

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 195**

51 Int. Cl.:

A61K 31/136	(2006.01)	A61P 1/00	(2006.01)
A61K 31/166	(2006.01)	A61P 1/02	(2006.01)
A61K 31/196	(2006.01)	A61P 1/04	(2006.01)
A61K 31/343	(2006.01)	A61P 11/02	(2006.01)
A61K 31/357	(2006.01)	A61P 17/00	(2006.01)
A61K 31/4439	(2006.01)		
A61K 31/47	(2006.01)		
A61K 31/606	(2006.01)		
A61K 31/609	(2006.01)		
G01N 33/94	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08717161 .7**

96 Fecha de presentación: **27.02.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2131829**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2009**

54 Título: **Agonistas de PPAR-gamma para la inducción de la expresión de péptidos antimicrobianos catiónicos como estimulantes inmunoprotectores**

30 Prioridad:
28.02.2007 IE 20070129

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.07.2012

73 Titular/es:
**GIULIANI INTERNATIONAL LIMITED
33 SIR JOHN ROGERSON'S QUAY
DUBLIN 2, IE**

72 Inventor/es:
**BARONI, Sergio;
DESREUMAUX, Pierre y
BELLINVIA, Salvatore**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 195 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

Agonistas de PPAR-gamma para la inducción de la expresión de péptidos antimicrobianos catiónicos como estimulantes inmunoprotectores

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la inducción de las defensinas por los agonistas de PPAR-gamma. Las defensinas proporcionan inmunoprotección a la piel, los epitelios oral, nasal, ocular y otras mucosas epiteliales, que incluyen la mucosa vaginal. En concreto, la invención se refiere a la estimulación de la producción de defensinas por tales agonistas a través de la activación de los receptores PPAR en los epitelios y/o las mucosas. Más concretamente, la invención se refiere a la estimulación de la producción de defensinas entéricas por tales agonistas mediante la activación de los receptores PPAR del intestino.

Antecedentes de la invención

15 Las enfermedades intestinales inflamatorias (EII), que incluyen la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), son enfermedades crónicas recurrentes con remisiones y exacerbaciones, que aparecen principalmente en pacientes jóvenes. La inflamación puede afectar a todas las regiones del intestino y a todas las capas de la mucosa intestinal, incluyendo el tejido adiposo mesentérico adyacente y las zonas perianales en la EC. Estas enfermedades se caracterizan clínicamente por cursos prolongados y variables, la diversidad de las manifestaciones intestinales, y por la aparición de graves complicaciones locales y sistémicas. La etiología de la EC y la CU sigue siendo desconocida, aunque se piensa que la respuesta intestinal inflamatoria patológica es consecuencia de una ruptura de la tolerancia a la flora bacteriana en el tracto gastrointestinal de individuos genéticamente predispuestos¹.

20 Las EII son más prominentes en los países desarrollados y en concreto en Europa Occidental, América del Norte y Australia. La prevalencia de la EC y la CU es de aproximadamente 1-2/1.000 habitantes. En particular en el año 2005, se estima un total de 120.000 pacientes con EC y 80.000 pacientes con UC en Francia y aproximadamente 2,5 millones de pacientes con EII en los Estados Unidos. Al no disponer de moléculas terapéuticas curativas, el manejo terapéutico asocia la terapia sintomática (analgésicos, antibióticos, nutrición), los agentes antiinflamatorios e inmunosupresores (aminosalicilatos, esteroides, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, anticuerpos monoclonales anti-TNF tales como infliximab) y el tratamiento quirúrgico. En conjunto, el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas es, por lo tanto, fundamental para la gestión clínica.

30 La mucosa digestiva ha desarrollado diversas estrategias inmunológicas para tolerar el contacto íntimo con comensales y evitar que las bacterias patógenas se propaguen a los tejidos del huésped. El reconocimiento de los microbios patógenos y autóctonos transmitidos por los alimentos es una función de barrera esencial para la supervivencia de los insectos y los mamíferos. En concreto, la resistencia de los mamíferos a los agentes patógenos es conferida principalmente por los receptores de tipo Toll ligados a membrana (TLRs)¹ y la familia recientemente identificada de las proteínas citoplasmáticas con repeticiones ricas en leucina y dominio de oligomerización por unión de nucleótidos (NOD-LRRs)². NOD1 y NOD2 poseen un dominio N-terminal de unión a caspasa (CARD), un dominio central de unión a nucleótidos (NOD) y un dominio de repetición rico en leucina C-terminal (LRR)².

35 Se ha prestado una considerable atención a la señalización NOD2, ya que las mutaciones de este gen se han asociado con la enfermedad de Crohn (EC)^{3,4}. NOD2 actúa como una molécula citoplasmática de reconocimiento de patrones (PRM) para el peptidoglicano bacteriano⁵ detectando un muropeptido principal liberado y reciclado durante el crecimiento bacteriano - el muramil dipéptido MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP)⁶⁻⁸. Después del reconocimiento de MDP, NOD2 promueve y regula la inmunidad innata y la adaptativa a través de factores de transcripción y de la activación de la quinasa². Por lo tanto, la ausencia de señalización NOD2 en ratones confiere comprensiblemente susceptibilidad oral a *Listeria monocytogenes* a través de la regulación de determinados péptidos antimicrobianos catiónicos entéricos (CAMPs)⁸. Trabajos recientes han proporcionado pruebas de que NOD1 confiere capacidad de respuesta a los peptidoglicanos que contienen ácido meso-diaminopimérico (que se encuentra principalmente en las bacterias Gram negativas)^{9,10}. De manera similar a la función fisiológica de NOD2, NOD1 es necesario para la expresión de determinadas β -defensinas por parte de las células epiteliales gástricas durante la infección por *Helicobacter pylori*¹¹.

Péptidos antimicrobianos gastrointestinales (CAMPs: defensinas, catelicidinas): implicaciones para la enfermedad inflamatoria

50 Informes recientes han arrojado luz sobre el papel efector de las CAMPs en el control de la homeostasis intestinal y la contención de microbios invasores, ya que las células madre que regeneran el epitelio intestinal requieren una protección antimicrobiana continua. El nivel de expresión de CAMP va en paralelo con el desarrollo intestinal en los metazoos, desde la inmadurez de los mecanismos de defensa locales durante la gestación hasta la colonización bacteriana del intestino después del nacimiento¹². Son de particular interés la regulación dependiente e independiente de NF- κ B de dos tipos de CAMP que son prevalentes en el intestino de los mamíferos, a saber, las defensinas y las catelicidinas.

Las α - y β - defensinas son polipéptidos pequeños con residuos hidrófobos y cargados positivamente separados espacialmente. Seis cisteínas invariantes forman 3 enlaces disulfuro intramoleculares específicos y estabilizan así la proteína en una configuración en lámina beta de triple cadena plegada de manera compleja^{12,13}. Mientras que las α -defensinas HD-1 a HD-4 (también conocidas como proteínas de neutrófilos humanos 1 a 4) son expresadas por los neutrófilos, HD-5 y HD-6 (también conocidas como criptidinas en ratones) son producidas por células epiteliales intestinales especializadas, llamadas células de Paneth. Estas últimas se encuentran principalmente en la base de las criptas de Lieberkühn del intestino delgado y tienen un papel principal en la inmunidad innata de la mucosa ileal sintetizando y liberando gránulos proteicos en el lumen después de la exposición a microbios y/o a productos microbianos. Estos gránulos de secreción son ricos en péptidos anfipáticos que pueden causar la muerte microbiana alterando la integridad de la membrana¹²

Las células de Paneth juegan un papel crucial al mantener la tolerancia hacia los comensales y repeler las infecciones por patógenos produciendo péptidos antimicrobianos, tales como las defensinas. La vía de señalización de Wnt/TCF/beta-catenina es esencial para el control de la homeostasis intestinal y la diferenciación de las células de Paneth.

Curiosamente, se ha informado acerca de la expresión intestinal alterada de las alfa defensinas entéricas (es decir, HD-5) en la EC lo que puede contribuir a los cambios en la flora luminal y/o generar vulnerabilidad a través de la barrera epitelial a la infección por enteropatógenos⁴, tales como *E. coli* adherente-invasiva⁵⁹ y *M. paratuberculosis*⁶⁰ (Figura 2). También necesita ser aclarada la influencia de los sensores microbianos y de los CAMPs en la aparición de la enfermedad del colon, ya que la carga bacteriana fisiológica es mayor en el colon que en el intestino delgado. Por último, el uso de ratones con CAMPs mutantes y un modelo en ratones desarrollado recientemente que portan la mutación principal NOD2 asociada a EC⁶¹ puede ayudar a determinar si la función de la defensina entérica alterada y/o las mutaciones de los NODs naturales son suficientes para desencadenar el desarrollo de enfermedades intestinales inflamatorias. Se ha ilustrado experimentalmente la función antimicrobiana *in vivo* de las α -defensinas por la observación de una mayor resistencia a la infección por *Salmonella typhimurium* en ratones transgénicos HD-5, acompañada de cambios marcados en la composición de la flora dominante en el lumen gastrointestinal¹⁴. A diferencia de las β -defensinas, las α -defensinas producidas por las células de Paneth se regulan principalmente a nivel post-transcripcional mediante proteasas extracelulares¹⁵, que incluyen metaloproteinasas-7 de matriz (MMP-7, matrilisina) y tripsina en ratones y seres humanos, respectivamente^{16,17}. Por lo tanto, los ratones MMP-7^{-/-} acumulan formas inactivas de criptidinas y sucumben más fácilmente a la infección oral por *S. typhimurium* de lo que lo hacen los animales naturales¹⁷. La mayoría de las células epiteliales sintetizan principalmente seis beta-defensinas humanas (hBD-1 a hBD-6). Los ratones que carecen del ortólogo de hBD1 muestran una mayor susceptibilidad a la infección por *Staphylococcus aureus*¹⁸, lo que confirma el papel de esta proteína en la inmunidad innata.

