

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 552**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 31/454** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**A61K 31/415** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05733278 .5**

96 Fecha de presentación: **08.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1725223**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2006**

54

Título: **USO DE ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR CB1 PARA LA FABRICACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS.**

30

Prioridad:  
**09.03.2004 EP 04290633**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.01.2012**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.01.2012**

73

Titular/es:  
**INSERM  
101, RUE DE TOLBIAC  
75654 PARIS CEDEX 13, FR y  
Sanofi**

72

Inventor/es:  
**LOTERSZTAJN, Sophie;  
MALLAT, Ariane;  
GRENARD, Pascale;  
JULIEN, Boris y  
TRAN VAN NHIEU, Jeanne**

74

Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 371 552 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

Uso de antagonistas del receptor CB1 para la fabricación de una composición útil para el tratamiento de enfermedades hepáticas.

## CAMPO DE LA INVENCION.

- 5 La invención se refiere a un nuevo uso para antagonistas del receptor CB1 para la fabricación de una composición útil para reducir la fibrosis hepática.

## FUNDAMENTOS DE LA INVENCION.

10 La fibrosis hepática es la respuesta más común a la lesión hepática crónica, que finalmente conduce a la cirrosis y sus complicaciones, a la hipertensión portal, a la insuficiencia hepática y al carcinoma hepatocelular. El proceso fibrogénico es consecuencia de una proliferación y acumulación intensas de miofibroblastos hepáticos que sintetizan los componentes de la fibrosis e inhibidores de la degradación de la matriz (Friedman, S.L., *J. Biol. Chem.* 275, 2247-50 (2000)).

15 El *Cannabis Sativa* contiene más de sesenta compuestos, el más activo de los cuales es (-)- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC). También han sido caracterizados los cannabinoides naturales endógenos, anandamida y 2-araquidonil-glicerol, que son lípidos derivados del ácido araquidónico (Piomelli, D. et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 218-24. (2000)). Los cannabinoides se unen a los dos receptores acoplados a la proteína G, CB1 y CB2, que igualmente se unen al THC (Pertwee, R.G., *Curr. Med. Chem.* 6, 635-64. (1999)). El CB1 es, por tanto, uno de los dos receptores celulares humanos conocidos de los cannabinoides. Se sabe que este receptor, que es un receptor transmembranal acoplado a la proteína G, se expresa en el cerebro y en los vasos sanguíneos (Pertwee, R.G., *Curr. Med. Chem.* 6, 635-64 (1999)), pero no en los hepatocitos (Guzmán, M & Sánchez, C., *Life Sci.* 65, 657-64 (1999)). El CB1 media los efectos psicoactivos del cannabis (marihuana). En contraste, los receptores CB2 se expresan principalmente en el sistema inmunitario y están exentos de efectos psicoactivos (Friedman, S.L., *J. Biol. Chem.* 275, 2247-50 (2000)). Además de sus efectos psicótrópos, los cannabinoides presentan efectos analgésicos, antieméticos y orexigénicos centrales (Harrold, J. A. & Williams, G. *Br. J. Nutr.* 90, 729-34 (2003)). Además, los cannabinoides también presentan propiedades anti-inflamatorias y vaso-relajantes (Kumar, R.N., Chambers, W.A. & Pertwee., *Anaesthesia* 56, 1059-68. (2001)). Diversos estudios sugieren también que los cannabinoides pueden ser agentes antitumorales potenciales, debido a su capacidad de inducir la regresión de de diversos tipos de tumores experimentales, incluyendo glioma o tumores cutáneos. Estos efectos antitumorales son atribuidos principalmente a sus propiedades antiproliferantes y apoptóticas (Bifulco, M. et al., *Faseb J.* 29, 29 (2001); Casanova, M.L. et al., *J. Clin. Invest.* 111, 43-50. (2003); Sánchez, C. et al., *Cancer Res.* 61, 5784-9. (2001)).

20 Solarmente existen unos cuantos datos referentes a la acción hepática de los cannabinoides. Los receptores CB1 y CB2 no se expresan en hepatocitos (Guzman, M. & Sánchez, C. *Life Sci.* 65, 657-64 (1999)). Sin embargo, los receptores CB1 están presentes en las células endoteliales aisladas de las arterias hepáticas, y su expresión aumenta durante la cirrosis (Batkai, S. et al. *Nat. Med.* 7, 827-32. (2001)).

25 Se han aislado dos isoformas del receptor CB1: una isoforma larga (correspondiente a la SEQ ID NO:1) y una más corta truncada en la parte NH<sub>2</sub> terminal correspondiente a una variante de empalme (correspondiente a la SEQ ID NO:2), que difiere en su afinidad para sus ligandos (Shire et al., *J. Biol. Chem.* (1995); Rinaldi-Carmona et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1996)). También existen 5 polimorfismos de un solo nucleótido en la región codificadora del gen del receptor CB1. De estos solarmente tres dan como resultado cambios de un solo aminoácido en el receptor CB1 (siendo estos, en la SEQ ID NO:1, una sustitución de fenilalanina por leucina en la posición 200, una sustitución de isoleucina por valina en la posición 216 y una sustitución de valina por alanina en la posición 246 y las correspondientes posiciones en la SEQ ID NO:2). Existe una secuencia de 7 dominios de consenso para el receptor CB1 que está fuertemente conservada en los vertebrados, pero que no aparece en otros receptores de cannabinoides (Attwood, T.K. and Findlay, J.B.C., *Protein Eng.* 7(2) 195-203 (1994), Attwood, T.K. and Findlay, J.B.C., *7TM*, Volume 2 Eds G. Vriend and B. Bywater, (1993), Birnbaumer, L., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 675-705 (1990), Casey, P. J. and Gilinan, A. G., *J. Biol. Chem.* 263(6) 2577-2580 (1988), 5. Attwood, T.K. and Findlay, J.B.C., *Protein Eng.* 6(2) 167-176 (1993), Watson, S. and Arkinsall, S., en *The G Protein-Linked Receptor Factsbook*, Academic Press, 1994, pp. 80-83). Dicha secuencia de aminoácidos de consenso comprende los 7 dominios proteínicos de la SEQ ID NO:3 hasta la SEQ ID NO:9.

30 Se han descrito previamente antagonistas del receptor CB1, que incluyen agonistas contrarios o inversos. Estos incluyen las amidas sustituidas descritas en el documento WO 03/077847, las aril-amidas sustituidas descritas en el documento WO 03/087037, los imidazoles sustituidos descritos en el documento WO 03/063781, las amidas bicíclicas descritas en el documento WO 03/086288, los derivados de terfenilo descritos en el documento WO 03/084943, la N-piperidino-3-pirazolcarboxamida y la N-piperidino-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metilpirazol-3-carboxamida descritas en la patente EP-B-656354, los compuestos de arilbenzo[b]tíofeno y benzo[b]furano descritos respectivamente en las patentes de EE.UU. 5.596.106 y EE.UU. 5.747.524, los derivados de azetidina descritos en la patente FR 2.805.817, la 3-amino-azetidina descrita en la patente FR 2.805.810 o los derivados de 1-(di-((hetero)aril)-metil)-azetidina 3-sustituidos o 3,3-disustituidos descritos en la patente FR 2.805.818.

Otros antagonistas están comercializados, tales como N-(piperidin-1-il)-1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-yodofenil)-4-metil-1H-

pirazol -3-carboxamida, conocida comercialmente como AM251 y el compuesto conocido como LY-320135.

Son conocidos los usos de estos antagonistas del receptor CB1 para el tratamiento de la disfunción sexual (solicitud de patente WO 03/082256) o diarrea (solicitud de patente WO 01/85092) o enfermedades neuro-inflamatorias o trastornos por drogadicción, obesidad, asma y estreñimiento (solicitud de patente WO 03/077847).

- 5 Los documentos constituidos por la patente de EE.UU. 5.939.429, las solicitudes de patentes WO 03/077847, WO 03/084930, WO 03/084943, WO 03/063781 y WO 03/087037 describen que los antagonistas del CB1 pueden invertir las alteraciones hemodinámicas sistémicas en ratas con hipertensión portal cirrótica.

#### SUMARIO DE LA INVENCION.

- 10 Sin embargo, los documentos antes mencionados nunca describen que los antagonistas del CB1 pueden reducir la fibrogénesis en enfermedades hepáticas de cualquier etiología (alcohólica, vírica, tóxica). Además no se conoce la implicación de los receptores CB1 o los efectos de los antagonistas del CB1 en esteatohepatitis no alcohólica y carcinogénesis hepática.

Los inventores demuestran ahora sorprendentemente que los antagonistas del CB1 tienen potentes propiedades anti-fibróticas en el hígado que se pueden usar para reducir la fibrosis hepática.

- 15 Por consiguiente, la presente invención, basada en el hallazgo de que la inactivación de los receptores CB1 pueden reducir la fibrogénesis hepática asociada con la lesión o enfermedad hepática, proporciona una variedad de métodos y composiciones para reducir la fibrosis hepática. La invención se refiere por tanto a un antagonista del receptor CB1 para uso en un método para reducir la fibrosis hepática.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

- 20 **Figura 1:** Histograma que muestra el contenido de TGF- $\beta$ 1 hepático por mg de proteína soluble (panel A) y que muestra la expresión de alfa-actina hepática en la musculatura lisa como un porcentaje de la tinción del área superficial del corte total (panel B), tanto en ratones de tipo natural (mostrados como WT) como en ratones deficientes en CB1 (mostrados como CB1-/-). OO se refiere al grupo de ratones que recibieron solarmente aceite de oliva, mientras que CCl<sub>4</sub> muestra los resultados de los ratones intoxicados con CCl<sub>4</sub>.

- 25 Se midió la producción del TGF- $\beta$ 1 hepático (la significación estadística es  $p < 0,05$ ). Para la determinación de la alfa-actina de la musculatura lisa la tinción se cuantificó en 4-5 cortes de tejido hepático por animal (la significación estadística es  $p < 0,05$ ).

- 30 **Figura 2:** Histogramas que muestran respectivamente la viabilidad de miofibroblastos hepáticos (panel A) y actividad similar a caspasa-3 (panel B) inicialmente y 48 horas después de la privación de suero tanto en ratones de tipo natural (mostrados como WT) como en ratones deficientes en CB1 (mostrados como CB1KO). Se indujo la apoptosis por privación de suero durante 48 horas. Los resultados de la viabilidad de miofibroblastos hepáticos se expresan como el porcentaje medio de células supervivientes  $\pm$  SEM, a partir de 6-9 experimentos obtenidos de células aisladas de hígados de 3 ratones WT y 2 ratones CB1 -/- (la significación estadística es inferior a 0,05 para los ratones CB1 -/-). Los resultados para la actividad similar a caspasa-3 se expresan como el doble de la actividad medida el día 0 (el valor medio  $\pm$  SEM se obtuvo de 6-9 experimentos realizados en células aisladas de hígados de 3 ratones WT y 3 ratones CB1 -/-). Estadísticamente  $p$  es inferior a 0,05.

