

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 040**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61K 31/7048** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 35/04** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2008 E 08772950 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2163247**

54 Título: **Uso de naringenina y de naringina como inhibidores de la ruta de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1**

30 Prioridad:

**13.06.2007 CN 200710118871**

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

**06.11.2014**

73 Titular/es:

**THE INSTITUTE OF BIOPHYSICS CHINESE  
ACADEMY OF SCIENCES (50.0%)  
15, Datun Road Chaoyang District  
Beijing 100101, CN y  
HENAN TOPFOND PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIANG, WEI;  
DU, GANGJUN;  
ZHANG, HONGYAN;  
JIN, LINGTAO;  
LV, HEPING;  
WANG, WEI;  
LIU, JINPING y  
JIAO, GUOHUA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 519 040 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

5      Uso de naringenina y de naringina como inhibidores de la ruta de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$ .

5      **Campo técnico**

10     La invención se refiere al uso de naringenina y de naringina, en particular a su uso como inhibidores de la ruta de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la fibrosis pulmonar y de las metástasis de tumores pulmonares.

15     **Antecedentes de la técnica**

15     La fibrosis es la base patológica común de varias enfermedades crónicas, y una etapa intermedia importante en la esclerosis de tejidos y órganos, e incluso de la carcinogénesis. La fibrosis se refiere fundamentalmente a los procesos patológicos en los que varios factores patógenos estimulan la citoclasia en tejidos y vísceras, y la matriz extracelular (ECM) aumenta anormalmente y se deposita en exceso en los tejidos. Se caracteriza por la proliferación y la precipitación de una gran cantidad de tejidos fibróticos, y un aumento de 4 ~ 7 veces en el contenido en colágeno [Won-I1 Jeong et al., *Hepatology*, 44 (6): 1441 - 1451, (2006)]. Durante la fibrosis de tejidos y órganos, los fibroblastos son las bases de varias presentaciones de fibrosis locales. Los fibroblastos activados tienen una capacidad muy fuerte para producir y recombinar colágeno. Algunas citocinas del tejido dañado y de aparición en la inflamación, tales como la molécula de adhesión celular 1, el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento de tejido conectivo etc., modulan la activación de los fibroblastos [Jurgen J. W. et al., *Annals of Surgery*, 242 (6): 880 - 887, (2005)]. Muchos estudios han demostrado que el TGF- $\beta$  representaba un papel crítico en los procesos de fibrosis, especialmente en un proceso de fibrosis patológica. El TGF- $\beta$  no solo activa directamente la transformación de los fibroblastos estáticos en miofibroblastos, sino que también induce la producción de PDGF y la expresión de los receptores de los mismos en los fibroblastos, lo que indirectamente estimula la proliferación y la activación de los fibroblastos, promueve la síntesis de matriz extracelular tal como colágeno, fibronectina y proteoglucano etc. por parte de los fibroblastos y aumenta la síntesis de ECM [Victorino R. Briones et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 345 (2): 595 - 601, (2006)]. Además, el TGF- $\beta$  da como resultado un fallo en la degradación normal de la ECM al regular por disminución la expresión de la MMP, y también suprime la degradación y acelera la acumulación de ECM al regular por aumento la expresión de PAI y de TIMP, dando lugar así finalmente a la aparición de una fibrosis. Por lo tanto, la inhibición del TGF- $\beta$  puede prevenir y tratar las enfermedades fibróticas [Christelle Guyot et al., *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38: 135 - 151, (2006)].

35     El TGF- $\beta$  no solo es un regulador clave de la formación de fibrosis, sino también un moderador muy fuerte del crecimiento, la diferenciación y la migración de las células. También representa un importante papel en la aparición, el desarrollo y la metástasis de tumores. Algunos estudios clínicos han demostrado que la sobreexpresión del TGF- $\beta 1$  estaba asociada al menos con la patogénesis de tumores tales como el cáncer de mama humano, el cáncer rectal, el cáncer de esófago, el cáncer de estómago, el cáncer de hígado, el cáncer de pulmón, el cáncer de páncreas, particularmente la sobreexpresión del TGF- $\beta 1$  estaba relacionada con el desarrollo y la metástasis de tumores, la neovascularización y el mal pronóstico [Brian Bierie et al., *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17: 29 - 40, (2006)]. El TGF- $\beta$  tiene una acción hasta cierto punto inhibidora del crecimiento tumoral al comienzo de la carcinogénesis, pero posteriormente cambia hacia la promoción del desarrollo del tumor, que se muestra en 3 aspectos: 1) haciendo que las células pierdan el control sobre la inhibición del crecimiento; 2) permitiendo que las células tumorales consigan una metástasis; 3) permitiendo que las células tumorales escapen a la inmunovigilancia. El principal mecanismo para permitir que las células tumorales escapen de la inmunovigilancia es que el TGF- $\beta 1$  inhibe la producción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) de diferentes maneras durante las fases de inicio y de memoria de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Por lo tanto, la supresión del TGF- $\beta$  también puede prevenir y tratar enfermedades tumorales [Brian Bierie et al., *Nature Reviews / Cancer*, 6: 506 - 520, (2006)].

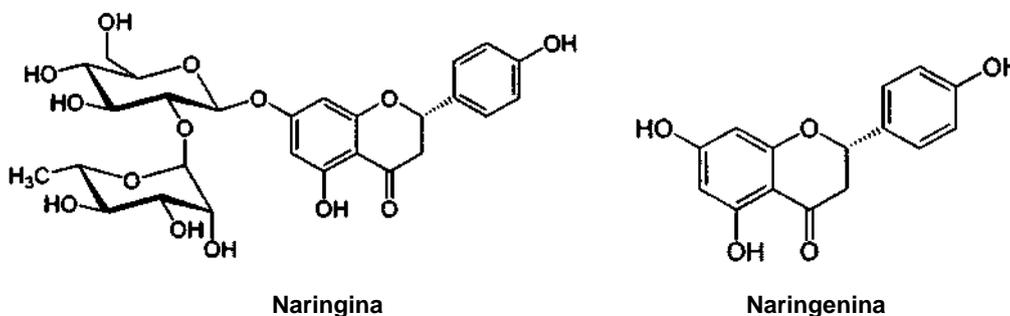
50     Durante los últimos pocos años, la aparición del concepto de fibroblastos relacionados con el cáncer nos condujo a apreciar la correlación entre las afecciones fibróticas y la carcinogénesis [Akira Orimo et al., *Cell Cycle*, 5 (15): 1597 - 1601, (2006)]. Mediante una investigación, los presentes inventores averiguaron que la fibrosis proporcionaba un microentorno adecuado para el desarrollo de tumores, y que la ruta de señalización del TGF- $\beta$  juega un importante papel en ese proceso.

60     Actualmente, las terapias dirigidas a la ruta de señalización del TGF- $\beta$  incluyen inmunocomponentes alterados, inhibidores de moléculas pequeñas, proteínas solubles e inhibidores complejos antisentido. Sin embargo, todavía no hay comercializado un medicamento interferente de la ruta de señalización del TGF- $\beta$ , y no hay ningún medicamento ideal para el tratamiento clínico de la fibrosis, excepto el clásico IFN- $\gamma$  recombinante [Eiji Suzuki et al., *Cancer Res*, 67 (5): 2351 - 2359 (2007)].

65     Los flavanoides son ingredientes eficaces que existen habitualmente en la medicina tradicional china. Tienen varias funciones farmacológicas, tales como antibacterianas, antiinflamatorias, limpiadoras de radicales libres y antitumorales, etc. [Mouming Zhao et al., *International Immunopharmacology*, 7: 162 - 166 (2007)].

La naringina, también denominada aurantiina, tiene la fórmula  $C_{27}H_{32}O_{14}$ , un peso molecular de 580,53, existe principalmente en el pericarpo y la pulpa de las Rutáceas, tales como el pomelo, la mandarina y la naranja, y también es el principal ingrediente eficaz de la medicina herbaria china tal como el rizoma de *Drynaria fortunei*, *Fructus Aurantii Immaturus*, *Fructus Aurantii seu ponciri*, *Exocarpium Citri Rubrum*. Se ha notificado que una inyección subcutánea de 100 mg/kg de naringina da como resultado una evidente función antiinflamatoria, y que 200 mg/l de naringina suprimen fuertemente los virus de la estomatitis vesicular en ratas. La naringina también puede disminuir la viscosidad de la sangre, reducir la formación de trombos, tiene efectos analgésicos y sedantes, así como una importante función en el aumento de la secreción biliar en animales de experimentación. La naringina también tiene muchas características tales como desensibilizante, anti-sensibilidad, promueve la circulación sanguínea, alivia los espasmos musculares, mejora la microcirculación tópica y el suministro de nutrientes, dando así como resultado algunos efectos curativos únicos, tales como la promoción de la evacuación de medicinas, la eliminación de las lesiones causadas por la estreptomycin en el octavo par craneal, y el alivio de los efectos secundarios perjudiciales de la estreptomycin [Bok, S. H et al., Nutr. Res. 20, 1007 - 1015 (2000)].

