

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 487**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/426** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2011 E 11720594 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2598142**

54 Título: **Compuestos de difeniléter para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas**

30 Prioridad:

**23.02.2011 IN CH05252011**

**28.07.2010 IN CH21402010**

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

**05.04.2016**

73 Titular/es:

**ORCHID CHEMICALS AND PHARMACEUTICALS LTD (100.0%)**

**Orchid Towers, 313 Valluvar Kottam High Road, Nungambakkam**

**600 034 Chennai, Tamil Nadu, IN**

72 Inventor/es:

**NARAYANAN, SHRIDHAR;  
MOOKKAN, JEYAMURUGAN;  
KULATHINGAL, JAYANARAYAN;  
NARAYANAN, SURENDRAN;  
SINGH, GAJENDRA y  
BALASUBRAMANIAN, GOPALAN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 565 487 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

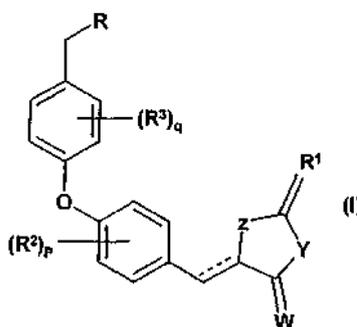
Compuestos de difeniléter para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas

5 **Campo**

En el presente documento, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de trastornos hepáticos tales como la enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD), la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la esteatohepatitis alcohólica (ASH).

10

En el presente documento, se desvelan el compuesto de fórmula (I), sus formas tautoméricas, estereoisómeros, polimorfos, hidratos, solvatos, sales farmacéuticamente aceptables y composiciones de los mismos para su uso en el tratamiento de la NAFLD/NASH.



15

**Antecedentes**

20

La esteatosis hepática, en personas no alcohólicas o personas sin antecedentes de otra enfermedad hepática conocida, es la enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD), y su forma progresiva se denomina esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (*J. Gastrointest. Liver. Dis.*, 2007, 16, 39-46). La NASH se caracteriza por la resistencia a la insulina, la esteatosis y la necroinflamación con o sin fibrosis centrilobular. No existe un tratamiento farmacológico que haya demostrado ser, de manera concluyente, un tratamiento eficaz para la NASH (*New England Journal of Medicine*, 2006, 355, 2297-2307).

25

30

La patogenia de la NASH se suele conceptualizar como un proceso de dos picos, que consiste en la acumulación hepática de triglicéridos (primer pico), seguida del desarrollo de estrés oxidativo y de la expresión de citocinas que conduce a la esteatohepatitis (segundo pico). Hay múltiples procesos metabólicos que pueden dar lugar a la acumulación hepatocelular de triglicéridos, entre los que se incluyen: (1) Exceso de ingesta dietética. Los triglicéridos de la dieta son transportados al hígado en forma de quilomicrones. Además, las calorías de la dieta almacenadas en el tejido adiposo en forma de grasa representan una fuente de ácidos grasos y triglicéridos que pueden llegar al hígado en forma de partículas lipoproteicas y ácidos grasos libres (FFA). (2) Aumento de las tasas de la lipogénesis procedentes de la síntesis *de novo* de ácidos grasos y triglicéridos en el hígado. (3) Reducción de las tasas de  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en el hígado. (4) Reducción de las tasas de exportación de ésteres de colesterol y triglicéridos desde el hígado en forma de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). La resistencia a la insulina se asocia con el aumento de la lipólisis y la reducción de la absorción postprandial y el almacenamiento de los ácidos grasos en el tejido adiposo, lo que conduce al aumento del flujo de ácidos grasos en el hígado. A su vez, un mayor contenido de grasa en el hígado contribuye a la resistencia a la insulina hepática. La hiperinsulinemia induce la expresión de la proteína 1c de unión al elemento regulador del esterol (SREBP-1c), y la hiperglucemia activa la proteína de unión al elemento de respuesta a los hidratos de carbono (ChREBP), aumentando ambas la síntesis hepática de ácidos grasos (*World J Gastroenterol* 2008, 14 (1), 22- 28).

35

40

45

Las citocinas son candidatos atractivos para el "segundo pico" de la patogenia de la NASH. Son capaces de producir todas las características histológicas clásicas de LA NASH, incluyendo la muerte/apoptosis de hepatocitos (factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )), la quimiotaxis de neutrófilos (IL-8) y la activación de células estrelladas hepáticas (TNF- $\alpha$ , factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ )). Además, se ha demostrado que los pacientes con NASH tienen un aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  y ARNm tanto en el hígado como en el tejido adiposo en comparación con los controles con obesos, y esta sobreexpresión se correlaciona con la gravedad histológica (*Current science*, 2006, 90(5), 10).

50

55

Hay suficiente material publicado que sugiere una estrecha asociación de la NAFLD con el síndrome metabólico, y que la obesidad y la diabetes se consideran los dos principales factores de riesgo para el desarrollo de la NAFLD. Los pacientes con síndrome metabólico y NAFLD presentan un mayor riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en comparación con los que no tienen el hígado graso (*Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, 8, 361-367), y la NAFLD es un factor predictor de la aparición de la diabetes de tipo 2. En estos episodios

multifactoriales por etapas, la insulina y la resistencia a la insulina desempeñan un papel fundamental. De hecho, la resistencia a la insulina está presente en aproximadamente el 98 % de los pacientes con NAFLD. Basándose en estos episodios fisiopatológicos, el tratamiento de la NAFLD debería regular el metabolismo de los lípidos en el músculo y en el tejido adiposo y, por lo tanto, reducir la entrada de FFA en el hígado a través de la corrección de la resistencia a la insulina y/o la modificación del metabolismo intrahepático de los lípidos y los hidratos de carbono para evitar la nueva síntesis de FFA (*Expert. Opin. Emerging Drugs.*, 2008, 13, 1-14).

La NAFLD presenta un desafío especial por varias razones. Se desconoce la prevalencia exacta de la enfermedad, sin embargo, su asociación con afecciones muy prevalentes (obesidad, diabetes de tipo 2, dislipidemia) sugiere que hay un número muy elevado de personas que pueden estar en riesgo. Los marcadores de la NAFLD como la alanina aminotransferasa no están aceptados universalmente, pues la enfermedad hepática progresiva también puede estar presente en los sujetos con niveles enzimáticos normales. Los pacientes de NAFLD de edad avanzada pueden tener múltiples defectos metabólicos, y su pronóstico final está regulado de manera más grave por las complicaciones cardiovasculares del síndrome metabólico que por la enfermedad hepática (*Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2004, 18, 1105-1116).

No hay ningún fármaco en particular realmente disponible para el tratamiento de la esteatosis hepática o NASH, sin embargo, hay informes sobre los estudios en seres humanos realizados mediante el uso de agente antidiabético/de sensibilización a la insulina (Metformina, Pioglitazona y Rosiglitazona), agente anti-hiperlipidémico (Clofibrato, Gemfibrozilo, Atorvastatina, Pravastatina y Probucol), agente anti-obesidad (Orlistat) y agente citoprotector (Ácido ursodesoxicólico, UDCA) (*Expert. Opin. Emerging Drugs.* 2008, 13, 145-158). Los ensayos clínicos realizados con Rosiglitazona (durante 48 semanas, 4 mg dos veces al día) mostraron una mejora significativa del balonamiento hepatocelular, sensibilidad a la insulina y niveles medios de aminotransferasa en suero, sin embargo, se produjo el aumento de peso en el 67 % de los pacientes y un aumento medio del aumento de peso del 7,3 % (*Hepatology*, 2003, 38, 1008-1017). Se realizó otro estudio piloto con Pioglitazona en pacientes con NASH, en el que los pacientes se trataron con 30 mg de Pioglitazona diariamente durante 48 semanas. Aunque hubo una mejora en las características histológicas, los principales efectos secundarios fueron el aumento de peso y el aumento de la adiposidad corporal (*Hepatology*, 2004, 39, 188-196).

Se llevó a cabo un estudio de control con placebo aleatorizado con betaína (derivada de la oxidación de fuentes dietéticas de colina), en el que el paciente de NASH recibió 20 g de betaína al día durante 12 meses. Este tratamiento, sin embargo, no logró mejorar el estado antioxidante en suero reducido, la resistencia a la insulina ni los niveles de adiponectina (*Hepatology*, 2009, 50(6), 1818-1826). Se realizó un estudio piloto con Metformina (durante 48 semanas, en el que el paciente recibió 2 g/día). Se observó una notable asociación entre la pérdida de peso y la mejora del índice de actividad de la NASH. Además, también se produjo una mejora de la sensibilidad a la insulina, pero no se correlacionó con cambios histológicos. La pérdida de peso y las mejoras en los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) se siguieron produciendo a lo largo del tratamiento, aunque la detención del tratamiento fue seguida de inmediato por el aumento de peso y el aumento de los niveles de aminotransferasas (*Aliment Pharmacol Ther.*, 2008, 29, 172- 192).

Ensayos clínicos preliminares llevados a cabo con Atorvastatina (inhibidores de la HMG-CoA reductasa) mostraron la mejora de los niveles totales de colesterol (CT) y triglicéridos (TG) no mostrada por ningún otro fármaco. Esta parece ser la primera opción en pacientes obesos/dislipidémicos con NASH. Sin embargo, no mostraron una mejora significativa en los niveles de glucosa en sangre ni en el índice de masa corporal (IMC). Otros ensayos clínicos preliminares con Pentoxifilina (inhibidor de PDE4) mostraron una reducción rápida y profunda de ALT y  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa (GGT) después de 10 semanas de tratamiento, sin interferir con otros parámetros bioquímicos, y este efecto se mantuvo estable durante todo el período de vigilancia. Sin embargo, esto tampoco mejoró significativamente los niveles de glucosa en sangre ni el IMC (*J Gastrointestin Liver Dis* 2007, 16, 39-46).

En un pequeño estudio piloto con el fármaco contra la obesidad Orlistat (un inhibidor reversible de la lipasa gástrica y pancreática, que bloquea la absorción de triglicéridos y potencia la pérdida de peso) mostró una mejora de la aminotransferasa, pero los cambios en la glucosa en suero y el perfil lipídico no fueron estadísticamente significativos (*Aliment Pharmacol Ther* 2004, 20, 623-628).

La NAFLD tiene una alta prevalencia, del aproximadamente 14-30 %, en la población general, que incluye a todos los grupos de edad y grupos étnicos, mientras que la aparición de NASH es del aproximadamente 3 %. Estudios epidemiológicos recientes realizados en Italia han demostrado que la incidencia de NAFLD está en constante aumento. La mayoría de los pacientes de NAFLD/NASH están asociados con la obesidad, la diabetes y la dislipidemia (*Expert Opinion on Emerging Drugs* 2008, 13, 145-158). Si algún compuesto individual tiene efecto en las tres indicaciones, es decir, en la obesidad, la diabetes y la dislipidemia, entonces sería la mejor opción para NAFLD/NASH. Por lo tanto, el desarrollo de fármacos que traten las tres indicaciones será útil para el tratamiento de NAFLD/NASH.

La NASH también se asocia con los pacientes que usan ciertos fármacos. Por ejemplo, el Tamoxifeno se usa en todo el mundo como agente antiestrogénico en pacientes con receptores de estrógenos positivos en una fase temprana del cáncer de mama. Se observó esteatosis hepática masiva en un tercio de los pacientes no obesos con

cáncer de mama como resultado de la exposición al tamoxifeno, y algunos de estos pacientes incluso desarrollaron NASH (*Internal Medicine*, 2002, 41(5), 345-350).

La NAFLD es ampliamente común en individuos con obesidad central leve o grave y en sujetos con diabetes de tipo 2 o dislipidemia (*The Journal of Medicine*, 2004, 62, 217). A la luz de lo anterior, ahora es evidente que no hay ningún fármaco específico para el tratamiento de NAFLD/NASH. Otros fármacos disponibles en el mercado que se probaron para el tratamiento de la NASH/NASH presentaron efectos secundarios. Ahora es evidente que existe una necesidad no cubierta en el tratamiento de la NAFLD/NASH y que es imprescindible identificar compuestos que puedan tratar de forma apreciable la NAFLD/NASH sin mostrar efectos no deseados/secundarios como se ha descrito anteriormente.

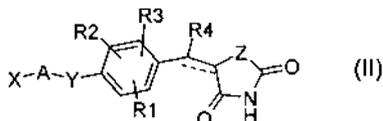
La progresión de la fibrosis hepática se ha encontrado en un tercio de los pacientes de esteatohepatitis no alcohólica (*Hepatology*, 2004, 40, 820-826). Esta enfermedad crónica no se puede tratar con éxito con los fármacos antifibróticos e antiinflamatorios convencionales que se encuentran actualmente en el mercado, porque bien carecen de eficacia o provocan demasiados efectos secundarios. Los agentes antifibróticos dirigidos a las células estrelladas hepáticas (HSC) se consideran una estrategia prometedora para aumentar su potencial terapéutico. Las HSC representan un 5-8 % de todas las células hepáticas humanas y un 13 % del volumen de las células sinusoidales. Las células estrelladas se encuentran en el espacio perisinusoidal de Disse debajo de la barrera endotelial. Tras una lesión hepática aguda o crónica, las HSC se activan y se someten a un proceso de trans-diferenciación que conduce a un fenotipo miofibroblástico. Tras la estimulación, las células comienzan a trans-diferenciarse en células estrelladas activadas, que secretan factores fibrogénicos incluyendo el colágeno en el hígado. La secreción de colágeno es una característica notable de las HSC activadas. La sobreproducción del colágeno por parte de las HSC activadas es una etapa fundamental en el desarrollo de la fibrosis hepática. No es de extrañar, por tanto, que las HSC activadas se consideran la principal diana celular para prevenir la progresión de la fibrosis hepática. De hecho, la mayoría de los tratamientos antifibróticos que se encuentran actualmente en fase de evaluación se dirigen a la inhibición de la activación, de la proliferación o los productos sintéticos de las HSC (*J Gastroenterol*, 2000, 35, 665-662). La fibrosis, caracterizada por la acumulación patológica del colágeno, cada vez se reconoce más como una característica importante de muchas enfermedades crónicas y como se ha dicho anteriormente, dado que los fármacos antifibróticos e antiinflamatorios convencionales disponibles en el mercado que se usan en el tratamiento de la fibrosis hepática bien carecen de la eficacia requerida o muestran efectos secundarios, existe la necesidad de desarrollar fármacos que aborden las desventajas mencionadas anteriormente.

Las complicaciones de la diabetes se pueden dividir en complicaciones macrovasculares (enfermedad isquémica del corazón, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica) y complicaciones microvasculares (cataratas, retinopatía, nefropatía, neuropatía, maculopatía y glaucoma), y pueden estar causadas, por ejemplo, por la acumulación de poliol (por ejemplo, sorbitol), peroxidación de radicales libres y glicosilación de proteínas en el lugar de los restos de lisina. La hiperglucemia provoca varias anomalías bioquímicas que se cree que contribuyen a las complicaciones de la diabetes. Las mayores concentraciones de glucosa intracelular activan la aldosa reductasa, una enzima que convierte la glucosa en sorbitol. (*The Journal of the American Medical Association*, 2002, 288, 2579-88). La reducción de la glucosa en sorbitol es un proceso dependiente de la energía y la actividad enzimática excesiva da lugar al estrés oxidativo, lo que provoca la disfunción y el daño de las células. La glucosa se une no enzimáticamente a las proteínas, generando la formación de productos finales de glicación avanzada que pueden causar la disfunción y el daño de las células. La activación de la proteína quinasa C (PKC), que desempeña un papel en la señalización intracelular, puede alterar la expresión génica y la función de las proteínas, generando daño y disfunción celular. La vía de la aldosa reductasa, la vía de los productos finales de la glicación avanzada y la vía de la PKC están interrelacionadas. Se cree que todas estas vías contribuyen a la disfunción y al daño celular endotelial vascular de la retina, al crecimiento y la supervivencia anómalos de las células, al aumento de la permeabilidad vascular, a la alteración del flujo sanguíneo, a la isquemia, a la angiogénesis anómala y al engrosamiento de la matriz basal asociado con complicaciones de la diabetes. Estas vías son dianas de los tratamientos de las complicaciones de la diabetes.

La regulación positiva de los factores de transcripción nuclear proinflamatorios (factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT), activador proteico 1 (AP-1)) puede conducir a la expresión y la producción de moléculas inflamatorias tales como interleucinas inflamatorias, factores de crecimiento, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y enzimas proteolíticas. Estas moléculas se han relacionado con la neovascularización de la córnea, lo que sugiere que los factores de transcripción mencionados podrían ser dianas adecuadas para inhibir los cambios angiogénicos (*Recent Prog. Horm. Res.*, 2001, 56, 239-263; *J. Mol. Med.*, 2001, 79, 30-47; *J. Clin. Invest.*, 2002, 110, 923-932; *J. Endocrinol.*, 2001, 169, 453-459; *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 4541-4544; *J. Endocrinol.*, 2001, 169, 461-464). Un estudio reciente que emplea la alineación de múltiples secuencias usando herramientas computacionales sugiere ("Medical Hypotheses", 2008, 70, 148-155) una estrecha asociación entre la aldosa reductasa, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), óxido nítrico sintasa (NOS), factor de crecimiento placentario (PIGF), receptor de productos finales de glicación avanzada (AGE-RAGE), angiopoyetinas y citocinas en la patogénesis de las complicaciones de la diabetes y, por tanto, una metodología múltiple será eficaz en la lucha contra dicha afección. Además, el TNF- $\alpha$  es un marcador sérico para la retinopatía diabética proliferativa (PDR) en los pacientes de tipo I (*J. Diab. Comp.*, 2008, 22 309-316), lo que sugiere la inhibición del TNF- $\alpha$  inducido por lipopolisacáridos (LPS) como una herramienta útil para el tratamiento de las complicaciones de la diabetes.

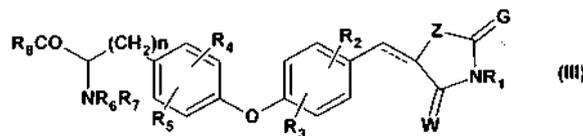
En el caso de las complicaciones de la diabetes, los estudios apoyan la participación de múltiples mecanismos en la patogénesis de la enfermedad y, por tanto, dirigirse a un solo mecanismo de acción puede no ser eficaz en el tratamiento a largo plazo de las complicaciones de la diabetes. Por lo tanto, es necesario que los compuestos para el tratamiento de las complicaciones de la diabetes se dirijan a múltiples dianas incluyendo, pero sin limitación, la aldosa reductasa, iNOS, TNF- $\alpha$  e IL-6 y, por lo tanto, existe la necesidad de una nueva molécula que satisfaga estas estipulaciones.

El documento US6794401B2 desvela los compuestos de fórmula (II),



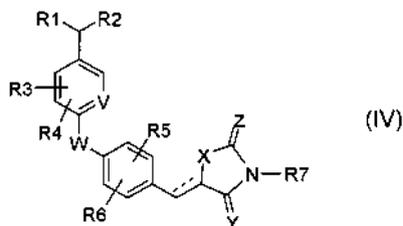
sus formas tautoméricas, sus estereoisómeros, sus polimorfos, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que --- representa un doble enlace opcional; Y representa O, S o NR, en el que R representa hidrógeno o alquilo; Z representa O o S; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> pueden ser iguales o diferentes y representan independientemente, hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, formilo, amino, alquilo o alcoxi; A representa un enlace, o grupos sustituido o no sustituidos seleccionados entre arilo, heterociclilo y anillo heteroarilo; X representa un ácido  $\alpha$ -aminocarboxílico o un derivado de ácido  $\alpha$ -aminocarboxílico unido a A o Y a través de su cadena lateral  $\alpha$ .