- 35 **Figura 3:** Gráficos que muestran el efecto de aumentar las cantidades del antagonista de CB1, SR141716, en la síntesis de DNA en miofibroblastos hepáticos humanos (panel A) y en ratones de tipo natural (mostrados como WT) y ratones deficientes en CB1 (mostrados como CB1KO) (panel B). La síntesis de DNA se expresa como un porcentaje de la síntesis de DNA en células tratadas con el vehículo de SR 141716 y representada gráficamente frente a las concentraciones crecientes de SR 141716 en nM. Las células miofibroblastos hepáticos humanos fueron estimuladas durante 30 horas con concentraciones variables del antagonista del receptor CB1, SR 141716, en presencia de 20 ng/ml de PDGF-BB. La incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en DNA se midió como el valor medio  $\pm$  SEM, de 3-6 experimentos y se expresa como el porcentaje de control ( $p$  es inferior a 0,05). En la gráfica se muestran las barras de error. Los miofibroblastos hepáticos de ratón (en la gráfica de los ratones de tipo natural se muestran como círculos y de los ratones deficientes en CB1 se muestran como rombos) fueron estimulados durante 30 horas con concentraciones variables del antagonista del receptor CB1, SR 141716, en presencia de 20 ng/ml de PDGF-BB. La incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en el DNA se midió como el valor medio  $\pm$  SEM, de 3-6 experimentos realizados en células aisladas de hígados de 3 ratones WT y 3 ratones CB1 -/- y se expresa como porcentaje del control. ( $p$  es inferior a 0,05). En la gráfica se muestran las barras de error.

- 40 **Figure 4:** Gráfica que muestra el efecto de SR141716 o su vehículo sobre la mortalidad inducida por tetracloruro de carbono en ratones. La tasa de supervivencia de los ratones tratados con CCl<sub>4</sub> y con SR141716 (líneas de puntos) o sin tratamiento (líneas continuas que muestran la administración solamente de vehículo sin antagonista de CB1) se muestra frente al tiempo en días. El tiempo de la administración de CCl<sub>4</sub> se muestra por una flecha.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES DE LA INVENCION.**

La presente invención proporciona compuestos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para reducir la fibrosis hepática. Las enfermedades hepáticas incluyen también cirrosis hepática alcohólica, hepatitis vírica crónica, esteatohepatitis no alcohólica y cáncer primario de hígado.

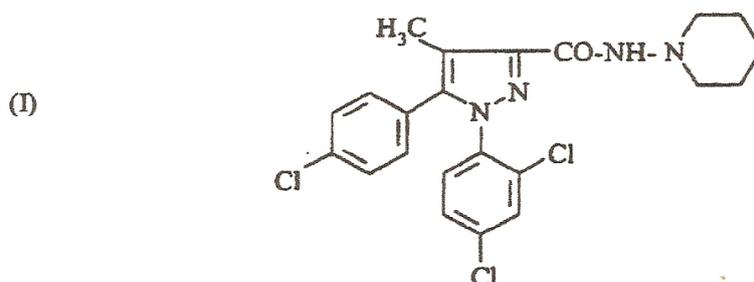
5 La firma solicitante ha mostrado que la sub-regulación de los receptores CB1 y el uso de antagonista o agonista inverso del receptor CB1 constituyen un tratamiento para diversos tipos de fibrosis hepática. Esto se demuestra por diversos experimentos.

10 En primer lugar, se estudió el papel de los receptores CB1 en el progreso de la fibrosis hepática en ratones con el gen del receptor CB1 desactivado manipulados por ingeniería genética para que carezcan de la expresión de los receptores CB1 (CB1KO, n=15) y su correspondiente de tipo natural (WT, n=12) en un modelo de fibrosis crónica inducida por intoxicación con tetracloruro de carbono. La fibrosis y la necro-inflamación se determinaron por una puntuación derivada de la escala METAVIR. Los ratones CB1KO mostraron una fibrosis reducida en comparación con los animales WT (puntuación de fibrosis:  $2,59 \pm 0,13$  vs.  $3,33 \pm 0,13$ ,  $p < 0,05$ ). Por consiguiente, el colágeno hepático, evaluado por determinación de la hidroxiprolina había disminuido 40% en ratones CB1KO, en comparación con los animales WT ( $0,46 \pm 0,06$  vs.  $0,73 \pm 0,11$  mg/mg de tejido,  $p < 0,05$ ). La puntuación necroinflamatoria era similar en ambos grupos. Dicha inactivación del receptor CB1 es fenotípicamente equivalente a un bloqueo antagonista perfecto del receptor CB1 por medios farmacéuticos. La fibrosis hepática se reduce fuertemente en ratones con el gen del receptor CB1 desactivado en comparación con los ratones de control, basado tanto en los análisis histológicos de los hígados como en las medidas del contenido de hidroxiprolina, que es un marcador bioquímico específico de la deposición de colágeno. Además, se demostró que la expresión de TGF- $\beta$ 1 y  $\alpha$ -actina en la musculatura lisa se redujo en ratones deficientes en CB1 en comparación con ratones de tipo natural tratados con CCl<sub>4</sub>. Finalmente se demostró que la inactivación de CB1 aumenta la apoptosis en miofibroblastos hepáticos de muridos. Por tanto, la inactivación del receptor CB1 reduce la fibrosis hepática.

25 En segundo lugar, el marcaje inmunohistoquímico se realizó con miofibroblastos hepáticos cultivados y de hígado cirrótico humano normal. La inmunoquímica mostró una débil expresión de los receptores CB1 en hígado norma (n = 3), contrastando con una marcada sobre-regulación en muestras cirróticas de diversas etiologías (n = 13), predominando células no parenquimales dentro y en el borde de los tabiques fibrosos. La inmunohistoquímica doble identificó miofibroblastos como una fuente principal de receptores CB1, y por consiguiente, los receptores CB1 se expresaron también en los miofibroblastos hepáticos humanos cultivados. Los receptores CB1 son expresados débilmente por células intrasinusoidales en el hígado normal y están marcadamente sobre-regulados durante las enfermedades hepáticas crónicas. La doble inmunohistoquímica reveló los miofibroblastos hepáticos como un tipo de célula prominente que expresa los receptores CB1 en el hígado cirrótico. Por tanto, la expresión y actividad de los receptores CB1 están correlacionadas con la fibrosis hepática.

35 En tercer lugar, se realizaron estudios epidemiológicos en un conjunto de pacientes con hepatitis C crónica y mostraron que fumar diariamente cannabis es un factor de riesgo para el progreso de la fibrosis en la hepatitis C crónica, puesto que la tasa de fibrosis es mayor en estos pacientes comparada con los no fumadores de cannabis. Esto demuestra una participación de la transducción de señales de los cannabinoides en la fibrosis del hígado. Por tanto, la vía de señalización de cannabinoides está implicada en la fibrosis hepática.

40 En cuarto lugar, se realizaron estudios *in vitro* de los efectos del antagonista del receptor CB1, N-piperidino-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metilpirazol-3-carboxamida conocido comercialmente como SR141716 (o SR141716A) o rimonabant, en cultivos de miofibroblastos hepáticos tanto de seres humanos como de ratones que mostraron que un antagonista del CB1 puede inhibir el crecimiento de miofibroblastos hepáticos. Este compuesto y su preparación se describen en la solicitud de patente europea EP656354-A1 y se representa por la fórmula I:



45 Dicho antagonista del CB1 y sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar de acuerdo con la solicitud de patente europea EP656354, y similarmente las composiciones farmacéuticas se pueden preparar de acuerdo con la descripción de la misma patente.

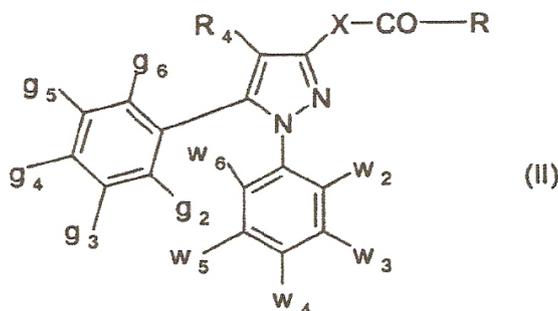
En quinto lugar, los estudios *in vivo* en ratones mostraron que el antagonista de CB1, SR141716, podía reducir la letalidad inducida por tetracloruro de carbono que es un modelo de fibrosis hepática inducida.

Los antagonistas del receptor CB1 se describen en la presente memoria como compuestos capaces de inhibir la activación o la expresión del receptor CB1.

- 5 Los compuestos capaces de inhibir la activación del receptor CB1 incluyen en particular los capaces de interactuar con los agonistas de los receptores CB1, inhibiendo la unión de dichos agonistas o inhibiendo la activación del receptor CB1 resultante de dicha unión.

En particular, los antagonistas adecuados del receptor CB1 pueden ser específicos del CB1 o no, e incluir agonistas inversos. Estos antagonistas incluyen también las amidas sustituidas descritas en el documento WO 03/077847, las aril-amidas sustituidas descritas en el documento WO 03/087037, los imidazoles sustituidos descritos en el documento WO 03/063781, las amidas bicíclicas descritas en el documento WO 03/086288, los derivados de terfenilo descritos en el documento WO 03/084943, la N-piperidino-3-pirazol-carboxamida y la N-piperidino-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metilpirazol-3-carboxamida descritas en EP-B-656354, los compuestos de aril-benzo[b]tiofeno y benzo[b]furano descritos respectivamente en las patentes de EE.UU. 5.596.106 y EE.UU. 5.747.524, los derivados de azetidina descritos en la patente Francesa FR 2.805.817, la 3-amino-azetidina descrita en la patente FR 2.805.810 o los derivados de 1-(di-((hetero)aril)-metil)-azetidina 3-sustituidos o 3,3-disustituidos descritos en la patente FR 2.805.818, la N-(piperidin-1-il)-1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-yodofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (conocida como AM251) y el compuesto conocido comercialmente como LY-320135. Los antagonistas de CB1 adecuados incluyen también N-piperidino-5-(4-bromofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-etilpirazol-3-carboxamida descritos en la patente EP1150961.