La naringenina, el aglicón de la naringina, es la fracción estructural farmacológicamente funcional de la naringina. La naringenina tiene la fórmula  $C_{15}H_{12}O_5$ , un peso molecular de 272,25, y también tiene funciones tales como antibacteriana, antiinflamatoria, antiespasmódica y efecto colagogo, etc. [Chul-Ho Lee et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 284, 681 - 688 (2001)]. Las estructuras de la naringenina y de la naringina son como sigue:



El documento WO 01/51043 desvela el uso de naringenina, sola o junto con otros agentes naturales, en el tratamiento y la prevención del cáncer, tal como el cáncer de pulmón y el cáncer de hígado, mediante la destrucción de las células cancerosas.

### Divulgación de la invención

Los presentes inventores averiguaron en primer lugar que los compuestos de moléculas pequeñas flavonoides naturales, es decir la naringenina y la naringina, existen habitualmente en los limones, los pomelos y las naranjas, etc., podrían inhibir la ruta de señalización del TGF- $\beta$ , aumentando así el nivel sérico del IFN- $\gamma$ . Los experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* demostraron que la naringenina y la naringina poseían funciones terapéuticas y profilácticas en la fibrosis y en los tumores. La potencial aplicación clínica de la naringenina y de la naringina se investigó adicionalmente de forma intensiva.

La divulgación detallada de la invención es como sigue:

(1) El uso de naringenina y de naringina como inhibidores de la ruta de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la fibrosis pulmonar o de la metástasis de tumores pulmonares.

(2) El uso de acuerdo con (1), en el que el intervalo de dosis eficaces de dichos inhibidores de la ruta de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta$  para tratar o prevenir la fibrosis en el animal es de 10 - 300 mg/kg de peso corporal/día por vía oral, de 4 - 200 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección subcutánea, de 1 - 30 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección intravenosa, preferiblemente de 50 - 200 mg/kg de peso corporal/día por vía oral, de 10 - 100 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección subcutánea, de 5 - 20 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección intravenosa; su intervalo de dosis supuestamente eficaz en el ser humano es de 0,8 - 24 mg/kg de peso corporal/día por vía oral, de 0,2 - 6 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección subcutánea, de 0,8 - 4 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección intravenosa, preferiblemente de 4 - 12 mg/kg de peso corporal/día por vía oral; de 0,6 - 2 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección subcutánea; de 0,1 - 0,4 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección intravenosa.

La invención descubre que la naringenina y la naringina pueden usarse para el tratamiento o la prevención de la fibrosis pulmonar y de metástasis de tumores pulmonares como inhibidores de la ruta de señalización del TGF- $\beta$ 1. En segundo plano, la naringenina inhibe la proliferación de las células estrelladas hepáticas de las ratas y la

secreción de la matriz celular y el colágeno de las mismas (véanse la figura 1 y la figura 2). La naringenina inhibe drásticamente la proliferación de las células estrelladas hepáticas y suprime significativamente la expresión del inhibidor de la activación del plasminógeno 1 (PAI-1), la fibronectina (FN) y el colágeno 1  $\alpha$  (Co 1 Ialfa1) en ratas. Los resultados descritos anteriormente indican que la naringenina posee una potencial función antifibrótica.

5 La naringenina realiza una función protectora de los daños hepáticos (fibrosis) causados por el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). El tamaño de un hígado refleja directamente la extensión de la tumefacción por daños en el hígado. Unas dosis altas y medias de naringenina inhiben claramente la extensión de los hígados en ratones con una fibrosis hepática provocada por CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,01$ , véase la figura 3). El MDA (malondialdehído) es el producto del daño peroxidativo lipídico en los organismos. El alto contenido en MDA indica la mayor extensión del daño de los organismos. Unas dosis altas, medias y bajas de naringenina reducen de forma evidente el nivel sérico de MDA en los ratones con una fibrosis hepática causada por CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,05$ , véase la figura 4); la CAT (catalasa) y la POD (peroxidasa) eliminan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y reducen los daños propios en los organismos. El aumento en la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* es el factor esencial para la aparición de las actividades de CAT y de POD. Unas dosis altas, medias y bajas de naringenina reducen, todas, las excitabilidades séricas de la CAT y de la POD en los ratones con una fibrosis hepática causada por CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,05$ , véase la figura 4). Los datos demuestran que la naringenina reduce los radicales libres *in vivo*.

20 Las actividades de la ALT (aminotransferasa de alanina) y de la AST (aminotransferasa de aspartato) reflejan directamente la extensión de los daños de los hígados, en las que las mayores actividades indican el mayor daño a los hígados. Unas dosis altas, medias y bajas de naringenina reducen todas el aumento de los niveles séricos de la ALT y de la AST en los ratones con una fibrosis hepática causada por CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,01$ , véase la figura 5). Los resultados anteriores indican que la naringenina realiza una evidente función protectora de los daños hepáticos (fibrosis) causados por el CCl<sub>4</sub> en ratones.

25 Además, las terapias con 3 dosis de naringenina, es decir 200, 100, 50 mg/kg de peso corporal/día por vía oral, 20, 10, 5 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección intravenosa, o 40, 20, 10 mg/kg de peso corporal/día mediante inyección subcutánea, y la misma dosis molar de naringina inhibieron, todas, significativamente el crecimiento de tumores subcutáneos de cáncer hepático H22 en ratones ( $P < 0,01$ , véanse la figuras 6, 7 y 8).

30 Los tres grupos de dosis de naringenina pueden disminuir las metástasis pulmonares del cáncer de pulmón de Lewis ( $P < 0,05$ , véase la figura 9) y ralentizar el crecimiento de los tumores metastásicos pulmonares ( $P < 0,01$ , véase la figura 10), lo que indica que la naringenina posee una función antimetastásica tumoral.

35 La naringenina suprime significativamente el nivel sérico del TGF- $\beta$ 1 ( $P < 0,01$ , véase la figura 11), y aumenta notablemente el nivel sérico del IFN- $\gamma$  ( $P < 0,05$ , véase la figura 12) en los ratones con una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. La naringenina previene el aumento de los Treg en el tejido pulmonar de los ratones con una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina ( $P < 0,05$ , véase la figura 13), y aumenta por lo tanto el IFN- $\gamma$  en el tejido pulmonar de los ratones con fibrosis pulmonar ( $P < 0,05$ , véase la figura 14). La naringenina también inhibe la metástasis pulmonar de tumores en los ratones con una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina ( $P < 0,01$ , véase la figura 15), por lo que prolonga el periodo de supervivencia de los ratones con una fibrosis pulmonar después de que los tumores pulmonares hayan metastatizado ( $P < 0,01$ , véase la figura 16). Estos resultados indican que la naringenina puede tratar la fibrosis y disminuir los tumores mediante una reducción en los niveles del TGF- $\beta$ 1 e induciendo la producción de IFN- $\gamma$  tanto en el suero como en los tejidos. También, la naringenina reduce el nivel sérico del MDA en ratones ( $P < 0,01$ , véase la figura 12). Tomados conjuntamente, a la vista de la divulgación anterior, los efectos beneficiosos de la invención pueden resumirse en los siguientes aspectos:

50 1) la naringenina y la naringina realizan funciones terapéuticas o profilácticas en la fibrosis pulmonar causada por bleomicina en ratones, disminuyendo así evidentemente la extensión de la fibrosis pulmonar, y evitando que los pulmones se dañen.

2) la naringenina y la naringina inhiben claramente la metástasis de cáncer de pulmón de Lewis en ratones, reduciendo así la incidencia de metástasis de cáncer de pulmón de Lewis, y restringiendo la tasa de crecimiento de los tumores metastásicos pulmonares.

55 3) la naringenina y la naringina reducen significativamente los niveles séricos aumentados de TGF- $\beta$ 1 y de MDA causados por la fibrosis en ratones, regulándolos así de nuevo a la normalidad, y también, la naringenina aumenta de nuevo claramente el nivel sérico disminuido del IFN- $\gamma$  causado por el TGF- $\beta$ 1.

