

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 403**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2014 PCT/EP2014/072078**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15055694**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2014 E 14784452 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021 EP 3057591**

54 Título: **Ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético para su uso en la prevención o tratamiento de la lesión renal aguda**

30 Prioridad:

15.10.2013 EP 13306417

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

07.03.2022

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BRIAND, VÉRONIQUE;
GRATZER, SABINE;
HUEBSCHLE, THOMAS;
JANIAK, PHILIP;
KADEREIT, DIETER;
PARKAR, ASHFAQ;
POIRIER, BRUNO;
SCHAEFER, MATTHIAS y
WOHLFART, PAULUS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 898 403 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

Ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético para su uso en la prevención o tratamiento de la lesión renal aguda

5 La presente invención se refiere al ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en la prevención o el tratamiento de la lesión renal aguda (AKI), y una composición farmacéutica de este. El compuesto del ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un método preparativo de este se describen en la solicitud de patente WO2011/086079. Este compuesto tiene afinidad por los receptores de S1P₁/ EDG1.

10 La lesión renal aguda (AKI), anteriormente conocida como "insuficiencia renal aguda", es un trastorno frecuente y potencialmente grave que se presenta en una variedad de situaciones con manifestaciones clínicas que van desde la elevación transitoria de la creatinina sérica (SCr) hasta la insuficiencia renal anúrica definitiva. La AKI se ha descrito tradicionalmente como una disminución abrupta (dentro de las 48 horas) de la función renal medida por los aumentos de la creatinina sérica. Las guías recientes KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) establecieron un consenso en torno a los criterios de diagnóstico basados en los valores clínicos y de laboratorio que se enumeran a continuación (Grupo de trabajo de ERBP (European Renal Best Practice), 2012, NDT 27: 4263-4272). La AKI se define y organiza según cualquiera de los siguientes:

- Aumento de la SCr en $\geq 0,3$ mg/dl ($\geq 26,5$ μ mol/l) dentro de 48 horas; o
- Aumento de la SCr a $\geq 1,5$ veces el valor inicial, que se sabe o se presume que ha ocurrido dentro de los 7 días anteriores; o
- 20 • Volumen de orina $< 0,5$ ml/kg/h durante 6 horas.

La AKI aparece en aproximadamente el 7% de todos los pacientes hospitalizados (Nash y cols., 2002, Am J Kidney Dis 39: 930-936) y hasta un 36-67% de los pacientes críticamente enfermos, dependiendo de la definición usada. La AKI grave ocurre en el 4 al 25% de todos los ingresos a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y aproximadamente en el 5% de los pacientes de la UCI con AKI requieren terapia de reemplazo renal (Hoste y cols. 2006, Crit Care 10: R73, Mehta y cols., 2004, Kidney Int 66: 1613-1621; Uchino y cols., 2005, Jama 294: 813-818; Uchino y cols., 2006, Crit Care Med 34: 1913-1917; Ostermann y cols., 2007, Crit Care Med 35: 1837-1843). Las causas más comunes de AKI son sepsis, cirugía mayor, hipovolemia y medicamentos. Los factores de riesgo para el desarrollo de AKI incluyen edad avanzada (> 75 años), enfermedad renal crónica (ERC, TFGe (Tasa de Filtración Glomerular estimada) < 60 ml/min/1,73 m²), enfermedad vascular periférica aterosclerótica, insuficiencia cardíaca, enfermedad hepática, diabetes mellitus y medicamentos nefrotóxicos.

A pesar de los avances en las estrategias preventivas y las medidas de apoyo, la AKI sigue estando asociada con una alta morbilidad y mortalidad, especialmente en los ingresados en la UCI, donde las tasas de mortalidad intrahospitalaria pueden superar el 50%. Además de las tasas de mortalidad, existen consecuencias crónicas que incluyen un alto riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica (ERC) y desarrollo acelerado de enfermedad renal en etapa terminal (ERT) (Hsu y cols., 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4: 891-898; Ishani y cols., 2009, JASN 20: 223-228; Coca y cols., 2009, Am J Kidney Dis 53: 961-973). La morbilidad también se asocia con un aumento de los costos y una mayor duración de la estancia hospitalaria.

40 Existe una clara necesidad médica insatisfecha ya que no existe una terapia aprobada para la prevención o para el tratamiento de la AKI cualquiera que sea la etiología. El manejo de la afección es principalmente de apoyo, con la Terapia de Reemplazo Renal (TRR) como el componente central de la atención para los pacientes con AKI grave. La hidratación sigue siendo la medida preventiva más apropiada para la nefropatía inducida por contraste (NIC).

La esfingosina-1-fosfato (S1P) es un mediador lipídico que se une a cinco GPCRs (receptores acoplados a la proteína G) denominados S1P₁₋₅ (Brinkman y cols., 2007, Pharmacol Ther 115: 84-105.). La S1P circulante se origina principalmente a partir de células endoteliales, plaquetas y eritrocitos y se encuentra altamente unida a proteínas plasmáticas que incluyen ApoM (Apolipoproteína M) en HDL (lipoproteínas de alta densidad) (Hammad y cols., 2012, J Lipids; Karuna y cols., 2011, Atherosclerosis 219: 855-863) y albúmina. El S1P₁ está ampliamente expresado, incluyendo células endoteliales, inmunes y epiteliales renales. El S1P₁ regula muchas funciones fisiológicas, que incluyen el mantenimiento de la integridad de la barrera endotelial (reordenamientos del citoesqueleto), el crecimiento celular, la supervivencia, la diferenciación, la angiogénesis y el tráfico de células inmunes. El S1P₁ se expresa en gran medida en la médula renal (Zhu y cols., 2011, Am J Physiol Renal Physiol 301: F35-F41), una región del riñón donde el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno están restringidos por la anatomía túbulo vascular diseñada específicamente para la concentración urinaria. Dado que las células de esta región tienen un alto consumo de oxígeno, la médula es particularmente vulnerable al daño hipóxico. El daño de los túbulos corticales es una consecuencia tanto de la lesión de la médula como de las agresiones directas sobre las células de los túbulos proximales. El S1P₁ se regula positivamente después de una lesión por reperusión por isquemia renal (Awad y cols., 2006, Am J Physiol Renal Physiol 290: F1516-F1524) y se espera que su activación preserve la función renal a través de mecanismos principales:

- Mantenimiento de la función de la barrera endotelial. Esta barrera está dañada en la AKI, lo que da lugar a alteraciones de la permeabilidad vascular y de las propiedades de adhesión.
- Limitación de la apoptosis de las células epiteliales tubulares proximales,
- Reducción de la infiltración de células inflamatorias. La inflamación en la AKI es a menudo una consecuencia de la lesión combinada de las células tubulares epiteliales y de la barrera endotelial.

El papel de la vía S1P-S1P₁ en la regulación de la integridad de la barrera endotelial ha sido ampliamente documentada (Wang y Dudek, 2009, *Microvasc Res* 77: 39-45; Mc Verry y García, 2005, *Cell signaling* 17: 131-139; Lucke y Levkau, 2010, *Cell Phys Biochem* 26: 87-96). La activación de S1P₁ mejora la función de la barrera endotelial a través de la activación de la vía PLC/Ca²⁺/FAK/pRac (Belvitch y Dudek, 2012, *Microvasc Res* 83: 22-30). Se demostró que la S1P asociada a HDL-ApoM prolonga la función de la barrera endotelial a través de la activación de eNOS (Wilkerson y cols., 2012, *JBC* 287: 44645-44653; Christoffersen y cols., 2011, *PNAS* 108: 9613-9618; Argraves y cols., 2008, *JBC* 283: 25074-25081). En este sentido, los niveles bajos de HDL en plasma se han asociado con un riesgo de desarrollar AKI en pacientes sometidos a cirugía vascular (Miller GJ y Miller NE., 1975, *Lancet* 1: 16-19; Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW y cols., 1986, *JAMA*; 256: 2835-2838)

La supresión global o específica de endotelio de S1P₁ induce la letalidad del embrión debida a una hemorragia masiva que afecta a múltiples órganos (Kono y cols., 2004, *JBC* 279: 29367-29373). Se observan defectos idénticos en ratones *knockout* con supresión de las enzimas responsables de la biosíntesis de S1P (esfingosina quinasa 1 y 2) (Mizugishi y cols., 2005, *Mol Cell Biol* 25: 11113-11121.). Del mismo modo, los antagonistas de S1P₁ también aumentan la permeabilidad vascular. A pesar de los efectos protectores agudos de los antagonistas funcionales de S1P₁ en modelos de AKI (Bajwa y cols., 2010, *JASN* 21: 955-965; Awad y cols., 2006, *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F1516-F1524), el tratamiento crónico con estos antagonistas funcionales de S1P₁ empeora drásticamente la extravasación vascular en modelos de lesión pulmonar y altera la integridad de la barrera endotelial *in vitro* (Shea y cols., 2010, *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 662-673). También se imitan defectos endoteliales similares en ratones con menos S1P (Camerer y cols., 2009, *JCI* 119: 1871-1879).

En pacientes y modelos de AKI, las citoquinas como TNF- α se liberan de las células endoteliales y regulan positivamente moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y selectinas P/E que contribuyen a la infiltración de células inflamatorias en el parénquima túbulo-intersticial (Bonventre y cols., 2003, *JASN* 14: 2199-2210; Singbartl y cols., 2000, *Crit Care Med* 28: 2507-2514; Sadik y cols., 2012, *Mol Cell Biochem* 359: 73-81). Además, en células endoteliales humanas cultivadas, varias de estas moléculas de adhesión endotelial se regulan positivamente después de la hipoxia/re-oxigenación (Lutz y cols., 2008, *J Mol Med* 86: 1329-1339). La activación de S1P₁ regula a la baja estas moléculas de adhesión y, por lo tanto, reduce la infiltración de células inflamatorias (Lien y cols., 2006, *Kidney Int* 69: 1601-1608). Se ha demostrado un papel esencial de la S1P en la conservación de la función endotelial en la lesión renal aguda que usa una supresión condicional del receptor endotelial S1P₁ en ratones (Ham A., 2013, *Kidney Int*, Sept.).

La estimulación de S1P₁ activa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) a través de la fosforilación de Akt, que es una enzima clave que regula la vasorelajación local a través de la producción de NO (Morales-Ruiz y cols., 2001, *JBC* 276: 19672-19677; Igarashi y cols., 2000, *JBC* 275: 32363-32370; Igarashi y cols., 2008, *BBA* 1781: 489-495). Por lo tanto, la S1P induce vaso-relajación de una manera dependiente del endotelio y del NO (Roviezzo y cols., 2006, *FASEB J* 20: 340). El NO tiene un efecto protector sobre la función renal en modelos animales de AKI inducida por I/R (García-Criado y cols, 1998, *Transplantation* 66: 982-990). En ratas, la inhibición de la eNOS reduce el flujo sanguíneo renal en un 35%, con disminuciones asociadas en la TFG y aumento de la resistencia vascular renal (Cao y cols, 2010, *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1056-F1064). La S1P se considera uno de los activadores más eficaces del óxido nítrico endotelial, que se sabe que mejora el flujo sanguíneo local, pero también limita la activación plaquetaria y la congestión vascular, particularmente en la vulnerable región cortico-medular. Este mecanismo podría ser importante para preservar la función renal durante la AKI. Es importante destacar que la reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico se asocia con la AKI en pacientes con bypass cardiopulmonar (BCP) y con sepsis (Lema y cols., 2009, *J Cardio Thorac Vasc Anesth* 23: 188-194; Sadik y cols., 2012, *Mol Cell Biochem* 359: 73-81). Curiosamente, un polimorfismo 786C en el promotor de eNOS humana exhibe una actividad transcripcional reducida y se asocia con disfunción renal en pacientes de cirugía cardíaca con bypass cardiopulmonar (Popov y cols., 2009, *Eur J Cardio-Thorac Surgery* 36: 651-656; Nakayama y cols., 1999, *Circulation* 99: 2864-2870). La frecuencia del polimorfismo es de aproximadamente el 50% y podría representar una subpoblación significativa que no solo tiene más riesgo de desarrollar AKI, sino que también responde mejor a un tratamiento que restaura los niveles locales de NO, como a través de la activación de S1P₁.

Además, la activación de S1P₁ limita directamente la apoptosis de las células epiteliales tubulares proximales activando las vías de supervivencia pERK y pAkt. La supresión específica de S1P₁ en las células epiteliales tubulares proximales empeora la disfunción renal después de una lesión por isquemia-reperusión (Bajwa y cols., 2010, *JASN* 21: 955-965), así como la necrosis tubular, lo que subraya un patrón de S1P endógeno que amortigua la gravedad de la lesión por reperusión. Estos datos subrayan la importancia de un papel protector para el sistema S1P-S1P₁ en la AKI, tanto en eje endotelial como epitelial.

La S1P es responsable de la salida de linfocitos del ganglio linfático a la sangre a través de la activación de S1P₁. Esta

activación de S1P₁ provoca la internalización del receptor seguida del reciclaje del receptor de vuelta a la superficie celular, lo que permite la reactivación. Sin embargo, se cree que los antagonistas funcionales o antagonistas de S1P₁ causan linfopenia ya sea al inhibir el reciclaje de los receptores S1P₁ internalizados de vuelta a la superficie celular o bloqueando la activación de S1P₁, y, por lo tanto, origina reducciones dramáticas y prolongadas en el S1P₁ de superficie celular. En consecuencia, los últimos agentes muestran una caída grande y prolongada de linfocitos sanguíneos como se observa preclínica y clínicamente.

Varios informes muestran que los linfocitos T contribuyen a la lesión renal aguda. La observación de que la lesión mejora con la depleción de las células T y se reconstituye con la transferencia adoptiva de células T CD4 + es una evidencia de que depende de las células T CD4 + (Burne y cols., 2001, J. Clin Invest 108: 1283-1290.; Ysebaert y cols., 2004, Kidney Int 66: 491-496). Por tanto, no es de extrañar que los antagonistas funcionales de S1P₁ que incluyen fingolimod y SEW2871, sean protectores en modelos de lesión renal aguda a dosis linfopénicas (Lien y cols., 2006, Kidney Int 69: 1601-1608).