20 Otros antagonistas de CB1 adecuados están descritos en la patente EP576357 e incluyen un compuesto de la formula II en la cual  $g_2, g_3, g_4, g_5$  y  $g_6$  y  $w_2, w_3, w_4, w_5$  y  $w_6$  son idénticos o diferentes y son independientemente hidrógeno, un átomo de cloro o bromo, un grupo alquilo ( $C_1-C_3$ ), alcoxi ( $C_1-C_3$ ), trifluorometilo o nitro y  $g_4$  es opcionalmente un grupo fenilo;  $R_4$  es hidrógeno o un alquilo ( $C_1-C_3$ ); X es un enlace directo o un grupo  $-(CH_2)_x-N(R_3)-$ , en el cual  $R_3$  es hidrógeno o un grupo alquilo ( $C_1-C_3$ ) y x es cero o uno; R es un grupo  $-NR_1R_2$  en el cual  $R_1$  y  $R_2$  son independientemente un alquilo ( $C_1-C_6$ ); un radical carbocíclico no aromático ( $C_3-C_{15}$ ) que está opcionalmente sustituido, siendo dicho(s) sustituyente(s) distintos de carbonilo sustituido; un grupo amino-alquilo ( $C_1-C_4$ ) en el cual el amino está opcionalmente disustituido con un alquilo ( $C_1-C_3$ ); un cicloalquil-alquilo ( $C_1-C_3$ ) en el cual el cicloalquilo es  $C_3-C_{12}$ ; un fenilo que está no sustituido o monosustituido o polisustituido con un halógeno, con un alquilo ( $C_1-C_5$ ) o con un alcoxi( $C_1-C_5$ ); un fenil-alquilo ( $C_1-C_3$ ); un difenil-alquilo ( $C_1-C_3$ ); un naftilo; un antraceno; un radical heterocíclico saturado de 5 a 8 miembros que está no sustituido o sustituido con un alquilo( $C_1-C_3$ ), con un hidroxilo o con un bencilo; un 1-adamantilmetilo; un heterociclo aromático que está no sustituido o monosustituido o polisustituido con un halógeno, con un alquilo ( $C_1-C_5$ ) o con un alcoxi ( $C_1-C_5$ ); un alquilo ( $C_1-C_3$ ) que está sustituido con un heterociclo aromático que está no sustituido o monosustituido o polisustituido con un halógeno, con un alquilo( $C_1-C_5$ ) o con un alcoxi( $C_1-C_5$ ); o también  $R_1$  es hidrógeno y  $R_2$  es como se ha definido antes; o también  $R_1$  y  $R_2$  forman con el átomo de nitrógeno al que están unidos un radical heterocíclico saturado de 5 a 8 miembros, siendo dicho radical heterocíclico distinto de morfolina cuando  $w_2, w_3, w_4, w_5, w_6, g_2, g_3, g_4, g_5$  y  $g_6$  son todos hidrógeno; un grupo  $R_2$  como se ha definido antes cuando X es  $-(CH_2)_x N(R_3)-$ ; un grupo  $R_5$  cuando X es un enlace directo, siendo  $R_5$  un alquilo ( $C_1-C_3$ ); un cicloalquilo ( $C_3-C_{12}$ ) que está no sustituido o sustituido con un alquilo ( $C_1-C_5$ ); un fenil-alquilo ( $C_1-C_3$ ) que está no sustituido o sustituido con un halógeno o con un alquilo ( $C_1-C_5$ ); un cicloalquil-alquilo ( $C_1-C_3$ ) en el cual el cicloalquilo es  $C_3-C_{12}$  y está no sustituido o sustituido con un alquilo ( $C_1-C_5$ ); o un 2-norbornilmetilo;



Estos resultados no están confinados a seres humanos y se pueden aplicar a mamíferos en general.

Las composiciones que contienen el (los) antagonista(s) de CB1 se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. El ingrediente activo (por ejemplo, el (los) antagonista(s) del receptor CB1) está presente en la composición farmacéutica en una "cantidad eficaz" Por una "cantidad eficaz" de una composición farmacéutica se quiere decir una cantidad suficiente, pero no tóxica, del agente para proporcionar el efecto deseado. La expresión se refiere a una cantidad suficiente para tratar un sujeto (por ejemplo, un mamífero, particularmente un ser humano). Por tanto, la expresi-

5 sión "cantidad terapéutica" se refiere a una cantidad suficiente para remediar un estado o síntomas de enfermedad, previniendo, impidiendo, retardando o invirtiendo el progreso de la enfermedad o cualesquiera otros síntomas indeseables. La expresión cantidad "profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad administrada a un sujeto que aún no tiene la enfermedad, y por tanto es una cantidad eficaz para prevenir, impedir o retrasar el comienzo de una enfermedad.

10 En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad, como se ha descrito, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. De acuerdo con uno cualquiera de los protocolos bien establecidos se determina fácilmente una dosis apropiada de la composición farmacéutica. Por ejemplo, los estudios en animales (por ejemplo en ratones o ratas) se usan generalmente para determinar la dosis tolerable máxima del agente bioactivo por kilogramo de peso. En general, al menos una de las especies animales ensayadas es un mamífero. Se pueden extrapolar los resultados de los estudios en animales para determinar las dosis que se pueden usar en otras especies, tal como, por ejemplo, seres humanos. Lo que constituye una dosis eficaz también depende de la naturaleza y gravedad de la enfermedad o estado, y del estado general de salud del paciente.

15 En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen, por ejemplo, los antagonistas del receptor CB1 se administran a un paciente susceptible o con riesgo de enfermedad hepática. Dicha cantidad se define como una cantidad o dosis "profilácticamente eficaz". En este uso, la cantidad precisa depende de la salud y el peso del paciente.

20 Tanto en los tratamientos terapéuticos como profilácticos, el antagonista contenido en la composición farmacéutica puede ser administrado en varias dosis o como una única dosis hasta que se ha alcanzado una respuesta deseada. El tratamiento se monitoriza típicamente y, si es necesario, se pueden administrar dosis repetidas. Los compuestos de la invención se pueden administrar con los regímenes de dosis establecidos siempre y cuando se requiera la inactivación de los receptores CB1.

25 La dosis diaria de los productos puede ser variada en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto y por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al paciente que ha de ser tratado. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra generalmente a un nivel de dosis de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día. Se ha de entender, sin embargo, que el nivel específico de la dosis y la frecuencia de la dosis para un paciente particular se pueden variar y dependerán de una diversidad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de dicho compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y momento de la administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad del estado particular y la terapia que recibe el paciente.

35 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede ser administrado en una forma de administración unitaria, como una mezcla con vehículos farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas para vía oral, tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones para vía oral, formas para administración sublingual y bucal, formas para administración por aerosoles, implantes, subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas para administración rectal.

45 Las formas unitarias apropiadas de administración incluyen formas para administración oral, tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, polvos, gránulos y soluciones o suspensiones que han de ser ingeridas por vía oral, formas para administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas para administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intranasal o intraocular y formas para administración rectal.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el principio activo se formula generalmente como unidades de dosificación que contienen de 0,5 a 1000 mg, preferiblemente de 1 a 500 mg, más preferiblemente de 2 a 200 mg de dicho principio activo por unidad de dosis para administraciones diarias.

50 Cuando se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, se puede añadir al principio activo un agente humectante, tal como laurilsulfato sódico, opcionalmente micronizado, que luego se mezcla con un vehículo farmacéutico, tal como sílice, gelatina, almidón, lactosa, estearato de magnesio, talco, goma arábiga o similar. Los comprimidos pueden ser revestidos con sacarosa, con diversos polímeros u otras sustancias apropiadas o también pueden ser tratados de modo que tengan una actividad prolongada o retrasada y de modo que liberen continuamente una cantidad pre-determinada de principio activo.

55 Una preparación en forma de cápsulas de gelatina se obtiene mezclando el principio activo con un diluyente, tal como un glicol o un éster de glicerol y vertiendo la mezcla obtenida en cápsulas de gelatina blandas o duras.

Una preparación en forma de jarabe o elixir puede contener el principio activo junto con un edulcorante, que preferiblemente está exento de calorías, metil-parabeno y propil-parabeno como antiséptico, un aromatizante y un colorante apropiado.

5 Los polvos o gránulos dispersables en agua pueden contener el principio activo mezclado con agentes dispersantes o humectantes o agentes de puesta en suspensión, tales como polivinilpirrolidona, y también con edulcorantes o correctores del sabor.

Las administración rectal se efectúa usando supositorios preparados con aglutinantes que funden a la temperatura rectal, por ejemplo manteca de cacao o polietilenglicoles.

10 La administración parenteral, intranasal o intraocular se efectúa usando suspensiones acuosas, soluciones salinas isotónicas o soluciones estériles e inyectables que contienen dispersantes y/o agentes humectantes farmacológicamente compatibles, por ejemplo propilenglicol, butilenglicol o polietilenglicol.

15 Por tanto, para preparar una solución inyectable acuosa para vía intravenosa puede usarse un co-disolvente, por ejemplo un alcohol, tal como etanol, o un glicol, tal como polietilenglicol o propilenglicol, y un tensioactivo hidrófilo, tal como Tween RTM 80. El principio activo puede ser solubilizado por un triglicérido o un éster de glicerol para preparar una solución oleosa inyectable por vía intramuscular.

La administración transdérmica se efectúa usando parches multi-estratificados o depósitos en los cuales el principio activo está en la forma de una solución alcohólica.

La administración por inhalación se efectúa usando un aerosol que contiene por ejemplo trioleato de sorbitán o ácido oleico junto con triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o cualquier otro gas propulsor biológicamente compatible.

20 El principio activo también puede ser formulado como microcápsulas o microesferas, opcionalmente con uno o más vehículos o aditivos.

25 Entre las formas de liberación prolongada, que son útiles en el caso de tratamientos crónicos, se pueden usar implantes. Estos se pueden preparar en forma de una suspensión oleosa o en forma de una suspensión de microesferas en un medio isotónico. El principio activo también puede ser presentado en forma de un complejo con una ciclodextrina, por ejemplo .alfa-, beta- o gamma-ciclodextrina, 2-hidroxi-propil-beta-ciclodextrina o metil-beta-ciclodextrina.

Otro antagonista adecuado del receptor CB1 puede consistir en un anticuerpo dirigido contra el receptor CB1 que impide la unión de los agonistas al receptor CB1.

30 Existen varias isoformas de los receptores CB1 y otras variantes. Por consiguiente el uso de antagonistas para cualquiera de estos receptores CB1 variantes no estaría fuera del alcance de la invención. Generalmente y además de la identidad u homología de secuencias de proteínas, la función biológica de un receptor CB1 puede ser definida como un receptor celular acoplado a la proteína G, capaz de unir THC y transducir una señal celular. Los expertos podrían ser capaces de analizar la función del receptor CB1 por métodos estándares conocidos. Estos podrían incluir la expresión del supuesto cDNA del CB1 en células de CHO, el ensayo subsiguiente usando ligandos del CB1 y la medida de la actividad de señalización celular del supuesto receptor CB1 activado, por ejemplo midiendo la producción de AMP cíclico.

35 Una alternativa para reducir la transducción de señal de los cannabinoides a través del receptor CB1 por medios farmacológicos implica la sub-regulación o supresión de dicho receptor. Existen diversas técnicas conocidas para subregular o suprimir la expresión de genes que podrán usar los expertos. Una lista no exhaustiva implica la inactivación por recombinación homóloga (Gossen, *J. Trends Genet.* 9:27-31, 1993), interferencia de RNA (Elbashir S.M., *Nature.* 2001 May 24; 411(6836):428-9), la expresión de receptores negativos dominantes (Dosil, M. et al, *Mol.Cell Biol.* 1998 Oct, 18(10):5981-91) y la expresión transgénica de factores de transcripción supresores.