### Breve descripción de los dibujos

60 La Figura 1 es una gráfica de curva que muestra la influencia de la naringenina sobre la proliferación de las células estrelladas hepáticas en ratas.

La Figura 2 es una gráfica de curva que muestra la influencia de la naringenina sobre la expresión y la secreción de la proteína colagenosa de la matriz celular, incluyendo el inhibidor de la activación del plasminógeno 1 (PAI-1), la fibronectina (FN) y el colágeno 1 $\alpha$  (Co1 Ialfa1).

65 La Figura 3 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre la tumefacción de los hígados de

ratones con una fibrosis hepática causada por  $\text{CCl}_4$ , en el que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina o de naringina, Nar (iv) representa la inyección intravenosa (iv) de naringenina o de naringina, y Nar (sc) representa la inyección subcutánea (sc) de naringenina o de naringina.

La Figura 4 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre los niveles séricos aumentados del MDA, de la CAT y de la POD en los ratones con una fibrosis hepática causada por  $\text{CCl}_4$ , en el que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina o de naringina, Nar (iv) representa la inyección intravenosa (iv) de naringenina o de naringina, y Nar (sc) representa la inyección subcutánea (sc) de naringenina o de naringina.

La Figura 5 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre el aumento de los niveles séricos de la ALT y de la AST en los ratones con una fibrosis hepática causada por  $\text{CCl}_4$ , en el que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina o de naringina, Nar (iv) representa la inyección intravenosa (iv) de naringenina o de naringina, y Nar (sc) representa la inyección subcutánea (sc) de naringenina o de naringina.

La Figura 6 es un diagrama de curva que muestra la influencia de la naringenina (ig) sobre el crecimiento de tumores subcutáneos de cáncer hepático H22 en ratones, en el que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina o de naringina.

La Figura 7 es un diagrama de curva que muestra la influencia de la naringenina (iv) sobre el crecimiento de tumores subcutáneos de cáncer hepático H22 en ratones, en el que Nar (iv) representa la inyección intravenosa de naringenina o de naringina.

La Figura 8 es un diagrama de curva que muestra la influencia de la naringenina (sc) sobre el crecimiento de tumores subcutáneos de cáncer hepático H22 en ratones, en el que Nar (sc) representa la inyección subcutánea de naringenina o de naringina.

La Figura 9 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre las metástasis de cáncer de pulmón de Lewis en ratones, en el que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina o de naringina, Nar (iv) representa la inyección intravenosa (iv) de naringenina o de naringina, y Nar (sc) representa la inyección subcutánea (sc) de naringenina o de naringina.

La Figura 10 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre el crecimiento de tumores tras la metástasis del cáncer de pulmón de Lewis en ratones, en el que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina o de naringina, Nar (iv) representa la inyección intravenosa (iv) de naringenina o de naringina, y Nar (sc) representa la inyección subcutánea (sc) de naringenina o de naringina.

La Figura 11 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre el aumento del nivel sérico del  $\text{TGF-}\beta 1$  en los ratones con una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, en el que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina o de naringina, Nar (iv) representa la inyección intravenosa (iv) de naringenina o de naringina, y Nar (sc) representa la inyección subcutánea (sc) de naringenina o de naringina.

La Figura 12 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre la disminución de los niveles séricos del  $\text{IFN-}\gamma$  y el aumento de los niveles séricos de MDA en ratones inducidos por bleomicina, en el que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina o de naringina, Nar (iv) representa la inyección intravenosa (iv) de naringenina o de naringina, y Nar (sc) representa la inyección subcutánea (sc) de naringenina o de naringina.

La Figura 13 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre el aumento de los Treg en el tejido pulmonar en los ratones con una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, en el que la figura 13a presenta el porcentaje de células Treg, la figura 13b presenta una intensidad media (fluorescencia) de células que expresan Foxp3. Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina.

La Figura 14 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre la disminución del  $\text{IFN-}\gamma$  en el tejido pulmonar en los ratones con una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, en el que la figura 14a es un histograma del porcentaje de células que muestran expresión del  $\text{IFN-}\gamma$  de los linfocitos CD4+ y CD8+ de los tejidos pulmonares de ratones, la figura 14b es un histograma de intensidad media (fluorescencia) que muestra la expresión del  $\text{IFN-}\gamma$  de los linfocitos CD4+y CD8+ en tejidos pulmonares de ratones, Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina.

La Figura 15 es un histograma que muestra la influencia de la naringenina sobre la metástasis pulmonar de tumores en los ratones con una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, en el que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina.

La Figura 16 es una gráfica de curva que muestra la influencia de la naringenina sobre el periodo de supervivencia de los ratones con fibrosis pulmonar y tumores metastásicos pulmonares, en la que Nar (ig) representa la administración intragástrica de naringenina.

### Modo de llevar a cabo la invención

La naringenina y la naringina de la invención pueden usarse como inhibidores de la ruta de señalización del  $\text{TGF-}\beta 1$ , para tratar o prevenir la fibrosis pulmonar o la metástasis de tumores pulmonares. Se proporcionan otras revelaciones como antecedentes. En la invención se ensayaron las actividades antifibróticas y antitumorales de la naringenina y de la naringina. La naringina tiene unas funciones comparables a las de la naringenina con la misma dosis molar, por lo que solo se ensayó la naringenina en los siguientes ejemplos. La naringenina y la naringina de la invención se adquirieron ambas comercialmente en Shanxi Huike Botanic Development Ltd.

**Ejemplo 1. Influencia de la naringenina sobre la proliferación de las células estrelladas hepáticas y la secreción de la matriz extracelular en ratas.**

**Métodos:** se cultivaron células estrelladas hepáticas (HSC-T6, célula estrellada hepática, proporcionada por el Prof. Friedman, The Medical Center of Mount Sinai, EE.UU.) en medio RPMI1640 (Sigma Co.) que contenía un 10 % de suero bovino fetal (PPA Co., EE.UU.), 100 U/ml de cada una de penicilina y estreptomycin, al 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37 °C (estufa de incubación modelo FIL-TER, Thermo Co. Alemania). Después de que las células con una abundancia del 90 % se digirieran con un 0,25 % de tripsina, el número de células se ajustó a 5 x 10<sup>4</sup>/ml. Las células se incuban en una placa de cultivo de 96 pocillos, a 100 µl/pocillo. Las células se cultivaron adherentemente durante una noche, y después se añadió a la placa el medio que contenía naringenina a diferentes concentraciones, a 100 µl/pocillo. Había 4 - 6 pocillos replicados para cada concentración. Después de cultivar las células otras 48 h, el medio se eliminó. A los pocillos se añadió solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0,5 mg/ml de MTT bromuro de (dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma Co.), a 100 µl/pocillo. Después de 4 h de cultivo se eliminó el MTT, y se añadió dimetilsulfóxido (DMSO), 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 590 nm mediante un fotómetro enzimático (modelo MK3, Thermo Co., Alemania). La absorbancia del pocillo de control (sin naringenina) era del 100 %. La proporción entre la absorbancia del pocillo tratado y del pocillo de control es el porcentaje de células supervivientes. La influencia de la naringenina sobre la proliferación de las células estrelladas hepáticas de rata se observó a partir de la representación de la curva de supervivencia celular. Para investigar la influencia de la naringenina sobre la secreción de matriz extracelular en las células estrelladas hepáticas de rata, se inocularon 2 x 10<sup>5</sup> células/ml en una placa de seis pocillos, con 3 pocillos replicados para cada pocillo. El procedimiento de tratamiento era el mismo que en la anterior placa de 96 pocillos. Después de 48 h de tratamiento, las células se digirieron con tripsina, se lavaron con PBS 3 veces. Posteriormente, se detectaron el colágeno 1a (Col Ialfa1, colágeno Iα1), la fibronectina (FN) y el inhibidor de la activación del plasminógeno 1 (PAI-1, inhibidor de la activación del plasminógeno 1) mediante un método de inmunotransferencia Western. La citocina recombinante humana TGF-β1 usada en este ejemplo se adquirió en R&D Co., EE.UU.

Los marcadores proteicos y las escalas proteicas se adquirieron en Bio-Rad Co., EE.UU. Todos los anticuerpos (incluyendo los anticuerpos primarios y secundarios) se adquirieron en Santa Cruz Biotech. Co., EE.UU.