Sin embargo, la linfopenia es un factor predisponente para las infecciones oportunistas, especialmente en pacientes muy sensibles y debilitados, como los pacientes con alto riesgo de AKI (edad avanzada, enfermedades cardíacas, diabetes y enfermedad renal crónica). En consecuencia, existe una necesidad de un agonista selectivo de S1P₁ que induzca linfopenia limitada, o en el mejor de los casos, ninguna linfopenia, y tenga utilidad terapéutica en el tratamiento de la AKI. De manera sorprendente, el compuesto del ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético difiere de otros moduladores de S1P₁, por el hecho de que causa protección frente a la AKI en mamíferos a dosis no linfopénicas. Se cree que esta propiedad del ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético podría estar relacionada con su agonismo sesgado en el receptor S1P₁, con mínimos efectos de antagonismo funcional o de desensibilización. Esto representaría una ventaja de seguridad clínica significativa para el uso del ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético en el tratamiento de la AKI.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere al ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en la prevención o el tratamiento de la AKI (lesión renal aguda).

La presente invención también se refiere al ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso como agente no linfopénico en la prevención o el tratamiento de la AKI.

Definiciones

Por razones de conveniencia y para facilitar la lectura, el compuesto del ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético ha sido renombrado como "compuesto A" en los capítulos de la solicitud actual y en las figuras.

Para la presente invención, las siguientes palabras se deben entender como corresponde:

- El agonista selectivo de S1P₁ es un compuesto que es más potente sobre S1P₁ en comparación con los otros 4 receptores de S1P, S1P₂₋₅. Además, el compuesto debe tener una actividad mínima o nula en una amplia gama de ensayos de receptores, enzimas y canales iónicos.
 - La linfopenia es la afección de tener un descenso anormal de linfocitos en sangre, una célula blanca de la sangre con funciones importantes en el sistema inmunológico. En los adultos, es diagnóstico un nivel de linfocitos por debajo de 1.500 células/microlitro (prueba de la afección), y en los niños, es diagnóstico un nivel de linfocitos por debajo de 3.000 células/microlitro.
- La linfopenia mediada por la activación de S1P₁ se refiere a una afección linfopénica causada por el uso de un modulador de S1P₁. Dado que S1P es responsable de la salida de linfocitos mediada por S1P₁ desde el ganglio linfático a la sangre, se cree que estos últimos agentes causan linfopenia ya sea al inhibir el reciclaje de los receptores S1P₁ internalizados de vuelta a la superficie celular o bloqueando la activación de S1P₁.
- La linfopenia limitada es una reducción transitoria de los linfocitos sanguíneos (el recuento absoluto de linfocitos se sale del rango normal antes del tratamiento). Transitorio se refiere a un cambio temporal en los linfocitos que regresa al rango normal en 24 h o 48 h.
 - No-linfopénico o sin linfopenia se refiere a la ausencia de reducción transitoria o prolongada de linfocitos en sangre (recuento absoluto de linfocitos que cae fuera del rango normal antes del tratamiento). Transitorio se refiere a un cambio temporal en los linfocitos que regresa al rango normal dentro de las 24 h, mientras que prolongado se refiere a una reducción que persiste más allá de las 24 h.
 - Dosis protectora de AKI: una dosis de ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético que proporciona una reducción significativa de la creatinina plasmática de al menos un 30%.

- Cantidad terapéuticamente eficaz, como se usa en esta memoria, significa una cantidad de un compuesto farmacéutico, tal como ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético que produce un efecto sobre la AKI.
 - Paciente significa un paciente humano.
- 5
- Profiláctico: que sirve para prevenir o proteger frente a un efecto no deseado y está destinado a prevenir que se produzca una afección médica, especialmente una enfermedad.

Una primera realización es el ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en la prevención o el tratamiento de la AKI, en donde el ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético no es linfopénico en dosis protectoras de AKI.

- 10 Una segunda realización es el ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en la prevención o el tratamiento de la AKI, en donde los efectos protectores están mediados por la activación de S1P₁ sin inducir linfopenia.

Abreviaturas

	AKI	Lesión renal aguda
15	ApoM	Apolipoproteína M
	NIC	Nefropatía Inducida por Contraste
	ERC	Enfermedad Renal Crónica
	DMSO	Dimetilsulfóxido
	ERBP	Mejores Prácticas Renales Europeas
20	TFGe	Tasa de Filtración Glomerular estimada
	eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
	ERT	Enfermedad renal en etapa terminal
	FlipR	Lector de placas de imágenes de fluorescencia
	GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
25	HDL	Lipoproteínas de alta densidad
	HDMEC	Células endoteliales microvasculares dérmicas humanas
	HSC	Células estrelladas hepáticas
	UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
	I/R	Isquemia/Reperusión
30	KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
	PBS	Solución salina de tampón de fosfato
	TRR	Terapia de reemplazo renal
	S1P	Esfingosina-1-fosfato
	S1P ₁	Esfingosina-1-fosfato 1
35	SCr	Creatinina de suero
	s.e.m	error estándar de la media

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención y no pretenden limitar la invención. Por razones convenientes y para facilitar la lectura, el compuesto del ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo[5,4-D]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético ha sido renombrado como "compuesto A" en las figuras y los resultados.

40

Se han realizado los análisis estadísticos y el cálculo de los valores p y están simbolizados por los símbolos "*" o "#" en las figuras, dependiendo de las condiciones experimentales.

Figura 1: Efecto de una administración única o repetida del compuesto A y/o BAF-312 en el modelo de isquemia-reperusión (I/R) de rata. Las ratas Fischer se sometieron a cirugía simulada o a oclusión bilateral de la arteria renal durante 25 min y se midió la creatinina plasmática después de 24 h de la reperusión. (Fig 1-A) Se evaluó

45

el compuesto A a 0,3, 1 y 3 mg/kg administrado p.o. 1 hora antes de la oclusión. (Figura 1-B) Se evaluó BAF-312 a 3, 10 y 30 mg/kg administrado p.o. 1 hora antes de la oclusión. Al grupo de control sin compuesto se le administró vehículo 1 hora antes de la oclusión. *** p <0,001 vehículo I/R frente al grupo simulado. # p <0,05; ## p <0,01 tratado con compuesto frente al grupo de vehículo. Las barras son medias +/- s.e.m. (Fig. 1-C) Se recogieron muestras de riñón para evaluar el efecto del compuesto A sobre el contenido de albúmina cortical después de una lesión por I/R de rata. La albúmina se midió mediante transferencia de Western en el área cortical de los riñones representativos de ratas tratadas con operación simulada, tratadas con vehículo I/R o tratadas con compuesto A I/R (3 mg/kg p.o.). (Fig. 1-D) Se administró el compuesto A (3 mg/kg p.o.) o el vehículo dos veces al día durante 5 días. La última administración se administró 1 hora antes de la oclusión. ** p <0,01 vehículo I/R frente al grupo simulado. ### p <0,001 tratado con compuesto A frente al grupo de vehículo. Las barras son medias +/- s.e.m.

Figura 2: Efecto del compuesto A sobre la lesión por AKI inducida por rabiomiólisis en ratones. El compuesto A (0,3, 1, 3 y 10 mg/kg) o el vehículo se administraron por vía oral 1 hora antes de la inyección intramuscular (patas traseras) de glicerol (al 50% en PBS v/v) a 8 ml/kg en ratones machos CD1. El grupo simulado recibió el volumen correspondiente de PBS. Se evaluó la creatinina plasmática 24 h después. ** p <0,01 vehículo de glicerol frente al grupo simulado. # p <0,05 tratado con compuesto A frente al grupo de vehículo. Las barras son medias +/- s.e.m.

Figura 3: Linfocitos de sangre periférica en ratas Fischer después de la administración única (Fig. 3-A) o en ratas Sprague-Dawley después de administración única (Figura 3-B) o administración repetida (Figura 3-C). Se administró el compuesto A por vía oral a 1, 3, 10 y 30 mg/kg ya sea a ratas Fischer o a 3 mg/kg a ratas Sprague-Dawley. Se administró BAF-312 por vía oral a 1 y 10 mg/kg a ratas Fischer o 3 mg/kg a ratas Sprague-Dawley (n = 8). En el protocolo de administración repetida, los compuestos se administraron durante 5 días dos veces al día. Los linfocitos sanguíneos se expresan ya sea como área bajo la curva (AUC) (Fig 3-A) o como un porcentaje del total de células blancas sanguíneas en cada punto de tiempo (Fig 3-B/C), y se representan como media +/- s.e.m. ** p <0,01 frente al valor inicial. (Fig. 3-D) Relación entre la protección frente a la AKI y la linfopenia en ratas Fischer. Nótese los recuadros que indican la ausencia de linfopenia y la protección total frente la AKI para el compuesto A a 3 mg/kg, mientras que BAF-312 es linfopéxico y muestra una protección parcial frente a la AKI.

Figura 4: Linfocitos de sangre periférica en ratones C57Bl6/J. Se administró el compuesto A a 1, 3, 10 y 30 mg/kg p.o. (n = 8). Los linfocitos sanguíneos en cada punto de tiempo se expresan como un porcentaje del total de células blancas sanguíneas y se representan como media +/- s.e.m. *** p <0,001 frente al valor inicial.

Figura 5: Linfocitos de sangre periférica en perros beagle. Se tomaron los recuentos de linfocitos iniciales y luego se administró a los perros una única dosis oral de compuesto A, a 3, 10 y 30 mg/kg (n = 8), o BAF-312, a 10 mg/kg (n = 4). Los animales se monitorizaron durante 7 días (Fig. 5-A) y, en el caso de BAF-312, hasta 66 días (Fig. 5-B). * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 frente al valor inicial. Las barras son medias +/- s.e.m. Téngase en cuenta que el compuesto A no indujo ninguna linfopenia significativa en ninguno de los puntos de tiempo medidos para la dosificación de 3 mg/kg.

Figura 6: Extravasación vascular pulmonar en ratones C57Bl6/J y ratas Fischer sanos. Los ratones se trataron durante 7 días con compuesto A (3 y 10 mg/kg p.o. b.i.d.), BAF-312 (1 y 3 mg/kg p.o. b.i.d.) y fingolimod (0,1 y 1 mg/kg p.o. b.i.d.), n = 5-8. (Fig. 6-A) Permeabilidad vascular evaluada mediante la extravasación del azul de Evan. (Fig 6-B) Peso del pulmón. Las ratas se trataron durante 7 días con compuesto A (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg p.o. b.i.d.) y BAF-312 (0,03, 0,1, 0,3, 3 y 30 mg/kg p.o. b.i.d.). (Fig. 6-C) Permeabilidad vascular evaluada mediante la extravasación del azul de Evan. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 frente al control (sin compuesto) para ratones o vehículo (metilcelulosa al 0,6% - tween 80 0,5% en agua) para ratas. Las barras son medias +/- s.e.m.

Figura 7: Desensibilización del receptor S1P₁ en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) usando un ensayo de impedancia. Las HDMEC se estimularon primero durante 1 h con S1P (1 μM), fingolimod (100 nM) o compuesto A (1 μM), seguido de un período de lavado de 30 minutos. El efecto de la primera estimulación en la desensibilización del receptor se evaluó mediante una segunda estimulación de S1P (3 concentraciones) y medición de la impedancia resultante (n = 3 experimentos). Todas las concentraciones de la primera estimulación fueron > EC₉₀. Las barras son medias +/- s.e.m.

Figura 8: Desensibilización del receptor S1P₁ en células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC) usando un ensayo de impedancia. Las HUVEC se estimularon primero durante 1 h con S1P (1 μM), compuesto A (1 μM), fingolimod (100 nM) o SEW2871 (1 μM), seguido de un período de lavado de 30 minutos. El efecto de la primera estimulación en la desensibilización del receptor se evaluó mediante una segunda estimulación de S1P (4 concentraciones) y medición de la impedancia resultante (n = 3 experimentos). Todas las concentraciones de la primera estimulación fueron > EC₉₀. Las barras son medias +/- s.e.m.

Figura 9: Desensibilización del receptor S1P₁ en células CHO que sobreexpresan S1P₁ (fusión-G) usando un ensayo FlipR. (Fig. 9-A) El protocolo implicó 5 minutos de primera estimulación con S1P (100 nM), compuesto A, fingolimod, BAF-312, ponesimod a las concentraciones indicadas. Todas las concentraciones de la primera estimulación se eligieron para que fueran > EC₉₀. Después de diferentes períodos de lavado, se evaluó la desensibilización del receptor mediante una segunda estimulación con S1P (100 nM). (Fig. 9-B) Se muestra la respuesta FlipR inducida por S1P, expresada como un porcentaje de la respuesta basal, para cada compuesto con

períodos de lavado variables (de 15 a 60 min, n = 4 experimentos). Las barras son medias +/- s.e.m.

Figura 10: Desensibilización del receptor S1P₁ en células estrelladas hepáticas humanas (HSC) usando un ensayo FlipR. (Fig.10-A) El protocolo implicó una primera estimulación con compuesto A (10 μ M) o BAF-312 (300 nM). Todas las concentraciones de la primera estimulación se eligieron para que fueran > EC₉₀. Después de periodos de lavado de 1 hora o 3 horas, se evaluó la desensibilización del receptor usando una segunda estimulación con el mismo compuesto. (Figura 10-B) Se muestra la respuesta FlipR inducida por el compuesto A o BAF-312, expresada como unidades de fluorescencia para cada compuesto con períodos de lavado variables (n = 3 experimentos). Las barras son medias +/- s.e.m.

