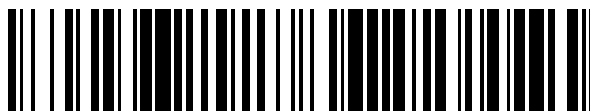


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 665**

51 Int. Cl.:

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/216 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2010** **E 10787363 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013** **EP 2504005**

54 Título: **Utilización de derivados de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona para tratar trastornos hepáticos**

30 Prioridad:

26.11.2009 EP 09306146

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2014

73 Titular/es:

GENFIT (100.0%)
Parc Eurasanté Lille Métropole 885, Avenue
Eugène Avinée
59120 Loos, FR

72 Inventor/es:

DARTEIL, RAPHAËL;
HANF, RÉMY;
HUM, DEAN y
DUFOUR, INGRID

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 441 665 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

Utilización de derivados de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona para tratar trastornos hepáticos

Campo técnico

5 La invención se refiere al uso de compuestos que tienen efectos hepatoprotectores en la preparación de composiciones farmacéuticas y en métodos para el tratamiento de trastornos hepáticos.

Antecedentes

10 De acuerdo con the Washington Manual of Medical Therapeutics (31^a ed.; 2004; Lippincott Williams & Wilkins), los trastornos del hígado se pueden clasificar en diferentes grupos de enfermedades, en particular enfermedades víricas, enfermedades del hígado relacionadas con fármacos y alcohol, enfermedades del hígado mediadas por el sistema inmunes, enfermedades metabólicas del hígado, enfermedades diversas, tales como la enfermedad de hígado graso no alcohólico y complicaciones de la insuficiencia hepática (tales como la insuficiencia hepática fulminante o carcinoma hepatocelular) y del trasplante de hígado.

15 En particular, la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) es un trastorno hepático común con características histológicas de la enfermedad del hígado graso inducida por el alcohol en las personas que consumen poco o nada de alcohol (Yeh M et al, 2007; Marchesini G et al, 2003). La EHGNA es debida a la retención anormal de lípidos dentro de las células (comúnmente definida como esteatosis), un evento más frecuente en el hígado ya que este órgano es el principal responsable del metabolismo de lípidos. La EHGNA tiene un espectro de formas histológicas que incluyen la esteatosis hepática, y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que se caracteriza por la inflamación del hígado, esteatosis, necrosis y fibrosis debidas a la desorganización de las células del hígado. Las afecciones asociadas con la EHGNA son variadas, e incluyen la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia, el síndrome metabólico, el tratamiento con fármacos hepatotóxicos, toxinas, agentes infecciosos, u otras causas exógenas.

20 Aunque la EHGNA típicamente sigue un curso clínico benigno, no progresivo, EHNA es una afección potencialmente grave, tanto como 25% de los pacientes pueden progresar a una fibrosis avanzada, cirrosis y experimentar complicaciones de hipertensión portal, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular, que hace obligatoria una evaluación temprana y correcta (Yeh M et al, 2007).

25 Los sistemas de formación de imágenes hepáticas son útiles para evaluar también la estructura del hígado y la presencia de esteatosis. Sin embargo, la biopsia hepática sigue siendo el modelo de referencia para la evaluación de la fibrosis del hígado, pero este método de análisis no se podía realizar para cada estudio individual debido a su invasividad. La evaluación no invasiva de la bioquímica y el metabolismo del hígado se utiliza a menudo para definir las enfermedades del hígado, tal como en la EHGNA y la EHNA (Gressner A et al, 2009; Vuppalanchi R y Chalasani N, 2009). Mediante el uso de plasma, se mide comúnmente el alto nivel de enzimas tales como alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (ASAT), fosfatasa alcalina (AP), y/o gamma glutamil transpeptidasa (GGT), así como la presencia de otras proteínas de origen hepático (incluyendo la haptoglobina, la bilirrubina total, la alfa-2-microglobulina, la Resistina, la citoqueratina-18 escindida o intacta) además de la glucosa en suero y de parámetros de resistencia de insulina. Puesto que el nivel de actividad de ALT es elevado con frecuencia en pacientes con EHNA (Angulo P et al, 2002), este criterio se considera como un marcador sustituto para la evaluación de la lesión hepática. De hecho, no se encuentran disponibles métodos no invasivos fiables para diagnosticar correctamente la EHGNA o la EHNA e incluso no siempre son suficientes las características histológicas para distinguir adecuadamente la EHGNA o la EHNA de otras afecciones tales como la enfermedad hepática alcohólica (Yeh M et al., 2007; Vuppalanchi R y Chalasani N, 2009).

30 Los métodos para un tratamiento eficaz del las enfermedades fibróticas del hígado, y en particular de EHGNA y de EHNA, siguen siendo insuficientes. No se ha establecido tratamiento para los pacientes con EHNA y se someten a ensayo varias opciones terapéuticas en las pruebas clínicas (Vuppalanchi R y Chalasani N, 2009, Dowman JK et al., 2009). Estos estudios implican el uso de muchas familias diferentes de compuestos químicos (fibratos, tiazolidinodionas, biguanidas, estatinas, cannabinoides) y dianas terapéuticas (receptores nucleares, receptores de angiotensina, receptores de cannabinoides, HMG-CoA reductasa). Recientemente, los estudios que implican tiazolidinodionas (Rosiglitazona y pioglitazona) han demostrado que estos fármacos pueden mejorar las afecciones del hígado, pero el tratamiento con estos fármacos no está exento de efectos no deseados, tales como un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva y osteoporosis, así como aumento de peso con efectos psicológicos en el paciente (Dowman J. K et al, 2009; Shiri-Sverdlov R et al., 2006; Neuschwander-Tetri et al., 2003). Las pruebas clínicas que implican la administración de cannabinoides han planteado la preocupación por alteración neuropsiquiátrica (Vuppalanchi R y Chalasani N, 2009). Otras terapias actualmente en curso están tratando de evaluar en EHNA fármacos como antioxidantes, pero ninguno de estos tratamientos ha demostrado aún resultados convincentes (Nelson A et al., 2009).

La solicitud internacional WO 2008/077618 describe compuestos para tratar trastornos del hígado.

La solicitud internacional WO 01/98291 describe compuestos utilizados para tratar los trastornos mediados por VCAM-1, en particular en el rechazo de órganos sólidos tardío y crónico post-trasplante tales como los trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinado, hígado, riñón, pancreático, piel, bazo, intestino delgado, y córnea.

- 5 La necesidad de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de trastornos del hígado, en particular las relacionadas con fibrosis y/o esteatosis hepática, aún es clara y urgente.

Compendio de la invención

- 10 Un estudio clínico ha demostrado sorprendentemente que el tratamiento de pacientes con un derivado de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona proporciona una reducción estadísticamente relevante de los marcadores bioquímicos específicos del hígado en plasma, lo que demuestra las propiedades hepatoprotectoras de una familia de compuestos que se define por medio de una Fórmula General (I).

- 15 La presente descripción proporciona nuevos derivados de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona de Fórmula General (I) (haciéndose referencia por otra parte a dichos derivados también como los "compuestos") o composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos para su uso en un método para el tratamiento de trastornos del hígado, en particular, aquellos que conducen al aumento del nivel en plasma de marcadores bioquímicos tales como las aminotransferasas. Los derivados de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona de Fórmula General (I) y las composiciones farmacéuticas que los comprenden tienen propiedades hepatoprotectoras y se pueden utilizar en métodos para el tratamiento de trastornos hepáticos que implican la alteración patológica, inflamación, degeneración, y/o proliferación de las células del hígado, tales como la fibrosis hepática, la enfermedad del hígado graso y la esteatohepatitis no alcohólica.

- 20 Los objetos de la presente invención, incluyendo las fórmulas generales específicas de los compuestos de interés, se proporcionan en la Descripción Detallada.

Descripción de las figuras

Abreviaturas utilizadas en las figuras y en el texto:

- ALAT = alanina aminotransferasa
- 25 -CCL5 = ligando 5 de quimioquina (motivo CC)
- COL1A1 = colágeno tipo I, alfa 1
- Comp. 1 = compuesto 1 del documento WO2007/147879
- Comp. 29 = compuesto 29 del documento WO2004/005233
- Ctrl = control o vehículo
- 30 -Feno = Fenofibrato
- HDL = lipoproteína de alta densidad
- LDL = lipoproteína de baja densidad
- EHGNA = enfermedad del hígado graso no alcohólico
- EHNA = esteatohepatitis no alcohólica
- 35 -PPAR = receptor activado por proliferador de peroxisomas
- Rosi = Rosiglitazona
- RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
- TGFβ = factor de crecimiento transformante beta
- TNFα = factor de necrosis tumoral alfa

- 40 Figura 1: Estructura de los compuestos ilustrativos de Fórmula General (I)

Los compuestos ilustrativos de Fórmula General (I) se agrupan de acuerdo con las definiciones más específicas de la Fórmula General (II) (Panel A), de la Fórmula General (IV) (Panel B) y de la Fórmula General (V) (Panel C).

Figura 2: Evaluación *in vivo*, en ratones ob/ob, de las propiedades anti-inflamatorias de los compuestos de Fórmula General (I)

Los compuestos de la Fórmula General (I) se sometieron a ensayo en un modelo murino de diabetes de tipo II, ratones ob/ob. Los ratones se trataron diariamente por vía oral con el Compuesto 29 del documento WO2004/005233 a dos dosis diferentes (10 y 30 mg/kg/día) y con los compuestos de referencia específicos de PPARalfa y PPARgamma prototípicos (Fenofibrato a 100 mg/kg/día y Rosiglitazona a 10 mg/kg/día, respectivamente). Después de 26 días de tratamiento, los animales se sacrificaron y se recogieron muestras de plasma y de hígado. La expresión hepática de los genes que se sabe que están implicados en el proceso de inflamación del hígado se evaluó y se midieron los niveles en plasma de ALAT (paneles AC). Se realizó un análisis estadístico utilizando una prueba t no pareada con tres valores de p que definen la relevancia estadística (* significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,01$; *** significa $p < 0,001$).

Figura 3: Evaluación *in vivo*, en ratones hApoE2 KI, de las propiedades anti-inflamatorias y anti-fibróticas de los compuestos de Fórmula General (I)

Los compuestos de la Fórmula General (I) se sometieron a ensayo *in vivo* en un modelo de ratones con dieta de alto contenido en grasas. Se alimentaron ratones ApoE2 "knock-in" (ratones en los que se ha sustituido un gen endógeno por otro, denominados de aquí en adelante ratones knock in) "humanizado" dislipidémico (hApoE2 KI) con una dieta Western y se trataron durante 12 semanas. Los compuestos de interés, incluyendo el Compuesto 29 del documento WO2004/005233 a 0,3 mg/kg/día y el Fenofibrato a 100 mg/kg/día (utilizado como compuesto de referencia) se incorporaron a la dieta. Al final del protocolo, se sacrificaron los animales, se recogieron los hígados y se evaluó la expresión hepática de los genes que se sabe que están implicados en la inflamación del hígado y los procesos de fibrosis mediante RT-PCR cuantitativa (Paneles A-D). El análisis estadístico se llevó a cabo como se indica para la Figura 1.