40 También es posible cribar los antagonistas del CB1 con propiedades anti-fibróticas selectivas usando cultivos de miofibroblastos obtenidos por proliferación de explantes preparados de muestras quirúrgicas de hígado humano normal, como se ha descrito previamente (Li, L. et al, *Gastroenterology* 125, 460-9 (2003), Davaille J et al., *J. Biol. Chem.* (2002)). En particular, un método de cribado de antagonistas del CB1 con propiedades anti-fibróticas selectivas implica las etapas de:

- a) preparar cultivos celulares múltiples de miofibroblastos.
- b) exponer cada uno de los cultivos celulares a uno de los compuestos a ensayar,
- c) determinar los efectos de los compuestos sobre las propiedades fibrogénicas de los miofibroblastos, evaluando sus efectos sobre la supervivencia y crecimiento de estas células,
- 50 d) seleccionar uno de los compuestos analizados.

Un método alternativo sería como antes, en donde la etapa c) implica determinar los efectos de los compuestos sobre las propiedades fibrogénicas de los miofibroblastos, evaluando sus efectos sobre su capacidad de sintetizar la matriz extracelular y los componentes que inhiben su degradación.

Un método alternativo sería como el anterior, en donde la etapa c) implica determinar los efectos de los compuestos sobre las propiedades fibrogénicas de los miofibroblastos, evaluando la producción y migración de citoquinas.

Los expertos serían capaces de realizar estas etapas individuales usando métodos bien conocidos, tales como los descritos por Li, L. et al, *Gastroenterology* 125, 460-9 (2003), Davaille J. et al., *J. Biol. Chem.* (2002), Li L. et al., *J. Biol. Chem* 2001 et Davaille, J. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 34628-33 (2000).

Los compuestos aislados por dichos medios se pueden usar luego para la fabricación de una composición para reducir la fibrosis hepática.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Sobre-regulación de los receptores CB1 en hígado cirrótico humano.

#### 10 **Materiales.**

Los medios de cultivo y los reactivos fueron de Gibco (Invitrogen, Francia). El suero de ternera fetal fue de JBio Laboratories (Francia). La mezcla de sueros humanos AB positivos fue suministrada por The National Transfusion Center. El antisuero anti-receptor CB1 de conejo (producido contra 1 - 14 residuos del receptor CB1 humano y) y el péptido bloqueante de CB1 (residuos 1-14 del receptor CB1 humano) fueron de Cayman (Spibio, Francia).

#### 15 **Preparación de RNA y RT-PCR.**

El RNA total se extrajo de células quiescentes confluentes en placas de 100 mm, usando el kit RNeasy (Qiagen, Francia). El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg del RNA total por transcripción inversa durante 1 hora a 37°C, usando 200 unidades de transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen, Francia), en una mezcla de reacción de 20 µl que contenía 0,05 µg/µl de cebadores oligo (dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen, Francia), dNTP 0,5 mM (Promega, Francia) y ditiotreitol 10 mM en tampón de la primera cadena (Invitrogen, Francia). Para comprobar la eventual contaminación por DNA genómico, se realizaron controles en las mismas condiciones sin transcriptasa inversa. Las PCR se realizaron con 2 µl de la mezcla de reacción de la transcripción inversa, usando 1,25 unidades de DNA-polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Francia) y el tampón correspondiente suplementado con MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 0,2 mM y 25 pmol de cada cebador en un volumen total de 50 µl. Se realizaron 40 ciclos de PCR en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems, Francia), consistiendo cada ciclo de desnaturalización a 95°C durante 45 segundos, reasociación a 58°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos, conteniendo el primer ciclo un periodo de desnaturalización prolongado (10 minutos) para la activación de la polimerasa y el último ciclo un periodo de alargamiento prolongado (10 minutos). Los cebadores oligonucleotídicos (MWG Biotech, Francia) para el CB1 fueron como sigue: cebador con sentido para CB1, 5'-TTTGGCTACACAATTGGAAGTCTAAGAACCC-3' y cebador antisentido para CB1, 5'-GCACACATTGACACG TATCCACTGCTTG-3', con un producto pronosticado de la PCR de 287 pb. Los productos amplificados por la PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1,5 %, y transferidos sobre una membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Francia). Después de una pre-hibridación en un tampón que contenía 6XSSC, EDTA 5 mM, pH 8, 5X Denhardt, SDS al 0,1 % y 0,1 mg/ml de ssDNA, durante 2 horas a 42°C, la membrana se hibridó durante una noche a 42°C en el mismo tampón que contenía 50 ng de la sonda oligonucleotídica de CB1 5'-CCTGTGAGATGTGTATCAG TGTTTATGTGC-3', marcada con [γ-<sup>32</sup>P] trifosfato de adenosina, usando quinasa de T4 (Invitrogen, Francia). Después de la hibridación, la transferencia se lavó dos veces en SDS al 0,1 %, 1XSSC durante 30 minutos a temperatura ambiente y se analizó por un dispositivo de fosfoimagen (Molecular Dynamics, Francia).

#### **Muestra de hígado humano.**

Se estudiaron retrospectivamente cortes quirúrgicos de hígado congelados bruscamente de 13 pacientes (8 hombres, 5 mujeres, edad media 55 años, intervalo de edades 39 - 72 años). Las muestras de hígados normales fueron recogidas de 3 mujeres que fueron sometidas a una resección hepática para metástasis colo-rectal (n = 3). Las muestras cirróticas se obtuvieron de 8 hígados de pacientes sometidos a trasplante de hígado y de 2 pacientes sometidos a una resección hepática por carcinoma hepatocelular. La cirrosis fue consecuencia de infecciones crónicas por el virus de la hepatitis C (VHC) (n = 1) o el virus de la hepatitis B (VHB) (n = 2), cirrosis primaria biliar (n = 1), enfermedad hepática alcohólica (n = 4) o enfermedad de Wilson (n = 1) y permanecía criptógena en 1 caso.

#### **Detección inmunohistoquímica de receptores CB1 en hígados normales y cirróticos.**

Cortes congelados (5-7 µm) se secaron al aire y se fijaron en acetona enfriada con hielo durante 10 minutos a -20°C. La unión no específica fue bloqueada pre-incubando los cortes 1 hora a temperatura ambiente con suero humano al 20% en solución salina tamponada con Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6. Los cortes fueron incubados adicionalmente durante una noche a 4°C con un antisuero policlonal de conejo para el receptor CB1 humano (Cayman, Spibio, Francia), diluidos 1/2000 en un diluyente de anticuerpos (Dakopatts, Francia). Después de lavar 3 veces en TBS, los cortes fueron incubados durante 45 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos inmunoglobulinas G monoclonales anti-conejo de ratón (Dakopatts, Francia), diluidos 1/50, lavados 3 veces en TBS, incubados adicionalmente durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos inmunoglobulinas anti-ratón de conejo (Dakopatts, Francia), diluidos 1/50, y luego tratados usando el método inmunoenzimático con el complejo fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa alcalina (APAAP), como se describe en la publicación de Li, L. et al, *Gastroenterology* 125, 460-9 (2003). Para confirmar la especificidad

del anticuerpo primario, los controles incluían la pre-adsorción del anticuerpo primario por el péptido sintético correspondiente (100 µg/ml, durante 1 hora a temperatura ambiente) o la omisión del anticuerpo primario. Para determinar si los miofibroblastos hepáticos expresan la proteína CB1, se realizó una doble inmunotinción de CB1 y de la  $\alpha$ -actina de la musculatura lisa. Los cortes se procesaron primeramente para la inmunotinción de CB1 usando un método estándar de tres etapas de inmunoperoxidasa con biotina-estreptavidina. Dicho brevemente la peroxidasa endógena se enfrió bruscamente por incubación de los cortes fijados en acetona en TBS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% durante 30 minutos, y luego se lavó en TBS. La unión no específica fue bloqueada por pre-incubación de cortes durante 30 minutos con TBS/suero humano al 20 %. Los cortes fueron incubados durante 15 minutos en avidina seguido por 15 minutos en biotina (kit de bloqueo de avidina/biotina, Vector Laboratories) e incubados adicionalmente durante una noche a 4°C con el antisuero anti-CB1. Subsiguientemente los cortes se lavaron en TBS y se incubaron sucesivamente con el anticuerpo secundario anti-conejo de cabra biotilado (Dakopatts, Francia) (1/500) y el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano silvestre (1/50) (Pierce, Perbio, Interchim, Francia), 30 minutos cada uno. La actividad de peroxidasa se reveló usando el sustrato de diaminobencidina (DAB) potenciado con metal (Pierce, Interchim, Francia). Todas las etapas se llevaron a cabo a temperatura ambiente a no ser que se indique otra cosa. La inmunotinción para el  $\alpha$ -actina de la musculatura lisa se procesó luego usando el método APAAP antes descrito, con una dilución de 1/5000 de un anticuerpo monoclonal para la  $\alpha$ -actina de la musculatura lisa (Sigma, Francia). Los portaobjetos se contra-tiñeron con hematoxilina acuosa. Las tinciones sencillas y dobles se visualizaron por fotomicrografías de campo brillante en un microscopio Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Alemania), equipado con un sistema digital de imágenes (cámara de color Hamamatsu 3CCD, Hamamatsu Photonics, Francia).

#### 20 Aislamiento y cultivo de miofibroblastos hepáticos humanos.

Se obtuvieron miofibroblastos hepáticos humanos por proliferación de explantes preparados de muestras quirúrgica de hígado normal obtenido por cirugía de tumores hepáticos benignos o malignos, como ha sido descrito por Davaille, J. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 34628-33 (2000). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero al 10% (suero de ternera fetal al 5% y suero humano al 5%, DMEM 5/5) y se usaron entre el tercer y séptimo pase. Los experimentos se realizaron en células quiescentes por incubación durante 48 horas en medio de Waymouth exento de suero, salvo que se indique otra cosa. La naturaleza miofibroblástica de estas células se evaluó como ha sido descrito por Davaille, J. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 34628-33 (2000), y presentan las características fenotípicas y funcionales de las células fibrogénicas encontradas *in situ* durante la fibrogénesis hepática (Win, K.M. et al., *Hepatology* 18, 137-45 (1993). Se encontró que los cultivos expresaban  $\alpha$ -actina en la musculatura lisa y dos marcadores de los miofibroblastos hepáticos, fibulina-2 e interleuquina-6 (Davaille, J. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 34628-33 (2000)).

#### 30 Detección inmunocitoquímica de receptores CB1 en miofibroblastos hepáticos humanos cultivados.

Se sembraron miofibroblastos hepáticos (10.000 g/m<sup>2</sup>) en placas de 35 mm, se hicieron crecer en un medio que contenía suero durante 24 horas, se privaron de suero durante 48 horas, se lavaron con TBS y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Después de lavar una vez en TBS, las células se incubaron en TBS que contenía suero humano al 20% durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se incubaron adicionalmente con el antisuero anti-CB1 (dilución 1/500 en TBS/suero humano al 20%) durante 3 horas a temperatura ambiente y durante la noche a 4°C en una cámara húmeda. Las células se lavaron luego exhaustivamente en TBS, se incubaron con una IgG anti-conejo de cabra conjugada con Cy3 (Sigma, Francia) (dilución 1/50 en TBS/suero humano al 20%) a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante 30 minutos, se lavaron, se cubrieron con VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA), y se visualizaron bajo microscopía de fluorescencia. Para confirmar la especificidad del anticuerpo primario, los controles incluyeron una pre-adsorción con el péptido sintético correspondiente (100 µg/ml, durante 1 hora a temperatura ambiente) o una omisión del anticuerpo primario.