Figura 11: Evolución temporal de la S1P plasmática después de la lesión por I/R en ratones C57Bl6/J. Se evaluaron los niveles plasmáticos de S1P (kit Elisa de Echelon) después de una cirugía simulada o después de 22 min de oclusión bilateral de la arteria renal seguida de reperfusión. El grupo de control (CTRL) no se sometió a cirugía. ### p <0,001 frente al grupo simulado (emparejado en el tiempo). * p <0,05; ** p <0,001; *** p <0,001 frente al control (CTRL). Las barras son medias +/- s.e.m.

Métodos

15 Materiales:

Fingolimod y SEW2871 están disponibles comercialmente. BAF-312 y ponesimod se sintetizaron de acuerdo con métodos publicados:

- WO04/103306 para BAF-312,
- WO05/054215 para ponesimod.

20 El compuesto A se ha sintetizado de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO2011/086079.

Todos los estudios *in vivo* se realizaron de acuerdo con los Estándares de la Comunidad Europea sobre el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Sanofi Research & Development.

Análisis estadístico:

25 Sobre la base de la normalidad de la distribución y la homogeneidad de la varianza (prueba de Levene), se usó una prueba de Student o una prueba de Wilcoxon para comparar el grupo simulado/control con el grupo tratado con vehículo con el fin de evaluar las diferencias en el parámetro evaluado. A continuación, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) o ANOVA de dos vías, usando el software Everst@t V6 para comparar el grupo tratado con vehículo con el(los) grupo(s) tratados con compuesto. Este análisis primario se continuó con una prueba post hoc de Dunnett cuando fue apropiado. En caso de no homogeneidad de la varianza, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas si p <0,05.

1. Seguridad de la función cardiovascular

a) Ensayo de hERG

35 Se ha cultivado la línea celular CHO (Ovario de Hámster Chino) recombinante que expresa el canal de potasio ERG (gen relacionado con el éter-a-go-go) (Número de Catálogo Cytomyx: CYL3002) humano de acuerdo con el siguiente protocolo. Cuando fue necesario, se ha reiniciado un cultivo a partir de alícuotas congeladas. Las alícuotas de células congeladas (1 ml) se atemperaron rápidamente a 37 °C y se volvieron a plaquar primero en una matraz de 75 cm² (Corning). A continuación, se ajustó el volumen a 10 ml con el Medio Esencial Mínimo α (Gibco 32571-028) que contenía suero de ternera fetal al 10%. El medio se ha renovado a las 24 h y se ha añadido genetina al 1% (G418, Gibco 10131) para evitar la derivación celular. Después de dos o tres días, las células se sembraron a 1,5x10⁶ células por matraz T25. Los matraces se colocaron en una incubadora de CO₂ al 5% a 37 °C durante 1 hora; después de haber sido colocados a 28 °C en una incubadora de CO₂ al 5% durante 2 días. El procedimiento de aislamiento celular se llevó a cabo después de 2 días de incubación a 28 °C. Las células se recolectaron con Accumax (Sigma; 1: 4) o versene (Gibco) y se colocaron en medio extracelular.

45 Las células se superfundieron con la solución extracelular PATCH (NaCl, 138 mM; KCl, 4 mM; CaCl₂, 1,8 mM; MgCl₂, 1 mM; glucosa, 5,6 mM, HEPES, 10 mM). El pH se ajusta a 7,3 con NaOH. La osmolaridad se ajusta a 285 mOsm. La solución interna se preparó como sigue: KCl, 60 mM; KF, 70 mM; NaCl, 15 mM; HEPES, 5 mM; EGTA(K), 5 mM; el pH se ajustó a 7,25 con KOH. La osmolaridad se ajusta a 290 mOsm.

50 Se activó la corriente hERG en respuesta a las etapas de voltaje (2 s) a partir de un potencial de retención de -80 mV a un potencial de prueba de +20 mV seguido de una repolarización a -100 mV. Se aplicaron etapas de voltaje a intervalos de 20 s. La corriente hERG se midió como la corriente de desactivación de cola a -100 mV. Después de un período de 3 minutos para las mediciones del valor inicial, se midieron los efectos del compuesto A 4-6 minutos después del cambio de solución. Al final de cada experimento, la superfusión de un bloqueante específico de hERG,

es decir, Risperidona (que exhibe un IC₅₀ de aproximadamente 0,7 μM), a una concentración de 10 μM, permitió medir una inhibición del 100% de hERG.

Las corrientes se analizaron usando una base de datos y un software de análisis DataXpress 1.0 (Axon Instruments/Molecular Devices). El decaimiento lineal de las corrientes se extrapola a partir del período de medición de inicio y se calculó el porcentaje de inhibición de la corriente hERG después del efecto del fármaco de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de inhibición de la corriente hERG (\%)} = 100 - [(I - I_{\text{risperidona}}) / (I_{\text{valor inicial}} - I_{\text{risperidona}})] \times 100$$

Donde "I" era la corriente medida después del efecto del fármaco, "Irisperidona" era la corriente medida después del efecto del bloqueante específico de hERG e "Ivalor inicial" era la corriente medida antes de la superfusión del fármaco.

b) Ensayo de fibras de Purkinje de conejo

Se evaluaron los efectos del compuesto A sobre el potencial de membrana en reposo y los parámetros del potencial de acción registrados a partir de fibras de Purkinje de conejo aisladas (machos, conejos New Zealand; 1,3 a 1,5 kg; 9-12 semanas de edad) mediante una técnica de microelectrodos. Se midieron los siguientes parámetros: potencial de reposo (RP en mV), amplitud del potencial de acción (APA en mV), tasa máxima de aumento del potencial de acción (V_{max} en V/s), duración del potencial de acción al 50 y 90% de la repolarización (APD₅₀ y APD₉₀ en ms). Las fibras se superfundieron con una solución fisiológica oxigenada que contenía (en mmol/l): NaCl, 120; KCl, 4; MgCl₂, 1; NaH₂PO₄, 1,8; NaHCO₃, 25; glucosa, 11; CaCl₂, 1,8; pH = 7,4, a 36 ± 1 °C. El compuesto A se disolvió primero en DMSO para obtener una solución madre de 12 mmol/l. Esta solución se diluyó más en DMSO y luego se añadió a la solución fisiológica para obtener las concentraciones nominales adecuadas de 0,3, 1, 3, 10 y 30 μmol/l (es decir, 0,1, 0,5, 1,4, 4,5 y 13,6 μg/ml de ingrediente activo, respectivamente). La concentración final de DMSO en la formulación de prueba se mantuvo constante al 0,25% (v/v) en la solución fisiológica. Las fibras de Purkinje (n = 4) se superfundieron primero con la solución fisiológica. Después de un período de control de 30 minutos, se evaluó el compuesto de prueba a concentraciones crecientes aplicadas secuencialmente, cada 30 minutos. Para cada concentración probada, las fibras se estimularon a la tasa basal de 1 pulso por segundo (1 Hz). Además, la tasa de estimulación se redujo de 1 pulso por segundo (1 Hz) a 1 pulso cada 4 segundos (0,25 Hz) durante 3 minutos, se aumentó de nuevo a 1 pulso por segundo durante 1 minuto y finalmente se aumentó a 3 pulsos por segundo (3 Hz) durante 2 minutos adicionales (entre los minutos 19 y 25), como se describe a continuación:

TIEMPO (min)	19	3	1	2	5	19	3	1	2	5	19
tiempo de medida		*		*		*		*		*	
tasa de estimulación (Hz)				3					3		
	1		1		1	1		1		1	1
		0,25					0,25				
	Periodo control (30 min)					Compuesto 1ª concentración (30 min)					2ª C (30 min)

Se usó la baja tasa de estimulación para favorecer la aparición de eventos eléctricos anormales durante la fase de repolarización del potencial de acción y para facilitar el desarrollo de Posdespolarización Temprana (EAD). Se usó la alta tasa de estimulación para evaluar el bloqueo de los canales de sodio dependiente del uso. Después de la concentración más alta, se superfundió la solución fisiológica de nuevo para evaluar la reversibilidad del efecto del fármaco (lavado).

c) Estudios de telemetría en perros

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto potencial del compuesto A sobre la función cardiovascular (presión arterial, frecuencia cardíaca y ECG) en perros conscientes con telemetría durante un período de 24 horas después de la dosificación.

Los perros conscientes que se movían libremente (Marshall Farms, n = 4, 2 machos y 2 hembras, de 6,9 a 10,8 kg de peso corporal y de 44 a 64 meses) recibieron una dosis oral o intravenosa del artículo de control negativo (es decir, solución acuosa de hidroxietilcelulosa al 0,5% (p/p) / polisorbato 80 al 0,6% (p/p) por vía oral, o solución acuosa de Captisol al 20%, pH 7,5 a 8) seguido de compuesto A 30 y 100 mg/kg por vía oral como suspensiones en artículo de control negativo, o 10 y 30 mg/kg por vía intravenosa como solución en el artículo de control negativo, de acuerdo con un diseño de estudio de dosis creciente con al menos un período de lavado de 4 días entre cada administración (5 ml/kg por vía oral o para infusión de 30 minutos en la vena yugular). Se registraron de modo continuo la presión arterial y las señales de ECG de la derivación II (Transmisores de Data Science, EE. UU.) en cada día de tratamiento desde aproximadamente 2 horas antes de la dosificación hasta 24 horas después de la dosificación. Se analizaron los siguientes parámetros en varios momentos: presión arterial (sistólica, diastólica y media), frecuencia cardíaca,

parámetros electrocardiográficos de duraciones de los intervalos RR, PQ (= PR), QT y duración del complejo QRS, así como la temperatura corporal. El intervalo QT se corrigió para las variaciones de la frecuencia cardíaca de acuerdo con las fórmulas de Fridericia y de van de Water. La señal de ECG completa se examinó latido a latido en busca de cualquier alteración del ritmo y morfología de la forma de onda desde 30 min hasta 6 h después de la dosificación. Se realizaron observaciones clínicas en cada día de tratamiento. Se revisó una grabación de video para identificar posibles cambios graves de comportamiento y una posible interferencia con los parámetros cardiovasculares. Después de la dosificación, los puntos de tiempo para el análisis fueron los siguientes: 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 y 24 horas.

2. Diferenciación en la integridad de la barrera endotelial

a) Estudio de la extravasación vascular pulmonar en ratón

Se trataron ratones macho C57Bl6/J (n = 5-8, 25-30 g) (Laboratorio Charles River, Francia), por vía oral y dos veces al día, durante 7 días con compuesto A 3 y 10 mg/kg, BAF-312 a 1 y 3 mg/kg, fingolimod a 0,1 y 1 mg/kg o artículo de vehículo (metilcelulosa al 0,6% - tween 80 al 0,5% en agua) en un volumen de administración de 10 ml/kg. El número de ratones incluidos en cada grupo fue entre 5 y 8. Después de 7 días, los ratones se anestesiaron usando una inyección i.p. de mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilasina (10 mg/kg). Se inyectó azul de Evans i.v. en la vena yugular a 15 mg/kg en 1 ml/kg. Diez minutos más tarde, el ventrículo izquierdo inyectó suero fisiológico para lavar el cuerpo del azul de Evans intravascular residual. Se recogió y pesó tejido pulmonar y luego se sumergió en una solución de formamida pura durante 24 h para extraer tejido de azul de Evans y, por lo tanto, evaluar la permeabilidad vascular. La concentración de azul de Evans se evaluó a 630 nM usando una curva estándar y se normalizó con el peso del pulmón. Los resultados se expresan como medias +/- s.e.m.

b) Estudio de la extravasación vascular pulmonar en rata

Se trataron ratas Fischer macho (n = 4-8, 280-350 g) (Laboratorio Charles River, Francia), por vía oral y dos veces al día, durante 7 días con compuesto A (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg), BAF-312 (0,03, 0,1, 0,3, 3 y 30 mg/kg) o artículo de vehículo (metilcelulosa al 0,6% - tween 80 al 0,5% en agua) en un volumen de administración de 2 ml/kg. Después de 7 días, las ratas se anestesiaron usando una inyección i.p. de pentobarbital (50 mg/kg). Se inyectó azul de Evans i.v. en el seno retroorbital a 30 mg/kg en 1 ml/kg. Quince minutos más tarde, el ventrículo izquierdo inyectó suero fisiológico para lavar el cuerpo del azul de Evans intravascular residual. Se recogió y pesó tejido pulmonar y luego se sumergió en una solución de formamida pura (4 ml/g de peso de tejido) durante 24 h para extraer tejido de azul de Evans y, por lo tanto, evaluar la permeabilidad vascular. La concentración de azul de Evans se evaluó a 630 nM usando una curva estándar. Los resultados se expresan como medias +/- s.e.m.

3. Diferenciación en la actividad linfopénica

a) Estudios de linfopenia en ratas

Las ratas macho Sprague-Dawley (n = 8, 250 a 350 g) (Laboratorio Charles River, Francia) recibieron la administración oral de compuesto A, BAF-312 a 3 mg/kg o un artículo de vehículo (metilcelulosa al 0,6% - tween 80 al 0,5% en agua) en un volumen de administración de 2 ml/kg. Se usaron dos protocolos: administración única o administración repetida b.i.d. durante 5 días consecutivos. Se recogió sangre a las 2, 6 y 24 h después de la administración del compuesto (última administración para el protocolo repetido) para el análisis hematológico para determinar el recuento de linfocitos en sangre completa. Los resultados se expresan como media +/- s.e.m.

