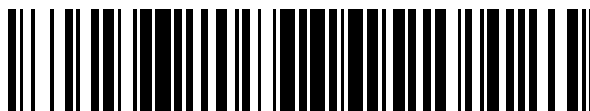


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 900**

51 Int. Cl.:

A61K 31/395 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2010 PCT/CA2010/002014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11072394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 10836897 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2512468**

54 Título: **Método para tratar cicatrices y trastornos mediados por catenina**

30 Prioridad:

15.12.2009 US 286633 P

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

23.12.2016

73 Titular/es:

**THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN (100.0%)
555 University Avenue
Toronto, Ontario M5G 1X8, CA**

72 Inventor/es:

**ALMAN, BENJAMIN, A.;
POON, RAYMOND y
HONG, HELEN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 594 900 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

Método para tratar cicatrices y trastornos mediados por β -catenina.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente al tratamiento de cicatrices y trastornos mediados por β -catenina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

Los procesos fibroproliferativos son un grupo de trastornos caracterizados por una excesiva proliferación de las células fusiformes de tipo fibroblastos mesenquimales. Varían de heridas hipertróficas al desarrollo de neoplasmas, tales como fibromatosis agresiva (FA).

15 Durante la curación de las heridas, se activan varios tipos de células y vías de señalización para reconstituir las capas epiteliales y dermis de la piel. Después de una lesión cutánea, se inician tres procesos secuencialmente distintos pero solapantes: inflamación, proliferación y remodelación. Durante la fase proliferativa, las células tipo fibroblastos mesenquimales se acumulan en el componente dérmico de la piel mientras que la capa de barrera de las células epiteliales se reforma (Singer 1999, Martin 1997, McClain 1996). Se ha demostrado que la β -catenina

20 media la actividad de las células epiteliales y mesenquimales, por lo que es capaz de aumentar la proliferación y diferenciación en las células mesenquimales cutáneas y disminuir la migración de queratinocitos epiteliales (Cheon 2002). Los modelos de ratón han demostrado que la β -catenina puede modular el tamaño de la herida resultante, donde los niveles inducidos de β -catenina por tratamiento con litio dan como resultado la cicatrización de las heridas con un mayor tamaño (Cheon 2006). Además, se ha generado un ratón transgénico en el que se expresa β -catenina

25 estabilizada en las células mesenquimales, bajo el control de un promotor regulado por tetraciclina. Los ratones heridos se curaron con heridas cutáneas hiperplásicas en comparación con los ratones control de tipo silvestre (Cheon 2002). Esto demuestra la importancia de la β -catenina en las células mesenquimales y su crucial función en la cicatrización de heridas.

30 Otro trastorno fibroproliferativo mediado por β -catenina es fibromatosis agresiva (FA), también denominada tumor desmoide. La FA es un tumor de tejido blando localmente invasivo compuesto por células fusiformes de tipo fibroblastos mesenquimales. La FA se presenta como una lesión esporádica o como un síndrome familiar, tal como poliposis adenomatosa familiar (PAF). La estabilización de la beta-catenina es una aparición universal en la FA, como se demuestra por los elevados niveles de β -catenina y el aumento de la actividad transcripcional mediada por

35 β -catenina. Además, la estabilización de β -catenina es suficiente causar FA como se muestra usando un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa la forma estabilizada de β -catenina (Cheon 2002). Esto sugiere la función crucial de la β -catenina en los trastornos fibroproliferativos y su importancia en las células mesenquimales.

Además de una función de la β -catenina en los trastornos fibroproliferativos, varios estudios han demostrado que la

40 expresión de β -catenina desregulada es un acontecimiento importante en la génesis de varias neoplasias, tales como cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, meduloblastoma pilomatricomas y cáncer de próstata. Las mutaciones de la β -catenina parecen ser una etapa crucial en la progresión de un subconjunto de estos cánceres, lo que sugiere un papel importante en el control de la proliferación celular o la muerte celular (como se describe en Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. Curr Opin

45 Genet Dev. 2007 Feb;17(1): 45-51).

En vista de lo anterior, es deseable desarrollar novedosos métodos eficaces para el tratamiento de afecciones y trastornos que pueden estar asociados a la β -catenina.

50 Gomaa y col. (2006) describen los efectos inmunopotenciadores del nefopam. Los documentos WO 2009/053742, WO 2007/012870, WO 2006/106308, EP 1683522, GB 2413322, WO 2005/060957 y Mukherjee y col. (2006) se refieren a los usos terapéuticos de los compuestos de nefopam, incluyendo su uso para el tratamiento del dolor por cáncer (documento WO 2005/060957), y/o formulaciones farmacéuticas de compuestos de nefopam, tales como los parches transdérmicos matriciales (Mukherjee y col.). No se hace ninguna indicación o sugerencia en estos

55 documentos de que dichos compuestos sean adecuados para su uso con el fin de tratar trastornos fibroproliferativos o tejido cicatricial.

RESUMEN DE LA INVENCION

60 Ahora se ha descubierto que Nefopam, y análogos del mismo, son útiles para tratar trastornos mediados por β -

catenina, tales como trastornos fibroproliferativos, así como el tratamiento del tejido cicatricial.

Por consiguiente, en un aspecto de la invención se proporciona un compuesto de Nefopam seleccionado entre Nefopam, o una sal o solvato del mismo para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno fibroproliferativo seleccionado del grupo que consiste en cicatrices cutáneas, tales como cicatrices de cortes, rasguños, infección, acné, quemaduras, cirugía, cicatriz hipertrófica, cicatrices hiperplásicas, cicatrices queloides y cicatrices que implican células mesenquimales y obtenidas del mesénquima, fibromatosis agresiva, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, glomeruloesclerosis, enfermedad de Ledderhose, y contractura de Dupuytren (CD) en un mamífero.

10

En realizaciones particulares del compuesto de Nefopam para su uso de acuerdo con la invención, el trastorno está caracterizado por la acumulación de tejido fibroso. En realizaciones particulares adicionales, el trastorno es la formación de cicatrices.

15 En realizaciones particulares del compuesto de Nefopam para su uso de acuerdo con la invención, el compuesto de Nefopam se administra junto con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En realizaciones particulares adicionales, el compuesto de Nefopam se administra junto con un agente terapéutico adicional. En realizaciones particulares del compuesto de Nefopam para su uso de acuerdo con la invención, el compuesto de Nefopam se administra por vía tópica. En realizaciones particulares del compuesto de Nefopam para su uso de acuerdo con la invención, el compuesto de Nefopam se aplica a una matriz biocompatible para su aplicación a un sitio diana. En realizaciones particulares la matriz biocompatible se selecciona del grupo que consiste en un apósito, vendaje, implante y matriz polimérica. En realizaciones particulares del compuesto de Nefopam para su uso de acuerdo con la invención, el compuesto de Nefopam se administra a una dosificación de aproximadamente 0,0001-100 mg.

25 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso cosmético de un compuesto de Nefopam seleccionado entre Nefopam, o una sal o solvato del mismo para mejorar la estética de una cicatriz y el área circundante. Por consiguiente, la invención se refiere al uso de un compuesto de Nefopam seleccionado entre Nefopam, sal o solvato del mismo, para mejorar la estética de una cicatriz y el área circundante. En realizaciones particulares, el uso es reducir el tamaño de la cicatriz, la elevación de la cicatriz, o la rojez de la cicatriz.

30

En realizaciones particulares de este uso, el compuesto de Nefopam se administra por vía tópica. En realizaciones particulares de este uso, el compuesto de Nefopam se aplica a una matriz biocompatible para su aplicación a un sitio diana. En realizaciones particulares de este uso, el compuesto de Nefopam proporciona efectos antiarrugas.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia a las siguientes Figuras:

La **figura 1A** es un gráfico de barras que indica la viabilidad celular en células de fibroblastos normales cultivadas y células cultivadas obtenidas a partir de dos heridas hiperplásicas tras el tratamiento con DMSO (control) o Nefopam usando el ensayo SRB. El porcentaje de supervivencia celular se da como una media y un intervalo de confianza del 95 %. Hay un descenso significativo en el porcentaje de células que sobreviven en los cultivos tratados con Nefopam en comparación con los cultivos de células de heridas hiperplásicas de control con DMSO, sin embargo, las tasas de supervivencia celular en cultivos de fibroblastos normales permanecieron relativamente inalteradas (el asterisco indica la importancia en comparación con los cultivos de fibroblastos normales).

La **figura 1B** es un análisis western blot de los niveles de β -catenina en los cultivos celulares de heridas hiperplásicas. Se demostró que el tratamiento con Nefopam redujo sustancialmente los niveles de proteína β -catenina en comparación con los controles tratados con DMSO.

50

La **figura 2** es un gráfico que compara el número de tumores de fibromatosis agresiva (FA) formados en ratones macho *Apc+/-Apc1638N* que se dejaron sin tratar o tratados con Nefopam o control de DMSO y que ilustra el número de pólipos derivados del epitelio en el tracto gastrointestinal superior bajo el mismo tratamiento. 1) Sin tratamiento (n = 11), 2) DMSO al 0,1 % (n = 10), y 3) Nefopam a 40 mg/kg de peso corporal (n = 10).