Las catelicidinas son CAMPs que son estructural y evolutivamente distintos de las defensinas, pero que tienen una distribución y abundancia similares en el tracto gastrointestinal¹². Se sintetizan como péptidos precursores grandes que contienen un dominio N-terminal altamente conservado (catelina), engarzado a un péptido C-terminal con actividad antimicrobiana. Al igual que con las defensinas, las catelicidinas son activadas por proteólisis parcial extracelular¹⁹. Aunque se han identificado varios miembros de la familia en otras especies de mamíferos, los humanos y los ratones poseen un único gen de la catelicidina (denominado LL37/FALL39/hCAP18 y el péptido antimicrobiano relacionado con la catelina (CRAMP), respectivamente)²⁰. La evidencia experimental ha indicado que los ratones que carecen de CRAMP son más susceptibles a la infección cutánea por estreptococos del grupo A y a la infección del tracto urinario por *Escherichia coli* invasiva^{21,22}. Además, los macrófagos deficientes para CRAMP no controlaban la replicación de *S. typhimurium*²³.

Los ratones con mutaciones en las vías de señalización de NF- κ B y MyD88 presentan una mayor susceptibilidad a la colitis inducida por *Helicobacter*²⁴ y a la colitis desencadenada por comensal respectivamente²⁵, lo que indica un papel esencial para NF- κ B en la tolerancia/resistencia intestinal a las bacterias y una posible implicación en la regulación de la producción de CAMP. En los seres humanos, la expresión de hBD-1 es constitutiva en el intestino delgado y en el colon, mientras que la síntesis colónica de hBD-2 a -4 es fuertemente dependiente de la activación de NF- κ B por agentes infecciosos en el tracto digestivo (tal como *H. pylori*) y/o citocinas pro-inflamatorias¹². Además del impacto de la regulación de la señalización TLR²⁶, se ha demostrado que las vías de señalización NOD1 y NOD2 activan la expresión de hBD-2^{11,27}. Además, hallazgos recientes han demostrado que la activación de las vías de MAP quinasa también es necesaria para la expresión de hBD-2 y/o -3^{11,26}.

Se ha demostrado que tres mutaciones en el gen NOD2 (a saber, R702W, G908R y 1007fs) conducen a una predisposición a EC^{3,4}. Las correlaciones genotipo-fenotipo han demostrado que los mutantes NOD2 están en su mayoría ligados a la EC ileal⁴². Las mutaciones comunes y las raras se han asociado con una activación NF- κ B inducida por MDP alterada^{5,7} y la producción de citocinas en monocitos de sangre periférica^{7,43-45}. Lala y sus colaboradores informaron recientemente que NOD2 es altamente expresado en las células de Paneth^{46,47}, un hallazgo que podría explicar la asociación entre las mutaciones NOD2 y el desarrollo de las lesiones ileales inflamatorias⁴². De acuerdo con un efecto protector de NOD2 en el íleon, los ratones knock out para NOD2 presentaron (i) una mayor susceptibilidad a la infección por vía oral (pero no a la infección sistémica) por las bacterias Gram positivas intracelulares facultativas *L. monocytogenes*, y (ii) una expresión notablemente reducida de un subgrupo de genes de criptidina⁸.

Se considera importante que se ha descubierto una producción disminuida de HD-5 y HD-6 en muestras de resección quirúrgica y biopsias de pacientes con EC ileal^{14,48,49}; supuestamente, las mutaciones NOD2 asociadas a EC contribuían a esta alteración. Por otro lado, los individuos con colitis de Crohn presentan niveles normales de α -defensinas pero tienen un número de copias muy reducido para el gen de la β -defensina hBD-2, lo que da como resultado una expresión alterada en el colon⁵⁰. Al igual que con las mutaciones NOD2, se ha asociado el complejo polimorfismo intrónico del gen NOD1 con la patogénesis de la EII⁵¹. Además, los ratones deficientes para NOD1 presentan una mayor susceptibilidad a la infección por *H. pylori*⁵² y una menor expresión de determinadas β -defensinas¹¹.

La expresión reducida de las defensinas en la EC ileal podría contribuir a cambios de la flora luminal, generando así vulnerabilidad a través de la barrera epitelial a la infección por agentes patógenos asociados a la EC tales como *E. coli* adherente-invasiva⁵⁹ y *M. paratuberculosis*⁶⁰.

Al mismo tiempo, las vías de señalización independientes de NF- κ B podrían controlar la producción de CAMP regulando la diferenciación, el compromiso de linaje y/o la renovación del epitelio celular. Curiosamente, la señalización Wingless (Wnt) alterada se asocia con una carencia total de células proliferativas en el epitelio del intestino delgado fetal²⁸, lo que sugiere que esta vía tiene un papel esencial en el mantenimiento del estado proliferativo/indiferenciado de las células epiteliales intestinales. Se observó que la ausencia del gen ephrin-B3 (que es regulado negativamente mediante la vía de señalización de Wnt) daba como resultado un compromiso de linaje de células de Paneth anormal²⁹. Además, la vía de señalización de Wnt podría controlar la expresión génica de las defensinas (a través del factor de transcripción 4, TCF4) en células derivadas de las células de Paneth, ya que no se detectaron criptidinas en el intestino delgado de ratones TCF4^{-/-} embrionarios o en el de adultos que carecían del receptor de Wnt Frizzled-5³⁰. Por el contrario, los genes de la criptidina se sobreexpresan en ratones que muestran activación mutacional de la vía de señalización de Wnt^{30,31}.

Un análisis mutacional dirigido de los promotores de la α -defensina puso de manifiesto un papel regulador fundamental de los sitios de unión de TCF³⁰. Tomados en su conjunto, estos hallazgos indican que es necesaria la activación de la señalización de Wnt para la producción de CAMPs derivados de células de Paneth. Por lo tanto, deben considerarse los determinantes de las células de Paneth (tales como Mtgr1 y Gfi1) como candidatos potenciales para la susceptibilidad a los trastornos inflamatorios crónicos^{32,33}.

Finalmente, y dado el papel crucial de determinados receptores nucleares en la inmunidad, la inflamación inducida por bacterias o la proliferación/maduración celular, se ha sugerido que estos receptores pueden tener un papel potencial en la inmunidad gastrointestinal innata regulando la biogénesis de CAMP. Curiosamente, se ha demostrado que un agonista del receptor de glucocorticoides (dexametasona) mejora la expresión de hBD-2, aunque queda por determinar el mecanismo³⁴. Más recientemente, se identificaron los genes codificadores de la catelicidina y de la hBD2 como dianas del receptor de la vitamina D (VDR)³⁵, un receptor nuclear necesario para la resistencia a la infección por *M. bovis*³⁶. El tratamiento de los monocitos con un ligando VDR sintético condujo a la regulación positiva dependiente de dosis de la transcripción del gen de la catelicidina, que ejerce un efecto antimicrobiano directo sobre *M. tuberculosis*³⁷. De acuerdo con estos hallazgos, los individuos con niveles disminuidos de ligando VDR endógeno presentaron una mayor susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis*³⁷.

Para eludir la actividad microbicida de los CAMPs, los microorganismos (generalmente agentes patógenos) han desarrollado una variedad de estrategias que son una reminiscencia de las implicadas en la resistencia a antibióticos³⁹. Una forma de lograr la inactivación es producir proteasas, que degradan los CAMPs; sin embargo, en el caso de las defensinas, los puentes disulfuro intramoleculares hacen que los péptidos sean relativamente resistentes a la proteólisis enzimática. Otra estrategia consiste en reducir la carga catiónica neta de la envoltura bacteriana, a fin de reducir su afinidad por los CAMPs; esto se logra incorporando grupos cargados positivamente en los polímeros de ácido teicoico (D-alanina) y en el lípido A (aminoarabinosa) en la pared celular bacteriana. Otras estrategias bacterianas de resistencia a los CAMPs incluyen evitar que los efectores del huésped tengan acceso a su diana a través de la captura extracelular por proteínas de secreción y el bombeo activo de péptidos a través de la membrana citoplasmática³⁹. Sin embargo, a pesar de estas diversas armas protectoras (que no son mutuamente excluyentes), probablemente los microorganismos seguirán siendo inhibidos por los CAMPs si el huésped es capaz de liberar estos últimos en grandes cantidades en el lumen intestinal, como en el caso de las defensinas. En una situación de este tipo, la regulación negativa de los genes codificadores de los CAMPs a nivel de la transcripción por componentes bacterianos (como se informó en pacientes con shigellosis⁴⁰ y en ratones infectados por vía oral con *S. typhimurium*⁴¹) puede ser un contramecanismo muy sofisticado (Figura 2).

La agresión y la detección microbiana alteradas por microbios entéricos específicos pueden afectar la función de los CAMPs en el intestino y dar como resultado el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos, tales como la enfermedad intestinal inflamatoria (EII). Estos hallazgos arrojan nueva luz sobre la patogénesis de la EC, que se considera clásicamente como el resultado de una activación anormal de los linfocitos T por inmunógenos microbianos.

Además de la actividad antimicrobiana de los CAMPs, se han atribuido funciones pleiotrópicas a las defensinas y a las catelicidinas (Tabla 1)⁵³. Ambos CAMPs tienen la capacidad de quimioatraer a los inmunocitos implicados en la inmunidad innata (neutrófilos y monocitos/macrófagos), en la inmunidad adaptativa (células dendríticas y linfocitos T)

y en las reacciones alérgicas/inflamatorias (mastocitos). Además, hBD2 podría activar la vía de señalización dependiente de TLR4 en las células dendríticas⁵⁴.

