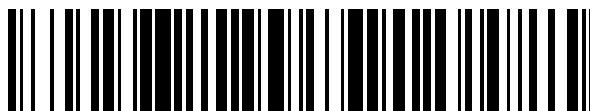


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 361**

51 Int. Cl.:
A61K 31/196 (2006.01)
A61K 31/606 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08863709 .5**
96 Fecha de presentación: **23.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2222291**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2010**

54 Título: **Compuestos para el tratamiento selectivo del componente inmuno-inflamatorio intestinal de la enfermedad celiaca**

30 Prioridad:
24.12.2007 IT MI20072429

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.07.2012

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

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

74 Agente/Representante:
Ruo, Alessandro

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).

ES 2 384 361 T3

DESCRIPCIÓN

Compuestos para el tratamiento selectivo del componente inmuno-inflamatorio intestinal de la enfermedad celíaca

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a compuestos para el tratamiento selectivo del componente inmuno-inflamatorio intestinal de la enfermedad celíaca.

[0002] La presente invención proviene del campo de fármacos para el tratamiento de enfermedades que tienen un componente inflamatorio y están localizadas en el nivel de la mucosa del primer tracto del intestino delgado, tal como la enfermedad celíaca.

Antecedentes de la invención

[0003] En particular, la presente invención se refiere a un grupo de moléculas adecuadas para reducir selectivamente la inflamación que se desarrolla en el nivel del duodeno y del yeyuno proximal en individuos que padecen de la enfermedad celíaca.

[0004] La enfermedad celíaca, también conocida como esprue celíaco, es una enfermedad autoinmunitaria bastante común que tiene componentes genético, inmunológico y medioambiental.

[0005] En la base de la enfermedad celíaca está una intolerancia permanente a gliadina, una fracción proteica del gluten contenido en el trigo, o a fracciones proteicas similares solubles en alcohol (prolaminas), contenidas en cebada, centeno, escanda, kamut y en otros cereales minoritarios.

[0006] En la enfermedad celíaca, la mucosa del intestino delgado se daña posteriormente a la exposición al antígeno (gliadina). En la enfermedad, las vellosidades intestinales tienden a aplanarse y las criptas hiperproliferan para compensar, los enterocitos toman la forma cúbica más que cilíndrica y el número de linfocitos aumenta en la luz intestinal.

[0007] La sintomatología que acompaña a la enfermedad es muy compleja y no se limita a la zona gastroentérica. De hecho, los síntomas típicos en un nivel local que comúnmente comprenden diarrea, dolor abdominal con posible hemorragia, intolerancia a la lactosa, van acompañados por una sintomatología extraintestinal que puede comprender estomatitis aftosa, dolor óseo, pérdida de peso progresiva con desnutrición. Además, en los casos de enfermedad celíaca no tratada o resistente existen riesgos de desarrollar carcinoma o linfoma gastrointestinal también.

[0008] Frecuentemente, además, el sujeto con enfermedad celíaca puede mostrar un déficit de hierro o ferritina, junto con posible carencia de vitaminas A, B12, D, E, K y ácido fólico, provocado por la absorción anómala intestinal. Además, la pérdida continua de grasas a través de la defecación puede provocar una carencia de calcio y desarrollar dos posibles complicaciones, una a un nivel renal con formación de cálculos de oxalato de calcio y la otra a un nivel óseo, con el desarrollo de osteomalacia, una patología que provoca debilitación ósea.

[0009] En un porcentaje de individuos, la enfermedad puede ser incluso total o parcialmente asintomática, es decir, no muestra claros síntomas o está en forma latente, lista para manifestarse tras acontecimientos particulares.

[0010] Puesto que se conoce el antígeno que desencadena la enfermedad, es posible obtener una remisión completa de los síntomas correlacionados simplemente evitando el consumo de alimentos que contienen gluten.

[0011] Puesto que el control de la enfermedad se basa en la adhesión a una dieta estricta, no es suficiente evitar el consumo de alimentos que como todo el mundo sabe contienen gluten, tal como la pasta, el pan, cebada, escanda, sino que también es esencial evitar tomar alimentos que puedan contenerlo en pequeñas cantidades, por ejemplo como agente espesante o estructurante, o como trazas perdidas en el procesamiento.

[0012] Por ejemplo, el paciente con enfermedad celíaca debe evitar tomar café expreso en el bar (éste puede estar contaminado con cebada), especias, azúcar glas, algunas preparaciones farmacéuticas y prestar atención también al pegamento hallado, por ejemplo, en sellos y sobres.

[0013] La dieta de pacientes con enfermedad celíaca puede variarse, en algunos casos, suficientemente y puede estar bien equilibrada comiendo sólo alimentos tal como arroz, maíz, trigo sarraceno, mijo, amaranto, carne, pescado, vegetales, fruta, queso y legumbres.

[0014] Según algunos estudios recientes existe un umbral crítico de 20 ppm de gluten por alimento, más allá del cual el contenido del alimento pasa a ser tóxico para el sujeto con enfermedad celíaca. El Código Alimentario

contempla dos tipos de umbrales para el alimento etiquetado como sin gluten. Uno primero se fija a 100 ppm y se refiere a alimento "desintoxicado" que entre los materiales de partida también contiene derivados de cereales tóxicos, tales como por ejemplo almidón de trigo, y un umbral de 20 ppm para el alimento sin ingredientes derivados de cereales tóxicos.

[0015] El cumplimiento estricto de la dieta y de algunas normas de comportamiento básicas previene la aparición de nuevos síntomas y generalmente provoca, de manera más o menos marcada según la respuesta individual, la remisión de los síntomas desarrollados. La dieta, sin embargo, debe observarse para toda la vida a pesar de la ausencia de síntomas o incluso la ausencia de anticuerpos en suero.

[0016] Sin embargo, además de la dieta no está disponible actualmente ninguna forma de tratamiento para sujetos con enfermedad celíaca, en particular no existen productos que puedan restringir los síntomas inflamatorios que acompañan la ingestión, incluso accidental, de alimentos que contienen gluten.

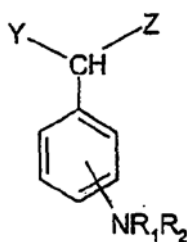
[0017] Los pocos procedimientos de intervención terapéutica intentados hasta este punto no condujeron al logro de resultados significativos.

[0018] Puesto que la enfermedad está estrictamente correlacionada con algunos genes que codifican para los antígenos de leucocitos humanos (HLA) DQ2 y DQ8, algunas formas de tratamientos tienen como objetivo inhibir el enlace de los péptidos de gluten a HLA DQ2/DQ8. En particular, algunos compuestos que bloquean HLA-DQ2 se han sometido a prueba pero sin lograr resultados significativos.

[0019] El uso de antagonistas de zonulina, una proteína implicada en la regulación de las uniones intercelulares del intestino delgado, la expresión de la cual aumenta durante la fase aguda de la enfermedad, se ha descrito en la bibliografía para el tratamiento del síndrome celíaco. Sin embargo, no está disponible actualmente en el mercado ningún fármaco basado en esta proteína.

[0020] Además, los fármacos antiinflamatorios para uso mucosal tópico no han encontrado aplicación hasta la fecha distinta del tratamiento de formas inflamatorias intestinales crónicas, localizadas a nivel del colon, el tracto distal del intestino. Por este motivo, las preparaciones disponibles en el mercado para tratar la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se venden como supositorios o disoluciones para uso rectal. Por el contrario, cuando estas preparaciones están pensadas para la administración oral, se formulan para la liberación retardada del principio activo de modo que pasen intactas a lo largo del tubo digestivo y permitan la liberación del principio activo al nivel del colon únicamente.

[0021] Estos fármacos no tienen efecto, por tanto, en la parte duodenal del intestino donde está localizado el foco inflamatorio en la enfermedad celíaca. El documento WO2007/010516 da a conocer el compuesto de la siguiente fórmula



en la que R1 y R2 pueden ser idénticos o diferentes y se seleccionan del grupo que comprende H o grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o juntos forman un anillo aromático o alifático; Y y Z, que pueden ser idénticos o diferentes, se seleccionan del grupo que comprende H, -OH, -COOH, -OR3, -CH(OR3)COOH, en el que R3 se selecciona de H, fenilo, bencilo, -CF3, o -CF2CF3, vinilo, alilo y un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Tales compuestos se han dado a conocer para su uso en la prevención y el tratamiento de tumores que expresan los receptores PPAR γ y los receptores EGF y para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. No se hace ninguna referencia a la enfermedad celíaca.

[0022] El documento WO2005/072113 da a conocer composiciones para las enfermedades intestinales inflamatorias u otras enfermedades inflamatorias que comprenden ácido 5-aminosalicílico o éster o sal farmacéuticamente aceptable del mismo; al menos un antioxidante; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El objeto de tal solicitud de patente difiere de la presente en que la estructura básica de fenilo está sustituida con -CH(Y)(Z) y no con -COOH.

[0023] El documento US2006/270635 da a conocer derivados de ácido 4- ó 5-aminosalicílico y una composición

farmacéutica que contiene estos derivados de ácido 4- ó 5-aminosalicílico como principios activos, útiles para el tratamiento de enfermedades intestinales como enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) y enfermedad del intestino irritable (IBS) y para la prevención / el tratamiento de cáncer de colon. Se hace referencia a la enfermedad celíaca sólo como una posible enfermedad entre otras diversas.

[0024] Por tanto, existe actualmente una necesidad clínica de tener sustancias dotadas de actividad farmacológica que deberían permitir la restricción de los síntomas basados en la immuno-inflamación que se desarrollan al nivel de la mucosa duodenal del intestino delgado en la enfermedad celíaca.

Sumario de la invención

[0025] Un objeto general de la presente invención consiste en proporcionar nuevas indicaciones adecuadas sobre el uso de compuestos dotados de una actividad farmacológica.

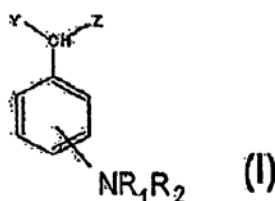
[0026] Uno de los principales objetos de la presente invención es, por tanto, proporcionar compuestos dotados de una acción selectiva sobre el componente local immuno-inflamatorio de la enfermedad celíaca.