Las ratas Fischer macho (n = 8, 250 a 350 g) (Laboratorio Charles River, Francia) recibieron una única administración oral de compuesto A (1, 3, 10 y 30 mg/kg), BAF-312 (1 y 10 mg/kg) o artículo de vehículo (metilcelulosa al 0,6% - tween 80 al 0,5% en agua) en un volumen de administración de 2 ml/kg. Se recogió sangre a las 2, 6 y 24 h después de la administración del compuesto para análisis hematológico para determinar el recuento de linfocitos en sangre completa. Los resultados se expresan como media +/- s.e.m.

b) Estudios de linfopenia en ratones

Los ratones macho C57Bl6/J (n = 8, 25-30 g) (Laboratorio Charles River, Francia) recibieron una única administración oral de compuesto A a 1, 3, 10 y 30 mg/kg o un artículo de vehículo (metilcelulosa al 0,6% - interpolación 80 al 0,5% en agua) en un volumen de administración de 10 ml/kg. Se recogió sangre a las 2, 6 y 24 h después de la administración del compuesto para análisis hematológico para determinar el recuento de linfocitos en sangre completa. Los resultados se expresan como media +/- s.e.m.

c) Estudios de linfopenia en perros

Los perros machos conscientes que se movían libremente (Marshall Farms, n = 8, de 10,5 a 14,3 kg de peso corporal) recibieron una dosis oral del artículo de control negativo (es decir, una solución acuosa de hidroxietilcelulosa al 0,5% (p/p) / polisorbato 80 al 0,6% (p/p)) o compuesto A 3, 10 y 30 mg/kg o BAF-312 a 10 mg/kg, como suspensiones en un artículo de control negativo, de acuerdo con un diseño de estudio de dosis creciente con un período de lavado de al menos 7 días entre cada administración (5 ml/kg). Se recogió sangre a las 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 y 168 h para ambos compuestos (y hasta 66 días para BAF-312) para análisis hematológico para determinar el recuento de

linfocitos en sangre completa. Los resultados se expresan como media +/- s.e.m.

4. Farmacología *in vitro*

a) Ensayo de movilización de calcio (FlipR) en células de ovario de hámster chino (CHO), células Chem y HSC

5 1. Células CHO

Se probaron las actividades del compuesto A, BAF-312 y fingolimod en transfección estable de Flip-In con la construcción de fusión hS1P₁-G en células CHO (patentada) y se probaron selectivamente sobre las construcciones de fusión hS1P₂-G y hS1P₃-G (patentadas). La generación de líneas celulares se describe en el documento WO2011/086079.

10 Se cuantificó la activación del receptor S1P₁ por los compuestos mediante su efecto sobre la liberación de calcio relacionada con el receptor S1P₁ en un ensayo de fluorescencia de calcio basado en células mediante el uso de células CHO en las que estaba sobreexpresado de forma estable el receptor S1P₁ humano (sistema Flip-In, Invitrogen). Con el fin de reforzar el acoplamiento de proteína G y dirigir la señalización hacia la liberación de Ca²⁺, el receptor sobreexpresado tenía además una secuencia C-terminal de una proteína G modificada (G_{ai4qi4}) (documento WO 02/04665). Se determinaron los cambios en el calcio intracelular mediante la medición de la fluorescencia con el colorante sensible al calcio fluo-4 (Invitrogen) en un lector de placas de imágenes de fluorescencia (FlipR, Molecular Dynamics).

15 Se sembraron células CHO que sobreexpresan de forma estable el receptor S1P₁ humano (40.000 por pocillo) en placas negras de fondo transparente de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (Becton Dickinson, Biocoat cellware) aproximadamente 18-24 h antes de los experimentos. Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C, dióxido de carbono al 5% y 95% de humedad en medio de cultivo celular basado en medio glutamax F-12 (Gibco # 31765) suplementado con penicilina/estreptomina al 1% (v/v) (PAN, # P06-07100), suero de ternero fetal al 10% (v/v) (FCS; FBS tratado con Hyclone Charcoal/Dextran # SH30068) e higromicina B (Invitrogen, # 10687-010) a 300 mg/l (concentraciones finales).

20 Antes del experimento FlipR, las células se cargaron con fluo-4 acetoximetil éster (fluo-4 AM, Invitrogen, # F14202) durante 60 min en una incubadora a 37 °C, dióxido de carbono al 5% y 95% de humedad en tampón de carga de colorante que consiste en Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS; Invitrogen # 14065049) suplementada con fluo-4 AM a 2 µM (todos los datos se dan para la concentración final), Pluronic® F-127 al 0,05% (v/v) (Invitrogen, # P-3000MP), HEPES 20 mM (Gibco # 15630), probenecid 2,5 mM (Sigma # P-8761) y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,05% (Sigma # A-6003), ajustada a pH 7,5 con hidróxido de sodio. Durante la carga celular, el fluo-4 AM es escindido por la esterasa intracelular, lo que da como resultado el atrapamiento del colorante fluo-4 dentro de las células. La carga se terminó lavando las células en un lavador de células (Tecan Power Washer) tres veces con el tampón especificado anteriormente pero sin fluo-4 AM y BSA. Este último tampón también se usó como tampón en las siguientes mediciones de fluorescencia celular.

25 Las células cargadas con colorante y lavadas se estimularon con los compuestos respectivos con varias concentraciones añadidas como una solución en DMSO (concentración final máxima de DMSO al 0,3% v/v), o con S1P (concentración final 100 nM) en DMSO solo en la concentración respectiva (control positivo). Los compuestos que activaron el receptor de S1P dan lugar a la liberación de calcio intracelular de las reservas internas lo que da como resultado un gran aumento transitorio de la señal de fluorescencia fluo-4 que se monitorizó durante aproximadamente 3 min. Se determinó el porcentaje de activación causado por un compuesto de prueba a partir de la respuesta de fluorescencia máxima en comparación con la respuesta de fluorescencia máxima al control positivo S1P. Todos los valores de fluorescencia se corrigieron con respecto a los valores de fluorescencia de inicio obtenidos con las células que se incubaron previamente solo con DMSO y no se trataron con S1P (control de inicio). Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Se calculó el valor de EC₅₀ a partir de la activación a diversas concentraciones.

3. Células Chem

45 Se usó el ensayo GPCRProfiler® de Millipore para determinar la actividad EC₅₀ del compuesto A, BAF-312 y fingolimod sobre los receptores S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ o S1P₅. Estos ensayos usaron líneas celulares estables GPCR ChemiScreen.

3. HSC

50 Se sembraron HSC humanas (Sciencell) a 25x10³ células por pocillo en placas multipocillo de 96 pocillos, 100 µl/pocillo, y se dejaron adherir durante 24 horas en medio completo (Sciencell SC5301) con suplementos al 1% (Sciencell SC5352) y FCS al 2%. El medio de cultivo se reemplazó por medio Sciencell con FCS al 2% pero sin suplementos durante otro período de 24 horas. Las células se lavaron y se colocaron en 100 µl de tampón de ensayo (HBSS, MgSO₄ 0,8 mM, Hepes 20 mM, Na₂CO₃ 3,3 mM, CaCl₂ 1 mM, BSA al 10%). Las células se cargaron con Fluo4-AM en presencia de ácido plurónico durante 1 hora a 37 °C en la oscuridad. El medio de carga se retiró y se reemplazó por 200 µl/pocillo de tampón de ensayo. Se dejó que las células se estabilizaran durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad. La placa de cultivo se colocó en el instrumento FlipR, se añadieron el

compuesto A o BAF-312 en un volumen de 50 μ l (solución 5X, concentración final 10 μ M) y se registró de forma continua la fluorescencia del calcio durante 6 minutos. Para los experimentos de desensibilización, después de la primera inyección del compuesto A o BAF-312, se lavó la placa de cultivo una vez y se dejó recuperar durante 1 o 3 horas en tampón de ensayo antes de la segunda adición del compuesto A o BAF-312. Para los experimentos de control, la primera inyección de compuesto A o BAF-312 se reemplazó por tampón de ensayo y se tomó como referencia la segunda inyección con compuesto A o BAF-312. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia (FU).

b) ensayo de β -arrestina

Se usó el ensayo PathHunter® β -Arrestin de DiscoverX para determinar la actividad EC_{50} del compuesto A, BAF-312 y fingolimod sobre los receptores S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ o S1P₅. Los compuestos se probaron en medio de ensayo que contenía FBS al 0,5%.

c) Ensayo de GTP γ S

Este método se describe en el documento WO2011/086079.

d) Ensayo de internalización

Se usó el ensayo de internalización de GPCR activado PathHunter® de DiscoverX para determinar la actividad EC_{50} del compuesto A, BAF-312 y fingolimod sobre el receptor de S1P₁. Los compuestos se probaron en medio de ensayo que contenía FBS al 0,5%.

e) ensayo de AMPc en células de ovario de hámster chino (CHO) y HUVEC

1. Células CHO

Se usó el ensayo Hit Hunter® cAMP de DiscoverX para determinar la actividad EC_{50} del compuesto A, BAF-312 y fingolimod sobre S1P₁. Los compuestos se probaron en medio de ensayo que contenía FBS al 0,5%.

2. HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humanas)

Se evaluó el AMP cíclico en respuesta al compuesto A, BAF-312 o fingolimod en células HUVEC tratadas con forskolina mediante el kit cAMP HTRF® (Cisbio). Brevemente, se sembraron HUVEC (Lonza) a 5×10^3 células por pocillo en una placa multipocillo blanca de 96 pocillos (medio volumen) durante 24 horas en medio EGM2 (Lonza). Al comienzo del experimento, se reemplazó el medio EGM2 por tampón de ensayo que consistía en HBSS que contenía Hepes (10 mM), BSA (0,1%) e IBMX (0,5 mM). Se dejó que las células se recuperaran durante 15 min. Se añadió el compuesto A, BAF-312 o fingolimod (10 nM - 100 μ M) a las células durante 15 min seguido de la adición de forskolina (FSK, 10 μ M). Después de 45 min de tratamiento con FSK, la reacción se detuvo mediante la adición de MAb anti-cAMP-criptato y cAMP-D2 durante 1 hora. Al final de la incubación, se leyó la fluorescencia (Envision, Perkin Elmer) y se calculó la relación FRET de acuerdo con el protocolo del kit de ensayo. La potencia del compuesto A, BAF-312 o fingolimod (EC_{50}) se calculó usando el software Sanofi BIOST@T-SPEED de acuerdo con el modelo de ecuación logística.

f) Fosforilaciones de Akt y ERK_{1/2} en ensayos de células RPTEC (en condiciones basales o después de la exposición a tunicamicina)

Se sembraron células RPTEC (Lonza) a $0,3 \times 10^6$ células por pocillo en placas multipocillo de 6 pocillos en 2 ml de medio completo REBM/REGM (Lonza) por pocillo durante 24 horas. Las células se privaron de suero durante un período adicional de 24 horas en 900 μ l de medio quiescente. Se añadieron concentraciones crecientes de compuesto A (10X) bajo el volumen de 100 μ l en cada pocillo durante 10 minutos a 37 °C. Cuando se usó, se añadió tunicamicina (100 μ l) 30 min antes de la adición del compuesto A. Después de la eliminación del medio, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en hielo en 100 μ l de tampón RIPA frío que contenía tritón al 1%, inhibidores de proteasas y fosfatasa. Para la transferencia de Western, se cargaron 30 μ g de lisado de proteína total en geles de bis-tris al 4-12% (Invitrogen). Después de la migración y la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se rastrearon con anti phospho-Akt (Phospho-Ser473, Cst # 9271) y anti phospho-Erk_{1/2} (phospho-Tyr202/Tyr204, Cst # 4377). Se usó el marcaje de tubulina con anti- α -tubulina (Cst # 2144) para la normalización después del análisis densitométrico de las películas.

g) Fosforilaciones de Akt y ERK_{1/2} en ensayos de células HUVEC (en condiciones de privación)

Se sembraron células HUVEC (Lonza) a $0,3 \times 10^6$ células por pocillo en placas multipocillo de 6 pocillos en 2 ml de medio completo EGM2 (Lonza) durante 24 horas. Las células se privaron de suero durante un período adicional de 24 horas en 900 μ l de medio quiescente. Se añadieron concentraciones crecientes de compuesto A, BAF-312 o fingolimod (10X) bajo el volumen de 100 μ l en cada pocillo durante 10 minutos a 37 °C. Después de la eliminación del medio, las células se lavaron con PBS frío y las células se lisaron en hielo en 100 μ l de tampón RIPA que contenía tritón al 1%, inhibidores de proteasas y fosfatasa. Para la transferencia de Western, se cargaron 30 μ g de lisado de proteína total en geles de bis-tris al 4-12% (Invitrogen). Después de la migración y transferencia, las membranas de nitrocelulosa se rastrearon con anti phospho-Akt (Phospho-Ser473, Cst # 2965) y anti phospho-Erk_{1/2} (Phospho Tyr202/Tyr204, Cst #

4377). Se usó el marcaje de tubulina con anti α -tubulina (Cst # 2144) para la normalización después del análisis densitométrico de las películas.

h) Ensayo de apoptosis inducida por tunicamicina

5 Se midió el efecto del compuesto A sobre la apoptosis inducida por tunicamicina (TN) en RPTEC por medio del kit de ensayo Caspase-Glo 3/7 (Promega). Brevemente, se sembraron células RPTEC (Lonza) en placas blancas multipocillo de 96 pocillos a 30×10^3 células por pocillo en REGM (medio REBM más FCS al 0,5% más Single quots, Lonza) y se dejaron adherir durante 24 h. Después de 24 h, el medio completo se reemplazó por suero y medio libre de suplementos (56 μ l/pocillo). Las células se trataron previamente durante 30 min con el compuesto A (concentraciones finales 0,3-30 μ M, 7 μ l) seguido de la adición de tunicamicina (TN, concentración final, 0,1 μ g/ml, 7 μ l). Después de 10 horas a 37 °C, CO₂, al 5%, se añadieron 70 μ l de reactivo Caspase-Glo y la placa de cultivo se colocó con agitación durante 1 hora. Se registró la luminiscencia por medio del lector Envision (Perkin Elmer). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la apoptosis inducida por TN.

i) Ensayo de sobreexpresión de moléculas de adhesión inducida por TNF α

15 Se midió la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y P/E-selectinas en HUVEC mediante ELISA. Las células HUVEC se sembraron en placas multipocillo de 96 pocillos a 25×10^3 células por pocillo bajo el volumen de 100 μ l en medio EGM2 (Lonza) y se dejaron adherir durante 24 h. Después de 24 h, el medio completo se reemplazó por medio quiescente (EGM2 sin suplementos ni suero) durante 3 horas. Después de esto, las células se trataron previamente con compuesto A o BAF-312 (1-30 μ M) durante 18 h. A continuación, las células se trataron con TNF- α (3 ng/ml) en medio libre de factores de crecimiento durante un período adicional de 6 h. Se eliminó el medio y las células se lavaron y fijaron con 100 μ l de solución RLC2 por pocillo (Alphelys # 01-RLC2-RTU30) durante 20 min a 4 °C. Las células 20 fijadas se lavaron dos veces con 100 μ l de HBSS antes de la adición de anticuerpos anti-ICAM-1 (# BBA3, R&D System), anti-VCAM-1 (# BBA5, R&D System) y anti-P/E-selectinas (# BBA1, R&D System) durante 1 hora. Después de un lavado extenso, se añadió anti-IgG de ratón HRP (n^o NA931, Amersham) durante 2 horas. La densidad óptica se leyó a 450 nm (Envision) después del lavado y la adición de sustrato HRP (OPD, Sigma # P9187). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la expresión de la molécula de adhesión inducida por TNF- α . 25

j) Ensayo de medición de impedancia en células de ovario de hámster chino (CHO) y células endoteliales

1. Células CHO

Se usó el ensayo de impedancia de CEREP para determinar la actividad EC₅₀ del compuesto A, BAF-312 y fingolimod sobre S1P₁.