55

La **figura 3A** es una western blot de los niveles de proteína β -catenina (92 kDa) en extractos de cultivos celulares primarios obtenidos de tumores de fibromatosis agresiva (FA) humana (n = 5) tras el tratamiento durante 5 días con uno de DMSO al 0,1 % (control) o Nefopam. Los niveles de proteína β -catenina también se determinaron en cultivos celulares de fibroblastos primarios incubados con Wnt3a con o sin Nefopam. Los experimentos se realizaron por triplicado. La expresión de actina se muestra como un control de carga de lisado.

60

La **figura 3B** es un gráfico del análisis de densitometría de los datos de niveles de proteína que muestra un descenso de casi 5 veces de los niveles de proteína β -catenina totales en cultivos celulares obtenidos a partir de tumores de FA humana tratados con DMSO al 0,1 % (control) o Nefopam. Se muestran las medias y los intervalos de confianza del 95 %. Se indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en comparación con el control por un asterisco.

La **figura 4A** es un gráfico que muestra las medias y los intervalos de confianza del 95 % de la viabilidad celular de las células primarias obtenidas de tumores de FA humana tratados con DMSO ($n = 5$) o Nefopam ($n = 5$) durante 5 días. La viabilidad celular se midió tiñendo las células con colorante azul de tripano y contando tanto las células vivas (transparentes) como muertas (azul). El Nefopam disminuyó significativamente el número de células vivas, mientras que el número de células muertas no cambió. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en comparación con los controles se indican con un asterisco.

La **figura 4B** es un gráfico que muestra el porcentaje de células BrdU positivas/DAPI positivas en comparación con las células DAPI positivas totales como una medida de la proliferación en los cultivos de las células primarias obtenidas a partir de tumores de fibromatosis agresiva humana ($n = 2$) tratados con DMSO o Nefopam por triplicado durante 5 días. Nefopam reduce significativamente la incorporación de BrdU en las células. Se muestran las medias y los intervalos de confianza del 95 %. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en comparación con el control se indican por un asterisco.

La **figura 5A** muestra un análisis por western blot de lisados extraídos de células de fibroblastos humanos inmortalizados. Se observó un descenso significativo en los niveles de proteína β -catenina totales en las células tratadas con Nefopam en comparación con las células tratadas con DMSO. La expresión de GAPDH se muestra como un control de carga de lisado.

La **figura 5B** es un gráfico de datos de densitometría correspondientes a los datos de western blot de la figura 5A.

La **figura 6A** es un análisis western blot de los niveles de proteína β -catenina en cultivos celulares de heridas de ratones Tcf 14 días post-laceración. La expresión de GAPDH se muestra como control de carga de lisado.

La **figura 6B** es un gráfico de un tamaño de cicatriz normal en ratones sometidos a heridas circulares de espesor completo tras el tratamiento con Nefopam formado con un vehículo (Nefopam) o vehículo en solitario (control) administrado por vía sistémica como 40 mg/kg al día durante dos semanas. El gráfico muestra la media y el intervalo de confianza del 95 % para el diámetro del área superficial de una herida cutánea generada usando un punzón para biopsia de 4 mm. El diámetro de la herida es significativamente menor tras el tratamiento con Nefopam en comparación con el tratamiento de control (el asterisco indica una diferencia significativa).

La **figura 7** es un gráfico de líneas que indica los niveles de proteína β -catenina relativos en el tiempo (medido en semanas) durante una cicatrización de herida normal (normal) y en heridas hiperplásicas (hiperplásicas) en comparación con tejido no herido. El patrón normal de aumento y descenso de los niveles de proteína β -catenina durante una curación de herida normal se desregula en heridas hiperplásicas, que muestran una duración significativamente prolongada de los niveles de proteína β -catenina elevados.

La **figura 8** es un gráfico de la media y el intervalo de confianza del 95 % para el diámetro del área superficial de cicatrices hiperplásicas cutáneas cuatro semanas post-laceración. Se generaron heridas circulares de espesor completo de 4 mm de diámetro usando un punzón para biopsia. El diámetro de la herida se da en mm. Un asterisco indica las diferencias estadísticamente significativas en el tamaño cicatricial apreciado en comparación con el tratamiento con TGF- β ($p < 0,01$), donde la inyección de TGF- β en el momento de la laceración se sabe que causa cicatrices hiperplásicas de tamaño aumentado.

La **figura 9** es un gráfico de formulaciones tópicas de Nefopam de concentración variable en tres vehículos diferentes: carboximetilcelulosa (CMC), vaselina e hipromelosa. Los tres vehículos se ensayaron *in vivo* en un modelo de ratón para determinar la formulación más eficaz en la administración de Nefopam a través de la piel. Las formulaciones de vehículo a base de vaselina demostraron un aumento de las propiedades de liberación de Nefopam según se determinó por la medición de los niveles de Nefopam en la piel y en suero.

La **figura 10** es un gráfico del área superficial cicatricial relativa medida en unidades arbitrarias (el tamaño de la cicatriz tras la laceración se considera como de 100 unidades arbitrarias). Las heridas por punción de espesor completo de 4 mm de diámetro se trataron por vía tópica con crema de control de vehículo o crema de Nefopam al 1 % formulada en vehículo de vaselina dos veces al día durante 14 días. Los datos representan un promedio de

10 heridas por tratamiento con una desviación estándar.

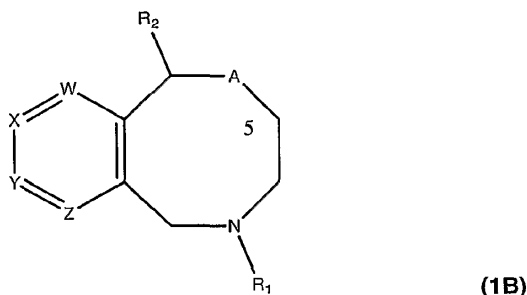
DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Se proporciona en el presente documento Nefopam o un análogo funcionalmente equivalente del mismo para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno mediado por β -catenina en un mamífero.

Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno o afección mediada por β -catenina" se refiere a trastornos o afecciones caracterizadas por la acumulación de tejido fibroso ("fibrosis") incluyendo, pero sin limitación, 10 trastornos fibroproliferativos, tales como cicatrices cutáneas, incluyendo cicatrices hipertróficas, hiperplásicas y queloides, en formación o ya formadas, y fibromatosis agresiva, por ejemplo, una lesión esporádica o un síndrome familiar, tal como poliposis adenomatosa familiar (PAF), fibrosis hepática, fibrosis pulmonar (por ejemplo, silicosis, asbestosis), fibrosis renal (incluyendo nefropatía diabética), glomeruloesclerosis, enfermedad de Ledderhose y contractura de Dupuytren (CD), así como neoplasias, tales como cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma, 15 carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario, cáncer endometrial, meduloblastoma, pilomatricomas y cáncer de próstata.

El término "Nefopam" se refiere a 5-metil-1-fenil-1,3,4,6-tetrahidro-2,5-benzoxazocina y análogos, profármacos, sales y solvatos funcionalmente equivalentes y farmacéuticamente aceptables del mismo. La expresión "funcionalmente 20 equivalente", como se usa con respecto a los análogos, profármacos, sales y solvatos de Nefopam, se refiere a la capacidad del compuesto seleccionado para modular β -catenina. La medida en la que el compuesto seleccionado puede modular la β -catenina puede variar de compuesto a compuesto.

El término "análogo" como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que tienen la siguiente fórmula 25 general (1),



donde R_1 es H, alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con F o cicloalquilo C_3-C_6 o alqueno C_2-C_4 ; A es O, CH_2 o 30 $S(O)_n$ donde n es 0-2; uno de W, X, Y y Z es N, CH o CR_3 y los otros son CH; R_2 es heteroarilo C_5-C_6 , cicloalquilo C_5-C_10 o cicloalqueno que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados de O, N y $S(O)_n$ donde n es 0-2, y opcionalmente sustituido con R_3 ; o un grupo fenilo opcionalmente sustituido en una o más posiciones con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, CN, CF_3 , alquilo C_1-C_6 y OR_1 , o el grupo 35 fenilo está condensado a un anillo de cinco o seis miembros que puede ser carbocíclico, heterocíclico (que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados de O, N y S), aromático o heteroaromático (que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados de O y N); R_3 se selecciona de entre halógeno; CF_3 ; CN; OR_5 ; $SO_2N(R_5)_2$; COR_5 ; CO_2R_5 ; $CON(R_5)_2$; NR_1COR_4 ; $NR_1SO_2R_4$; $NR_1CO_2R_4$; $NR_1CON(R_5)_2$; Oalquilo C_1-C_6 sustituido con R_3 ; alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con R_3 sin sustituir; cicloalquilo C_3-C_6 sustituido opcionalmente con R_3 sin sustituir; alqueno C_2-C_6 40 opcionalmente sustituido con R_3 sin sustituir; alqueno C_2-C_6 opcionalmente sustituido con R_3 sin sustituir; arilo opcionalmente sustituido con R_3 sin sustituir; y heterociclos aromáticos de cinco o seis miembros que contienen 1-4 heteroátomos seleccionados de entre N y O; R_4 es alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo o heteroarilo; y R_5 es H, alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo o heteroarilo y es el mismo que o diferente a otro R_5 ; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; donde R_1 es H, alquilo 45 C_1-C_6 , opcionalmente sustituido con F o cicloalquilo C_3-C_6 o alqueno C_2-C_6 ; R_2 y R_3 son iguales o diferentes y son H, un halógeno, CN, CF_3 , alquilo C_1-C_6 o OR_1 , o R_2 y R_3 forman un anillo de cinco o seis miembros que puede ser carbocíclico, heterocíclico (que contiene 1-2 heteroátomos tomados de O, N y S), aromático o heteroaromático (que contiene 1-2 heteroátomos tomados de O y N); uno de W, X, Y y Z es N, o CR_4 y los otros son cada uno CH; R_4 es un átomo de halógeno, CF_3 , CN, OR_7 , $SO_2N(R_6)_2$, COR_6 , CO_2R_6 , $CON(R_6)_2$, NR_1COR_5 , $NR_1SO_2R_5$, $NR_1CO_2R_5$, $NR_1CON(R_6)_2$, Oalquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con R_4 , alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con R_4 , 50 cicloalquilo C_3-C_6 opcionalmente sustituido con R_4 , alqueno C_2-C_6 opcionalmente sustituido con R_4 , alqueno C_2-C_6 opcionalmente sustituido con R_4 , arilo opcionalmente sustituido con R_4 , o un heterociclo aromático de cinco o seis