[0027] En un aspecto, el solicitante ha encontrado que compuestos de fórmula (I) descritos a continuación en el presente documento, tienen afinidad específica y por ejemplo son agonistas para los receptores PPARgamma (PPAR γ) y proporcionan activación de los mismos. En particular, la presencia de un receptor de este tipo se ha detectado a nivel de las células epiteliales del duodeno en pacientes afectados por la enfermedad celíaca, en los que el efecto anti-inflamatorio de los compuestos de fórmula I se demostró mediante una reducción de la producción de citocinas inflamatorias.

[0028] Normalmente, los compuestos de fórmula (I) tienen estructura similar a ácido aminofenilpropiónico y actúan bloqueando las citocinas liberadas en la enfermedad celíaca.

[0029] En una realización, los compuestos de fórmula (I) son específicamente útiles en el tratamiento de la enfermedad celíaca resistente a la dieta, en fallos alimenticios y en la reducción del tiempo de remisión de la enfermedad celíaca.

[0030] Según un aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I)



en la que

R1 y R2, iguales o diferentes entre sí, se seleccionan del grupo que comprende -H o un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 carbonos, Y y Z, iguales o diferentes entre sí, se seleccionan del grupo que comprende -H, -OH, -COOH, -OR3, -CH (OR3)COOH, en el que R3 se selecciona de H, un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 carbonos, y ésteres o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en el tratamiento del componente immuno-inflamatorio de la enfermedad celíaca.

Descripción detallada de la invención

[0031] En un aspecto se describen ejemplos adicionales de los compuestos de fórmula (I) adecuados para los usos de la invención en la solicitud WO 2007/010516.

[0032] El solicitante ha observado que los compuestos de fórmula I tienen una actividad específica sobre el componente immuno-inflamatorio observado al nivel de la mucosa intestinal, en particular al nivel de la segunda parte duodenal, del sujeto con enfermedad celíaca.

[0033] El solicitante ha observado adicionalmente que la actividad local anti-inflamatoria ejercida por los compuestos de fórmula (I) está relacionada con una actividad inhibidora en la liberación de citocinas, sustancias que tienen un papel importante en procesos flogísticos y/o su conversión en crónicos.

[0034] En particular, se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos de fórmula I bloquean de manera sustancial, o en cualquier caso inhiben sustancial y significativamente las citocinas en sujetos con enfermedad celíaca únicamente, mientras que no tienen una actividad significativa en sujetos que padecen enfermedades inflamatorias que afectan un tracto gastrointestinal específico, distintas de la enfermedad celíaca.

[0035] En particular, los compuestos de fórmula I son adecuados para bloquear las denominadas citocinas Th1 (célula T cooperadora tipo 1) prologogénicas puesto que favorecen la captación de células inmunitarias e inflamatorias en el sitio de lesión.

[0036] Esta actividad específica puede atribuirse al hecho de que en la enfermedad celíaca la persistencia de una flogosis de tipo Th1 refleja la activación del sistema inmunitario contra el antígeno (fracción de gliadina de gluten) que no puede eliminarse y hacia el cual el sistema no puede desarrollar tolerancia.

[0037] Ciertas citocinas prologogénicas (Th1) implicadas en la inmunopatogénesis de la enfermedad celíaca comprenden (L-1, IL-2, IL-6 (interleucinas 1, 2, 6), IFN (interferón). Además, las citocinas asociadas a Th2 (célula T cooperadora tipo 2), así como las citocinas derivadas de macrófagos tales como TNF- α (factor de necrosis tumoral) están también implicadas en la enfermedad celíaca. En particular, el TNF- α tiene un importante papel en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas debido a su capacidad de fomentar la producción de citocinas prologogénicas, algunas de las cuales están dotadas de toxicidad considerable.

[0038] En particular, el efecto de los compuestos de fórmula (I) sobre la producción y liberación de citocinas de muestras de mucosa intestinal que padecen la enfermedad celíaca se ha verificado usando un sistema de cultivo orgánico. En particular, se ha observado una reducción eficaz de la flogosis, como se destaca mediante una reducción significativa de los valores de IFN- γ , IL-2, TNF- α usando uno o más de los compuestos de fórmula (I) en biopsias de mucosa intestinal sometidas a cultivo.

[0039] Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula I, tal como se describió anteriormente, para la fabricación de un fármaco para tratar la inflamación en sujetos con enfermedad celíaca resistente.

[0040] Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula I, tal como se describió anteriormente, para la fabricación de un fármaco para tratar una reacción inflamatoria en un sujeto con enfermedad celíaca en la dieta, desencadenada por un fallo alimenticio.

[0041] Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de un fármaco, normalmente en combinación con uno o más excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, para tratar el componente inmuno-inflamatorio en la enfermedad celíaca para acortar el tiempo de remisión clínica y/o histológica.

[0042] En la preparación de fármacos según uno o más de los aspectos de la invención también es posible usar, además de uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, también lubricantes, humectantes, agentes de suspensión, agentes dispersantes, conservantes normalmente usados dentro del alcance de preparaciones para uso farmacéutico.

[0043] En una realización, los compuestos de fórmula (I) pueden administrarse en diversas formas tales como comprimidos, cápsulas, formulaciones granuladas, dispersiones y otra formulación típica del campo farmacéutico.

[0044] Normalmente, los principios activos (I) pueden incorporarse en la formulación adecuada para la administración en una cantidad eficaz para lograr la respuesta antiinflamatoria en la enfermedad celíaca.

[0045] A modo de ejemplo, el principio activo puede incorporarse en la composición farmacéutica en una cantidad que oscila desde 50 mg hasta 2000 mg, preferentemente en el intervalo desde 200 mg hasta 600 mg, más preferentemente desde 250 mg hasta 500 mg.

[0046] Se ha mostrado que el uso de fármacos basados en uno o más compuestos de fórmula (I) determina una mejora de la conformidad del paciente y médico, disminuyendo el tiempo de remisión.

[0047] En otra realización, los compuestos de fórmula (I) encontraron otra aplicación terapéutica en el tratamiento de la enfermedad celíaca resistente y/o refractario.

[0048] Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente como una ilustración de la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de protección tal como aparece en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo de referencia 1

[0049] Se evaluó el efecto de mesalazina sobre el componente inflamatorio observado en la enfermedad celíaca.

[0050] Para este fin se seleccionaron 16 sujetos en la fase activa de la enfermedad y 6 pacientes en fase de remisión clínica en una dieta sin gluten.

[0051] Se tomaron 5 fragmentos de biopsias por cada sujeto de estudio mediante examen EGDS.

[0052] Se tomaron 5 fragmentos de biopsias por cada sujeto de estudio mediante examen EGDS.

[0053] Se colocó en cultivo cada fragmento de mucosa intestinal en un medio adecuado, tanto con como sin mesalazina (5ASA).

[0054] Entonces se observó lo siguiente en líquidos de cultivo:

el nivel de citocinas liberadas en los diferentes medios de cultivo
la cantidad de las mismas citocinas presentes en la mucosa homogeneizada de manera adecuada.

Materiales y procedimientos

Procedimiento

[0055] Se evaluaron 3 grupos de sujetos.

[0056] El primer grupo (atrófico) incluía 29 sujetos con pruebas en suero positivas con respecto a anticuerpos antiendomiso y anti-trans-glutaminasa, con un nuevo diagnóstico de enfermedad celíaca y dieta que contiene gluten.

[0057] El segundo grupo (remisión) incluía 17 sujetos con enfermedad celíaca en remisión clínica y dieta sin gluten durante al menos 6 meses.

[0058] El tercer grupo (sano) incluía sujetos que no padecían la enfermedad celíaca pero que padecían inflamación del tracto gastroentérico.

Ensayo de citocinas en líquidos de cultivo

Cultivos de órgano:

[0059] Los pacientes de estudio se sometieron a 5 biopsias de mucosa duodenal mediante examen EGDS: una para el ensayo histológico y las otras cuatro (cada una dividida en dos partes) se someten a cultivo respectivamente con un medio de cultivo sólo (medio C) y con péptido gliadina, y con medio de cultivo con gliadina en presencia de mesalazina (medio + 5ASA C).

[0060] Se lavaron las biopsias en solución salina durante dos minutos al menos tres veces. Se colocaron las biopsias en medios de cultivo que tenían un volumen igual a 1 ml:

MEDIO (RPM11860 + suero de ternero fetal + penicilina/estreptomicina)
MEDIO + digestión de péptidos tripticos de gliadina o 31-43 u otros cereales
MEDIO + mesalazina (5-ASA)
MEDIO + digestión de péptidos tripticos de gliadina +5-ASA (1,5-8,0 mg por ml de medio)

[0061] Se incuban las biopsias en una atmósfera de O₂ (95%) y CO₂ (5%) a una temperatura de 37°C durante un periodo que oscila desde 4 h hasta 72 h.

[0062] Se comparten tres cantidades diferentes de medio para el ensayo ELISA de citocinas Th1 y Th2 liberadas en medios de cultivo.

Ensayo de citocina a partir de homogeneizado

[0063] Tras un tiempo de incubación que oscila entre 4 h y 72 h, a una T de 37°C:

- el fragmento de biopsia se lava tres veces en solución salina durante dos minutos
- las biopsias se homogeneizan mediante disgregación mecánica o química

Se lleva a cabo la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se transfiere en un Eppendorf de 1,5 ml Se someten a ensayo las citocinas fijadas en el tejido mucosal mediante el ensayo Elisa.

Resultados

- 5 **[0064]** Los datos encontrados demuestran que la presencia de mesalazina en medios de cultivo bloquea las citocinas en sujetos con enfermedad celíaca sólo, determinando de ese modo selectivamente una reducción del componente inflamatorio en muestras tomadas de sujetos con enfermedad celíaca (tabla 1).