30 2. Células endoteliales

Se probaron el compuesto A, BAF-312, fingolimod, SEW2871 y S1P (usado como control positivo) en función de la concentración sobre sus efectos sobre el cambio de forma que se detecta por cambios en la impedancia eléctrica (sistema X-celligence), para monitorizar la desensibilización del receptor S1P₁ tanto en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) como en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). El día 1 se sembraron células primarias en e-placas de 96 pocillos previamente recubiertas con colágeno-I con 20.000 células por pocillo. Después de 24 h de adherencia y proliferación, las HDMEC y HUVEC se estimularon primero durante 1h con S1P (1 μ M), compuesto A (1 μ M para HDMEC; 0,1, 1, 10 μ M para HUVEC), BAF-312 (1, 10, 100 nM solo en HUVEC), fingolimod (100 nM para HDMEC ; 1, 10, 100 nM para HUVEC) o SEW2871 (0,1, 1, 10 μ M, solo en HUVEC). Después de la incubación con los agonistas de S1PR, las células se lavaron cuidadosamente dos veces con medio seguido de un período de recuperación de 5,5 h. Se evaluó entonces el efecto de la primera estimulación anterior sobre la desensibilización del receptor mediante una segunda estimulación de concentraciones crecientes de S1P (0,1, 1 y 10 μ M) y medición de la impedancia resultante. Todas las mediciones se realizaron al menos por triplicado. Todo las concentraciones de la primera estimulación fueron > EC₉₀ en HDMEC. Los resultados se expresan en unidades de impedancia arbitrarias como media +/- s.e.m. 40

45 5. Farmacología *in vivo*

a) Modelo de rata de lesión por reperfusión por isquemia renal (I/R)

Ratas Fischer macho (n = 3-9, 250 a 300 g) (Laboratorio Charles River, Francia) recibieron administración oral de compuesto A 0,3, 1 y 3 mg/kg o BAF-312 a 3, 10 y 30 mg/kg o artículo de vehículo (metilcelulosa al 0,6% - tween 80 al 0,5% en agua) en un volumen de administración de 2 ml/kg, una hora antes de la isquemia renal. En un segundo conjunto de experimentos, el compuesto A se administró dos veces al día durante 5 días para evaluar la taquifilaxia potencial. Brevemente, los animales se sometieron a cirugía simulada (es decir, laparotomía, aislamiento de las arterias renales) o a oclusión bilateral de la arteria renal durante 25 minutos bajo anestesia con pentobarbital (50 mg/kg i.p.). La temperatura corporal (37 °C- 38 °C) y la hidratación (inyección peritoneal de suero fisiológico) se controlaron cuidadosamente para estandarizar el procedimiento quirúrgico y limitar la variabilidad entre individuos. Al final del período isquémico, los riñones se reperfundieron retirando las pinzas y se controló la calidad de la reperfusión antes de suturar el plano muscular y cutáneo (los animales con mala reperfusión se excluyeron inmediatamente). 55

Veinticuatro horas después, se recogió sangre y riñones. La sangre se centrifugó (3.000 g, 10 min) y el plasma heparinizado se congeló para la evaluación de la creatinina usando un analizador bioquímico (P400, Horiba, Francia). Se congeló un riñón para análisis de transferencia de Western para la evaluación de albúmina tisular (anti-albúmina, Santa Cruz) y HSP70 tisular (anticuerpo monoclonal anti-HSP70 de Santa Cruz # SC32239) y el segundo se fijó (formalina tamponada neutra al 10%) y se sumergió en parafina para el análisis histológico en cortes de 5 µm de espesor (cuantificación de necrosis tubular aguda usando hematoxilina-eritrosina-Saffran clásica, tricrómica de Masson modificado y ácido peryódico de Schiff – asociado a alcina azul) y análisis de inmunohistoquímico (tinción de macrófagos con anticuerpo monoclonal anti-CD68 de Acris # BM4000, y tinción capilar con anticuerpo monoclonal anti-PECAM de Santa Cruz # SC1506, usando el robot Ventana, VMS Inc.). La necrosis tubular aguda se expresa como porcentaje de túbulos que mostraron necrosis celular en 12-15 campos en la región cortico-medular renal. El marcaje inmunológico de CD68 y PECAM se expresan como porcentaje del recuento de píxeles positivos (algoritmo de Aperio) en toda la sección. La creatinina plasmática se expresa como media +/- s.e.m.

b) Modelo de ratón de lesión renal inducida por rabiomíolisis

Ratones macho suizos (CD1) (n = 5-15, 13-14 semanas de edad) (Laboratorio Charles River, Francia) recibieron la administración oral de compuesto A 0,3, 1, 3 y 10 mg/kg o de artículo de vehículo (metilcelulosa al 0,6% - Tween 80 al 0,5% en agua) en un volumen de administración de 10 ml/kg, una hora antes de la inyección de glicerol. Se realizó una inyección intramuscular de glicerol (al 50% en PBS v/v) o de artículo de vehículo (PBS) en las patas traseras (2 inyecciones por pata, gastrocnemio y recto femoral) a 8 ml/kg bajo anestesia con pentobarbital (33 mg/kg) y ketamina (40 mg/kg). Veinticuatro horas después, se extrajo sangre, se centrifugó (3.000 g, 10 min) y se congeló el plasma heparinizado para evaluación de creatinina usando un analizador bioquímico (P400, Horiba, Francia). Los resultados se expresan como media +/- s.e.m.

Resultados

El compuesto de acuerdo con la invención, concretamente el compuesto A, fue objeto de diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* con el fin de demostrar su actividad en escenarios de AKI y su diferenciación sobre antagonistas funcionales de S1P₁.

1- Seguridad de la función cardiovascular

Aunque el compuesto A es un agonista de S1P₁ que carece de antagonismo funcional, los intereses potenciales basados en la diana podrían ser similares a los antagonistas funcionales de S1P₁. La mayor experiencia clínica hasta la fecha se ha generado con el compuesto S1P mixto_{1/3/4/5}, fingolimod, que induce bloqueo auriculo-ventricular y bradicardia (Schmouder y cols., 2006, J Clin Pharmacol 46: 895-904). Hay mucha evidencia preclínica que implica a S1P₃ en estos hallazgos de cardio-toxicidad, por lo tanto, el campo se ha desplazado a la identificación de compuestos S1P₁ selectivos para superar estas limitaciones. Sin embargo, los compuestos S1P₁ selectivos, que siguen en la fase clínica parecen también inducir bradicardia (Gergely y cols., 2012, BJP 167: 1035-1047), pero sus efectos sobre el bloqueo auriculo-ventricular se desconocen actualmente. Por lo tanto, se realizaron varios estudios además de los estudios habituales para evaluar la cardiotoxicidad potencial del compuesto A. En el ensayo de hERG, la IC₅₀ para el compuesto A fue > 30 µM. En el ensayo de fibra de Purkinje en conejo, no hubo un efecto significativo del compuesto A probado de 0,3 a 10 µM, aunque se observó un acortamiento del potencial de acción a 26 µM.

No se observó ningún efecto sobre la frecuencia cardíaca o el bloqueo auriculo-ventricular o cualquier otro parámetro del ECG en un estudio de telemetría en perros, a 30 o 100 mg/kg p.o. y 10 o 30 mg/kg i.v. (infusión durante 30 min). No hubo cambios significativos en la presión arterial con ambas dosis.

2- Farmacología renal *in vivo*

Se usó un modelo de rata de lesión por reperfusión por isquemia renal (I/R) para imitar la lesión renal que surge después de la cirugía cardíaca en los pacientes. En este modelo, el compuesto A redujo notablemente (85-90%) la gravedad de la AKI, como se refleja al limitar el aumento de la creatinina sérica (un biomarcador clínicamente validado) (la Fig 1A es representativa de 5 estudios independientes). El efecto fue dependiente de la dosis y estadísticamente significativo a 1 y 3 mg/kg p.o. (figura 1A). El análisis histológico mostró que el compuesto A tenía efectos directos sobre la vasculatura al prevenir la extravasación de albúmina (figura 1C) y preservar los capilares. El compuesto A también protegió los túbulos renales proximales de la necrosis, redujo la infiltración de macrófagos y aumentó la proteína HSP70 renal (un marcador asociado con la reparación después de una lesión isquémica renal). El compuesto A no mostró signos de taquifilaxia ya que se mantuvo una actividad similar después de 5 días de administración repetida BID en comparación con una administración única (figura 1D).

La rabiomíolisis es otra causa importante de AKI en pacientes y se reproduce en ratones mediante la inyección intramuscular de glicerol. El glicerol induce una lesión muscular progresiva con liberación de mioglobina y posterior disfunción renal. Como se observó en el modelo I/R, el compuesto A previno notablemente (~85% a 10 mg/kg p.o) y dependiente de la dosis el deterioro de la función renal en este modelo (n = 3 estudios independientes) (figura 2).

Los efectos del compuesto A se compararon en el modelo de reperfusión de isquemia renal con un antagonista funcional selectivo de S1P₁, BAF-312. BAF-312 es al menos 10 veces más potente en la mayoría de ensayos *in vitro*

de S1P₁ (incluidos los ensayos endoteliales, véase tabla 1) y tiene una exposición similar en plasma/riñón al compuesto A en ratas. Sin embargo, a pesar de las propiedades mejoradas de potencia/exposición de BAF-312, no logró mostrar una reducción de más del 40% en la creatinina sérica en el modelo de isquemia-reperfusión, incluso a dosis de hasta 30 mg/kg p.o. (figura 1B).

5 3- Diferenciación sobre la actividad linfopénica

S1P es responsable de la salida de linfocitos del ganglio linfático a la sangre a través de la activación de S1P₁. Esta activación de S1P₁ provoca la internalización del receptor seguida del reciclaje del receptor de vuelta a la superficie celular, lo que permite la reactivación. Sin embargo, los antagonistas funcionales de S1P₁ (fingolimod, BAF-312) provocan la degradación del S1P₁ internalizado y, por lo tanto, provocan reducciones dramáticas y prolongadas en el S1P₁ de superficie celular. En consecuencia, los antagonistas funcionales de S1P₁ muestran una caída grande y prolongada en los linfocitos sanguíneos como se observa preclínica y clínicamente (Mandala y cols., 2002, Science 296: 346-349; Gergely y cols., 2012, BJP 167: 1035-1047).

Como era de esperar, BAF-312 indujo una linfopenia profunda (-80%) y prolongada en ratas (figura 3A, 3B). Esto fue evidente incluso a dosis tan bajas como 1 mg/kg p.o. (la dosis más baja probada). Las 2 dosis que fueron parcialmente eficaces en el modelo de AKI de rata fueron dosis más altas (10 y 30 mg/kg p.o., figura 1B) y representan dosis altamente linfopénicas. Por el contrario, el compuesto A 1 y 3 mg/kg p.o. no mostró reducción de linfocitos, incluso después de 5 días de administración repetida BID (3 mg/kg p.o) en ratas (figura 3C). Las dosis más altas de compuesto A revelaron una linfopenia dependiente de la dosis, pero estas representan dosis más altas que las requeridas para una protección total frente a la AKI.

De manera similar, no se observó actividad linfopénica del compuesto A en ratones a 3 y 10 mg/kg (figura 4), dosis que eran activas en el modelo de rhabdomiólisis inducida por glicerol (figura 2).

El compuesto A no fue linfopénico en perros a 3 mg/kg p.o. (figura 5A). Esta dosis no linfopénica en perros ya proporciona una exposición (C_{max} y AUC) que excede la exposición requerida para una protección total frente a la AKI en ratas (3 mg/kg) (tabla 4). A las dosis más altas de 10 y 30 mg/kg p.o en perros, el compuesto A indujo solo una linfopenia transitoria (figura 5A). Por el contrario, BAF-312 indujo una profunda (I_{max} ~80%) reducción de linfocitos a 3 mg/kg p.o. que tardó al menos 60 días en recuperarse (figura 5B).

El compuesto A es un agonista de S1P₁ único porque demuestra por primera vez una fuerte protección frente a la AKI a dosis no linfopénicas (figura 3D). Aunque otros compuestos de S1P₁, como fingolimod y SEW2871, también son activos en modelos de AKI, sus efectos se producen a dosis linfopénicas (Awad y cols., 2006, Am J Physiol Renal Physiol 290: F1516-F1524; Sanna y cols., 2004, JBC 279: 13839-13848; Lai y cols., 2007, Kidney Int 71: 1223-1231).