miembros que contiene 1-4 heteroátomos seleccionados de entre N y O, unidos a través de carbono o nitrógeno; R₅ es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo; cada uno de R₆ (que puede ser igual o diferente) es H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo; y R₇ es arilo o heteroarilo; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; donde R₁ es H, alquilo C₁-C₆ 5 opcionalmente sustituido con F o cicloalquilo C₃-C₆ o alqueno C₂-C₄; A es O, CH₂ o S(O)_n donde n es 0-2; uno de W, X, Y y Z es N, CH o CR₃ y los otros son CH; R₂ es heteroarilo C₅-C₆, cicloalquilo C₅-C₁₀ o cicloalqueno que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados de entre O, N y S(O)_n donde n es 0-2, y opcionalmente sustituido con R₃; o un grupo fenilo opcionalmente sustituido en una o más posiciones con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de entre halógeno, CN, CF₃, alquilo C₁-C₆ y OR₁, o el grupo fenilo 10 está condensado a un anillo de cinco o seis miembros que puede ser carbocíclico, heterocíclico (que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S), aromático o heteroaromático (que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados de entre O y N); R₃ se selecciona de entre halógeno; CF₃; CN; OR₅; SO₂N(R₅)₂; COR₅; CO₂R₅; CON(R₅)₂; NR₁COR₄; NR₁SO₂R₄; NR₁CO₂R₄; NR₁CON(R₅)₂; Oalquilo C₁-C₆ sustituido con R₃; alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; 15 alqueno C₂-C₆ opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; alquino C₂-C₆ opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; arilo opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; y heterociclos aromáticos de cinco o seis miembros que contienen 1-4 heteroátomos seleccionados de entre N y O; R₄ es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo; y R₅ es H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo y es igual que o diferente a otro R₅; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; donde 20 R₁ es H, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con F o cicloalquilo C₃-C₆ o alqueno C₂-C₄; A es O, CH₂ o S(O)_n donde n es 0-2; uno de W, X, Y y Z es N, CH o CR₃ y los demás son CH; R₂ es heteroarilo C₅-C₆, cicloalquilo C₅-C₁₀ o cicloalqueno que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados de entre O, N y S(O)_n donde n es 0-2, y opcionalmente sustituido con R₃; o un grupo fenilo sustituido opcionalmente en una o más posiciones con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de entre halógeno, CN, CF₃, alquilo C₁-C₆ y OR₁, o el 25 grupo fenilo está condensado a un anillo de cinco o seis miembros que puede ser carbocíclico, heterocíclico (que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S), aromático o heteroaromático (que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados de entre O y N); R₃ se selecciona de entre halógeno; CF₃; CN; OR₅; SO₂N(R₅)₂; COR₅; CO₂R₅; CON(R₅)₂; NR₁COR₄; NR₁SO₂; NR₁CO₂R₄; NR₁CON(R₅)₂; Oalquilo C₁-C₆ sustituido con R₃; alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; 30 alqueno C₂-C₆ opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; alquino C₂-C₆ opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; arilo opcionalmente sustituido con R₃ sin sustituir; y heterociclos aromáticos de cinco o seis miembros que contienen 1-4 heteroátomos seleccionados de entre N y O; R₄ es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo; y R₅ es H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo y es el mismo que o diferente a otro R₅; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; o 35 donde: R₁ es H, alquilo C₁-C₆, opcionalmente sustituido con F o cicloalquilo C₃-C₆ o alqueno C₂-C₄; R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son cada uno H, halógeno, CN, CF₃, alquilo C₁-C₆ o OR₁, o R₂ y R₃ pueden formar un anillo de cinco o seis miembros que puede ser carbocíclico, heterocíclico (que contiene 1-2 heteroátomos tomados de O, N y S), aromático o heteroaromático (que contiene 1-2 heteroátomos tomados de O y N); y uno de W, X, Y y Z es N, CH o CR₄ y los demás son CH; R₄ es halógeno; CF₃; CN; OR₇; SO₂N(R₆)₂ (donde cada R₆ es igual o diferente); COR₆; 40 CO₂R₆; CON(R₆)₂ (donde R₆ es igual o diferente); NR₁COR₅; NR₁SO₂R₅; NR₁CO₂R₅; NR₁CON(R₆)₂ (donde cada R₆ es igual o diferente), Oalquilo C₁-C₆ sustituido con R₄ sin sustituir, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con R₄ sin sustituir, cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con R₄ sin sustituir, alqueno C₂-C₆ opcionalmente sustituido con R₄ sin sustituir, alquino C₂-C₆ opcionalmente sustituido con R₄ sin sustituir y arilo opcionalmente sustituido con R₄ sin sustituir, o R₄ es un heterociclo aromático de cinco o seis miembros que contiene 1-4 heteroátomos tomados 45 de N y O; R₅ es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo; R₆ puede ser H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo; y R₇ es arilo o heteroarilo; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los análogos adicionales de Nefopam se describen en los documentos WO2004/056788, WO2005/103019 y US2006/0019940, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. El Nefopam y análogos del mismo, pueden elaborarse usando métodos sintéticos 50 químicos ya conocidos por los expertos en la técnica. Además, el Nefopam está disponible en el mercado.

El término "profármaco" se refiere a un compuesto (por ejemplo, un precursor farmacológico) que se transforma *in vivo* para producir un compuesto que tiene la estructura de Nefopam o un análogo, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. La transformación puede producirse mediante diversos mecanismos (por 55 ejemplo, por procesos metabólicos o químicos), tal como, por ejemplo, a través de hidrólisis en la sangre. La expresión "sal (o sales)", como se emplea en el presente documento, representa sales ácidas formadas con ácidos inorgánicos y/o orgánicos, así como sales básicas formadas con bases inorgánicas y/u orgánicas. Se prefieren sales farmacéuticamente aceptables (es decir, no tóxicas, fisiológicamente aceptables), aunque también son útiles otras sales. Un "solvato" se forma por la mezcla de Nefopam o un análogo del mismo en un disolvente, que es 60 preferiblemente farmacéuticamente aceptable.

Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" se usan ampliamente en el presente documento para representar métodos que alteran de forma favorable el trastorno diana, incluyendo aquellos que moderan o invierten el avance de, reducen la gravedad de, previenen, o curan el trastorno. El término "mamífero" se usa en el presente documento para incluir tanto mamíferos humanos como no humanos.

5

También se proporciona un compuesto de Nefopam para su uso en el tratamiento de cicatrices cutáneas, incluyendo cicatrices resultantes de cortes, rasguños, infección, acné, quemaduras, cirugía, etc., cicatrices hipertróficas, hiperplásicas, queloides, cicatrices que implican células mesenquimales y obtenidas del mesénquima, cualquiera de las cuales puede o no estar mediada por β -catenina. El tratamiento comprende administrar al sitio diana una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Nefopam. El tratamiento de cicatrices, en formación o ya formadas, incluye reducir el tamaño de la cicatriz (por ejemplo, en al menos aproximadamente un 5-10 %, preferiblemente en al menos aproximadamente un 20 %, y más preferiblemente en al menos aproximadamente un 25 % o más) o la prevalencia de la cicatriz (por ejemplo, la elevación de la cicatriz, la rojez, etc.) y mejorar así el aspecto de la misma. A este respecto, como apreciará un experto, puede usarse una escala de evaluación de cicatrices, por ejemplo la escala Manchester, para evaluar la mejora de una cicatriz determinada. La escala Manchester evalúa el color en comparación con la piel circundante, de aspecto mate o brillante, el contorno (enrojecimiento con la piel circundante con respecto a la cicatriz/queloides), textura (normal a dura), márgenes (distintos o no), el tamaño y número (única o múltiple) (Disability & Rehabilitation, 2009, Vol. 31, n.º 25: Páginas 2055-2063; International Journal of Lower Extremity Wounds diciembre de 2007 6: 249-253).

20

Por lo tanto, pueden utilizarse compuestos de Nefopam en un tratamiento cosmético para reducir el tejido cicatricial y mejorar la estética de la cicatriz y el área circundante, y pueden proporcionar características cosméticas adicionales, por ejemplo, efectos antiarrugas.