Tabla 1: Medio C / Medio + 5ASA C

Población	Citocina	Parámetro	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Mínimo	Mediana	Máximo	Prueba de los signos de Wilcoxon
Atrofia	IFN	Medio C	22	0,196	0,197	0,0420	0,0450	0,119	0,916	p= 0,08
		Medio + 5ASA C	22	0,136	0,165	0,0351	0,0330	0,0670	0,780	
		Diferencia	22	0,0601	0,250	0,0533	-0,549	0,0260	0,877	
	IL-2	Medio C	15	0,175	0,136	0,0351	0,0100	0,161	0,569	p= 0,03
		Medio + 5ASA C	15	0,119	0,0978	0,0252	0,0130	0,0910	0,355	
		Diferencia	15	0,0559	0,0557	0,0221	-0,060	0,0490	0,258	
Remisión	TNF	Medio C	21	0,477	0,585	0,128	0,0550	0,174	2,077	p= N.S.
		Medio + 5ASA C	21	0,472	0,651	0,142	0,0590	0,204	2,134	
		Diferencia	21	0,0048	0,447	0,0974	-1,398	0,0150	0,972	
	IFN	Medio C	15	0,240	0,154	0,0398	0,0610	0,209	0,534	p= N.S.
		Medio + 5ASA C	15	0,201	0,135	0,0348	0,0390	0,208	0,429	
		Diferencia	15	0,0383	0,123	0,0317	0,262	0,0500	0,209	
Control positivo	IL-2	Medio C	12	0,315	0,176	0,0509	0,0420	0,284	0,732	p= N.S.
		Medio + 5ASA C	12	0,309	0,223	0,0644	0,0500	0,253	0,737	
		Diferencia	12	0,0061	0,147	0,0425	0,314	5E-4	0,201	
	TNF	Medio C	15	0,948	0,796	0,206	0,0830	0,578	2,477	p= N.S.
		Medio + 5ASA C	15	0,894	0,689	0,178	0,249	0,571	2,301	
		Diferencia	15	0,0541	0,297	0,0767	0,460	0,0790	0,728	
	IFN	Medio C	7	0,145	0,0643	0,0243	0,102	0,112	0,281	p= N.S.
		Medio + 5ASA C	7	0,149	0,0480	0,0182	0,111	0,140	0,252	
		Diferencia	7	0,004	0,0398	0,0150	0,047	0,029	0,0510	
	IL-2	Medio C	7	0,532	0,171	0,0659	0,223	0,535	0,730	p= 0,07
		Medio + 5ASA C	7	0,356	0,140	0,0530	0,169	0,379	0,529	
		Diferencia	7	0,116	0,169	0,0638	-0,028	0,247	0,351	
TNF		Medio C	7	0,253	0,129	0,0486	0,105	0,220	0,489	p= N.S.
		Medio + 5ASA C	7	0,259	0,105	0,0397	0,127	0,229	0,434	
		Diferencia	7	0,005	0,201	0,0761	0,260	0,0040	0,362	

Tabla 2: PTC / PT+5ASA C

Población	Citocina	Parámetro	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Mínimo	Mediana	Máximo	Prueba de los signos de Wilcoxon
Atrófica		PTC	22	0,211	0,213	0,0454	0,0400	0,126	0,849	p= 0,05
		PT+5ASA C	22	0,145	0,195	0,0416	0,0270	0,0545	0,816	
		Diferencia	22	0,0657	0,178	0,0379	-0,244	0,0505	0,563	
	IFN	PTC	15	0,151	0,124	0,0320	0,0100	0,124	0,507	p= 0,012
		PT+5ASA C	15	0,124	0,137	0,0355	0,0070	0,0770	0,440	
		Diferencia	15	0,0270	0,0749	0,0193	-0,217	0,0410	0,0900	
Remisión	IL-2	PTC	21	0,600	0,788	0,172	0,0550	0,200	2,725	p< 0,0001
		PT+5ASA C	21	0,414	0,584	0,127	0,0700	0,120	2,163	
		Diferencia	21	0,187	0,272	0,0593	-0,052	0,0580	0,986	
	TNF	PTC	15	0,254	0,210	0,0543	0,0560	0,185	0,870	p= 0,022
		PT+5ASA C	15	0,153	0,120	0,0309	0,0370	0,0960	0,387	
		Diferencia	15	0,101	0,210	0,0541	-0,060	0,0210	0,791	
Control positivo	IFN	PTC	12	0,271	0,218	0,0630	0,0360	0,204	0,815	p= N. S.
		PT+5ASA C	12	0,234	0,126	0,0363	0,0650	0,194	0,473	
		Diferencia	12	0,0365	0,141	0,0425	-0,187	0,0260	0,342	
	IL-2	PTC	15	0,996	0,832	0,215	0,216	0,673	2,951	p= 0,005
		PT+5ASA C	15	0,305	0,708	0,183	0,151	0,545	2,294	
		Diferencia	15	0,191	0,221	0,0659	-0,188	0,221	0,657	
	TNF	PTC	7	0,141	0,0766	0,0289	0,0700	0,124	0,295	p= N. S.
		PT+5ASA C	7	0,116	0,0628	0,0237	0,0540	0,121	0,210	
		Diferencia	7	0,0247	0,0505	0,0191	-0,030	0,0090	0,105	
	IFN	PTC	7	0,501	0,243	0,0920	0,284	0,469	0,996	p= N. S.
		PT+5ASA C	7	0,521	0,259	0,0979	0,191	0,468	0,951	
		Diferencia	7	-0,020	0,123	0,0465	-0,184	0,0210	0,144	
	IL-2	PTC	7	0,313	0,133	0,0504	0,183	0,280	0,511	p= N. S.
		PT+5ASA C	7	0,291	0,127	0,0479	0,159	0,274	0,470	
		Diferencia	7	0,0226	0,102	0,0385	-0,190	0,0250	0,110	
	TNF	PTC	7	0,313	0,133	0,0504	0,183	0,280	0,511	p= N. S.
		PT+5ASA C	7	0,291	0,127	0,0479	0,159	0,274	0,470	
		Diferencia	7	0,0226	0,102	0,0385	-0,190	0,0250	0,110	

Tabla 3: Medio O / Medio + 5ASA O

Población	Citocina	Parámetro	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Mínimo	Mediana	Máximo	Prueba de los signos de Wilcoxon
Atrófica		Medio O	9	0,277	0,0561	0,0187	0,212	0,274	0,361	p= 0,003
		Medio + 5ASA	9	0,202	0,0585	0,0195	0,125	0,193	0,311	
		Diferencia	9	0,0951	0,0594	0,0198	0,0270	0,0560	0,227	
	IFN	Medio O	0							
		Medio + 5ASA	0							
		Diferencia	0							
	IL-2	Medio O	11	0,138	0,0546	0,0165	0,0710	0,115	0,233	p= N.S.
		Medio + 5ASA	11	0,123	0,0395	0,0119	0,0660	0,106	0,174	
		Diferencia	11	0,0154	0,0297	0,0089	-0,035	0,0100	0,0640	
	TNF	Medio O	4	0,252	0,0748	0,0374	0,183	0,251	0,324	
		Medio + 5ASA	4	0,133	0,0577	0,0289	0,0490	0,151	0,174	
		Diferencia	4	0,120	0,0505	0,0252	0,0440	0,142	0,150	
Remisión	IFN	Medio O	0							p= N.S.
		Medio + 5ASA	0							
		Diferencia	0							
	IL-2	Medio O	5	0,122	0,0331	0,0118	0,0800	0,133	0,159	
		Medio + 5ASA	5	0,122	0,0230	0,0103	0,0960	0,114	0,154	
		Diferencia	5	-0,00	0,0371	0,0169	-0,057	0,0050	0,0370	
Control positivo	TNF	Medio O	0							p= N.S.
		Medio + 5ASA	0							
		Diferencia	0							
	IFN	Medio O	0							
		Medio + 5ASA	0							
		Diferencia	0							
	IL-2	Medio O	0							
		Medio + 5ASA	0							
		Diferencia	0							
	TNF	Medio O	0							
		Medio + 5ASA	0							
		Diferencia	0							

Tabla 4: PTO / PT+5ASAO

Población	Citocina	Parámetro	N	Media	Desviación			Error	Prueba de los signos de Wilcoxon
					estándar	estándar	Mínimo		
Atrofia	IFN	PTO	9	0,223	0,0496	0,0165	0,151	0,223	0,287
		PT + 5ASAO	9	0,179	0,0589	0,0196	0,100	0,193	0,243
		Diferencia	9	0,0437	0,0409	0,0136	-0,009	0,0380	0,0980
	IL-2	PTO	0						p= 0,019
		PT + 5ASAO	0						
		Diferencia	0						
Remisión	TNF	PTO	11	0,156	0,0627	0,0189	0,0680	0,134	0,254
		PT + 5ASAO	11	0,101	0,0463	0,0140	0	0,0980	0,160
		Diferencia	11	0,0554	0,0735	0,0222	0,004	0,0270	0,254
	IFN	PTO	4	0,200	0,0931	0,0466	0,120	0,172	0,334
		PT + 5ASAO	4	0,177	0,0692	0,0346	0,120	0,161	0,264
		Diferencia	4	0,0230	0,0411	0,0206	-0,021	0,0215	0,0700
Control positivo	L-2	PTO	0						p= 0,002
		PT + 5ASAO	0						
		Diferencia	0						p= N.S.
	TNF	PTO	5	0,126	0,0276	0,0123	0,0640	0,127	0,158
		PT + 5ASAO	5	0,107	0,0310	0,0139	0,0630	0,110	0,1480
		Diferencia	5	0,0194	0,0089	0,0040	0,0100	0,0210	0,0310
Control negativo	IFN	PTO	0						p= N.S.
		PT + 5ASAO	0						
		Diferencia	0						
	11,-2	PTO	0						
		PT + 5ASAO	0						
		Diferencia	0						
Control negativo	TNF	PTO	0						
		PT + 5ASAO	0						
		Diferencia	0						
	11,-2	PTO	0						
		PT + 5ASAO	0						
		Diferencia	0						

[0065] La reducción del componente inflamatorio lograda permite el uso de mesalazina sola o como soporte terapéutico en todos los casos de resolución clínica lenta o dificultosa.

Ejemplo de referencia 2

Expresión génica de citocinas

[0066] Los fragmentos de biopsia duodenal tomados del paciente durante el procedimiento de gastroscopia se han colocado en cultivo a 37°C durante 48 h en ausencia y en presencia del fármaco 5-ASA. Tras el cultivo, los fragmentos se han homogeneizado en una disolución de fase única compuesta por fenol y guanidinio (reactivo de lisis Isol-RNA).

[0067] Se ha usado un homogeneizador IKA T10-Ultra Turrax para la homogeneización.

[0068] Se ha separado toda la materia insoluble de la disolución mediante centrifugación y se ha transferido el sobrenadante a un tubo de ensayo limpio, al cual se han añadido 200 µl de cloroformo por ml de lisis.

[0069] Después de una agitación mecánica corta, las muestras se han dejado sedimentar durante algunos minutos a temperatura ambiente y más tarde se han centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase inorgánica que contiene ARN se ha transferido a un tubo de ensayo limpio.