Estos datos *in vivo* apoyan que el compuesto A actúa como un agonista de S1P₁ que induce protección de la AKI a dosis no linfopénicas. El compuesto A difiere notablemente de BAF-312, como se describe en esta memoria, así como de otros antagonistas funcionales de S1P₁ que están diseñados específicamente para ser agentes linfopénicos, por ejemplo, para enfermedades autoinmunes.

35 4- Diferenciación en la integridad de la barrera endotelial

El antagonismo funcional de S1P₁ se asocia con efectos dañinos para el endotelio. El edema macular y pulmonar son eventos adversos prominentes en pacientes con esclerosis múltiple tratados con fingolimod (Jain y Bhatti, 2012, 78: 672-680).

Se encontró que la administración oral crónica en ratones sanos de fingolimod fue capaz de producir una extravasación vascular significativa (figura 6A, 6B), en línea con los hallazgos clínicos. El agonista selectivo de S1P₁, BAF-312 a 1 y 3 mg/kg b.i.d. indujo una extravasación vascular aún mayor en el pulmón (figura 6A, 6B). Estos hallazgos están de acuerdo con informes anteriores que demuestran que los antagonistas funcionales de S1P₁ alteraron la integridad de la barrera endotelial y promovieron la extravasación de proteínas vasculares en el pulmón (Shea y cols., 2010, Am J Respir Cell Mol Biol 43: 662-673). Por el contrario, el compuesto A no mostró un aumento en la extravasación vascular (a 3 y 10 mg/kg (que representan dosis que proporcionan hasta el efecto protector total de la AKI en ratones) (figura 6A, 6B). De manera similar, en ratas Fisher, el compuesto A no indujo extravasación vascular pulmonar a 1 y 3 mg/kg (que representan dosis eficaces de AKI) o incluso a una dosis más alta (10 mg/kg). Por el contrario, BAF-312 indujo extravasación vascular en ratas tanto a 3 mg/kg (dosis no eficaz de AKI) así como a 30 mg/kg (dosis de AKI parcialmente eficaz).

Dadas las propiedades de daño endotelial observadas de BAF-312 (figura 6), las propiedades protectoras de BAF-312 podrían contrarrestarse por sus efectos deletéreos endoteliales que dan como resultado el efecto protector parcial observado (figura 1B). El daño endotelial es una característica notable de múltiples antagonistas funcionales de S1P₁ (Figura 6 y datos publicados). Por lo tanto, el nuevo perfil del compuesto A brinda la oportunidad de proteger frente a la lesión renal aguda en dosis que son protectoras endoteliales en lugar de dañinas.

55

5- Farmacología *in vitro*

Se demostró que el compuesto A es un potente agonista de S1P₁. En células CHO que sobreexpresan S1P₁ humana (G-fusión), la EC₅₀ fue de 31 nM en un ensayo de movilización de calcio, 656 nM en un ensayo de β-arrestina, 206 nM en un ensayo de GTPγS y 213 nM en un ensayo de internalización (tabla 1).

- 5 **Tabla 1: Valores de EC₅₀ para el compuesto A, BAF-312 y fingolimod usando varios ensayos *in vitro*.** Las células Chem* y CHO se diseñaron para sobreexpresar S1P₁ humano. Las HUVEC expresan endógenamente S1P₁. # Ensayo ChemiScreen. "-" significa no determinado.

* Los valores son medias de 2 experimentos separados. Ensayo de β-arrestina: Cpd A - 800 & 511, BAF-312 - 7,9 & 2,83, S1P - 41 & 20,8; ensayo de internalización: Cpd A - 160 & 266, BAF-312 - <0,5 & 0,67, fingolimod-P - 0,7 & 4,74, S1P - 56 & 40,2.

10

Ensayo	Tipo de célula	Proteínas en medios de ensayo	EC ₅₀ en nM				
			Compuesto A	BAF-312	Fosfato de fingolimod	S1P	SEW2871
FLIPR	Chem#	0%	86	29	26	9,6	-
	CHO	0%	31	2,8	0,14	7,5	24
GTPγS	CHO	0%	206	6,7	5	120	795
β-arrestina	CHO	FBS al 0,5%	656*	5,4*	7	30,9*	-
Internalización	CHO	FBS al 0,5%	213*	< 0,59*	2,72*	48,1*	-
AMPc	CHO	FBS al 0,5%	22,6	0,47	-	78	-
AMPc	HUVEC	BSA al 0,1%	15.600	74	132	-	-
pERK1/2	HUVEC	FBS al 0,1%	190	4,9	9,4	-	-
pAkt	HUVEC	FBS al 0,1%	101	4,3	14,5	-	-
Impedancia	CHO	FBS al 10%+ BSA al 0,1%	65	0,4	-	1,5	-
Impedancia	HUVEC	FBS al 2%	172	0,21	0,12	-	54

15

20

El compuesto A no mostró propiedades de antagonismo funcional ni indujo desensibilización del receptor (figuras 7-10). Esta diferenciación se demostró en cuatro sistemas independientes *in vitro*, dos sistemas que usaban la medición de impedancia en células endoteliales HDMEC (células endoteliales microvasculares dérmicas humanas) y HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana), y dos sistemas que usaban el ensayo FlipR en células CHO y células HSC (células estrelladas hepáticas). La incubación previa con el compuesto A (seguida de una etapa de lavado) permitió una segunda estimulación casi completa con S1P (figuras 7-9) o con compuesto A (figura 10). Sin embargo, la incubación previa con los antagonistas funcionales previno de una segunda estimulación completa con S1P (figuras 7-9) o BAF-312 (figura 10). En el ensayo de impedancia de HUVEC, se comparó la concentración en la que cada compuesto comenzó a desensibilizar la respuesta de impedancia inducida por S1P₁ con su EC₅₀ absoluta en el ensayo. BAF-312 comenzó la desensibilización a 5 veces la EC₅₀, SEW2871 a 20 veces la EC₅₀, mientras que no se observó desensibilización para el compuesto A hasta 60 veces la EC₅₀.

Los datos de las figuras 7-10 indican que los antagonistas funcionales (fingolimod, BAF-312, SEW2871 y ponesimod) indujeron una desensibilización prolongada del receptor.

25

30

El compuesto A mostró diferentes potencias relativas en las vías de señalización de S1P₁ (tabla 1) en comparación con BAF-312 o fingolimod. Dado que las condiciones de ensayo con respecto a la proteína diferían entre las pruebas, excluimos la posible influencia de la unión de proteína en las potencias relativas comparando las potencias en los ensayos de CHO para AMPc, beta arrestina e internalización usando las mismas condiciones de medio. Como se muestra en la tabla 2, el compuesto A (en relación con BAF-312 y S1P) está más sesgado en su activación de AMPc en comparación con la internalización o con la β-arrestina.

Tabla 2: Valores relativos de EC₅₀ del compuesto A, BAF-312 y S1P (normalizados al ensayo de AMPc). Los medios contenían concentraciones de proteínas idénticas (FBS al 0,5%) en las 3 pruebas

	AMPc	Internalización	β-Arrestina
	CHO	CHO	CHO
Compuesto A	1	9,4	29
BAF-312	1	1,3	11,5
S1P	1	0,62	0,40

- 5 El compuesto A indujo marcadores de supervivencia, pERK y pAkt, en células epiteliales tubulares renales humanas (RPTEC) con una EC₅₀ de aproximadamente 3 μM en condiciones basales, o después de una lesión por tunicamicina (EC₅₀ ~ 10 μM) de una manera dependiente de la concentración. Estos efectos a favor de la supervivencia fueron más potentes en células endoteliales humanas después de la privación de suero, con una EC₅₀ de 101 nM en P-Akt y de 190 nM en P-ERK_{1/2}. Además, el compuesto A inhibió la apoptosis inducida por tunicamicina en RPTEC evaluada mediante la actividad de caspasa 3/7 con una EC₅₀ de aproximadamente 3-10 μM.
- 10 El compuesto A, a diferencia de BAF-312, redujo la sobreexpresión de moléculas de adhesión inducida por TNFα, incluidas las ICAM-I, VCAM-I y P/E selectinas, en tres tipos de células endoteliales humanas (HPAEC, HUVEC y HRGEC). Se sabe que estos marcadores de disfunción endotelial están regulados positivamente en muestras de plasma de pacientes con AKI (Sadik y cols., 2012, Mol Cell Biochem 359: 73-81), e implicados en el proceso de infiltración de células inflamatorias en el espacio túbulo-intersticial.
- 15 El compuesto A tenía un perfil de selectividad atractivo sobre los otros receptores de la familia S1PR (tabla 3), en más de 110 dianas en un panel CEREP, en más de 216 quinazinas y en más de 5 dianas en un panel de canal iónico. Como se muestra en la tabla 3, el compuesto A es un agonista de S1P₁ más selectivo en comparación con fingolimod. La carencia de actividad en S1P₂ y S1P₃ es particularmente importante ya que se informa que estos receptores se oponen a la función de S1P₁ en células endoteliales.
- 20 **Tabla 3: Selectividad del compuesto A, BAF-312 y fingolimod frente a miembros de la familia de receptores de esfingosina.**

	EC ₅₀ en μM							
	S1P ₂		S1P ₃		S1P ₄		S1P ₅	
	FlipR (Chem)	β-arrestina	FlipR (Chem)	β-arrestina	FlipR (Chem)	β-arrestina	FlipR (Chem)	β-arrestina
Compuesto A	> 30	> 10	> 30	> 10	> 30	2,5	1,0	1,3
BAF-312	> 30	> 10	> 30	> 10	> 30	2,1	0,30	0,035
Fingolimod	> 30	-	0,82	-	0,12	-	0,12	-

"-" significa no determinado.

- 25 La activación preferencial de algunas vías de señalización por el compuesto A (p. ej., AMPc), mientras que tiene una potencia más débil en otras (p. ej., internalización, β-arrestina), proporciona el perfil deseado para la AKI (es decir, desensibilización mínima del receptor, sin linfopenia prolongada, protección endotelial). Esto contrasta con lo deseado para los antagonistas funcionales de S1P₁, BAF-312 y fingolimod en la esclerosis múltiple (alta desensibilización del receptor, fuerte linfopenia, siendo el daño endotelial el efecto secundario no deseado). Este perfil define el compuesto A como una nueva clase de agonista sesgado de S1P₁.
- 30 **Tabla 4: Propiedades farmacocinéticas del compuesto A 3 mg/kg p.o. en rata Fisher macho y perro beagle.**

	Rata	Perro
Cmax (μg/ml)	2,56	2,91
AUC (μg.h/ml)	13	41,3

Conclusión

- Estos datos preclínicos demuestran un profundo impacto del compuesto A en múltiples criterios de valoración mecanísticos en la AKI, incluido un marcado mantenimiento de la función de la barrera endotelial, así como una reducción de la necrosis tubular y la inflamación de los macrófagos. Todas las dosis protectoras de AKI del compuesto A (tanto en ratones como en ratas) eran no linfopénicas y cuando se alcanzaron las exposiciones correspondientes en perros, el compuesto A todavía no era linfopénico. Dado que el compuesto A no fue linfopénico en todas las dosis protectoras de la AKI, su mecanismo de protección frente a la AKI es independiente de la linfopenia. El compuesto A mostró efectos protectores directos sobre las células endoteliales y epiteliales, que probablemente sean el mecanismo de acción en la AKI.
- 5
- 10 Esto está en contraste con compuestos S1P₁ existentes que tienen un perfil de señalización diferente y son i) antagonistas funcionales de S1P₁, ii) que dañan el endotelio y iii) muestran solo una actividad limitada en la AKI inducida por I/R a dosis linfopénicas.
- 15 El compuesto A proporciona la nueva oportunidad de tratar a pacientes con AKI sin inducir linfopenia y, por tanto, evitar los efectos secundarios correspondientes (incluidas las infecciones). En consecuencia, este compuesto tiene el potencial de ser una terapia transformadora en un campo donde actualmente no hay medicamentos disponibles para los pacientes.