El documento US7521465B2 desvela los compuestos de fórmula (III),



sus análogos, sus formas tautoméricas, sus estereoisómeros, sus polimorfos, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que --- representa un enlace opcional; W representa O o S; Z representa CR<sub>10</sub>, O o S; G representa O, S o, junto con R<sub>10</sub>, forma un sistema de anillo aromático o heteroaromático de 5 o 6 miembros que contiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; n representa 1. R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan entre hidrógeno, halógenos; hidroxilo, nitro, ciano, formilo, amino, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) lineales o ramificados; grupos alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>). R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> pueden ser iguales o diferentes y representan independientemente, H, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y COR<sub>12</sub>; en el que R<sub>12</sub> representa grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo, arilo, alqueniloxi, ariloxi, alcoxi, aralquilo y aralcoxi. R<sub>5</sub> representa -OR<sub>13</sub> o NR<sub>14</sub>R<sub>15</sub>, en el que R<sub>13</sub> representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, heteroarilo y un contraión; R<sub>14</sub> y R<sub>15</sub> pueden ser iguales o diferentes, y representan independientemente, hidrógeno, grupos seleccionados entre alquilo, alquenilo y arilo. R<sub>1</sub> representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, arilo, alquenilo, un contraión y -CH<sub>2</sub>COOR; en el que, R representa H o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>). R<sub>10</sub> opcionalmente, junto con G, forma un sistema de anillo aromático o heteroaromático de 5 o 6 miembros tal como fenilo, furilo, pirrolilo, piridilo y similares.

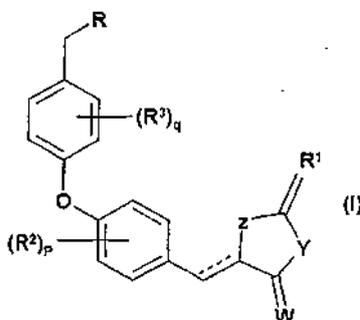
El documento US7781464B2 desvela los compuestos de fórmula (IV),



sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que "----" representa un enlace opcional; V representa CH o N; Y representa O o S; W representa O o NR<sub>8</sub>; R<sub>8</sub> se selecciona entre hidrógeno, o grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos; X representa CR<sub>9</sub>, O o S; en el que R<sub>9</sub> es hidrógeno, o R<sub>9</sub> junto con Z forma un sistema de anillo aromático o heteroaromático de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 2 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; Z representa O, S o, junto con R<sub>9</sub>, forma un sistema de anillo aromático o heteroaromático de 5 a 6 miembros que contiene 1 a 2 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan, independientemente, entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, formilo, amino, COR<sub>10</sub>, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) lineal o ramificado y grupo alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); R<sub>10</sub>

representa  $-OR_{11}$  o  $NR_{12}R_{13}$ ; en el que  $R_{11}$ ;  $R_{12}$  y  $R_{13}$  son como se definen en el mismo;  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$  son como se definen en el mismo;  $R_7$  representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos tales como alquilo, alquenilo,  $-CH_2COOR$ , grupo arilo y un contraión; en el que R representa H o un grupo alquilo ( $C_1-C_6$ ).

5 Los compuestos de fórmula (II), (III) y (IV) se representan por la fórmula general (I).



### Objetivo

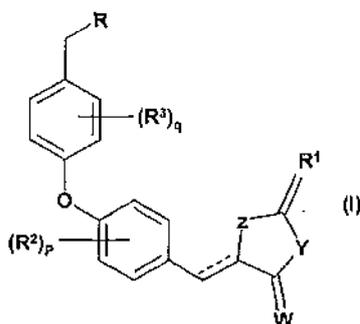
10 El objetivo del presente documento es proporcionar compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de trastornos hepáticos y enfermedades asociadas. El tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de fórmula (I).

15 Otro objetivo del presente documento son medicamentos para su uso en el tratamiento de trastornos hepáticos y enfermedades asociadas, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de fórmula (I).

20 Otro objetivo es proporcionar el compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento del trastorno hepático y las enfermedades asociadas; proporcionar un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la NAFLD (enfermedad del hígado graso no alcohólica), la NASH (esteatohepatitis no alcohólica), fibrosis hepática, cirrosis hepática y esteatohepatitis alcohólica; proporcionar el compuesto de fórmula (I) para la reducción de los niveles de triglicéridos en plasma; proporcionar el compuesto de fórmula (I) para la inhibición de la metaloproteinasas de la matriz-2; proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento de dichas enfermedades o al menos para  
25 proporcionar al público una opción útil.

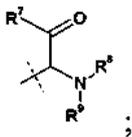
### Sumario

30 En el presente documento, se describen los compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de trastornos hepáticos, así como para el uso de sus formas tautoméricas, estereoisómeros, polimorfos, hidratos, solvatos, sales farmacéuticamente aceptables y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos,



35 En particular, en el presente documento, se proporcionan compuestos de fórmula (I), sus formas tautoméricas, estereoisómeros, polimorfos, hidratos, solvatos, sales farmacéuticamente aceptables y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en el tratamiento de trastornos hepáticos, en la que --- representa un enlace opcional; W representa O o S; Y representa  $NR^4$ , S u O; en el que  $R^4$  representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo, arilo, un contraión y  $-CH_2COR^6$ ; en el que  
40  $R^6$  representa  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHOH$  o  $OR^{18}$ ; en el que  $R^{18}$  es un grupo alquilo; Z representa  $CR^5$  o S;  $R_1$  representa O, S o, junto con  $R^5$ , forma un sistema de anillo condensado aromático o heteroaromático de 5 o 6 miembros que contiene átomos de carbono, o 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre O, S o N;  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^5$  representan independientemente, hidrógeno, halógenos, hidroxilo, nitro, ciano, formilo, amino, alquilo, haloalquilo o alcoxi;

R representa bien U o V; en el que U representa hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, formilo, amino,  $-\text{COR}^{10}$ , o grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) lineal o ramificado y grupo alcoxi ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ );  $\text{R}^{10}$  representa  $-\text{OR}^{11}$  o  $-\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ ; en el que  $\text{R}^{11}$  representa hidrógeno, un contraión, o grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alqueno, arilo, aralquilo y heteroarilo;  $\text{R}^{12}$  y  $\text{R}^{13}$  representan independientemente, hidrógeno, o grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alqueno, arilo y heteroarilo; o  $\text{R}^{12}$  y  $\text{R}^{13}$  forman juntos un anillo heteroalifático o heteroaromático; V representa



$\text{R}^7$  representa  $-\text{OR}^{14}$ ; en el que  $\text{R}^{14}$  representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alqueno, arilo, aralquilo, heteroarilo, un contraión; y  $-\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$ ; en el que  $\text{R}^{15}$  y  $\text{R}^{16}$  representan independientemente, hidrógeno, o grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alqueno, arilo y heteroarilo;  $\text{R}^8$  y  $\text{R}^9$  representan independientemente, hidrógeno,  $-\text{COR}^{17}$ , o grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alqueno, arilo y heteroarilo; en el que  $\text{R}^{17}$  representa grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, arilo, heteroarilo, alqueno, alquenoilo, arilo, alcoxilo, alcoxilo y aralcoxilo; p y q son números enteros que se seleccionan de 1 a 3.

En una realización preferida, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de NAFLD/NASH, y trastornos y afecciones relacionados con NAFLD/NASH que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de fórmula (I).

En otra realización más, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la NAFLD/NASH, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de fórmula (I).

En otra realización más, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la NAFLD/NASH, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto de fórmula (A).

En otra realización más, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la fibrosis hepática y la cirrosis hepática, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de fórmula (I).

En otra realización más, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en enfermedades asociadas con NAFLD/NASH, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de fórmula (I).

En otra realización más, se proporcionan compuestos de fórmula (I) que tienen actividad de inhibición de la metaloproteinasas de la matriz-2.

En otra realización más, se proporcionan compuestos de fórmula (I) para reducir el nivel de triglicéridos hepáticos.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre el peso corporal en ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO)/NAFLD.

Figura 2: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el peso corporal en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 3: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el peso del hígado en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 4: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el nivel de TG en el hígado en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 5: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de glucosa (en ayunas) en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 6: Representación gráfica de la clasificación del efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología hepática en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 7 (7a-7h): Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los cambios histopatológicos en el hígado en un modelo de NAFLD/NASH.

Figura 8: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el aumento del peso corporal en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 9: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de glucosa en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 10: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de ALT en los ratones con NAFLD/NASH.

Figura 11: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre los triglicéridos hepáticos en la NAFLD/NASH inducidas por una dieta supranutricional en ratones C57BL/6.

Figura 12: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la vacuolización hepatocelular en ratones con NAFLD/NASH inducidas por una dieta supranutricional.

Figura 13: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología hepática en la NAFLD/NASH inducidas por una dieta supranutricional en ratones C57BL/6.

Figura 14: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de triglicéridos en hámsteres alimentados por una dieta HC-HF (rica en colesterol-rica en grasas).

Figura 15: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de NEFA en hámsteres alimentados con una dieta HC-HF.

Figura 16: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el aumento de peso corporal en ratones con NAFLD/NASH.

5 Figura 17: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la aspartato aminotransferasa (AST) en plasma en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 18: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la ALT en plasma en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 19: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el balonamiento hepatocelular en ratones con NAFLD/NASH.

10 Figura 20: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la esteatosis hepática en ratones con NAFLD/NASH.

Figura 21 A: Efecto del Compuesto de fórmula (A) en la histopatología hepática en la NAFLD/NASH inducidas por una dieta supranutricional en ratones C57BL/6.

Figura 22: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre HOMA-IR en ratones DIO.

15 Figura 23: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el aumento de peso corporal en la NAFLD/NASH inducidas por una dieta supranutricional en ratas tratadas con nSTZ.

Figura 24: Representación gráfica de la clasificación del efecto del compuesto de fórmula (A) en la vacuolización hepática (esteatosis) en la dieta inducida supranutricional NAFLD/NASH en nSTZ ratas tratadas.

Figura 25: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la vacuolización hepática (esteatosis) en la NAFLD/NASH inducidas por una dieta supranutricional en ratas tratadas con nSTZ.

20 Figura 26: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología pulmonar en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones C57BL/6.

Figura 27: Compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología pulmonar (tinción H & E) en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones C57BL/6.

25 Figura 28: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el nivel de TNF- $\alpha$  en ratones con NAFLD/NASH desafiados con lipopolisacáridos (LPS).

Figura 29: Efecto de la sal disódica del Compuesto de fórmula (C) sobre los TG en plasma en hámsteres alimentados con una dieta HC-HF.

Figura 30: Efecto del Compuesto de fórmula (A) y sal disódica del Compuesto de fórmula (C) sobre el balonamiento hepatocelular en ratones con NAFLD/NASH inducidas por una dieta supranutricional.

30 Figura 31: Efecto del Compuesto de fórmula (A) y la sal disódica del Compuesto de fórmula (C) sobre la microvacuolación en ratones con NAFLD/NASH inducidas por una dieta supranutricional.

Figura 32: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología hepática en la NAFLD/NASH inducidas por una dieta supranutricional en ratones C57BL/6.

35 Figura 33: Efecto del Compuesto de fórmula (A) y sales disódicas del Compuesto de fórmula (C) sobre los TG en plasma en la hipertrigliceridemia inducida por el consumo de alcohol agudo en ratones.

Figura 34: Efecto de Compuestos de fórmula (A), (B) y (C) sobre la adipogénesis en fibroblasto de ratón 3T3-L1.

Figura 35a y 35b: Estimación de la secreción de colágeno a partir de HSC tratadas con Compuestos de fórmula (B) y (C) usando la técnica de transferencia Western.

Figura 36: Inducción de la apoptosis sobre HSC por compuestos de fórmula (B) y (C).

40 Figura 37: La inducción de la apoptosis por los compuestos de fórmula (B) y (C) es selectiva de las HSC.

Figura 38: Efecto inhibitor sobre la producción de iNOS.

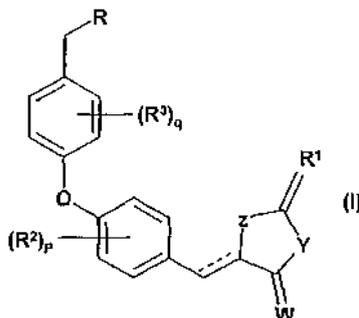
Figura 39: Niveles de TNF- $\alpha$  en suero (pg/dl) tras la administración oral de vehículo (n = 5) y compuesto de fórmula (A) (50 mg/kg/día, n = 4) en ratones de control delgados *ob/ob* machos durante 10 días.

45 Figura 40: Niveles de IL-6 en suero (pg/dl) tras la administración oral de vehículo (n = 5) y compuesto de fórmula (A) (50 mg/kg/día, n = 4) en ratones de control delgados *ob/ob* machos durante 10 días.

Figura 41: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la degeneración lenticular en rata con diabetes inducida por STZ.

## Descripción detallada

50 En el presente documento, se describen compuestos de fórmula (I),



55 sus formas tautoméricas, estereoisómeros, polimorfos, hidratos, solvatos, sales farmacéuticamente aceptables y composiciones farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de trastornos hepáticos,

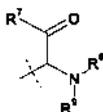
en la que --- representa un enlace opcional; W representa O o S; Y representa NR<sup>4</sup>, S u O;  
 en el que R<sup>4</sup> representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)  
 lineales o ramificados, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *t*-butilo y similares; grupos  
 alqueno tales como etenilo, propenilo, butenilo y similares; grupos arilo tales como fenilo, naftilo y similares; un  
 5 contraíón seleccionado entre metales alcalinos como Li, Na, K y similares, o -CH<sub>2</sub>COR<sup>6</sup>; en el que R<sup>6</sup> representa  
 -OH, -NO<sub>2</sub>, -NHOH o -OR<sup>18</sup>; en el que R<sup>18</sup> es un grupo alquilo; Z representa CR<sup>5</sup>, O o S; R<sup>1</sup> se selecciona entre O, S  
 o, junto con R<sup>5</sup>, forma un sistema de anillo condensado aromático o heteroaromático de 5 o 6 miembros que  
 contiene átomos de carbono, o 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre O, S o N, tales como fenilo, naftilo, furilo,  
 pirrolilo, piridilo y similares.

10 Los grupos adecuados representados por R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan entre hidrógeno, halógenos tales como flúor,  
 cloro, bromo o yodo; hidroxilo, nitro, ciano, formilo, amino, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre  
 grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) lineales o ramificados tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *t*-butilo y  
 similares; grupos haloalquilo seleccionados entre grupos alquilo sustituidos con uno, dos, tres o cuatro átomos de  
 15 halógeno tales como clorometilo, cloroetilo, trifluorometilo, trifluoroetilo, diclorometilo, dicloroetilo y similares; y  
 grupos alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) tales como metoxi, etoxi, propoxi, butoxi y similares.

R representa bien U o V; en el que U se selecciona entre hidrógeno, halógenos tales como flúor, cloro, bromo o  
 yodo; hidroxilo, nitro, ciano, formilo, amino, -COR<sup>10</sup>, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre grupos  
 20 alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) lineales o ramificados tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *t*-butilo y  
 similares; grupos alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) tales como metoxi, etoxi, propoxi, butoxi y similares; R<sup>10</sup> representa -OR<sup>11</sup> o  
 -NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup>; en el que R<sup>11</sup> representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre grupos alquilo  
 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *t*-butilo y similares; grupos alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)  
 25 tales como etenilo, propenilo, butenilo y similares; grupos arilo, incluyendo sistemas de anillos mono-, bi- o tricíclicos  
 de 5 a 14 miembros tales como fenilo, naftilo y similares; grupos aralquilo tales como bencilo, feniletilo, fenilpropilo y  
 similares; grupos heteroarilo incluyendo sistemas de anillos mono-, bi- o tricíclicos de 5 a 14 miembros tales como  
 piridilo, tienilo, furilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo,  
 pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, quinolinilo, dihidroquinolinilo, tetrahydroquinolinilo, isoquinolinilo,  
 dihidroisoquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo y similares, y/o un contraíón tal como sodio, potasio o magnesio;

30 R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> pueden ser iguales o diferentes, y representan independientemente, hidrógeno, grupos sustituidos o no  
 sustituidos seleccionados entre grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) lineales o ramificados tales como metilo, etilo, n-propilo,  
 isopropilo, n-butilo, isobutilo, *t*-butilo y similares; grupos alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>) tales como etenilo, propenilo, butenilo y  
 similares; grupos arilo tales como fenilo, naftilo y similares; grupos heteroarilo tales como piridilo, tienilo, furilo,  
 35 pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, pirimidinilo,  
 pirazinilo, piridazinilo, benzopirano, benzofurano, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzopirrolilo,  
 benzoxadiazolilo, benzotiadiazolilo, benzodioxolilo, quinolinilo y similares, o R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> forman juntos un anillo  
 heteroalifático o heteroaromático, tal como un morfolinilo, piperidinilo, piperazinilo, pirrolidinilo, azetidínilo, pirrol,  
 pirazol, triazol y tetrazol, y similares, que pueden estar sustituidos;

V representa:



o sus sales; R<sup>7</sup> representa -OR<sup>14</sup> o -NR<sup>15</sup> R<sup>16</sup>.

45 Los grupos adecuados representados por R<sup>14</sup> se seleccionan entre hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos  
 seleccionados entre grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) lineales o ramificados tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-  
 butilo, isobutilo, *t*-butilo y similares; grupos alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) lineales o ramificados tales como etenilo, propenilo,  
 butenilo y similares; grupos arilo tales como fenilo, naftilo y similares; grupos aralquilo tales como bencilo, feniletilo,  
 50 fenilpropilo y similares; grupos heteroarilo tales como piridilo, tienilo, furilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo,  
 isoxazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, benzopirano,  
 benzofurano, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzopirrolilo, benzoxadiazolilo, benzotiadiazolilo,  
 benzodioxolilo, quinolinilo y similares; el contraíón se selecciona entre metales alcalinos como Li, Na y K; metales  
 alcalinotérreos tales como Ca y Mg; sales de diferentes bases tales como sales de amonio o de amonio sustituido,  
 dietanolamina,  $\alpha$ -feniletilamina, bencilamina, piperidina, morfolina, piridina, hidroxietilpirrolidina, hidroxietilpiperidina,  
 55 aluminio colina, trometamina y similares.

Los grupos adecuados representados por R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> se seleccionan entre H, COR<sup>15</sup>, grupos sustituidos o no sustituidos  
 seleccionados entre grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) lineales o ramificados tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-  
 butilo, isobutilo, *t*-butilo y similares; grupos alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) lineales o ramificados tales como etenilo, propenilo,  
 60 butenilo y similares; grupos arilo tales como fenilo, naftilo y similares, y grupos heteroarilo tales como piridilo, tienilo,  
 furilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, pirimidinilo,  
 pirazinilo, piridazinilo y similares.

Los grupos adecuados representados por R<sup>15</sup> y R<sup>16</sup> se seleccionan entre hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) lineales o ramificados tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo y similares; grupos alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) lineales o ramificados tales como etenilo, propenilo, butenilo y similares; grupos arilo tales como fenilo, naftilo y similares; grupos heteroarilo tales como piridilo, tienilo, furilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, benzopirano, benzofurano, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzopirrolilo, benzoxadiazolilo, benzotiadiazolilo, benzodioxolilo, quinolinilo y similares; grupos alcoxi tales como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi y similares; grupos aralcoxi tales como fenilmetoxi, feniletoxi, fenilpropoxi y grupos similares, y grupos ariloxi tales como fenoxi, naftoxi y similares.

Cuando están sustituidos, los sustituyentes pueden incluir, sin limitaciones, uno o más sustituyentes seleccionados entre halógenos tales como flúor, cloro, bromo o yodo; grupos hidroxilo, nitro, ciano, azido, nitroso, amino, hidrazina, hidrazida, hidroxamato, formilo, alquilo, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquilo, arilo, alcoxi, ariloxi, acilo, aciloxi, aciloxiacilo, heterociclico, heteroarilo, monoalquilamino, dialquilamino, acilamino, alquilaminocarbonilo, alcóxycarbonilo, ariloxycarbonilo, heterocíclicocarbonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfínilo, arilsulfínio, ariltio, ariltio, sulfamóilo, alcóxycalquilo y ácidos carboxílicos, y sus derivados tales como carboxamida y carboxamidoalquilo.

p y q son números enteros y se seleccionan entre 1-3.

En el presente documento, se proporcionan los compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de trastornos hepáticos, trastornos pulmonares, complicaciones de la diabetes, enfermedades cardiovasculares y asociadas, que comprende la administración del compuesto de fórmula (I).