[0070] Se ha hecho precipitar ARN añadiendo 500 µl de alcohol isopropílico por ml de lisis. Se han incubado las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y entonces se han centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

[0071] Tras haber eliminado el sobrenadante, el sedimento de ARN se ha lavado con 1000 µl de etanol al 75% por ml de lisis, se ha agitado mecánicamente y se ha centrifugado a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se ha eliminado el etanol y se ha secado al aire el sedimento de ARN en una campana química.

[0072] Se ha resuspendido el ARN en una cantidad adecuada de agua libre de RNasa.

[0073] La concentración del ARN se ha determinado midiendo la absorción a 260 nm en el espectrómetro; también se ha estimado la razón A260/A280 para diferentes moldes de ARN.

RT-PCR

[0074] El ADNc se ha sintetizado comenzando desde cantidades diferentes de ARN extraído diluido en volúmenes adecuados de agua libre de RNasa. El ADNc de los genes afectados (citocinas) se ha amplificado mediante PCR con el uso de cebadores específicos.

[0075] Se ha usado el sistema Masterscript - RT-PCR (5 PRIMA) para la RT-PCR.

[0076] Con el fin de verificar la presencia y la cantidad de ARNm que codifica para las citocinas en las muestras de biopsia, se ha realizado una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 1X TBE.

[0077] Los resultados obtenidos se muestran en el diagrama de referencia de la figura 1.

Ejemplo de referencia 3

Presencia del receptor PPARgamma en células epiteliales duodenales de pacientes con enfermedad celíaca

[0078] El receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, que incluye receptores para estrógenos, glucocorticoides, hormonas tiroideas, vitamina D3 y ácido retinoico, así como también receptores que pueden unir diferentes productos del metabolismo de lípidos, tal como el PPAR y el receptor LXR.

[0079] Específicamente, la familia de PPAR incluye 3 subtipos (PPAR alfa, beta o delta y gamma) con distinta distribución en tejidos y diferente especificidad a ligandos.

[0080] Tanto PPAR gamma como alfa se han expresado en macrófagos humanos diferenciados, en los que regulan los genes implicados en la respuesta inflamatoria y modulan la diferenciación macrófaga.

[0081] Los diferentes agonistas PPARgamma inhiben la producción de citocinas inflamatorias en monocitos humanos y reducen la expresión génica para TNF-alfa, IL-6, IL-1b, iNOS, B gelatinoso, receptor A eliminador y COX-2 en macrófagos activados, lo que confirma el papel anti-inflamatorio de PPARgamma.

[0082] Uno de los objetos principales era detectar la presencia de un receptor de este tipo en células epiteliales duodenales de pacientes con enfermedad celíaca, en los que se ha confirmado previamente el efecto anti-inflamatorio de los compuestos de fórmula I, y específicamente de 5-ASA dado a conocer mediante una reducción de la producción de citocinas inflamatorias.

5 Inmunofluorescencia

[0083] Se ha tomado un fragmento de biopsia duodenal, mediante el procedimiento EGDS, tanto de pacientes con enfermedad celíaca en dieta que contiene gluten como de sujetos no afectados por la enfermedad celíaca (grupo control). Se han lavado los fragmentos de biopsia, se han orientado en OCT y se han almacenado a -80°C. Se han obtenido algunas secciones 5 µm de cada pieza de biopsia congelada (tomada en la etapa de EGDS tanto de pacientes con enfermedad celíaca como de sujetos no afectados por la enfermedad), tales secciones se han expuestos al anticuerpo primario de PPARgamma durante la noche (tras tratamientos adecuados de fijación y eliminación de especificidad).

[0084] Tras haberse lavado en PBS, las muestras se incubaron durante aproximadamente una hora con el anticuerpo secundario fluorescente ALEXA 488. En el caso de unión del anticuerpo primario al receptor PPARgamma, si está presente, se forma un complejo de anticuerpo primario/secundario que puede revelarse como fluorescencia en la sección que puede observarse mediante microscopio.

[0085] La presencia del receptor PPARgamma, revelada mediante un microscopio de fluorescencia, es evidente a partir de las figuras 2 y 3 (diagnóstico por fotos).

[0086] En particular, en las imágenes de las figuras 2 y 3, la presencia del receptor se revela mediante la señal de fluorescencia detectable en la parte periférica de la sección. La fluorescencia demuestra la presencia del PPARgamma al nivel de enterocitos, células epiteliales intestinales en la superficie desviada hacia la luz intestinal.

[0087] Las biopsias de los pacientes no afectados por la enfermedad celíaca se han usado como control negativo: el resultado ha sido una ausencia de señal y por consiguiente de la ausencia de receptor en las secciones analizadas mediante microscopio. En particular, las figuras de referencia 4 y 5 (controles) muestran que no se ha detectado fluorescencia: ésta es la señal de la ausencia de receptor en el nivel de la misma parte intestinal, en el control, grupo sano.

[0088] De la misma manera se sometieron a prueba los compuestos detallados en el presente documento a continuación y se lograron resultados similares:

Ejemplo de referencia 4

[0089] Se monitorizó la expresión génica (ARNm) de las citocinas pro-inflamatorias IL-2, TFN-alfa y IFN-gamma, liberadas en la fase aguda de la enfermedad.

[0090] En particular, los diagramas ilustrados en las figuras de referencia 6 a 8 indican los valores de densidad óptica (IMAGEN J) extrapolados de diferentes bandas, obtenidas mediante ejecución electroforética con 1x gel de agarosa, en relación con los amplificadores de citocina objeto del estudio.

[0091] La expresión génica de las citocinas se ha evaluado mediante RT-PCR del ARN extraído mediante biopsias duodenales de los pacientes afectados por la enfermedad celíaca. Tales biopsias se han mantenido para su crecimiento a 37°C durante 48 h, tanto en un medio de cultivo que contiene una digestión triptica de gliadina (PT) y en un medio PT, al que se ha añadido el fármaco 5-ASA.

Resultados

[0092] Los tres diagramas muestran que, en los fragmentos de biopsias mantenidos en cultivo en presencia de fármaco, se reduce bien la expresión génica (ARNm) de las citocinas pro-inflamatorias IL-2, TFN-alfa y IFN-gamma, liberadas en la fase aguda de la enfermedad.

[0093] La reducción aumenta cuando el paciente se somete a un tratamiento más duradero y constante con el fármaco;

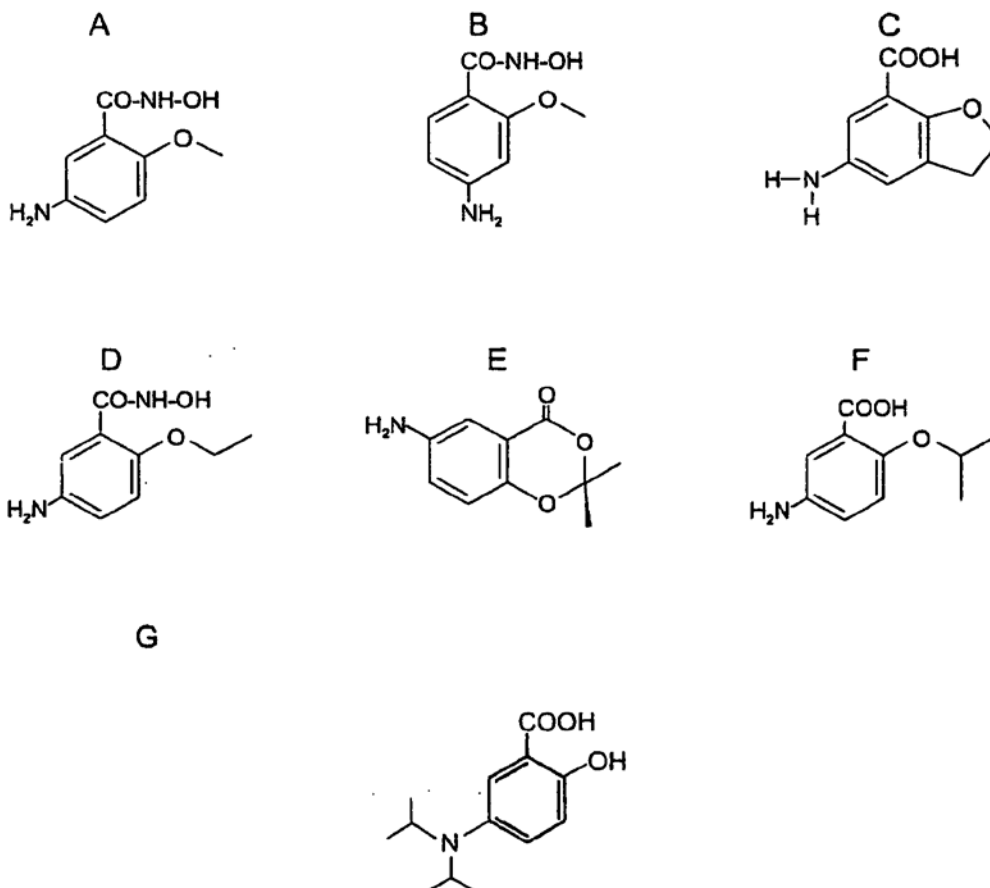
Ejemplo de referencia 5

Estudio sobre los efectos de compuestos de referencia sobre la activación/expresión de PPARγ y la regulación de la proliferación celular y apoptosis.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Compuestos A - G

5 **[0094]** Se adquirió 5-ASA en Sigma-Aldrich™ (St Quentin Fallavier, Francia). Se adquirió rosiglitazona en Spiro BIO™ (Massy, Francia). Los siguientes compuestos A a G, se sometieron a prueba:



10

Líneas celulares

15 **[0095]** Se hizo crecer de manera rutinaria la línea de células de colon HT-29 STD (ATCC HTB-38) en DMEM complementado con FCS al 10% inactivado por calor y antibióticos. Se hicieron crecer las células en monocapas, incubadas a 37°C en un 5% de CO₂ y un 95% de humedad relativa.