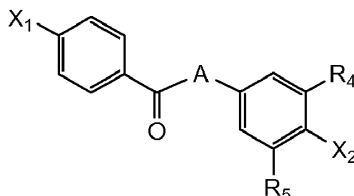
Figura 4. Evaluación *in vivo*, en ratones hApoE2 KI y hApoE2 KI/PPARalfa KO, de las propiedades anti-inflamatorias y anti-esteatósicas de los compuestos de Fórmula General (I)

Los compuestos de Fórmula General (I) se sometieron a ensayo *in vivo* en un modelo de ratones con una dieta con alto contenido de grasas. Los hApoE2 KI dislipidémicos "humanizados" deficiente para PPARalfa se alimentaron con una dieta Western y se trataron durante 6 semanas. Los compuestos de interés, incluyendo el Compuesto 29 del documento WO2004/005233 a 30 mg/kg/día y el compuesto 1 del documento WO2007/147879 a 30 mg/kg/día se administraron oralmente por medio de una sonda. Al final del protocolo, se sacrificaron los animales, se recogieron los hígados y la expresión hepática de los genes relevantes implicados en la inflamación del hígado y los procesos de fibrosis se evaluaron mediante RT-PCR cuantitativa. Al mismo tiempo, se evaluó el contenido de triglicéridos del hígado hepáticos (paneles AD). El análisis estadístico se realizó como se indica para la Figura 1.

Descripción detallada de la invención

La presente solicitud describe nuevos usos terapéuticos y métodos de administración de los derivados de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona de Fórmula General (I) y de las composiciones farmacéuticas que los comprenden para el tratamiento de los trastornos del hígado. Los derivados de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona específicos que están sustituidos en ambos grupos fenilo se pueden definir de acuerdo con los Ejemplos por ser útiles para el tratamiento de los trastornos del hígado, ya que tales compuestos disminuyen de una manera sorprendente los marcadores específicos de la inflamación del hígado así como la alteración, la degeneración, y/o la proliferación de las células del hígado en sujetos humanos y modelos animales, y por lo tanto pueden proporcionar un efecto hepatoprotector.

Los compuestos que se van a utilizar y administrar de acuerdo con la invención y comprendidos en las composiciones de acuerdo con la invención tienen la siguiente Fórmula General (I):



en la que:

X1 representa un halógeno, un grupo R1, o G1-R1;

A representa un grupo CH=CH o un grupo CH2-CH2;

X2 representa un grupo G2-R2;

G1 y G2, idénticos o diferentes, representan un átomo de oxígeno o de azufre;

R1 representa, un grupo alquilo no sustituido, un grupo arilo o un grupo alquilo que está sustituido con uno o más átomos de halógeno, un grupo alcoxi o alquiltio, grupos cicloalquilo que está sustituidos o no con uno o más átomos de halógeno, grupos cicloalquiltio o grupos heterocíclicos;

5 R2 representa un grupo alquilo sustituido con al menos un grupo -COOR₃, en donde R₃ representa un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo que está sustituido o no con uno o más átomos de halógeno, grupos cicloalquilo, o grupos heterocíclicos.

R₄ y R₅, idénticos o diferentes, representan un grupo alquilo lineal o ramificado no sustituido que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.

10 En una realización concreta, los compuestos de Fórmula General (I) están sustituidos con al menos un grupo alquiloxi o un grupo alquiltio en las posiciones X₁ y X₂. Por otra parte, los derivados pueden estar en forma de 1,3-difenilpropanonas sustituidas que se obtienen por reducción de los correspondientes derivados de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona.

15 En una realización concreta, X₁ es un grupo G₁-R₁, y más preferiblemente G₁ es un átomo de azufre y R₁ es un grupo alquilo lineal o ramificado que está sustituido o no con uno o más átomos de halógeno, grupos cicloalquilo, grupos heterocíclicos. Incluso más preferiblemente, X₁ es un grupo alquiltio que comprende un grupo alquilo que es lineal o ramificado, que tiene de uno a siete átomos de carbono que está sustituido o no con uno o más átomos de halógeno. En una realización preferida, X₁ es un grupo metiltio.

20 En una realización concreta, X₂ es un grupo G₂-R₂ en donde G₂ es un átomo de oxígeno y R₂ es un grupo alquilo sustituido con un grupo -COOR₃, en donde R₃ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo lineal o ramificado no sustituido que tiene de uno a siete átomos de carbono, y más preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbono. En una realización preferida, tanto R₄ como R₅ representan grupos metilo.

25 En el contexto de la presente invención, el término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado saturado que es lineal o ramificado, que tiene preferiblemente de uno a veinticuatro, y aún más preferiblemente de uno a siete átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, sec-butilo, pentilo, neopentilo, o n-hexilo.

El término "alquiloxi" se refiere a un grupo alquilo que está unido al resto del compuesto por un átomo de oxígeno.

El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo que está unido al resto del compuesto por un átomo de azufre (enlace tioéter).

30 El término "cicloalquilo" designa un grupo alquilo que forma un ciclo que tiene preferiblemente de tres a catorce átomos de carbono, y más preferiblemente de tres a ocho átomos de carbono, tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, y ciclooctilo.

El término "cicloalquiltio" se refiere a un grupo cicloalquilo que está unido al resto del compuesto por un átomo de azufre (enlace tioéter).

35 El término "arilo" designa un grupo aromático, sustituido o no que tiene preferiblemente de seis a catorce átomos de carbono tal como fenilo, a-naftilo, b-naftilo, bifenilo, o antraceno.

El término "heterocíclico" se refiere a un grupo heterocicloalquilo o un grupo heteroarilo.

El término "heterocicloalquilo" se refiere a un grupo cicloalquilo como se ha indicado anteriormente que comprende adicionalmente uno o varios heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre. Comprende generalmente de cuatro a catorce átomos de carbono, tal como morfolinilo, piperidinilo, tetrahidropiranilo, ditiolanilo.

40 El término "heteroarilo" se refiere a un grupo arilo como se ha indicado anteriormente que comprende adicionalmente uno o varios heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre. Comprende generalmente de cuatro a catorce átomos de carbono, tal como furanilo, tiofenilo, piridinilo, pirimidinilo, quinoleinilo, isoquinoleinilo.

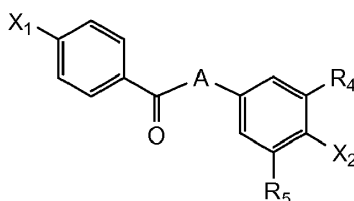
Por átomo de halógeno, se entiende un átomo de bromo, cloro, flúor o yodo.

45 Las diferentes familias de derivados de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona y 1,3-difenilpropanonas que están sustituidas en ambos grupos fenilo se pueden encontrar en la técnica anterior (documentos WO2003/037315, WO2001/046110, JP2006-303800, JP04-202129). Sin embargo, ninguno de estos documentos demuestra que los efectos hepatoprotectores específicos están asociados a los compuestos definidos en la Fórmula General (I).

50 La estructura, la síntesis, y algunas actividades de los compuestos que están incluidos en la Fórmula General (I) se han descrito en una serie de solicitudes de patente (WO2004/005243, WO2004/005233, WO2005/005369, US20070032543, WO2005/073184, WO2007/147879, y WO2007/147880) que no describen el uso de tales compuestos en métodos para el tratamiento de los trastornos del hígado.

Los derivados de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona específicos de Fórmula General (I) que se pueden utilizar en la presente invención y que pueden estar incluidos en las composiciones de acuerdo con la invención se pueden seleccionar entre los descritos en los documentos WO2004/005243 y WO2004/005233, y en particular:

- 1-[4-clorofenil]-3-[3,5-dimetil-4-isopropiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 15;
- 5 1-[4-clorofenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 16;
- 1-[4-clorofenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona como compuesto 17;
- 1-[4-metiltofienil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 27;
- 10 1-[4-metiltofienil]-3-[3,5-dimetil-4-isopropiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 28;
- 1-[4-metiltofienil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 29;
- 1-[4-hexiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 32;
- 1-[4-hexiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 33;
- 15 1-[4-heptilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 38;
- 1-[4-heptilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 39;
- 1-[4-bromofenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 40;
- 1-[4-bromofenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 41.
- 20 En una realización adicional de la invención, los compuestos descritos en los documentos WO2004/005243 y WO2004/005233 (referidos en la presente memoria como compuestos de Fórmula General (II)) que se pueden utilizar y administrar y que pueden estar incluidos en las composiciones de acuerdo con la invención, tienen la siguiente Fórmula General (I):



- 25 en la que:
- X1 representa un halógeno, un grupo R1, o G1-R1;
- A representa un grupo CH=CH;
- X2 representa un grupo G2-R2;
- G1 y G2, idénticos o diferentes, representan un átomo de oxígeno o de azufre;
- 30 R1 representa un grupo alquilo o cicloalquilo que tiene de uno a siete átomos de carbono, en particular, estando el grupo alquilo o cicloalquilo sustituido o no con uno o más átomos de halógeno;
- R2 representa un grupo alquilo sustituido con un grupo -COOR3, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.
- R4 y R5 representan un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.
- 35 Los documentos WO2005/005369 y US20070032543 también describen la estructura y el procedimiento alternativo para la síntesis de compuestos de acuerdo con la Fórmula General (I), así como con la Fórmula General (II), en particular:
- 1-[4-trifluorometilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]-prop-2-en-1-ona (compuesto 57 del documento US20070032543)

1-[4-trifluorometilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 58 del documento US20070032543)

1-[4-trifluorometiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 61 del documento US20070032543)

- 5 1-[4-trifluorometiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 62 del documento US20070032543).

Los ejemplos adicionales de los compuestos que se van a utilizar y administrar y que pueden estar incluidos en las composiciones de acuerdo con la invención se pueden seleccionar entre los descritos en el documento WO2005/073184, y en particular:

- 10 1-(4-(Pentiltioetilo)fenil)-3-(4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 1;

1-(4-(Pentiltioetilo)fenil)-3-(4-carboxidimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 2;

1-(4-((R,S)-5-[1,2]ditiolan-3-ilpentiloxi)fenil)-3-(4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 5;

- 15 1-(4-((R,S)-5-[1,2]ditiolan-3-ilpentiloxi)fenil)-3-(4-carboxidimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 6;

1-(4-Ciclohexiletiloxifenil)-3-(4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 10;

1-(4-Ciclohexiletiloxifenil)-3-(4-carboxidimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 11;

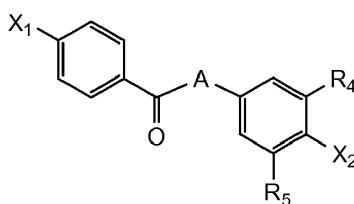
- 20 1-(4-Ciclohexiltioetiloxifenil)-3-(4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 22;

1-(4-Ciclohexiltioetiloxifenil)-3-(4-carboxidimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 23;

- 25 1-(4-Feniloxifenil)-3-(4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 32;

1-(4-Feniloxifenil)-3-(4-carboxidimetilmetiloxi-3,5-dimetilfenil)prop-2-en-1-ona, descrito como compuesto 33.