Por otro lado, Hancock *et al.* informaron recientemente que LL-37 puede amortiguar la activación dependiente de TLR en los monocitos humanos⁵⁵ y puede promover la maduración de las células dendríticas, dando como resultado la polarización Th1 de los linfocitos T⁵⁶. En su conjunto, estos hallazgos indican que las interacciones CAMP pueden iniciar y controlar la respuesta inflamatoria uniendo la inmunidad innata y la adquirida (Tabla 1). Por último, los CAMPs tales como LL-37 tienen la capacidad de promover la angiogénesis, como lo demuestra la disminución de la vascularización durante la reparación de heridas en la piel en ratones deficientes para CRAMP⁵⁷. Ya que la biología de las células de Paneth influye en la angiogénesis intestinal a través del reconocimiento de los comensales⁵⁸, estos hallazgos proporcionan una comprensión acerca de la patogénesis de la EII. Los CAMPs entéricos tienen una serie de funciones esenciales y emergentes, tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa del tracto gastrointestinal modulando la resistencia microbiana, la angiogénesis, la quimiotaxis y la activación/maduración de la respuesta humoral (Tabla 1). En concreto, se piensa que la liberación de CAMPs en el lumen protege a las células de las células de las criptas mitóticamente activas (que renuevan la monocapa de células epiteliales) de la colonización por microorganismos patógenos. El uso de animales transgénicos proporciona una mejor comprensión acerca de la función fisiológica y la regulación de estos efectores. Se ha demostrado que NOD1/2 ejercen una actividad bactericida modulando la producción epitelial de defensinas - lo que sugiere un posible mecanismo por el cual las moléculas de reconocimiento de patrones PRMS podrían proteger al huésped del desarrollo de la EC (Figura 2).

Péptidos antimicrobianos epiteliales: implicaciones para la estimulación del sistema inmunológico

Varios estudios recientes han implicado a los péptidos antimicrobianos, que incluyen las defensinas, en funciones de protección en la piel, el epitelio oral, nasal, ocular y otras mucosas epiteliales, que incluyen la mucosa vaginal. Todas las mucosas comparten un origen embriogénico común, ya que todas proceden de la misma capa embrionaria y podría esperarse que presentasen respuestas bioquímicas similares, que incluyen la expresión de defensinas protectoras.

En el año 2003, Dinulos *et al.* examinaron la actividad antimicrobiana de expresión de la β -defensina-2 de los queratinocitos en las defensas inmunológicas cutáneas. Se descubrió que la expresión de β -defensina-2 era inducida por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que *Streptococcus pyogenes* resultó ser un pobre inductor de la β -defensina-2. El estudio indicó que la capacidad de inducir la expresión de β -defensina-2 en combinación con sus efectos antimicrobianos puede contribuir a la rareza de las infecciones cutáneas por organismo bacterianos gram negativos mientras que la carencia de estimulación proporcionada por *Streptococcus pyogenes* puede apuntar a su capacidad para evadir las defensas del sistema inmunológico y provocar enfermedades cutáneas⁶⁷.

En el último año, Huang *et al.* han llevado a cabo ensayos antimicrobianos para investigar la actividad antimicrobiana de una serie de péptidos antimicrobianos expresados en la superficie ocular humana, que incluyen las β -defensinas 1 a 3, contra microbios tales como *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Staphylococcus aureus* (SA) y *Staphylococcus epidermidis* (SE) en presencia de NaCl o lágrimas. La β -defensina-3 ha demostrado tener una potente actividad contra SA y SE, mientras que la β -defensina-2 tenía una actividad moderada y la β -defensina-1 no mostró actividad contra estas cepas. El NaCl atenúa la actividad y las lágrimas inhibían completamente la actividad de la β -defensina-1 y 2, pero no afectaban a la actividad de la β -defensina-3. El estudio valida el papel de algunas defensinas como antimicrobianos *in vivo*⁶⁸.

Hacia finales del 2007, Vanhinsbergh demostró que los niveles reducidos de determinada expresión génica inmunomoduladora, especialmente los receptores de tipo Toll (TRL) y las defensinas, se asocian con el desarrollo de alergias, por ejemplo el desarrollo de la rinitis alérgica y no alérgica⁶⁹.

Por último, Chung *et al.* han identificado determinadas vías de señalización específicas que los agentes patógenos y comensales toman en la estimulación de péptidos antimicrobianos tales como las defensinas y las catelicidinas en la piel, la mucosa oral y otros epitelios, e identifican estas vías con el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para las enfermedades periodontales⁷⁰.

Este trabajo refuerza el papel protector de las defensinas en el sistema inmunológico humano y destaca la importancia de aumentar la respuesta inmunológica frente a agentes patógenos proporcionando vías para la estimulación de la producción de defensinas en el cuerpo.

Otra técnica anterior

En la patente de Estados Unidos n° US 6.326.364 se describen compuestos con 5-aminosalicilato tales como 5-ASA por tener efectos antimicrobianos selectivos *in vitro*. Los ejemplos muestran efectos inhibidores contra una serie de cultivos bacterianos de *Clostridium* en placas de agar en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. No se observó ningún efecto contra las colonias de *Lactobacillus*, *Enterococcus* o *Bacteroides*.

En las publicaciones internacionales N^{os} WO2007/010514 y WO2007/010516 se describe el uso de una serie de análogos estructurales de 5-ASA que funcionan como agonistas de PPAR y que pueden utilizarse en el tratamiento

de afecciones inflamatorias gastrointestinales y del cáncer.

Funciones de PPAR-gamma

5 Recientemente, se identificó el receptor nuclear gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR-gamma) como una diana de los fármacos antiinflamatorios utilizados en el tratamiento de la EII, lo que indica un mecanismo mediante el cual intervienen en el efecto antiinflamatorio *in vivo* en el intestino². Sin embargo, presumiblemente debido al origen embriogénico común de las mucosas, se ha demostrado la expresión del receptor PPAR en diversas zonas de la mucosa diferentes del intestino. Estudios recientes han sugerido que PPAR-gamma puede contribuir a la inflamación crónica de la mucosa nasal en la rinitis alérgica perenne⁷⁰.

10 PPAR-gamma es un receptor nuclear esencial que controla la homeostasis intestinal interactuando con la beta-catenina y el factor de transcripción de los linfocitos T (Tcf-4). Tcf-4 es un factor de transcripción esencial para determinar el destino de las células intestinales y para la regulación de la expresión de antibióticos naturales por parte de las células de Paneth³.

15 El 5-aminosalicilato (5-ASA) es un fármaco antiinflamatorio (mesalazina) ampliamente utilizado en el tratamiento de las enfermedades intestinales inflamatorias, pero el mecanismo que subyace a sus efectos intestinales sigue siendo poco conocido. Recientemente, se identificó el receptor nuclear gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR-gamma) como una diana de 5-ASA, lo que indica un mecanismo por el cual 5-ASA interviene en su efecto antiinflamatorio *in vivo* en el intestino². Por lo tanto, dadas las propiedades antimicrobianas de 5-ASA, tales compuestos y sus derivados podrían modular la expresión de genes antimicrobianos a través de la activación de PPAR-γ. La rosiglitazona también logra la activación de los receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs), específicamente de los PPAR-gamma, tiene un efecto antiinflamatorio.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención, se define a continuación una serie de términos.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "péptidos antimicrobianos" se refiere a cualquiera de las α- o β-defensinas (por ejemplo, HD-5 para la defensina humana 5) o pequeños polipéptidos con residuos hidrófobos y cargados positivamente espacialmente separados.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "defensinas activadas", cuando se utiliza en referencia a cualquier molécula que activa las defensinas, se refiere a una molécula (es decir, un agonista de PPAR-gamma) que induce la expresión génica de las α- o β-defensinas.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido sintético, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "reacción en cadena de la polimerasa" (en adelante "PCR") es un procedimiento para amplificar un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Los dos cebadores son complementarios a sus respectivas cadenas de la secuencia diana bicatenaria.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "análogos estructurales" se refieren a compuestos cuya estructura molecular actúa como mimético de 5-ASA con respecto a su capacidad de unión al receptor PPAR-gamma. En concreto, aquellos compuestos cuyas estructuras permiten tipos análogos de enlaces de hidrógeno, e interacciones electrostáticas en el receptor PPAR-gamma.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "células Caco-2" se refiere a células de adenocarcinoma de colon de humano caucásico.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "rosiglitazona" se refiere a un agonista químico altamente selectivo y potente para PPAR-gamma. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "epitelio" se refiere a los tejidos del cuerpo compuestos de capas de células que cubren las superficies de órganos tales como la superficie de la piel y el revestimiento interior del tracto digestivo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mucosas" se refiere a los revestimientos y a las membranas mucosas de origen principalmente endodérmico, cubiertos de epitelio, que están implicados en la absorción y la secreción. Las mucosas revisten diversas cavidades corporales que están expuestas al ambiente externo y a los órganos internos. Se continúan con la piel en la nariz, los labios, los oídos, el área genital y el ano.

50 **Objeto de la invención**

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones. También se describen los agonistas de PPAR-gamma que pueden estimular los receptores PPAR-gamma para inducir la expresión de las defensinas entéricas en el intestino.

También se describen los agonistas de PPAR-gamma, que comprenden una serie de compuestos que han resultado ser activos en el receptor PPAR para su uso como estimulantes para inducir la expresión de CAMP entérico en el intestino, en concreto para la expresión de defensinas.

5 También se describen compuestos que son capaces de matar los microbios estimulando la expresión de CAMP. Los CAMPs pueden ser defensina y/o catelicidina. Los microbios son agentes que son capaces de matar bacterias, virus, hongos y otros agentes infecciosos.

También se describen compuestos que mejoran los mecanismos de defensa del cuerpo a través de la expresión de CAMP. CAMP puede ser defensina y/o catelicidina. El objeto de la presente invención es proporcionar compuestos para su uso en la intervención de la afección del tracto gastrointestinal diverticulitis aguda.

10 Es un objeto preferente de la invención proporcionar una intervención para la prevención de la diverticulitis aguda en pacientes afectados por la diverticulosis de colon, la colitis indeterminada y la colitis infecciosa.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar compuestos para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de tales enfermedades.

También se describen moduladores de la expresión de CAMP.

15 **Sumario de la invención**

Se describe un procedimiento que utiliza una variedad de entidades químicas que actúan sobre los PPAR-gamma, para inducir la producción de CAMP. Tales compuestos pueden utilizarse en la inducción de la expresión de CAMP en los tejidos que tienen receptores PPAR-gamma, tales como los epitelios y/o las mucosas. En concreto, los compuestos pueden utilizarse para inducir la expresión de CAMP entérica en el intestino. Las defensinas son ejemplos de CAMPs.

