séricos de sTNFR2, lo que podría impulsar la expansión de los linfocitos T reguladores y promover la regeneración de tejidos. Por lo tanto, los futuros tratamientos de las enfermedades renales, como la nefropatía diabética, deberían dirigirse a la identificación de moléculas capaces de modular los TNFRs, disminuyendo o antagonizando TNFR1 e incrementando o siendo agonista de TNFR2. Actualmente, según el mejor saber y entender de la solicitante, no se conocen moléculas que actúen disminuyendo o antagonizando TNFR1 y al mismo tiempo actúen aumentando o siendo agonistas de TNFR2. Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha en la técnica de encontrar nuevas terapias capaces de disminuir o antagonizar TNFR1 e incrementar o ser agonista de TNFR2, disminuyendo así la vía de sTNFR1 y aumentando la vía de sTNFR2. En particular, tales compuestos serían valiosos para tratar ciertas subpoblaciones de sujetos caracterizados por tener TNFR1 muy elevado y padecer enfermedades renales, en particular nefropatía diabética, antes de que su nefropatía se desarrolle irreversiblemente en ERET en el transcurso de unos pocos años.

La presente invención se refiere a la sal de terc-butilamonio de ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico para uso en el tratamiento de enfermedades renales, en particular la nefropatía diabética. Este compuesto pertenece a una clase de 2,4-difenil-1,3-dioxanos que previamente han mostrado ser antagonistas de los receptores de tromboxano, inhibidores de la tromboxano sintasa y/o agonistas de PPAR (documento WO 2008/089461 A1). Por lo tanto, se ha mostrado previamente que esa clase de compuestos tiene un efecto sobre la captación de glucosa (véase el ejemplo 32 y la Fig. 7, en el documento WO 2008/089461 A1), la inhibición de la agregación plaquetaria y la trombosis arterial en un modelo de ratón (véanse los ejemplos 34 y 35, documento WO 2008/089461 A1) y la inhibición de la proliferación celular (véase el ejemplo 31, en el documento WO 2008/089461 A1). Por lo tanto, los datos publicados anteriormente han respaldado que esa clase de compuestos podrían tener potencial como agentes antihiper glucémicos, agentes anticancerígenos y/o anticoagulantes.

### Compendio de la invención

Los presentes inventores han descubierto que el ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo actúa reduciendo o antagonizando el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1) y aumentando o siendo agonista del receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR2). Por tanto, los inventores han demostrado que la sal de terc-butilamonio de ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico es capaz de disminuir sTNFR1 y al mismo tiempo aumentar sTNFR2 en un modelo animal de nefropatía diabética, en comparación con ratas tratadas con placebo, disminuyendo de este modo las vías proinflamatorias de TNFR1 e incrementando las vías de regeneración tisular mediadas por TNFR2. Por tanto, el compuesto según la invención es más útil en el tratamiento de enfermedades renales, en particular de la nefropatía diabética, en los subgrupos de pacientes caracterizados por tener un nivel elevado de sTNFR1, en comparación con otros subgrupos de pacientes en los que la vía de TNFR1 es menos pronunciada. Además, se ha encontrado sorprendentemente que se observa un mejor efecto del tratamiento en pacientes que tienen un ACR > 300 mg/kg.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere de este modo a un compuesto de Fórmula (I):



Fórmula (I)

para uso en el tratamiento de una enfermedad renal en un grupo de pacientes caracterizados por tener un valor sérico de sTNFR1 > 2,9 ng/mL y/o un ACR > 300 mg/g.

### Breve descripción de las Figuras

5 La Fig. 1 muestra una representación esquemática de una trayectoria de eTFG en el grupo de deterioro rápido (TNFR1 > 4,3 ng/mL), una trayectoria de eTFG en el grupo de deterioro moderado (TNFR1 2,9-4,3 ng/mL) y una trayectoria de eTFG en el grupo de deterioro lento (TNFR1 < 2,9 ng/mL) que no reciben tratamiento (líneas discontinuas). Cuando se reducen los valores de TNFR1 mediante un tratamiento (línea continua negra), la pendiente de eTFG cambia de modo que se pospone la ERET. (Figura adaptada de A. Krolewski et al., *Kidney Int.* Junio 2017; 91(6): 1300-1311).

10 La Fig. 2 muestra la medición de los cambios de TNFR1 frente a la creatinina en orina (pg/mg) desde el valor inicial y después de 4 y 7 semanas, en ratas operadas de forma simulada y ratas operadas con Px-UNx que recibieron placebo o tratamiento con el compuesto 1. Los datos para las dosis de 1, 3 y 10 mg/kg, p.o. se agruparon. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. La figura muestra que las ratas operadas de forma simulada experimentan una ligera reducción en los niveles de TNFR1 durante las 7 semanas del estudio, mientras que las ratas operadas con Px-UNx que reciben placebo (vehículo) muestran niveles de TNFR1 que aumentan rápidamente durante el mismo período. Las ratas operadas con Px-UNx tratadas con el compuesto 1 también muestran niveles crecientes de TNFR1 durante el período de 7 semanas, pero significativamente menores que para el grupo de control con placebo.

20 La Fig. 3 muestra la medición de los cambios de TNFR2 frente a la creatinina en orina (pg/mg) desde el valor inicial y después de 4 y 7 semanas en ratas operadas de forma simulada y ratas operadas con Px-UNx que recibieron placebo o tratamiento con el compuesto 1 (3 mg/kg, p.o.). Los valores representan la media  $\pm$  SEM. La figura muestra que las ratas operadas de forma simulada experimentan una ligera reducción en los niveles de TNFR2 durante las 7 semanas del estudio, mientras que las ratas operadas con Px-UNx que reciben placebo (vehículo) muestran niveles de TNFR2 rápidamente decrecientes durante el mismo período. Las ratas operadas con Px-UNx tratadas con el compuesto 1 muestran niveles decrecientes de TNFR2 pero mucho menores que en comparación con el grupo de control con placebo.

25 La Fig. 4 muestra un mapa anatómico del páncreas. El remanente (páncreas residual) después de una pancreatometomía del 90% se define como el área blanca en la Fig. 4.

### Definiciones

30 En el presente contexto, el término "tratamiento" debe entenderse en el sentido más amplio como prevención, mejora o tratamiento. Por lo tanto, también se entiende que tratamiento incluye un tratamiento profiláctico. Por lo tanto, tratamiento de una enfermedad renal puede referirse a la prevención o el retardo de la pérdida de la función renal o a revertir parcialmente la pérdida de la función renal estimada mediante ACR y/o eTFG.

35 En el presente contexto, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a todo tipo de sales que se usan en productos farmacéuticos para convertir un ácido en una sal. La sal se puede formar mediante la adición de una base al compuesto de fórmula (I). Se pueden encontrar ejemplos típicos en el *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, 2ª edición revisada P. Heinrich Stahl (compilador), Camille G. Wermuth (compiladora) ISBN: 978-3-906-39051-2 Abril 2011, 388 páginas.

40 En el presente contexto, "sTNFR1" se refiere al receptor de TNF de tipo 1 soluble. El sTNFR1 se puede medir en suero u orina de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento.

En el presente contexto, "sTNFR2" se refiere al receptor de TNF de tipo 2 soluble. El sTNFR2 se puede medir en suero u orina de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento.