En una realización adicional de la invención, los compuestos descritos en el documento WO2005/073184 (referidos en la presente memoria como compuestos de Fórmula General (III)) que se pueden utilizar y administrar, y que pueden estar incluidos en las composiciones de acuerdo con la invención, tienen la siguiente Fórmula General (I):



30

en la que:

X1 representa un grupo G1-R1;

A representa un grupo CH=CH;

X2 representa un grupo G2-R2;

- 35 G1 y G2 representan un átomo de oxígeno;

R1 representa un grupo cicloalquilo, arilo o alquilo que está sustituido o no con uno o más grupos alquiltio, cicloalquilo, cicloalquiltio o grupos heterocicloalquilo o un grupo alquiltio;

R2 representa un grupo alquilo sustituido con al menos un grupo -COOR3, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono;

- 40 R4 y R5 representan un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

Los ejemplos adicionales de los compuestos utilizados y administrados de acuerdo con la invención y que pueden estar incluidos en las composiciones de acuerdo con la invención se pueden seleccionar entre los descritos en los documentos WO2004/005243, WO2004/005233, WO2005/005369, US20070032543 o WO2005/073184, y reducir en forma de las correspondientes 1,3-difenilpropanonas sustituidas.

- 5 Por consiguiente, los compuestos que se pueden utilizar y administrar de acuerdo con la invención y que puede estar incluidos en las composiciones de acuerdo con la invención se pueden seleccionar entre los descritos en el documento WO2007/147879, y en particular:

ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 1;

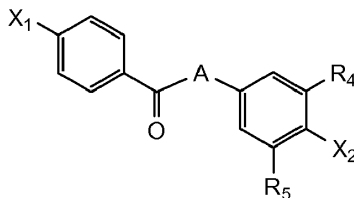
ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metoxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 6;

- 10 ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]etanoico, descrito como compuesto 7;

ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(propiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 8;

éster isopropílico de ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 13.

- 15 En una realización adicional de la invención, los compuestos descritos en el documento WO2007/147879 (referidos en la presente memoria como compuestos de Fórmula General (IV)) que se pueden utilizar y administrar y que pueden estar incluidos en las composiciones de acuerdo con la invención tienen la siguiente Fórmula General (I):



en la que:

X1 representa un grupo R1 o G1-R1;

- 20 A representa un grupo CH2-CH2;

X2 representa un grupo G2-R2;

G1 representa un átomo de oxígeno o de azufre y G2 representa un átomo de oxígeno;

R1 representa un grupo alquilo o cicloalquilo que tiene de uno a siete átomos de carbono;

- 25 R2 representa un grupo alquilo sustituido con al menos un grupo -COOR3, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono;

R4 y R5 representan un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

- 30 De manera similar al documento WO2007/147879, el documento WO2007/147880 describe compuestos que pueden estar incluidos en las composiciones de acuerdo con la invención que corresponden a derivados de 1,3-difenilpropanona sustituidos reducidos de los compuestos que fueron descritos en los documentos WO2004/005243, WO2004/005233, WO2005/005369, US20070032543, o WO2005/073184, y en particular:

ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 1;

ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 2;

ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-bromofenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 3;

- 35 ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometil)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 4;

ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(3,3,3-trifluoropropiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 11;

ácido 2-[2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 12;

ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(2,2,2-trifluoroetil)io)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 13

ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)propanoico, descrito como compuesto 29;

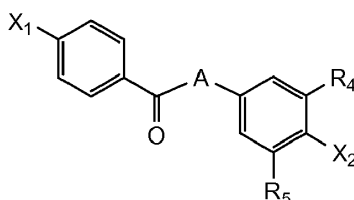
4-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoico, descrito como compuesto 34;

5 éster terc-butílico de ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 35;

éster isopropílico de ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico, descrito como compuesto 36;

10 ácido 2,2-difluoro-2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propil)fenoxi)acético, descrito como compuesto 37.

En una realización adicional de la invención, los compuestos descritos en el documento WO2007/147880 (referidos en la presente memoria como compuestos de acuerdo con la Fórmula General (V)) que se pueden utilizar y administrar y que pueden estar incluido en las composiciones de acuerdo con la invención tienen la siguiente Fórmula General (I):



15 en la que:

X1 representa un átomo de halógeno o un grupo R1 o G1-R1;

A representa un grupo CH2-CH2;

X2 representa un grupo G2-R2;

20 G1 representa un átomo de oxígeno o de azufre y G2 representa un átomo de oxígeno;

R1 representa un grupo alquilo o cicloalquilo que está sustituido con uno o más átomos de halógeno;

R2 representa un grupo alquilo sustituido o no con uno o más átomos de halógeno y sustituido con al menos un grupo -COOR3, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

25 R4 y R5 representan un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

Los compuestos que se pueden utilizar y administrar más preferiblemente de acuerdo con la invención e incluidos en las composiciones de acuerdo con la invención son los que se definen de acuerdo con la Fórmula General (II), la Fórmula General (IV) o Fórmula General (V), y, en particular:

30 1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 29 del documento WO2004/005233);

1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-isopropiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 28 del documento WO2004/005233);

1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 27 del documento WO2004/005233);

35 1-[4-trifluorometilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 57 del documento US20070032543)

1-[4-trifluorometilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 58 del documento US20070032543)

40 1-[4-trifluorometiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 61 del documento US20070032543)

1-[4-trifluorometiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (compuesto 62 del documento US20070032543)

ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico (compuesto 1 del documento WO2007/147879);

- 5 éster isopropílico de ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico (compuesto 13 del documento WO2007/147879);

ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometiloxi)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico (compuesto 1 del documento WO 2007147880);

- 10 ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(trifluorometiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico (compuesto 2 del documento WO 2007147880);

éster terc-butílico de ácido 2-(2,6-dimetil-4-(3-oxo-3-(4-(trifluorometiloxi)fenil)propil)fenoxi)-2-metilpropanoico (compuesto 35 del documento WO 2007147880).

- 15 La presente invención proporciona usos específicos de los compuestos de Fórmula General (I) y composiciones farmacéuticas relacionadas que comprenden los mismos. El compuesto puede o no estar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable y se utiliza en una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de trastornos hepáticos. Cualquier compuesto que se defina de acuerdo con la Fórmula General (II), la Fórmula General (III), la Fórmula General (IV), o la Fórmula General (V), estando estas fórmulas representadas por la Fórmula General (I), se puede utilizar en la presente invención para el tratamiento de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en, la fibrosis hepática o la enfermedad de hígado graso, en particular en forma de una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto.

La invención también proporciona un método para el tratamiento de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en, la fibrosis hepática o la enfermedad de hígado graso, que comprende la administración a un sujeto que lo necesite de un compuesto de Fórmula General (I) en la que:

X1 representa un halógeno, un grupo R1 o G1-R1;

- 25 A representa un grupo CH=CH o un grupo CH2-CH2;

X2 representa un grupo G2-R2;

G1 y G2, idénticos o diferentes, representan un átomo de oxígeno o de azufre;

- 30 R1 representa un grupo alquilo no sustituido, un grupo arilo o un grupo alquilo que está sustituido con uno o más átomos de halógeno, un grupo alcoxi o un grupo alquiltio, grupos cicloalquilo, grupos cicloalquiltio o grupos heterocíclicos;

R2 representa un grupo alquilo sustituido con al menos un grupo -COOR3, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo que está sustituido o no con uno o más átomos de halógeno, grupos cicloalquilo o grupos heterocíclicos.

- 35 R4 y R5, idénticos o diferentes, representan un grupo alquilo lineal o ramificado no sustituido que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

Las composiciones que comprenden compuestos en los que X1, X2, A, G1, G2, R1, R2, R3, R4, y R5 se definen de acuerdo con la Fórmula General (II), la Fórmula General (III), la Fórmula General (IV), o la Fórmula General (V) también se pueden utilizar para llevar a cabo el método para el tratamiento de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en, la fibrosis hepática o la enfermedad de hígado graso.

- 40 De acuerdo con la presente descripción, el término "trastorno hepático" incluye cualquier trastorno que afecte al hígado, y, en particular, cualquier enfermedad hepática aguda o crónica que implique la alteración patológica, inflamación, degeneración, y/o la proliferación de las células del hígado. En particular, el trastorno hepático es la fibrosis hepática, la cirrosis hepática, o cualquier otra enfermedad del hígado en la que el nivel en el plasma de algunos marcadores de lesión hepatocelular, alteración o necrosis, es elevada en comparación con los niveles en plasma normales. Estos marcadores bioquímicos asociados con la actividad y el estado del hígado se pueden seleccionar entre los descritos en la bibliografía y, en particular, la alanina aminotransferasa (ALAT), la aspartato aminotransferasa (ASAT), la fosfatasa alcalina (AP), la gamma glutamil transpeptidasa (GGT), la citoqueratina-18 (CK-18) o resistina. En una realización concreta, el trastorno hepático es una enfermedad del hígado graso en la que la elevación de uno o más de estos marcadores se asocia a una esteatosis más o menos importante en el hígado, como se puede confirmar por medio de una biopsia de hígado. Una lista no exhaustiva de las enfermedades del hígado graso incluye EHNA, EHNA, y la enfermedad de hígado graso asociada a trastornos tales como la hepatitis o el síndrome metabólico (obesidad, resistencia a la insulina, la hipertrigliceridemia, y similares). Un trastorno

hepático seleccionado del grupo que consiste en fibrosis hepática o enfermedad de hígado graso se trata de acuerdo con la presente invención.

El término "hepatoprotección" o "hepatoprotector" se refiere a la capacidad de un compuesto para reducir, revertir o prevenir el daño al hígado, en particular, reduciendo, revertiendo o previniendo la alteración patológica, la inflamación, la degeneración, y/o la proliferación de células del hígado tales como hepatocitos.

Los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a la terapia, la prevención y la profilaxis de un trastorno, en particular de un trastorno hepático. El tratamiento consiste en la administración de un compuesto o composición farmacéutica al paciente que tiene un trastorno declarado para curar, retrasar o ralentizar el progreso, mejorando de este modo el estado de los pacientes. El tratamiento se puede administrar también a sujetos sanos que tienen riesgo de desarrollar un trastorno hepático.

En el contexto de la invención, el término "sujeto" significa un mamífero y más concretamente un ser humano. Los sujetos que se van a tratar de acuerdo con la invención se pueden seleccionar adecuadamente basándose en varios criterios asociados al trastorno hepático, tales como los tratamientos previos con fármacos, las patologías asociadas, el genotipo, la exposición a factores de riesgo, la infección viral, así como cualquier otro biomarcador relevante que pueda ser evaluado por medio de un método inmunológico, bioquímico, enzimático, químico, o de detección de ácidos nucleicos. En una realización concreta, el sujeto es un paciente con sobrepeso (en particular, un paciente diabético o prediabético con sobrepeso) o un paciente obeso que sufre dislipidemia aterogénica. De hecho, estos pacientes tienen riesgo de desarrollar un trastorno hepático, en particular, EHGNA o EHNA. Los autores de la presente invención han demostrado que compuestos como los definidos anteriormente tienen un efecto beneficioso sobre las funciones hepáticas de tales pacientes.