Se proporciona en el presente documento Nefopam o un análogo funcionalmente equivalente del mismo, para su uso en un método para tratamiento de tumores. El tratamiento de tumores incluye inhibir el inicio tumoral y la proliferación de células tumorales. Los tumores pueden ser resultado de la expresión desregulada de β -catenina, tal como fibromatosis agresiva, así como de diversos cánceres, tales como cáncer de colon, melanoma, cáncer hepatocelular, cáncer de ovario, cáncer endometrial y cáncer de próstata. El método comprende administrar a un mamífero que necesita tratamiento, es decir, un mamífero que tiene un tumor, una cantidad eficaz de Nefopam, un análogo del mismo, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el tratamiento puede realizarse por la regulación o modulación de la expresión de β -catenina, a nivel del ácido nucleico, o la regulación o modulación de la actividad de β -catenina, a nivel de proteínas.

Se administran dosificaciones terapéuticamente eficaces de Nefopam a un mamífero. La expresión "terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento con respecto a las dosificaciones, se refiere a una dosificación que es eficaz para tratar un trastorno mediado por β -catenina sin causar efectos secundarios adversos inaceptables. El término "administrado" se refiere a cualquier medio apropiado para proporcionar Nefopam a un mamífero, y dependerá de la forma de dosificación que se usa como se describirá. Por ejemplo, la dosificación puede administrarse por vía oral, por inyección, por mucosas y por vía tópica, como se describirá en más detalle.

Por lo tanto, las dosificaciones terapéuticamente eficaces están en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1500 mg, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 0,0001-100 mg. Sin embargo, como apreciará un experto en la técnica, la dosificación terapéutica eficaz de Nefopam, o análogos del mismo, variará dependiendo de muchos factores, incluyendo, pero sin limitación, el tipo de trastorno a tratar, la naturaleza y gravedad del trastorno, el mamífero a tratar, los síntomas del mamífero a tratar, el compuesto usado para el tratamiento, y ruta de administración.

50

El Nefopam puede administrarse en solitario o en una composición combinada con un adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aceptable para su uso en las técnicas farmacéuticas, es decir, que no es tóxico de forma inaceptable, o de otro modo inadecuado para su administración a un mamífero. Los ejemplos de adyuvantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, diluyentes, excipientes y similares. Puede hacerse referencia a "Remington's: The Science and Practice of Pharmacy", 21ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005, para obtener orientación sobre formulaciones farmacológicas generalmente. La selección del adyuvante depende del modo pretendido de administración de la composición. En una realización de la invención, los compuestos se formulan para su administración por infusión, o por inyección por vía subcutánea o intravenosa y, por consiguiente, se utilizan como soluciones acuosas en forma estéril o libre de pirógenos y opcionalmente tamponados o isotónicos. Por lo tanto, los compuestos pueden

administrarse en agua destilada o, más deseablemente, en solución salina, solución salina tamponada con fosfato o solución de dextrosa al 5 %. Las composiciones para administración oral a través de comprimido, cápsula, pastilla, solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, un elixir o jarabe, se preparan usando adyuvantes, incluyendo azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; 5 almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y derivados de la misma, incluyendo carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetatos de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnesio; sulfato cálcico; aceites vegetales, tales como aceites de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de maíz; polioles, tales como propilenglicol, glicerina, sorbital, manitol y polietilenglicol; agar; ácidos alginicos; agua; solución salina isotónica y soluciones de tampón 10 fosfato. También pueden estar presentes agentes humectantes, lubricantes, tal como lauril sulfato sódico, estabilizantes, agentes de compresión, agentes disgregantes, antioxidantes, conservantes, agentes colorantes y agentes saporíferos. En otra realización, la composición puede formularse para aplicación por vía tópica, como una crema, loción o pomada. Para tal aplicación tópica, la composición puede incluir una base apropiada, tal como una base de triglicéridos. Dichas cremas, lociones y pomadas también pueden contener un agente de superficie activa y 15 otros aditivos cosméticos tales como suavizantes de piel y similares, así como fragancia. También pueden prepararse formulaciones en aerosol, por ejemplo, para administración nasal, en las que se usan adyuvantes propulsores adecuados. Las composiciones de la presente invención también pueden administrarse como un bolo, electuario o pasta. También se incluyen composiciones para administración por mucosas, incluyendo administración oral, nasal, rectal o vaginal para el tratamiento de infecciones que afectan a estas áreas. Dichas composiciones 20 incluyen generalmente uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorio, un salicilato, u otros vehículos adecuados. También pueden añadirse otros adyuvantes a la composición, independientemente de cómo se administre que, por ejemplo, pueden facilitar la extensión de la semivida de la misma.

25 Un compuesto de Nefopam puede administrarse de una manera conveniente por cualquiera de varias rutas, incluyendo, pero sin limitación, medio oral, subcutáneo, intravenoso, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópico, sublingual, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, inhalación, ocular, transdérmica, vaginal o rectal. Los compuestos de Nefopam también pueden administrarse a las células en protocolos de tratamiento *ex vivo*. Dependiendo de la ruta de administración, los compuestos de Nefopam pueden revestirse o recubrirse en un 30 material protector para impedir la degradación, por ejemplo, por enzimas, ácidos u otras condiciones que puedan afectar a la actividad terapéutica de los mismos.

En una realización, el Nefopam, o un análogo del mismo, puede aplicarse por vía tópica a un sitio diana, por ejemplo, una cicatriz en formación o ya formada, fijado a un dispositivo biocompatible, polímero u otra matriz, por 35 ejemplo, tal como un vendaje, apósito, malla polimérica, implante, dispositivo u otro artículo relacionado cosméticamente. Los fibroblastos/queratinocitos dérmicos diseñados por bioingeniería para expresar un compuesto de Nefopam también pueden aplicarse a un sitio diana. Una matriz o malla polimérica adecuada, por ejemplo, injertos de piel artificiales o no artificiales, pueden impregnarse, como alternativa, con un compuesto de Nefopam para su aplicación a un sitio diana para permitir la liberación lenta del compuesto para el tratamiento continuo del 40 sitio durante un periodo de tiempo.

Los presentes compuestos de Nefopam pueden administrarse en una formulación de liberación controlada usando métodos ya establecidos incluyendo, por ejemplo, por dispositivos monolíticos controlados por disolución o difusión, sistemas encapsulados con perlas, sistemas controlados osmóticamente, y sistemas de revestimiento de película 45 modificados que incorporan materiales hidrófilos e hidrófobos poliméricos y no poliméricos adecuados. Las formulaciones de liberación controlada adecuadas pueden incluir materiales hidrófilos que comprenden, pero sin limitación, polímeros o copolímeros acrílicos o metacrílicos, polímeros de alquivilinilo, celulosas, celulosas de hidroxialquilo, celulosas de carboxialquilo, polisacáridos, alginatos, pectinas, almidones y derivados, gomas naturales y sintéticas, policarbófilos, chitosanos. Los materiales hidrófobos adecuados comprenden, pero sin 50 limitación, polímeros hidrófobos, ceras, grasas, ácidos grasos de cadena larga, sus ésteres correspondientes, sus éteres correspondientes, y sus mezclas.

En otra realización, los compuestos de Nefopam pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo, por ejemplo, un agente anti-cicatrices; un agente de cicatrización de heridas, tal 55 como un factor de crecimiento, por ejemplo un factor del crecimiento epidérmico, bFCF, PDGF; plaquetas, fibroblastos y queratinocitos dérmicos; agentes quimioterapéuticos, tales como, pero sin limitación, rapamicina, troglitazona, rosiglitazona, celecoxib, retinoides e iresa. A este respecto, el Nefopam puede administrarse en una formulación separada, o junto con un agente terapéutico adicional en una formulación combinada.

60 Además, los presentes tratamientos pueden utilizarse en una combinación con otras terapias, por ejemplo, en combinación con terapia de radiación en el tratamiento de neoplasias, o en combinación con terapia láser para tratar

tejido cicatricial, tal como cicatrices normales, tejidos de cicatrices hiperplásicas y similares.

En un aspecto adicional, se proporciona en el presente documento un artículo de fabricación que comprende un envase y una composición que comprende Nefopam como se describe. El envase se etiqueta para indicar que la
5 composición es adecuada para tratar un trastorno mediado por β -catenina, o puede etiquetarse para indicar que la composición es adecuada para tratar cicatrices, en formación o ya formadas.

La presente invención se describe por referencia a las figuras y Ejemplos específicos adjuntos que no se interpretarán como limitantes.

10

Ejemplos

Los siguientes materiales y métodos se usaron en los ejemplos analizados a continuación.

15 **Modelo de ratón de FA Apc^+/Apc^{1638N} y plan de tratamiento.** La generación y fenotipo de ratones *Apc/Apc1638N* se han caracterizado bien. Estos ratones albergan una mutación diana en el codón 1638 en el gen *Apc* como resultado de una inserción de neomicina en orientación antisentido en el exón 15. Los ratones macho desarrollan una media de 45 lesiones de FA y 6 pólipos gastrointestinales a la edad de 6 meses, mientras que los ratones hembra desarrollan significativamente menos lesiones de FA. Los ratones macho *Apc/Apc1638N* se dividieron en
20 tres grupos de estudio: Sin tratamiento (n = 11), DMSO al 0,1 % (n = 10), y Nefopam a 40 mg/kg de peso corporal (n = 10). El tratamiento por sonda oral diario comenzó 2 meses después de destetar los ratones *Apc/Apc1638N* y continuó durante 3 meses. En la autopsia, los tumores de FA y los pólipos intestinales se puntuaron macroscópicamente. Los tumores de FA y el tejido normal se recogieron para la extracción de proteínas y se fijaron para el examen histológico.