20 También se describen agonistas de PPAR-gamma que comprenden una serie de compuestos que han resultado ser activos en el receptor PPAR-gamma, para su uso como estimulantes para inducir la expresión de CAMP en el tejido, especialmente la expresión de defensinas.

25 También se describen agonistas de PPAR-gamma que comprenden una serie de compuestos que han resultado ser activos en el receptor PPAR-gamma, para su uso como estimulantes para inducir la expresión de CAMP en el epitelio y/o las mucosas que tienen receptores PPAR-gamma, especialmente la expresión de defensinas.

También se describen agonistas de PPAR-gamma que comprenden una serie de compuestos que han resultado ser activos en el receptor PPAR-gamma, para su uso como estimulantes para inducir la expresión de CAMP entérica en el intestino, particularmente la expresión de defensinas.

30 Los compuestos de la invención pueden seleccionarse de entre ácido 2-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico, 5-amino-N-hidroxi-2-metoxibenzamida, ácido 2-etoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico o ácido 2-etoxi-3-(3'-aminofenil) propiónico para su uso en el tratamiento y la prevención de la diverticulitis aguda.

35 Los compuestos pueden utilizarse en la inducción de la expresión de CAMP en los tejidos que tienen receptores PPAR-gamma, tales como los epitelios y/o las mucosas. En concreto, los compuestos pueden utilizarse para inducir la expresión de CAMP entérico en el intestino.

Los compuestos de la invención puede seleccionarse del grupo que comprende: ácido 3-(4'-aminofenil)2-metoxipropiónico "R34", ácido 3-(4'-aminofenil)2-etoxipropiónico, ácido3-(3'-aminofenil) 2-etoxipropiónico.

40 Los nombres de los compuestos anteriormente indicados también pueden escribirse en la nomenclatura química estándar como sigue (nomenclatura que se utilizará en todo el texto): ácido (\pm)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico "R34" (**forma racémica**), ácido (\pm)-2-etoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico, ácido (\pm)-2-etoxi-3-(3'-aminofenil) propiónico.

En concreto, los compuestos para su uso en los procedimientos de la presente invención pueden ser enantiómeros de las siguientes mezclas racémicas: ácido (R,S)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico (compuesto 34) "R34" (**forma racémica**) Enantiómeros de R34:

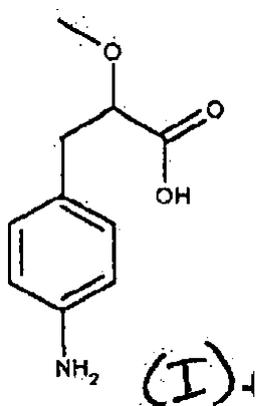
45 Acido (+) 2-S-metoxi-3'(4'-aminofenil) propiónico "34-E1" o "E-1".

Ácido (-) 2-R-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico "34-E2" o "E-2".

Las mezclas racémicas de los compuestos también pueden ser para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento. Ejemplos de mezclas racémicas incluyen ácido (\pm)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico "R34" (**forma racémica**).

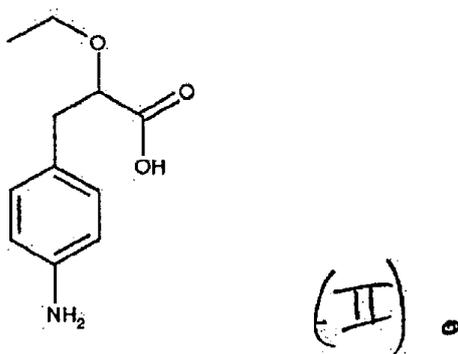
50 Las composiciones que contienen un exceso de un enantiómero con respecto al otro, para cualquiera de los compuestos estereoisómeros descritos en el presente documento, también pueden ser para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento.

De acuerdo con todavía otra forma de realización, los compuestos que pueden utilizarse incluyen el compuesto de la fórmula (I)

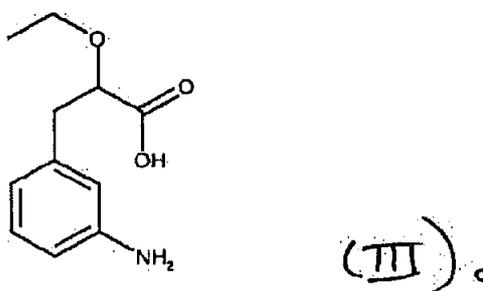


5 De acuerdo con la invención, un enantiómero del ácido (R,S)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico que tiene la fórmula (I), a saber, ácido (-)-2-R-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico "34-E2" o "E-2", que resulta especialmente eficaz en la inducción de la expresión de las defensinas intestinales (Figuras 8 y 9). De acuerdo con la presente invención algunos enantiómeros pueden proporcionar una expresión de CAMP superior que sus estereoisómeros. En otras formas de realización, algunas mezclas racémicas pueden proporcionar una expresión de CAMP superior que sus estereoisómeros individuales.

10 De acuerdo con todavía otra forma de realización, los compuestos que pueden utilizarse incluyen el compuesto de la fórmula (II)



De acuerdo con todavía otra forma de realización, los compuestos que pueden utilizarse incluyen el compuesto de la fórmula (III)



15 Preferentemente, los compuestos que pueden ser para su uso en los procedimientos de la invención pueden seleccionarse del grupo que comprende: ácido (±)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico "R34",

ácido (+) 2-S-metoxi-3-(3-aminofenil) propiónico "34-E1" o "E-1"

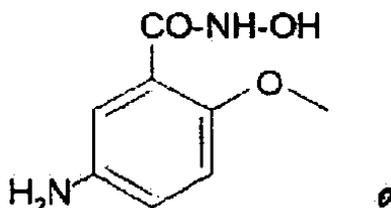
ácido (-) 2-R-metoxi-3-(3-aminofenil) propiónico "34-E2" o "E-2"

20 ácido (±)-2-etoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico

ácido (±)-2-etoxi-3-(3'-aminofenil) propiónico, cuyas fórmulas se han mostrado anteriormente.

En concreto, el compuesto de 5-amino-N-hidroxi-2-metoxibenzamida también puede ser para su uso en los procedimientos de la invención.

Un ejemplo comprende el uso del siguiente compuesto:



La presente invención también se refiere a compuestos para su uso en los procedimientos de tratamiento de seres humanos y/o de mamíferos (que incluyen roedores, animales de granja, animales domésticos, ratones, ratas, hámsters, conejos, perros, gatos, cerdos, ovejas, vacas, caballos).

De acuerdo con la presente invención se proporcionan compuestos para su uso en la intervención de la afección del tracto gastrointestinal diverticulitis aguda.

En un aspecto de la invención, se proporcionan compuestos para su uso en la prevención de la diverticulitis aguda en pacientes afectados por la diverticulosis de colon, la colitis indeterminada y la colitis infecciosa.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse ventajosamente en el campo médico para estimular los PPAR-gamma para que produzcan CAMPs. Los CAMPs incluyen defensina y/o catelicidina. Por lo tanto otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos como se ha definido anteriormente como principios activos en combinación con uno o más adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona compuestos para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de la diverticulitis aguda y la prevención de la diverticulitis aguda en pacientes afectados por la diverticulosis de colon, la colitis indeterminada y la colitis infecciosa.

La presente invención también se refiere a compuestos para su uso en procedimientos de tratamiento de seres humanos y/o de mamíferos (que incluyen roedores, animales de granja, animales domésticos, ratones, ratas, hámsters, conejos, perros, gatos, cerdos, ovejas, vacas, caballos).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: La rosiglitazona (compuesto de referencia) activa HD-5 en las células Caco-2, según se determina mediante análisis de PCR cuantitativa.

Figura 2: La 5-amino-N-hidroxi-2-metoxibenzamida activa HD-5 en las células Caco-2, según se determina mediante análisis de PCR cuantitativa.

Figura 3: El ácido 2-etoxi-3-(3'aminofenil) propiónico activa HD-5 en las células Caco-2, según se determina mediante análisis de PCR cuantitativa.

Figura 4: El ácido 2-etoxi-3-(4'aminofenil) propiónico activa HD-5 en las células Caco-2, según se determina mediante análisis de PCR cuantitativa.

Figura 5: La mesalazina (compuesto de referencia) activa HD-5 en las células Caco-2, según se determina mediante análisis de PCR cuantitativa.

Figura 6: Estructura de las defensinas y la catelicidina humanas

A. Secuencias humanas de la α -defensina entérica HD-5, la β -defensina hBD-2 y la catelicidina hCAP-18. Las flechas de color gris representan el punto de escisión para HD-5 y catelicidina. Se han notificado patrones de los tres enlaces disulfuro intramoleculares (S-S) de las α y β -defensinas, tanto en las estructuras esquemática como tridimensional (barras de color azul).

B. Se presenta una solución tridimensional (h-BD2 y catelicidina) o estructura cristalina (HD-5) de las defensinas y la catelicidina. Los números de registro de la base de datos de proteínas utilizados para la ilustración son los siguientes: 1ZMP para HD-5, 1E4Q para h-BD2 y 2FCG para LL-37 (fragmento C-terminal de hCAP-18). Las vueltas beta se representan en color naranja y las hélices alfa en rojo. Se presenta la hidrofobicidad de las moléculas.

Figura 7: Un modelo fisiopatológico de la inflamación intestinal crónica. Una vez que los microbios y/o sus productos son detectados por los TLR y/o NODs (lado izquierdo de la figura), se sintetizan los CAMPs a través de la acción de NF- κ B y/u otros factores de transcripción (véase el texto principal). Después de su secreción y tratamiento extracelular, los CAMPs (i) promueven la tolerancia y el reclutamiento de células inflamatorias, (ii) impiden la invasión de patógenos microbianos y (iii) protegen contra el desarrollo de la inflamación intestinal crónica. La función y/o la síntesis anormal de péptidos antimicrobianos podría conducir a la activación aberrante del sistema inmunológico adaptativo y a la inflamación intestinal (lado derecho de la figura) por amenazas microbianas y/o una inmunidad innata alterada (es decir, mutaciones NOD2).