En el presente documento, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la NAFLD/NASH, y trastornos y afecciones relacionados con la NAFLD/NASH, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de fórmula (I).

Además, en el presente documento, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la NAFLD/NASH que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de fórmula (I).

Además, en el presente documento, se proporcionan compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la NAFLD/NASH que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto de fórmula (A).

La síntesis hepática de triglicéridos de ácidos grasos y de fosfolípidos se acelera tras el consumo agudo y crónico de etanol. El aumento de la lipogénesis es un reflejo del aumento de la expresión de las enzimas lipogénicas incluyendo la sintasa de ácidos grasos, acil CoA carboxilasa (ACC), ATP citrato liasa (ACL), esteroil CoA desaturasa y la enzima málica, mejorando de este modo la acumulación de grasa. Estas enzimas son codificadas por genes regulados por el factor de transcripción, la proteína 1 de unión al elemento regulador del esteroil (SREBP-1). Los individuos con esteatosis inducida por el alcohol son vulnerables al desarrollo de la esteatohepatitis alcohólica (ASH), fibrosis hepática, cirrosis e incluso al carcinoma hepatocelular (*World J Gastroenterol* 2007, 13, 4974-4978).

Además, en el presente documento, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la fibrosis hepática, esteatohepatitis alcohólica (ASH), cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular, trastorno pulmonar, fibrosis de pulmón, metástasis pulmonar y soriasis.

La NAFLD se ha asociado estrechamente con los factores de riesgo cardiovascular clásicos, el síndrome del ovario poliquístico (PCOS) y la apnea obstructiva del sueño (OSA) (*Journal of Hepatology*, 2008, 48, S104-S112).

Además, en el presente documento, se describen compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas tales como el síndrome del ovario poliquístico, la apnea obstructiva, la soriasis esclerodérmica con NAFLD/NASH.

Además, en el presente documento, se describen compuestos de fórmula (I) para la inhibición de la metaloproteínasa de la matriz-2.

Además, en el presente documento, se describen compuestos de fórmula (I) para la reducción del nivel de triglicéridos en plasma.

El término "estereoisómero" incluye isómeros que difieren entre sí en el modo en que los átomos están dispuestos en el espacio, pero cuyas fórmulas y estructuras químicas son, por lo demás, idénticas. Los estereoisómeros incluyen enantiómeros y diastereoisómeros.

El término "tautómeros" incluye formas isoméricas fácilmente interconvertibles de un compuesto en equilibrio. La tautomería ceto-enol es un ejemplo.

El término "polimorfos" incluye formas cristalográficamente distintas de compuestos con estructuras químicamente idénticas.

5 La expresión "solvatos farmacéuticamente aceptables" incluye combinaciones de moléculas de disolvente con moléculas o iones del compuesto soluto.

10 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen metales alcalinos tales como Li, Na, K y similares; metal alcalinotérreo tal como Ca, Mg y similares; sales de bases orgánicas tales como dietanolamina,  $\alpha$ -feniletilamina, bencilamina, piperidina, morfolina, piridina, hidroxietilpirrolidina, hidroxietilpiperidina, colina y similares, sales de amonio o de amonio sustituido, sales de aluminio. Las sales también incluyen sales de amino ácidos tales como glicina, alanina, cistina, cisteína, lisina, arginina, fenilalanina, guanidina etc. Las sales pueden incluir sales de adición de ácido, cuando sea apropiado, que son sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, hidroháluros, acetatos, tartratos, maleatos, citratos, succinatos, palmoatos, metanosulfonatos, tosilatos, benzoatos, salicilatos, hidroxinaftoatos, bencenosulfonatos, trifluoroacetatos, ascorbato, glicerofosfatos, cetoglutaratos y similares. Los solvatos farmacéuticamente aceptables pueden ser hidratos o comprender otros disolventes de cristalización tales como alcoholes.

20 Cuando se ha descrito un término, se aplica el mismo significado a lo largo de toda la patente. **Los compuestos particularmente preferidos de la presente invención incluyen:**

1. (2S)-2-Amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoato de metilo o su sal;
2. Ácido (2S)-2-amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoico o su sal y
3. Ácido (4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)acético o su sal.

25 Las sales farmacéuticamente aceptables se preparan haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (I) con 1 a 10 equivalentes de una base tal como hidróxido de sodio, metóxido de sodio, hidruro de sodio, *t*-butóxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio y similares, en disolventes como éter, tetrahidrofurano, metanol, *t*-butanol, dioxano, isopropanol, etanol, etc. También se puede usar una mezcla de disolventes. Las bases orgánicas tales como dietanolamina,  $\alpha$ -feniletilamina, bencilamina, piperidina, morfolina, piridina, hidroxietilpirrolidina, hidroxietilpiperidina, colina, guanidina, amonio, sales de amonio sustituido y sales de aluminio, y aminoácidos tales como glicina, alanina, cistina, cisteína, lisina, arginina, fenilalanina, etc. se pueden usar para la preparación de sales de aminoácidos. Como alternativa, las sales de adición de ácido, siempre que sea aplicable, se preparan mediante el tratamiento con ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido hidroxinaftoico, ácido ascórbico, ácido palmítico, ácido succínico, ácido benzoico, ácido bencenosulfónico, ácido tartárico, ácido oxálico y similares, en disolventes como acetato de etilo, éter, alcoholes, acetona, tetrahidrofurano, dioxano, etc. También se puede usar la mezcla de disolventes.

40 Cabe señalar que los compuestos de la invención pueden contener grupos que pueden existir en formas tautoméricas, y aunque se nombre, se describa, se muestre y/o se reivindique una forma en el presente documento, se pretende incluir inherentemente todas las formas en dicho nombre, descripción, representación y/o reivindicación.

45 Los estereoisómeros de los compuestos que forman parte de la presente invención se pueden preparar mediante el uso de reactivos en su forma enantiomérica individual, en el proceso, cuando sea posible, o llevando a cabo la reacción en presencia de reactivos o catalizadores en su forma enantiomérica individual o resolviendo la mezcla de estereoisómeros mediante métodos convencionales. Algunos de los métodos preferidos incluyen el uso de la resolución microbiana, resolviendo las sales diastereoméricas formadas con ácidos quirales tales como ácido mandélico, ácido alcanforsulfónico, ácido tartárico, ácido láctico y similares, siempre que sea aplicable o mediante el uso de bases quirales tales como brucina, alcaloides de la cinchona, sus derivados y similares.

50 Se pueden preparar diversos polimorfos de los compuestos de la fórmula general (I), que forman parte de la presente invención mediante la cristalización de los compuestos de fórmula (I) en diferentes condiciones. Por ejemplo, usando diferentes disolventes comúnmente usados o sus mezclas para la recristalización; cristalizaciones a diferentes temperaturas; varios modos de enfriamiento, que varían de enfriamiento muy rápido a muy lento durante las cristalizaciones. Con el calentamiento o la fusión de los compuestos seguida del enfriamiento gradual o inmediato, también se pueden obtener polimorfos. La presencia de polimorfos se puede determinar mediante espectroscopia de RMN de sonda sólida, espectroscopia de IR, espectroscopia de Raman, calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X de polvo u otras técnicas.

60 Los solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) que forman parte de la presente invención se pueden preparar mediante métodos convencionales tales como la disolución de los compuestos de fórmula (I) en disolventes tales como agua, metanol, etanol, mezcla de disolventes tales como acetona/agua, dioxano/agua, *N,N*-dimetilformamida/agua y similares, preferentemente agua y la recristalización mediante el uso de diferentes técnicas de cristalización.

65 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene uno o más de los

compuestos de fórmula general (I) como se ha definido anteriormente, sus formas tautoméricas, estereoisómeros, polimorfos, hidratos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables en combinación con los vehículos habituales empleados farmacéuticamente, diluyentes y similares, útiles para el tratamiento de trastornos hepáticos tales como NASH/NAFLD, fibrosis hepática, cirrosis hepática y esteatohepatitis.

5 La composición farmacéutica puede estar en las formas normalmente empleadas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, jarabes, soluciones, suspensiones y similares, pueden contener aromatizantes, edulcorantes, etc., en vehículos o diluyentes sólidos o líquidos adecuados, o en medios estériles adecuados para formar soluciones o suspensiones inyectables. Las composiciones se pueden preparar mediante procesos conocidos en la técnica. La cantidad del principio activo en la composición puede ser inferior al 70 % en peso. Por lo general, dichas composiciones contienen del 1 al 25 %, preferentemente 1-15 % en peso de compuesto activo, siendo el resto de la composición vehículos, diluyentes, excipientes o disolventes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cargas o diluyentes sólidos y soluciones acuosas u orgánicas estériles.

15 En general, la dosis eficaz para el tratamiento de una determinada afección en un paciente se puede determinar fácilmente y es ajustada por el médico durante el tratamiento para aliviar los síntomas o las indicaciones de la afección o enfermedad. En general, es adecuado administrar una dosis diaria de compuesto activo en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 1.000 mg/kg de peso corporal es adecuada para obtener resultados eficaces. La dosis diaria se puede administrar en una sola dosis o dividida en varias dosis. En algunos casos, dependiendo de la respuesta individual, puede ser necesario desviarse hacia arriba o hacia abajo de la dosis diaria inicialmente prescrita. Las preparaciones farmacéuticas típicas normalmente contienen de aproximadamente 0,2 a 500 mg de compuesto activo de fórmula I y/o sus sales o solvatos farmacéuticamente activos por dosis.

25 Aunque los compuestos de la invención se pueden administrar como el único agente farmacéutico activo, también se pueden usar en combinación con uno o más compuestos de la invención u otros agentes terapéuticos. Cuando se administran como una combinación, los agentes terapéuticos se pueden formular en forma de composiciones separadas que se administran a la vez o en momentos diferentes, o los agentes terapéuticos se pueden administrar como una sola composición.

30 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad de un compuesto o mezcla de compuestos de fórmula (I) que es suficiente para efectuar el tratamiento, según lo definido más adelante, cuando se administra sola o en combinación con otros tratamientos a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento.

35 El término "animal", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los mamíferos y, en particular, seres humanos. Dichos animales también se denominan en el presente documento sujetos o pacientes que necesitan tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz variará en función del sujeto y de la afección que se esté tratando, del peso y de la edad del sujeto, de la gravedad de la afección, del compuesto de fórmula (I) seleccionado en particular, de la pauta de dosificación que se vaya a seguir, del momento de la administración, del modo de administración y similares, pudiendo ser todo ello determinado fácilmente por cualquier experto habitual en la materia.

45 El término "hepatitis", como se describe en el presente documento, se refiere a la inflamación del hígado. La expresión "esteatosis hepática", como se describe en el presente documento, se refiere a la acumulación de gotitas de grasa o triglicéridos en el citoplasma de las células hepáticas/hepatocitos. La expresión "vacuolación de los hepatocitos", como se describe en el presente documento, se refiere a células hepáticas/hepatocitos que contienen vacuolas de diversos tamaños.

50 La expresión "balonamiento hepatocelular", como se describe en el presente documento, se refiere a una forma especial de degeneración de las células hepáticas asociada con el hinchamiento y el agrandamiento de las células encontradas particularmente en la esteatohepatitis.

55 La expresión "complicaciones de la diabetes" incluye, pero sin limitación, complicaciones microvasculares y macrovasculares, y se refiere a las enfermedades inducidas por la diabetes (hiperglucemia).

La expresión "enfermedad cardiovascular" se refiere a las enfermedades del corazón y del sistema circulatorio.

60 El término "profilaxis" o "prevención" significa la prevención de la enfermedad, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen.

El término "tratamiento" significa cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, incluyendo: (a) la inhibición de la enfermedad, es decir, el retardo o la detención del desarrollo de los síntomas clínicos; y/o (b) el alivio de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos.

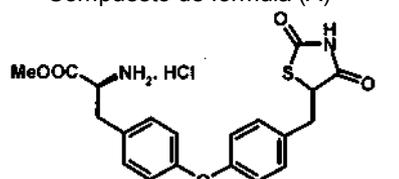
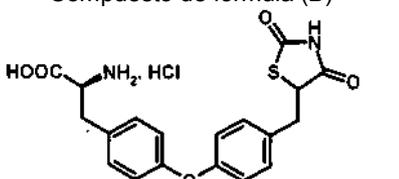
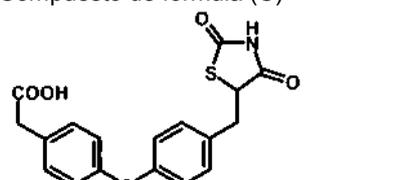
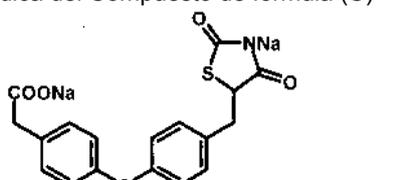
65 La expresión "compuesto/s para su uso", como se usa en el presente documento, engloba uno cualquiera o más de

los siguientes: (1) uso del/de los compuesto/s; (2) método de uso del/de los compuesto/s; (3) uso en el tratamiento de; (4) el uso para la fabricación de una composición farmacéutica/medicamento para el tratamiento o; (5) método de tratamiento/preVENCIÓN/reDUCCIÓN/inHIBICIÓN que comprende la administración de una cantidad eficaz del compuesto activo a un sujeto que lo necesita.

5 La presente invención se proporciona mediante los ejemplos que se dan a continuación, que se proporcionan a modo meramente ilustrativo, y no se han de considerar como limitantes del alcance de la invención. Se pretende que la variación y los cambios, que son evidentes para el experto en la materia, estén en el alcance y la naturaleza de la invención.

10 En la Tabla 1 que se presenta a continuación, se proporcionan los compuestos que pertenecen al alcance de la invención.

Tabla 1.

|  |   |
|--|---|
| <p>Compuesto de fórmula (A)</p>  <p>Sal clorhidrato de (2S)-2-amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoato de metilo</p> | <p>Compuesto de fórmula (B)</p>  <p>Sal clorhidrato de ácido (2S)-2-amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoico</p> |
| <p>Compuesto de fórmula (C)</p>  <p>Ácido (4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)acético</p>   | <p>Sal disódica del Compuesto de fórmula (C)</p>  <p>Sal disódica de ácido (4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)acético</p>    |

15 El compuesto de fórmulas (I) y (A)-(C) o sus sales se pueden preparar mediante métodos descritos en los documentos US6794401B2, US 7521465B2 y US7781464B2.

## Ensayo de biología

### 20 1. NAFLD/NASH

Para investigar el efecto del compuesto de fórmulas (A), (B), (C) y sus sales en las características clave de la NAFLD/NASH, se desarrollaron los modelos animales relevantes usando la dieta supranutricional, la bleomicina y los lipopolisacáridos (LPS).

#### Experimento - 1: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre el peso corporal en ratones DIO/NAFLD

30 Se desarrolló un modelo de roedores obesos y con NAFLD mediante la alimentación con dieta supranutricional, que simula varias características de la obesidad humana y la NAFLD. Estas características se trataron como se menciona a continuación. Para este estudio, se usaron treinta ratones macho C57BL/6 de 6-8 semanas de vida, con un peso corporal que variaba de 16 a 22 g. Los animales se dividieron en dos grupos. El primer grupo (n = 8, donde n se refiere al número de animales) se trató como un control normal alimentado con pienso (Nutri Lab<sup>®</sup> Rodent, Tetragon Chemie Pvt. Ltd., Bangalore) y el segundo grupo (n = 20) se trató con una dieta de 60 % Kcal rica en grasas (HFD) (Research Diets, New Brunswick, NJ, n.º de cat. D12492 con colorante azul) durante 90 días. Los animales se seleccionaron basándose en el peso corporal. Los animales alimentados con dieta de pienso normal (n = 8) sirvieron como control normal (Grupo I) y los animales alimentados con HFD se dividieron en dos grupos como control de DIO/NAFLD (Grupo II) (n = 10) y Grupo III (n = 9) tratado con compuesto de fórmula (A) a 100 mg/kg durante 28 días. Durante este período, se registraron diariamente el peso corporal y el consumo de alimento de los animales.

#### Experimento - 2: Efecto del Compuesto de fórmula (A) en ratones con NAFLD/NASH

45 Se desarrolló un modelo de NAFLD/NASH mediante la alimentación con dieta supranutricional, que simula varias características de NAFLD/NASH. Estas características se trataron como se menciona a continuación. Para este estudio, se usaron treinta ratones macho C57BL/6 de 6-8 semanas de vida, con un peso corporal que variaba de 16

a 36 g. Los animales se dividieron en dos grupos. El primer grupo (n = 10), tratado como un control normal, se alimentó con pienso (Nutri Lab<sup>®</sup> Rodent, Tetragon Chemie Pvt. Ltd., Bangalore) y el segundo grupo (n = 40) se trató con una dieta de 60 % Kcal HFD (Research Diets, New Brunswick, NJ, n.º de cat. D12492 con colorante azul) y 40 % de líquido rico en fructosa (HFL) durante 60 días. Tras 45 días, se sacrificaron dos animales de los grupos de inducción de la enfermedad y de control normal. Se llevó a cabo el examen histopatológico del hígado para confirmar la inducción de NAFLD/NASH. Los animales alimentados con la dieta de pienso normal sirvieron como control normal (Grupo I) y los animales alimentados con HFD y HFL se dividieron en tres grupos (n = 6-8) como el control de NAFLD/NASH (Grupo II), y el Grupo III y Grupo IV, que recibieron compuesto de fórmula (A) y metformina a 100 y 350 mg/kg p.o. respectivamente durante 28 días. El día 28, los animales se mantuvieron en ayunas 12 horas y el día 29 se extrajo sangre, se separó el plasma y se usó para los análisis bioquímico y de la concentración de compuesto. A continuación, se sacrificaron los animales. Se extrajo el hígado y se pesó. Los tejidos hepáticos se usaron para el análisis de la concentración del compuesto, la estimación de los triglicéridos y el examen histopatológico. También se observó la patología macroscópica del hígado.

### 15 **Experimento - 3: Efecto del Compuesto de fórmula (A) en ratones con NAFLD/NASH**

Se siguió el protocolo del experimento 2. Se comparó el compuesto de fórmula (A) con otros compuestos antidiabéticos (Figuras 8-13).

### 20 **Experimento - 4: Efecto del Compuesto de fórmula (A) en hámsteres alimentados con dieta rica en colesterol y rica en grasas (HC-HF)**

Se desarrolló dislipidemia en hámsteres mediante la alimentación con dieta supranutricional con el líquido de fructosa (10 %), que simula las características de la dislipidemia en los seres humanos. Estas características se trataron como se menciona a continuación. Para este estudio, se usaron treinta hámsteres sirios dorados machos de 14 a 16 semanas de vida, con pesos corporales que variaban entre 100 y 160 g. Los animales se dividieron en dos grupos. El primer grupo (n = 7) se trató como un control normal y se alimentó con pienso (Nutri Lab<sup>®</sup> Rodent, Tetragon Chemie Pvt. Ltd., Bangalore), y el segundo grupo (n = 23) se alimentó con dieta HC-HF (elaborada internamente), cuya composición era 11,50 % de aceite de maíz, 11,50 % de aceite de coco, 0,50 % de colesterol, 0,25 % de colato de sodio y 76,25 % de pienso Nutri Lab<sup>®</sup>, y los animales recibieron fructosa al 10 % en el agua potable. Tras 14 días, se extrajo sangre de los animales para la estimación del parámetro bioquímico, a saber, triglicéridos (TG), colesterol total (TC) y glucosa para confirmar la inducción de la enfermedad. Basándose en el parámetro bioquímico, se agruparon los animales. Los animales alimentados con la dieta de pienso normal (n = 7) sirvieron como control normal (Grupo I) y los animales alimentados con dieta supranutricional con el líquido de fructosa (10 %) se dividieron en tres grupos, como el control de la enfermedad (Grupo II) (n = 7), y el Grupo III (n = 8) y el Grupo IV (n = 8), que se trataron con el compuesto de fórmula (A) a 30 mg/kg y 100 mg/kg p.o., respectivamente durante 28 días. Durante este período, se registró diariamente el peso corporal de los animales. Los animales se mantuvieron durante 4 horas en ayunas y se extrajo sangre en los días 16 y 28 del tratamiento, se separaron el plasma y el suero, y se usaron para el análisis bioquímico, a saber, TG, TC, glucosa en plasma y ácidos grasos no esterificados (NEFA).