La expresión del receptor CB1 se estudió por inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal dirigido contra el receptor humano CB1, en cortes de tejido congelados preparados de muestras quirúrgicas de hígados normales (n =3) e hígados cirróticos (n =10), con diversas etiologías (VHC crónico n = 1 o VHB n = 2, cirrosis biliar primaria n = 1, enfermedad hepática alcohólica n = 4 o enfermedad de Wilson n = 1 y en un caso permaneció criptógeno). En el hígado normal se detectó inmuno-reactividad de CB1 puntual y discreta a lo largo de las paredes sinusoidales. En el hígado cirrótico aumentó marcadamente la intensidad global de la inmunotinción de CB1, independientemente de la etiología de la cirrosis. El CB1 fue más evidente en numerosas células fusiformes distribuidas a lo largo de los tabiques fibróticos. La expresión del receptor CB1 también se encontró en otras células no parenquimales, incluyendo células inflamatorias y células proliferantes ductulares localizadas a lo largo de los tabiques fibróticos. La especificidad del anticuerpo se demostró por la falta de señal en cortes incubados en presencia del péptido bloqueante del CB1 o en ausencia del primer anticuerpo.

La inmunohistoquímica doble, que usa un anticuerpo anti-receptor CB1 y un anticuerpo anti- $\alpha$ -actina de la musculatura lisa, identificó claramente los miofibroblastos hepáticos dentro de los tabiques fibróticos como un tipo de célula prominente que expresa los receptores CB1. Por consiguiente, los receptores CB1 también se expresaron miofibroblastos hepáticos humanos cultivados, como se demostró tanto por análisis RT-PCR como por inmunocitoquímica.

**Ejemplo 2 : Respuesta fibrogénica reducida en ratones deficientes en CB1.****Animales y diseño experimental.**

Se generaron ratones machos CD1 que tenían invalidados los receptores CB1 y miembros de una camada de tipo natural como se ha descrito antes en la publicación de Ledent, C. et al., *Science* 283, 401-4. (1999). Se criaron ratones heterocigóticos durante más de quince generaciones sobre un fondo CD1, antes de generar los ratones de tipo natural y mutantes usados en el presente estudio. Se usaron cuarenta machos: WT (n = 20) y CB1<sup>-/-</sup> (n = 20), de 8-10 semanas y los animales fueron divididos en los grupos siguientes: WT de referencia (aceite de oliva n = 8); WT con CCl<sub>4</sub> (n = 12); CB1<sup>-/-</sup> de referencia (aceite de oliva n = 5); CB1<sup>-/-</sup> con CCl<sub>4</sub> (n = 15). Los animales fueron alojados en recintos a temperatura y humedad controladas, mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les proporcionaron cantidades no restringidas de alimento y agua, a no ser que se especifique otra cosa. La fibrosis fue inducida administrándoles tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Sigma, St Quentin-Fallavier, Francia) mezclado con aceite de oliva (1 vol:10 vol) a una dosis de 0,5 ml/kg de peso corporal, por inyección intraperitoneal (IP), dos veces a la semana, alternando con un volumen igual de etanol mezclado con Cremophor y PBS (5/5/90) tres veces a la semana. Los animales de referencia para CCl<sub>4</sub> recibieron aceite de oliva. Después de 4 semanas, los animales se dejaron en ayunas y se sacrificaron 48 horas después de la última inyección de CCl<sub>4</sub>. Se tomaron muestras de hígados de varios lóbulos y ya sea i) se congelan bruscamente en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en solución de extracción de RNA, o ii) se homogeneizaron en H<sub>2</sub>O y se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido para la determinación de hidroxiprolina o iii) se fijaron en formalina tamponada. Las muestras congeladas bruscamente se conservaron a -80°C hasta su uso. También se recogieron muestras de sangre en tubos revestidos de silicona que contenían un barrera de gel inerte y un disco activador de coagulación (Venoject, Terumo, Francia), se separó el suero por centrifugación y se conservaron a -20°C hasta su uso.

**Ensayos de la función del hígado.**

En un analizador automático se realizaron los análisis de sangre habituales de la función hepática (bilirrubina, fosfatasa alcalina y aspartato-transaminasa).

**Determinación de la fibrosis, inflamación y necrosis.**

Se fijaron muestras de hígado en formalina al 10% y se incrustaron en parafina. Se tiñeron cortes de tejidos (de 4 µm de espesor) con hematoxilina-eosina (H&E) para examen habitual, o con rojo PicroSirius para la visualización de la deposición del colágeno hepático. Se determinaron a ciegas la graduación histológica (necrosis e infiltración inflamatoria) y la estadificación (fibrosis) en al menos 4 fragmentos de diferentes zonas de cada hígado, por un anatomo-patólogo independiente. La fibrosis se estadificó en una escala de 0 a 4, de acuerdo con un sistema de puntuación semicuantitativa METAVIR modificado como sigue: sin fibrosis = 0, fibrosis portal sin tabiques = 1, pocos tabiques = 2, numerosos tabiques sin cirrosis = 3 y cirrosis = 4. Se tuvo en cuenta la heterogeneidad de la fibrosis en todo el hígado, cuando estaba presente, estimando el área porcentual correspondiente a un nivel de puntuación individual en cada fragmento y combinando los datos para cada hígado. La necrosis, definida por cuerpos acidófilos, degeneración con hinchamiento y/o focos dispersos de necrosis hepatocelular, fue graduada como sigue: ausente = 0; suave = 1 (implicación de 1/3 de lóbulos o nódulos); moderada (implicación de 1/3-2/3 de lóbulos o nódulos) = 2; marcada (implicación de más de 2/3 de lóbulos o nódulos) = 3. La infiltración inflamatoria fue graduada de 0 a 3: ninguna = 0; suave (portal y/o lobular) la infiltración inflamatoria en menos de 1/3 de los lóbulos o nódulos = 1; moderada (portal y/o lobular) la infiltración inflamatoria que implica 1/3-2/3 de lóbulos o nódulos = 2; marcada (portal y/o lobular) infiltración inflamatoria que implica más de 2/3 de lóbulos o nódulos = 3. Todas las muestras fueron puntuadas simultáneamente.

**Contenido de hidroxiprolina.**

El contenido de hidroxiprolina se determinó como se ha descrito previamente en la publicación de Grenard, P et al., *J. Hepatol.* 26, 1356-62. (1997). Se reunieron tres fragmentos pequeños de cada hígado, se homogeneizaron en agua destilada, se liofilizaron y se hidrolizaron durante una noche en HCl 6 N a 110°C (10 mg de polvo de hígado seco/ml de HCl 6 N). Los hidrolizados se trataron luego con carbón activo, se filtraron, se evaporaron y se volvieron a poner en suspensión en agua destilada. Se usaron partes alícuotas de los hidrolizados para medir espectrofotométricamente el contenido de hidroxiprolina (HP), haciendo reaccionar con reactivo de Ehrlich de acuerdo con el método de Woessner (Woessner, J. F., *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 440-7 (1961)) modificado como se ha descrito en la publicación de Creemers, L.B et al., *Biotechniques* 22, 656-8 (1997). El contenido de hidroxiprolina hepática se expresa como microgramos por miligramo de tejido (peso seco).

**Aislamiento y cultivo de miofibroblastos hepáticos de ratones.**

Se aislaron miofibroblastos de ratones por perfusión en colagenasa y se purificaron por un gradiente de densidad en Nicodenz, como ha sido descrito por Vrochides, D., et al., *Hepatology*, 1996. 23(6): pp. 1650-5. Después del aislamiento las células se cultivaron en un medio DMEM que contenía suero de ternera fetal (FCS) al 20%. En el día uno, los residuos celulares y las células no adherentes se retiraron por lavado, y las células se cultivaron adicionalmente en un medio DMEM que contenía FCS al 10%. Se usaron las células entre el tercer y el noveno pase, y se encontró que expresaban alfa-actina de la musculatura lisa, fibulina-2 e interleuquina-6.

**Medida de actividad similar a la de caspasa-3.**

Se realizaron ensayos de apoptosis en células no confluentes a las que se permitió unirse durante una noche en DMEM que contenía FCS al 10% y privadas de suero durante el tiempo indicado. Se determinó la actividad similar a la de caspasa-3 en lisados celulares usando AC-DEVD-AFC como sustrato, como ha sido descrito previamente (Davaile, J., et al., *J. Biol. Chem.* 2002, 277(40): pp. 37323-30; Li. L., et al., *J. Biol. Chem.* 2001. 276(41): pp. 38152-8).

**Determinación de la viabilidad celular.**

Miofibroblastos hepáticos de ratones (7.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos) se dejaron unir durante una noche en DMEM al 10%, privados de suero durante el tiempo indicado. A cada pocillo se añadió el reactivo *CellTiter 96 Aqueous One Solution* y se registró la absorbancia a 490 nm.

**10 Determinación del TGF- $\beta$ 1 hepático.**

Se determinó el contenido de TGF- $\beta$ 1 hepático en homogeneizados de hígados completos activados con ácidos. Las muestras de hígados congeladas se homogeneizaron en tampón de lisis (HEPES 25 mM, pH 7,4, NP40 al 1%, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1,3 mM, EGTA 1 mM, fosfatasa e inhibidores de proteasas) durante 30 minutos a 4°C. Después de centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C, se recogieron los lisados de tejidos clarificados y se conservaron a -80°C hasta su análisis. Se determinó la concentración de proteínas por el ensayo de proteínas BCA (Pierce) usando como patrón seroalbúmina bovina (BSA). Para activar el TGF- $\beta$ 1 latente a la forma inmuno-reactiva, los lisados de tejidos se acidificaron en volúmenes iguales de ácido acético 2,5 N y urea 10 M, a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido por una neutralización usando NaOH 2,7 M en HEPES 1 M. Se realizó un ELISA usando TGF- $\beta$ 1 de muridos Quantikine (R&D Systems, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como patrón se usó la proteína recombinante TGF- $\beta$ 1 de muridos. Los resultados se expresan como pg de TGF- $\beta$ 1/mg de proteína soluble.