45 De acuerdo con la presente invención, sTNFR1 y sTNFR2 se miden en suero u orina de acuerdo con los procedimientos descritos en Krolewski A.S. *Diabetes Care* 2015;38:954-962 y Krolewski A.S. et al. *Kidney Int.* Junio 2017; 91(6): 1300-1311. Brevemente, todos los marcadores se midieron mediante inmunoensayo. Las muestras se descongelaron, se agitaron y se centrifugaron, y se realizaron mediciones en el material sobrenadante. sTNFR1 y sTNFR2 se midieron mediante ELISA (DRT100, DRT200 e inmunoensayo de alta sensibilidad HS600B, respectivamente; R&D, Minneapolis, Minnesota) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Otras definiciones que se utilizan en este documento son las siguientes:

50 ACR: índice entre albúmina y creatinina

eTFG: TFG estimada

ERET: enfermedad renal en etapa terminal

TFG: tasa de filtración glomerular

NA: normoalbuminuria

MA: microalbuminuria

DMT1 o DT1: diabetes (mellitus) de tipo 1

DMT2 o DM2: diabetes (mellitus) de tipo 2

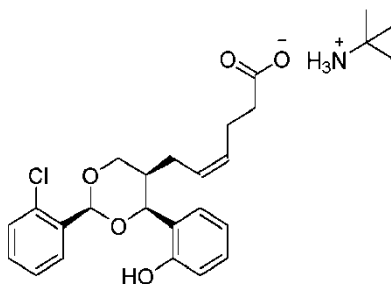
## 5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la sal de terc-butilamonio de ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico para uso en el tratamiento de enfermedades renales, en particular la nefropatía diabética. Este compuesto, como se ha descrito anteriormente, pertenece a una clase de 2,4-difenil-1,3-dioxanos que previamente se ha mostrado que son antagonistas de los receptores de tromboxano, inhibidores de la tromboxano sintasa y/o agonistas de PPAR.

Los presentes inventores han descubierto ahora sorprendentemente que la sal de terc-butilamonio de ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico también reduce el nivel sérico o en orina de/actúa como antagonista del receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1) y aumenta el nivel sérico y en orina de/actúa como agonista del receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR2). Este hallazgo hace que el compuesto de la invención sea útil en el tratamiento de enfermedades renales, en particular la nefropatía diabética, más particularmente el tratamiento de enfermedades renales en los subgrupos de pacientes con enfermedades renales caracterizadas por tener un nivel elevado de sTNFR1 en suero u orina.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que el compuesto 1 es capaz de disminuir el nivel de sTNFR1 en ratas operadas con Px-UNx, en comparación con ratas operadas con Px-UNx que reciben placebo (véase la Fig. 2). Además, los inventores han encontrado sorprendentemente que el compuesto 1 es capaz de aumentar el nivel de sTNFR2 en ratas operadas con Px-UNx, en comparación con ratas operadas con Px-UNx que reciben placebo (véase la Fig. 3). Este hallazgo era sorprendente, ya que no se esperaba que el compuesto 1 como antagonista del receptor de tromboxano, inhibidor de la tromboxano sintasa y agonista de PPAR, modulara el nivel de TNFR1, ya que no existe ningún vínculo biológico entre esos receptores y TNFR1. Por lo tanto, estos nuevos hallazgos han dado lugar a un nuevo uso clínico, a saber, el uso para el tratamiento de ciertos subgrupos que padecen una enfermedad renal y se caracterizan por tener un sTNFR1 elevado y/o un sTNFR2 disminuido y, por lo tanto, el deterioro más rápido de la función renal.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I),



Fórmula (I)

para uso en el tratamiento de una enfermedad renal en un grupo de pacientes caracterizados por tener un nivel sérico de sTNFR1 > 2,9 ng/mL y/o un ACR > 300 mg/g.

### *Enfermedades renales*

En una realización de la invención, la enfermedad renal se selecciona a partir del grupo que consiste en nefropatía diabética, glomerulonefritis, glomeruloesclerosis o nefroesclerosis hipertensiva. En la realización más preferida, la enfermedad renal es nefropatía diabética.

### *Grupos de pacientes*

Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes que padecen una enfermedad renal específica no pueden considerarse un único grupo uniforme, sino que pueden dividirse en subgrupos, por ejemplo, según los niveles de sTNFR1. Como se ejemplifica en la Fig. 1, los pacientes que padecen nefropatía diabética pueden clasificarse adicionalmente como con "deterioro rápido", "deterioro moderado" o "deterioro lento", según la tasa con la que se deteriora la función renal (pendiente de eTFG). Por lo tanto, los sujetos que se clasifican inicialmente en la misma etapa (1-5) de nefropatía diabética, debido a valores similares de ACR y TFG, pueden tener una progresión de la enfermedad completamente diferente debido a tasas muy diferentes del deterioro de su función renal. La tasa con la que se deteriora la función renal viene determinada por los niveles séricos u urinarios de sTNFR1, lo que enfatiza el

papel de sTNFR1 y sus vías de señalización proinflamatoria en la tasa de progresión de la enfermedad. Según Krolewski et al., los "pacientes con deterioro rápido" alcanzan la ERET en aproximadamente 2 a 10 años y se caracterizaron por tener TNFR1 sérico  $> 4,3$  ng/mL. Los "pacientes con deterioro moderado" alcanzan la ERET en aproximadamente 10-18 años y se caracterizan por tener un TNFR1 de 2,9-4,3 ng/mL. Finalmente, los pacientes con deterioro lento alcanzan la ERET en 20-45 años y se caracterizan por tener un nivel sérico de TNFR1  $< 2,9$  ng/mL (véase la Fig. 4). El compuesto de acuerdo con la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es, por lo tanto, particularmente útil en el tratamiento de los subgrupos caracterizados por tener niveles séricos de sTNFR1  $> 2,9$  ng/mL, tal como un valor de sTNFR1 entre 2,9 y 4,3 ng/mL, lo más preferiblemente un nivel sérico de sTNFR1  $> 4,3$  ng/mL. Por tanto, los compuestos según la invención son particularmente útiles para ralentizar la progresión de una nefropatía diabética en los grupos que tienen un alto riesgo de desarrollar ERET o perder  $\geq 40\%$  de la eTFG inicial en el transcurso de algunos años, ya que niveles elevados de sTNFR1 causan una rápida progresión de la enfermedad. Por lo tanto, en una realización preferida, el tratamiento es para uso en un subgrupo de pacientes que padecen una enfermedad renal caracterizada por tener un nivel sérico de sTNFR1  $> 2,9$  ng/mL (es decir, un "deterioro moderado" o un "deterioro rápido"). En una realización preferida, el tratamiento es para uso en un subgrupo de pacientes que padecen una enfermedad renal caracterizada por tener un nivel sérico de sTNFR1 entre 2,9 y 4,3 ng/mL (es decir, un "deterioro moderado"). En una realización más preferida, el tratamiento es para uso en la subpoblación de sujetos humanos que padecen una enfermedad renal caracterizada por tener un nivel sérico de sTNFR1  $> 4,3$  ng/mL (es decir, un "deterioro rápido"). En particular, la invención es útil para el tratamiento de la nefropatía diabética. Por lo tanto, en una realización incluso más preferida, el tratamiento es para uso en el subgrupo de pacientes que padecen nefropatía diabética caracterizados por tener un nivel sérico de sTNFR1 entre 2,9-4,3 ng/mL (es decir, un "deterioro moderado"). En la realización más preferida, el tratamiento es para uso en el subgrupo de pacientes que padecen nefropatía diabética, caracterizados por tener un nivel sérico de sTNFR1  $> 4,3$  ng/mL (es decir, un "deterioro rápido"). Como se ha mencionado anteriormente, la nefropatía diabética puede tener lugar como una complicación a largo plazo tanto de la diabetes de tipo 1 como de la diabetes de tipo 2. Así, en una realización particular, el cuadro clínico es nefropatía diabética como una complicación a largo plazo con diabetes de tipo 1. En todavía otra realización particular, el cuadro clínico es nefropatía diabética como una complicación a largo plazo con diabetes de tipo 2.