**Resultados:** la proliferación activada de las células estrelladas hepáticas era la base de la formación de la fibrosis hepática, y la naringenina inhibió evidentemente la proliferación de las células estrelladas hepáticas en ratas (p < 0,05, véase la figura 1). El inhibidor de la activación del plasminógeno 1 (PAI-1), la fibronectina (FN) y el colágeno 1α (Col Ialfa1), secretados por las células estrelladas activadas, eran los materiales de la matriz requerida para la fibrosis. Estos tres tipos de matrices extracelulares eran regulados por disminución por la naringenina (véase la figura 2). Los anteriores resultados indicaron que la naringenina poseía una función antifibrótica.

**Ejemplo 2. Influencia de la naringenina sobre la fibrosis hepática causada por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) en ratones**

**Métodos:** se inyectaron s.c. ratones balb/c hembra (proporcionados por Beijing Weitonglihua Experimental Animal Co.) con CCl<sub>4</sub> al 10 % (tetracloruro de carbono), 0,2 ml/animal, dos veces por semana durante 4 semanas consecutivas, de forma que se estableciera un modelo de fibrosis hepática. A partir de la semana 2, a los grupos tratados se les administró intragástricamente (ig) una dosis alta (100 mg/kg), media (50 mg/kg) y baja (25 mg/kg) de naringenina (Nar), o se les inyectaron intravenosamente (iv) 5 mg/kg de naringenina (Nar) y se les inyectaron subcutáneamente (sc) 20 mg/kg de naringenina (Nar). Otro grupo de ratones sin un modelo de fibrosis establecido se usó como ratones de control normales. Había 10 ratones en cada grupo, y recibieron las dosis una vez al día, durante 3 semanas consecutivas. El día 28 se recogieron muestras sanguíneas de las venas orbitales y se detectó el índice sanguíneo. Después los ratones se sacrificaron y se extrajeron los hígados y se pesaron. En este ejemplo, los kits del MDA, de la CAT y de la POD se adquirieron en Nanjing Jiancheng Biotech. Co., China; los kits de la ALT y de la AST se adquirieron en Beijing Zhong-shengbeikong Biotech. Co., China.

**Resultados:** los tamaños de los hígados reflejaban directamente la extensión de la tumefacción por daños en el hígado. Unas dosis altas y medias de naringenina inhiben claramente la extensión de los hígados en ratones con una fibrosis hepática provocada por CCl<sub>4</sub>; y la naringenina administrada iv y sc también era eficaz (p < 0,01, véase la figura 3). El MDA (malondialdehído) era el producto del daño peroxidativo lipídico en los organismos. El alto contenido en MDA indicaba la mayor extensión del daño de los organismos. Unas dosis altas, medias y bajas de naringenina redujeron de forma evidente el nivel sérico de MDA en los ratones con una fibrosis hepática causada por CCl<sub>4</sub>; y la naringenina administrada iv y sc también era eficaz (p < 0,05, véase la figura 4). La CAT (catalasa) y la POD (peroxidasa) eliminaban el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y reducían los daños propios en los organismos. El aumento en la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* era el factor esencial para la aparición de las actividades de CAT y de POD. Unas dosis altas, medias y bajas de naringenina redujeron, todas, las excitabilidades séricas de la CAT y de la POD en los ratones con una fibrosis hepática causada por CCl<sub>4</sub>; y la naringenina administrada iv y sc también era eficaz (p < 0,05, véase la figura 4), lo que indirectamente demostró que la naringenina reducía los radicales libres *in vivo*. Las actividades de la ALT (aminotransferasa de alanina) y de la AST (aminotransferasa de aspartato) reflejaron directamente la extensión de los daños de los hígados, en las que las mayores actividades indican el mayor daño a los hígados. Unas dosis altas, medias y bajas de naringenina redujeron, todas, el aumento de los niveles séricos de

la ALT y de la AST en los ratones con una fibrosis hepática causada por CCl<sub>4</sub>; y la naringenina administrada iv y sc también era eficaz ( $p < 0,01$ , véase la figura 5). Los resultados anteriores indicaron que la naringenina realizaba una evidente función supresora de la fibrosis hepática causada por el CCl<sub>4</sub>.

### 5 **Ejemplo 3. Influencia de la naringenina sobre el crecimiento de los tumores subcutáneos de cáncer hepático H22 en ratones**

10 **Métodos:** los tumores subcutáneos de cáncer hepático H22 (proporcionados por el Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences) se suspendieron en PBS para elaborar una suspensión de células. Después de ajustar el número de células a  $5 \times 10^6$ /ml, la suspensión de células se inoculó subcutáneamente en las axilas de la extremidad anterior de ratones hembra balb/c, a 0,2 ml/animal. A partir del día siguiente a la inoculación de tumor, a los grupos tratados se les administraron intragástricamente (ig) dosis de 200 mg/kg, de 100 mg/kg y de 50 mg/kg de naringenina (Nar), se les inyectaron intravenosamente (iv) dosis de 20 mg/kg, de 10 mg/kg y de 5 mg/kg de naringenina (Nar) o se les inyectaron subcutáneamente (sc) dosis de 40 mg/kg, de 20 mg/kg y de 10 mg/kg de naringenina (Nar). Había 10 ratones en cada grupo, y recibieron las dosis una vez al día, durante 2 semanas consecutivas. Después de la carcinogénesis, el tamaño de los tumores se midió mediante el uso de un calibre vernier cada 3 días, y el volumen de los tumores se calculó como longitud x ancho x 0,5 ancho, para representar una curva de crecimiento del tumor.

20 **Resultados:** las dosis administradas ig o iv altas, medias y bajas de naringenina, y las mdosis administradas sc altas y medias de naringenina, inhibieron el crecimiento de los tumores subcutáneos de cáncer hepático H22 en los ratones ( $P < 0,01$  o  $P < 0,05$ , véanse la figuras 6, 7 y 8), lo que indica que la naringenina tiene una actividad antitumoral.

### 25 **Ejemplo 4. Influencia de la naringenina sobre la metástasis de cáncer de pulmón de Lewis**

30 **Métodos:** los tumores subcutáneos de cáncer de pulmón de Lewis de los ratones (proporcionados por el Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences) se suspendieron en PBS para elaborar una suspensión de células. Después de ajustar el número de células a  $1 \times 10^6$ /ml, la suspensión de células se inoculó iv en ratones hembra balb/c a 0,2 ml/animal. A partir del día siguiente a la inoculación de tumor, a los grupos tratados se les administraron intragástricamente (ig) una dosis alta (100 mg/kg), media (50 mg/kg) y baja (25 mg/kg) de naringenina (Nar), se les inyectaron intravenosamente (iv) 5 mg/kg de naringenina (Nar) o se les inyectaron subcutáneamente (sc) 20 mg/kg de naringenina (Nar). Había 10 ratones en cada grupo, y recibieron las dosis una vez al día, durante 3 semanas consecutivas. El día 22 después de la inoculación del tumor, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones y se pesaron. Se contó el número de nódulos tumorales visibles.

35 **Resultados:** las dosis altas y medias administradas de naringenina disminuyeron las metástasis del cáncer de pulmón de Lewis ( $P < 0,05$ , véase la figura 9) y ralentizaron el crecimiento de los tumores metastásicos pulmonares ( $P < 0,01$ , véase la figura 10), y la naringenina administrada iv o sc también era eficaz, lo que indica que la naringenina posee una función antimetastásica de los tumores.

### 40 **Ejemplo 5. Influencia de la naringenina sobre los niveles séricos de TGF- $\beta$ 1, de IFN- $\gamma$ y de MDA en ratones con fibrosis pulmonar causada por bleomicina**

45 **Métodos:** se anestesiaron ratones hembra balb/c con 30 mg/kg de pentobarbital sódico (0,3 %, 0,2 ml/animal), y el modelo de fibrosis pulmonar se estableció mediante la administración de 100  $\mu$ g de bleomicina/animal (productos de Cosmetics and Medication Corporation, Japón, 2  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ l/animal) mediante un goteo intranasal una sola vez. A partir del día siguiente a la inoculación del tumor, los grupos tratados se trataron con naringenina (Nar) ig (50 mg/kg), iv (5 mg/kg) o sc (20 mg/kg). Había 10 ratones en cada grupo, y recibieron las dosis una vez al día, durante 3 semanas consecutivas. El día 22 después del establecimiento del modelo, se extrajeron muestras de sangre y suero para detectar el TGF- $\beta$ 1, el IFN- $\gamma$  y el MDA mediante el uso de un kit de ELISA. Los kits de TGF- $\beta$ 1 y de IFN- $\gamma$  usados en este ejemplo fueron proporcionados por Genzima Co., EE.UU.