Transfección transitoria con PPAR_γ y estimulación de células

20 **[0096]** Se transfectaron células HT-29 STD de manera transitoria usando el reactivo de transfección Effectene™ (Qiagen™) según las instrucciones del fabricante. Para someter a prueba la activación de PPAR_γ se realizó la transfección con 500 ng de un constructo de promotor mínimo que contiene dos copias de PPRE obtenido del citocromo p450 4A (2XCYP). También se transfectó el plásmido de luciferasa de renilla (0,1 µg/pocillo) como control interno para monitorizar la eficacia de la transfección y para normalizar la actividad de luciferasa de luciérnaga. Las células transfectadas se dejaron durante 48 horas de incubación a 37°C. Se realizaron estimulaciones tras la incubación de células durante 3-6-9-12-15-18-24 horas con los compuestos A - G a una concentración de 30 mM y en comparación con los dos ligandos sintéticos PPAR_γ se usaron 5-ASA 30 mM y rosiglitazona 10-5 M como controles positivos. Se ajustó el pH de las disoluciones de fármaco hasta 7,4 con NaOH. Se prepararon extractos de células totales usando el tampón de lisis Passive (Promega™, Madison, Wis.). Se sometió a ensayo la actividad de la luciferasa en 20 µl del extracto usando el sistema de ensayo de luciferasa Dual de Promega™ según el protocolo del fabricante. Se sometieron a ensayo las transfecciones por triplicado en al menos tres experimentos separados. Se expresó la actividad de la luciferasa como veces de la actividad obtenida en células tratadas con las diferentes moléculas divididas por la actividad de la luciferasa de células no estimuladas.

Evaluación de PPAR γ y β -actina mediante análisis de inmunotransferencia tipo Western

[0097] Las proteínas totales se obtuvieron mediante la homogeneización de células en un tampón de extracción que consistía en PBS con un 2% de TritonTM, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 100 mM y un cóctel clásico de inhibidor de proteasa. Entonces se separaron las proteínas totales mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se electroinmunotransfirieron. Se incubaron membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) durante la noche con anticuerpo primario policlonal de conejo dirigido frente a PPAR γ (dilución 1/500, TEBU, Le Perray en Yveline, Francia). Se detectó β -actina usando un anticuerpo primario monoclonal de conejo diluido a 1/10.000 (Sigma). Se realizó la inmunodetección con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1/1000, DakoTM, Trappes, Francia) y quimioluminiscencia según el protocolo del fabricante (ECLTM, Amersham Pharmacia BiotechTM, Orsay, Francia). Se proporcionaron valores de densidad óptica de PPAR γ para cada condición en proporción a la cantidad del control interno β -actina en la misma muestra.

Análisis de proliferación celular mediante inmunotinción con Ki-67

[0098] Tras 24 h de cultivo, se trataron las células HT-29 STD durante 24 h con los compuestos A, B, C, D y F, a 30 mM. Se usaron 5-ASA (30 mM) y rosiglitazona (10-5M) como controles positivos. La molécula G no estaba incluida en este experimento debido a su baja solubilidad. Se ajustó el pH de las disoluciones de fármaco hasta 7,4 con NaOH. Se fijaron las células en PFA al 4%, se permeabilizaron en PBS que contenía un 0,1% de Triton X-100TM a 4°C y entonces se incubaron con suero normal de cabra y tampón de bloqueo (1% de BSA en PBS) para minimizar la adsorción no específica del anticuerpo.

[0099] Se evaluó la proliferación celular mediante una tinción con Ki-67 nuclear usando anticuerpo primario monoclonal de ratón dirigido frente a Ki-67 (dilución 1:50 durante la noche; ZYMEDTM, ClinisciencesTM, Montrouge, Francia). El anticuerpo primario se reveló con IgG de mono anti-ratón con Alexa 594 conjugado con fluorocromo de rojo acridina (dilución 1:100, Molecular ProbesTM, InvitrogenTM, Cergy Pontoise, Francia). Se tiñeron núcleos con solución de Hoescht 33342 (0,125 mg/ml) (Sigma-Aldrich-TM) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (LeicaTM, Bensheim, Alemania). Los controles negativos consistían en tinción con un suero de ratón no específico en lugar del anticuerpo específico. Se realizaron recuentos de al menos 500 células/muestra sistemáticamente a ciegas en un experimento. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ EEM del número de células teñidas.

Detección de apoptosis

[0100] Tras 24 h de cultivo se trataron las células HT-29 STD durante 24 h con los compuestos A, B, C, D, F, a una concentración de 30 mM. Se usaron 5-ASA (30 mM) y rosiglitazona (10-5M) como controles positivos. Las moléculas E y G no estaban incluidas en este experimento debido a su baja solubilidad. Se ajustó el pH de las disoluciones de fármaco hasta 7,4 con NaOH. Se identificaron las células que se experimentaron apoptosis mediante marcaje enzimático de cadenas de ADN usando un ensayo de marcaje de extremo libre por dUTP de transferasa terminal (ensayo TUNEL, Roche DiagnosticsTM, Meylan, Francia). Se realizaron recuentos de al menos 500 células/muestra sistemáticamente a ciegas en un experimento. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ EEM del número de células teñidas.

Resultados

[0101] Se ha observado que las moléculas C y F inducen la activación de PPAR γ . El compuesto D también induce PPAR γ , pero en un grado ligeramente menor. La activación de PPAR γ da como resultado una cascada de reacciones que conducen a una unión a elementos de la secuencia de ADN específicos denominados elementos de respuesta a los proliferadores de peroxisomas (PPRE).

[0102] Se sometió a investigación la actividad transcripcional de PPAR γ mediante transfecciones transitorias de células epiteliales con los plásmidos de PPRE y luciferasa de renilla. Las células se estimularon con las diferentes moléculas durante 24 horas. El análisis de la actividad de PPAR γ en células HT-29 transfectadas mostró que el compuesto C y F a una concentración de 30 mM aumentó la actividad del gen indicador en dos veces mostrando de ese modo una actividad similar a 5-ASA y rosiglitazona. Los compuestos A, B y G a una concentración de 30 mM ejercieron un rápido efecto citotóxico sobre las células epiteliales limitando la investigación de la activación de PPAR γ tras 6 horas.

[0103] En particular, las moléculas C, D y F inducen la expresión de PPAR γ . En general todos los compuestos A - G muestran la capacidad de inducir la expresión de PPAR γ a niveles de proteína en la línea celular HT-29. En particular se observó una inducción de dos veces promedio de niveles de proteína PPAR γ cuantificados mediante inmunotransferencia de tipo Western en células tratadas durante 24 horas con las moléculas C, D y F.

[0104] En particular, las moléculas C y F inhiben la proliferación de células epiteliales. Se evaluó en la línea celular HT-29 STD el papel de las moléculas en la regulación de la proliferación celular. Se evaluó la proliferación celular mediante regulación nuclear de proliferación celular. Se evaluó la proliferación celular mediante tinción con Ki-67 de

proteína nuclear expresada en células que proliferan, siendo necesaria la presencia de Ki-67 para mantener la proliferación celular. En comparación con células no tratadas, la incubación de células HT-29 durante 24 h con las moléculas C y F (30 mM) dieron como resultado una inhibición del 67% al 75% de la proliferación celular.

- 5 **[0105]** Se obtuvieron resultados similares con los dos controles positivos rosiglitazona (10-5M) y 5-ASA (30 mM) usados en sus concentraciones óptimas. La demostración del efecto anti-mitógeno potencial de las moléculas A, B y D estaba limitado por sus efectos citotóxicos rápidos sobre las células epiteliales a esta concentración.

- 10 **[0106]** El compuesto F también induce la apoptosis de células epiteliales a través de PPAR γ . De manera similar a rosiglitazona y 5-ASA, la molécula F mostró apoptosis en un 80% de células epiteliales identificadas mediante marcaje de cortes de cadena de ADN usando un marcaje de extremo libre por dUTP de transferasa terminal (TUNEL). De manera similar al experimento previo, las moléculas A, B y D inducían un efecto citotóxico rápido a 30 mM impidiendo el análisis de apoptosis celular.

15 Conclusión

- 20 **[0107]** Este ejemplo muestra específicamente la capacidad de los compuestos C y F para estimular la expresión y activación de PPAR γ y para regular la proliferación de células epiteliales y la apoptosis. Además, los efectos citotóxicos sobre las células epiteliales de los compuestos A, B, D (así como también E a G) a 30 mM pueden estar relacionados con la presencia en su estructura de un grupo ácido hidroxámico sumamente reactivo que se sabe que muestra una gran afinidad por muchas enzimas diversas.

Ejemplo de referencia 6

- 25 **[0108]** Se realizaron estudios de modelado molecular usando el software SYBYL versión 6.9.1 (Tripos Associates IncTM, St Louis, MO) ejecutándose en una estación de trabajo de Silicon GraphicsTM. Se construyó un modelo tridimensional de la forma zwitteriónica de 5-ASA a partir de una biblioteca de fragmentos convencional, y posteriormente se optimizó su geometría usando el campo de fuerza Tripos. Ya que la pKa de los compuestos se desconoce todavía, se usó la calculadora en línea SPARC para determinar las especies que se producían a pH fisiológico (7,4). Se construyeron modelos tridimensionales de los compuestos ionizados a partir de una biblioteca de fragmentos convencional, y posteriormente se optimizó su geometría usando el campo de fuerza Tripos incluyendo el término electrostático calculado a partir de cargas atómicas de Gasteiger y Hückel. El procedimiento de Powell disponible en el procedimiento Maximin2 se usó para la minimización de la energía hasta que el valor del gradiente era menor de 0,001 kcal/mol.Å. La estructura del dominio de unión a ligando de PPAR γ humano se obtuvo a partir de su estructura cristalina de rayos X compleja con tesaglitazar (AZ 242) disponible en el banco de datos de proteínas RCSB (1171) (4,5). La fijación flexible de los compuestos en el sitio activo de receptor se realizó usando el software GOLD. Los modelos de fijación más estables se seleccionaron según la conformación mejor puntuada predicha por las funciones de puntuación GoldScore y X-Score. Los complejos se minimizaron energéticamente usando el procedimiento Powell disponible en el procedimiento Maximin2 con el campo de fuerza Tripos y una constante dieléctrica de 4.0 hasta que el valor de gradiente alcanzó 0,01 kcal/mol.Å. La función de hibridación se usó definiendo el ligando una región caliente (10 Å).

Estudios de fijación

- 45 **[0109]** Los compuestos A a G se fijan de manera ajustada con el PPAR γ -LBD interaccionando por medio de puente de hidrógeno con His-323, His-449, Tyr-473 y Ser-289 considerados

- [0110]** Los compuestos A a G se fijan de manera ajustada con el PPAR γ -LBD interaccionando por medio de puente de hidrógeno con His-323, His-449, Tyr-473 y Ser-289 considerados como determinantes clave requeridos para el reconocimiento molecular y la activación de PPAR γ .