Los compuestos de Fórmula General (I) pueden contener uno o varios centros asimétricos. Cuando se desea un compuesto enantioméricamente puro (o enriquecido), éste se puede obtener mediante purificación del producto final o de los intermedios quirales, o mediante síntesis asimétrica siguiendo los métodos típicos conocidos por un experto normal en la técnica (por ejemplo, mediante el uso de reactivos y catalizadores quirales). Algunos de estos compuestos pueden tener diferentes formas tautoméricas estables. Esta invención incluye el uso de estereoisómeros (diastereoisómeros, enantiómeros), mezclas puras o mixtas, así como racémicas e isómeros geométricos de los compuestos de Fórmula General (I).

Los compuestos de Fórmula General (I) se pueden formular como sales "farmacéuticamente aceptables", siendo las sales ligeramente tóxicas o no tóxicas obtenidas a partir de bases o ácidos orgánicos o inorgánicos de los compuestos de Fórmula General (I). Estas sales pueden obtenerse durante la etapa de purificación final del compuesto o mediante la incorporación de la sal al compuesto previamente purificado.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de Fórmula General (I) para el tratamiento de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en, fibrosis hepática o la enfermedad de hígado graso pueden comprender uno o varios excipientes o vehículos, aceptables dentro de un contexto farmacéutico (por ejemplo, soluciones salinas, soluciones fisiológicas, soluciones isotónicas, etc., compatibles con el uso farmacéutico y bien conocidas por un experto normal en la técnica). Estas composiciones pueden comprender uno o varios agentes o vehículos seleccionados entre dispersantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, etc. Los agentes o vehículos útiles para estas formulaciones (líquidas y/o inyectables y/o sólidas) son particularmente metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, polisorbato 80, manitol, gelatina, lactosa, aceites vegetales, acacia, liposomas, etc. Estas composiciones se pueden formular en forma de suspensiones inyectables, geles, aceites, píldoras, supositorios, polvos, cápsulas de gel, cápsulas, aerosoles, etc., eventualmente por medio de formas galénicas o dispositivos que aseguran una liberación prolongada y/o lenta. Para este tipo de formulación, se pueden usar ventajosamente agentes tales como celulosa, carbonatos o almidones.

Los compuestos de Fórmula General (I) se deben administrar en una cantidad eficaz de un compuesto mediante el uso de una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente. En el contexto de la invención, el término "una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto suficiente para producir el resultado terapéutico deseado.

Los compuestos de Fórmula General (I) se pueden administrar de diferentes maneras y en diferentes formas que permiten la administración de dichos compuestos en una cantidad terapéuticamente eficaz. Así, por ejemplo, se pueden administrar de una manera sistemática, por boca, parenteralmente, mediante inhalación, o mediante inyección, tal como por ejemplo por ruta intravenosa, por ruta intramuscular, por ruta subcutánea, por ruta transdérmica, por ruta intraarterial, etc. La administración oral es la ruta preferente de administración para las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de Fórmula General (I) para el tratamiento de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en la fibrosis hepática o la enfermedad de hígado graso.

La frecuencia y/o la dosis con respecto a la administración pueden ser adaptadas por un experto normal en la técnica, en función del paciente, la patología, la forma de administración, etc. Típicamente, los compuestos de Fórmula General (I) se pueden administrar para el tratamiento de trastornos de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en la fibrosis hepática o la enfermedad de hígado graso en dosis que varían entre 0,01 mg y

1 g por administración, preferentemente de 1 mg a 100 mg por administración. La administración puede realizarse diariamente o incluso varias veces al día, si fuera necesario.

Los compuestos y composiciones de la invención se pueden administrar ventajosamente combinados con otros agentes terapéuticos, actualmente disponibles en el mercado o en desarrollo para el tratamiento de trastornos metabólicos y/o hepáticos, tales como metformina, insulina, tiazolidinodionas, glitazonas, estatinas, inhibidores de colesterol y/u otros fármacos hipolipemiantes.

En una realización adicional, la presente descripción proporciona métodos de tratamiento de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en, la fibrosis hepática o la enfermedad de hígado graso que comprende la administración de un compuesto de Fórmula General (I), en particular en forma de composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos. Tales métodos pueden comprender la administración de cualquier compuesto que se define de acuerdo con la Fórmula General (II), la Fórmula General (III), la Fórmula General (IV), o la Fórmula General (V).

Los compuestos y composiciones de la invención proporcionan una herramienta terapéutica ventajosa para el tratamiento de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en, la fibrosis hepática o la enfermedad de hígado graso, y en particular enfermedades de hígado graso incluyendo EHGNA y EHNA, debido a los efectos hepatoprotectores de los compuestos de Fórmula General (I). En particular, estos compuestos se pueden seleccionar entre aquellos en los que X1, X2, A, G1, G2, R1, R2, R3, R4, y R5 se definen de acuerdo con la Fórmula General (II), la Fórmula General (III), la Fórmula General (IV), o la Fórmula General (V). Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula General (I) como se ha descrito anteriormente, y, en particular, de la Fórmula General (II), (III), (IV) y (V), para su uso en un método para tratar un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en la fibrosis hepática o la enfermedad de hígado graso. Se pretende que los trastornos hepáticos específicos que se van a tratar sean los descritos anteriormente, tales como la fibrosis hepática o una enfermedad del hígado graso. En otra realización más, los compuestos para su uso en dichos métodos son aquellos descritos anteriormente específicamente.

En general, las propiedades específicas para el hígado de los compuestos de Fórmula General (I) se pueden evaluar en poblaciones específicas de pacientes que presentan un trastorno hepático, tal como EHGNA y/o EHNA en el momento de la inclusión. Por ejemplo, un estudio doble ciego, controlado con placebo y aleatorizado puede evaluar la eficacia de la administración oral del compuesto (a la dosis de 80 mg/día o más) durante 3-12 meses en los sujetos que han sido diagnosticados de EHGNA (solo esteatosis) y/o EHNA (esteatosis y fibrosis) y presentan niveles elevados de aminotransferasas. Cualquier mejora estadísticamente relevante sobre los principales parámetros bioquímicos (tales como la reducción de los niveles de aminotransferasas, GGT, y/o citoqueratina-18 y/o la reducción de los niveles de resistina), en el volumen de la esteatosis hepática medido mediante la técnica de formación de imágenes o sobre las características histológicas de biopsias de hígado (medición de la esteatosis, la inflamación hepática y la fibrosis) puede evaluarse con regularidad en estos pacientes durante el estudio (una vez al mes o con mayor frecuencia). También se pueden medir parámetros adicionales tales como colesterol total/LDL/HDL, parámetros hemodinámicos, índice de masa corporal, resistencia a la insulina, marcadores de estrés oxidativo inflamatorio o, insulina y glucosa en plasma, marcadores de la función renal en la orina, formación de imágenes por MRI, y/o histomorfología en biopsias de hígado durante el estudio y/o al final del estudio para completar el perfil de eficacia de los compuestos para el tratamiento de trastornos hepáticos.

Habiendo descrito ahora completamente la invención, los expertos normales en la técnica entenderán que la invención puede ponerse en práctica dentro de un intervalo amplio y equivalente de condiciones, parámetros y similares, sin afectar al espíritu o al alcance de la invención o cualquier realización de la misma. Varias otras ventajas de la invención se deducirán de la lectura de los siguientes ejemplos, que deben considerarse como datos ilustrativos y no como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efectos de los compuestos de Fórmula General (I) en los índices bioquímicos específicos del hígado

Materiales y Métodos

La 1-[4-metilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (Compuesto 29 del documento WO2004/005233) se formuló en forma de cápsulas de cubierta dura que contenían 5, 10 o 20 mg del compuesto. El compuesto (80 mg) se administró oralmente una vez al día durante 28 días. El estudio se realizó en dos grupos paralelos en condiciones de doble ciego: placebo o Comp. 29 del documento WO2004/005233.

La tolerabilidad y la seguridad de las administraciones una vez al día, así como la eficacia en la mejora de los lípidos del plasma y la homeostasis de la glucosa en comparación con el placebo, se evaluaron en dos ensayos piloto utilizando parámetros bioquímicos relevantes. Los datos se utilizaron para calcular el porcentaje de cambio debido al compuesto en comparación con el placebo después de 28 días de tratamiento.

Resultados y Conclusiones:

Un primer estudio piloto, doble ciego, controlado con placebo, aleatorizado se realizó en pacientes con dislipidemia aterogénica y obesidad abdominal para evaluar la tolerabilidad y la seguridad de las administraciones una vez al día de dosis orales del Compuesto 29 del documento WO2004/005233 (a la dosis de 80 mg/día), así como la eficacia sobre los triglicéridos en plasma y el colesterol HDL (objetivos primarios).

- 5 En relación con el grupo de placebo, la eficacia terapéutica de este compuesto se demostró con reducción estadísticamente significativa de 21% ($p < 0,01$) de los triglicéridos en plasma y un aumento del nivel de colesterol bueno (HDL-C) de 9% ($p < 0,01$). Estos efectos metabólicos eran comparables a los publicados con los fibratos en la misma población de pacientes. Además, el compuesto reveló una notable falta de efecto sobre la homocisteína (un factor de riesgo cardiovascular conocido). El compuesto mostró efectos significativos en varios de los criterios de
- 10 evaluación secundarios, incluyendo la reducción de los marcadores hepáticos de fase aguda de la inflamación, tales como fibrinógeno y haptoglobina ($p < 0,01$). También se midieron los efectos sobre los parámetros bioquímicos de la función hepática y las administraciones de dosis orales del Compuesto 29 del documento WO2004/005233 llevaron inesperadamente a una reducción estadísticamente significativa de 23% del nivel de gamma glutamil transpeptidasa ($p < 0,001$) y una reducción de 13% del nivel de alanina aminotransferasa ($p < 0,01$).
- 15 Un segundo estudio piloto, doble ciego, controlado con placebo, aleatorizado se realizó en pacientes que padecían de alteración de la glucosa en ayunas, disminución de la tolerancia a la glucosa y obesidad abdominal para evaluar la tolerabilidad y la seguridad de las administraciones una vez al día de dosis orales del Compuesto 29 del documento WO2004/005233 (a la dosis de 80 mg/día), así como la eficacia sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos.
- 20 En relación con el grupo de placebo, la eficacia terapéutica de este compuesto se demostró con una reducción estadísticamente significativa de la glucosa en plasma en ayunas (-5%, $p < 0,05$), de la insulinemia en ayunas (-25%, $p < 0,01$) y del índice de resistencia a la insulina, HOMA-IR (-31%, $p < 0,01$). En paralelo, el Comp. 29 del documento WO2004/005233 redujo los triglicéridos en plasma (-25%, $p < 0,001$) y el LDL-C al tiempo que mejoraba el HDL-C (+9%, $p < 0,01$). El compuesto demostró efectos significativos en varios de los criterios de evaluación
- 25 secundarios, incluyendo la reducción de los marcadores hepáticos de fase aguda de la inflamación tales como la haptoglobina ($p < 0,01$). También se calcularon los parámetros bioquímicos sobre la función hepática y las administraciones de dosis orales de Compuesto 29 del documento WO2004/005233 condujeron a una reducción estadísticamente significativa de 15% de nivel de gamma glutamil transpeptidasa ($p < 0,01$).
- Estos resultados demostraron que una formulación oral de un compuesto de Fórmula General (I) no solo es bien tolerada por los pacientes, sino que tiene efectos positivos sobre varios parámetros bioquímicos asociados con la EHNA y la EHNA incluyendo las enzimas hepáticas, la sensibilidad a la insulina, el metabolismo de lípidos, y los marcadores de inflamación del hígado. En particular, el Comp. 29 del documento WO2004/005233 disminuye significativamente los niveles en plasma de ALAT y GGT, dos biomarcadores específicos comunes de la disfunción del hígado, que están elevados en pacientes que sufren de EHNA y EHNA.
- 30
- 35 Ejemplo 2: Modelos animales para someter a ensayo las propiedades específicas para el hígado de los compuestos de Fórmula General (I)