Figura 8: 5-ASA 1 (compuesto de referencia), rosiglitazona 2 (compuesto de referencia), R34 racémica y

enantiómero 34-E2 inducen la expresión de hBD1 (defensinas humanas-1) en las células Caco-2.

Figura 9: Efecto de R34 racémica y enantiómeros 34-E1 y 34-E2 sobre el nivel de PPAR-gamma y LL37 (defensina) en el nivel de ARNm en ratones sanos (n=5). La administración de 5-ASA (30 mM) (compuesto de referencia), R34 (1 mM), E1 y E2 (1 mM) mediante enema durante 10 días en ratones sanos indujo la expresión de defensinas y ARNm de PPAR γ en el colon.

Tabla 1. Funciones versátiles de las defensinas y de las catelicidinas. Las funciones de las α/β -defensinas y las catelicidinas se enumeran en la Tabla y se analizan en el texto principal.

Descripción detallada de la invención

Dado el papel negativo directo del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR-gamma) sobre la vía de señalización de Wnt/Tcf/beta-catenina, se examinó la activación de PPAR-gamma para investigar la biogénesis de las defensinas.

Datos experimentales

Los agonistas de PPAR-gamma sometidos a ensayo, la rosiglitazona (a 1 μ M durante 1, 3 ó 6 horas) y otros, activan HD-5 en las células Caco-2, según se determina mediante análisis de PCR cuantitativa (Figuras 1 a 5).

Procedimientos

Se trataron las líneas celulares epiteliales intestinales cultivadas, a saber, Caco-2 (de origen humano) y ICcl2 (de origen murino) con el inhibidor de GSK-3 LiCl (20 microM) o el inhibidor de la fosfatasa calcicolina (50 nM), seguido o no de estimulación con el agonista de PPAR-gamma tal como la rosiglitazona (1 microM) (compuesto de referencia).

Se investigaron la expresión de la defensina y de los genes diana conocidos de las vías de señalización de Wnt y de PPAR-gamma mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se midió la activación de GSK3, beta-catenina, NF-kappaB, ERK1/2, SAPK/JNK y p38 mediante inmunotransferencia específica.

Para investigar el papel antimicrobiano de PPAR-gamma, se midió la replicación intracelular de la enfermedad de Crohn asociada a *Escherichia coli* (LF82) tras estimulación o no con rosiglitazona en la línea celular de macrófagos RAW.

Resultados

La incubación con rosiglitazona y otros activadores de PPAR-gamma aumentó significativamente la expresión de las defensinas alfa- (HD-5 y HD-6) y beta- (Defb10) por parte de las células epiteliales intestinales. Se sinergizó tal expresión génica antimicrobiana después de la coestimulación mediante calcicolina que promueve la degradación de la beta-catenina. Por consiguiente, se observó la replicación intracelular reducida de LF82 a través de la activación de PPAR-gamma mediante la rosiglitazona.

Por el contrario, la expresión de un gen diana de Wnt/Tcf/beta-catenina, la ciclina-D1, y la estabilidad de la beta-catenina se redujo notablemente tras la estimulación tanto mediante calcicolina como rosiglitazona.

Por último, LiCl, un activador de la vía de señalización dependiente de Wnt/TCF/beta-catenina, bloqueó la expresión génica de la defensina inducida por rosiglitazona tras la coestimulación.

La incubación con sustancias de ensayo aumentó significativamente la expresión de las defensinas alfa- (HD-5 y HD-6) y beta- (Defb10) por parte de las células epiteliales intestinales. Por consiguiente, se observó la reducción de la replicación intracelular de LF82 a través de la activación de PPAR-gamma mediante rosiglitazona.

Conclusión

En su conjunto, los resultados indican que la activación de PPAR-gamma promueve la inducción de un programa génico antimicrobiano, regulando negativamente la formación del complejo Tcf/beta-catenina. Estos hallazgos destacan el potencial terapéutico de PPAR-gamma en la complementación de la deficiencia de defensinas en muchos trastornos gastrointestinales tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el síndrome de colon intestinal, la diverticulitis aguda y para la prevención de afecciones tales como la diverticulitis aguda en pacientes afectados por la diverticulosis de colon, la colitis indeterminada y la colitis infecciosa.

Además, estos hallazgos destacan el potencial terapéutico de los agonistas de PPAR-gamma en la complementación de la deficiencia de defensinas en otros trastornos de la mucosa, que incluyen pero no se limitan a aquellos tales como las infecciones y la inflamación ocular, la enfermedad periodontal, la rinitis alérgica y no alérgica, la vaginosis bacteriana y las infecciones y afecciones inflamatorias cutáneas tales como el impétigo, la erisipela, la dermatitis, la foliculitis, el acné vulgar.

Estudios *in vitro* con el compuesto racémico 34 y los enantiómeros 34-E1 y 34-E2**Materiales**

Se adquirió 5-ASA 1 (compuesto de referencia) en Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, Francia). Se sintetizó rosiglitazona 2 (compuesto de referencia) en el laboratorio de acuerdo con procedimientos estándar. El compuesto racémico 34 y los dos enantiómeros del compuesto, 34-E1 y 34-E2 fueron proporcionados por Giuliani SpA (Milán, Italia). Se resuspendieron los compuestos en medio DMEM (Gibco) y se ajustaron a pH=7, en caso necesario con NaOH 10N.

Regulación de la expresión de la defensina hBD1 en líneas celulares de células epiteliales de colon

Se cultivó de forma rutinaria la línea celular del carcinoma de colon Caco-2 (ATCC HTB-39) en DMEM complementado respectivamente con un 10% o un 20% de FCS inactivado por calor, y antibióticos. Se cultivaron las células en monocapas, se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% y a una humedad relativa del 95%.

Se estimularon las células mediante 5-ASA, R34, 34-E1 y 34-E2 durante 24 horas. Se aisló el ARN total de las células utilizando un kit Rneasy (Macherey Nagel, Hoerd, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN se realizó utilizando espectrofotometría. Después del tratamiento a 37°C durante 30 minutos con 20 a 50 unidades de DNasa I libre de RNasa (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE.UU.), se utilizaron cebadores oligo-dT (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, EE.UU.) para sintetizar ADNc monocatenario. Se cuantificó el ARNm utilizando un equipo SYBR Green Master Mix (Applera, Courtaboeuf, Francia) con oligonucleótidos específicos humanos para hBD1 (S:5'-ATACTTCAAAAAGCAATTTTCCTTTAT-3'; AS:5'-TTgTCTGAGATGGCCTCAgTggTAAC-3') en un equipo Gene-Amp Abiprism 7000 (Applera, Courtaboeuf, Francia). En cada ensayo, se incluyeron controles calibrados y sin molde. Se hizo migrar cada muestra por triplicado. Se analizó la intensidad del colorante SYBR green utilizando el software Abiprism 7000 SDS (Applera, Courtaboeuf, Francia). Se normalizaron todos los resultados con respecto al gen de mantenimiento sano de la β -actina humana (S:5'-TCACCCACACTgTgCCCATCTACg-3'; AS:5'-CAgCggAACCGCTCATTgCCAATg-3').

Evaluación de la expresión de la β -defensina en ratones sanos

Se administraron 5-ASA (30 mM), R34 racémica y 34-E1 y 34-E2 (1 mM) mediante instilaciones intrarrectales durante 8 días. Post mórtem, se aisló el ARN total a partir de tejidos de colon de ratones completos utilizando el kit Rneasy (Macherey Nagel, Hoerd, Francia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó la cuantificación del ARN utilizando espectrofotometría. Después del tratamiento a 37°C durante 30 minutos con 20 a 50 unidades de DNasa I libre de RNasa (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE.UU.), se utilizaron cebadores oligo-dT (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, EE.UU.) para sintetizar ADNc monocatenario. Se cuantificaron los ARNm utilizando un equipo SYBR Green Master Mix (Applera, Courtaboeuf, Francia) con oligonucleótidos específicos de ratón para LL37 (S:5'-gCTgATTCTTTgACATCAgCTg-TAA-3' AS:5'-gCCAgCCgggAAATTTTCT-3') en un equipo Gene-Amp Abiprism 7000 (Applera, Courtaboeuf, Francia). En cada ensayo, se incluyeron controles calibrados y sin molde. Se hizo migrar cada muestra por triplicado. Se analizó la intensidad del colorante SYBR green utilizando el software Abiprism 7000 SDS (Applera, Courtaboeuf, Francia). Se normalizaron todos los resultados con respecto al gen de mantenimiento sano de la β -actina humana (S:5'-gggTCAgAAggATTCCTATg-3'; A:5' ggTCTCAAA- CATgATCTggg-3').

Estudio *in vivo***Regulación del dolor visceral en ratas**

40 Animales

En este estudio se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos (Charles River, L'Arbresle, Francia) con un peso de 175 a 200 gramos. Se mantuvieron las ratas en condiciones de laboratorio durante 1 semana antes del experimento. En cada jaula se alojaron 5 animales con alimento y agua disponibles a discreción. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la propuesta del Comité para la Investigación y la Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (Zimmermann M, Pain 1983; 16:109-110). Se tuvo gran cuidado, especialmente con respecto a las condiciones de alojamiento, para evitar o minimizar las molestias a los animales.