50 **Resultados:** el TGF- $\beta$ 1 (el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1) era la principal citocina para la formación de la fibrosis, y también el promotor de la carcinogénesis y del desarrollo del tumor. El IFN- $\gamma$  (interferón  $\gamma$ ) tenía una función opuesta a la del TGF- $\beta$ 1, reduciendo por tanto la fibrosis y evitando el crecimiento del tumor. Las 3 vías de administración de la naringenina inhibieron claramente el aumento del nivel sérico del TGF- $\beta$ 1 ( $P < 0,01$ , véase la figura 11), y promovieron la secreción del IFN- $\gamma$  ( $P < 0,05$ , véase la figura 12) en los ratones con una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, lo que indicaba que la naringenina era capaz de tratar las enfermedades fibróticas y tumorales mediante la inhibición del TGF- $\beta$ 1 y la inducción del IFN- $\gamma$ . También, la disminución en el nivel sérico del MDA resultante de la naringenina en los ratones ( $P < 0,01$ , véase la figura 12) era otra parte de las pruebas que demuestran que la naringenina podría prevenir los daños en los organismos.

### Ejemplo 6. Influencia de la naringenina sobre los Treg y el IFN- $\gamma$ del tejido pulmonar en los ratones con una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

**Métodos:** se usaron los modelos de fibrosis pulmonar en ratón inducida por bleomicina para la creación de ratones hembra Balb/c con fibrosis pulmonar. También se crearon 10 ratones normales de control mediante el tratamiento paralelo con un goteo intranasal de solución salina fisiológica. En otras palabras, la distribución de los ratones era como sigue: 1) control normal (Normal): goteo intranasal de solución salina fisiológica, administración intragástrica de 0,5 % de CMC-Na; 2) modelo de control (Control): goteo intranasal de bleomicina, administración intragástrica de 0,5 % de CMC-Na; 3) grupo tratado con naringenina (Nar 100 mg/kg): goteo intranasal de bleomicina, administración intragástrica de 100 mg de naringenina suspendida en 0,5 % de CMC-Na/kg de peso corporal. Había 20 ratones en cada grupo. El primer día del experimento se estableció un modelo de fibrosis pulmonar de ratón mediante el goteo intranasal de bleomicina. El Día 2, al grupo tratado se le administró naringenina mediante una administración intragástrica; al grupo sin tratar se le administró el mismo volumen de disolvente (0,1 ml/10 g de peso corporal) mediante una administración intragástrica, una vez al día para ambos. El Día 21, los ratones fueron sacrificados y se extirparon los pulmones. Después del corte, el tejido fue digerido con una solución de HBSS que contenía 1 mg/ml de colagenasa D y 0,02 mg/ml de DNasa I a 37 °C durante 90 min, para obtener células individuales. La muestra se filtró con un filtro celular de 70  $\mu$ m para eliminar los desechos celulares, se lavó con una solución de HBSS dos veces, se resuspendió en un 35 % de Percoll PBS, se cargó la parte superior del 70 % de Percoll, y se centrifugó a 2.500 rpm durante 20 min. Se recogieron los linfocitos, se cultivaron con la estimulación de 25 ng/ml de PMA y 500 ng/ml de Ionomicina durante 5 h, y después se cultivaron otras 3 h después de añadir una solución de Brefeldin A. Después de fijar y permeabilizar de acuerdo con las instrucciones del kit, las células se tiñeron con anti-CD4 acoplado a FITC, con anti-CD8 acoplado a Percp-cy5.5 y con anti-IFN- $\gamma$  acoplado a PE. Entonces, se seleccionó la proporción y la potencia de expresión del IFN- $\gamma$  para los subgrupos de linfocitos cuantitativos mediante un citómetro de flujo. La proporción y la fuerza de la expresión intracelular de Foxp3 en el subgrupo de linfocitos CD4+CD25+ se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del kit Regulatory T Cell Staining.

**Resultados:** los linfocitos T reguladores (Treg) inhibidores eran los principales reguladores de la inmunosupresión, y también los ejecutores de la inmunosupresión por TGF- $\beta$ 1. Veintiún días después del modelado con bleomicina, la proporción de células CD4+ / CD25+ que expresan Foxp3, un marcador de los Treg, estaba aumentada en los tejidos pulmonares fibróticos de los ratones ( $P < 0,05$ , véase la figura 13a, 13b), y los correspondientes niveles del IFN- $\gamma$  estaban ambos disminuidos en los CD4+ y en los CD8+ ( $P < 0,05$ , véase la figura 14a, 14b). El tratamiento ig con 100 mg de naringenina/kg devolvió los cambios en los tejidos pulmonares fibróticos de los ratones a la normalidad ( $P < 0,05$ , véase la figura 13, 14), lo que indicaba que la naringenina podía anular la inmunosupresión de los tejidos fibróticos mediante la inhibición del TGF- $\beta$ 1.

### Ejemplo 7. Influencia de la naringenina sobre los ratones con fibrosis pulmonar y tumores metastásicos pulmonares

**Métodos:** se usaron los modelos de fibrosis pulmonar de ratón inducida por bleomicina para crear 40 ratones hembra Balb/c con fibrosis pulmonar. También se crearon 20 ratones normales de control tratados paralelamente con un goteo intranasal de solución salina fisiológica. En otras palabras, la distribución de los ratones era como sigue: 1) control normal (Normal): goteo intranasal de solución salina fisiológica, administración intragástrica de 0,5 % de CMC-Na; 2) modelo de control (Control): goteo intranasal de bleomicina, administración intragástrica de 0,5 % CMC-Na; 3) grupo tratado con naringenina (Nar 100 mg/kg): goteo intranasal de bleomicina, administración intragástrica de 100 mg de naringenina suspendida en 0,5 % de CMC-Na/kg de peso corporal. Siete días después del goteo intranasal de bleomicina, las células 4T1 de cáncer de mama de ratón se cultivaron *in vitro* y se digirieron con tripsina, con objeto de generar una suspensión de células individuales. Después de ajustar el número de células a  $5 \times 10^5$ /ml, se inocularon 0,2 ml de la suspensión de células/animal en cada ratón mediante su inyección a través de las venas de la cola. El mismo día, al grupo tratado se le administró naringenina mediante una administración intragástrica; al grupo sin tratar se le administró el mismo volumen de disolvente (0,1 ml/10 g de peso corporal) mediante una administración intragástrica, una vez al día durante 4 semanas consecutivas para ambos. El Día 28 después de la inoculación del tumor se sacrificaron 10 ratones/grupo, y se extrajeron los pulmones y se pesaron. Se contó el número de nódulos tumorales visibles, y se comparó la incidencia de metástasis pulmonares de los tumores y el tamaño de los tumores metastásicos. Se ensayaron otros 10 ratones para comprobar los periodos de supervivencia. Se registró el número de ratones que murió por las metástasis pulmonares en los 70 días posteriores a la inoculación del tumor, y se analizó para comprobar la supervivencia de los ratones.

**Resultados:** siete días después del modelado con bleomicina, a los ratones se les inocularon i.v. las células tumorales. Veintiocho días después de que a los ratones con fibrosis pulmonar se les inocularan los tumores, el peso de los pulmones con los tumores era de 0,584 g, lo que era 2,3 veces más pesados que los de los ratones de control sin fibrosis pulmonar (0,254 g). Después de tratar a los ratones con fibrosis pulmonar ig con 100 mg de naringenina/kg, el peso de los pulmones con tumores era de 0,263 g, que había descendido en un 54,95 % en comparación con el de los ratones con fibrosis pulmonar sin tratar, es comparable al de los ratones de control sin fibrosis pulmonar ( $P > 0,05$ , véase la figura 15).

5 Durante la observación de los periodos de supervivencia, la supervivencia media era de 39 días para los 10 ratones con fibrosis pulmonar con metástasis pulmonares, lo que era 24 días más corta que la supervivencia media (63 días) de los 10 ratones sin fibrosis pulmonar con metástasis pulmonares (38,1 %). Después de que los 10 ratones con fibrosis pulmonar con metástasis pulmonares se trataran ig con 100 mg de naringenina/kg, la supervivencia media era de 56 días, lo que era 17 días más larga que la supervivencia media de los ratones con fibrosis pulmonar con metástasis pulmonares no tratados (43,6 %) ( $P < 0,01$ , véase la figura 16).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de naringenina y de naringina como inhibidores de la ruta de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de fibrosis pulmonar.
2. El uso de naringenina y de naringina como inhibidores de la ruta de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de metástasis de tumores pulmonares.
- 10 3. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el medicamento se va a administrar por vía oral, mediante inyección subcutánea o mediante inyección intravenosa.
4. Naringenina y naringina como inhibidores de la ruta de señalización del factor crecimiento transformante  $\beta 1$  para su uso en el tratamiento y/o la prevención de fibrosis pulmonar.
- 15 5. Naringenina y naringina como inhibidores de la ruta de señalización del factor crecimiento transformante  $\beta 1$  para su uso en el tratamiento y/o la prevención de tumores metastásicos pulmonares.