- 55 **[0111]** Se ha demostrado que los efectos anti-inflamatorios de los compuestos con estructura aminosalicílica estaban mediados a través de PPAR γ principalmente expresada por las células epiteliales. Los análisis de fijación revelaron que los compuestos mencionados, usados a una concentración de 30 mM, activan PPAR γ , inducen su expresión por las células epiteliales intestinales y ejercen una acción farmacológica sobre el componente inmuno-inflamatorio de la enfermedad celíaca.

Conclusión

- 60 **[0112]** Se ha demostrado previamente que los efectos anti-inflamatorios de compuestos de fórmula II con estructura amino-salicílica (como estructura 5-ASA) se mediaron a través del PPAR γ , expresado en las células epiteliales a nivel de duodeno. El desarrollo racional de los compuestos A a G basándose en el análisis de fijación reveló que dichos compuestos, específicamente C, F, usados a una concentración de 30 mM, activan PPAR γ e inducen su expresión por las células epiteliales intestinales. Los compuestos también inhiben la proliferación de células epiteliales e inducen apoptosis, dos importantes mecanismos atribuidos a la activación de PPAR γ . En

particular, en relación a las moléculas A, B, D, G se ha detectado que tienen efectos citotóxicos directos sobre las células epiteliales a una concentración de 30 mM, impidiendo el análisis de PPAR γ la activación y regulación y evaluación de la proliferación celular y la apoptosis.

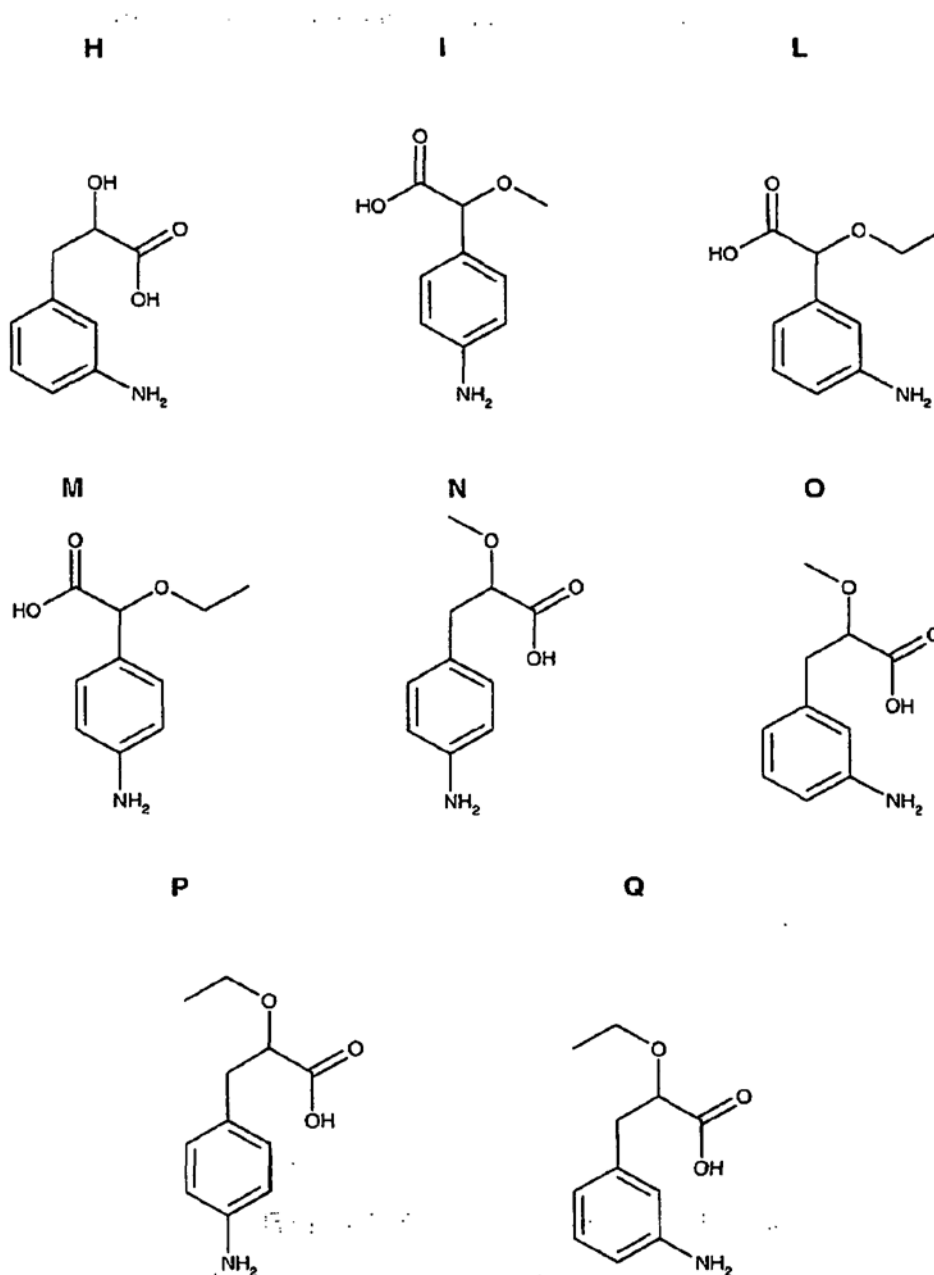
5 Ejemplo 7

[0113] Efectos de compuestos H - Q de fórmula (I) sobre la activación de PPAR γ

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Materiales

[0114] Se adquirió 5-ASA en Sigma-AldrichTM (St Quentin Fallavier, Francia). Se adquirió rosiglitazona en Spi BioTM (Massy, Francia). Se sometieron a prueba los siguientes compuestos H - Q, que se encuentran dentro de la fórmula (I):



Líneas celulares

[0115] Se hizo crecer de manera rutinaria la línea de células de carcinoma de colon HT-29 STD (ATCC HTB-38) en DMEM complementado con FCS al 10% inactivado por calor y antibióticos. Se hicieron crecer las células en monocapas, incubadas a 37°C en un 5% de CO₂ y un 95% de humedad relativa.

Transfección transitoria con PPAR_γ y estimulación de células

[0116] Se transfectaron células HT-29 STD de manera transitoria usando el reactivo de transfección EffecteneTM (QiagenTM) según las instrucciones del fabricante. Para someter a prueba la activación de PPAR_γ se realizó la transfección con 500 ng de un constructo de promotor mínimo que contiene dos copias de PPRE obtenido del citocromo p450 4A (2XCYP). También se transfectó el plásmido de luciferasa de renilla (0,1 µg/pocillo) como control interno para monitorizar la eficacia de la transfección y para normalizar la actividad de luciferasa de luciérnaga. Las células transfectadas se dejaron durante 24 horas de incubación a 37°C. Se realizaron estimulaciones tras la incubación de células durante 18 horas con los compuestos H-Q a una concentración de 1 mM y en comparación con los dos ligandos sintéticos PPAR_γ se usaron 5-ASA (30 mM) y rosiglitazona (10-5 M) como controles positivos. Se ajustó el pH de las disoluciones de fármaco hasta 7,4 con NaOH. Se prepararon extractos de células totales usando el tampón de lisis Passive (PromegaTM, Madison, Wis.). Se sometió a ensayo la actividad de la luciferasa en 20 µl del extracto usando el sistema de ensayo de luciferasa Dual de PromegaTM según el protocolo del fabricante. Se sometieron a ensayo las transfecciones por triplicado en al menos tres experimentos separados. Se expresó la actividad de la luciferasa como veces de la actividad obtenida en células tratadas con las diferentes moléculas dividiendo entre la actividad de la luciferasa de células no estimuladas.

RESULTADOS

[0117] La activación de PPAR_γ da como resultado una cascada de reacciones que conducen a una unión de elementos de secuencia de ADN específicos denominados elementos de respuesta a los proliferadores de peroxisomas (PPRE).

[0118] Se sometió a investigación la actividad transcripcional de PPAR_γ mediante transfecciones transitorias de células epiteliales con los plásmidos de PPRE y luciferasa de renilla. Para evaluar si los compuestos H - Q tenían eficacia así como también o incluso sobre 5-ASA para estimular la activación de PPAR_γ, se sometieron a prueba estas moléculas a una concentración de 1 mM. Se comparó el efecto de las nuevas moléculas a una concentración de 1 mM con 5-ASA y rosiglitazona, usados como controles positivos a concentraciones óptimas de 30 mM y 10-5 M respectivamente. Se estimularon las células con las diferentes moléculas durante 24 horas.

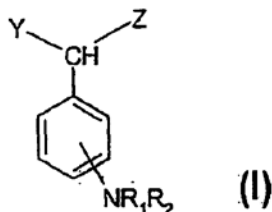
5-ASA para estimular la activación de PPAR_γ, se sometieron a prueba estas moléculas a una concentración de 1 mM. Se comparó el efecto de las nuevas moléculas a una concentración de 1 mM con 5-ASA y rosiglitazona, usados como controles positivos a concentraciones óptimas de 30 mM y 10-5 M respectivamente. Se estimularon las células con las diferentes moléculas durante 24 horas.

[0119] El análisis de la actividad de PPAR_γ en células HT-29 transfectadas demostró que dichos compuestos 40 a 1 mM aumentaron la actividad del gen indicador en 4,8±0,71; 2,73±0,31; 2,64±0,46; 3,4±0,97 veces respectivamente, mostrando de ese modo una actividad similar o superior a 5-ASA a 30 mM (2,8±0,7) y rosiglitazona a 10-5 M (3,17±0,29).