Evaluación de la sensibilidad de colon

Se evaluó la nocicepción en los animales midiendo la presión intracolónica necesaria para inducir una respuesta de comportamiento durante la distensión colorrectal (CRD), debida al inflado de un balón introducido en el colon. Esta respuesta se caracterizó por una elevación de la parte posterior del cuerpo del animal y la contracción abdominal claramente visible correspondiente a las severas contracciones (Al Chaer, gastro 2000; Tarrerias, pain 2002; Bourdu *et al*, 2005). En resumen, se anestesió a las ratas con anestesia volátil (isoflurano al 2%), se insertó el globo (preparado como se ha descrito anteriormente en Bourdu *et al*, 2005) por vía rectal de manera mínimamente invasiva a 7 cm del ano, y se pegó el catéter a la base de la cola. Después de 5 minutos, se colocó a las ratas en medio de una caja de plexiglas de 40x40 cm y se conectó el catéter a un barostato electrónico (G & J Electronics

Inc., Toronto, Canadá). Se aplicó presión creciente de forma continua hasta presentar comportamiento debido al dolor o alcanzar una presión límite de 80 mm de Hg.

Tratamiento de los animales

5 Se administraron diariamente los compuestos mediante instilaciones intrarrectales. Para cada enema, se colocó un catéter (catéter de Fogarty de 2 mm) en el colon a 7 cm del ano, y los animales recibieron 500 µl de compuesto resuspendido a una concentración óptima en medio DMEM y ajustado a pH 7 mediante NaOH 10N en caso necesario durante 21 días. Los animales control recibieron medio en solitario. Se evaluó el efecto del compuesto sobre el dolor visceral después de 2 y 3 semanas de tratamiento.

Estadísticas

10 Todas las comparaciones se analizaron utilizando el ensayo de permutación para dos muestras independientes. Se han calculado las estadísticas utilizando el software StatXact (Cytel Inc., Cambridge, MA, EE.UU.). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de p era <0,05.

Conclusiones

15 Los resultados *in vitro* e *in vivo* obtenidos demuestran claramente la inducción de la expresión de defensinas cuando se utilizan 5-ASA (compuesto de referencia) y R34, E1 y E2. En concreto y, sorprendentemente, E1 y E2 mostraron una mayor potencia en comparación con 5-ASA.

Referencias

1. Barton, G.M. and Medzhitov, R. (2003) (Toll-like receptor signaling pathways). *Science* 300 (5625), 1524-1525
- 20 2. Inohara, N. *et al.* (2005) NOD-LRR Proteins: (Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease). *Annu. Rev. Biochem.* 74, 355-383
3. Ogura, Y. *et al.* (2001) (A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease). *Nature* 411 (6837), 603-606
4. Hugot, J.P. *et al.* (2001) (Association of NOD2 leucine- rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease). *Nature* 411 (6837), 599-603
- 25 5. Chamaillard, M. *et al.* (2003) (Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (6), 3455-3460
6. Girardin, S.E. *et al.* (2003) (Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection). *J Biol Chem* 278 (11), 8869-8872
- 30 7. Inohara, N. *et al.* (2003) (Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease). *J Biol Chem* 278 (8), 5509-5512
8. Kobayashi, K.S. *et al.* (2005) (Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract). *Science* 307 (5710), 731-734
9. Chamaillard, M. *et al.* (2003) (An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid). *Nat Immunol* 4 (7), 702-707
- 35 10. Girardin, S.E. *et al.* (2003) (Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan). *Science* 300 (5625), 1584-1587
11. Boughan, P.K. *et al.* (2006) (Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection). *J Biol Chem* 281 (17), 11637-11648
- 40 12. Ganz, T. (2003) (Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity). *Nat Rev Immunol* 3 (9), 710-720
13. Selsted, M.E. and Ouellette, A.J. (2005) (Mammalian defensins in the antimicrobial immune response). *Nat Immunol* 6 (6), 551-557
14. Wehkamp, J. *et al.* (2005) (Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (50), 18129-18134
- 45 15. Ayabe, T. *et al.* (2000) (Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria). *Nat Immunol* 1 (2), 113-118
16. Ghosh, D. *et al.* (2002) (Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5). *Nat Immunol* 3 (6), 583-590
- 50 17. Wilson, C.L. *et al.* (1999) (Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense). *Science* 286 (5437), 113-117
18. Morrison, G. *et al.* (2002) (Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model). *Infect Immun* 70 (6), 3053-3060
19. Sorensen, O.E. *et al.* (2001) (Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3). *Blood* 97 (12), 3951-3959
- 55 20. Agerberth, B. *et al.* (1995) (FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1), 195-199
21. Chromek, M. *et al.* (2006) (The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection). *Nat Med* 12 (6), 636-641

22. Nizet, V. *et al.* (2001) (Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection). *Nature* 414 (6862), 454-457
23. Rosenberger, C.M. *et al.* (2004) (Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (8), 2422-2427
- 5 24. Erdman, S. *et al.* (2001) (Typhlocolitis in NF-kappa B-deficient mice). *J Immunol* 166 (3), 1443-1447
25. Rakoff-Nahoum, S. *et al.* (2004) (Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis). *Cell* 118 (2), 229-241
26. Vora, P. *et al.* (2004) (Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells). *J Immunol* 173 (9), 5398-5405
- 10 27. Voss, E. *et al.* (2006) (NOD2/CARD15 Mediates Induction of the Antimicrobial Peptide Human Betadefensin-2). *J Biol Chem* 281 (4), 2005-2011
28. Korinek, V. *et al.* (1998) (Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4). *Nat Genet* 19 (4), 379-383
29. Battle, E. *et al.* (2002) (Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB). *Cell* 111 (2), 251-263
- 15 30. van Es, J.H. *et al.* (2005) (Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts). *Nat Cell Biol* 7 (4), 381-386
31. Andreu, P. *et al.* (2005) (Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine). *Development* 132 (6), 1443-1451
- 20 32. Shroyer, N.F. *et al.* (2005) (Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation). *Genes Dev* 19 (20), 2412-2417
33. Amann, J.M. *et al.* (2005) (Mtgr1 is a transcriptional corepressor that is required for maintenance of the secretory cell lineage in the small intestine). *Mol Cell Biol* 25 (21), 9576-9585
34. Witthoft, T. *et al.* (2005) (Enhanced human betadefensin- 2 (hBD-2) expression by corticosteroids is independent of NF-kappaB in colonic epithelial cells (CaCo2)). *Dig Dis Sci* 50 (7), 1252-1259
- 25 35. Wang, T.T. *et al.* (2004) (Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression). *J Immunol* 173 (5), 2909-2912
36. Waters, W.R. *et al.* (2004) (Mycobacterium bovis infection of vitamin D-deficient NOS2-/-mice). *Microb Pathog* 36 (1), 11-17
- 30 37. Liu, P.T. *et al.* (2006) (Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response). *Science* 311 (5768), 1770-1773
38. Shah, S. *et al.* (2006) (The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation). *Mol Cell* 21 (6), 799-809
39. Peschel, A. and Sahl, H.G. (2006) (The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance). *Nat Rev Microbiol* 4 (7), 529-536
- 35 40. Islam, D. *et al.* (2001) (Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator). *Nat Med* 7 (2), 180-185
41. Salzman, N.H. *et al.* (2003) (Enteric salmonella infection inhibits Paneth cell antimicrobial peptide expression). *Infect Immun* 71 (3), 1109-1115
- 40 42. Schreiber, S. *et al.* (2005) (Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease). *Nat Rev Genet* 6 (5), 376-388
43. Li, J. *et al.* (2004) (Regulation of IL-8 and IL-1 {beta} expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations). *Hum Mol Genet* 13 (16), 1715-1725
44. van Heel, D.A. *et al.* (2005) (Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease). *Lancet* 365 (9473), 1794-1796
- 45 45. Netea, M.G. *et al.* (2004) (NOD2 mediates antiinflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease). *Eur J Immunol* 34 (7), 2052-2059
46. Lala, S. *et al.* (2003) (Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells). *Gastroenterology* 125 (1), 47-57
- 50 47. Ogura, Y. *et al.* (2003) (Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis). *Gut* 52 (11), 1591-1597
48. Ayabe, H. *et al.* (2005) (The Innate Intestinal Immunity By Paneth Cells and Their Alpha-Defensins in Patients With Crohn's Disease). *Gastroenterology* 128 (4), TI546
49. Wehkamp, J. *et al.* (2004) (NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression). *Gut* 53 (11), 1658-1664
- 55 50. Fellermann, K. *et al.* (2006) (A chromosome 8 gene cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn's disease of the colon). *Am J Hum Genet* in press
51. McGovern, D.P. *et al.* (2005) (Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease). *Hum Mol Genet* 14 (10), 1245-1250
- 60 52. Viala, J. *et al.* (2004) (Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island). *Nat Immunol* 5 (11), 1166-1174
53. Yang, D. *et al.* (2004) (Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense). *Annu Rev Immunol* 22, 181-215
54. Biragyn, A. *et al.* (2002) (Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2). *Science* 298 (5595), 1025-1029
- 65 55. Mookherjee, N. *et al.* (2006) (Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous

- human host defense peptide LL-37). *J Immunol* 176 (4), 2455-2464
56. Davidson, D.J. *et al.* (2004) (The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization). *J Immunol* 172 (2), 1146-1156
57. Koczulla, R. *et al.* (2003) (An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18). *J Clin Invest* 111 (11), 1665-1672
58. Stappenbeck, T.S. *et al.* (2002) (Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (24), 15451-15455
59. Darfeuille-Michaud, A. *et al.* (2004) (High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease). *Gastroenterology* 127 (2), 412-421
60. Chacon, O. *et al.* (2004) (Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*). *Annu Rev Microbiol* 58, 329-363
61. Maeda, S. *et al.* (2005) (Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing). *Science* 307 (5710), 734-738
62. Donnelly, J.P. *et al.* (2003) (Antimicrobial therapy to prevent or treat oral mucositis). *Lancet Infect Dis* 3 (7), 405-412
63. Fahlgren, A. *et al.* (2004) (beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis). *Clin Exp Immunol* 137 (2), 379-385
64. Wehkamp, J. *et al.* (2003) (Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis). *Inflamm Bowel Dis* 9 (4), 215-223
65. Furrie, E. *et al.* (2005) (Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial). *Gut* 54 (2), 242-249
66. Wehkamp, J. *et al.* (2004) (NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium). *Infect Immun* 72 (10), 5750-5758
67. Dinulos J.G. *et al.* (2003) (Keratinocyte Expression of Human β Defensin 2 following Bacterial Infection: Role in Cutaneous Host Defense). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol* (10) 161-166
68. Huang L.C. *et al.* (2007) (Ocular surface expression and in vitro activity of antimicrobial peptides). *Curr Eye Res.* 32 (7-8) 595 - 609
69. Vanhinsbergh L.J. *et al.* (2007) (Reduction of TLR2 gene expression in allergic and nonallergic rhinitis). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 99(6) 509 - 16
70. Chung W.O. *et al.* (2007) (Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease). *Curr Pharm Des.* 13(30) 3073 - 83
71. Kang H.J. *et al.* (2006) (Up-regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\{\gamma\}$ in Perennial Allergic Rhinitis). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 132 (11) 1196 - 1200