Al reducir los valores de TNFR1, la pendiente de eTFG disminuye de tal manera que se pospone el inicio de la ERET. La Fig. 1 ilustra una pendiente de eTFG de un paciente en el "subgrupo de deterioro rápido" (línea discontinua) que se cambia a una pendiente de eTFG correspondiente a las pendientes de eTFG en el "subgrupo de deterioro moderado" (línea continua), posponiendo así el inicio de la ERET en aproximadamente 5 años. De ello se deduce que el tratamiento de las enfermedades renales debe iniciarse preferentemente lo antes posible para obtener el mejor resultado clínico. Por lo tanto, en una realización de la invención, el tratamiento es para uso en el subgrupo de pacientes que padecen una enfermedad renal y tienen insuficiencia renal (etapa 5 con TFG inferior a 15) y un nivel sérico de sTNFR1  $> 2,9$  ng/mL, lo más preferiblemente  $> 4,3$  ng/mL. En una realización preferida, el tratamiento es para uso en el subgrupo de sujetos humanos que padecen una enfermedad renal y tienen una pérdida grave de la función renal (etapa 4 con TFG menor entre 15 y 29) y un nivel sérico de sTNFR1  $> 2,9$  ng/mL, lo más preferiblemente  $> 4,3$  ng/mL. En una realización más preferida, el tratamiento es para uso en el subgrupo de pacientes que padecen una enfermedad renal y tienen una pérdida de la función renal de leve a grave (etapa 3 con TFG menor entre 30 y 59) y un nivel sérico de sTNFR1  $> 2,9$  ng/mL, lo más preferiblemente  $> 4,3$  ng/mL. En una realización aún más preferida, el tratamiento es para uso en el subgrupo de pacientes que padecen una enfermedad renal y tienen daño renal con alguna pérdida de la función renal (etapa 2 con TFG menor entre 60 y 89) y un nivel sérico de sTNFR1  $> 2,9$  ng/mL, lo más preferiblemente  $> 4,3$  ng/mL. En la realización más preferida, el tratamiento es para uso en el subgrupo de pacientes que padecen una enfermedad renal y tienen daño renal presente pero una función renal normal (etapa 1 con TFG superior a 90) y un nivel sérico de sTNFR1  $> 2,9$  ng/mL, lo más preferiblemente  $> 4,3$  ng/mL. En cualquiera de las realizaciones anteriores, como enfermedad renal se selecciona preferiblemente la nefropatía diabética.

En otra realización muy preferida, el compuesto de fórmula (I) es para uso en el tratamiento de una nefropatía diabética en el subgrupo de pacientes caracterizados por tener una tasa de filtración glomerular (TFG) normal superior a 90 mL/min, un ACR  $> 1,9$  g de albúmina/g de creatinina en orina y un nivel sérico de sTNFR1  $> 2,9$  ng/mL, lo más preferiblemente  $> 4,3$  ng/mL.

En otra realización muy preferida, el compuesto de fórmula (I) es para uso en el tratamiento de una nefropatía diabética en el subgrupo de pacientes caracterizados por tener una tasa de filtración glomerular (TFG) normal superior a 90 mL/min, un ACR  $> 300$  mg de albúmina/g de creatinina en orina y un nivel sérico de sTNFR1  $> 2,9$  ng/mL, lo más preferiblemente  $> 4,3$  ng/mL.

#### Dosis

Los inventores han sometido a ensayo el compuesto 1 inicialmente en un modelo animal (rata) de nefropatía diabética inducida mediante cirugía (Secher T et al. *Diabetes* julio 2018; 67 (Suplemento 1)). En ese modelo, se pueden observar niveles elevados de TNFR1 circulante en la orina en los "animales con deterioro rápido" de manera similar a los hallazgos de Krolewski et al. En el estudio con ratas, los inventores encontraron sorprendentemente una reducción de los niveles de TNFR1 a través del compuesto 1, en comparación con el tratamiento con placebo durante un período de tratamiento completo de 7 semanas (véase la Fig. 2).

Se administraron tres dosis activas de 1, 3 y 10 mg/kg del compuesto 1 por vía oral, una vez al día, a ratas

pancreatectomizadas y uninefrectomizadas al 90% durante 49 días. Un grupo de control recibió placebo y otro grupo de control se sometió a una cirugía para imitar la pancreatectomía (Px) y la uninefrectomía (UNx) del 90%, sin afectar a la función del riñón o del páncreas (modelo simulado). El grupo simulado también recibió placebo. La conclusión del estudio con ratas era que el compuesto 1 reducía el nivel de sTNFR1 en la orina durante todo el período de tratamiento (véase la Fig. 2). Como se puede observar en la Fig. 2, las ratas operadas de forma simulada experimentan una ligera reducción de los niveles de sTNFR1 durante las 7 semanas del estudio, mientras que las ratas operadas con Px-UNx que recibían placebo (vehículo), muestran niveles rápidamente crecientes de sTNFR1 durante el mismo período. Las ratas tratadas con el compuesto 1 y operadas con Px-UNx también muestran niveles crecientes de TNFR1 durante el período de 7 semanas, pero significativamente menor que en el grupo de control con placebo. Las dosis diarias en el modelo de rata se pueden convertir en dosis equivalentes en seres humanos (Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, 2005). Por lo tanto, la dosis diaria de 1 mg/kg corresponde a una dosis diaria en humanos de 0,16 mg/kg o 11,2 mg para un paciente de 70 kg. Asimismo, una dosis diaria de 3 mg/kg corresponde a una dosis diaria en humanos de 0,48 mg/kg o 33,6 mg para un paciente de 70 kg. Finalmente, una dosis diaria de 10 mg/kg corresponde a una dosis diaria en humanos de 1,6 mg/kg o 112,7 mg para un paciente de 70 kg. Como se observa en el Ejemplo 1, no se pudo detectar ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de dosificación (1, 3 o 10 mg). Esto sugiere que la eficacia total ya se obtiene con la dosis más baja y, por lo tanto, incluso dosis diarias inferiores a 1 mg/kg son suficientes para reducir el sTNFR1 en la orina en el modelo animal.

Por lo tanto, según el estudio en animales y aplicando la conversión de dosis mencionada anteriormente a dosis humanas, se mostró que las dosis diarias terapéuticamente efectivas equivalentes se encuentran en el intervalo de 0,16 mg/kg a 1,6 mg/kg. Sin embargo, dado que se encontró que todas las dosis eran igualmente efectivas, los datos del modelo animal sugieren que incluso dosis diarias inferiores a 0,16 mg/kg del compuesto 1, son efectivas para disminuir el sTNFR1. Esto significa efectivamente que sTNFR1 puede reducirse en un paciente con un efecto mínimo sobre el sistema de coagulación (mediante el antagonismo del receptor de tromboxano o la tromboxano sintetasa) para lo que se necesitarían dosis más altas.