**Tinción inmunohistoquímica para la  $\alpha$ -actina de la musculatura lisa.**

Se fijó tejido hepático en formalina y se incrustó en parafina. La tinción inmunohistoquímica para  $\alpha$ -actina de la musculatura lisa se realizó usando el kit de inmunodetección Vector M.O.M., y de acuerdo con el protocolo especificado por el fabricante (Vector Laboratories). Expresado en breves palabras, los cortes incrustados en parafina se desparafinaron y rehidrataron por xileno y etanol en TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6). Los portaobjetos fueron sometidos a microondas en tampón de citrato, a una potencia de 700 W 2 veces, 5 minutos cada vez. La actividad de peroxidasa endógena se extinguió por incubación durante 1 hora en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en TBS. Después del bloqueo, se realizó la unión no específica pre-incubando los cortes con suero de caballo al 1,5% en TBS durante 1 hora y luego dichos cortes se incubaron durante 15 minutos en avidina, seguido por 15 minutos en biotina (kit de bloqueo de avidina/biotina, Vector Laboratories) y se incubaron adicionalmente con solución bloqueante de IgG de ratón MOM durante 1 hora. Los cortes fueron lavados posteriormente en TBS, e incubados sucesivamente con la solución diluyente de MOM durante 5 minutos, con una dilución 1:1000 de un anticuerpo monoclonal para  $\alpha$ -actina de musculatura lisa durante 30 minutos (Sigma, Francia), con el reactivo IgG anti-ratón biotinilada MOM durante 10 minutos y finalmente con el reactivo Vectastain ABC durante 5 minutos. Se reveló la actividad de peroxidasa usando un sustrato de diaminobencidina (DAB) potenciado con metal (Pierce, Interchim, Francia). Todas las etapas se llevaron a cabo a la temperatura ambiente. Los portaobjetos de control teñidos con el diluyente de MOM en lugar de con el anticuerpo primario no mostraron tinción positiva. Se midió el área de la tinción positiva en 4-5 fragmentos de hígado por animal, usando un sistema de análisis morfométrico con el programa informático *Image-Pro Plus* (MediaCybernetics, MicroMecanique, Francia).

**Estadísticas.**

Los resultados se expresan como valores medios  $\pm$  SEM de n experimentos. Los resultados se analizaron mediante un análisis de dos vías de la varianza (ANOVA) seguido por comparaciones apareadas corregidas de acuerdo con el método de Student-Newmann-Keuls. Se tomó  $p < 0,05$  como nivel mínimo de significancia.

Se expusieron ratones deficientes en el receptor CB1 (CB1<sup>-/-</sup>) y sus miembros de camada (WT) a un tratamiento crónico con CCl<sub>4</sub>. Los ratones de referencia (CB1<sup>-/-</sup> y WT) recibieron aceite de oliva. El peso corporal medio, el peso del hígado y la relación peso del hígado/peso corporal no diferían significativamente entre los cuatro grupos experimentales, como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Parámetros vitales y ensayos de la función del hígado en ratones de tipo natural (WT) o deficientes en CB1 después de 4 semanas de tratamiento con CCl<sub>4</sub>**

Parámetro	WT con aceite de oliva	WT con CCl <sub>4</sub>	CB1-/- con aceite de oliva	CB1-/- con CCl <sub>4</sub>
Peso corporal (g)	36,3 ± 1,7	35,2 ± 0,8	34,8 ± 2,1	36,6 ± 0,9
Peso del hígado (g)	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Relación peso de hígado/peso corporal (x 100)	5,26 ± 0,45	6,0 ± 0,3	5,4 ± 0,4	5,7 ± 0,1
Aspartato-transaminasa (UI 1-1)	94,7 ± 9,2	1887,2 ± 656,6*	139,6 ± 24,3	1341,9 ± 457,1 #
Fosfatasa alcalina (UI 1-1)	37,9 ± 5,9	55,0 ± 6,2*	33,6 ± 2,0	56,4 ± 4,6 #
Bilirrubina total	3,5 ± 1,0	15,1 ± 4,2*	3,6 ± 0,9	10,0 ± 3,4 #

5 Los resultados se expresan como valores medios ± SEM. \* p<0,05 vs. WT con aceite de oliva; # p<0,05 vs. CB1-/- con aceite de oliva.

10 Los ratones WT desarrollaron fibrosis hepática después de 4 semanas de tratamiento con CCl<sub>4</sub>, como lo muestra el análisis histológico de cortes de tejidos hepáticos teñidos con rojo PicroSirius. Los hígados de ratones WT tratado con CCl<sub>4</sub> mostraron numerosa formación de tabiques con algunos nódulos. Sorprendentemente, los ratones CB1-/- tratados con CCl<sub>4</sub> mostraron las respuestas fibrogénicas más débiles con formación reducida de tabiques fibróticos. Por consiguiente, la puntuación de fibrosis fue significativamente inferior en los ratones CB1-/- tratados con CCl<sub>4</sub> en comparación con el grupo WT tratado con CCl<sub>4</sub> (2,59 ± 0,13 y 3,33 ± 0,13 respectivamente, p<0,05). Además, el contenido de colágeno hepático, cuantificado por determinación de la hidroxiprolina hepática, estaba fuertemente reducido en 40 % en los ratones deficientes en el receptor CB1 tratados con CCl<sub>4</sub> en comparación con sus correspondientes WT (respectivamente 0,45 ± 0,06 y 0,73 ± 0,11 mg/mg de tejido (peso seco); p<0,05). Finalmente la necrosis e inflamación no fueron significativamente diferentes en ratones WT y CB1-/- tratados con CCl<sub>4</sub>, como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2: Necrosis e inflamación en ratones de tipo natural (WT) y CB1-/- después de 4 semanas de tratamiento con CCl<sub>4</sub>**

Parámetro	WT con CCl <sub>4</sub>	CB1-/- con CCl <sub>4</sub>
<b>Necrosis</b>	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,2
<b>Inflamación</b>	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,2
Los resultados se expresan como el valor medio ± SEM.		

20 Se midió el contenido hepático de la citoquina fibrogénica TGF-β1 y se determinó la expresión de la α-actina de la musculatura lisa, que es un marcador de miofibroblastos hepáticos y de células estrelladas hepáticas activadas. En los animales tratados con CCl<sub>4</sub>, la producción de TGF-β1 se redujo en los ratones deficientes en CB1 en comparación con sus correspondientes de tipo natural (Fig. 1A). Además, la α-actina de la musculatura lisa estaba marcadamente atenuada en ratones CB1-/- tratados con CCl<sub>4</sub> en comparación con animales WT tratados con CCl<sub>4</sub> (1,23 ± 0,09 vs. 2,58 ± 0,23; p<0,05) (Fig. 1B).

25 Finalmente, para determinar si la inactivación de CB1 reduce la acumulación de miofibroblastos hepáticos disminuyendo su proliferación y/o apoptosis, se usaron miofibroblastos hepáticos aislados de ratones WT y CB1-/. La privación de suero se usó como estímulo apoptótico. La privación de suero afecta marcadamente a la viabilidad de los miofibroblastos hepáticos aislados de ratones de tipo natural (WT) (Fig. 2). En contraste, la privación de suero produjo efectos citotóxicos para los miofibroblastos hepáticos aislados de animales CB1-/, como se muestra por el redondeo, contracción y desprendimiento de células, y reducción de su viabilidad (Fig. 2A). La privación de suero también aumentó la estimulación de actividad similar a la de caspasa-3 en células CB1-/- en comparación con células WT (Fig. 2B). Por tanto, los miofibroblastos hepáticos de ratones CB1-/- muestran una mayor tasa de apoptosis que las células de ratones WT.

30 Estos resultados demuestran que la invalidación del receptor CB1 sensibiliza los miofibroblastos hepáticos para la apoptosis.

### **Ejemplo 3 : Fumar cannabis diariamente es un factor de riesgo para el progreso de la fibrosis en la hepatitis C crónica**

Se incluyeron 195 pacientes sin tratamiento previo consecutivos con exposición en una fecha registrada (hom-

bres/mujeres: 140/55, edad 42 ± 10 años). Los datos recogidos fueron los consumos de cannabis, alcohol y tabaco durante el periodo de la enfermedad, edad en la infección, género, vía de transmisión, genotipo, índice de masa corporal, esteatosis, actividad y fibrosis (METAVIR) y tasa de progreso de la fibrosis (siendo el valor de la mediana 0,08 por año).

- 5 Por análisis univariante la tasa de progreso de la fibrosis superior a 0,08/año fue asociada a fumar cannabis como se muestra en la Tabla 3, la ingesta de alcohol mayor o igual que 30 g/día (64%, p = 0,03), esteatosis moderada o marcada (65%, p = 0,004), edad en la infección mayor o igual que 25 (63 %, p<0,01) y actividad histológica mayor o igual que A2 (65%, p<0,001). En análisis multivariante la tasa de progreso de la fibrosis >0,08 estaba relacionada independientemente con fumar cannabis diariamente (índice de probabilidad [*odds ratio* OR] = 3,8; 95% intervalo de confianza (IC) (1,7-8,7)), ingesta de alcohol mayor o igual que 30 g/día (OR = 2,1; 95% IC (1,0-4,6)), edad en la infección mayor o igual que 25 (OR = 4,0; 95% IC (1,9-8,4)) y actividad mayor o igual que A2 (OR = 7,5; 95% IC (3,5-16,1)). Hay por tanto una relación causal entre el consumo diario de cannabis y el progreso de la fibrosis.

**Tabla 3: Incidencia del consumo de cannabis en el progreso de la fibrosis**

Cannabis	Tasa de progreso de la fibrosis superior a 0,08/año	p
Ninguno, n = 102 (52%)	43 (42%)	
Ocasional, n = 30 (16%)	15 (50%)	0,029
Diariamente, n = 63 (32%)	40 (63%)	

#### 15 **Ejemplo 4 : Cultivos de miofibroblastos hepáticos en presencia de antagonistas del receptor CB1**

##### **Aislamiento y cultivo de miofibroblastos hepáticos humanos.**

- Se obtuvieron miofibroblastos hepáticos humanos por proliferación de explantes preparados a partir de muestras quirúrgicas de hígado normal obtenido de cirugía de tumores hepáticos benignos o malignos, como se ha descrito previamente. Este método se realizó de acuerdo con las regulaciones éticas impuestas por la legislación francesa. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero al 10% (suero de ternera fetal al 5% y suero humano al 5%, DMEM 5/5) y se usaron entre los pases tercero y séptimo. Los experimentos se realizaron en células quiescentes por una incubación de 48 horas en medio de Waymouth exento de suero, a no ser que se indique otra cosa.

##### **Aislamiento y cultivo de miofibroblastos hepáticos de ratones.**

- 25 Se aislaron miofibroblastos de ratones por perfusión con colagenasa y se purificaron por gradiente de densidad en Nicodenz, como se ha descrito. Después de aislamiento las células se cultivaron en un medio DMEM que contenía suero de ternera fetal al 20%. El día uno, se retiraron por lavado los residuos celulares y las células no adherentes y las células se cultivaron adicionalmente en un medio DMEM que contenía FCS al 10 %. Las células se usaron entre los pases tercero y noveno.

##### **30 Ensayos de apoptosis.**

- Se realizaron ensayos de apoptosis en células no confluentes a las que se les permitió unirse durante una noche en DMEM 5/5 y privadas de suero durante 48 horas, como ha sido descrito por Davaille J. et al., *J. Biol. Chem.* 2002; 277:37323-30, y Li L. et al., *J. Biol. Chem.* 2001; 276:38152-8. La morfología nuclear se analizó usando tinción DAPI, la actividad similar a la de caspasa-3 se analizó en lisados celulares usando AC-DEVD-AFC como sustrato, y la escalera de DNA se analizó por electroforesis en gel de agarosa del DNA total extraído usando el kit *ladder* de DNA apoptótico.