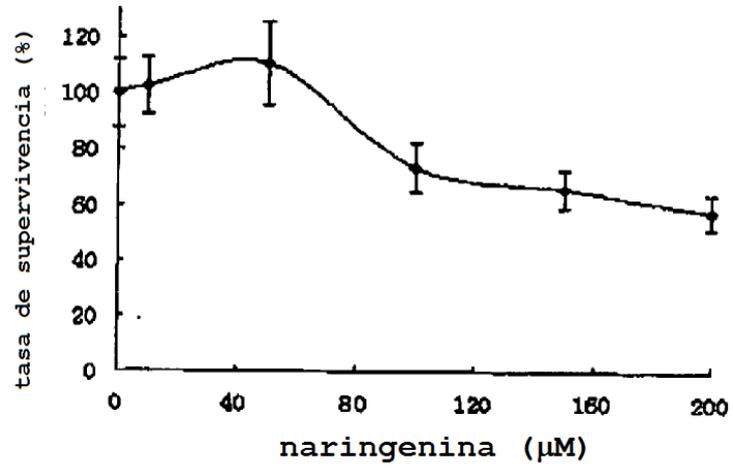


Fig. 1

TGF-β1 (10 ng/ml)	+	+	+	+	+	+
naringenina (µM)	0	1,0	5,0	10	20	50
carril	1	2	3	4	5	6