Por tanto, en una realización preferida, el compuesto de fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se administra a un paciente con una dosis terapéuticamente eficaz correspondiente a una dosis diaria de < 1,6 mg/kg, preferentemente menos de 0,48 mg/kg, incluso más preferiblemente menos de 0,16 mg/kg, tal como dosis diarias en el intervalo de 0,01 - 1,6 mg/kg, más preferiblemente 0,05 - 0,48 mg/kg, más preferiblemente 0,1 - 0,16 mg/kg. En otra realización de la invención, el compuesto de fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra a un paciente como dosis diaria en el intervalo de 0,16 mg/kg a 1,6 mg/kg. En otra realización preferida de la invención, el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a un paciente como dosis diaria en el intervalo de 0,3 mg/kg a 0,625 mg/kg. En todavía otra realización de la invención, el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a un paciente como una dosis diaria de 0,3 mg/kg o 0,625 mg/kg.

#### *Régimen de dosificación*

El régimen de dosificación puede incluir una sola dosis diaria como se describe en el presente documento, o dividirla en múltiples dosis diarias más bajas, de modo que se alcance una concentración plasmática terapéutica eficaz del fármaco. El beneficio de múltiples dosis más bajas es que hay menos fluctuaciones en la concentración plasmática del fármaco, lo que puede ser necesario para los fármacos que tienen una ventana terapéutica estrecha o una semivida corta. El inconveniente de los regímenes de dosificación más complejos puede ser una aceptación menos óptima por parte del paciente. En una realización, el régimen de dosificación comprende una única dosis diaria como se describe en el presente documento. En otra realización, el régimen de dosificación comprende dos dosis diarias en donde cada dosis es la mitad de la dosis única diaria. Preferiblemente, por razones de aceptación del paciente, se prefieren dosis únicas diarias.

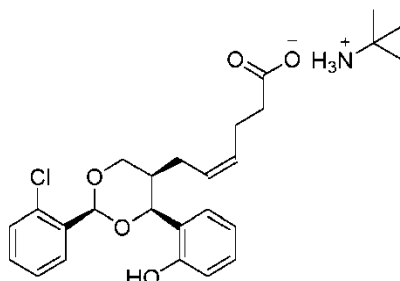
Por lo tanto, en una realización de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de una población de pacientes con nefropatía diabética, caracterizados por tener un nivel sérico de sTNFR1 > 2,9 ng/mL, lo más preferiblemente > 4,3 ng/mL, en donde dicho paciente recibe una dosis diaria tal como se ha descrito anteriormente en la sección "Dosis", durante el tiempo que requiera el tratamiento (es decir, mientras haya niveles elevados de sTNFR1 en orina o suero). Debido a la naturaleza progresiva de la pérdida de función renal que se ha descrito anteriormente, el período de tratamiento puede durar en algunas realizaciones durante varias semanas, meses o años, más preferiblemente el tratamiento es un tratamiento crónico.

El compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse junto con uno o más medicamentos adicionales, usados en el tratamiento de la nefropatía diabética, tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) o fármacos hipoglucemiantes.

#### *Sales farmacéuticamente aceptables*

El compuesto de fórmula (I) se usa como una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable. La formación de sales es un método bien conocido y eficaz para mejorar la solubilidad y la tasa de disolución de fármacos tanto ácidos como básicos. Las sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales que comprenden metales alcalinos o metales

- alcalinotérricos, tales como la sal de sodio, la sal de potasio o la sal de calcio del compuesto de fórmula (I). Otras sales pueden incluir sales de amonio adecuadas, formadas mediante la reacción del ácido de fórmula (I) con una amina apropiada. Se pueden encontrar ejemplos de sales adecuadas en el Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, 2ª edición revisada, P. Heinrich Stahl (compilador), Camille G. Wermuth (compiladora) ISBN: 978-3-906-39051-2, abril 2011 388 páginas. De acuerdo con la presente invención, la sal es la sal de terc-butil amonio (compuesto 1) como se muestra a continuación.



### Reducción de TNFR1

- Los inventores han encontrado que un compuesto de fórmula (I) es capaz de disminuir el sTNFR1 en suero u orina en el modelo animal de nefropatía diabética, mediante la administración de una dosis terapéutica eficaz como se ha descrito anteriormente. Cualquier disminución de los niveles de sTNFR1 en suero u orina retrasará la progresión de la enfermedad y mejorará la función renal. El grado de disminución de sTNFR1 depende de los niveles iniciales de sTNFR1 en el sujeto tratado, la dosis terapéutica eficaz y la duración del tratamiento. Por lo tanto, en una realización de la invención, el valor de sTNFR1 en suero se reduce a < 4,3 ng/mL, preferentemente, el valor de sTNFR1 en suero se reduce a < 2,9 ng/mL, más preferentemente, el valor de sTNFR1 en suero se reduce a < 1,0 ng/mL.

Según la descripción, se proporciona la sal de terc-butilamonio de ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)hex-4-enoico para uso en un método para el tratamiento de un sujeto humano al que se ha diagnosticado una enfermedad renal, preferiblemente nefropatía diabética, que tiene un mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica (ERC) o una enfermedad renal en etapa terminal (ERET) o ambas, comprendiendo el método:

1. obtener una muestra de suero u orina a partir de un sujeto humano que tiene normoalbuminuria (NA), microalbuminuria (MA), macroalbuminuria o proteinuria (PT),
2. medir el nivel de sTNFR1 en la muestra del sujeto (por ejemplo, usando un anticuerpo de TNFR1),
3. comparar los niveles de sTNFR1 en la muestra del sujeto con los niveles de sTNFR1 en una muestra de referencia,
4. determinar si el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar ERC o ERET, o ambas, basándose en la comparación de los niveles en la muestra del sujeto con los niveles de referencia, en donde la presencia de sTNFR1 en la muestra de suero del sujeto con niveles de al menos 2,9 ng/mL, indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar ERC, ERET o ambas,
5. administrar una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I a cualquier sujeto identificado en el punto 4) que tiene un mayor riesgo de desarrollar ERC, ERET o ambas; y
6. opcionalmente continuar haciendo un seguimiento de dichos sujetos identificados para vigilar una reducción del nivel de TNFR1.

### Ejemplos

#### Métodos de detección de biomarcadores

- En los ejemplos siguientes, el sTNFR1 y el sTNFR2 se midieron utilizando los kits comerciales de ELISA para ratón/rata TNFR1/TNFR2 Quantikine ELISA de R&D Systems, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Sin embargo, con el fin de medir el sTNFR1 y el sTNFR2 en seres humanos para determinar los grupos de población relevantes de acuerdo con la presente invención, se debería usar el método descrito por Krolewski A.S. *Diabetes Care* 2015;38:954-962 y Krolewski A.S. et al. *Kidney Int.* Junio 2017; 91(6): 1300-1311.
- Ejemplo 1 - Modelo de rata con nefropatía diabética

#### Procedimientos quirúrgicos

La pancreatectomía y la uninefrectomía (véase más abajo) se realizaron durante un único procedimiento quirúrgico (Secher T et al. *Diabetes* Julio 2018; 67 (Suplemento 1)). Los animales fueron operados de forma aleatoria durante varios días consecutivos de cirugía. Después de un ayuno completo durante la noche con rejillas instaladas en las jaulas, las

ratas fueron pancreatectomizadas y uninefrectomizadas con anestesia de isoflurano. Se administró una analgesia preoperatoria, antibióticos y reposición de líquidos. A las ratas no se les ofreció ningún alimento desde un día antes hasta un día después de la cirugía, a partir del segundo día después de la cirugía se pudieron alimentar a voluntad.