##### **Viabilidad celular.**

Se permitió a células (7.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos) unirse durante una noche en DMEM 5/5, privadas de suero durante 48 horas en DMEM sin rojo fenol y tratadas con los efectores indicados durante 16 horas. A cada pocillo se añadió el reactivo *CellTiter 96 Aqueous One Solution* y se registró la absorbancia a 490 nm.

##### **40 Medida de la síntesis de DNA.**

- La síntesis de DNA se midió en pocillos triplicados por incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, como se ha descrito previamente (Tao, J., et al., *J. Biol. Chem.* 1999. 274(34): pp. 23761-23769). Miofibroblastos hepáticos confluentes humanos fueron privados de suero durante 48 horas y estimulados adicionalmente durante 30 horas con 20 ng/ml de PDGF-BB. Miofibroblastos hepáticos confluentes de ratones fueron privados de suero durante 24 horas en presencia de BSA al 0,1% y estimulados adicionalmente durante 30 horas con 20 ng/ml de PDGF-BB en presencia de BSA al 0,01%. Se añadió [<sup>3</sup>H]-timidina (0,5 µCi/pocillo) durante las últimas 20 horas de incubación.

El cultivo celular se realizó como se ha descrito en el ejemplo 1 en la presente memoria. Los cultivos celulares de miofi-

broblastos hepáticos tanto humanos como de ratón fueron expuestos a dosis crecientes del antagonista del receptor CB1, SR141716, y se midió la síntesis de DNA de los miofibroblastos hepáticos.

En los miofibroblastos hepáticos humanos, el SR 141716 inhibió, dependientemente de la dosis, la síntesis de DNA producida por 20 ng/ml de PDGF-BB (Fig. 3A), ocurriendo la mitad de la inhibición máxima en presencia de 300-400 nM del compuesto. El SR 141716 también inhibió la síntesis de DNA producida por 20 ng/ml de PDGF-BB en miofibroblastos de múrdos aislados de ratones de tipo natural, mientras que, solo de un modo marginal afectó a la proliferación de células CB1-/- (Fig. 3B).

Estos resultados demuestran que el antagonista de CB1, SR141716, causa inhibición del crecimiento de miofibroblastos hepáticos humanos y de ratones y actúa a través de los receptores CB1.

#### **Ejemplo 5: Determinación del efecto terapéutico de SR 141716 en la fibrosis hepática inducida**

Se evaluó el potencial antifibrogénico del antagonista del CB1, SR 141716, en un modelo experimental de fibrosis hepática inducida por intoxicación crónica con tetracloruro de carbono.

##### **Administración de fármacos.**

El SR 141716 (10 mg/kg de peso corporal) se disolvió inmediatamente antes de su uso en una solución de vehículo (2 gotas de Tween 80 en 10 ml de PBS que contenía dimetilsulfóxido al 10% y etanol al 5%) y se trató con ultrasonidos.

##### **Animales y diseño experimental.**

Se obtuvieron ratones CD1 de Janvier (Francia). Todos los experimentos se realizaron usando las directrices éticas aceptadas. Se usaron 36 machos, de 10-12 semanas, y los animales se dividieron en los grupos siguientes: grupo tratado con el vehículo aceite de oliva (n = 3); grupo tratado con el vehículo CCl<sub>4</sub> (n = 14); grupo tratado con aceite de oliva y SR 141716 (n = 3); y grupo tratado con CCl<sub>4</sub> y SR 141716 (n = 16). Los animales se alojaron en recintos a temperatura y humedad controladas, se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les proporcionó cantidades no restringidas de alimento y agua, a no ser que se especifique otra cosa. Se les indujo fibrosis administrándoles tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Sigma, St Quentin-Fallavier, Francia) mezclado con aceite de oliva (1 vol:10 vol) a 0,5 ml/kg de peso corporal, por inyección intraperitoneal, dos veces por semana durante un mes. El SR141716 o el vehículo se administraron diariamente por inyección intraperitoneal. El tratamiento se comenzó 7 días antes de la inyección de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) y duró todo el tratamiento con CCl<sub>4</sub>.

La administración conjunta de CCl<sub>4</sub> con vehículo (PBS que contenía DMSO al 10%, etanol al 5% y Tween 80 al 0,1%) produjo la muerte masiva de los animales alcanzando al 50% de la población después de un mes (véase la Fig. 4). En contraste, la administración conjunta a ratones de CCl<sub>4</sub> junto con 10 mg/kg de SR 141716 estaba asociada con una tasa de supervivencia superior en un mes (83%). No hubo muertes en los animales de referencia tratados tanto con SR141716 como con vehículo.

Por tanto, estos resultados indican un papel hepatoprotector del antagonista de CB1, SR141716.

#### **Ejemplo 6: Determinación del régimen óptimo para la administración oral de SR141716 en el tratamiento de la fibrosis hepática.**

Para definir las condiciones óptimas de tratamiento a largo plazo con SR141716 se realiza lo siguiente. Se dividieron 40 ratones CD1 machos en los siguientes grupos: de referencia (aceite de oliva n = 3); CCl<sub>4</sub> (n = 12); grupo de referencia tratado con SR 141716 (aceite de oliva n = 3); 2 grupos del grupo de CCl<sub>4</sub> tratados con SR 141716 (n = 2 veces 12). Los animales se alojaron en recintos a temperatura y humedad controladas, se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les proporcionó cantidades no restringidas de alimento y agua, a no ser que se especifique otra cosa. La fibrosis se indujo administrándoles tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Sigma, St Quentin-Fallavier, Francia) mezclado con aceite de oliva (1 vol:10 vol) a 0,5 ml/kg de peso corporal por inyección intraperitoneal (IP), dos veces a la semana. Los animales de referencia para CCl<sub>4</sub> recibieron aceite de oliva. El SR 141716 se incluye en el alimento para ratones RM1 (DIETEX, Francia) a una concentración de 65 mg/kg y se les administra al grupo tratado con SR141716. Suponiendo que un ratón que pesa 30 g come 5 g por día, la dosis final esperada de SR 141716 administrada es 10 mg/kg. El tratamiento con SR 141716 comienza 7 días antes de la inyección de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (12 ratones) o comienza 7 días después de la primera inyección (12 ratones) y dura todo el tratamiento con CCl<sub>4</sub>. Después de 5 semanas, los animales se dejan en ayunas durante la noche y se sacrifican 48 horas después de la última inyección de CCl<sub>4</sub>. Las muestras de hígados se toman de diferentes lóbulos y: bien i) se congelan bruscamente en nitrógeno líquido y se homogeneizan en solución de extracción de RNA, o ii) se homogeneizan en H<sub>2</sub>O y se congelan en nitrógeno líquido para la determinación de hidroxiprolina o iii) se fijan en formalina tamponada. La muestra congelada bruscamente se conservará a -80°C hasta su uso. Las muestras de sangre se recogen también en tubos revestidos de silicona que contienen una barrera de gel inerte y un disco activador de la coagulación (Venoject, Terumo, Francia), se separa el suero por centrifugación y se conserva a -20°C hasta su uso. Los resultados se usan para determinar la concentración a la cual la toxicidad es terapéuticamente aceptable.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM  
SANOFI-AVENTIS

5 <120> USO DE ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR CB1 PARA LA FABRICACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS

<130> CB1

<150> EPO4290633  
<151> 2004-03-09

<160> 9

10 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1  
<211> 472  
<212> PRT  
<213> Humano

15 <400> 1

Met Lys Ser Ile Leu Asp Gly Leu Ala Asp Thr Thr Phe Arg Thr Ile  
1 5 10 15

Thr Thr Asp Leu Leu Tyr Val Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Glu Asp  
20 25 30

Ile Lys Gly Asp Met Ala Ser Lys Leu Gly Tyr Phe Pro Gln Lys Phe  
35 40 45

Pro Leu Thr Ser Phe Arg Gly Ser Pro Phe Gln Glu Lys Met Thr Ala  
50 55 60

ES 2 371 552 T3

Gly Asp Asn Pro Gln Leu Val Pro Ala Asp Gln Val Asn Ile Thr Glu  
65 70 75 80

Phe Tyr Asn Lys Ser Leu Ser Ser Phe Lys Glu Asn Glu Glu Asn Ile  
85 90 95

Gln Cys Gly Glu Asn Phe Met Asp Ile Glu Cys Phe Met Val Leu Asn  
100 105 110

Pro Ser Gln Gln Leu Ala Ile Ala Val Leu Ser Leu Thr Leu Gly Thr  
115 120 125

Phe Thr Val Leu Glu Asn Leu Leu Val Leu Cys Val Ile Leu His Ser  
130 135 140

Arg Ser Leu Arg Cys Arg Pro Ser Tyr His Phe Ile Gly Ser Leu Ala  
145 150 155 160

Val Ala Asp Leu Leu Gly Ser Val Ile Phe Val Tyr Ser Phe Ile Asp  
165 170 175

Phe His Val Phe His Arg Lys Asp Ser Arg Asn Val Phe Leu Phe Lys  
180 185 190

Leu Gly Gly Val Thr Ala Ser Phe Thr Ala Ser Val Gly Ser Leu Phe  
195 200 205

Leu Thr Ala Ile Asp Arg Tyr Ile Ser Ile His Arg Pro Leu Ala Tyr  
210 215 220

Lys Arg Ile Val Thr Arg Pro Lys Ala Val Val Ala Phe Cys Leu Met  
225 230 235 240

Trp Thr Ile Ala Ile Val Ile Ala Val Leu Pro Leu Leu Gly Trp Asn  
245 250 255

Cys Glu Lys Leu Gln Ser Val Cys Ser Asp Ile Phe Pro His Ile Asp  
260 265 270

Glu Thr Tyr Leu Met Phe Trp Ile Gly Val Thr Ser Val Leu Leu Leu  
275 280 285

Phe Ile Val Tyr Ala Tyr Met Tyr Ile Leu Trp Lys Ala His Ser His  
290 295 300

ES 2 371 552 T3

Ala Val Arg Met Ile Gln Arg Gly Thr Gln Lys Ser Ile Ile Ile His  
305 310 315 320

Thr Ser Glu Asp Gly Lys Val Gln Val Thr Arg Pro Asp Gln Ala Arg  
325 330 335

Met Asp Ile Arg Leu Ala Lys Thr Leu Val Leu Ile Leu Val Val Leu  
340 345 350

Ile Ile Cys Trp Gly Pro Leu Leu Ala Ile Met Val Tyr Asp Val Phe  
355 360 365

Gly Lys Met Asn Lys Leu Ile Lys Thr Val Phe Ala Phe Cys Ser Met  
370 375 380

Leu Cys Leu Leu Asn Ser Thr Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Leu Arg  
385 390 395 400