### **Experimento - 5: Respuesta a la dosis del Compuesto de fórmula (A) sobre la NAFLD/NASH en ratones C57BL/6**

Para desarrollar el modelo de NAFLD/NASH, se siguió el mismo protocolo que se ha mencionado en el Experimento - 2. Al final del período de inducción, se agruparon los animales de la siguiente manera. Los animales alimentados con una dieta de pienso normal (n = 9) sirvieron como control normal (Grupo 1) y los animales alimentados con HFD y HFL se dividieron en cuatro grupos (n = 9-12) como el control de NAFLD/NASH (Grupo II), y los Grupos III, IV y V, que se trataron con compuesto de fórmula (A) a 10, 30 y 100 mg/kg p.o. respectivamente durante 28 días. Tras 28 días de tratamiento, los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 horas y se extrajo sangre para las estimaciones bioquímicas. Tras la recogida de sangre, se sacrificaron los animales, y se extrajo y se pesó el hígado. Los tejidos hepáticos se usaron para el análisis de la concentración del compuesto, la estimación de TG y el examen histopatológico. También se observó la patología macroscópica del hígado.

### 55 **Experimento - 6: Efecto del compuesto de fórmula (A) en el ensayo de tolerancia a la insulina (ITT) en ratones con obesidad inducida por la dieta (C57BL/6)**

El modelo de animales con obesidad y con la resistencia a la insulina se desarrolló mediante la alimentación con dieta rica en grasas de 60 % Kcal, que simula varias características de la obesidad humana y la resistencia a la insulina. Estas características se trataron como se menciona a continuación. Se usaron treinta ratones C57BL/6 machos de 6 a 8 semanas de vida, y con pesos corporales que variaban entre 16 y 22 g. Los animales se dividieron en dos grupos. El primer grupo (n = 10) se trató como una alimentación con pienso de control normal (Nutri Lab<sup>®</sup> Rodent, Tetragon Chemie Pvt. Ltd., Bangalore), y el segundo grupo (n = 25) se alimentó con dieta rica en grasas (HFD) de 60 % Kcal (Research Diets, New Brunswick, NJ, n.º de catálogo D12492 con colorante azul) durante 120 días. Al final del período de inducción, los animales se seleccionaron basándose en la resistencia a la insulina para el estudio adicional. Los animales alimentados con la dieta de pienso normal (n = 10) sirvieron como control normal

(Grupo I), y los animales alimentados con HFD se dividieron en dos grupos (n = 6-7) como el control de DIO (Grupo II) y el Grupo III, tratados con el compuesto de fórmula (A) a 30 mg/kg durante 28 días. Durante este período, se registraron diariamente el peso corporal y el consumo de alimento. El día 28, se sometieron los animales a 12 horas de ayuno y se realizó el ITT. Tras un lapso de 3 días, se volvieron a someter una vez más los animales a 12 horas de ayuno, se extrajo sangre, y se separó el plasma o el suero para su análisis bioquímico.

**Experimento - 7: Respuesta a la dosis del compuesto de fórmula (A) en la NAFLD/NASH inducida por una dieta supranutricional en ratas recién nacidas tratadas con estreptozotocina (nSTZ)**

Se desarrolló un modelo de NAFLD/NASH de roedores mediante la alimentación con una dieta supranutricional a ratas tratadas con nSTZ. Este modelo simula diferentes características de las NAFLD/NASH humanas. Crías de rata Wistar macho de un día de vida recibieron por inyección bien 100 mg/kg de estreptozotocina (STZ) o solución salina normal (i.p.) para desarrollar resistencia a la insulina. Veintiún días después del tratamiento, los animales tratados con STZ se dividieron en dos grupos y se alimentaron bien con dieta de pienso normal o dieta rica en grasas de 60 % Kcal con fructosa al 40 % en el agua potable durante tres meses para inducir la NAFLD/NASH. Los animales tratados con solución salina fueron alimentados con dieta de pienso normal. Después de 45 días y 60 días de la inducción, se sacrificó un animal del grupo de inducción, y se llevó a cabo el examen histopatológico del hígado para confirmar la inducción de NAFLD/NASH. Después de 90 días de período de inducción, los animales se dividieron en los siguientes grupos. Los animales alimentados con dieta de pienso normal se mantuvieron como el control normal (Grupo I, n = 9) y el control de nSTZ (Grupo II, n = 7). Los grupos de inducción de la enfermedad se dividieron en cuatro grupos, el control de NAFLD/NASH (Grupo-III, n = 9), y el Grupo IV (n = 7), Grupo V (n = 8) y Grupo VI (n = 9) tratados con el Compuesto de fórmula (A) a 1, 3 y 10 mg/kg de peso corporal p.o. respectivamente durante 48 días. Se registraron el peso corporal diario, y el consumo de alimento y agua durante todo el período experimental. El día 31 y el día 48, los animales se mantuvieron en ayunas 12 horas, y el día 32 y el día 49 se extrajo sangre, se separó el plasma y se usó para el análisis bioquímico y de concentración del compuesto. El día 49, tras la extracción de sangre, se sacrificaron los animales. Se extrajeron el hígado y la capa de grasa, y se pesaron. Los tejidos hepáticos se usaron para el análisis de la concentración del compuesto, la estimación de los TG, y el examen histopatológico y el estudio de la expresión. También se observó la patología macroscópica del hígado.

**Experimento - 8: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la fibrosis pulmonar inducida por la bleomicina en ratones C57BL/6 (profiláctico)**

En este estudio, se usaron ratones C57BL/6 hembra. Los animales se dividieron en cuatro grupos basándose en su peso corporal. Para inducir la fibrosis, se administró bleomicina a 0,1 U/animal (volumen 50 µl) por vía intratraqueal al Grupo II (control de la enfermedad), Grupo III y Grupo IV, mientras que el Grupo I (control normal) solo recibió solución salina. Los animales del Grupo III y del Grupo IV desafiados con bleomicina se trataron con pentoxifilina (20 mg/kg p.o.) y el compuesto de fórmula (A) (100 mg/kg p.o.) respectivamente, mientras que los animales del Grupo I y del Grupo II desafiado con bleomicina recibieron vehículo durante 7 días antes y 14 días después de la administración de la bleomicina. Se registraron el peso corporal, el consumo de alimento y agua, y la tasa de mortalidad. Al final del estudio, se extrajo sangre de los animales y el plasma se almacenó en un congelador (-80 °C) para la estimación de los parámetros bioquímicos. A continuación, se sacrificaron los animales, y se recogió y se pesó tejido pulmonar. Se almacenó tejido del pulmón derecho en el congelador (-80 °C) para el estudio de la expresión y el análisis de la concentración del fármaco. Los tejidos de pulmón izquierdo se fijaron en formalina (10 %) mediante infusión lenta, después se sumergieron y se conservaron en formalina (10 %) para el examen histopatológico.

**Experimento - 9: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el nivel de TNF-α inducido por lipopolisacáridos (LPS) en ratones con NAFLD/NASH**

Para desarrollar el modelo de NAFLD/NASH, se siguió el mismo protocolo que se ha mencionado en el Experimento - 2. Tras la inducción, los animales se agruparon además de la siguiente manera. Los animales alimentados con dieta de pienso normal (n = 10) sirvieron como control normal (Grupo I) y los animales alimentados con HFD y HFL se dividieron en dos grupos como control de la enfermedad (Grupo II) (n = 10) y grupo de tratamiento (Grupo III) (n = 9). La duración del tratamiento fue de 28 días. Durante este período, los animales del Grupo I y Grupo II recibieron agua como vehículo, y los animales del Grupo III se trataron con el compuesto de fórmula (A) a 100 mg/kg por vía oral. El día 27, los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 horas, y el día 28, después de 60 minutos de tratamiento, los animales se desafiaron con LPS (500 µg/animal) por vía intraperitoneal. Después, tras 90 minutos de exposición a LPS, se llevó a cabo la extracción de sangre, se separaron el plasma y el suero, y se almacenaron a -80 °C en un congelador para su análisis posterior. Tras la extracción de sangre, se sacrificaron los animales; se extrajeron y se pesaron el hígado, y las grasas inguinales y del epidídimo.

**Experimento-10: Efecto de la sal disódica del compuesto de fórmula (C) en hámsteres alimentados con la dieta HC-HF**

Se desarrolló el modelo de dislipidemia en el protocolo que se ha mencionado en el Experimento 4. Tras 14 días, se extrajo sangre de los animales para estimar el parámetro bioquímico con el fin de confirmar la inducción de la

enfermedad. Tras el período de inducción, se agruparon los animales de la siguiente manera, los animales alimentados con dieta de pienso normal (n = 6) sirvieron como control normal (Grupo I) y los animales alimentados con dieta supranutricional con líquido de fructosa (10 %) se dividieron además en tres grupos, como control de la enfermedad (Grupo II) (n = 7), y el Grupo III (n = 7) y el Grupo IV (n = 7) tratados con sal disódica del compuesto de fórmula (C) a 10 mg/kg y 30 mg/kg p.o., respectivamente durante 28 días. Durante este período, se registró diariamente el peso corporal de los animales. El día 14 y el día 28, los animales se mantuvieron durante 4 horas en ayunas y se extrajo la sangre, y se separaron el plasma y el suero, que se usaron para el análisis bioquímico.

#### **Experimento - 11: Efecto del compuesto de fórmula (A) y de la sal disódica del compuesto de fórmula (C) sobre la NAFLD/ASH en ratones**

Para desarrollar el modelo de NAFLD/NASH, se siguió el mismo protocolo que se ha mencionado en el Experimento - 2. Al final del período de inducción, los animales se agrupan de la siguiente manera. Los animales alimentados con dieta de pienso normal (n = 8) sirvieron como control normal (Grupo I), y los animales alimentados con HFD y HFL se dividieron además en tres grupos (n = 9) como control de NAFLD/NASH (Grupo II), el Grupo III y el Grupo IV, que recibieron el compuesto de fórmula (A) y la sal disódica del compuesto de fórmula (C) a 100 y 30 mg/kg p.o., respectivamente, durante 28 días. El día 28, se mantuvieron los animales en ayunas durante 12 horas, y el día 29 se extrajo la sangre, se separó el plasma y se usó para el análisis bioquímico y de la concentración del compuesto. Tras la extracción de la sangre, los animales se sacrificaron. Se recogió y se pesó el hígado. Los tejidos hepáticos se usaron para el examen histopatológico. También se observó patología macroscópica del hígado.

#### **Experimento - 12: Compuesto de fórmula (A) y sales disódicas del Compuesto de fórmula (C) sobre la hipertrigliceridemia inducida por consumo agudo de alcohol en ratones**

Para este estudio, se usaron ratones C57BL/6 macho de 6 a 8 semanas, y peso corporal que variaba entre 22 y 28 g. Los animales se dividieron en cuatro grupos (n = 8) y se alimentaron con pienso normal (Nutri Lab<sup>®</sup> Rodent, Tetragon Chemie Pvt. Ltd., Bangalore) y agua potable. Los animales del Grupo I y Grupo II sirvieron como control normal y control de la enfermedad tratado con vehículo. Los animales del Grupo III (n = 8) y del Grupo IV (n = 8) se trataron con el compuesto de fórmula (A) y sales disódicas de compuesto de fórmula (C) a 100 y 30 mg/kg p.o., respectivamente durante siete días. El séptimo día, una hora después de la administración de los compuestos, los animales del Grupo II, del Grupo III y del Grupo IV fueron desafiados con alcohol al 40 % (10 ml/kg b.w) p.o. Dieciocho horas después del desafío, se extrajo sangre de los animales, se separó el plasma y se usó para el análisis de los parámetros bioquímicos.

#### **Parámetros bioquímicos**

Se midieron parámetros como la glucosa, ALT, AST, CT, TG (analyzer de química clínica Erba XL 300), insulina (Linco<sup>®</sup> - CA, código de producto: EZRMI-13K) y TNF $\alpha$  (GE Healthcare, Amersham, RU. Código del producto: RPN2718) usando kits disponibles en el mercado. Se midió el NEFA en suero usando el kit NEFA C disponible en el mercado (código del producto n.º 279-75401, Wako pure chemical industries Ltd, Japón).

**Triglicéridos hepáticos:** se extrajo lípido hepático de acuerdo con el método descrito por Folch *et al.*, (*Journal of Biological Chemistry*, **1957**, 497) y Purushotham A. *et al.*, (*Journal of Lipid Research*, **2007**, 48, 444-452). Los TG se estimaron mediante el uso de un kit convencional disponible en el mercado.

#### **Histopatología hepática:**

Se fijaron muestras hepáticas con formalina al 10 % y se introdujeron en parafina. Se cortaron secciones que medían 5  $\mu$ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). La histología hepática se examinó usando el sistema de análisis (NIKON, ECLIPSE-E200, Japón). (Carson FL., 1996).

Los animales tratados con el Compuesto de fórmula (A) mostraron una reducción del peso corporal, y la glucemia en ayunas y la esteatosis hepática. El efecto de este compuesto sobre estas características es mejor que otros compuestos convencionales tales como la metformina, la viladagliptina y la rosiglitazona.

Los modelos de enfermedades tratados con el compuesto de fórmula (A) y las sales disódicas del compuesto de fórmula (C) mostraron un impacto significativo en las características clave de NAFLD/NASH. En concreto, los ratones mostraron una reducción del peso corporal (Figuras 1, 2, 8, 16 y 23), glucosa (Figuras 5 y 9), AST (Figura 17), ALT (Figuras 10 y 18), niveles de TNF- $\alpha$  (Figura. 28 ), mejora de HOMA-IR (Figura 22) y mejora de la histopatología hepática (esteatosis hepática) (Figuras 6, 7, 12, 13, 19, 20, 21, 24, 25, 30, 31 y 32) en comparación con el control de la enfermedad sin tratar pertinente. El hámster dislipidémico tratado con compuesto de fórmula (A) y sales disódicas de compuesto de fórmula (C) mostró una reducción significativa de TG y NEFA (Figuras 14, 15 y 29). En el caso de la fibrosis inducida por bleomicina, el compuesto de fórmula (A) en tratamiento previene significativamente la formación de fibrosis (Figuras 26 y 27). Los ratones hipertrigliceridémicos inducidos por el consumo agudo de alcohol tratados con el compuesto de fórmula (A) y sales disódicas de compuesto de fórmula (C) mostraron una reducción significativa de TG (Figura 33). El efecto de este compuesto sobre estas características es

mejor que otros compuestos convencionales tales como la metformina, la vildagliptina y la rosiglitazona.

Tomado en conjunto, el compuesto de fórmula (A) ha demostrado un efecto notable sobre la esteatosis hepática, el rasgo distintivo de NADLD/NASH, además del efecto sobre otros rasgos clave tales como la obesidad, la resistencia a la insulina, la dislipidemia y la fibrosis. Este compuesto puede ser un tratamiento atractivo para el tratamiento de NAFLD/NASH.

#### **Análisis de los datos:**

Los valores se expresan como la media  $\pm$  DE. Los gráficos se generaron usando GraphPad Prism® (versión 4). Se realizó un análisis estadístico usando la prueba t o ANOVA de una vía con la prueba posterior de Dunnett o ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni. Los resultados se consideraron significativos cuando  $P < 0,05$ .

El compuesto de fórmula (A) también tiene un efecto significativo en las citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$  y, por lo tanto, es útil en el tratamiento de enfermedades como la soriasis.

#### **Experimento - 13: Efecto de los compuestos de Fórmula (A), (B) y (C) en la adipogénesis en fibroblastos de ratón 3T3-L1**

Se sembraron fibroblastos 3T3-L1 a una concentración de 10.000 células/pocillo en placas de cultivo tisular de 24 pocillos en un volumen total de 1 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal al 10 %, penicilina y estreptomina. Después de la incubación durante una noche a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub>, las células se trataron con vehículo (DMSO al 0,01 %), rosiglitazona (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) y diferentes concentraciones de compuesto de fórmula (A) (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), compuesto de la fórmula (B) (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) y compuesto de fórmula (C) (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) para ensayar las propiedades adipogénicas. Cada dos días, se sustituyó el contenido de los medios con medio recién preparado y el fármaco. Este proceso se llevó a cabo durante 7 días. Tras 7 días de tratamiento, se fijaron las células en formalina al 10 % durante 1 hora a 40 °C, se tiñeron con solución de aceite rojo O durante 10 minutos y se lavaron 6 veces con 1 x PBS para eliminar el exceso de colorante. Las placas se secaron y se visualizaron con objetivo de 40 aumentos usando un microscopio Nikon E200, y se tomaron imágenes con la cámara digital Nikon DXM 1200C. Las imágenes se presentan en la Figura 34.

Los pigmentos rojos observados en las células tratadas con rosiglitazona en 1  $\mu$ M o 10  $\mu$ M son los lípidos intracelulares teñidos con aceite rojo O, indicadores de adipogénesis (Figura 34, rosiglitazona 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M). Los compuestos de fórmula (A), (B) y (C) en 1  $\mu$ M o 10  $\mu$ M no indujeron la adipogénesis en fibroblastos 3T3-L1 tras 7 días de tratamiento a diferencia de la rosiglitazona (Figura 34, compuestos de fórmula (A), (B) y (C) en comparación con rosiglitazona). Por lo tanto, los datos muestran que los compuestos de fórmula (A), (B) y (C) no inducen la adipogénesis en fibroblastos 3T3-L1.

#### **Experimento - 14: Efecto de los compuestos de fórmula (B) y (C) sobre la secreción del colágeno de tipo 1 de las células estrelladas hepáticas activadas (HSC)**

Se trataron células HSC con los fármacos y se incubaron durante una noche. Se recogió el medio acondicionado y se extrajeron las proteínas secretadas usando el método de TCA-acetona. Se recogieron las células para el análisis de transferencia Western, y se añadió SDS al 1 % a la muestra. Las proteínas se detectaron mediante el uso de dilución 1:500 de anticuerpo policlonal al colágeno de tipo 1 (Abcam; AB292) y diluciones 1:1.000 de IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (Bangalore GENEI). Las transferencias se desarrollaron mediante el uso de sustrato TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El control de carga se realizó usando el nivel de expresión del gen constitutivo de la actina  $\beta$ .

La secreción de colágeno por las células estrelladas hepáticas activadas se reduce notablemente en el tratamiento con compuestos de fórmula (B) y (C).

Los compuestos de la presente invención han demostrado inhibir el colágeno de tipo 1 en las células estrelladas hepáticas activadas (Figura 35a y 35b). El efecto fue comparable con el compuesto de ensayo pentoxifilina a la misma concentración. Por lo tanto, los compuestos tienen propiedades antifibróticas y son útiles en el tratamiento de la fibrosis hepática y otras enfermedades fibróticas en las que la patología implica la modulación de la expresión del gen del colágeno (ejemplos: fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, esclerodermia etc.).

#### **Experimento - 15: Inducción de la apoptosis en las células estrelladas hepáticas (LX2)**

El yoduro de propidio (PI) se ha usado ampliamente para medir la apoptosis en diferentes sistemas experimentales (*Eur. J. Pharmacol.*, 2003, 473, 117-125.; *Br. J. Pharmacol.*, 2009, 158, 1720-1734). Se trataron las células LX2 con vehículo (DMSO), estaurosporina (0,1 nM), compuesto de fórmula (B) (2  $\mu$ M), compuesto de fórmula (C) (2  $\mu$ M) durante 8 horas, seguido de yoduro de propidio (PI) durante 10 minutos. A continuación, se lavaron las células con PBS 2 veces para eliminar el PI no unido, y se adquirieron imágenes de fluorescencia con la cámara DP71 adaptada a un microscopio Olympus IX71. Las células apoptóticas se detectaron mediante tinción de yoduro de propidio (PI) y

se estimó el % de células apoptóticas por campo. Se contaron el número de células positivas en PI y el número total de células de las imágenes y se representaron como el porcentaje de células apoptóticas por campo.