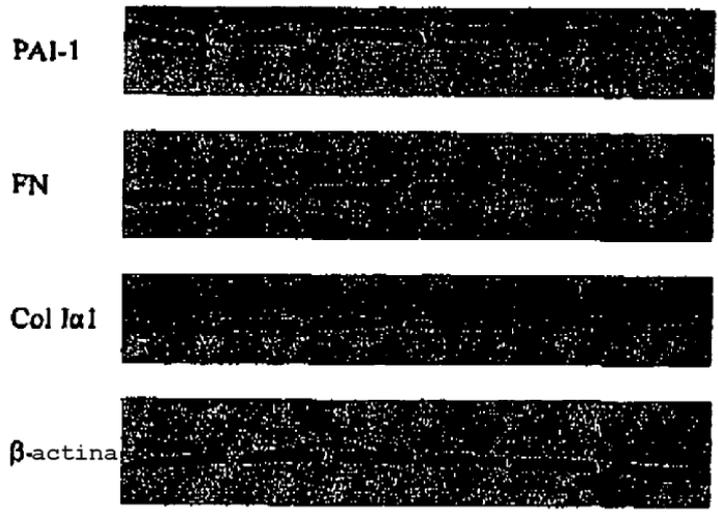


Fig. 2

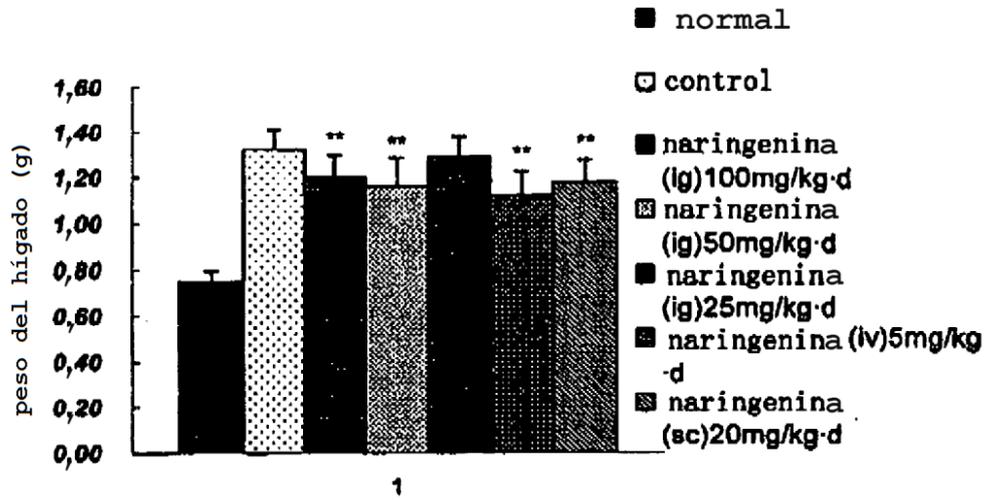


Fig. 3

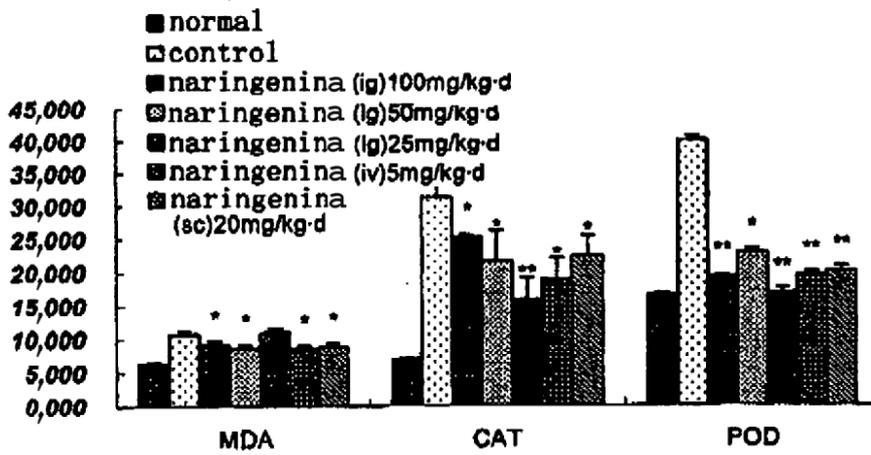


Fig. 4

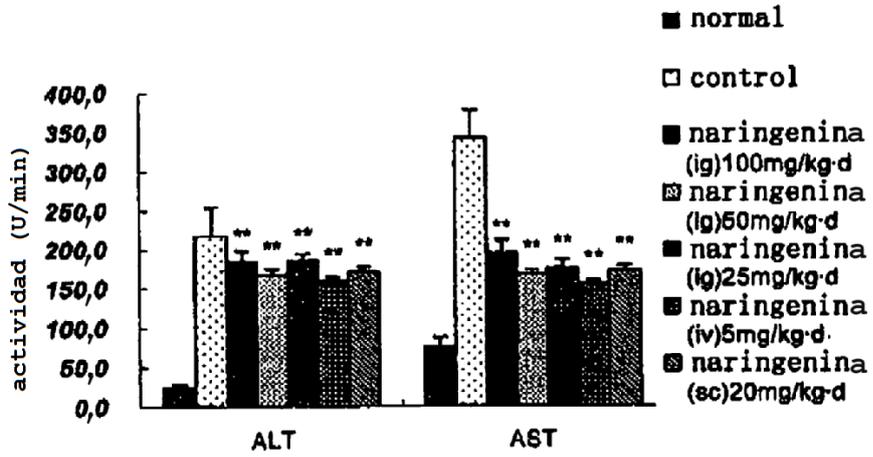


Fig. 5

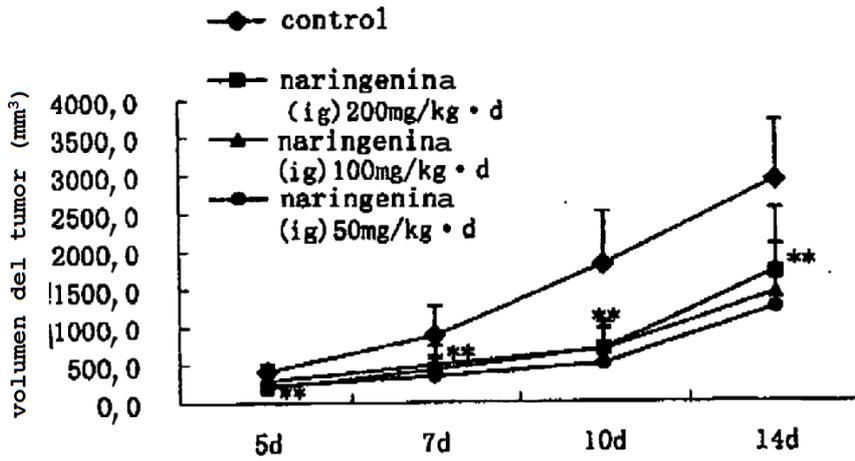


Fig. 6

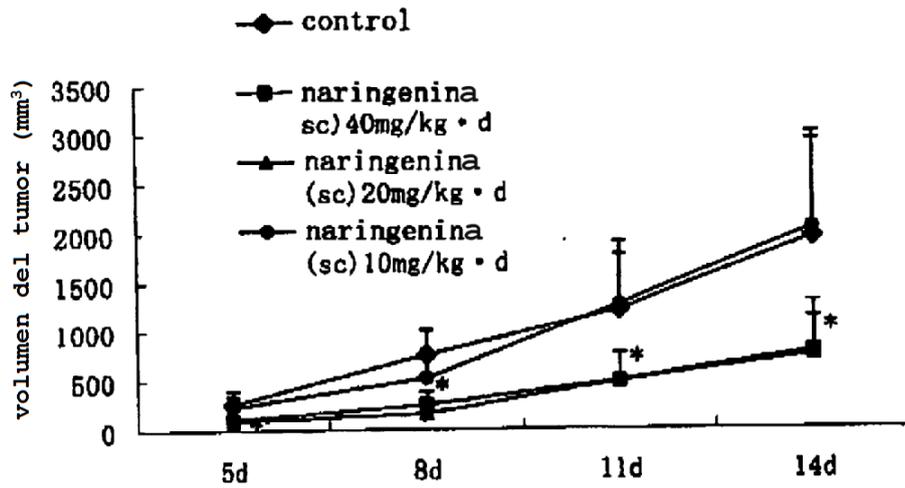
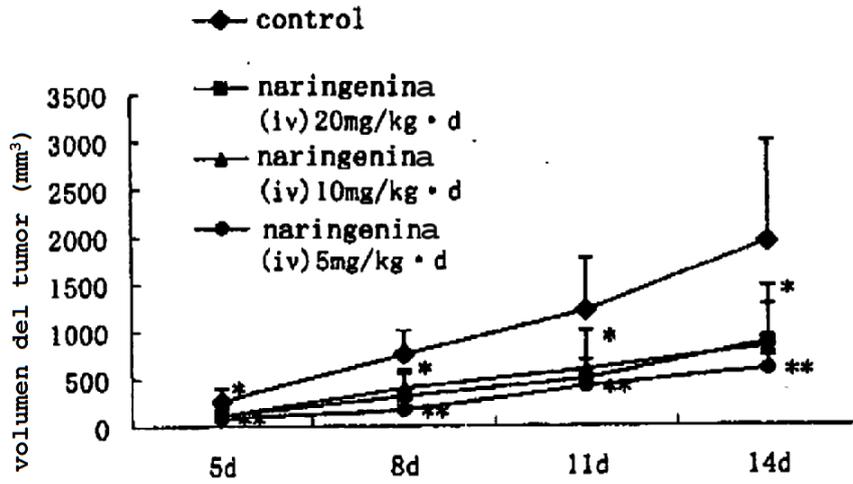