#### *Pancreatectomía (PX)*

- 5 Brevemente, la pancreatectomía del 90% se realiza extirpando la porción completa de la cola, el cuerpo y una parte de la cabeza del páncreas mediante abrasión suave con un aplicador dental. Los principales vasos sanguíneos del estómago, el bazo y el intestino se dejan intactos, por lo que no supone un riesgo para otros órganos. El resto (páncreas residual) se define como el área blanca según un mapa anatómico como se muestra en la Fig. 4.

#### *Uninefrectomía (UNx)*

- 10 Brevemente, se examina el riñón derecho y se identifican el uréter derecho, la arteria renal y la vena renal, y se ligan con sutura. A continuación, se extirpa el riñón derecho.

#### *Operación simulada*

- 15 La operación simulada se lleva a cabo para imitar lo mejor posible el procedimiento quirúrgico Px-UNx. Brevemente, la anestesia y la analgesia, así como la apertura y el cierre de la cavidad abdominal, se realizan como se ha descrito anteriormente. Después de abrir la cavidad abdominal, el páncreas y el riñón derecho quedarán expuestos, pero se dejarán sin tocar e intactos.

#### *Muestreo de orina*

- 20 Las ratas se colocaron individualmente en jaulas metabólicas durante 16 h desde la tarde hasta la mañana siguiente. Se colocaron subconjuntos aleatorios de los grupos de estudio en las jaulas durante varios días (ya que había menos jaulas que ratas). A las ratas se les suministró pienso y agua a voluntad. Si era posible, se incluyó una mejora de las jaulas (iglú, varilla de plástico para subirse). Se registró el volumen total de orina y se almacenó la orina a -80°C. Grandes cantidades se dividieron en partes alícuotas en varios tubos Eppendorf de 0,5 mL antes de la congelación.

#### *Ensayos de orina*

- 25 Las muestras de orina se almacenaron a -80°C hasta su análisis. El sTNFR1 en la orina de las ratas se midió usando kits de ELISAs comerciales (kits de ELISA para ratón/rata de R&D Systems TNFR1/TNFR2 Quantikine ELISA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La creatinina en orina se midió utilizando el kit CREP2 (Roche Diagnostics, Alemania) en el autoanalizador Cobas<sup>TM</sup> C-501, según las instrucciones del fabricante. La albúmina urinaria se midió usando el ELISA de albúmina de rata de Bethyl Laboratories según las instrucciones del fabricante. Se calculó el índice albúmina-creatinina en orina (UACR).

- 30 Planificación de la prueba

Se incluyeron en el estudio cinco grupos de ratas macho Sprague-Dawley: tres grupos tratados quirúrgicamente que recibieron el compuesto 1, un grupo que recibió placebo (vehículo) y un grupo con cirugía simulada, que también recibió placebo. Los grupos se resumen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Las ratas Sprague-Dawley recibieron las dosis por vía oral una vez al día.

Grupo	Nombre	Dosis (mg/kg)	Modelo	Número de ratas
1	Vehículo simulado	-	Simulado	12
2	Vehículo Px-Unx	-	Px-Unx	11
3	Px-Unx Bajo	1	Px-Unx	12
4	Px-UNx Intermedio	3	Px-Unx	9
5	Px-UNx Alto	10	Px-Unx	12

35

#### Resultados

Las concentraciones en orina de sTNFR1 corregidas para la concentración en orina de creatinina (pg/mg) al inicio y a las 4 y 7 semanas para los grupos individuales 1-5, eran las que se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2

Tiempo	Grupo 1 (simulado)	Grupo 2 (placebo)	Grupo 3 (1 mg/kg)	Grupo 4 (3 mg/kg)	Grupo 5 (10 mg/kg)
0 semanas	35,98	259,50	243,38	236,29	220,27
4 semanas	23,57	426,64	373,28	313,80	348,50
7 semanas	21,31	446,88	345,46	369,65	375,03

La Tabla 2 muestra los valores de sTNFR1 en pg por mg de creatinina para los grupos 1-5, las semanas 0, 4 y 7.

5 Como se puede observar en la Tabla 2, los valores de sTNFR1 corregidos para los 3 grupos de tratamiento están consistentemente por debajo de los valores del grupo de placebo, tanto a las 4 semanas como a las 7 semanas, lo que indica un efecto del tratamiento con el compuesto 1. Sin embargo, no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de las dosis (1, 3 o 10 mg) en ese punto. Esto sugiere que la eficacia total ya se obtiene con la dosis más baja y, por lo tanto, incluso dosis inferiores a 1 mg/kg son suficientes para reducir el sTNFR1 en la orina. Por lo tanto, se decidió agrupar los datos de la dosificación para llegar al siguiente conjunto de datos que se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3: Datos agrupados de la Tabla 2

Tiempo	Cirugía simulada (n = 12)	Vehículo (n = 11)	Tratado (n=33)
0 semanas	35,98	259,5	233,3
4 semanas	23,57	426,64	345,2
7 semanas	21,31	446,88	363,4

15 Los datos que se muestran en la Tabla 3 se representaron como el cambio en la concentración de sTNFR1 frente a los valores al inicio (véase la Fig. 2). Como se puede observar en la Fig. 2, las ratas operadas de forma simulada experimentan una ligera reducción en los niveles de TNFR1 durante las 7 semanas del estudio, mientras que las ratas operadas con Px-UNx que reciben placebo (vehículo) muestran niveles de sTNFR1 que crecen rápidamente durante el mismo período. Las ratas tratadas con el compuesto 1 y operadas con Px-UNx también muestran niveles crecientes de sTNFR1 durante el período de 7 semanas, pero significativamente menos que en el grupo de control con placebo. Estos datos demuestran el efecto del compuesto 1 sobre la disminución de sTNFR1.

20 Asimismo, las concentraciones en orina de sTNFR2 corregidas por la concentración en orina de creatinina (pg/mg) se midieron al inicio y después de 4 y 7 semanas en el grupo 3. Los datos se resumen en la Tabla 4:

Tabla 4

Tiempo	Grupo 1 (simulado)	Grupo 2 (placebo)	Grupo 3 (1 mg/kg)
0 semanas	2521	5212	4561
4 semanas	1460	3473	3302
7 semanas	1348	2743	3264

25 La Tabla 4 muestra los valores de TNFR1 en pg por mg de creatinina para el grupo 3, las semanas 0, 4 y 7. Los datos que se muestran en la Tabla 4 se representaron como el cambio en la concentración de TNFR2 frente a los valores iniciales (véase la Fig. 3). Como se puede observar en la Fig. 3, el cambio en los valores de TNFR2 para el grupo 3 (grupo tratado) es menos pronunciado que en comparación con el grupo 2 (placebo). Esto muestra que la ruta de sTNFR2 se deja intacta en comparación con el grupo de placebo, lo que da como resultado los efectos beneficiosos de una mayor regeneración de los tejidos.