Materiales y Métodos

Modelo animal y tratamiento: ratones ob/ob

- Se adquirieron ratones macho ob/ob de (8 semanas de edad) de Charles River (L'Arbresle, Francia) y se
- 40 mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura constante de $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Después de una aclimatación de 1 semana, los ratones se separaron en grupos de 8 animales seleccionados de tal manera que se determinó la distribución de su peso corporal y su glucemia de 6 horas en ayunas antes de que el experimento fuera uniforme. Los animales se alimentaron con una dieta convencional Chow (R03, SAFE) y se trataron durante 26 días con los compuestos de interés. Los compuestos, incluyendo el compuesto 29 del documento WO2004/005233
- 45 (Comp. 29, a 10 o 30 mg/kg/día), Fenofibrato (100 mg/kg/día) y Rosiglitazona (10 mg/kg/día) se administraron diariamente por sonda. Los animales de control se trataron con vehículo solo (Carboximetilcelulosa al 1% + Tween 80 al 0,1%). Los animales tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Modelo animal y tratamiento: estudio en ratones hApoE2 "knock-in"

- Ratones hApoE2 knock-in (KI) transgénicos hembra (Sullivan et al., 1998) (4 semanas de edad). Los ratones se
- 50 mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura constante de $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Después de una aclimatación de 1 semana, los ratones se separaron en grupos de 7-10 animales seleccionados, de manera que la distribución de su peso corporal y los niveles de lípidos en plasma determinados antes del experimento fueran uniformes. Los animales fueron alimentados con una dieta Western (20% de grasa saturada y 0,2% de colesterol, Harlan Teklad TD88137) al destete y durante 12 semanas. Los compuestos de interés (Comp. 29 a 0,3 mg/kg/día y Fenofibrato 100 mg/kg/día) se incorporaron a la Western (SAFE, Augy, Francia) y administraron a los ratones
- 55 durante 12 semanas. Los animales de control recibieron solo dieta Western. Los animales tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Modelo animal y tratamiento: estudios en ratones hApoE2 KI y hApoE2 KI PPARalfa KO

Ratones transgénicos emparejados por edad hApoE2 knock-in (KI) y hApoE2 KI/PPARalfa knock-out (con un gen inactivado) (KO) (de 8 a 25 semanas de edad para el primer experimento y de 10 a 14 semanas de edad para el segundo experimento). Se generaron ratones hApoE2 KI/PPARalfa KO cruzando los ratones hApoE2 KI homocigotos (Sullivan P et al., 1998) y los ratones carentes de PPAR homocigotos (Lee et al., 1995). Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura constante de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Después de una aclimatación de 1 semana, los ratones se separaron en grupos de 4-6 animales seleccionados de tal manera que la distribución de su edad, el peso corporal y los niveles de lípidos en plasma determinados antes del experimento fueran uniformes. Los animales se alimentaron con una dieta Western (20% de grasa saturada y 0,2% de colesterol, Harlan Teklad TD88137) durante 2 semanas en el primer estudio, que implicó la administración diaria del Compuesto 29 (30 mg/kg/día por sonda oral), y durante 6 semanas en el segundo estudio, que implicó la administración diaria de Compuesto 1 del documento WO2007147879 (Comp. 1, a 30 mg/kg/día por sonda oral). Los animales de control se trataron con vehículo solo (Carboximetilcelulosa la 1% + Tween 80 al 0,1%). Los animales tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Preparación de muestras biológicas obtenidas de modelos animales

Al final de los estudios, los animales se pesaron y se sacrificaron bajo anestesia. Se recogió sangre del seno retroorbital; se obtuvo plasma por centrifugación (4.000 rpm, a 4°C durante 15 min) y a continuación se congeló y se almacenaron a -20°C . Los tejidos y los hígados se aislaron y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C para su posterior análisis (expresión génica y bioquímica) o se fijaron en paraformaldehído al 4% para su histología.

Análisis de plasma

Se determinaron los niveles de alanina aminotransferasa en plasma utilizando el analizador automático RX Daytona™ (Randox) y el kit de dosificación apropiado (Randox, Núm. de cat. AL 3801).

Expresión génica

Se aisló el ARN total de los hígados congelados utilizando el kit de ARN NucleoSpin® 96 (Macherey Nagel), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó en 1 μg de ARN total por medio de la acción de 1 μl de la enzima MMLV-RT (Invitrogen) durante 1 hora a 37°C en un volumen total de 30 μl . Las condiciones de reacción fueron 1X tampón (Invitrogen), DTT 1,5 mM (Invitrogen), dNTPs 0,18 mM (Promega), 200 ng de pN6 (Amersham), 30U de inhibidor de RNasa (Promega). La PCR cuantitativa se llevó a cabo a continuación utilizando el Sistema de Detección de PCR en Tiempo Real MyiQ Single Color (BioRad). En resumen las reacciones de PCR se realizaron en placas de 96 pocillos sobre 5 μl de mezcla de transcripción inversa diluida utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix. Las condiciones de reacción fueron: 25 μl de volumen de reacción, MgCl_2 3 mM y 0,5 μl de cada una de las soluciones de cebadores inverso y directo (10 pmol), T_m de 60°C . Los pares de cebadores que se han diseñado para la amplificación específica de cada uno de los genes diana se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Genes	Cebador inverso (5'-3 ')	Cebador directo (5'-3 ')
36B4	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG (SEQ ID NO: 1)	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC (SEQ ID NO: 2)
TNF alfa	AGGTACAACCCATCGGCTGG (SEQ ID NO: 3)	CGTCGTAGCAAACCACCAAGTG (SEQ ID NO: 4)
TGF beta	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC (SEQ ID NO: 5)	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA (SEQ ID NO: 6)
CCL5	CACACTTGCGGTTCTTCG (SEQ ID NO: 7)	CCCTCACCATCATCCTCACTGC (SEQ ID NO: 8)
COL1A1	GCCAGGAGAACCAGCAGAG (SEQ ID NO: 9)	AGGCGAACAAGGTGACAGAG (SEQ ID NO: 10)

La cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de ADN complementaria presente en el inicio de la reacción y amplificada durante la PCR. Los niveles relativos de expresión se determinaron usando la curva patrón para cada transcripción. Los resultados se normalizaron con respecto a las señales obtenidas con el control 36B4 (un transcrito de referencia para la expresión génica hepática). El factor de inducción, es decir la relación entre la señal relativa inducida por el compuesto de acuerdo con la invención y el promedio de los valores

relacionados con el grupo de control, se calculó a continuación, para cada muestra. Cuanto más alto sea este factor, más promueve el compuesto la expresión del gen diana. El resultado final se describe como la media de los valores de inducción en cada grupo experimental.

Análisis histológico del hígado

- 5 El tejido hepático fijado con formalina se procesó, y secciones en parafina de 5 micras de grosor se tiñeron con hematoxilina y eosina. El análisis histológico de las secciones de hígado teñidas se llevó a cabo en condiciones ciegas para cuantificar la esteatosis hepática y la inflamación del hígado intralobular. La esteatosis hepática se puntuó de 0 a 3, como sigue: 0 (muy levemente afectado), 1 (levemente afectado), 2 (moderadamente afectado), 3 (muy afectado). La inflamación intralobular del hígado también se puntuó en función del número de focos inflamatorios contados por campo de observación de la siguiente manera: 0 (< 1 foco/campo), 1 (de 1 a 2 focos/campo), 2 (de 2 a 4 focos/campo) 3 (más de 4 focos/campo).

Análisis de los lípidos hepáticos

- 15 Se homogeneizaron aproximadamente 100 mg de tejido de hígado congelado con un homogeneizador de tejidos (Precellys® 24, Bertin Technologies, Francia) en tampón de NaCl 150 mM, que contenía NaN₃ 15,4 mM. Las fracciones de lípidos de los productos homogeneizados se extrajeron con cloroformo-metanol (2:1, v/v) seguido de la medición del colesterol total (utilizando el kit Cholesterol RTU™ 61218, Biomerieux, Francia) y triglicéridos verdaderos (kit TR0100, Sigma-Aldrich) .

Resultados y Conclusiones

- 20 Se describen varios modelos animales en la bibliografía como un reflejo de la etiología, el progreso de la enfermedad, y la patología de las enfermedades hepáticas humana. Sin embargo, estos modelos no siempre muestran la gama de características histopatológicas y fisiopatológicas asociadas con enfermedades hepáticas específicas. Como se ha revisado recientemente (Fan J y L Qiao, 2009), esto resulta particularmente evidente en caso de EHNA o EHNA, en donde se han establecido modelos genéticos (en ratones transgénicos) nutricionales (en ratas o ratones), o mixtos.

- 25 La EHNA se caracteriza por alteraciones patológicas del hígado que van de la esteatosis y la inflamación del hígado a la degeneración del hígado, fibrosis y cirrosis. La patogenia de la EHNA sigue siendo poco conocida. Es un componente del síndrome metabólico y por lo tanto está frecuentemente asociada con la hiperlipidemia. Se utilizaron diferentes modelos de animales transgénicos para caracterizar los efectos de los compuestos ilustrativos de Fórmula General (I), y más específicamente de Fórmula General (I) y de Fórmula General (IV): los ratones ob/ob carentes de leptina resistentes a la insulina, y los ratones hApoE2 knock-in dislipidémicos (los últimos, con o sin una modificación genómica adicional que consiste en la inactivación del gen PPAR α).