REIVINDICACIONES

1. Ácido {4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo [5,4-d]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en la prevención o el tratamiento de la AKI (lesión renal aguda).
 2. Ácido {{4-[5-(3-cloro-fenoxi)-oxazolo [5,4-d]pirimidin-2-il]-2,6-dimetil-fenoxi} acético o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso de acuerdo con a la reivindicación 1 como un agente no linfopénico.
- 5

FIG 1-A

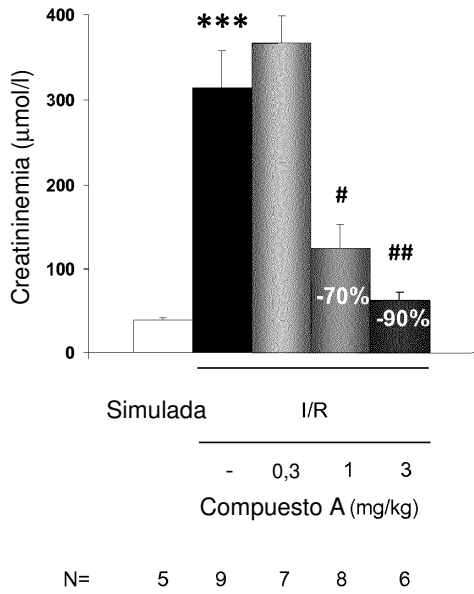


FIG 1-B

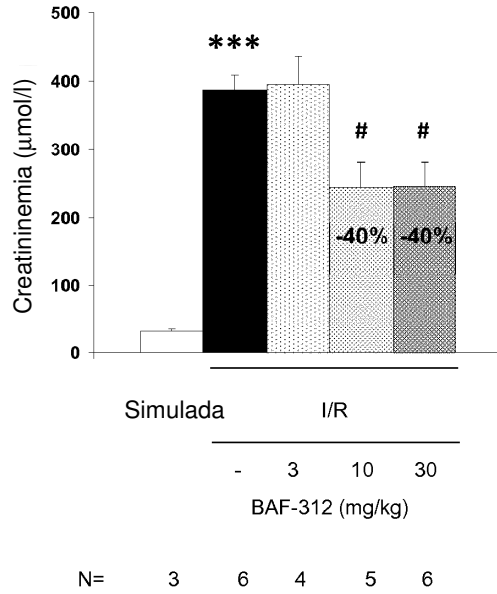


FIG 1-C

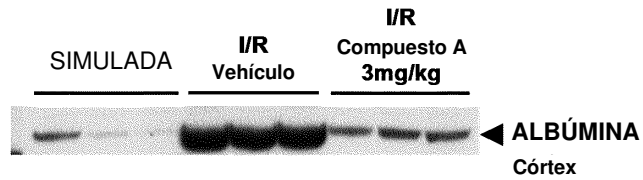


FIG 1-D

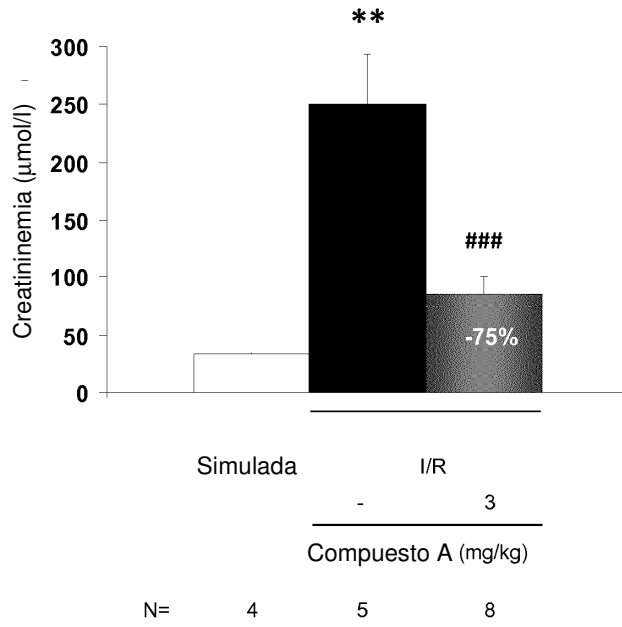


FIG 2

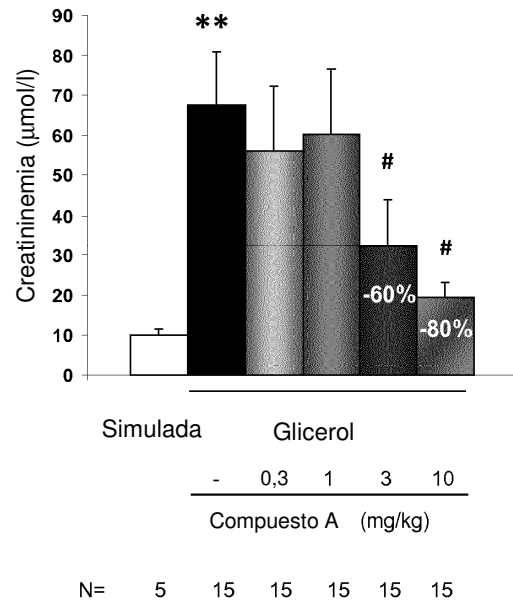


FIG 3-A

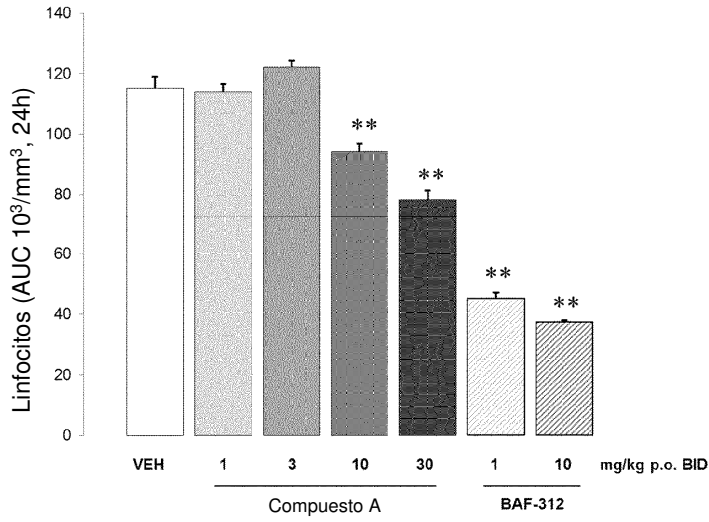


FIG 3-B- Administración oral única