5 Los compuestos muestran una inducción significativa de la apoptosis en las células LX2 en comparación con el control sin tratar o el control del vehículo. Los datos mostraron un aumento de la apoptosis de las HSC mediante el tratamiento con el compuesto (B) y el compuesto (C). \*frente al vehículo (DMSO) ( $P < 0,01$ ). En el tratamiento con el compuesto (B) a  $2 \mu\text{M}$ ,  $6 \pm 0,40$  % de las células resultaron ser apoptóticas. Sin embargo, en el tratamiento con el compuesto (C),  $7,5 \pm 0,64$  % de las células LX2 fueron apoptóticas. Estos valores fueron significativamente superiores a la apoptosis inducida en las células tratadas con vehículo (DMSO). En este experimento, la estaurosporina (estau), un potente inductor conocido de la apoptosis, mostró aproximadamente un 23 % de apoptosis en las células LX2. Por lo tanto, los datos del estudio muestran que el compuesto de fórmula (B) y el compuesto de fórmula (C) inducen la apoptosis en las células HSC. Los resultados se proporcionan en la Figura 36.

### 15 Experimento - 16: Inducción selectiva de la apoptosis en las células estrelladas hepáticas (LX2)

La metodología adoptada es la misma que en el Experimento-7 anterior. Los resultados se muestran en la Figura 37.

20 Se detectaron las células apoptóticas mediante tinción con yoduro de propidio (PI) y se estimó el % de células apoptóticas por campo. Los datos mostraron un aumento significativo de la apoptosis de las células estrelladas hepáticas (LX2) mediante el tratamiento con el compuesto (B) y con el compuesto (C). Sin embargo, no se observó apoptosis significativa en las células endoteliales humanas (ECV 304), los fibroblastos humanos aislados a partir de biopsias de piel o hepatocitos humanos (HepG2) mediante el tratamiento con el compuesto de fórmula (B) o (C) \* frente al vehículo (DMSO) ( $P < 0,01$ )

25 Los compuestos muestran una inducción significativa de la apoptosis en las células estrelladas hepáticas en comparación con el control sin tratar o el control de vehículo. Sin embargo, los hepatocitos, los fibroblastos humanos aislados a partir de biopsias de piel y las células epiteliales tratados bien con compuesto de fórmula (B) o (C) no mostraron apoptosis significativa en comparación con el control del vehículo (DMSO). Por lo tanto, los datos del estudio muestran que los efectos apoptóticos del compuesto tanto de fórmula (B) como de fórmula (C) son selectivos de las HSC.

30 La inducción selectiva de la apoptosis de las células estrelladas hepáticas en el hígado puede potenciar o mejorar la resolución de la enfermedad hepática y, en particular, de la fibrosis hepática. Por lo tanto, los compuestos proporcionan métodos de tratamiento de la enfermedad hepática mediante la inducción selectiva de la apoptosis de las células estrelladas hepáticas en el hígado.

### 35 2. Complicaciones de la diabetes (Ejemplo de referencia)

40 **Aldosa reductasa:** se usa aldosa reductasa de cristalino de rata. Se incuban previamente el compuesto de ensayo y/o el vehículo con la enzima a  $3.000 \mu\text{g/ml}$  (*J Enzyme Inhib.* 1993, 7, 249-256; *Biol. Pharm. Bull.* 1994, 17, 458-459) y NADPH  $0,2 \text{ mM}$  en tampón de fosfato a pH 6,2 durante 15 minutos a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . La reacción se inicia mediante la adición de DL-gliceraldehído  $10 \text{ mM}$  y se incubaba durante otros 20 minutos. Se lee espectrofotométricamente la determinación de la cantidad de NADPH que queda. Los compuestos se detectan a  $10 \mu\text{M}$ . Dado que la actividad enzimática puede cambiar de un lote a otro, si es necesario, se ajustará la concentración usada. El compuesto de referencia convencional es la quercitina, que se ensaya en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de competición de la que se calcula su  $\text{CI}_{50}$  (Tabla 2).

Tabla 2: Actividad inhibidora de la aldosa reductasa

| n.º de muestra | Compuesto de fórmula | $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) |
|----------------|----------------------|------------------------------------|
| 1              | A                    | 4,07                               |
| 2              | B                    | 4,92                               |
| 3              | C                    | 1,43                               |
| 4              | Quercitina           | 0,35                               |

50 Basándose en los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*, se puede concluir que los Compuestos A, B y C son inhibidores moderadamente potentes de la aldosa reductasa. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  son comparables al Sorbinil ( $2 \mu\text{M}$ ), indicativo de la posible actividad *in vivo* para la inhibición de la aldosa reductasa y el posible tratamiento de las complicaciones de la diabetes (*Biochemical Pharmacology*, 1986, 35, 2955-2959).

### 55 Inhibición de iNOS:

Primero se incubaron el Compuesto de fórmula (A) o rosiglitazona durante una hora y luego se desafiaron con LPS a  $1 \mu\text{g/ml}$  durante 6 horas. Al final del ensayo, se sondaron los lisados celulares con anticuerpo anti-iNOS.

El Compuesto de fórmula (A) inhibe la producción de iNOS en estas células (Figura 38). Basándose en los resultados, se concluye que el Compuesto de fórmula (A) es un potente inhibidor de la iNOS con una actividad superior a la rosiglitazona a concentraciones iguales (30  $\mu$ M). Dado que iNOS está implicada en la patología de las complicaciones de la diabetes, se prevé que el Compuesto de fórmula (A) tendrá un efecto protector en el desarrollo de la neovascularización aportada por un nivel alto de iNOS.

#### **Inhibición de TNF- $\alpha$ e IL-6 inducida por LPS *in vivo*:**

Este estudio se realizó cuando los ratones tenían de 10 a 11 semanas de vida. El Día 0, se midieron los pesos corporales y se asignaron a dos grupos de 6 ratones cada uno para obtener pesos corporales medios similares por grupo. Recibieron por vía oral bien vehículo (agua desionizada, Grupo 1) o el Compuesto de fórmula (A) (50 mg/kg; Grupo 2) diariamente entre las 9:30 y las 10:30 a.m. durante 10 días. Se midieron los pesos corporales los días 3, 7 y 10 del estudio antes de la administración del vehículo o del fármaco. El Día 10, los ratones recibieron LPS a 400  $\mu$ g/kg, i.p. Tras 1 hora, se les administró por vía oral vehículo o Compuesto de fórmula (A). Tras otros 90 minutos, los ratones fueron sacrificados por asfixia con dióxido de carbono. Se extrajo la sangre por punción cardíaca y se procesó para obtener suero. Los sueros fueron almacenados a -80 °C para el análisis *ex vivo* de TNF- $\alpha$  y citocinas IL-6.

#### **Inmunoensayo del TNF- $\alpha$ en suero:**

Se determina la concentración de TNF- $\alpha$  en suero para cada grupo de ratones usando el kit de inmunoensayo de TNF- $\alpha$  de ratón Quantikine. Para el ensayo, se siguieron las instrucciones del fabricante. Se diluyeron 1:20 en diluyente Calibrator las muestras de suero de los grupos de ratones tratados tanto con vehículo como con el Compuesto de fórmula (A). Se leyó la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm usando el lector de microplacas (Figura 39).

#### **Inmunoensayo de IL-6 en suero:**

Se determina la concentración de IL-6 en suero para cada grupo de ratones usando el kit de inmunoensayo de IL-6 de ratón Quantikine. Para el ensayo, se siguieron las instrucciones del fabricante. Se diluyeron 1:200 en diluyente Calibrator las muestras de suero del grupo de ratones tratado con vehículo. Se diluyeron 1:100 en diluyente Calibrator las muestras de suero del grupo de ratones de tratamiento. Se leyó la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm usando el lector de microplacas (Figura 40).

#### **Mejora de la degeneración lenticular en el modelo de diabetes de tipo I inducida por estreptozotocina (STZ) *in vivo*:**

Se desarrolló el modelo animal mediante la inyección de STZ a ratas Sprague Dawley y se mantuvo durante 10 semanas para desarrollar complicaciones de la diabetes. Inicialmente, los animales eran hiperglucémicos y, crónicamente, desarrollaron varias características de la diabetes y complicaciones de la diabetes, simulando la diabetes y las complicaciones humanas. Estas características se trataron como se menciona a continuación. Para este estudio, se usaron cuarenta ratas Sprague Dawley macho de 6 a 8 semanas, con un intervalo de pesos corporales de entre 150 y 190 g. Los animales se dividieron en dos grupos. El primer grupo (n = 10) se trató como un control normal que recibió por inyección solución salina normal, y el segundo grupo (n = 30) se trató con STZ (50 mg/kg, i.v.), (Sigma, EE.UU.). Se registró el peso corporal cada semana y la glucosa en sangre se registró cada mes usando un glucómetro (Contour TS, Bayer Healthcare Ltd.). Cada semana, se examinaron los ojos para detectar los cambios en las cataratas. Tras 10 semanas de la inducción de la diabetes, se agruparon los animales basándose en los niveles de glucosa en sangre y la gravedad de la catarata. El primer grupo sirvió como control normal (n = 10). Los animales diabéticos con cataratas se dividieron en dos grupos, y el segundo grupo sirvió como control de la enfermedad (n = 9) y el tercer grupo se trató con el compuesto de fórmula (A) (n = 10) a la dosis de 100 mg/kg durante 2 meses. El último día del experimento, los animales se mantuvieron durante 12 horas en ayunas, al día siguiente se extrajo sangre, se separó el plasma y se usó para el análisis bioquímico. Entonces, se sacrificaron los animales; se extrajeron los dos ojos y se usaron para el examen histopatológico.

La administración oral del compuesto de fórmula (A) tuvo un efecto en cada una de las características clave de las complicaciones de la diabetes. En concreto, los ratones mostraron una reducción de TNF- $\alpha$  (Figura 39) e IL-6 (Figura 40). La rata tratada con el compuesto de fórmula (A) mostró una mejora significativa de la degeneración lenticular (Figura 41). En el caso *in vitro*, el compuesto de fórmula (A) presentó una reducción de la actividad de la aldosa reductasa y la producción de iNOS (Figura 38).

#### **Análisis de los datos:**

Los valores se expresan como la media  $\pm$  DE. Los gráficos se generaron usando GraphPad Prism<sup>®</sup> (versión 3). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t no pareada de dos colas con la corrección de Welch y ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni usando GraphPad Prism<sup>®</sup>. Los resultados se consideraron significativos cuando p < 0,05.

**3. Actividad inhibidora de la metaloproteinasa de la matriz-2 (MMP-2) (a 10  $\mu$ M)**

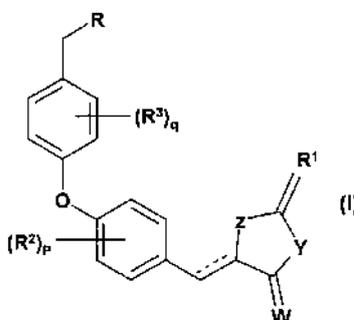
Las enzimas MMP-2 están implicadas en la metástasis pulmonar, y su inhibición es útil para prevenir o tratar la metástasis pulmonar (*Journal of Ethnopharmacology* 2011, 133, 426-433). Los compuestos de la presente invención son conocidos por inhibir la actividad de MMP-2 y, por lo tanto, son útiles para prevenir o tratar la metástasis pulmonar (Tabla 3).

Tabla 3: Actividad inhibidora de la metaloproteinasa de la matriz-2

| n.º de muestra | Compuesto de fórmula | % de inhibición |
|----------------|----------------------|-----------------|
| 1              | (B)                  | 59              |
| 2              | (C)                  | 16              |

## REIVINDICACIONES

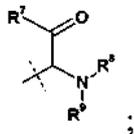
1. Un Compuesto de fórmula (I), sus formas tautoméricas, estereoisómeros, polimorfos, hidratos, solvatos, sales farmacéuticamente aceptables y composiciones farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de un trastorno hepático:



en la que ---- representa un enlace opcional; W representa O o S; Y representa NR<sup>4</sup>, S u O; en el que R<sup>4</sup> representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo y arilo, un contraión o -CH<sub>2</sub>COR<sup>6</sup>; en el que R<sup>6</sup> representa -OH, -NH<sub>2</sub>, -NHOH o OR<sup>18</sup>; en el que R<sup>18</sup> es un grupo alquilo; Z representa -CR<sup>5</sup> o S; R<sup>1</sup> representa O, S o, junto con R<sup>5</sup>, forma un sistema de anillo condensado aromático o heteroaromático de 5 o 6 miembros que contiene átomos de carbono, o 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre O, S o N; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>5</sup> representan independientemente hidrógeno, halógenos, hidroxilo, nitro, ciano, formilo, amino, alquilo, haloalquilo o alcoxi;

R representa bien U o V; en el que U representa hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, formilo, amino, -COR<sup>10</sup> o grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) lineal o ramificado y grupo alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); R<sup>10</sup> representa -OR<sup>11</sup> o -NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup>; en el que R<sup>11</sup> representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo y heteroarilo, o un contraión; R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> representan independientemente, hidrógeno, o grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo, arilo y heteroarilo; o R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> forman juntos un anillo heteroalifático o heteroaromático;

V representa



R<sup>7</sup> representa -OR<sup>14</sup>; en el que R<sup>14</sup> representa hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo o heteroarilo, o un contraión; o -NR<sup>15</sup>R<sup>16</sup>; en el que R<sup>15</sup> y R<sup>16</sup> representan independientemente, hidrógeno o grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo, arilo y heteroarilo; R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> representan independientemente, hidrógeno, grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, alquenilo, arilo y heteroarilo o -COR<sup>17</sup>; en el que R<sup>17</sup> representa grupos sustituidos o no sustituidos seleccionados entre alquilo, arilo, heteroarilo, alquenilo, alquenilo, ariloxi, alcoxilo y aralcoxilo;

p y q son números enteros seleccionados entre 1-3.

2. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) se selecciona entre

- i. (2S)-2-amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoato de metilo o su sal;
- ii. ácido (2S)-2-amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoico o su sal y
- iii. ácido (4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)acético o su sal.

3. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha sal se selecciona entre sal clorhidrato, bromhidrato, sódica, potásica o magnésica.

4. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es sal clorhidrato de (2S)-2-amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoato de metilo.

5. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es sal clorhidrato de ácido (2S)-2-amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoico.

6. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es ácido (4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)acético.

7. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es sal disódica de ácido (4-{4-

[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)acético.

5 8. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno hepático se selecciona entre enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), fibrosis hepática, cirrosis hepática y esteatohepatitis alcohólica.

9. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno hepático es NAFLD y NASH.

10 10. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para reducir los niveles de triglicéridos hepáticos.

11. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para inhibir la metaloproteinasa de la matriz-2.

12. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre:

15 (i) (2S)-2-amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoato de metilo o su sal;

(ii) ácido (2S)-2-amino-3-(4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)propanoico o su sal; y

(iii) ácido (4-{4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il)metil]fenoxi}fenil)acético o su sal,

para su uso en el tratamiento de NAFLD y NASH.

20

Figura 1: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre el peso corporal en ratones DIO/NAFLD

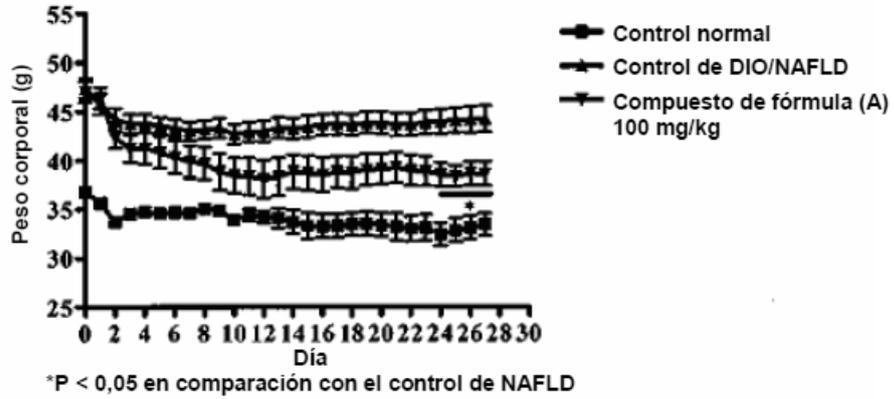


Figura 2: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre el peso corporal en ratones NAFLD/NASH

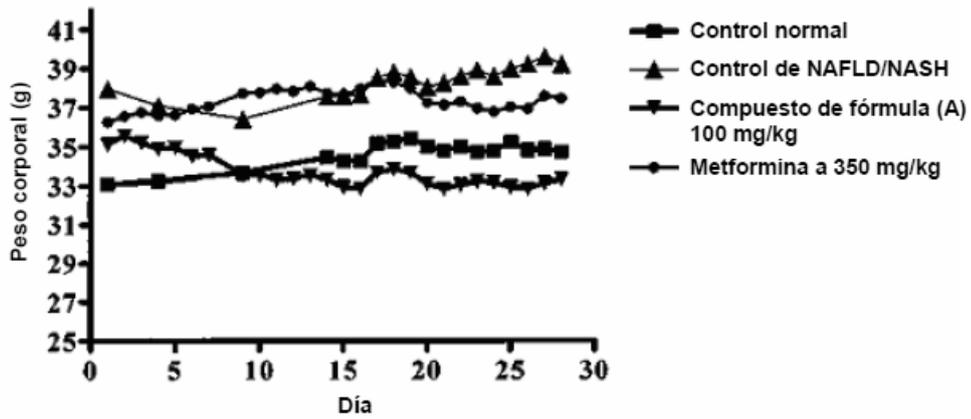


Figura 3: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre el peso corporal en ratones NAFLD/NASH

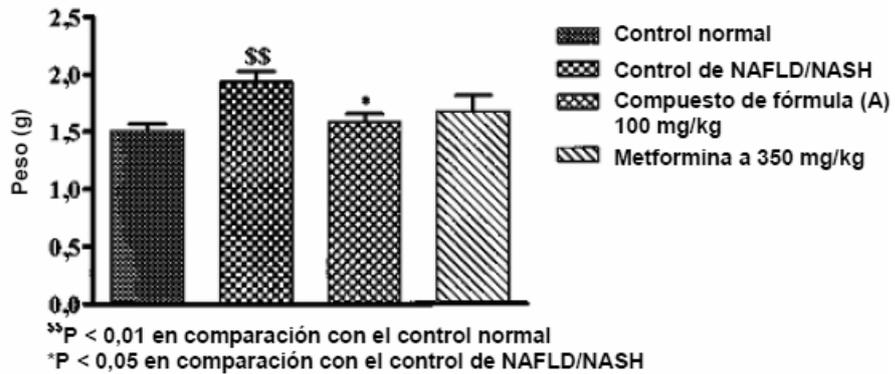


Figura 4: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre el nivel de TG hepáticos en ratones NAFLD/NASH

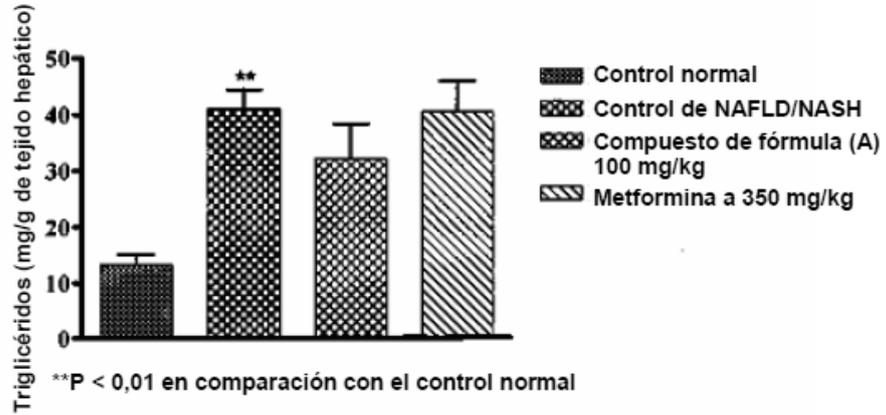


Figura 5: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de glucosa (en ayunas) en ratones NAFLD/NASH