25

Ratones reporteros Tcf y experimentos de laceración. Se construyó una construcción reportera de Tcf que contenía el gen *lacZ* en la dirección 3' de un promotor mínimo c-Fos y tres motivos de unión Tcf de consenso. Tras la unión del complejo de β -catenina/Tcf a los motivos Tcf, se activa la expresión de *lacZ*. Los ratones Tcf se hirieron como se ha descrito previamente: se generaron dos heridas cutáneas de espesor completo de 4 mm de diámetro
30 usando un punzón para biopsia dérmica (Millex Instrument Company, York, PA, Estados Unidos). Los ratones Tcf heridos se separaron en dos grupos de estudio: Grupo de control, que recibió inyecciones intraperitoneales a diario de solución salina; y grupo de Nefopam, que recibió inyecciones intraperitoneales a diario de 40 mg/kg de peso corporal. 14 días después de la laceración, se examinó el tamaño de las heridas, y se recogieron tejidos de herida para la extracción de ARN y proteínas y se fijaron para el examen histológico.

35

Tumor de FA humana y muestras de tejido fascial normal. Las muestras de tumores de fibromatosis agresiva humana se obtuvieron en el momento de la cirugía en el Hospital for Sick Children, Toronto. El tejido tumoral y el tejido fascial normal circundante del mismo paciente se recogieron y se procesaron inmediatamente después de la escisión quirúrgica. Los tejidos se crioconservaron y se almacenaron en vapor de nitrógeno líquido.

40

Estudios de cultivos celulares. Se establecieron cultivos de células primarias del tumor de FA humana y muestras de tejido fascial normal. Se cultivaron cultivos monocapa en DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 % y se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se dividieron cuando fueron confluentes y los experimentos se realizaron entre el primer y quinto pases. Antes de los estudios experimentales, las células sembraron durante una
45 noche y el tratamiento comenzó al día siguiente (Día 0), donde las células se trataron con el vehículo de control DMSO al 0,1 % con o sin 250 μ m de Nefopam preparado en medio DMEM.

Se realizó un ensayo de viabilidad celular, un ensayo de proliferación y un ensayo de apoptosis. La viabilidad celular se midió usando el método de exclusión por colorante azul de tripano. Las células se tiñeron con colorante azul de tripano a una relación 1:1, y se contaron tanto las células vivas (transparentes) como las muertas (azul). La proliferación se midió usando un ensayo de incorporación de 5-bromo-2-desoxi-uridina (BrdU). Después de la incubación de BrdU durante 12 horas, las células con BrdU incorporada se identificaron usando anticuerpo anti-BrdU monoclonal de ratón y anticuerpo anti-ratón de caballo conjugado con fosfatasa alcalina. La presencia de BrdU se detectó usando sustrato de fosfatasa alcalina. El porcentaje de núcleos teñidos positivamente de los núcleos totales
55 se analizó en 10 campos de gran potencia.

Extracción de proteínas y análisis Western Blot. Las muestras tisulares se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con tampón de lisis de ensayo de gen reportero (Roche). Los lisados se centrifugaron a 16.000 x g durante 5 minutos para eliminar los desechos celulares y se cuantificaron usando el ensayo de proteínas de ácido
60 bicinonínico (BCA) (Pierce). Se separaron cantidades iguales de proteína total por electroforesis a través de un gel de SDS-poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham), y se inmunotransfirieron

durante una noche a 4 °C con anticuerpos primarios contra phosphoGSK3 β (Ser 9, policlonal de conejo, New England Biolabs), β -catenina (monoclonal de ratón, Upstate Biotechnology), GSK3 β total (monoclonal de ratón, Transduction Laboratories), y GAPDH (monoclonal de ratón, Upstate Biotechnology). Se usaron anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP) y quimioluminiscencia mejorada (Amersham) para detectar la hibridización. Se realizó la densitometría usando el software AlphaEaseFC (Alpha Innotech). Se realizó un análisis Western blotting por triplicado para asegurar la reproducibilidad.

Análisis estadístico. Los datos en este trabajo se presentan como media \pm intervalo de confianza del 95 %. Todos los estudios se realizaron al menos por triplicado para asegurar la reproducibilidad.

10

Ejemplo 1: El tratamiento con Nefopam reduce la viabilidad celular de las heridas hiperplásicas.

Los compuestos se examinaron para identificar los que cumplieran dos criterios: 1) inhibir la viabilidad celular de fibroblastos obtenidos de heridas hiperplásicas que muestran activación de β -catenina; y 2) mostrar poco o ningún efecto sobre los cultivos de fibroblastos dérmicos normales. La relevancia biológica del examen fue considerable ya que las células usadas para el examen se obtuvieron de pacientes con heridas hiperplásicas, así como tejido sano. Los experimentos se repitieron por triplicado en placas de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo 4000 células tratadas con entre 0,1, 1,0, o 10 μ M de compuesto o DMSO como control. El ensayo de Sulforhodamina B (SRB) se usó para medir la viabilidad celular. Los compuestos detectados en el examen inicial se sometieron a ensayos adicionales usando un gran conjunto de muestras, de las cuales se identificó Nefopam (véase la figura 1A).

Los niveles de β -catenina en los cultivos celulares de cicatrices hiperplásicas tratadas con Nefopam o control se analizaron usando análisis Western blot. Se observó que Nefopam redujo sustancialmente el nivel de proteínas de β -catenina en los cultivos celulares de heridas hiperplásicas (véase la figura 1B). La expresión de GAPDH se incluyó como control de carga.

25

Ejemplo 2: Nefopam disminuye el número de tumores de FA formados en ratones *Apc/Apc1638N*.

Se investigó si el tratamiento con Nefopam fue capaz o no de modular el fenotipo de lesiones de FA *in vivo*. El número de tumores de FA formados en ratones macho *Apc/Apc1638N* tratados con Nefopam se redujo significativamente en comparación con el número formado en ratones no tratados o ratones tratados con DMSO al 0,1 % a los 6 meses de edad ($8,18 \pm 1,77$ frente a $13,2 \pm 2,30$ o $12,09 \pm 1,31$, $p < 0,03$, véase la figura 2). No hubo ninguna diferencia significativa en el número de pólipos obtenidos del epitelio en el tracto gastrointestinal superior (véase la figura 2). Esto muestra que Nefopam inhibe el inicio tumoral y además, es específico para las células mesenquimales.

35

Ejemplo 3: Nefopam disminuye los niveles de β -catenina en las células de tumores de FA humana.

Los tumores de FA se caracterizan por un aumento en los niveles de β -catenina. Para examinar si Nefopam tiene la capacidad de modular los niveles de β -catenina, se estudiaron cultivos de células primarias obtenidas de varios tumores de FA humana. Los análisis Western blot usando un anticuerpo contra β -catenina total demostraron un descenso marcado en la cantidad de proteína en un tamaño 92 kDa coherente con la β -catenina total como resultado del tratamiento con Nefopam durante 5 días, véase la figura 3A. El análisis de densitometría mostró casi un descenso de 5 veces en los niveles de β -catenina total en cultivos de células de tumor de FA humana tratados con Nefopam en comparación con los tratados con DMSO al 0,1 % (véase la figura 3B). La expresión de actina se determinó como un control de carga de lisado.

45

Ejemplo 4: Nefopam disminuye la viabilidad celular y la proliferación celular en las células de tumor de FA humana.

50

Para determinar cómo Nefopam puede modificar el comportamiento de las células de FA, se estudiaron cultivos de células primarias obtenidos de varios tumores de FA humana. En primer lugar, se estudiaron los efectos del Nefopam sobre la viabilidad celular en tumores de FA humana. Se observó un número significativamente menor de células vivas en los cultivos de células de tumor de FA humana tras el tratamiento con Nefopam en comparación con los cultivos tratados con DMSO al 0,1 % ($p < 0,05$). No hubo diferencias significativas en el número de células muertas contadas como resultado del tratamiento con Nefopam para los tumores ($p < 0,05$) (véase la figura 4A).

55

Tras demostrar que los niveles de β -catenina están implicados en la regulación de la tasa de proliferación en las células mesenquimales, se investigaron los efectos del Nefopam sobre la proliferación en los cultivos de células primarias. Usando el ensayo de incorporación de BrdU, se midió el porcentaje de las células BrdU+/DAPI+ en

60

comparación con las células DAPI+ totales. Se observó que los tumores de FA humana tratados con Nefopam contenían significativamente menos células proliferantes según se determinó por la incorporación de BrdU ($p < 0,05$, véase la figura 4B).

- 5 En conjunto, estos resultados muestran que Nefopam inhibe preferiblemente el número de células de FA viables reduciendo la tasa de proliferación.

Ejemplo 5: Nefopam disminuye los niveles de β -catenina en los cultivos de células de fibroblastos humanos primarias.

10

Las heridas hiperplásicas se caracterizan por niveles de β -catenina elevados durante la fase proliferativa. Los datos descritos en el presente documento muestran que Nefopam tiene la capacidad de modular los niveles de β -catenina particularmente en las células obtenidas del mesénquima. Para confirmar que el Nefopam puede modular los niveles de β -catenina en las células mesenquimales, se trataron células de fibroblastos humanas inmortalizadas con Nefopam (véase la figura 5A). El tratamiento con Nefopam dio como resultado un descenso de aproximadamente 4 veces en los niveles de β -catenina totales en los cultivos de células de fibroblastos humanas primarias en comparación con los cultivos tratados con DMSO al 0,1 % según se determinó por los análisis de densitometría ($p < 0,05$, véase la figura 5B). Los controles adicionales incluidos en los experimentos fueron tratamiento con Wnt3a de las células (que se sabe que aumenta la expresión de β -catenina) y los efectos del Nefopam sobre las células tratadas con Wnt3a.