35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de entre ácido 2-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico, 5-amino-N-hidroxi-2-metoxibenzamida, ácido 2-etoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico o ácido 2-etoxi-3-(3'-aminofenil) propiónico para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la diverticulitis aguda.
- 5 2. Un compuesto de la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en el que el tratamiento y/o la prevención de la diverticulitis aguda se da en pacientes afectados por la diverticulosis de colon, la colitis indeterminada y la colitis infecciosa.
3. Un compuesto de la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que el compuesto es ácido 2-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico.
- 10 4. Un compuesto de la reivindicación 3 para su uso según la reivindicación 3, en el que el compuesto está presente en una mezcla racémica o está presente como el enantiómero S- o R-.
5. Un compuesto de la reivindicación 4 para su uso según la reivindicación 4 en el que el compuesto está presente en una composición que contiene un exceso de un enantiómero con respecto a otro.

Figura 1

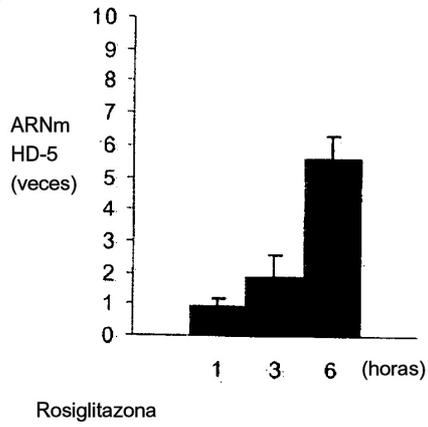


Figura 2

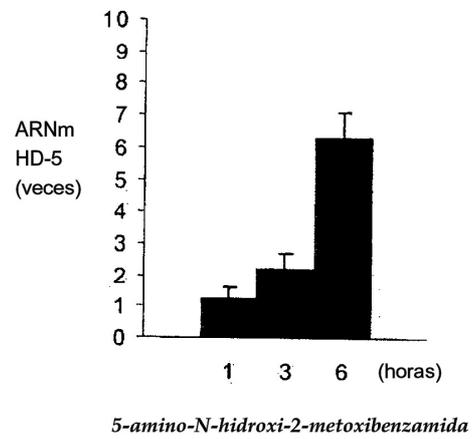


Figura 3

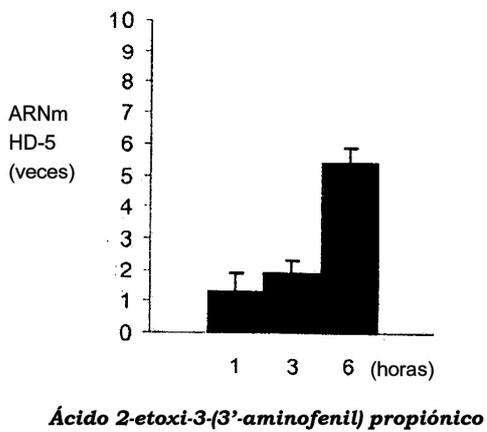


Figura 4

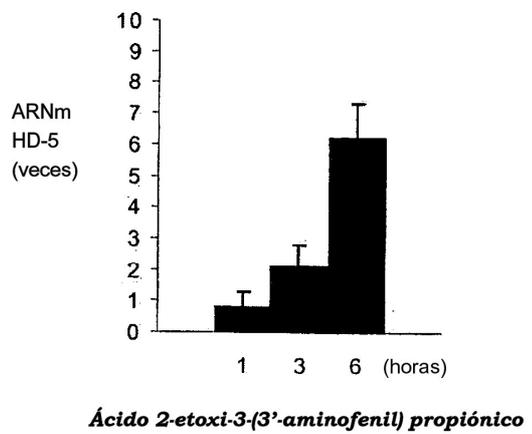


Figura 5