- 30 Los ratones ob/ob carentes de leptina son obesos, dislipidémicos, resistencia a la insulina y desarrollan lesión hepática y esteatosis. La esteatosis hepática es relativamente asintomática, pero los individuos con este trastorno tienen un mayor riesgo de desarrollar EHNA. Este primer protocolo fue diseñado para analizar los efectos del Comp. 29 y de los compuestos de referencia Fenofibrato y Rosiglitazona en las primeras etapas de la EHNA, es decir, la inflamación en el hígado esteatósico de ratones ob/ob. En ratones ob/ob, 26 días de tratamiento con Rosiglitazona indujeron el aumento de la expresión hepática de TNF α en los ratones ob/ob, mientras que no se observó ningún cambio importante en la expresión de esta citoquina en los animales tratados con Fenofibrato. Por el contrario, la administración del Comp. 29 inhibió la expresión de esta citoquina de una manera dosis-respuesta (Fig. 2A).
- 35 Siguiendo el mismo tratamiento, el nivel de expresión hepática de TGF β fue equivalente en todos los grupos de control y de referencia (control, Fenofibrato y Rosiglitazona). Una vez más, la administración del Comp. 29 inhibió la expresión de este factor de crecimiento de una manera dosis-respuesta, un efecto que es estadísticamente más relevante cuando el Comp. 29 se administró a 30 mg/kg/día (Fig. 2B).

- 40 Se midió ALAT en plasma como un marcador sustituto para la evaluación de la lesión hepática en estos ratones ob/ob después de los 26 días de tratamiento con los diferentes compuestos. Cuando el nivel de ALAT en plasma se compara con el grupo control o con el grupo tratado con Fenofibrato, el grupo de ratones que fueron tratados con Rosiglitazona exhibió un aumento significativo de sus niveles en plasma de ALAT. Por el contrario, la administración del Comp. 29 a 30 mg/kg/día indujo una disminución estadísticamente significativa de los niveles en plasma de ALAT (Fig. 2C).

- 45 Se utilizó otro modelo *in vivo* con el fin de estudiar los efectos del Comp. 29 y del compuesto de referencia Fenofibrato sobre los parámetros fisiológicos que normalmente se consideran relevantes para la evaluación de la EHNA. En ratones ApoE2 knock-in "humanizado" (referidos como hApoE2 KI) el alelo ApoE2 humano reemplaza el gen APOE murino, de manera que estos ratones expresan ApoE2 humana (hApoE2) bajo el control de secuencias promotoras endógenas a los niveles fisiológicos. Sin embargo, hApoE2 tiene una afinidad marcadamente reducida por el receptor de LDL, que conduce a un perfil de lipoproteínas en plasma que se asemeja a la hiperlipoproteinemia de tipo III humana (Sullivan et al., 1998). Al igual que los seres humanos, los ratones hApoE2 KI son sensibles a fármacos hipolipemiantes como los fibratos (ligandos para PPAR α). Se ha demostrado que esta clase de fármacos revierte la esteatohepatitis en ratones (Shiri-Sverdlov R et al., 2006) y por lo tanto este modelo puede permitir la

evaluación de los efectos anti-inflamatorios y anti-fibrótico específicos del hígado de los compuestos de Fórmula General (I). En particular, los niveles elevados de TNF α están relacionados con la inflamación del hígado, necrosis y fibrosis típicas de la EHNA (Larter et al., 2008). El TGF β es un péptido que se encuentra en muchos tipos de células que regulan la curación de heridas y la apoptosis. La isoforma encontrada en células hepáticas, El TGF β 1, se ha encontrado en muchos modelos de fibrosis hepática y los niveles aumentan en la hepatitis activa crónica y la enfermedad hepática alcohólica fibrótica (Nan et al., 2009).

Los diferentes ratones hApoE2 KI se trataron durante 12 semanas, mientras se alimentaban con una dieta Western. En este modelo, el Comp. 29 inhibió la expresión hepática de genes que son relevantes para la inflamación del hígado (TNF α , CCL5, TGF β ; Fig. 3A, 3B, 3C, respectivamente) con una eficacia similar (si no superior) al Fenofibrato que se administró a una dosis más alta.

Sin embargo, el grupo de ratones tratados con el Comp. 29 mostró una inhibición estadísticamente significativa de la expresión de genes como aquellos para las cadenas de colágeno específicas que están implicadas en la fibrosis hepática (Basaranoglu et al., 2010), y, en particular COL1A1 (Fig. 3D). Tal efecto sobre los genes de colágeno no se observó en el grupo de ratones tratados con Fenofibrato. Estos resultados demuestran que el Comp. 29 muestra propiedades anti-inflamatorias y anti-fibróticas en un modelo *in vivo* de EHNA.

Los compuestos ilustrativos de Fórmula General (I) se sometieron a ensayo *in vivo* en un modelo de ratones con una dieta de alto contenido de grasa. hApoE2 KI y hApoE2 KI/PPAR α KO (ratones ApoE2 knock-in "humanizados" carentes del gen mPPAR α) se alimentaron con una dieta Western y se trataron diariamente con el Comp. 29 a 30 mg/kg/día durante 2 semanas. Al final del protocolo, se evaluaron la esteatosis hepática y la inflamación intralobular en los ratones de control y tratados por medio de análisis histológico y puntuaciones específicas.

Este estudio demostró que el tratamiento con el Comp. 29 inhibe el desarrollo tanto de la esteatosis hepática como de la inflamación hepática que es inducido por la dieta en ratones hApoE2 KI y, aún más rápidamente en ratones hApoE2 KI/PPAR α KO, en donde es evidente una aceleración del trastorno hepático debido a la carencia de PPAR α (Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 2

Esteatosis hepática (puntuación)	hApoE2 KI		hApoE2 KI/PPAR α KO	
	Vehículo	Comp. 29 (30 mg/kg/día)	Vehículo	Comp. 29 (30 mg/kg/día)
0	17%	83%	0%	0%
1	50%	17%	33%	33%
2	33%	0%	33%	50%
3	0%	0%	33%	17%

Tabla 3

Inflamación hepática (puntuación)	hApoE2 KI		hApoE2 KI/PPAR α KO	
	Vehículo	Comp. 29 (30 mg/kg/día)	Vehículo	Comp. 29 (30 mg/kg/día)
0	50%	100%	17%	67%
1	50%	0%	33%	17%
2	0%	0%	33%	17%
3	0%	0%	17%	0%

En otro estudio, se evaluaron los efectos de las propiedades anti-inflamatorias y anti-fibróticas específicas del hígado del Comp. 29 y el Compuesto 1 del documento WO2007/147879 (Comp. 1) en los ratones hApoE2 KI/PPARalfa KO que se alimentaron con una dieta Western y se trataron diariamente con los compuestos seleccionados durante 6 semanas.

5 Tanto el Comp. 29 como el Comp. 1 inhibieron la expresión hepática de TNF α , TGF β y colágeno en ratones hApoE2 KI/PPARalfa KO (Fig. 4A, 4B, y 4C, respectivamente), lo que confirma las propiedades anti-inflamatorias, y anti-fibróticas específicas del hígado (principalmente independientes de PPAR), de estos compuestos en un modelo *in vivo* relevante para la EHNA. El análisis de los lípidos hepáticos reveló, adicionalmente, que tanto el Comp. 29 como el Comp. 1 impidieron la acumulación de triglicéridos en el hígado de ratones hApoE2 KI/PPARalfa KO (Fig. 4D).

10 En conjunto, estos resultados pusieron de relieve las propiedades anti-inflamatorias, anti-esteatósicas y anti-fibróticas específicas del hígado del Compuesto 29 del documento WO2004/005233 (incluido en la Fórmula General I y II) y el Compuesto 1 del documento WO2007/147879 (incluido en la Fórmula General (I) y (IV)) *in vivo*.

Un modelo adicional para someter a ensayo los compuestos de Fórmula General (I) son modelos animales nutricionales de EHNA tales como el modelo carente de metionina y colina (MCD) que se basa en una dieta que
15 tiene un alto contenido de sacarosa y grasa, pero que carece de dos componentes, metionina y colina que son factores esenciales para el metabolismo del hígado. Los ratones o ratas alimentadas con esta dieta desarrollan rápidamente la inflamación hepática, que adicionalmente evoluciona a esteatosis, inflamación necrótica, fibrosis, y estrés oxidativo. Este enfoque se ha utilizado para demostrar los efectos terapéuticos potenciales sobre la esteatosis hepática, la fibrosis, el estrés oxidativo, y/o la inflamación que están asociados a la administración de compuestos
20 tales como la Rosiglitazona (Tahan V., et al. 2007), el inhibidor de caspasas VX-166 (Witek R et al., 2009), la Zeaxantina (Chamberlain S et al., 2009), el Telmisartan (Kudo H et al., 2009) o Wy-14,643 (Ip E et al., 2004).

Los compuestos de Fórmula General (I) se pueden someter a ensayo en un modelo MCD establecido en ratas Sprague Dawley macho (8 semanas de edad) o ratones C57Bl6 que se alimentaron con una dieta carente de metionina y colina durante 4 a 12 semanas. El tratamiento con los compuestos de interés, incluyendo los
25 compuestos que se eligen como control negativo o positivo, se administra diariamente a dosis diferentes a grupos de diez o más animales por sonda durante las siguientes 4 a 12 semanas. Se pueden realizar varios tipos de mediciones antes, durante, o al final del tratamiento, con o sin sacrificar los animales. Las dosificaciones bioquímicas (actividades aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, colesterol LDL/HDL, hialuronato en suero, triglicéridos hepáticos y triglicéridos en plasma) y el análisis histomorfométrico (para
30 determinar la zona del hígado que presentan fibrosis y/o esteatosis) son las mediciones más relevantes. También se puede evaluar la dosificación de los marcadores inflamatorios (como las interleuquinas 1a, 1b, 2, 4, 6, 10, Interferón gamma o TNF) y/o de la expresión de genes relevantes (tales como colágeno de tipo I o receptores de quimioquinas específicos del hígado).

Alternativamente, los modelos animales basados en la fibrosis hepática inducida químicamente se pueden utilizar
35 para estudiar el efecto antifibrótico de los compuestos de Fórmula General (I). Por ejemplo, la administración de tioacetamida (TAA) o tetracloruro de carbono (CCl₄) induce un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que promueven la peroxidación de lípidos, la proliferación de células estrelladas hepáticas y la hiperproducción de colágeno, que conduce a lesión hepática crónica y fibrosis en ratas. Este enfoque se ha usado para mostrar el efecto positivo sobre la fibrosis hepática, el estrés oxidativo, y/o la inflamación con compuestos tales como curcumina (Fu Y
40 et al., 2008) o pioglitazona (Yuan G et al., 2004).