20

Ejemplo 6: Nefopam sistémico disminuye los niveles de β -catenina y los tamaños de herida en ratones Tcf.

A continuación, para examinar los efectos del Nefopam sobre los niveles de β -catenina durante la cicatrización de 25 heridas, se estudió tejido herido de ratones Tcf. Las laceraciones cutáneas se generaron usando un procedimiento de punzón para biopsia dando como resultado una herida circular de espesor completo de 4 mm de diámetro. La escala es en unidades de mm. El análisis Western blotting usando un anticuerpo contra la β -catenina total (véase la figura 6A) demostró un descenso en los niveles de β -catenina en las células cultivadas de heridas obtenidas de ratones Tcf tratados con Nefopam en comparación con el grupo de control 14 días después de la laceración. 30 Además, el examen de las heridas en la autopsia mostró que los ratones tratados con Nefopam tenían cicatrices significativamente más pequeñas de diámetro en comparación con los controles tratados con vehículo (solución salina) en día 14 post-laceración (el asterisco indica una diferencia significativa, $p < 0,001$) (véase la figura 6B).

Ejemplo 7: Nefopam sistémico reduce el tamaño de la cicatriz hiperplásica inducido por TGF- β .

35

Se sabe que los niveles proteína β -catenina aumentan durante las fases tempranas de la cicatrización de las heridas y después disminuyen a través de las fases posteriores con respecto al tejido no herido. El aumento y descenso normal de los niveles de proteína β -catenina se desregulan durante la cicatrización de heridas hiperplásicas donde se observan niveles elevados significativamente prolongados de β -catenina (véase la figura 7).

40

Tras los estudios de selección farmacológica, los efectos del Nefopam se ensayaron *in vivo* usando ratones. Se evaluaron las rutas de administración tanto oral como intraperitoneal (40 mg/kg de peso corporal, a diario; DMSO al 0,1 % como control). En ambas rutas de administración, el Nefopam se identificó en el suero según se detectó usando HPLC (datos no mostrados). Se hicieron heridas con punzón de espesor completo de 4 mm en la piel, y se administró Nefopam o control a diario después de la laceración. Para determinar si el Nefopam es eficaz en el 45 tratamiento de las cicatrices hiperplásicas, se usó un modelo de cicatriz hiperplásica de ratón, en el que se inyecta TGF- β antes de la laceración dando como resultado una cicatriz hiperplásica. De forma importante, el mismo régimen de tratamiento con Nefopam, como se ha descrito anteriormente, dio como resultado cicatrices más pequeñas en comparación con las cicatrices de control no tratadas con TGF- β (véase la figura 8). Por lo tanto, el 50 Nefopam es capaz de reducir el tamaño cicatricial en la reparación tanto de heridas hiperplásicas como normales.

Ejemplo 8: Pueden usarse diversos vehículos para la administración tópica de Nefopam.

Para las heridas de la piel, un producto ideal es una formulación tópica de Nefopam. Se prepararon y evaluaron 55 formulaciones tópicas de Nefopam usando los siguientes vehículos: carboximetilcelulosa (CMC), vaselina e hipromelosa. Los tres vehículos se ensayaron *in vivo* para determinar la formulación eficaz para administrar Nefopam a través de la piel. Los resultados se ilustran en la figura 9.

Ejemplo 9: Nefopam tópico disminuye el tamaño cicatricial normal en los ratones.

60

Las heridas cutáneas se generaron en ratones Tcf usando el procedimiento por punzón para biopsia que se ha

descrito anteriormente. Las heridas con punzón de espesor completo de 6 mm de diámetro se trataron por vía tópica con crema de control de crema de Nefopam al 1 % dos veces al día durante hasta 21 días. Se observó que el tratamiento con Nefopam dio como resultado una reducción del tamaño cicatricial de aproximadamente un tercio en comparación con los controles. La Tabla 1 indica el tamaño de herida normal medio (medido en mm) en un modelo de ratón el día 0 y después de 21 días de la administración tópica diaria de crema de Nefopam al 1 % formulada en vehículo de vaselina o crema de control con vehículo en solitario. Los promedios se proporcionan para 4 heridas por grupo.

Tabla 1.

		Día 0	Día 21
Control	Tamaño medio de la herida (mm)	6	3,116666667
nefopam al 1 %	Tamaño medio de la herida (mm)	6	2,02

10

Se generaron heridas por punzón de 4 mm en ratones Tcf que después se trataron por vía tópica con uno de crema de Nefopam al 1 % o crema de control dos veces al día durante 14 días. Las áreas superficiales de cicatrices formadas después de 14 días de tratamiento se midieron usando unidades arbitrarias, donde 100 unidades arbitrarias representan el tratamiento con crema de control. Se midieron diez heridas para cada tratamiento y los

15

datos se presentaron como la media y la desviación estándar. Se observó que las cicatrices en los ratones que recibieron tratamiento con Nefopam fueron significativamente menores que las sometidas a tratamiento de control ($p < 0,05$) donde el tratamiento de control es Nefopam al 0 % (véase la figura 10).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Nefopam seleccionado entre Nefopam, o una sal o solvato del mismo, para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno fibroproliferativo seleccionado del grupo que consiste en cicatrices
5 cutáneas, tal como cicatrices de cortes, rasguños, infección, acné, quemaduras, cirugía, cicatriz hipertrófica, cicatrices hiperplásicas, cicatrices queloides y cicatrices que implican células mesenquimales y obtenidas del mesénquima, fibromatosis agresiva, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, glomeruloesclerosis, enfermedad de Ledderhose, y contractura de Dupuytren (CD) en un mamífero.
- 10 2. El compuesto de Nefopam de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el trastorno está caracterizado por la acumulación de tejido fibroso.
3. El compuesto de Nefopam de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la
15 reivindicación 1, donde el trastorno es la formación de cicatrices.
4. El compuesto de Nefopam de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de Nefopam se administra junto con un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. El compuesto de Nefopam de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de Nefopam se administra junto con un agente terapéutico adicional.
6. El compuesto de Nefopam de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de Nefopam se administra por vía tópica.
25
7. El compuesto de Nefopam de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el compuesto de Nefopam se aplica a una matriz biocompatible para su aplicación a un sitio diana.
- 30 8. El compuesto de Nefopam de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde la matriz biocompatible se selecciona del grupo que consiste en un apósito, vendaje, implante y matriz polimérica.
9. El compuesto de Nefopam de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la
35 reivindicación 1, donde el compuesto de Nefopam se administra a una dosificación de aproximadamente 0,0001-100 mg.
10. Uso cosmético de un compuesto de Nefopam seleccionado entre Nefopam, o una sal o solvato del mismo, para mejorar la estética de una cicatriz y el área circundante.
40
11. El uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 10 para reducir el tamaño de la cicatriz, la elevación de la cicatriz, o la rojez de la cicatriz.
12. El uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 10, donde el compuesto de Nefopam se administra
45 por vía tópica.
13. El uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 12, donde el compuesto de Nefopam se aplica a una matriz biocompatible para su aplicación a un sitio diana.
- 50 14. El uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 10, donde el compuesto de Nefopam proporciona efectos antiarrugas.