30 Ejemplo 2

35 Se realizó un estudio clínico de Fase 2a con el compuesto 1 en pacientes con nefropatía diabética. Los pacientes se dividieron en dos subgrupos diferentes que tenían macroalbuminuria (ACR > 300 mg/g) o microalbuminuria (ACR 30-300 mg/g), y cada subgrupo se trató con 0,3 mg del compuesto 1/kg al día o 0,625 mg del compuesto 1/kg al día durante 4 semanas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos dosis en cada subgrupo y los datos se agruparon. Esto sugiere que la eficacia total ya se obtiene con la dosis más baja y, por lo tanto, incluso

dosis inferiores a 0,3 mg/kg al día son suficientes para mejorar el ACR. Se observó una reducción estadísticamente significativa en el ACR en ambos subgrupos desde el inicio. Los datos se resumen en la Tabla 5 a continuación:

Tabla 5

Pacientes	Microalbuminuria (n = 38)	Macroalbuminuria (n = 11)
ACR promedio al inicio	91,8 mg/g	691 mg/g
ACR promedio (4 semanas)	72,6 mg/g	510 mg/g
Reducción de ACR (%)	20,9 %	26,2 %

- 5 La Tabla 5 muestra que el compuesto 1 era eficaz para mejorar el ACR en ambos grupos de pacientes. Sin embargo, el subgrupo con macroalbuminuria (ACR > 300 mg/g) mostraba una reducción significativamente mayor estadísticamente en el ACR (26,2%) que en comparación con el subgrupo con microalbuminuria (ACR 30-300 mg/g), en el que la reducción del ACR era del (20,9%). Esta observación concuerda bien con el hallazgo de que el compuesto 1 es capaz de reducir o antagonizar TNFR1, ya que se ha demostrado previamente que un TNFR1 elevado está correlacionado con un ACR elevado. Por tanto, en conclusión, el compuesto 1 funcionaba mejor en el subgrupo que tenía macroalbuminuria (ACR > 300 mg/g).

Ejemplo 3 - Síntesis del ácido (Z)-6-(-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico.

ETAPA 1: Síntesis del ácido 2-metoxi-paracónico racémico como una mezcla cis/trans:

- 15 Un reactor de vidrio de doble camisa de 20 L se cargó con 260 g de *o*-metoxibenzaldehído, 286 g de anhídrido succínico, 572 g de cloruro de zinc anhidro y 2600 mL de diclorometano anhidro (DCM). La mezcla se agitó y se enfrió a 2°C. Se añadió una cantidad de 533 mL de trietilamina durante un período de 30 min. A continuación, la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadió una cantidad de 1690 mL de HCl 2 M, seguida de 2600 mL de acetato de etilo. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5 min. La fase acuosa se extrajo con 2000 mL de acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con 650 mL de salmuera saturada, seguida de un lavado con 3 x 2600 mL de bicarbonato de sodio saturado. A continuación, los extractos acuosos combinados se lavaron con acetato de etilo. Los extractos acuosos se acidificaron a pH 2 usando HCl concentrado. Se separó un aceite amarillo. La mezcla se extrajo dos veces usando 2000 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó cuatro veces con 1000 mL de salmuera y se evaporó en un rotavapor Buchi R220, empleando una temperatura del baño de calentamiento de 45°C. Al residuo restante se añadieron 4000 mL de tolueno. La mezcla se calentó a 110°C. Se eliminó por destilación 1 L de tolueno. El resto se dejó enfriar a temperatura ambiente y se dejó reposar durante 48 h durante las cuales cristalizó ácido 2-metoxiparacónico puro. El material cristalino se recogió, se filtró y se secó al vacío a 45°C en una estufa de vacío hasta tener un peso constante.

Rendimiento: 220 g (49%). Relación cis/trans: 46/54.

ETAPA 2: Conversión de ácido metoxi-paracónico racémico cis y trans en ácido todo-trans-2-metoxi-paracónico:

- 30 Se añadieron 1020 g de ácido metoxi-paracónico a una mezcla de 1729 mL de ácido sulfúrico concentrado y 2570 mL de agua. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. Se obtuvo una relación cis/trans de 33:64. A continuación, la mezcla se calentó a 60°C durante 2,5 h. Se obtuvo una relación cis/trans de 11:89 (análisis mediante HPLC). A continuación, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se filtró. El material sólido se volvió a disolver en acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó. Se observó una relación cis/trans de 6:94. El material sólido recristalizó en tolueno caliente. El material cristalino obtenido se secó al vacío a 40°C durante 48 h. Rendimiento: 855 g (84%). Relación cis/trans: 8/92. Punto de fusión: 132-133°C. H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): 2,9 (2H, d), 3,4 (1 H, m), 3,83 (3H, s), 5,85 (1 H, d), 6,8-7,4 (4H, m)

ETAPA 3: Esterificación del ácido metoxi-paracónico racémico:

- 40 Se disolvieron 193 g de ácido metoxi-paracónico en 600 mL de THF. A la mezcla se añadieron 145 g de CDI (899 mmol, 1,1 eq.) y la mezcla se agitó durante 10 min. Se añadió una cantidad de 65 mL de etanol absoluto (o metanol para preparar el éster metílico) y la mezcla se agitó hasta que se completó (~120 min). La mezcla de reacción bruta se extrajo usando acetato de etilo y bicarbonato de sodio saturado. La fase orgánica se lavó con HCl 0,5 N y salmuera. Después de la evaporación, se obtuvo una cantidad de 188 g del éster etílico deseado.

ETAPA 4: Reducción del éster etílico del ácido metoxi-paracónico racémico:

- 45 Preparación de lactol racémico: A 105 g de éster etílico (397 mmol) en 700 mL de tolueno a 5°C, se añadieron 3 eq. de DIBAL-H (1,19 mol, 1,19 L de solución 1 M). La mezcla se agitó durante 60 min a temperatura ambiente y se inactivó con metanol. Se añadieron acetato de etilo (2,5 L) y agua (700 mL). Después de la separación de fases, la fase acuosa se extrajo nuevamente con EtOAc. A continuación, la capa orgánica se lavó con salmuera, se filtró y se evaporó. El residuo oleoso recristalizó en cloroformo/hexanos. Los sólidos se filtraron y secaron al vacío. Rendimiento:

53 g (237 mmol, 59%).

ETAPA 5: Reacción de Wittig que emplea síntesis con lactol racémico de diol racémico:

5 Una cantidad de 191 g de bromuro de carboxipropiltriphenilfosfonio, 1000 mL de tolueno anhidro y 100 g de t-butoxido de potasio se mezclaron a 80°C durante 30 min. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió lentamente una cantidad de 25 g de lactol racémico purificado (114,5 mmol) disuelto previamente en 180 mL de THF anhidro. La reacción continuó durante 60 min. La mezcla de reacción bruta se vertió en 1500 mL de agua con hielo, se añadieron 300 mL de acetato de etilo. La fase acuosa se volvió a extraer con 300 mL de acetato de etilo. A continuación, la fase acuosa se acidificó con HCl 2 N y se extrajo 3 veces con 300 mL de acetato de etilo. Los sólidos que se habían formado se eliminaron por filtración. La fase orgánica se evaporó. Al residuo evaporado se añadieron 500 mL de éter dietílico.