图8

Fig. 8

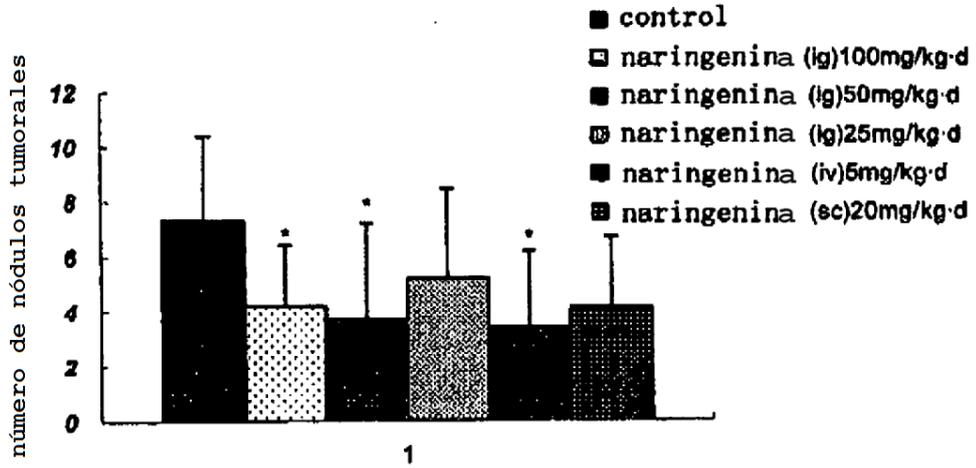


Fig. 9

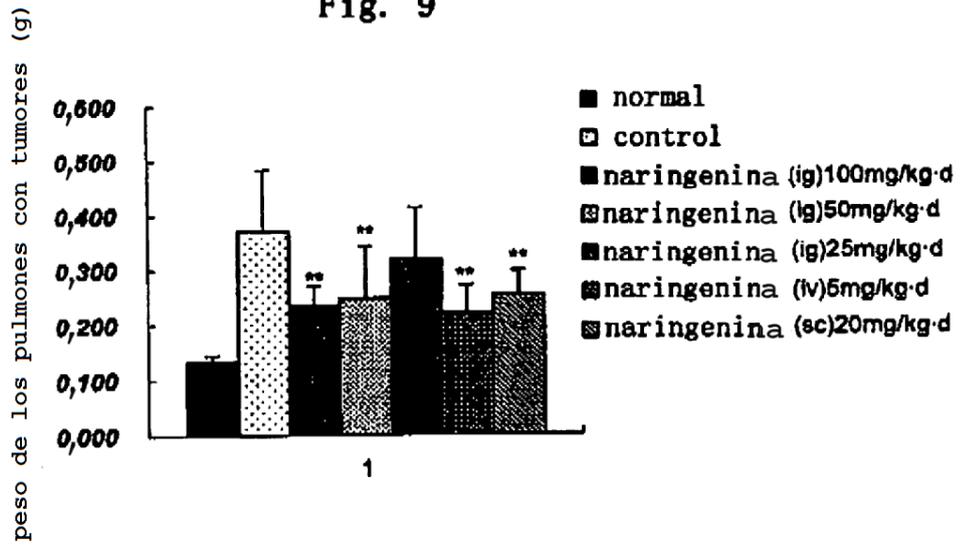


Fig. 10

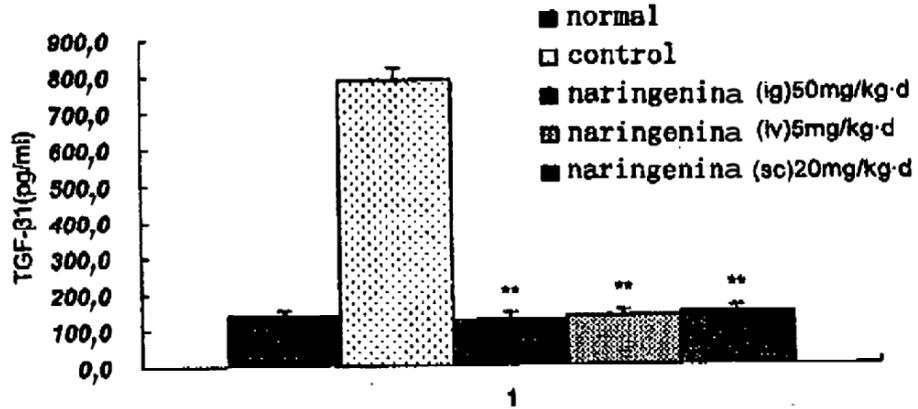


Fig. 11

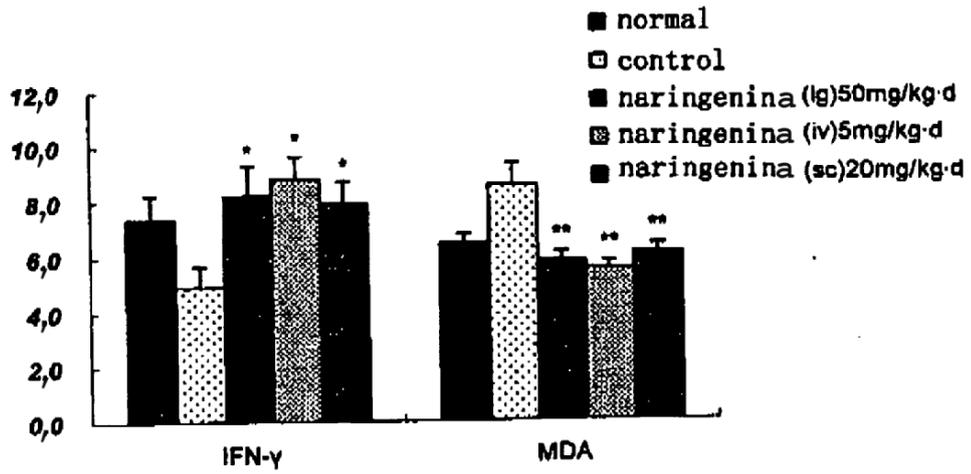


Fig. 12

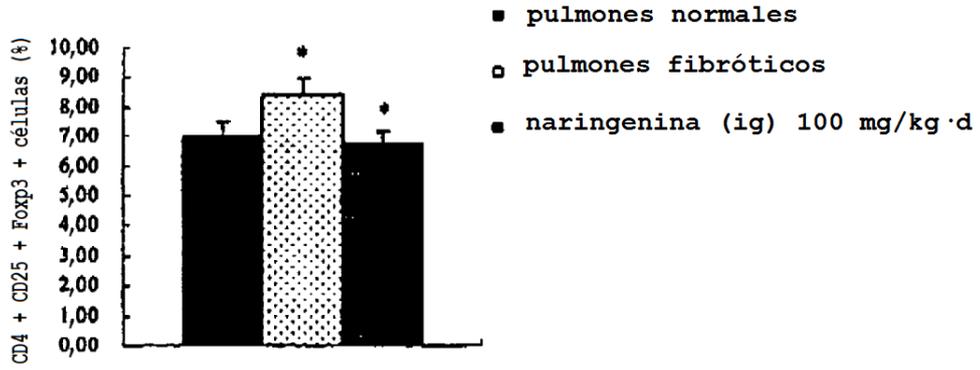


Fig. 13a

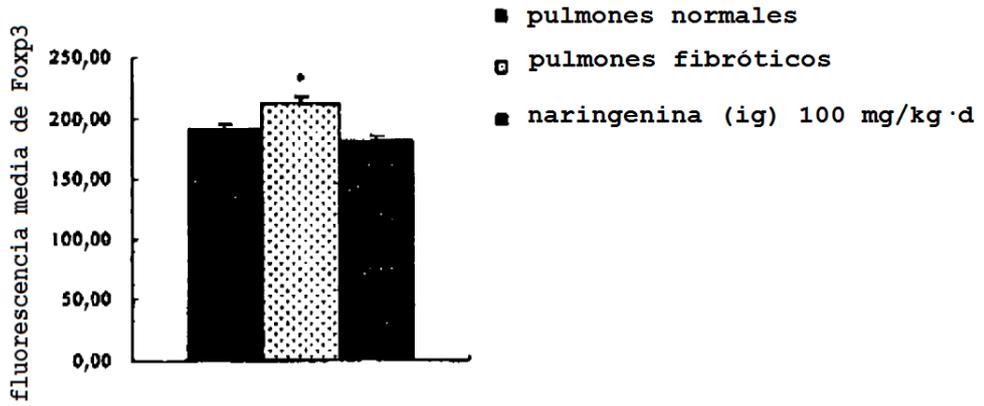


Fig. 13b

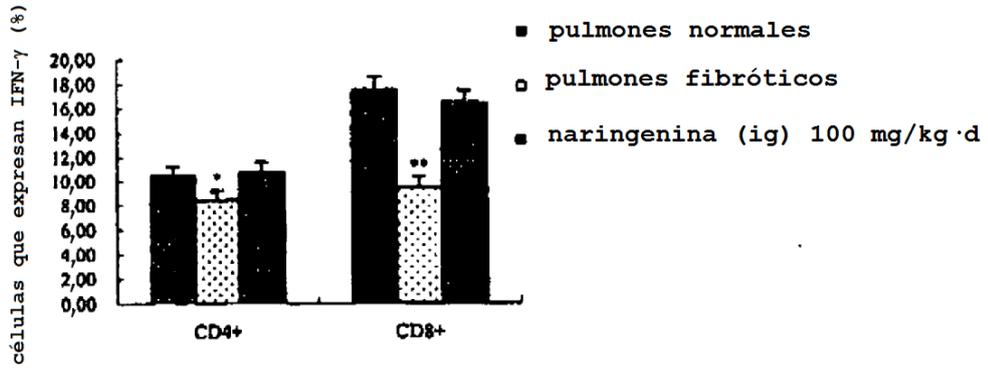


Fig. 14a

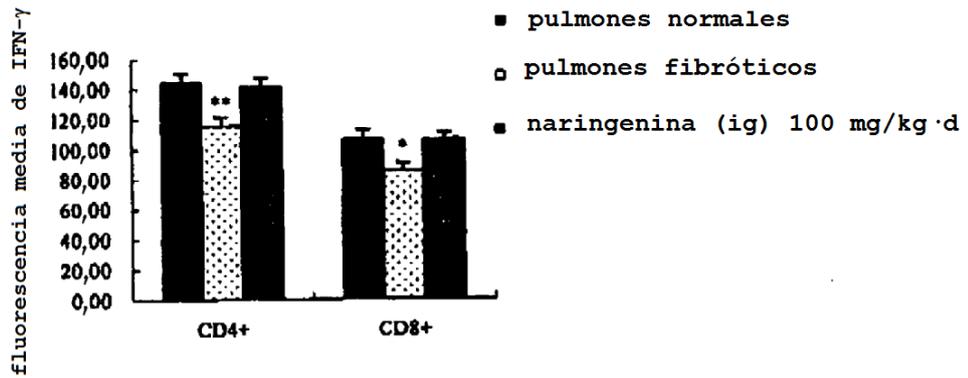


Fig. 14b

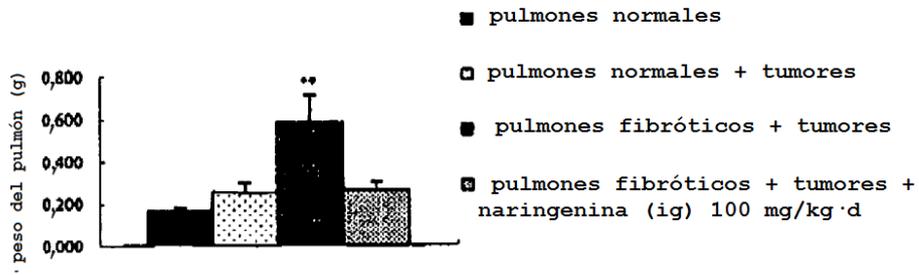


Fig. 15

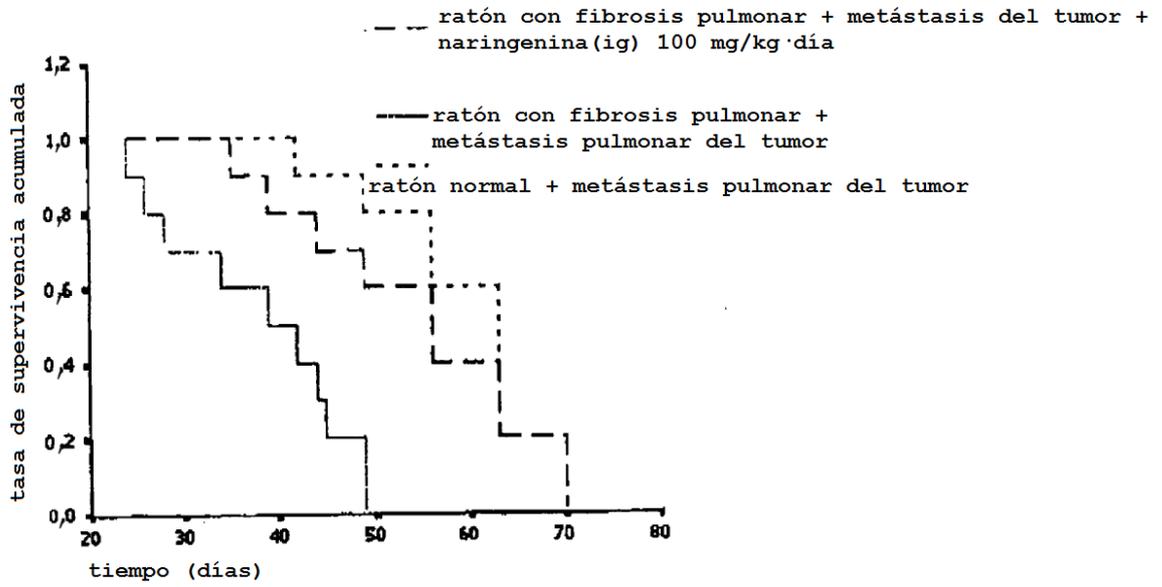


Fig. 16