FIGURA 1A

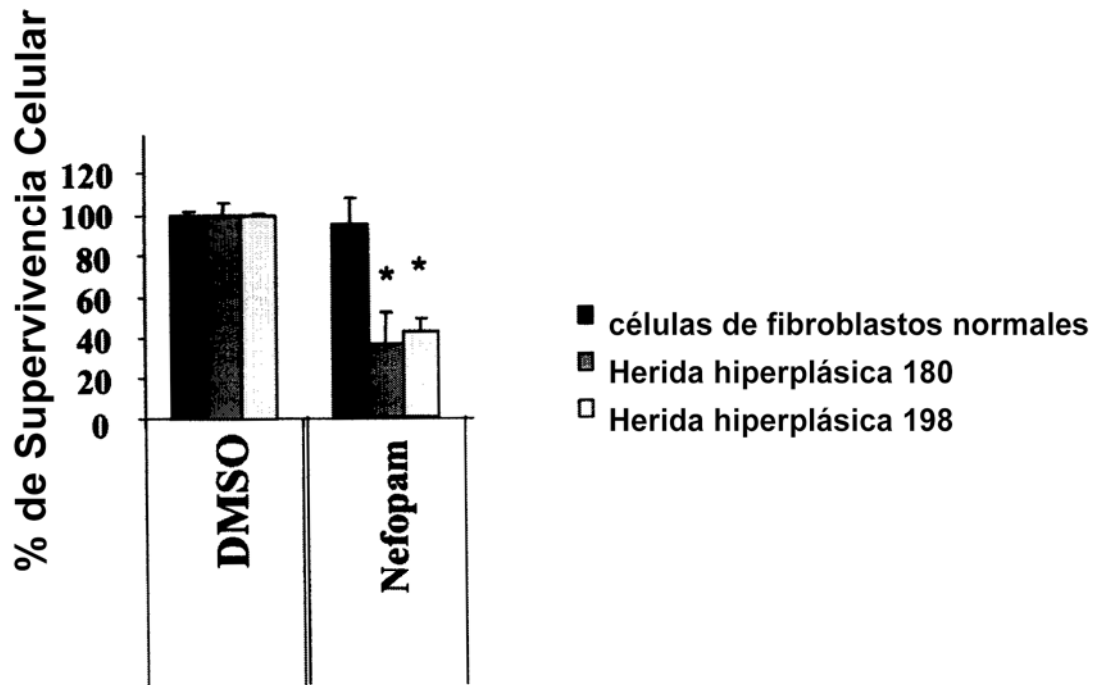


FIGURA 1B

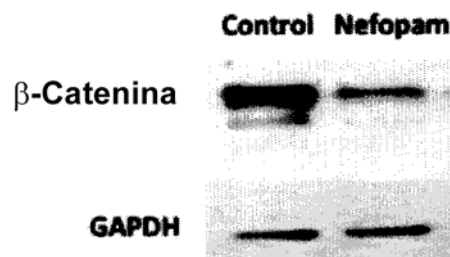


FIGURA 2

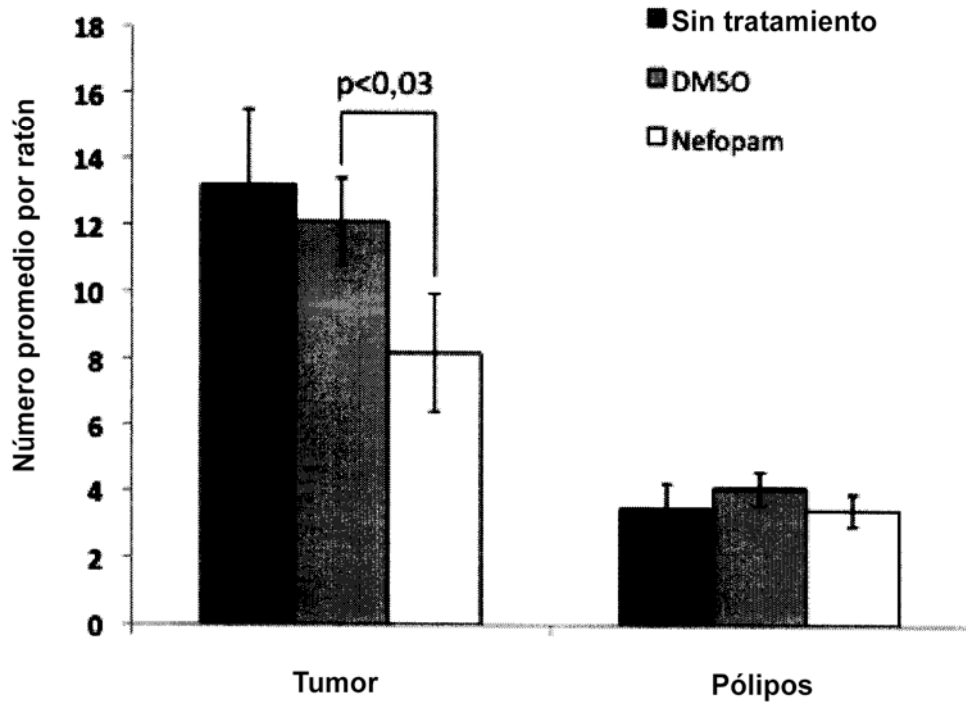


FIGURA 3A

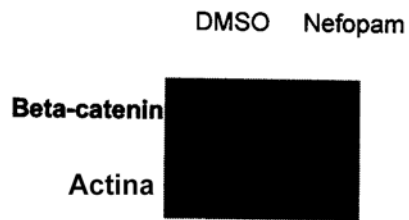


FIGURA 3B

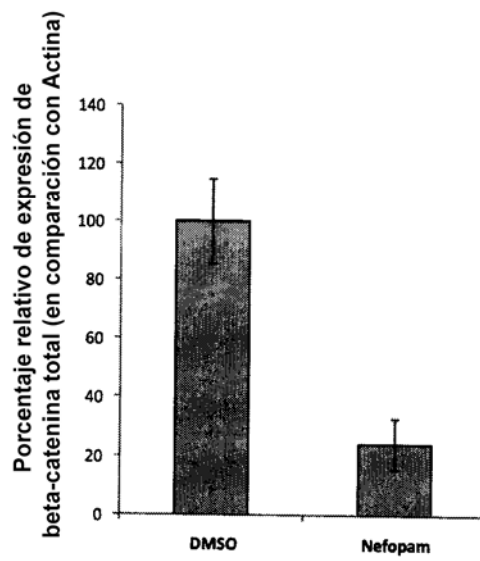


FIGURA 4A

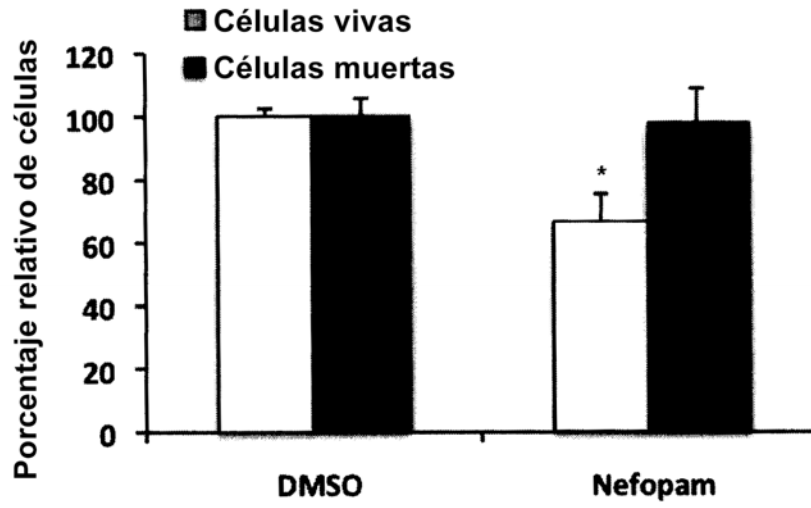


FIGURA 4B

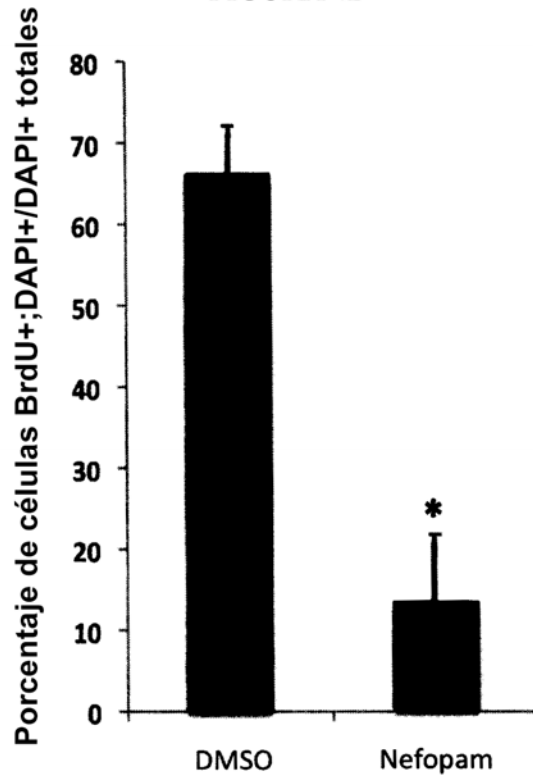