Los compuestos de Fórmula General (I) pueden ser sometidos a ensayo en un modelo de CCl₄ que se establece en ratas Sprague Dawley (8 semanas de edad) que reciben dosis crecientes de CCl₄ por vía intraperitoneal diluido en parafina líquida (50%) cada cinco días de 4 a 12 semanas. También se puede administrar Fenobarbital partiendo de
45 10 días antes de la primera dosis de CCl₄ con el fin de potenciar el modelo. El tratamiento con los compuestos de interés, incluyendo los compuestos que son elegidos como control negativo o positivo, se administra a continuación diariamente a dosis diferentes (comprendidas entre 0,01 y 100 mg/kg/día) a grupos de diez o más ratas mediante sonda durante las siguientes 4 a 12 semanas. Como en el modelo MCD, se pueden realizar varios tipos de mediciones antes, durante, o al final del tratamiento, con o sin sacrificar las ratas, para evaluar la eficacia del
50 tratamiento sobre la base de dosificaciones bioquímicas y análisis histomorfométricos, asociados con los índices hemodinámicos y la dosificación de los marcadores inflamatorios y/o de la expresión de genes relevantes.

Los modelos animales descritos anteriormente permiten la comparación de las actividades específicas del hígado de los compuestos de Fórmula General (I) entre ellos y con los compuestos ya conocidos por tener propiedades terapéuticas específicas del hígado (y, en particular específicas de EHNA/EHNA). En particular, los datos mostrados en este Ejemplo sugieren la superioridad de los compuestos de Fórmula General (I) en comparación con
55 los compuestos de referencia.

Ejemplo 3: modelos *in vitro* y *in vivo* para someter a ensayo las propiedades específicas del hígado de los compuestos de Fórmula General (I)

Se han establecido algunos modelos *in vitro/ex vivo* para el escrutinio de compuestos que pueden tener un efecto positivo sobre la fibrosis hepática, el estrés oxidativo, y/o la inflamación hepática. De hecho, un acontecimiento clave en la fibrosis hepática es la activación de las células estrelladas hepáticas (HSC). Después del daño de los hepatocitos, este tipo de célula se activa y comienza a proliferar (Sato M et al., 2003). Las HSC activadas (por ejemplo, HSC de rata o humanas aisladas de hígados o línea celular HSC-T6 de rata) se pueden activar y producir cantidades excesivas de compuestos de la matriz extracelular e inhibidores de la degradación de la matriz. Este enfoque se ha utilizado para mostrar el efecto positivo de compuestos tales como la curcumina (Xu et al., 2003), las tiazolidinodionas (Miyahara T et al., 2000), o el 17 beta-estradiol (Liu Q et al., 2004).

Los modelos *in vitro/ex vivo* descritos anteriormente permiten la comparación de las actividades específicas del hígado de los compuestos de Fórmula General (I) entre ellos y con los compuestos que se sabe que tienen propiedades terapéuticas específica del hígado (y, en particular, específicas de EHGA/EHNA).

REFERENCIAS

Angulo P et al., 2002. Best Pract Res Clin Gastroenterol; 16: 797-810.

Basasaranoglu, M et al., 2010. Mundial J Gastroenterol; 16: 2223-6.

Chamberlain S et al., 2009. Dig Dis Sci; 54: 1460-4.

Dowman JK et al, 2010, QJ Med; 103: 71-83

Fan J y L Qiao, 2009. Hepatobil Pancreat Dis Int.; 8: 233-240.

Fu Y et al., 2008. Mol Pharmacol, 73: 399-409.

Gressner A et al., 2009. World J Gastroenterol; 15: 2433-2440.

Ip E et al., 2004. Hepatology; 39: 1286-1296.

Kudo H et al., 2009. Liver Int.; 29: 988-96.

Larter C et al., 2008. J Gastroenterol Hepatol; 23: 1635-1648.

Lee S et al., 1995. Mol Biol. Cell; 15: 3012-22.

Liu Q et al., 2004. World J Gastroenterol; 10: 1315-1320.

Marchesini G y al.2003. Hepatology; 37:917-923.

Miyahara T et al., 2000. J Biol Chem; 275: 35715-22.

Nan Y et al., 2009. Scand J Gastroenterol, 44, 1121-1131.

Nelson A et al., 2009. J Clin Gastroenterol; 43: 990-994

Neuschwander-Tetri et al., 2003. Hepatology; 38: 1008-1017.

Sato M et al., 2003. Cell Struct Funct; 28: 105-12.

Shiri-Sverdlov R et al., 2006. J Hepatol; 44: 732-41.

Sullivan P et al, J Clin Invest; 102: 130-5.

Tahan V et al, 2007 Dig Dis Sci; 52: 3465-3472.

Vuppalanchi R y Chalasani N, 2009. Hepatology; 49: 306-317.

Witek R et al., 2009. Hepatology; 50:1421-30.

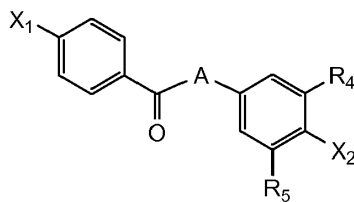
Xu et al., 2003. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol; 285: G20-G30.

Yeh M et al., 2007. Am J Clin Pathol; 128:837-847.

Yuan G et al., 2004. World J Gastroenterol; 10: 1047-1051.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula General (I)



en la que:

- 5 X1 representa un halógeno, un grupo R1, o G1-R1;
A representa un grupo CH=CH o un grupo CH2-CH2;
X2 representa un grupo G2-R2;
G1 y G2, idénticos o diferentes, representan un átomo de oxígeno o de azufre;
- 10 R1 representa un grupo alquilo no sustituido, un grupo arilo o un grupo alquilo que está sustituido con uno o más átomos de halógeno, un grupo alcoxi o un grupo alquiltio, grupos cicloalquilo que están sustituidos o no con uno o más átomos de halógeno, grupos cicloalquiltio o grupos heterocíclicos;
- R2 representa un grupo alquilo sustituido con al menos un grupo -COOR3, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo que está sustituido o no con uno o más átomos de halógeno, grupos cicloalquilo o grupos heterocíclicos.
- 15 R4 y R5, idénticos o diferentes, representan un grupo alquilo lineal o ramificado no sustituido que tiene de uno a cuatro átomos de carbono;

para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en fibrosis hepática o una enfermedad de hígado graso.

20 2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la fórmula general (I) en la que:

- X1 representa un halógeno, un grupo R1, o G1-R1;
A representa un grupo CH=CH;
X2 representa un grupo G2-R2;
G1 y G2, idénticos o diferentes, representan un átomo de oxígeno o de azufre;
- 25 R1 representa un grupo alquilo o cicloalquilo que tiene de uno a siete átomos de carbono, en particular, estando el grupo alquilo o cicloalquilo sustituido o no con uno o más átomos de halógeno;
- R2 representa un grupo alquilo sustituido con un grupo -COOR3, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.
- R4 y R5 representan un grupo alquilo no sustituido que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

30 3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la fórmula general (I) en la que:

- X1 representa un grupo R1 o G1-R1;
A representa un grupo CH2-CH2;
X2 representa un grupo G2-R2;
- 35 G1 representa un átomo de oxígeno o de azufre y G2 representa un átomo de oxígeno;
- R1 representa un grupo alquilo o cicloalquilo que tiene de uno a siete átomos de carbono;
- R2 representa un grupo alquilo sustituido con al menos un grupo -COOR3, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono;

R4 y R5 representan un grupo alquilo no sustituido que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

4. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la fórmula general (I) en la que:

X1 representa un átomo de halógeno o un grupo R1 o G1-R1;

5 A representa un grupo CH₂-CH₂;

X2 representa un grupo G2-R2;

G1 representa un átomo de oxígeno o de azufre y G2 representa un átomo de oxígeno;

R1 representa un grupo alquilo o cicloalquilo que está sustituido con uno o más átomos de halógeno;

10 R2 representa un grupo alquilo sustituido o no con uno o más átomos de halógeno y sustituido con al menos un grupo -COOR₃, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

R4 y R5 representan un grupo alquilo no sustituido que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

15 5. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde G2 es un átomo de oxígeno y R2 es un grupo alquilo sustituido con un grupo -COOR₃, en donde R3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo lineal o ramificado no sustituido que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

6. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde X1 es un grupo alquiltio que comprende un grupo alquilo que es lineal o ramificado, que tiene de uno a siete átomos de carbono que está sustituido o no con uno o más átomos de halógeno.

20 7. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto se selecciona en el grupo que consiste en 1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-isopropiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-trifluorometilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-trifluorometilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-trifluorometiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-terc-butiloxycarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-trifluorometiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico, y éster isopropílico de ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxopropil]fenoxi]-2-metilpropanoico.

8. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto se administra combinado con metformina, insulina, tiazolidinodionas, glitazonas, o estatinas.

30 9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula General (I) como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en un método para el tratamiento de un trastorno hepático seleccionado del grupo que consiste en fibrosis hepática o una enfermedad de hígado graso.

35 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en donde dicha composición se formula en forma de suspensiones inyectables, geles, aceites, píldoras, supositorios, polvos, cápsulas de gel, cápsulas, aerosoles o por medio de formas galénicas o dispositivos que aseguran una liberación prolongada y/o lenta.

11. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 o 10, para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad de hígado graso seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de hígado graso no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, y enfermedad de hígado graso asociada a hepatitis, obesidad, resistencia a insulina o hipertrigliceridemia.