[0120] Existen pruebas de la capacidad de las moléculas H - Q que se encuentran en compuestos de fórmula (I) de la invención, para aumentar la actividad de PPAR_γ en células HT-29 transfectadas, mostrando una actividad similar o incluso superior a 5-ASA a 30 mM y rosiglitazona a 10-5 M.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)

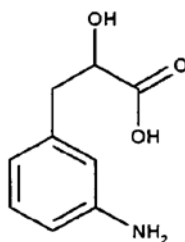


en la que

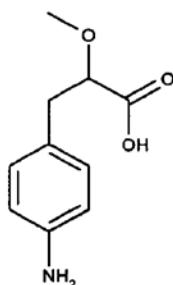
R1 y R2, iguales o diferentes entre sí, se seleccionan del grupo que comprende -H o un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 carbonos,
Y y Z, iguales o diferentes entre sí, se seleccionan del grupo que comprende -H, -OH, -COOH, -OR3, -CH(OR3)COOH,
en el que R3 se selecciona de H, un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 carbonos, y ésteres o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en el tratamiento del componente inmuno-inflamatorio de la enfermedad celíaca.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que comprende:

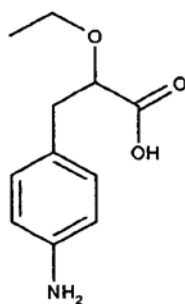
- ácido (±) 3-(3'-aminofenil)-2-hidroxi-propiónico de fórmula



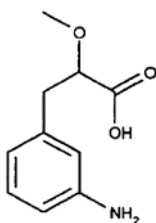
ácido 2-(4-aminofenil)-2-metoxiacético,
ácido 2-(3-aminofenil)-2-etoxiacético,
ácido 2-(4-aminofenil)-2-etoxiacético,
ácido 3-(4'-aminofenil)-2-metoxipropiónico de fórmula