10 El matraz se agitó durante 10 min y los sólidos se eliminaron por filtración. El material filtrado se extrajo 3 veces con solución saturada de bicarbonato de sodio. A continuación, la fase acuosa se acidificó a pH 4 con HCl 2 M. A continuación, la fase acuosa se extrajo 3 veces empleando 200 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron para obtener 45 g de material.

*Cromatografía en columna:*

15 El diol racémico se purificó sobre gel de sílice (columna de 35 cm de longitud, 4 cm de diámetro). Se disolvió el diol racémico en un mínimo de acetato de etilo y se aplicó a la columna. Se añadió 1 L de acetato de etilo (60%)/hexanos (40%) a un cilindro volumétrico. Se tomaron 300 mL de EtOAc/hexanos del cilindro y se añadieron a la columna. Los 700 mL restantes de EtOAc/hexanos en el cilindro se diluyeron hasta 1 L usando acetato de etilo. A continuación, se añadieron a la columna 300 mL de la nueva solución de EtOAc/hexanos y se hicieron pasar a través de la columna.

20 Los 700 mL restantes de EtOAc/hexanos en el cilindro se diluyeron nuevamente hasta 1 L usando acetato de etilo. A continuación, se añadieron a la columna 300 mL de la nueva solución de EtOAc/hexanos y se hicieron pasar a través de la columna. Los restantes 700 L de EtOAc/hexanos en el cilindro se diluyeron una vez más hasta 1 L usando acetato de etilo. A continuación, se añadieron a la columna 300 mL de la nueva solución de EtOAc/hexanos y se hicieron pasar a través de la columna. Se recogieron fracciones puras de diol racémico y se evaporaron para obtener

25 26 g de diol racémico puro. Rendimiento: 26 g (88,3 mmol, 79%).

ETAPA 6: Conversión de diol racémico en acetónido racémico:

Se mezclaron 26 g (88 mmol) de diol purificado con 260 mL de dimetoxipropano y 26 mg de p-TsOH. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron tres gotas de trietilamina y la mezcla se evaporó. Al residuo restante se añadieron 150 mL de hexano y la mezcla se agitó durante la noche. Los sólidos se filtraron y secaron para obtener 25 g (75 mmol) de acetónido racémico.

30

Rendimiento: 85%

ETAPA 7: Desmetilación del acetónido racémico:

Se preparó una suspensión de hidruro de sodio y etanotiol añadiendo 16,7 g de etanotiol a una mezcla de 21,5 g de NaH en 375 mL de DMPU. La suspensión se calentó a 80°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se disolvieron 15 g de acetónido racémico en 75 mL de DMPU y se añadieron a la suspensión de EtSH/NaH. La mezcla se calentó a 130°C durante 2 h. A continuación, la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. La capa acuosa se acidificó usando HCl 2 N y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se evaporó hasta sequedad. Rendimiento: 16,5 g (crudo).

35

ETAPA 8: Preparación del compuesto final racémico:

40 Se mezcló una cantidad de 28 mmol de acetónido racémico desmetilado con 15 mL de 2-clorobenzaldehído, 0,5 g de p-TsOH y 60 mL de tolueno. La mezcla se agitó durante 24 horas y se evaporó. La mezcla de reacción bruta se purificó usando cromatografía en gel de sílice, empleando un instrumento de cromatografía Biotage Horizon®. La mezcla se purificó usando DCM (19)/metanol (1) para obtener 6,5 g de un sólido después de la evaporación. Rendimiento: 6,5 g (16,7 mmol, 59%)

45 *Cromatografía quiral*

Cada enantiómero del producto de la ETAPA 8, es decir, los compuestos ácido (Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico (enantiómero 1) y ácido (Z)-6-((2R,4R,5S)-2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico (enantiómero 2, según la elución en la columna quiral a continuación), se aisló mediante cromatografía quiral con las siguientes condiciones:

50           Columna: 250×4,6 mm Chiralpak AD-H 5 mm  
               Fase móvil: n-heptano/etanol/ácido trifluoroacético 80/20/0,1  
               Caudal: 1 mL/min

Detección: UV a 230 nm

Temperatura: 25°C

Las muestras se disolvieron en n-heptano/etanol 80/20. El enantiómero 1 eluye primero de la columna quiral y el enantiómero 2 eluye en segundo lugar de la columna quiral.

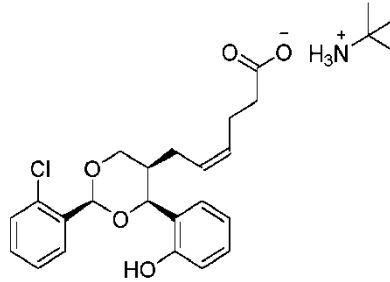
5 *Conversión a sal*

El ácido enantiopuro (enantiómero 1) (452,23 mg, 1,12 mmol) obtenido anteriormente se disolvió en IPA (2 mL) a temperatura ambiente. La solución se calentó a 50°C y se añadió t-butilamina. Un material cristalino precipitaba después de 1 hora. El volumen de IPA se aumentó a 23 mL y el material se volvió a disolver con calentamiento y se enfrió a temperatura ambiente durante 48 horas. Se obtuvo un material blanco cristalino con un rendimiento del 34%.

10 La caracterización de ese material lo identificó como un solvato de IPA con una pureza química del 95,4%. La difracción muestra la formación de la sal de t-butilamonio del compuesto como un solvato de IPA.