Ser Lys Asp Leu Arg His Ala Phe Arg Ser Met Phe Pro Ser Cys Glu  
405 410 415

Gly Thr Ala Gln Pro Leu Asp Asn Ser Met Gly Asp Ser Asp Cys Leu  
420 425 430

His Lys His Ala Asn Asn Ala Ala Ser Val His Arg Ala Ala Glu Ser  
435 440 445

Cys Ile Lys Ser Thr Val Lys Ile Ala Lys Val Thr Met Ser Val Ser  
450 455 460

Thr Asp Thr Ser Ala Glu Ala Leu  
465 470

<210> 2

<211> 411

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 2

Met Ala Leu Gln Ile Pro Pro Ser Ala Pro Ser Pro Leu Thr Ser Cys  
1 5 10 15

ES 2 371 552 T3

Thr Trp Ala Gln Met Thr Phe Ser Thr Lys Thr Ser Lys Glu Asn Glu  
 20 25 30  
 Glu Asn Ile Gln Cys Gly Glu Asn Phe Met Asp Ile Glu Cys Phe Met  
 35 40 45  
 Val Leu Asn Pro Ser Gln Gln Leu Ala Ile Ala Val Leu Ser Leu Thr  
 50 55 60  
 Leu Gly Thr Phe Thr Val Leu Glu Asn Leu Leu Val Leu Cys Val Ile  
 65 70 75 80  
 Leu His Ser Arg Ser Leu Arg Cys Arg Pro Ser Tyr His Phe Ile Gly  
 85 90 95  
 Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Gly Ser Val Ile Phe Val Tyr Ser  
 100 105 110  
 Phe Ile Asp Phe His Val Phe His Arg Lys Asp Ser Arg Asn Val Phe  
 115 120 125  
 Leu Phe Lys Leu Gly Gly Val Thr Ala Ser Phe Thr Ala Ser Val Gly  
 130 135 140  
 Ser Leu Phe Leu Thr Ala Ile Asp Arg Tyr Ile Ser Ile His Arg Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Tyr Lys Arg Ile Val Thr Arg Pro Lys Ala Val Val Ala Phe  
 165 170 175  
 Cys Leu Met Trp Thr Ile Ala Ile Val Ile Ala Val Leu Pro Leu Leu  
 180 185 190  
 Gly Trp Asn Cys Glu Lys Leu Gln Ser Val Cys Ser Asp Ile Phe Pro  
 195 200 205  
 His Ile Asp Glu Thr Tyr Leu Met Phe Trp Ile Gly Val Thr Ser Val  
 210 215 220  
 Leu Leu Leu Phe Ile Val Tyr Ala Tyr Met Tyr Ile Leu Trp Lys Ala  
 225 230 235 240  
 His Ser His Ala Val Arg Met Ile Gln Arg Gly Thr Gln Lys Ser Ile  
 245 250 255

ES 2 371 552 T3

Ile Ile His Thr Ser Glu Asp Gly Lys Val Gln Val Thr Arg Pro Asp  
260 265 270

Gln Ala Arg Met Asp Ile Arg Leu Ala Lys Thr Leu Val Leu Ile Leu  
275 280 285

Val Val Leu Ile Ile Cys Trp Gly Pro Leu Leu Ala Ile Met Val Tyr  
290 295 300

Asp Val Phe Gly Lys Met Asn Lys Leu Ile Lys Thr Val Phe Ala Phe  
305 310 315 320

Cys Ser Met Leu Cys Leu Leu Asn Ser Thr Val Asn Pro Ile Ile Tyr  
325 330 335

Ala Leu Arg Ser Lys Asp Leu Arg His Ala Phe Arg Ser Met Phe Pro  
340 345 350

Ser Cys Glu Gly Thr Ala Gln Pro Leu Asp Asn Ser Met Gly Asp Ser  
355 360 365

Asp Cys Leu His Lys His Ala Asn Asn Ala Ala Ser Val His Arg Ala  
370 375 380

Ala Glu Ser Cys Ile Lys Ser Thr Val Lys Ile Ala Lys Val Thr Met  
385 390 395 400

Ser Val Ser Thr Asp Thr Ser Ala Glu Ala Leu  
405 410

<210> 3  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Humano

5

<400> 3  
Phe Arg Thr Ile Thr Thr Asp Leu Leu Tyr Val Gly Ser Asn Asp Ile  
1 5 10 15  
Gln Tyr Glu Asp  
20

<210> 4  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Humano

10

<400> 4  
Asp Met Ala Ser Lys Leu Gly Tyr Phe Pro Gln Lys Phe Pro Leu Thr  
1 5 10 15  
Ser Phe Arg Gly Ser Pro Phe  
20

ES 2 371 552 T3

<210> 5  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Humano

5 <400> 5

Thr Glu Phe Tyr Asn Lys Ser Leu Ser Ser Phe Lys Glu Asn Glu Glu  
1 5 10 15

Asn Ile Gln Cys  
20

<210> 6  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Humano

10

<400> 6

Arg Met Ile Gln Arg Gly Thr Gln Lys Ser Ile Ile Ile His Thr Ser  
1 5 10 15

Glu Asp Gly Lys  
20

<210> 7  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Humano

15

<400> 7

Val Tyr Asp Val Phe Gly Lys Met Asn Lys Leu Ile  
1 5 10

<210> 8  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Humano

20

<400> 8

His Lys His Ala Asn Asn Ala Ala Ser Val His Arg Ala Ala Glu Ser  
1 5 10 15

Cys Ile Lys Ser  
20

<210> 9  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Humano

25

<400> 9

His Lys His Ala Asn Asn Thr Ala Ser Met His Arg Ala Ala Glu Ser  
1 5 10 15

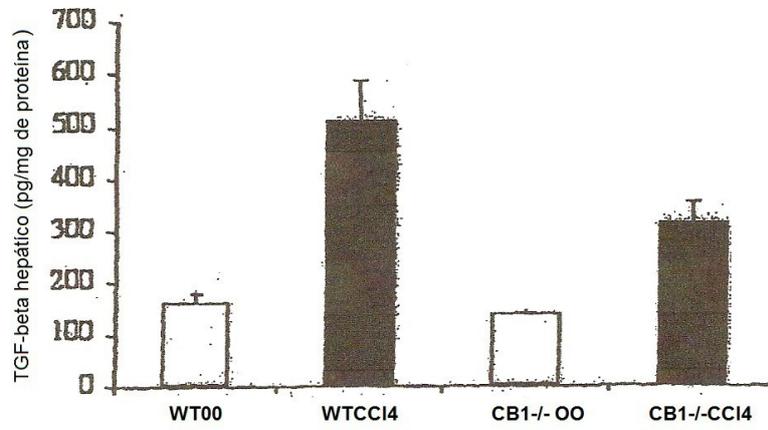
Cys Ile Lys Ser  
20

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un antagonista del receptor CB1 para uso en un método para reducir la fibrosis hepática.

A **Figura 1**



B

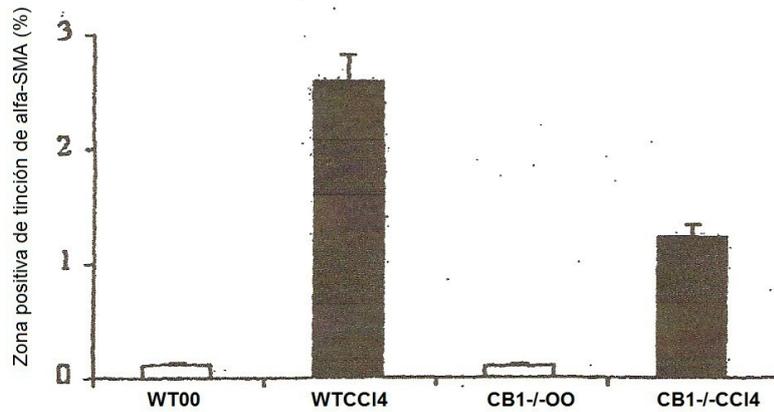


Figura 2

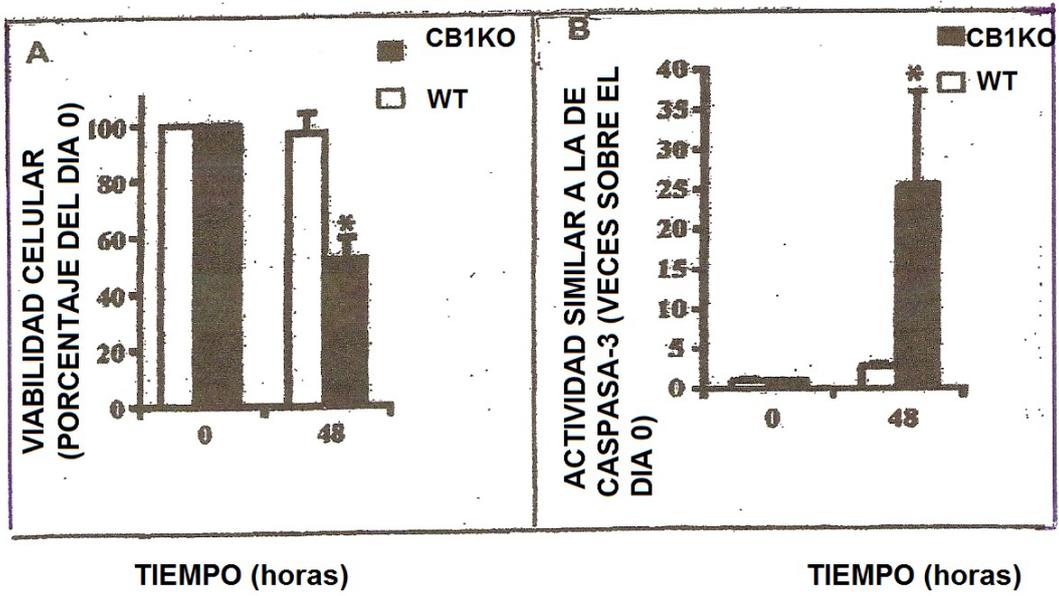


Figura 3

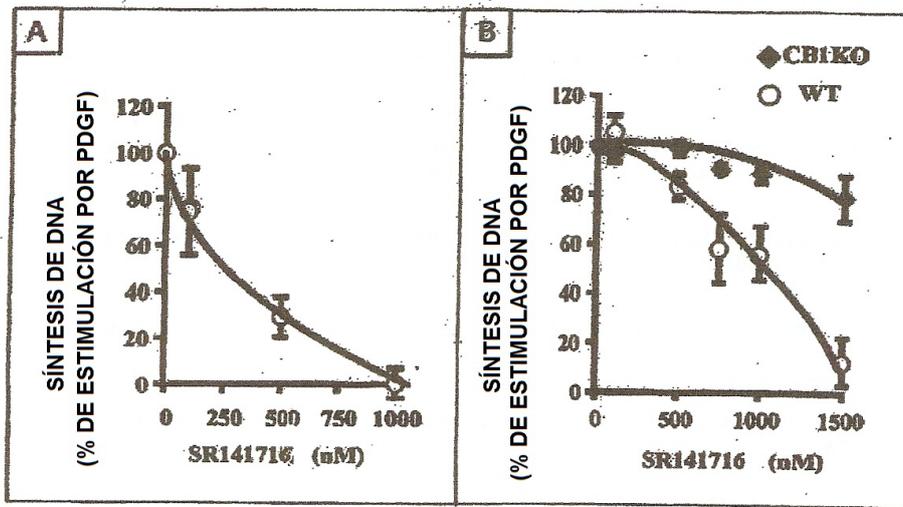


Figura 4