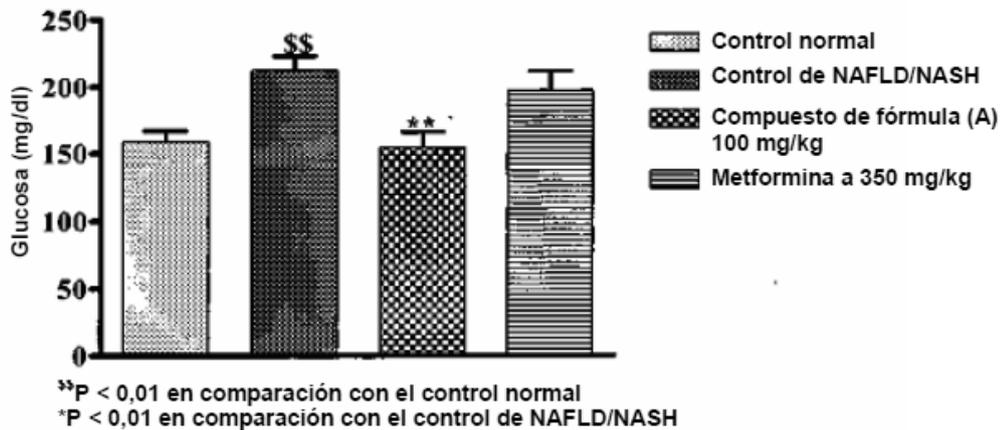


Figura 6: Representación gráfica de la clasificación del efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología hepática en ratones NAFLD/NASH

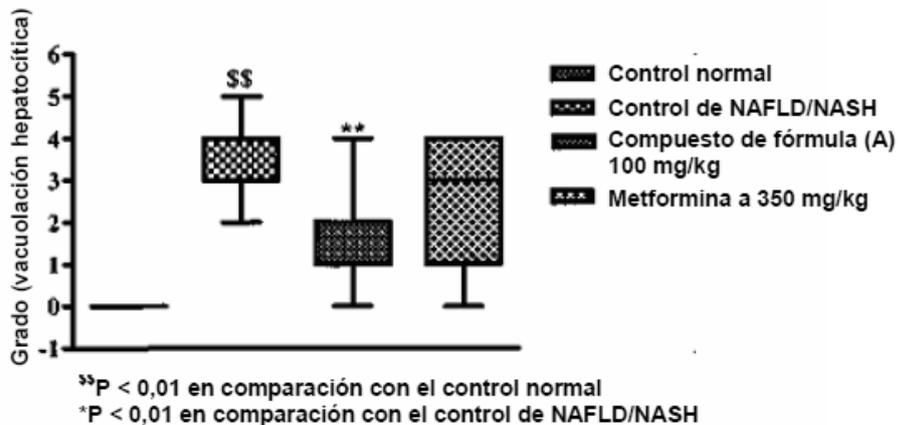


Figura 7 (7a-7h): Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los cambios histopatológicos en el hígado en el modelo de NAFLD/NASH

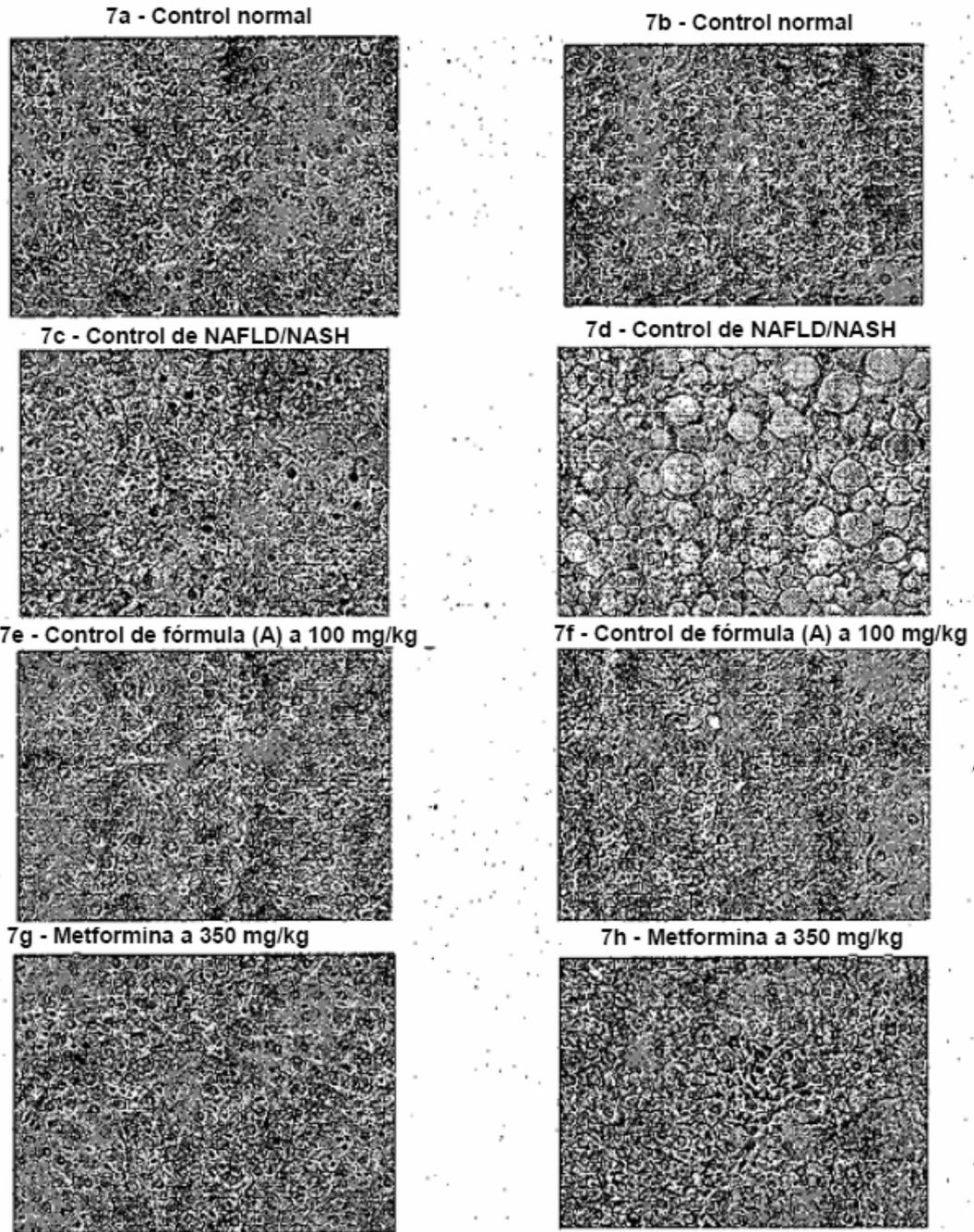
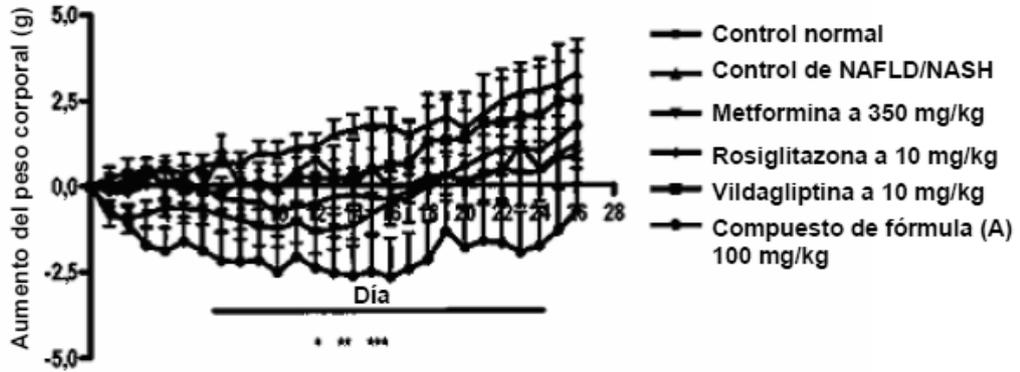
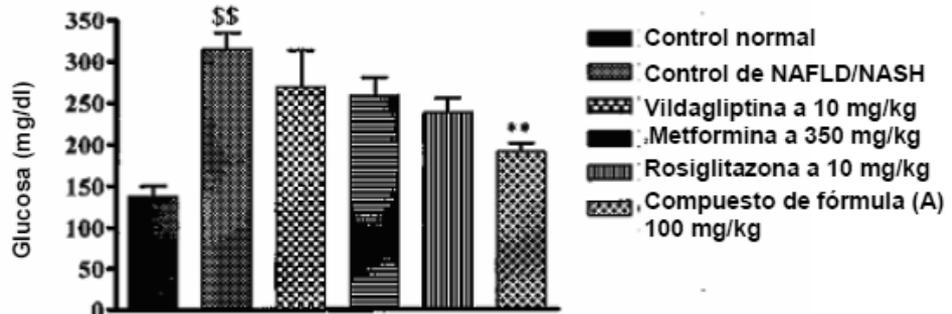


Figura 8: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el aumento del peso corporal en ratones con NAFLD/NASH



\*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 ((Compuesto de fórmula (A)) en comparación con el control de NAFLD/NASH

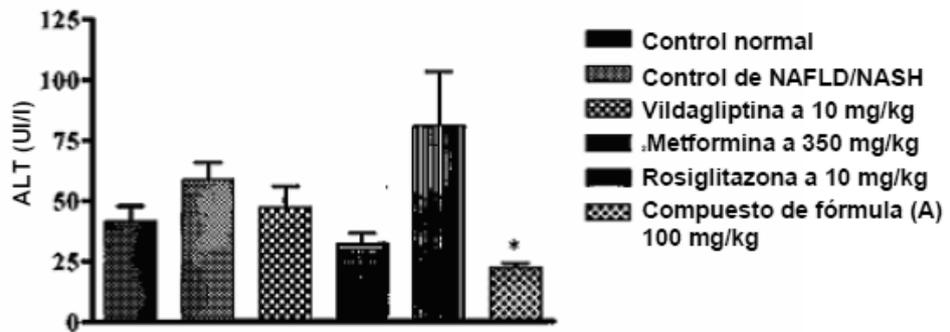
Figura 9: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de glucosa en ratones con NAFLD/NASH



\*\*P < 0,01 en comparación con el control normal

\*P < 0,01 en comparación con el control de NAFLD/NASH

Figura 10: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de ALT en ratones con NAFLD/NASH



\*P < 0,05 en comparación con el control de NAFLD/NASH

Figura 11: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre los triglicéridos hepáticos en NAFLD/NASH inducida por una dieta supranutricional en ratones C57BL/6

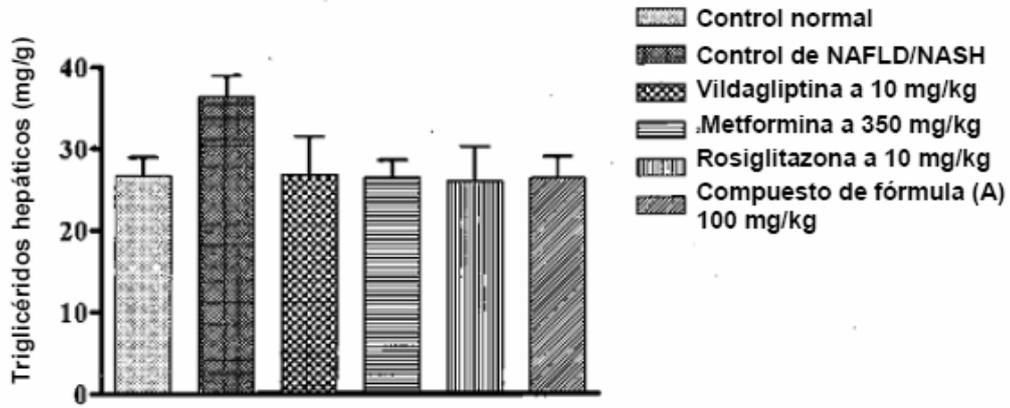
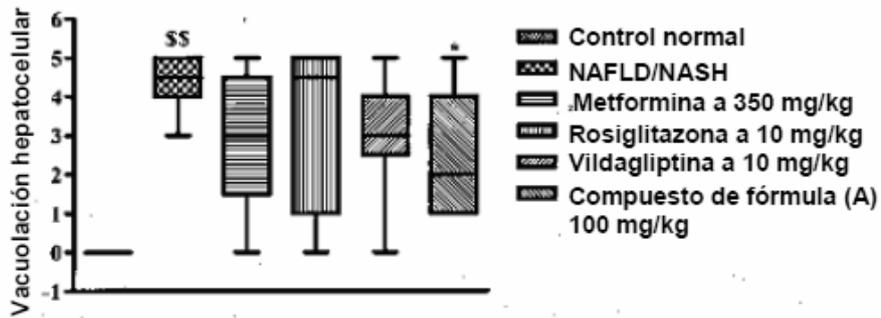


Figura 12: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la vacuolación hepatocelular en ratones con NAFLD/NASH inducida por una dieta supranutricional



\*\*P < 0,01 en comparación con el control normal

\*P < 0,05 en comparación con el control de NAFLD/NASH

Figura 13: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología hepática en NAFLD/NASH inducida por una dieta supranutricional en ratones C57BL/6

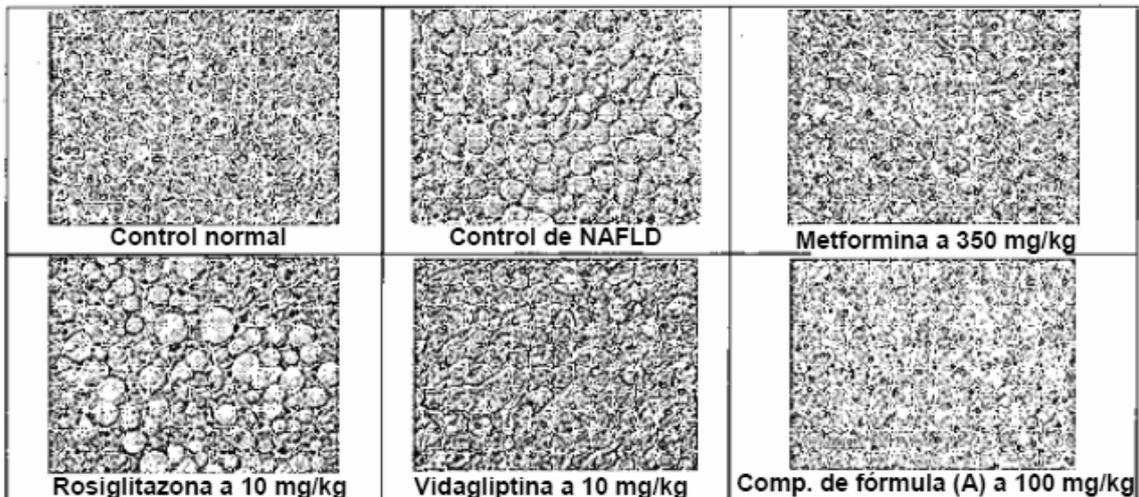
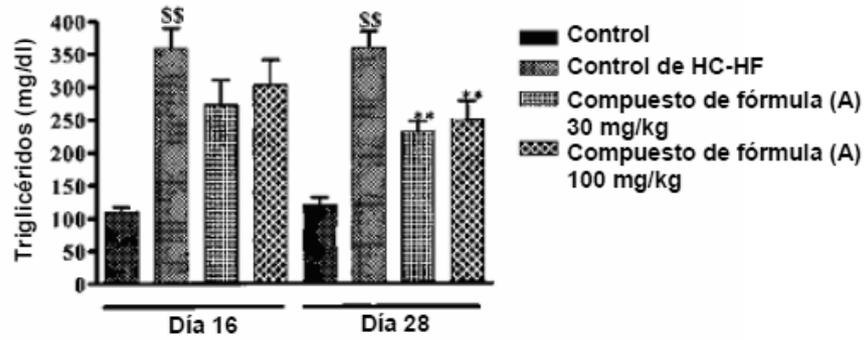
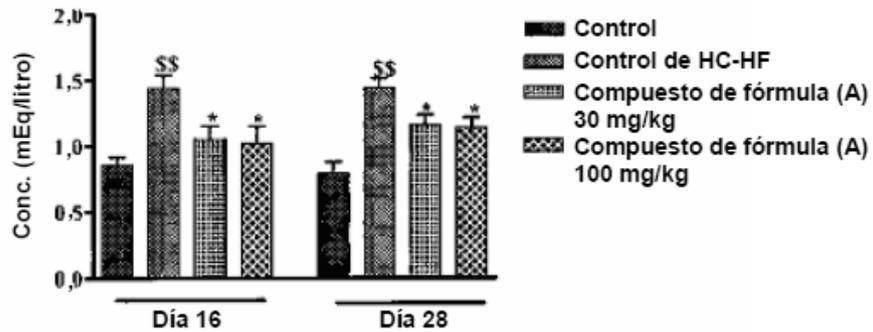


Figura 14: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de triglicéridos en hámsteres alimentados con dieta HC-HF



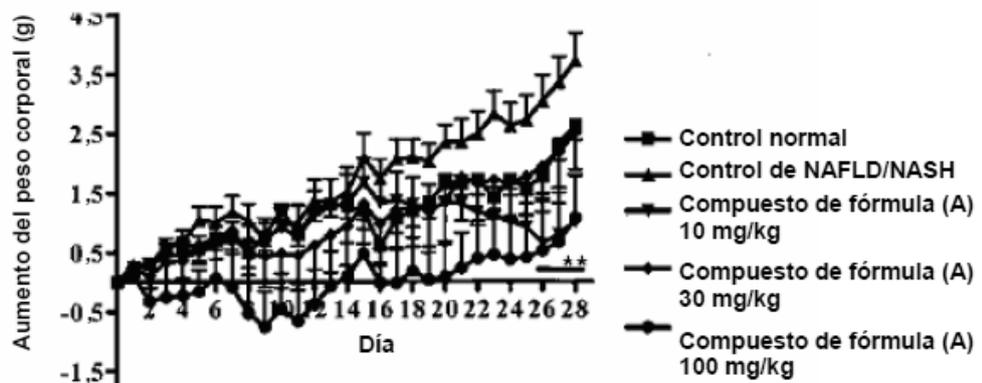
<sup>SS</sup>P < 0,01 en comparación con el control normal  
<sup>\*</sup>P < 0,01 en comparación con el control de HC-HF

Figura 15: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre los niveles de NEFA en hámsteres alimentados con dieta HC-HF



<sup>SS</sup>P < 0,01 en comparación con el control normal  
<sup>\*</sup>P < 0,05 en comparación con el control de HC-HF

Figura 16: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre el aumento del peso corporal en ratones con NAFLD/NASH



<sup>\*\*</sup>P < 0,01 Compuesto de fórmula (A) (10 y 100 mg/kg) en comparación con el control de NAFLD/NASH

Figura 17: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre AST en plasma en ratones con NAFLD/NASH

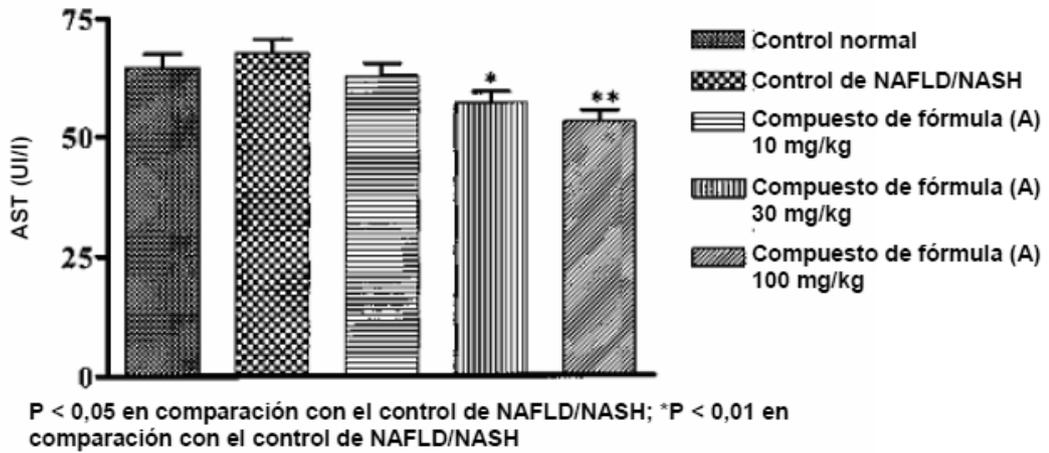


Figura 18: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre ALT en plasma en ratones con NAFLD/NASH