**REIVINDICACIONES**

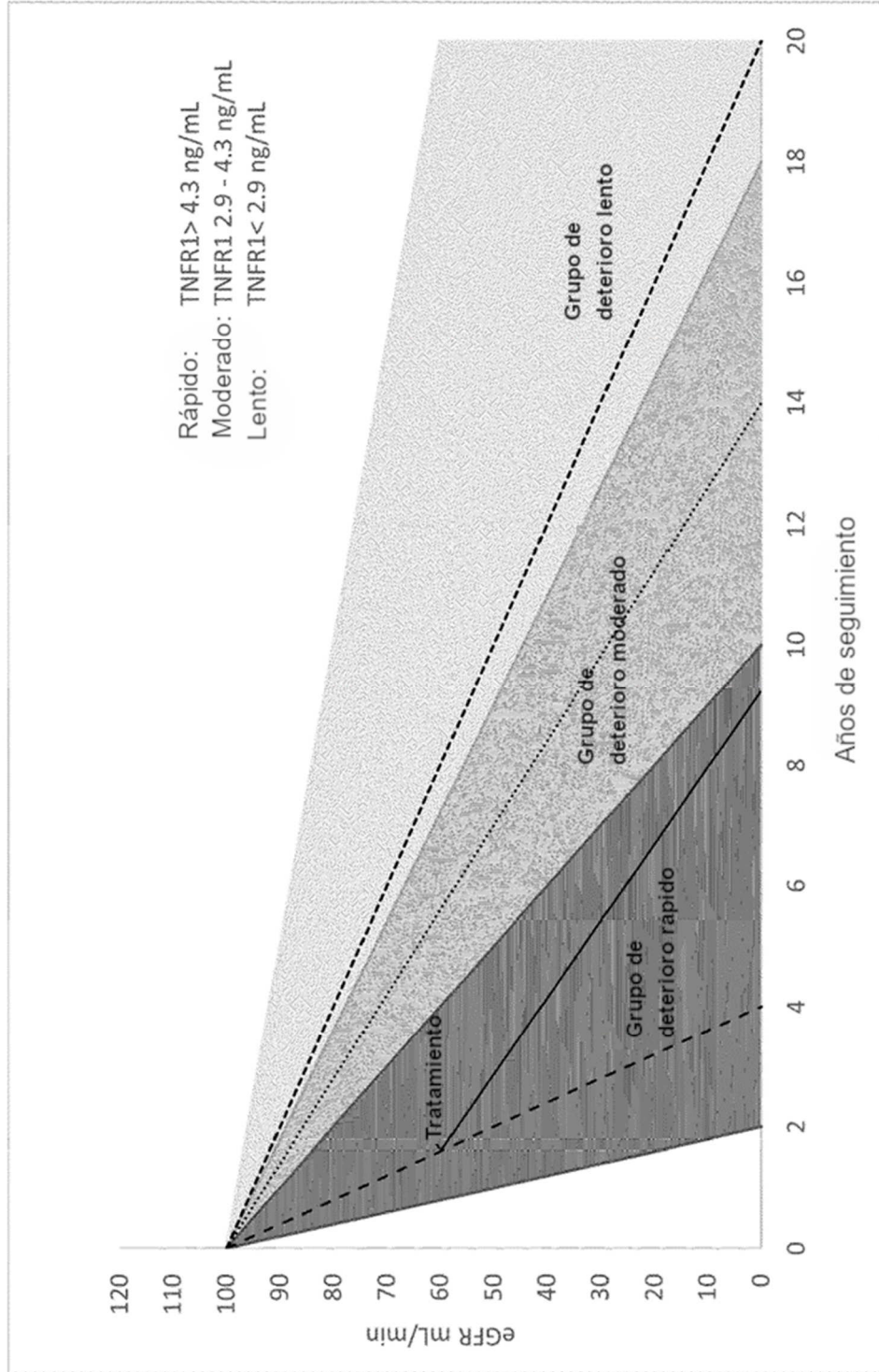
1. Compuesto de fórmula (I)



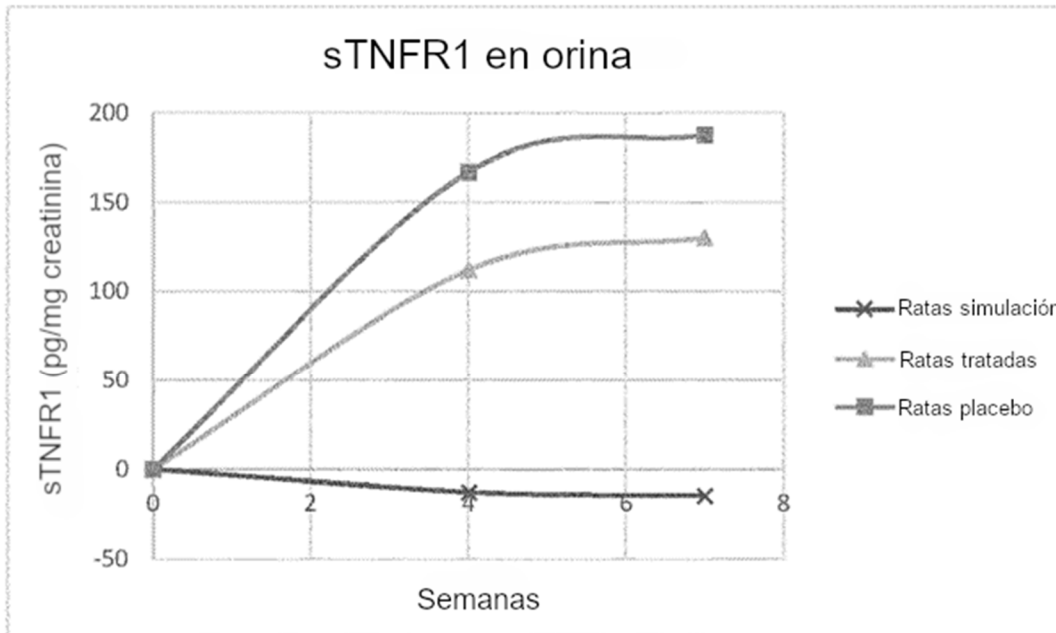
Fórmula (I)

- 5 para uso en el tratamiento de una población de pacientes que padecen una enfermedad renal, en donde la población que se va a tratar se caracteriza por tener un nivel sérico de TNFR1 de > 2,9 ng/mL y/o un ACR > 300 mg/g.
2. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad renal es nefropatía diabética.
3. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sTNFR1 elevado es > 4,3 ng/mL.
- 10 4. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto se administra como una dosis diaria en el intervalo de 0,16 mg/kg a 1,6 mg/kg, preferiblemente 0,3 mg/kg al día o 0,625 mg/kg.
5. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en la disminución de sTNF1R y/o ACR en el suero o la orina en un sujeto.
- 15 6. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el valor de sTNFR1 en suero u orina se reduce a < 4,3 ng/mL, preferiblemente < 2,9 ng/mL.

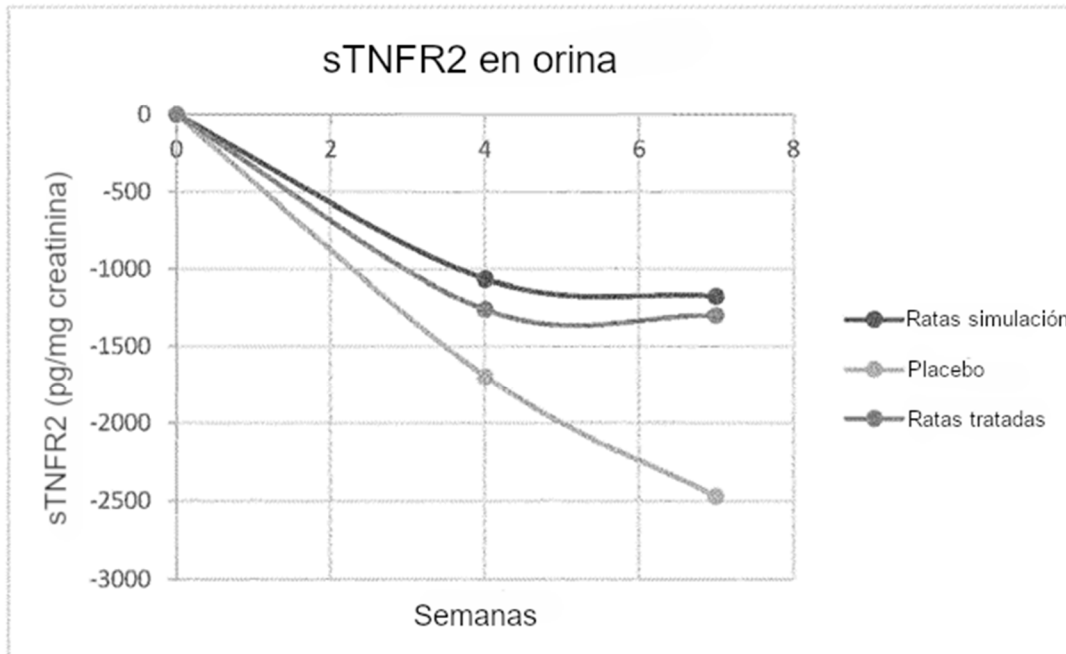
FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**