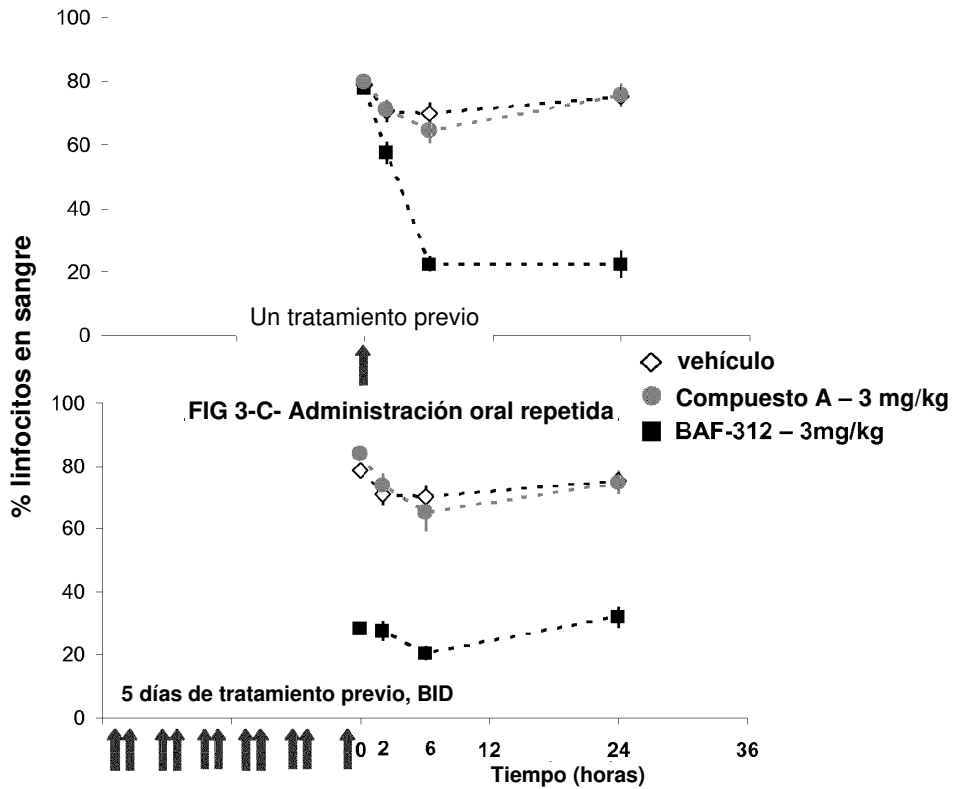


FIG 3-D

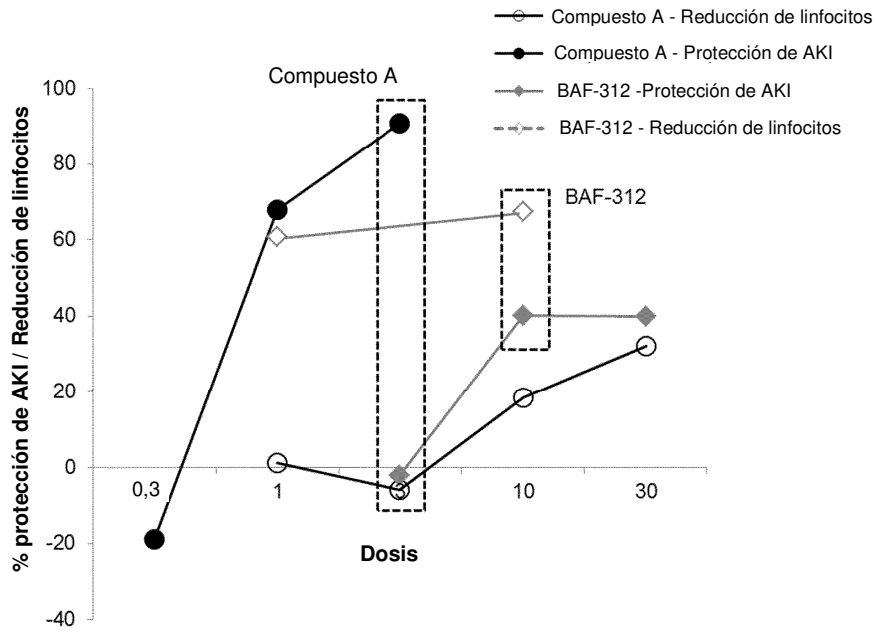


FIG 4

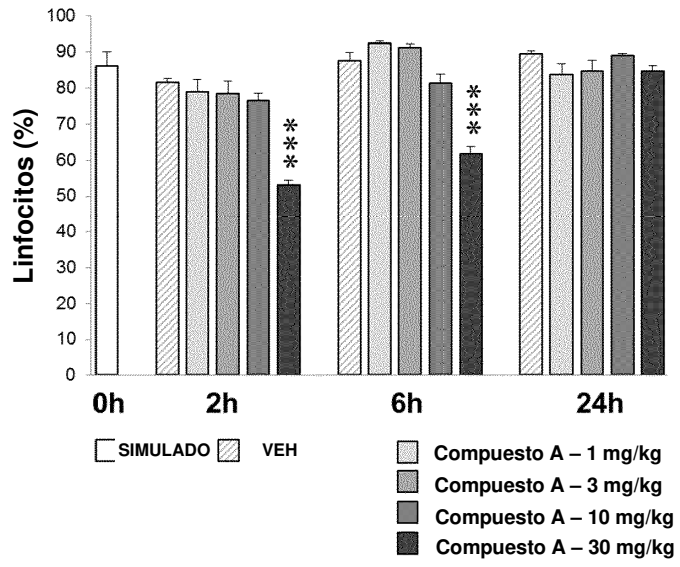


FIG 5-A

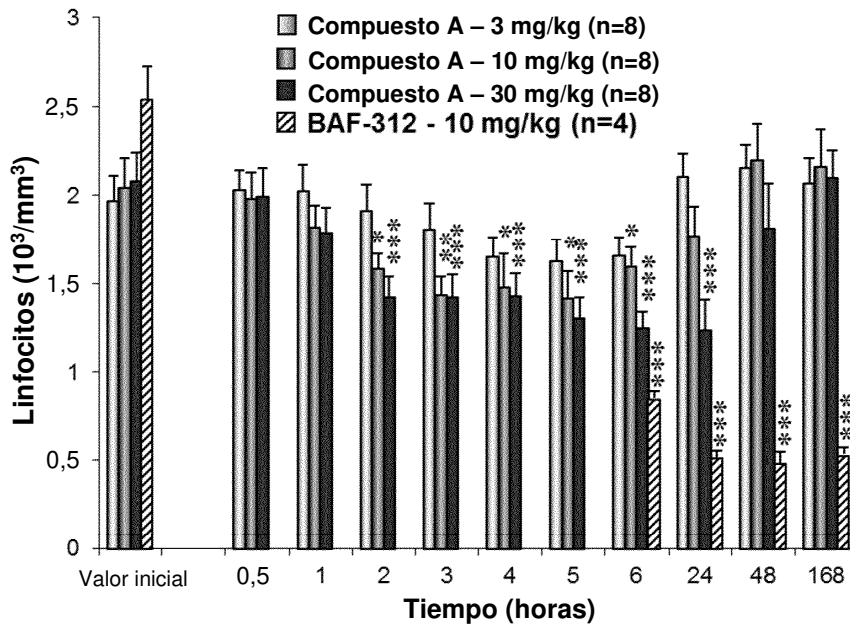


FIG 5-B

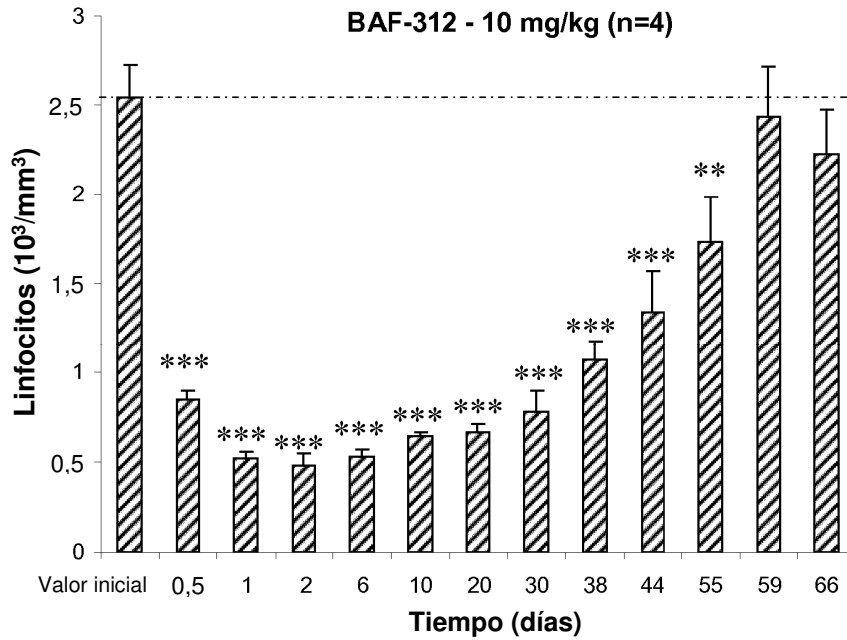


FIG 6-A

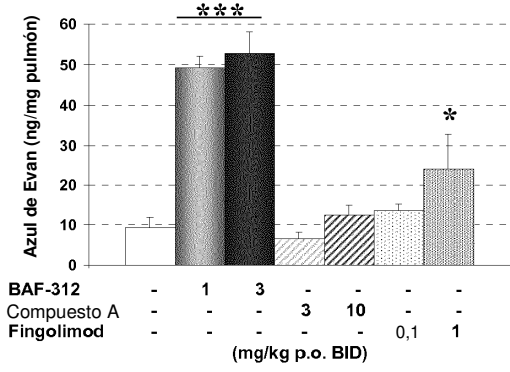


FIG 6-B

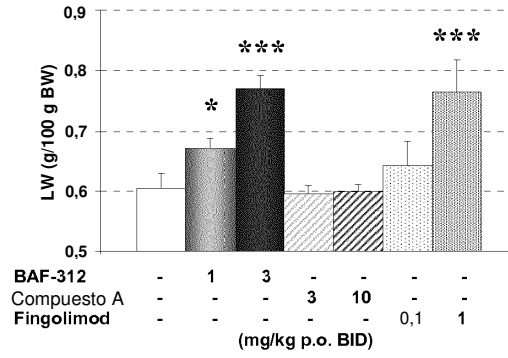


FIG 6-C

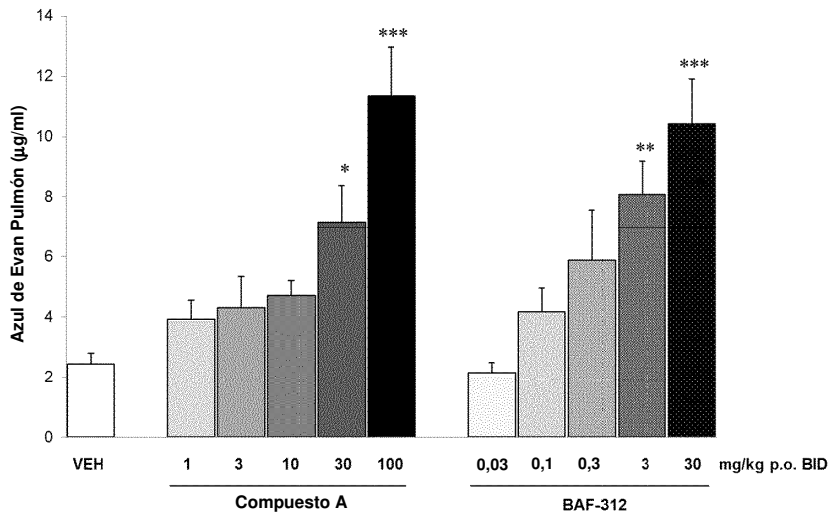


FIG 7

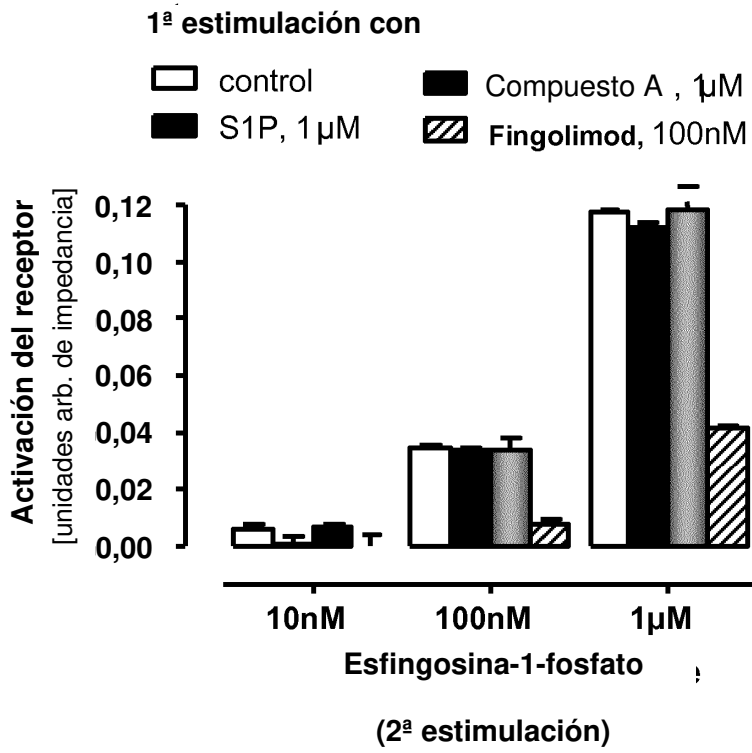


FIG 8-A

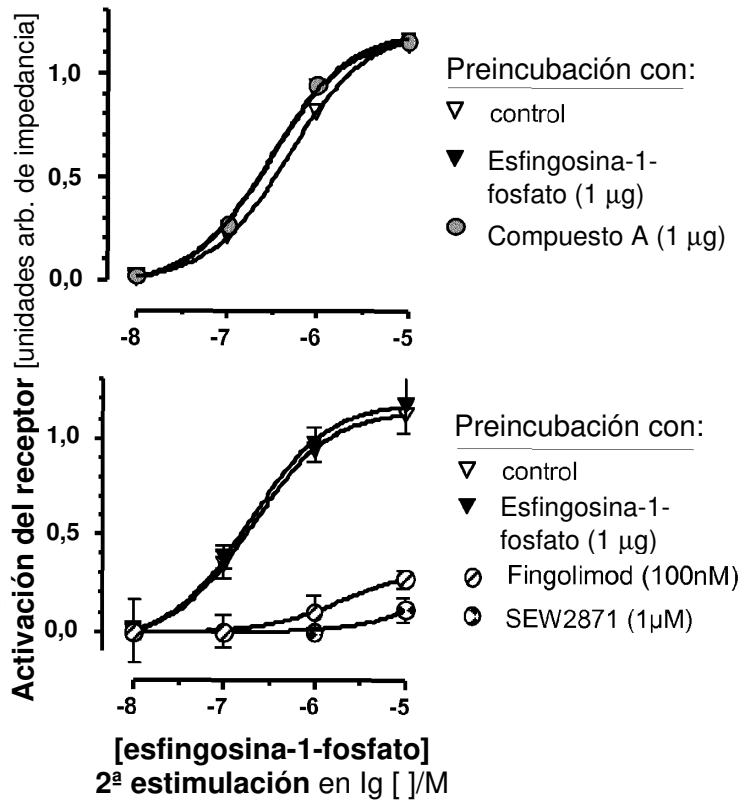


FIG 8-B

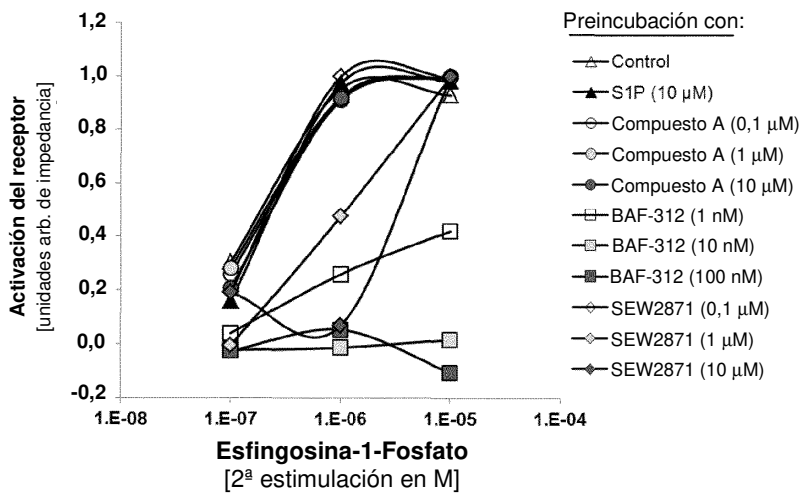


FIG 9-A

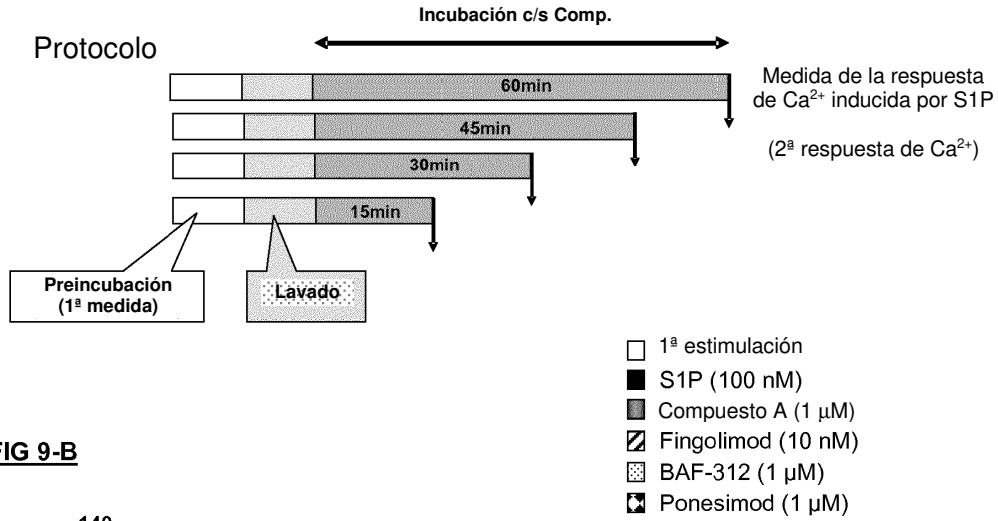


FIG 9-B

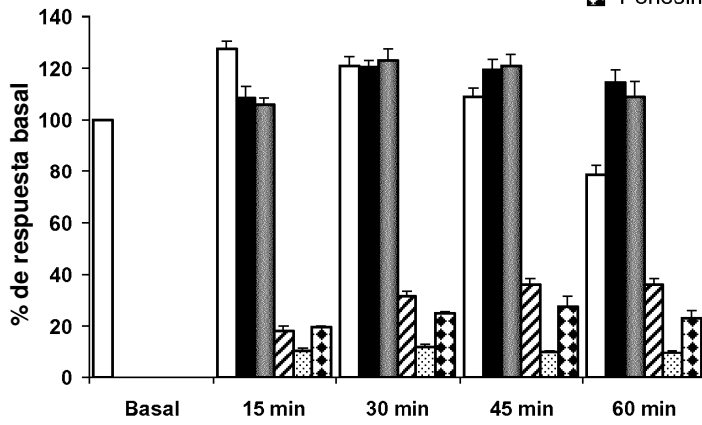


FIG 10-A

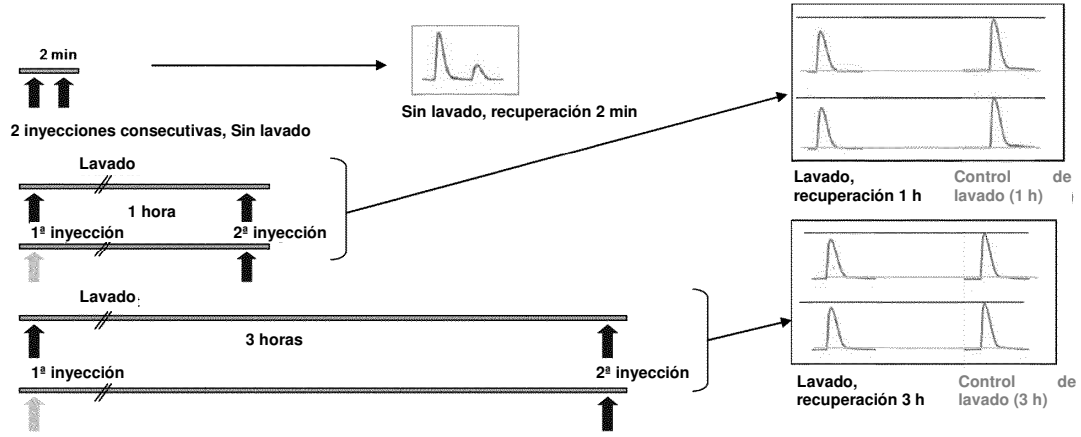


FIG 10-B

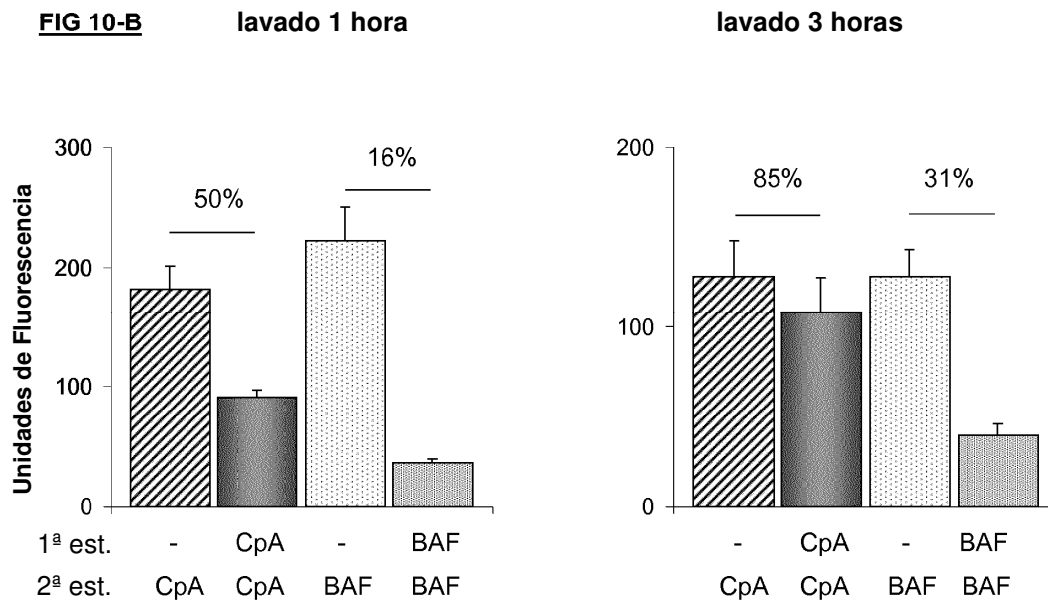


FIG 11