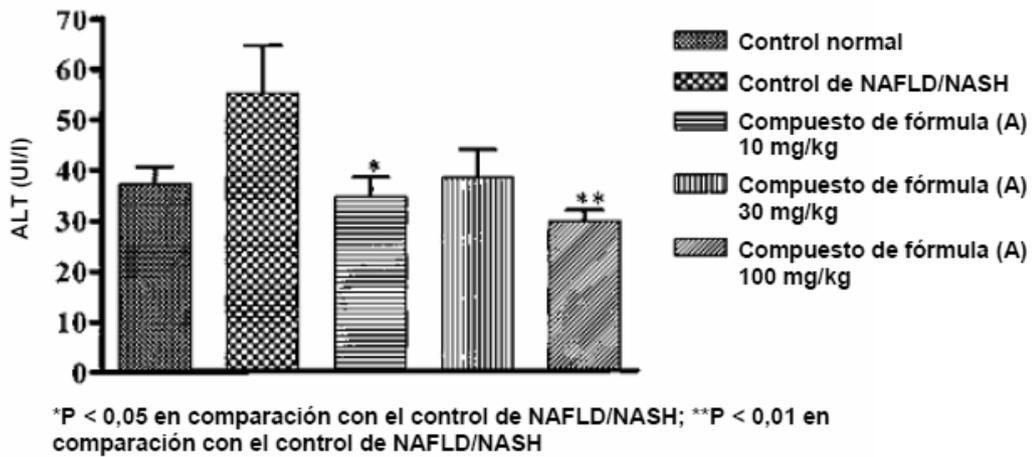


Figura 19: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el balonamiento hepatocelular en ratones con NAFLD/NASH

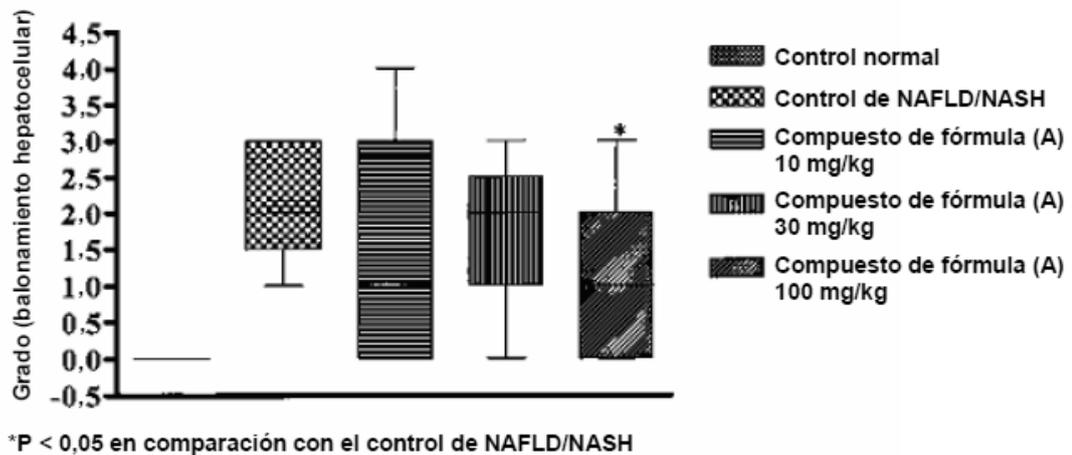


Figura 20: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la esteatosis hepática en ratones con NAFLD/NASH

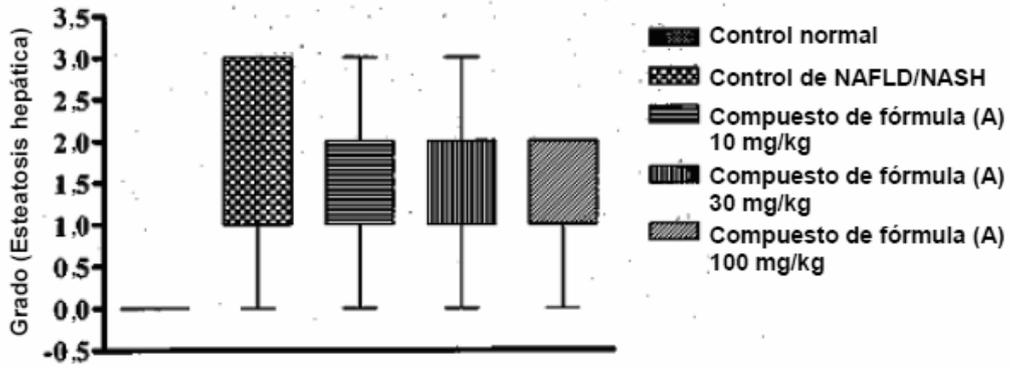


Figura 21: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología hepática en NAFLD/NASH inducida por una dieta supranutricional en ratones C57BL/6

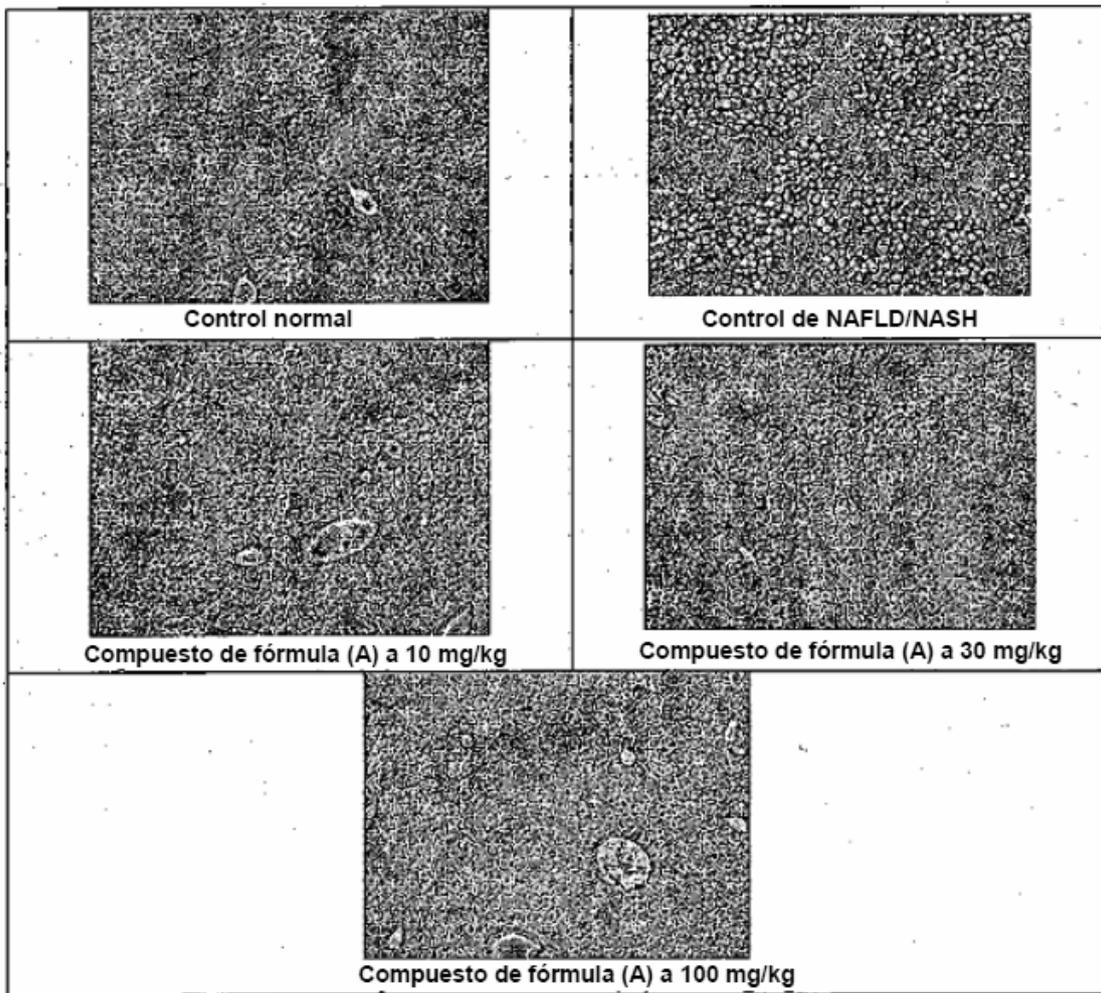
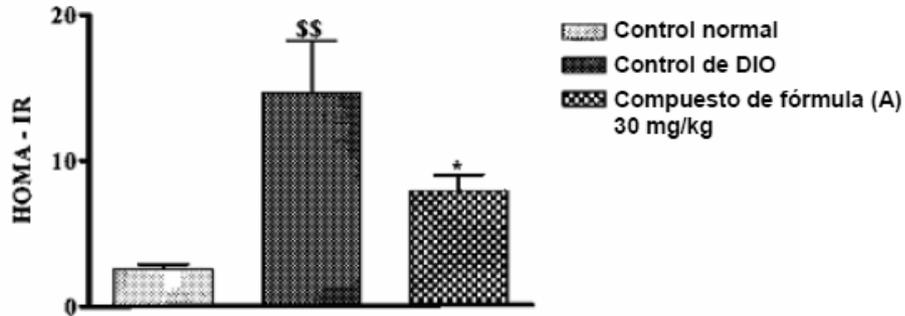
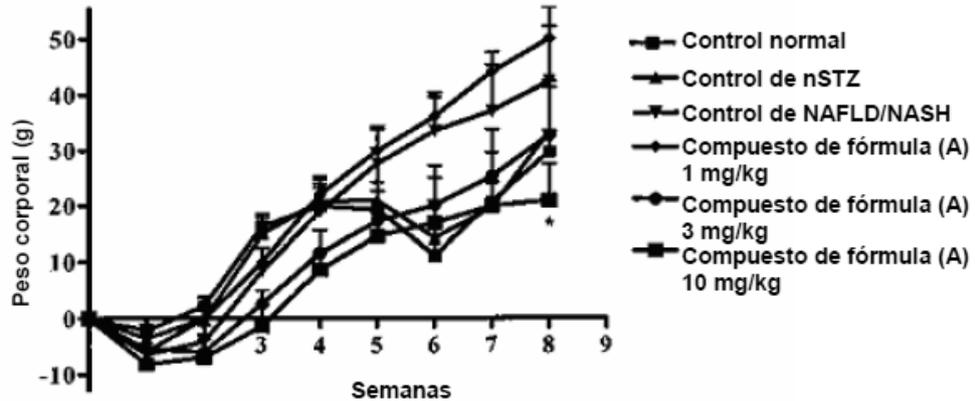


Figura 22: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre HOMA-IR en ratones DIO



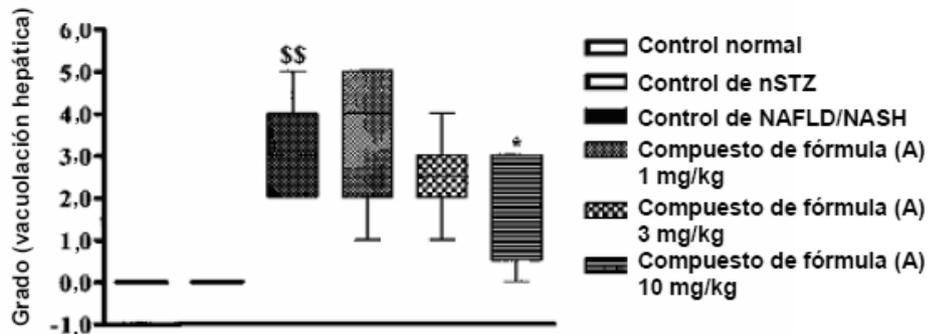
<sup>SS</sup>P < 0,01 en comparación con el control normal; \*P < 0,05 en comparación con el control de DIO

Figura 23: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre el aumento del peso corporal en la NAFLD/NASH inducida por una dieta supranutricional en ratas tratadas con nSTZ



\*P < 0,05 en comparación con el control de NAFLD/NASH

Figura 24: Representación gráfica de la clasificación del efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la vacuolación hepática (esteatosis) en NAFLD/NASH inducida por una dieta supranutricional en ratas tratadas con nSTZ



\*P < 0,05 en comparación con el control de NAFLD/NASH; <sup>SS</sup>P < 0,01 en comparación con el control de nSTZ

Figura 25: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la vacuolación hepática (esteatosis) en NAFLD/NASH inducida por una dieta supranutricional en ratas tratadas con nSTZ

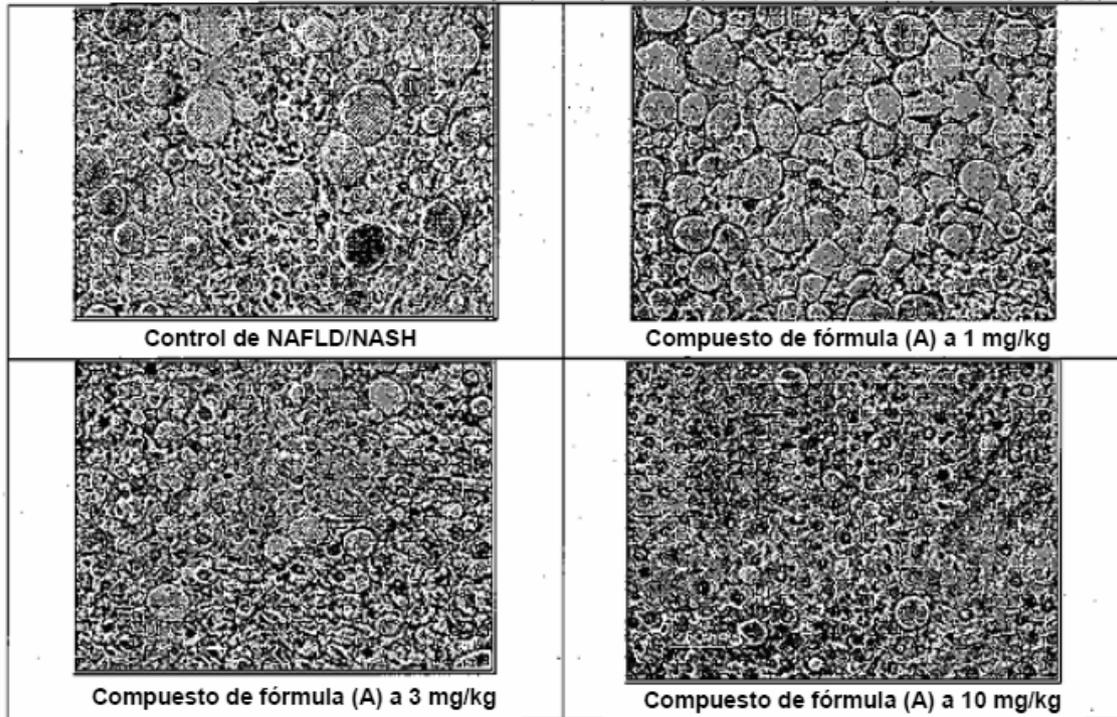
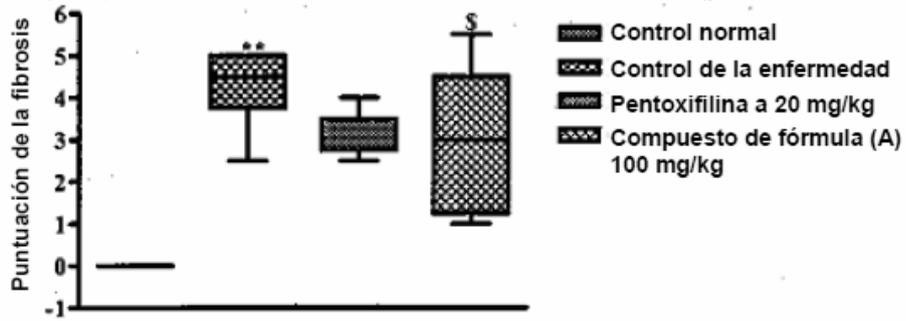


Figura 26: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología pulmonar en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones C57BL/6



\*\*P < 0,01 en comparación con el control normal;  
 \$P < 0,05 en comparación con el control de la enfermedad

Figura 27: Compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología pulmonar (tinción con H y E) en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones C57BL/6

● Fibrosis alveolar focal (Rojo Picro-Sirious x400)

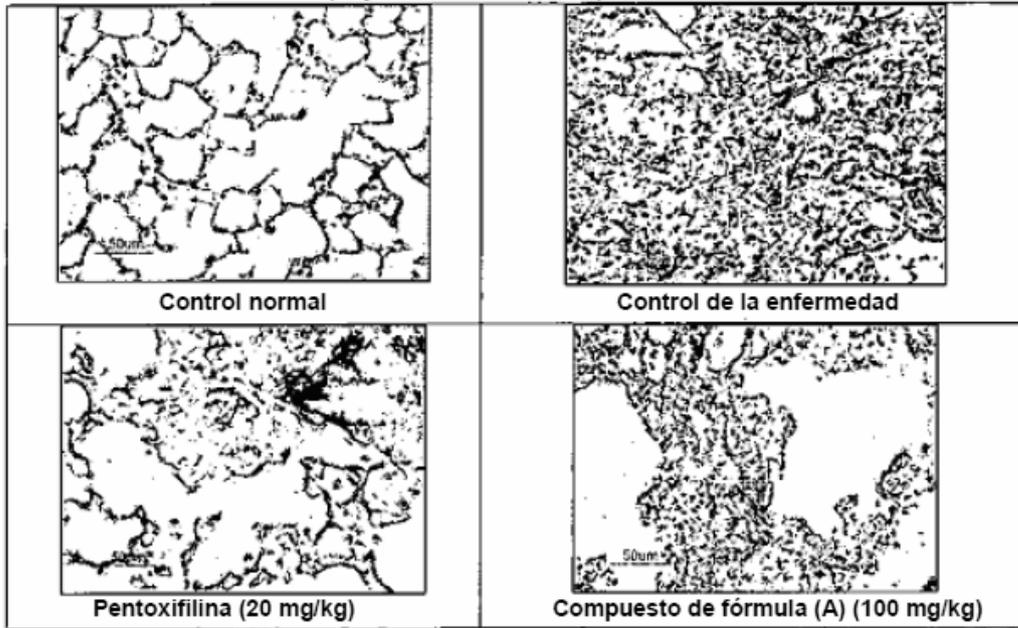


Figura 28: Efecto del compuesto de fórmula (A) sobre el nivel de TNF- $\alpha$  en ratones con NAFLD/NASH desafiados con lipopolisacáridos (LPS)

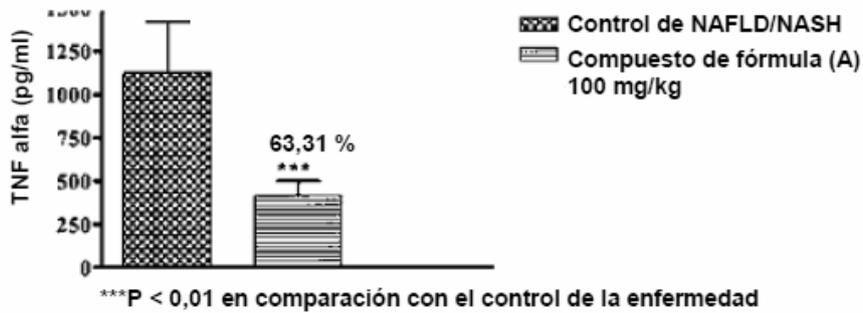


Figura 29: Efecto de la sal disódica del compuesto de fórmula (C) en los TG en plasma de hámsteres alimentados con dieta HC-HF