40

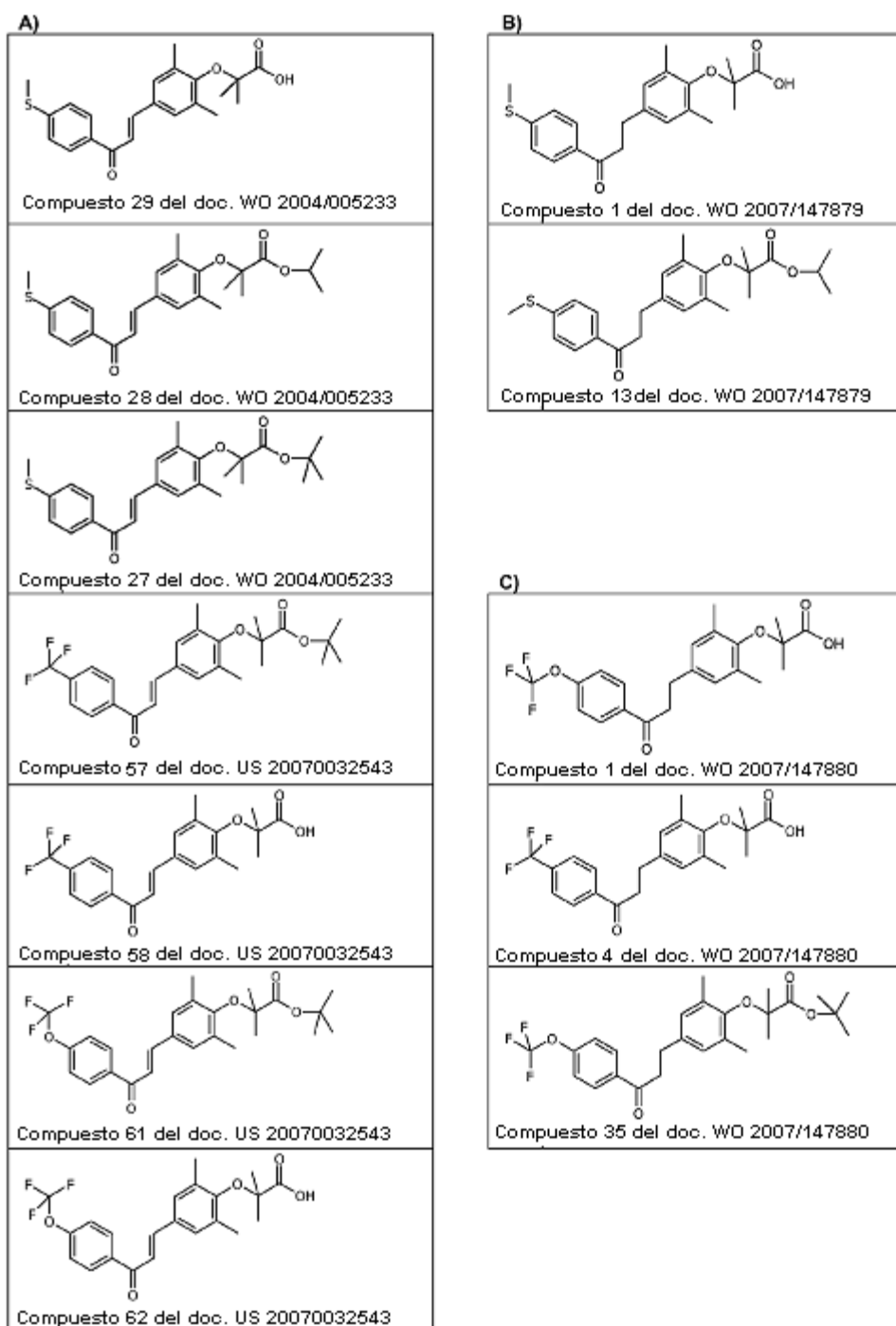
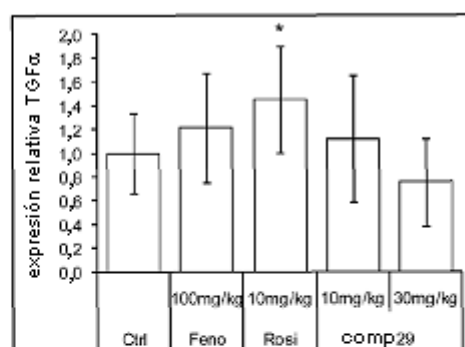
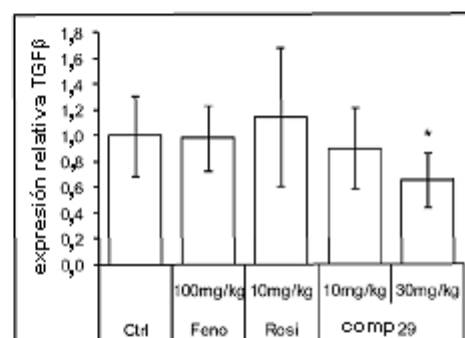


Figura 1

A)



B)



C)

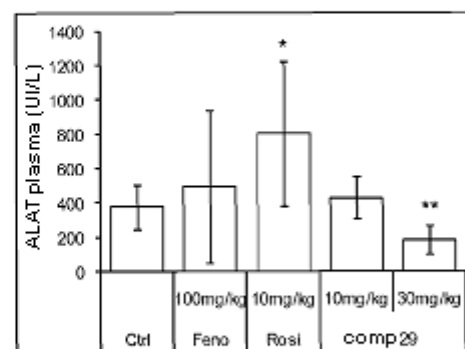
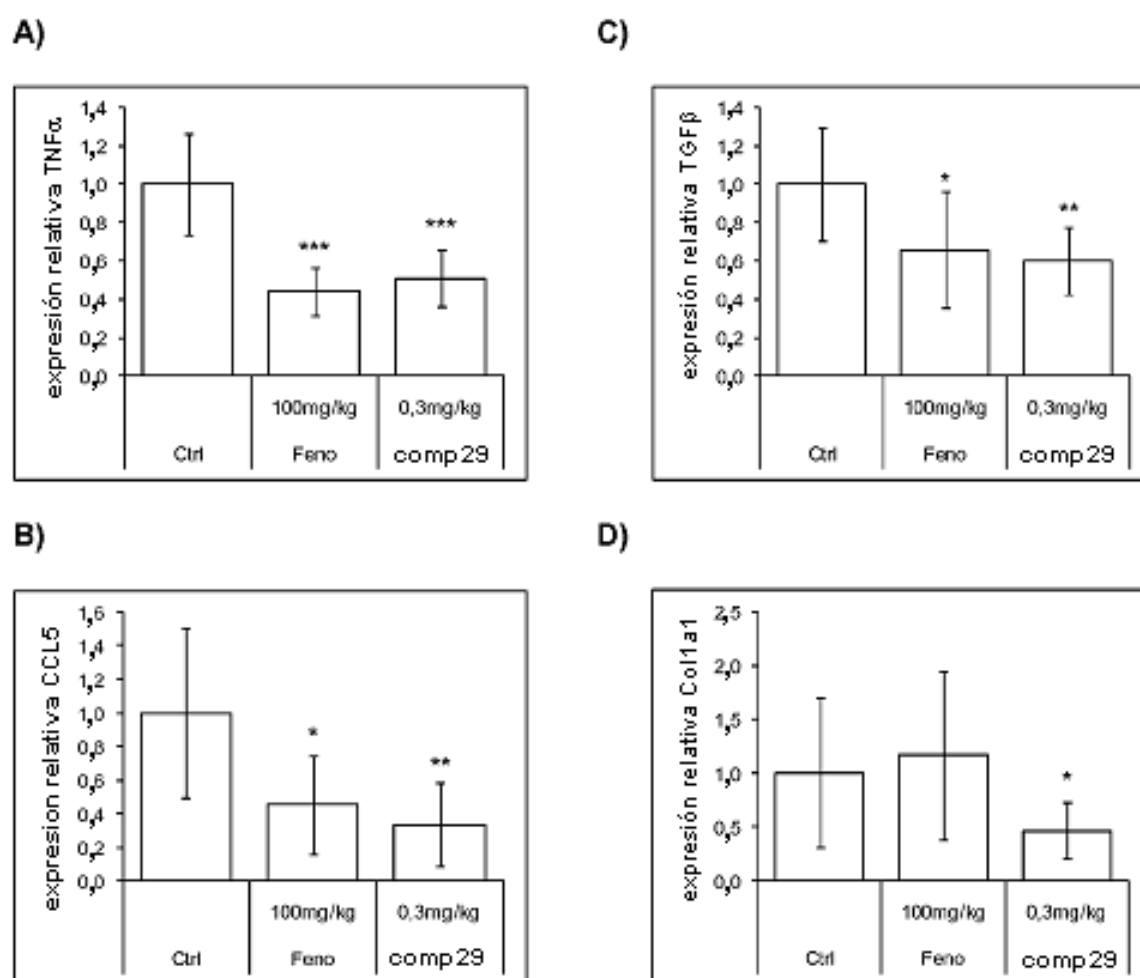
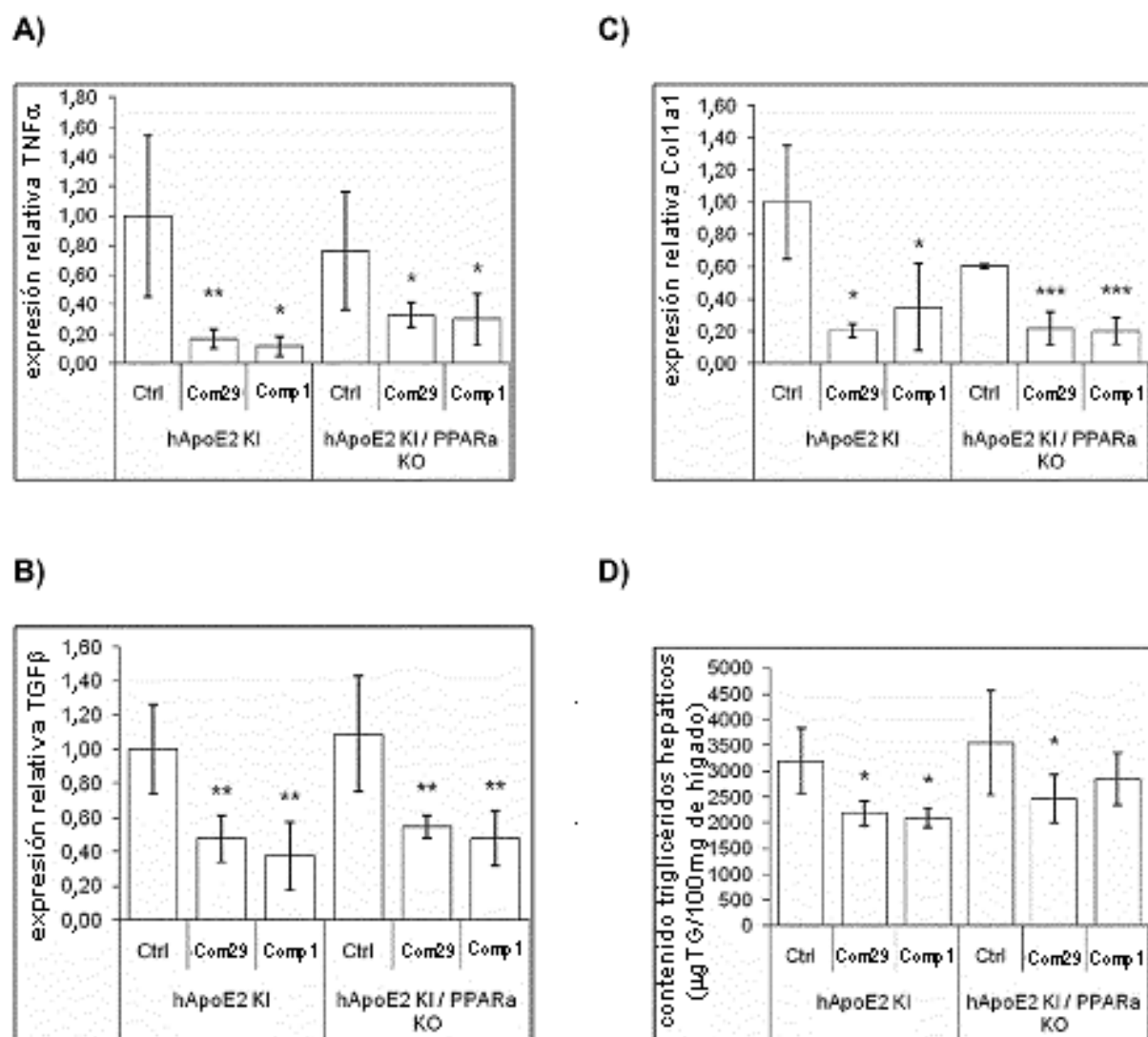


Figura 2

**Figura 3**

**Figura 4**