FIGURA 5A

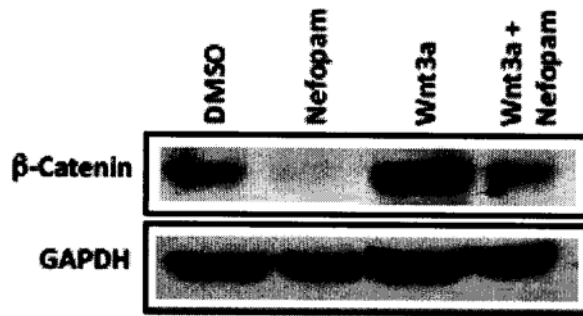


FIGURA 5B

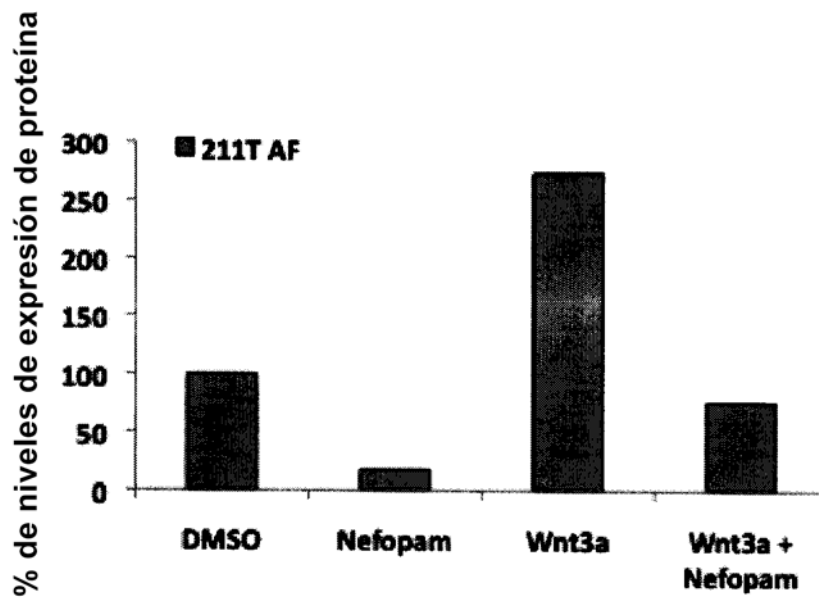


FIGURA 6A

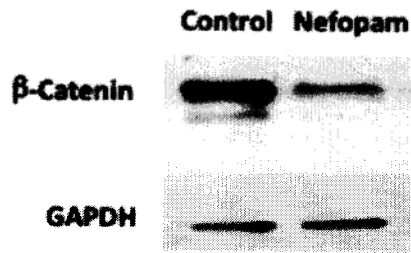


FIGURA 6B

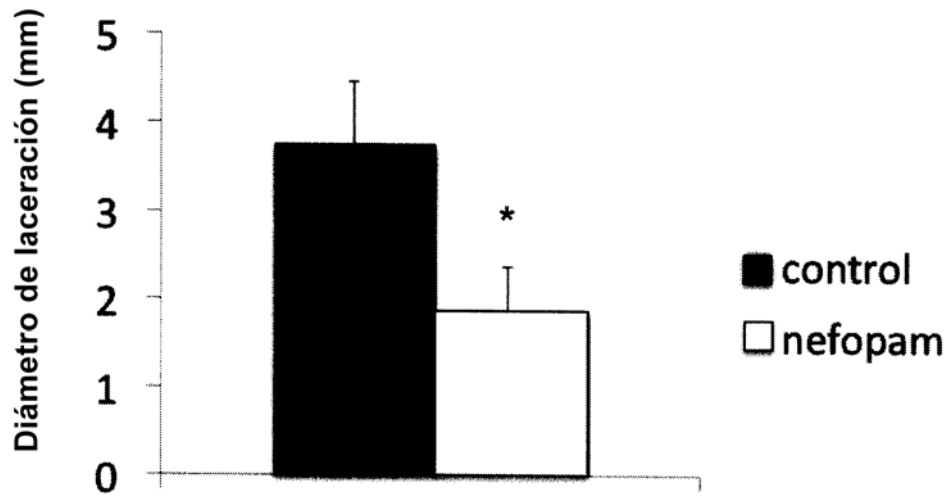


FIGURA 7

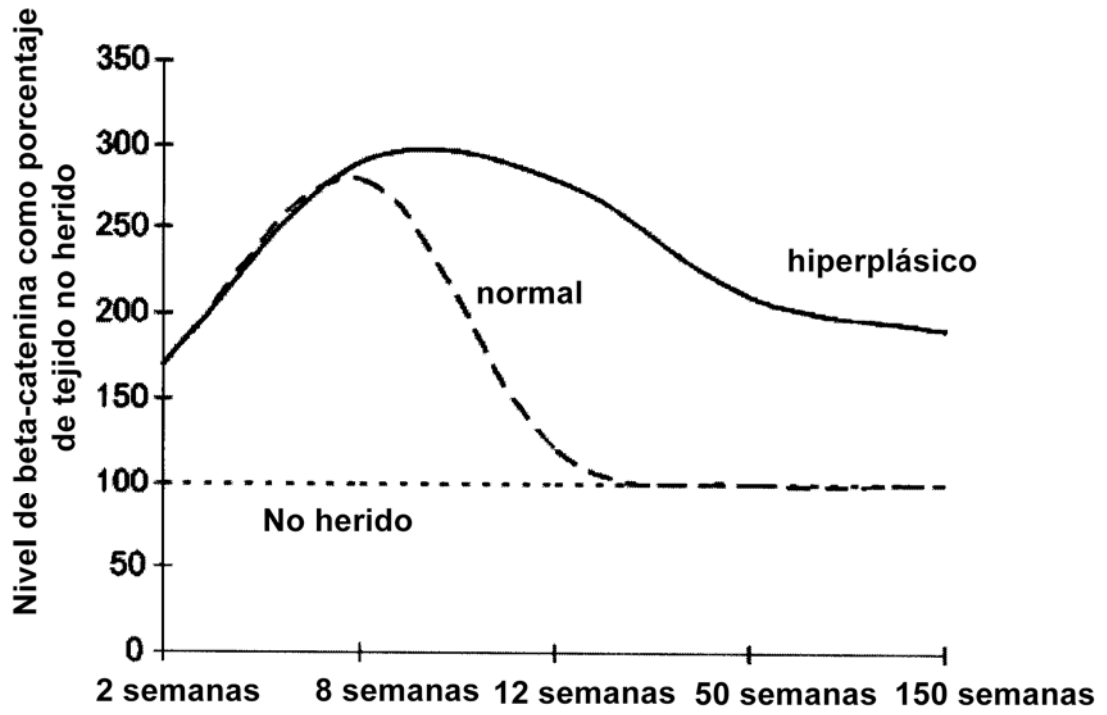


FIGURA 8

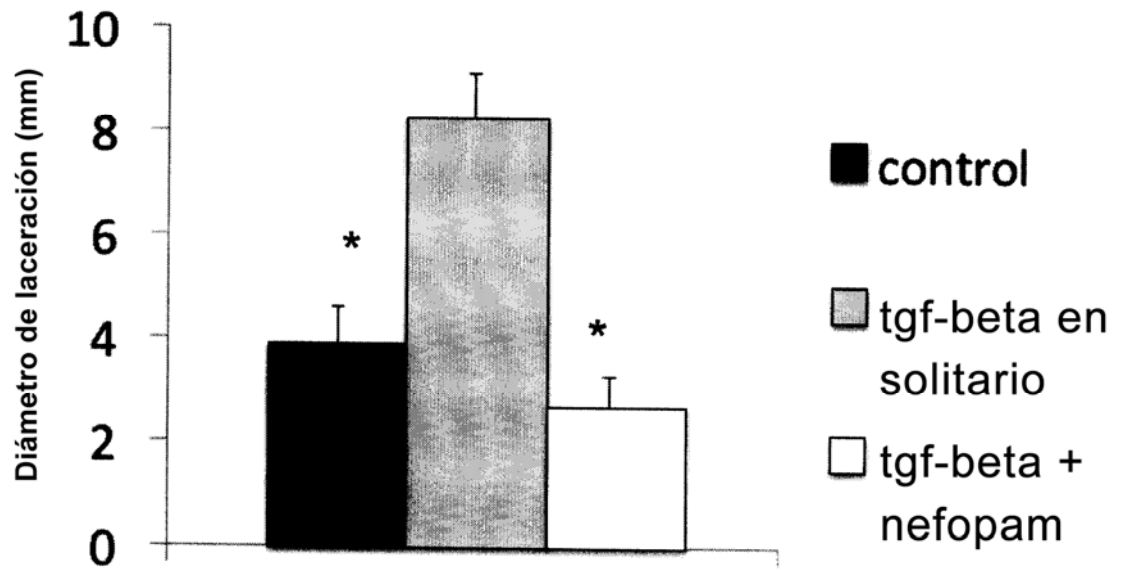


FIGURA 9

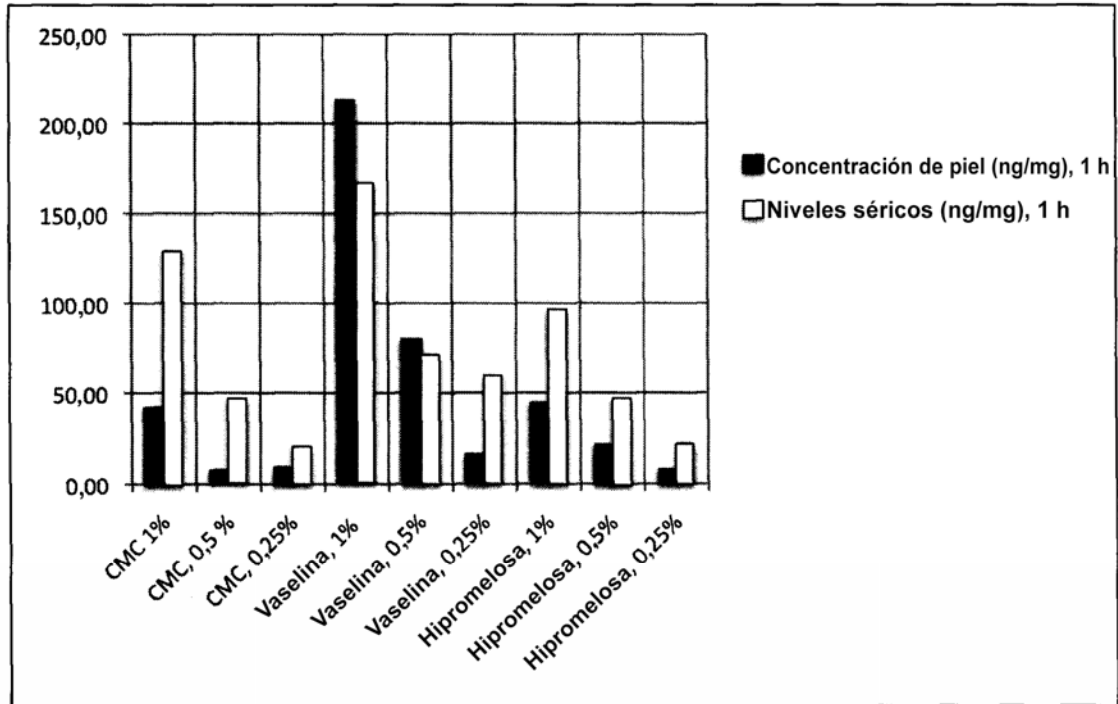


FIGURA 10