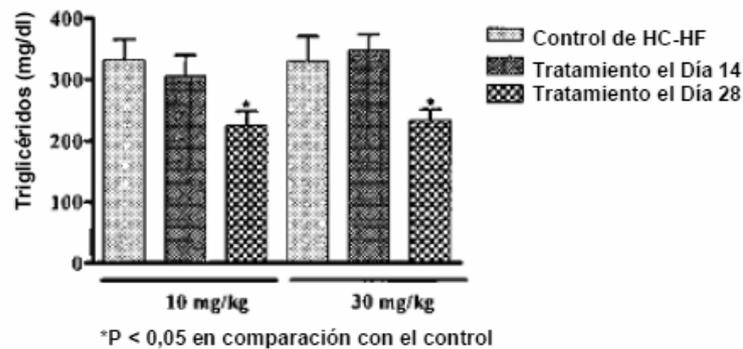


Figura 30: Efecto del Compuesto de fórmula (A) y la sal disódica del Compuesto de fórmula (C) sobre el balonamiento hepatocelular en ratones con NAFLD/NASH inducida por dieta supranutricional

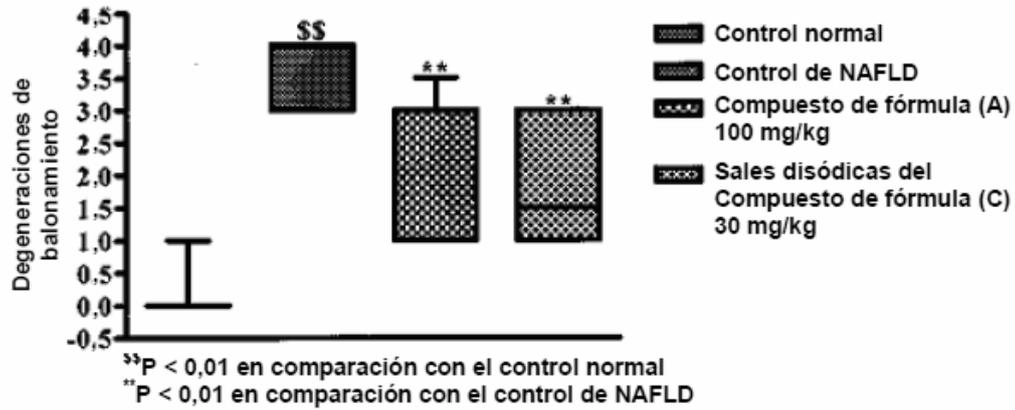


Figura 31: Efecto del Compuesto de fórmula (A) y la sal disódica del Compuesto de fórmula (C) sobre la microvacuolación en ratones con NAFLD/NASH inducida por dieta supranutricional

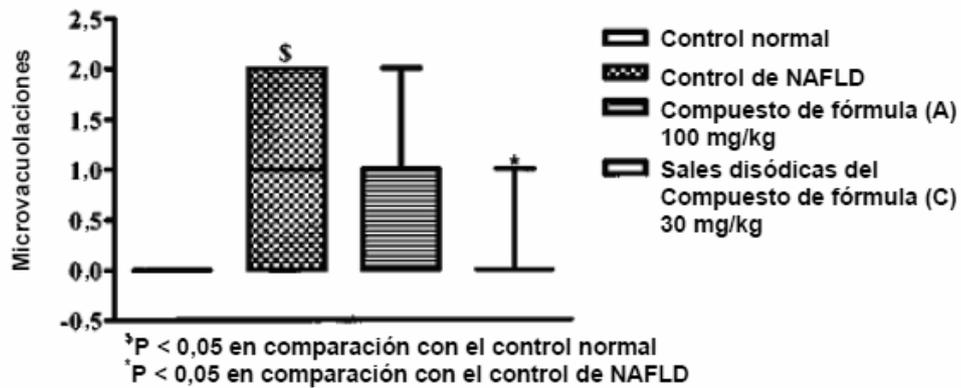
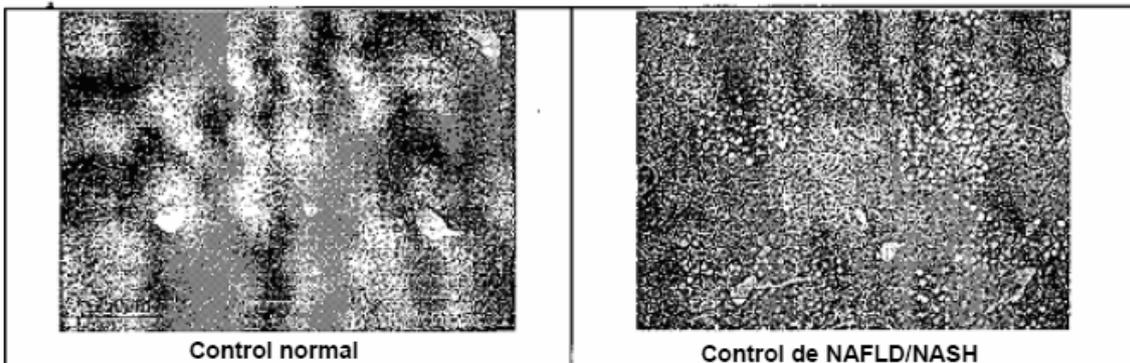


Figura 32: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la histopatología hepática en NAFLD/NASH inducida por una dieta supranutricional en ratones C57BL/6



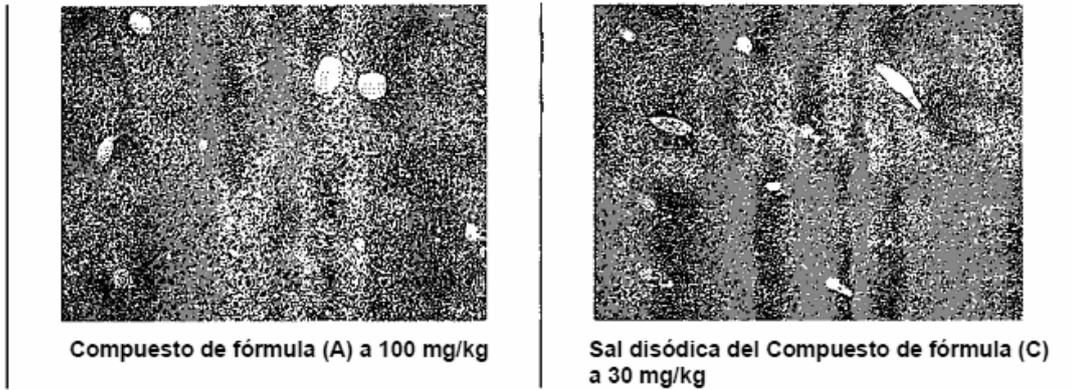


Figura 33: Efecto del Compuesto de fórmula (A) y sales disódicas del Compuesto de fórmula (C) sobre los TG en plasma en la hipertrigliceridemia inducida por consumo agudo de alcohol en ratones

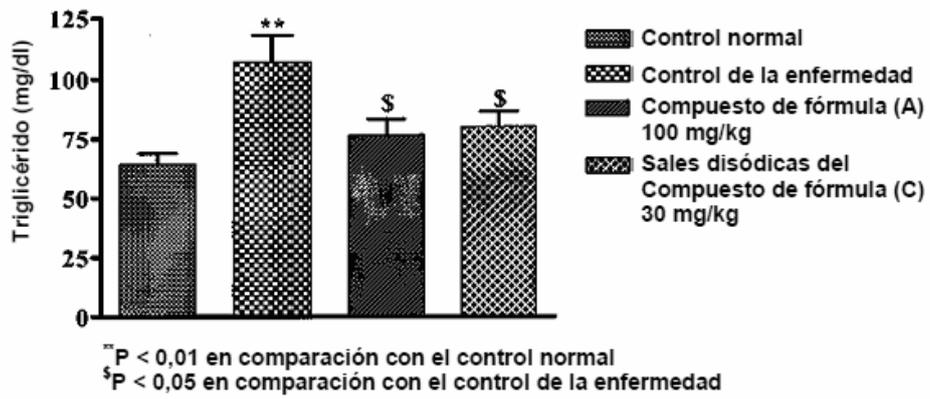


Figura 34: Efecto de los compuestos de fórmulas (A), (B) y (C) sobre la adipogénesis en fibroblasto de ratones 3T3-L1

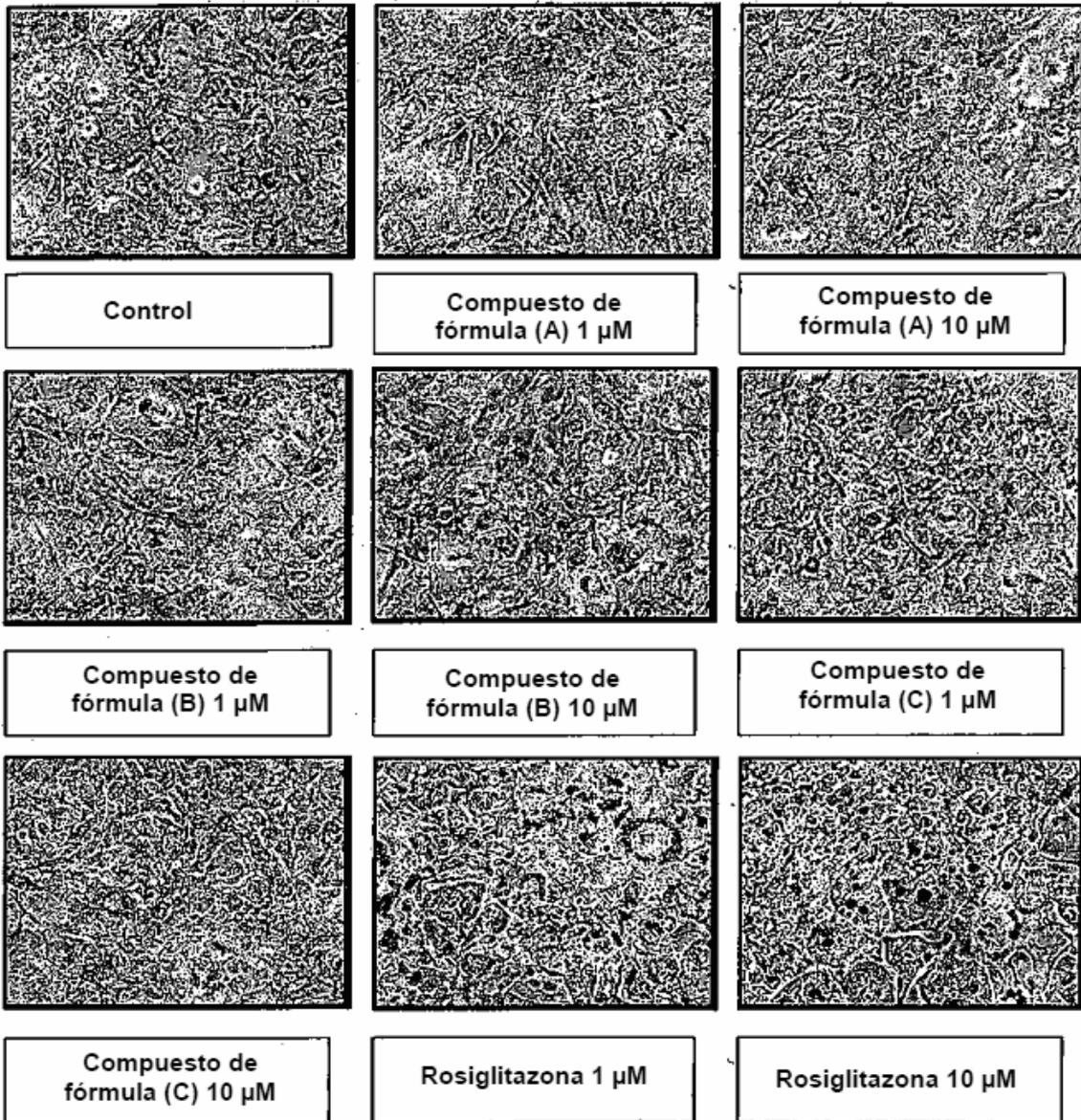
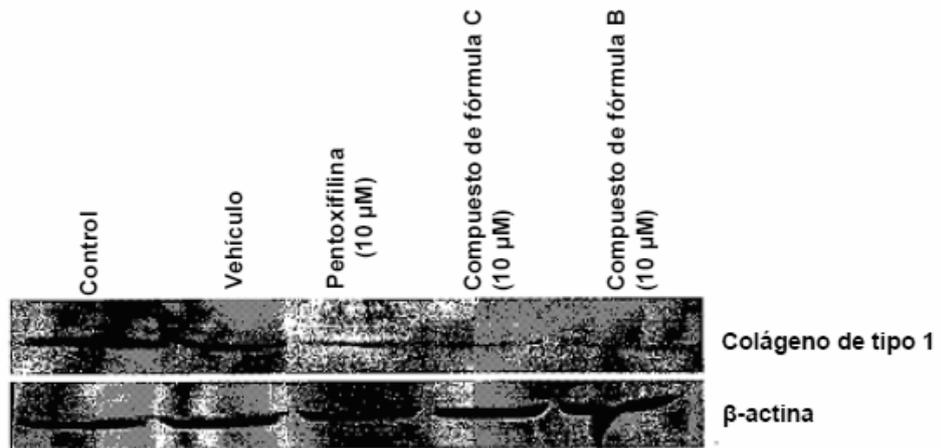


Figura 35a y 35b: Estimación de la secreción de colágeno desde HSC tratadas con Compuestos de fórmulas (B) y (C) usando la técnica de transferencia Western

(a)



(b)

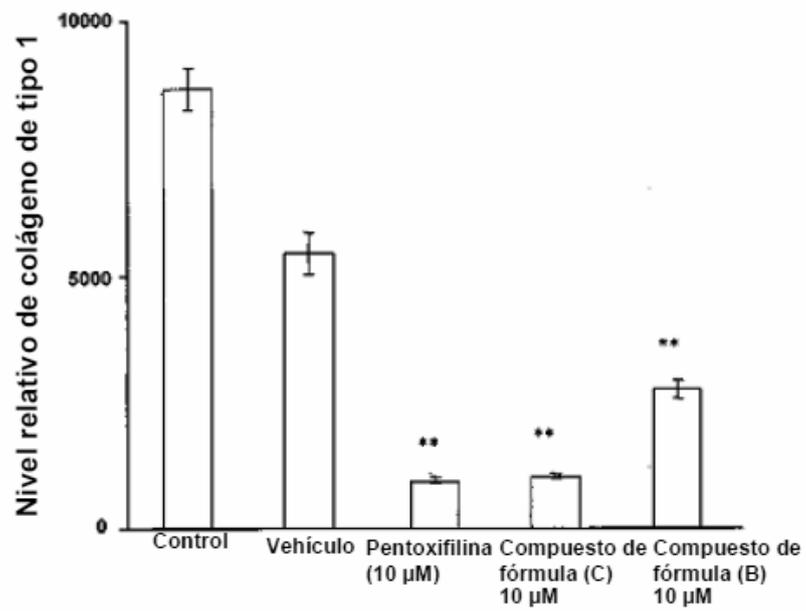


Figura 36: Inducción de la apoptosis en HSC por los compuestos de fórmulas (B) y (C)

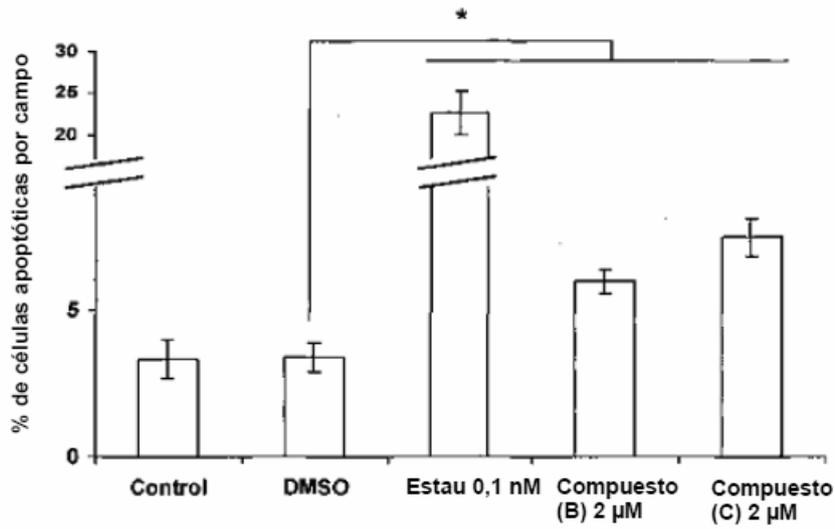


Figura 37: La inducción de la apoptosis por los compuestos de fórmulas (B) y (C) es selectiva de las HSC.

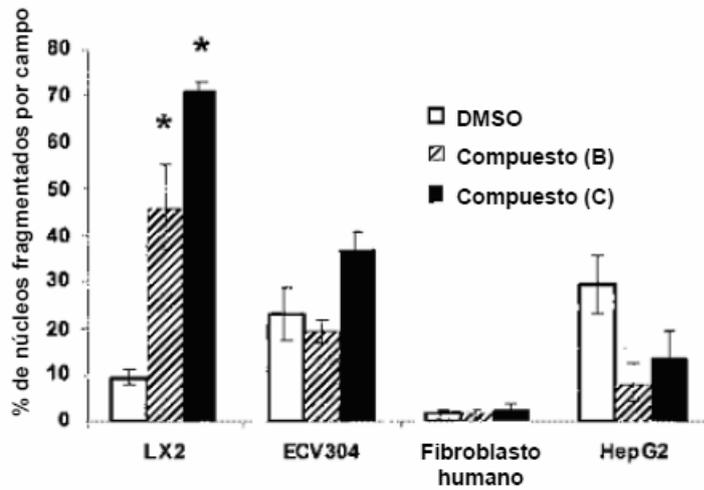


Figura 38: Efecto inhibitor sobre la producción de iNOS

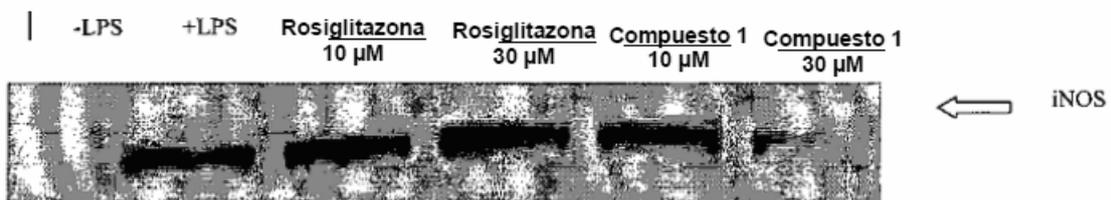


Figura 39: Niveles de TNF- $\alpha$  en suero (pg/dl) tras la administración oral de vehículo (n = 5) y compuesto de fórmula (A) (50 mg/kg/día, n = 4) en ratones de control delgados *ob/ob* macho durante 10 días

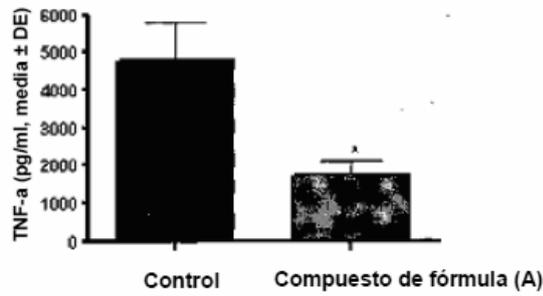


Figura 40: Niveles de IL-6 en suero (pg/dl) tras la administración oral de vehículo (n = 5) y compuesto de fórmula (A) (50 mg/kg/día, n = 4) en ratones de control delgados *ob/ob* macho durante 10 días

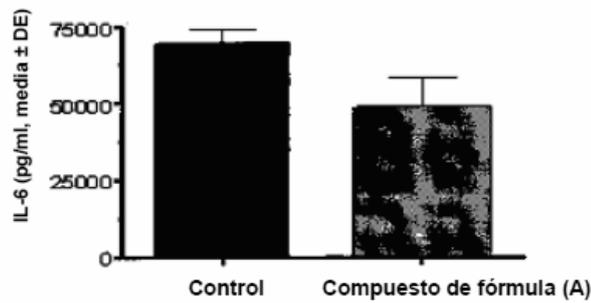


Figura 41: Efecto del Compuesto de fórmula (A) sobre la degeneración lenticular en rata diabética inducida por STZ