ácido 3-(4'-aminofenil)-2-etoxipropiónico de fórmula

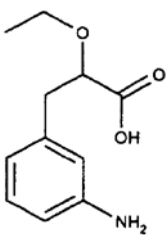


ácido 3-(3'-aminofenil)-2-metoxipropiónico de fórmula



5

ácido 3-(3'-aminofenil)-2-etoxipropiónico de fórmula



10

Fig.1 EJEMPLO DE REFERENCIA

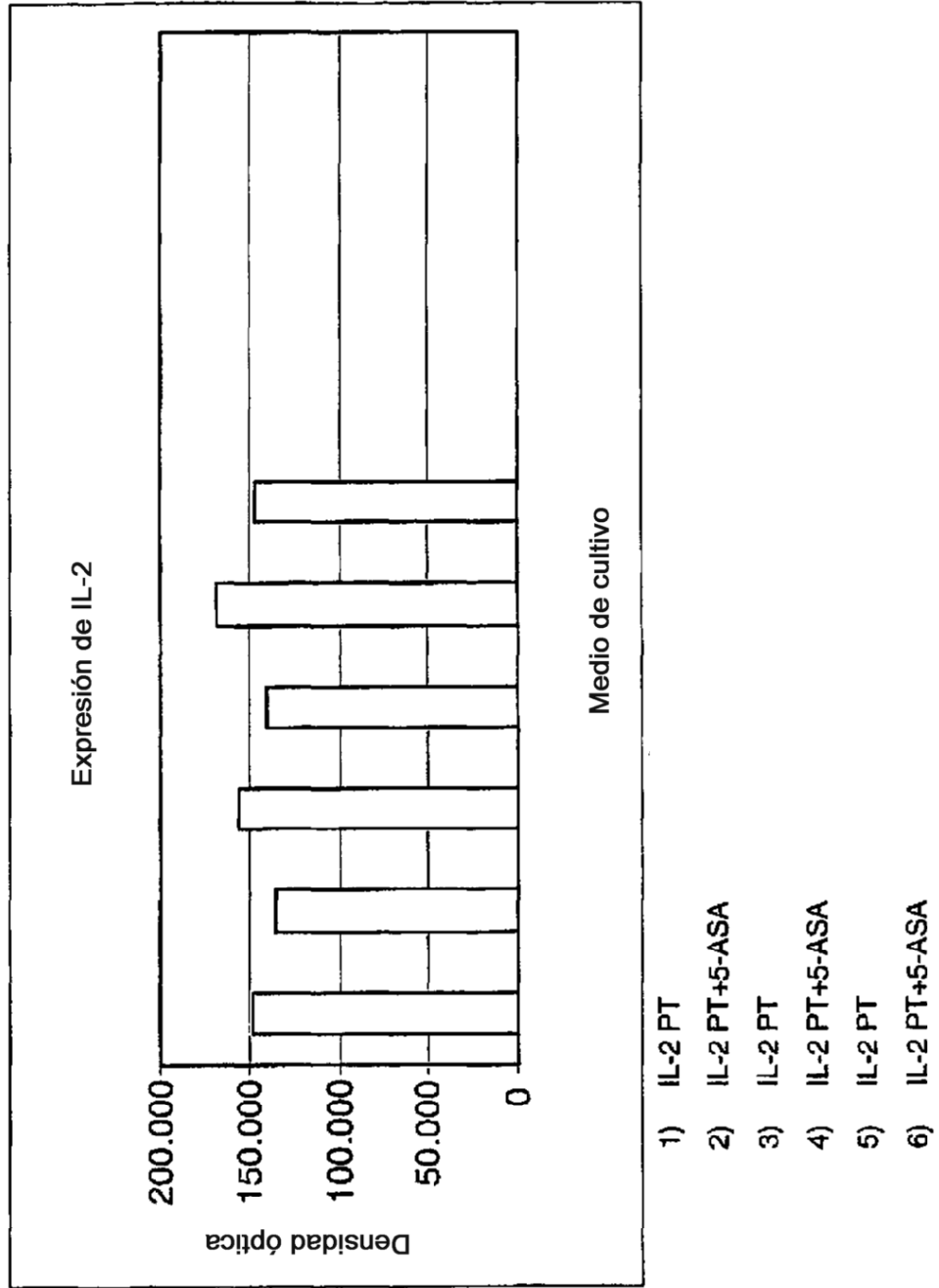


Fig.2 EJEMPLO DE REFERENCIA

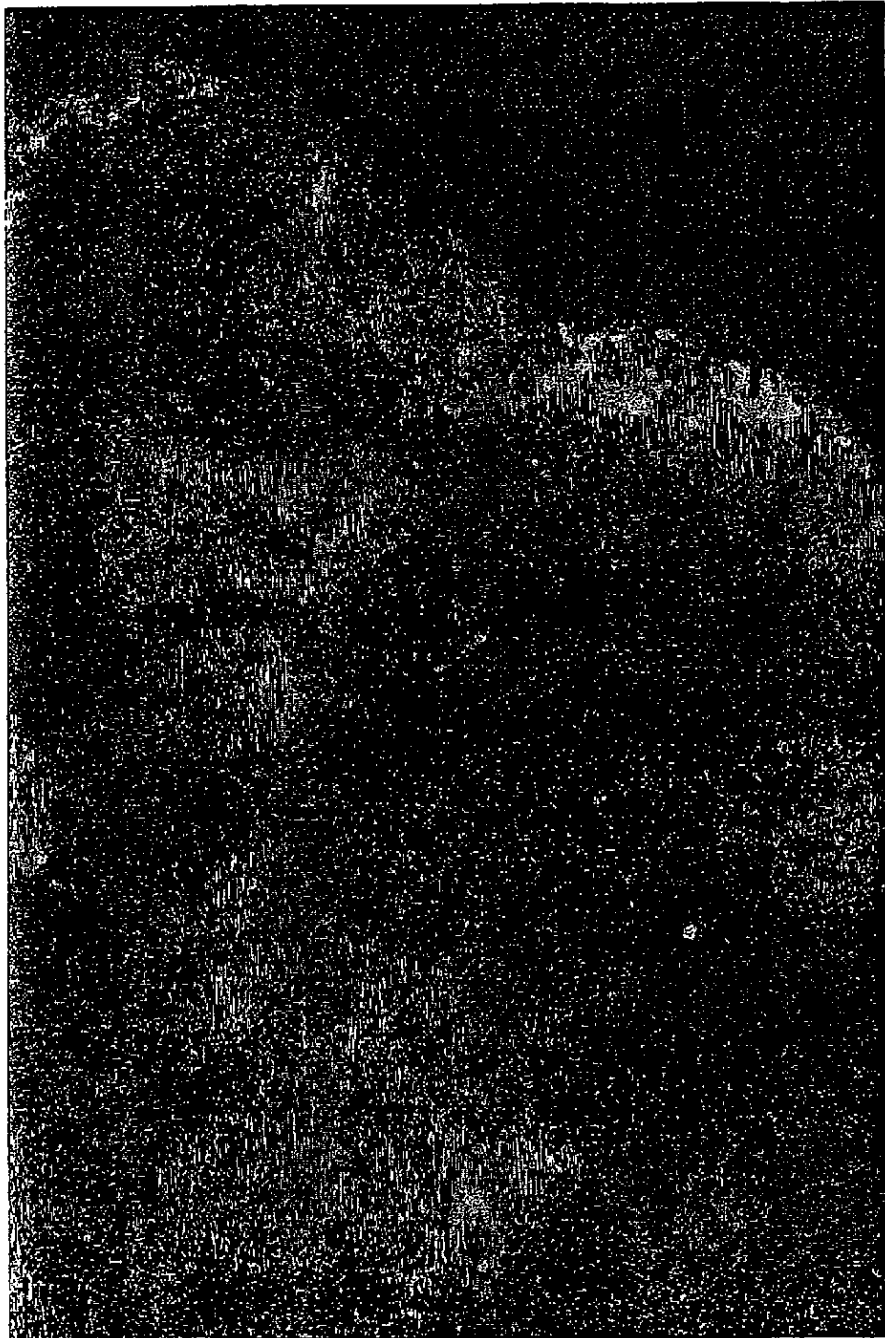


Fig.3 EJEMPLO DE REFERENCIA



Fig.4 EJEMPLO DE REFERENCIA

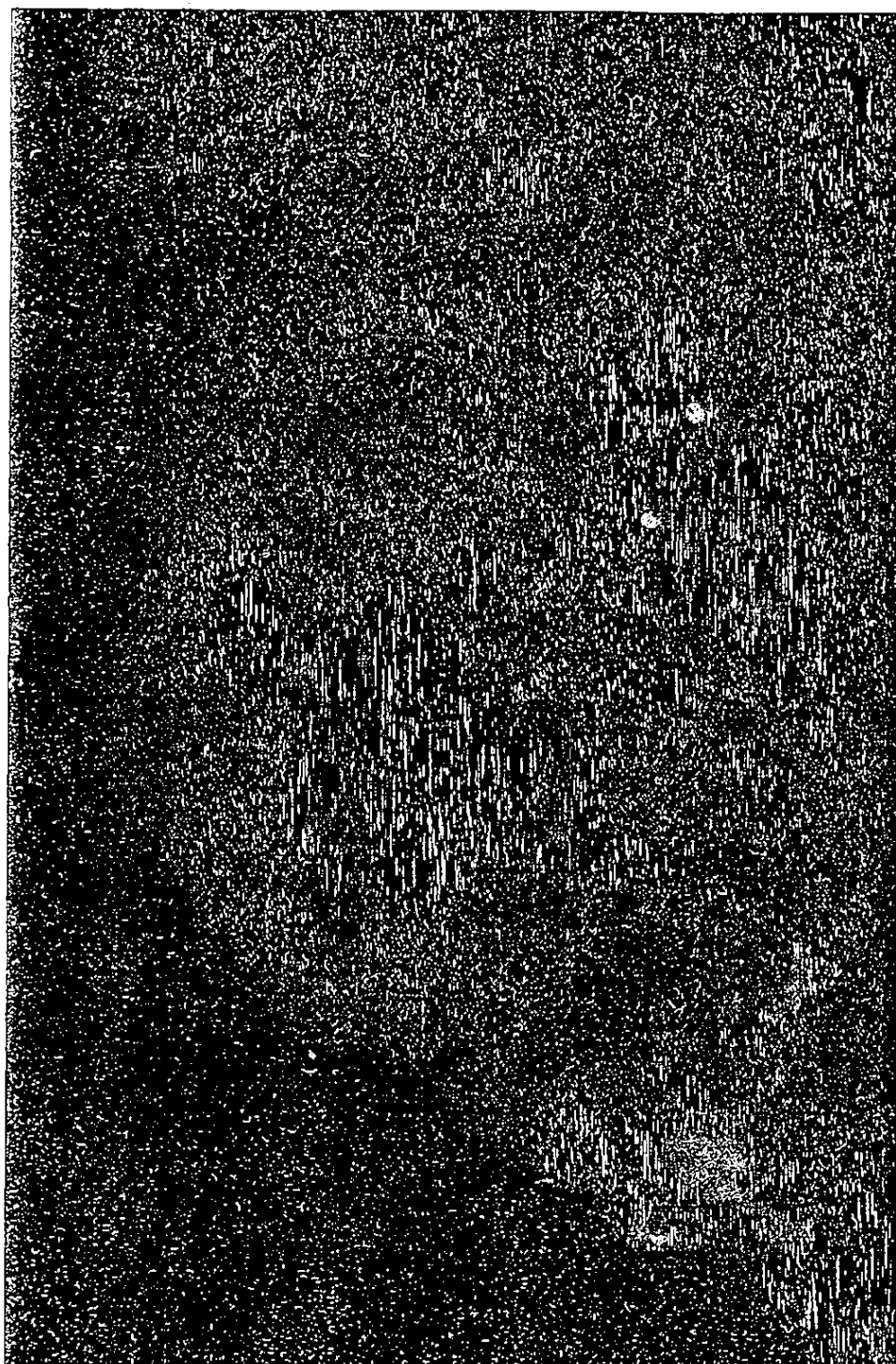


Fig.5 EJEMPLO DE REFERENCIA



Fig.6 EJEMPLOS DE REFERENCIA

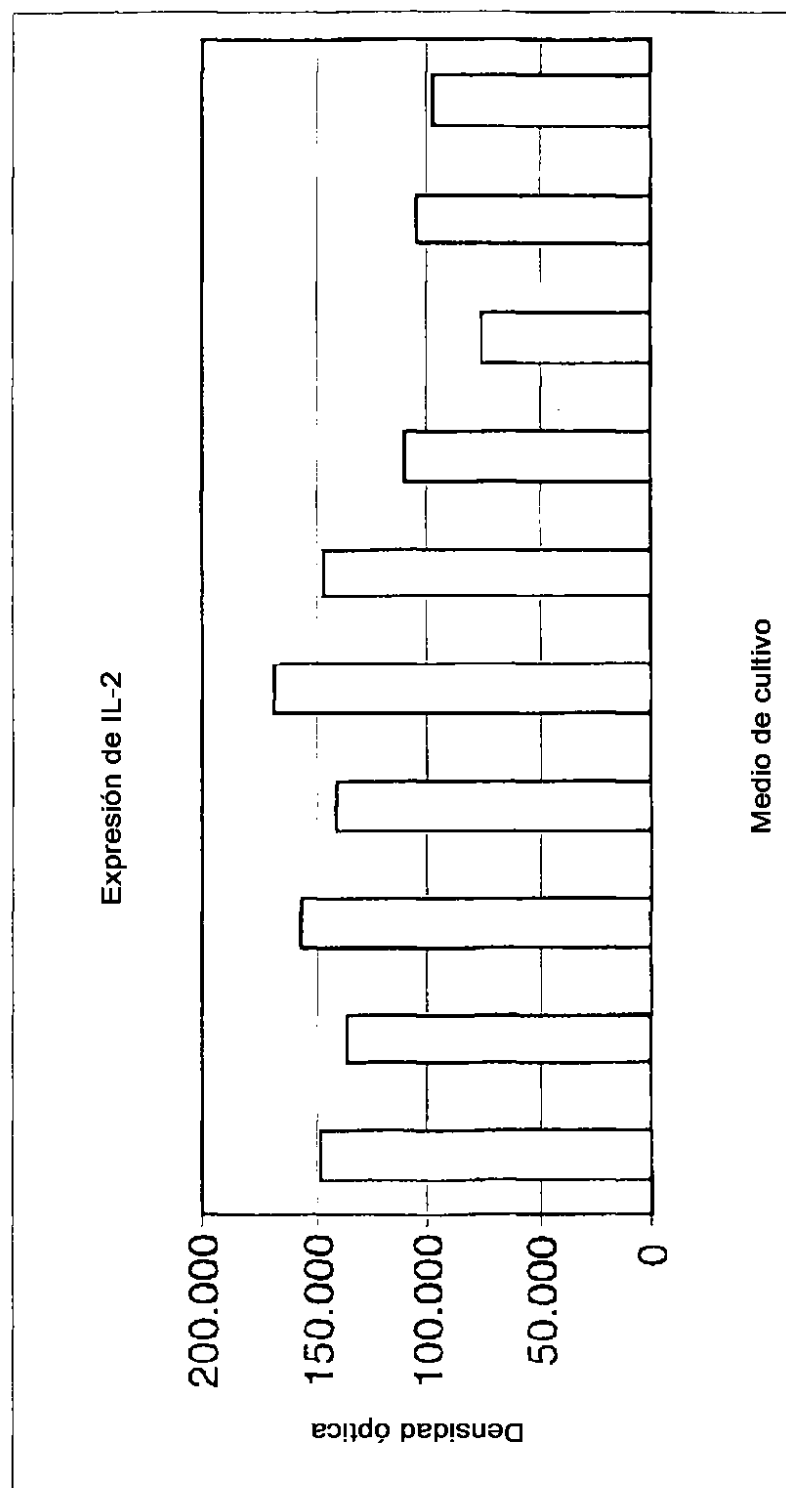


Fig.7 EJEMPLO DE REFERENCIA

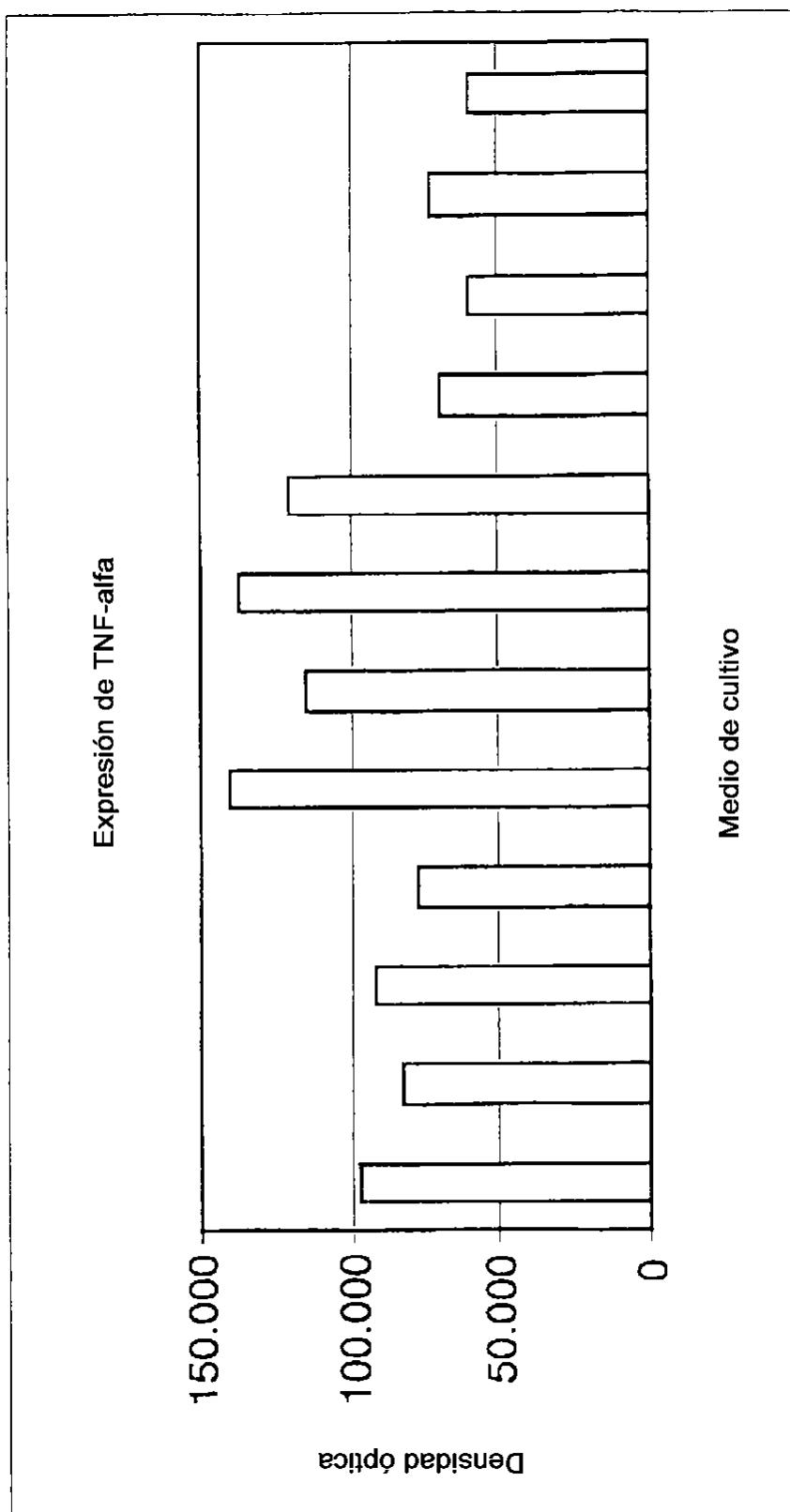


Fig.8 EJEMPLO DE REFERENCIA