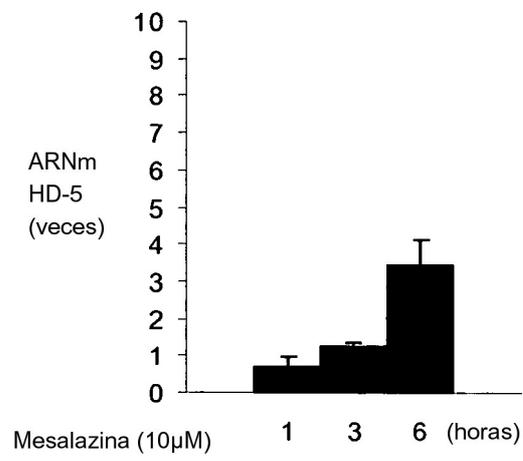


Figura 6

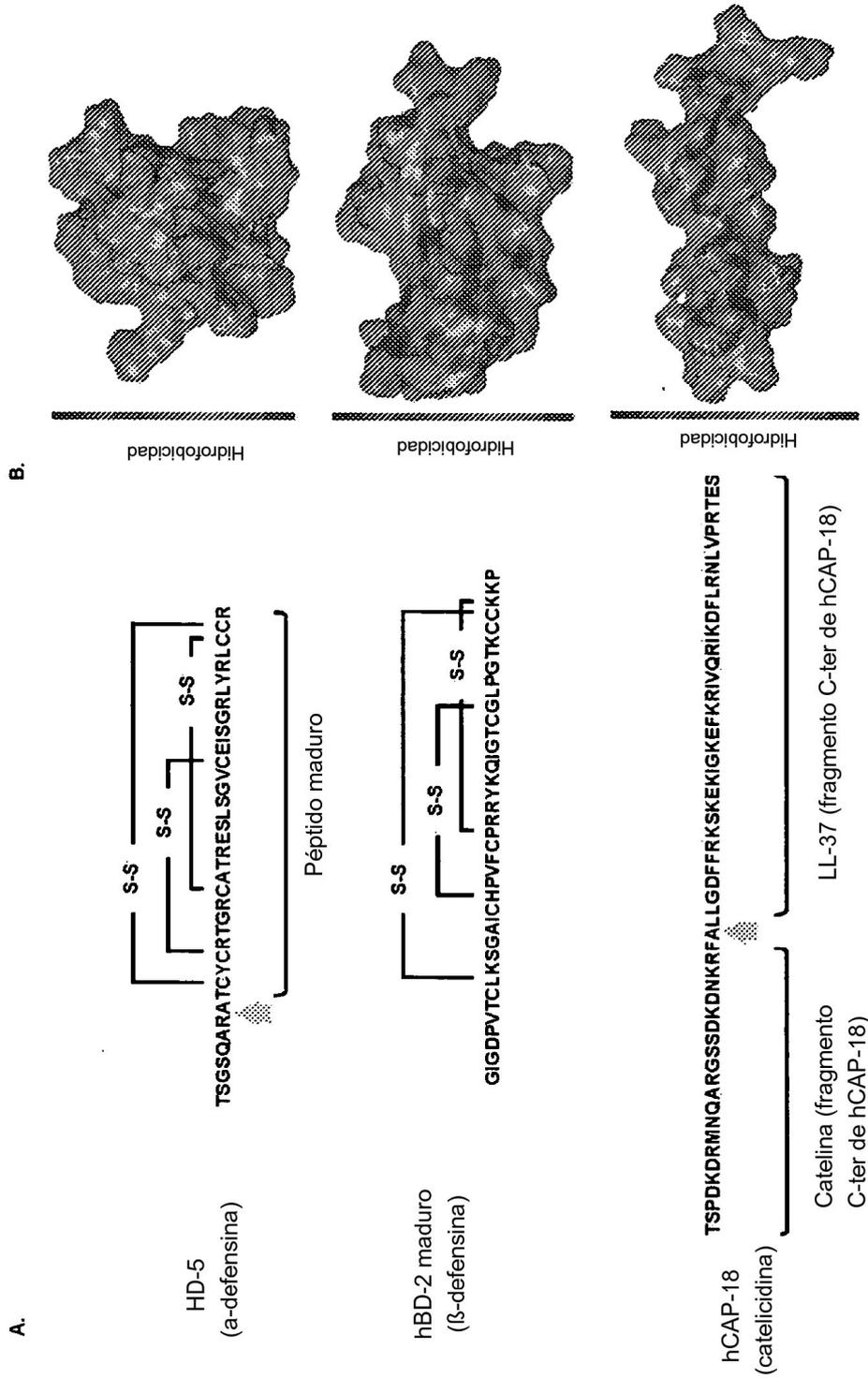


Figura 7

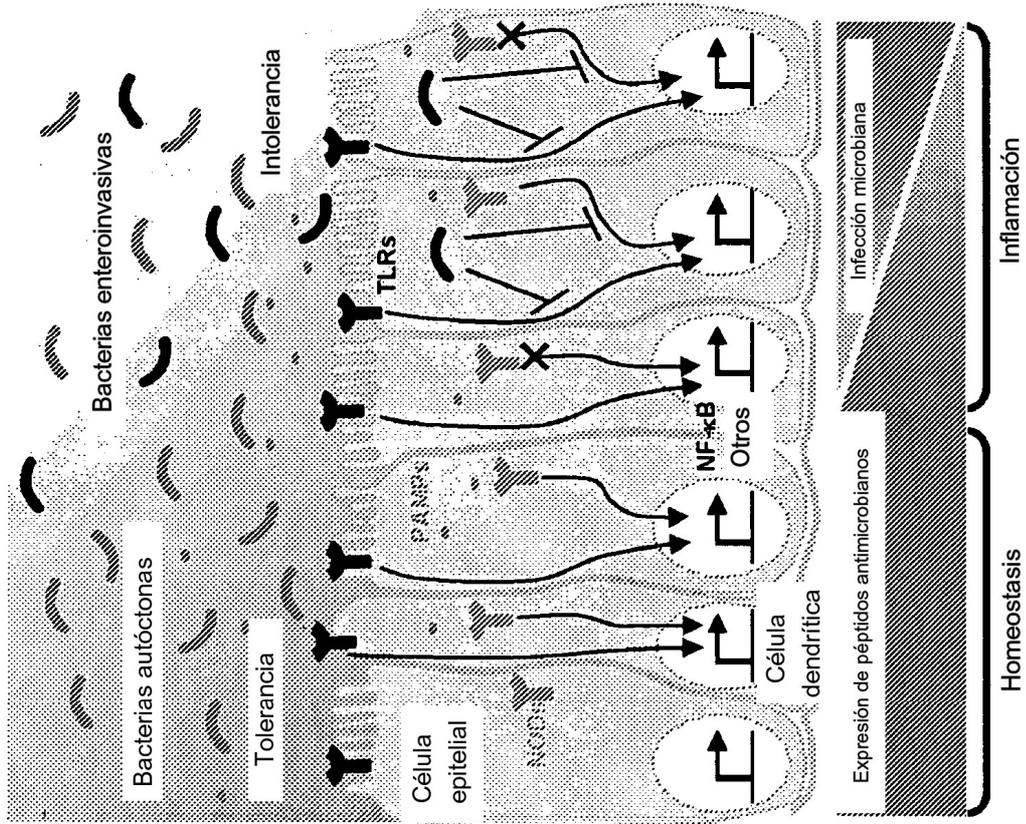


Figura 8

**5-ASA, Rosiglitazona, R34 y E2 inducen la expresión de hBD1
en las células Caco-2**

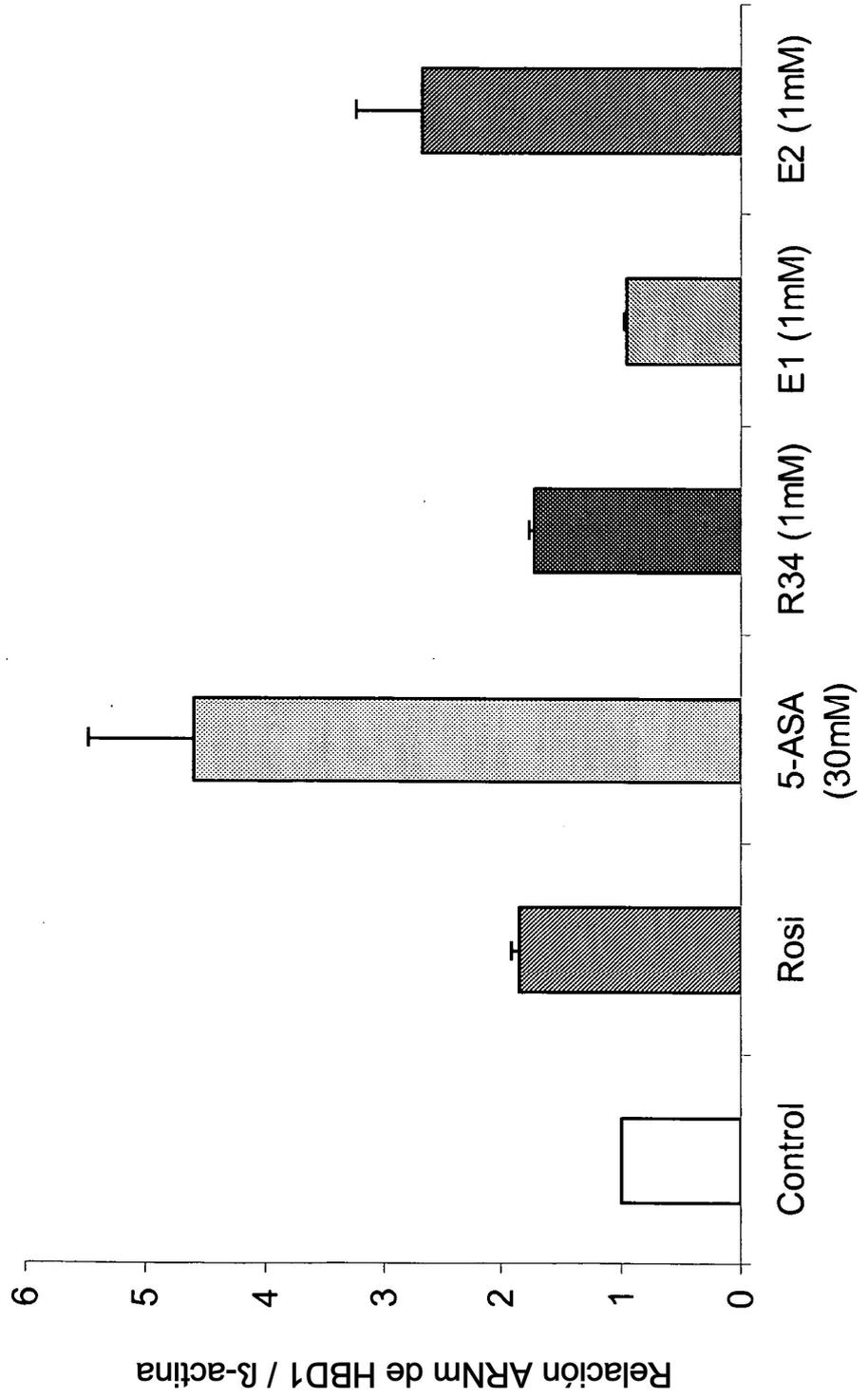
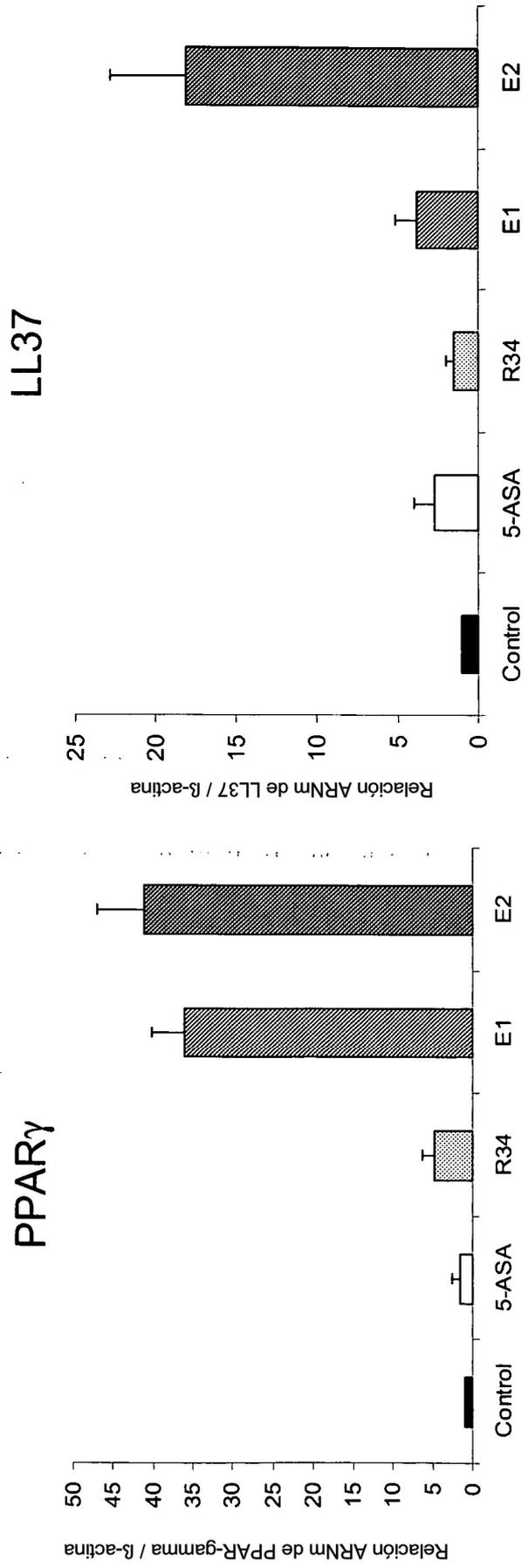


Figura 9

**Efecto de los nuevos compuestos sobre el nivel de PPAR-gamma y LL37 (defensina)
en el nivel de ARNm en ratones sanos (n=5)**

La administración de 5-ASA (30mM), R34 (1mM), E1 (1mM) o E2 (1mM) en enema durante 10 días en ratones sanos induce la expresión de defensina y ARNm de PPAR-gamma.



Función		α -defensinas entéricas	β -defensinas	Catelicidinas	Referencias
Innata	Antimicrobiana	✓	✓	✓	[12, 13, 21, 39, 53]
	Endotoxina			✓	[39, 53]
	Fagocito		✓	✓	[12, 13, 53]
	Producción de citocinas	✓	✓	✓	[54-56]
	Producción de quimiocinas	✓	✓	✓	[53, 54]
	Mastocito		✓	✓	[13, 53]
Adaptativa	Activación/maduración de células dendríticas		✓	✓	[54-56]
	Célula dendrítica		✓	✓	[12, 13, 53]
	Activación de linfocitos T		✓	✓	[56]
	Quimiotaxis de linfocitos T		✓	✓	[12, 13, 53]
	Producción de inmunoglobulinas		✓	✓	[53]
Otros	Angiogénica		✓	✓	[13, 57]
	Apoptótica		✓	✓	[53]
	Antitumoral/citotóxica		✓	✓**	[12, 53]
	Secreción de hidroelectrolitos por enterocitos	✓			[12, 53]

* Inhibición de neutrófilos

Inducción de células epiteliales

** Como máximo

Tabla 1