(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 687 039**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/606 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/194 (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2005 PCT/US2005/009325**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2005 WO05094448**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2005 E 05731483 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 1737469**

(54) Título: **Métodos y composiciones que emplean compuestos de ácido 4-aminofenilacético**

(30) Prioridad:

23.03.2004 US 555551 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2018

(73) Titular/es:

BIOCON LIMITED (100.0%)
20th K.M. Hosur Road, Electronic City P.O.
Bangalore 560 100, IN

(72) Inventor/es:

EKWURIBE, NNOCHIRI, N. y
LIDDLE, RODGER

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 687 039 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

Métodos y composiciones que emplean compuestos de ácido 4-aminofenilacético

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que emplean compuestos de 4-APAA en terapias de combinación para trastornos que implican la inflamación del sistema digestivo y/o los tejidos de la mucosa.

Antecedentes de la invención

Una amplia variedad de enfermedades intestinales está relacionada con los procesos inflamatorios. Dos de las afecciones inflamatorias más importantes son la colitis ulcerosa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD). La UC es una afección inflamatoria crónica del revestimiento interno del colon. Se extiende desde el recto y puede afectar a todo el colon. La CD puede afectar todo el tracto gastrointestinal (GI), pero generalmente se limita al intestino delgado y grueso. La CD se puede extender a través de la pared intestinal y ocasionar otras complicaciones. Aproximadamente el 20% de los pacientes con CD tienen una enfermedad aislada del colon. Tanto la UC como la CD son afecciones crónicas, y el tratamiento generalmente sigue un enfoque de tratamiento de dos fases: la inducción y luego el mantenimiento de la remisión. La UC y la CD se caracterizan por dolor abdominal, diarrea sanguinolenta e inflamación de la pared intestinal. Para muchos pacientes, la enfermedad es episódica, que ocurre como un ciclo de erupciones y remisiones con una morbilidad considerable. Los síntomas pueden ser leves o muy graves e incapacitantes. Pueden desarrollarse gradualmente o tener un inicio repentino.

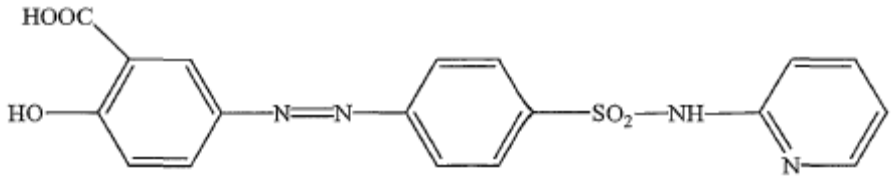
Aproximadamente un millón de estadounidenses padecen de ya sea UC o CD. En Europa occidental y los Estados Unidos, la prevalencia de UC es de 70 a 150 por 100,000, mientras que la prevalencia de CD es de 40 a 100 por 100,000. Estas enfermedades pueden afectar a personas de cualquier edad, pero son más comunes en la segunda y tercera décadas. Los hombres y las mujeres se ven igualmente afectados. El riesgo de enfermedad es más alto en algunos grupos étnicos que en otros. En general, la incidencia de UC parece estabilizarse, pero la incidencia de CD está aumentando, especialmente entre los jóvenes.

Se desconocen las causas de la UC y la CD, aunque se sospecha que la predisposición genética, los agentes infecciosos bacterianos y virales, así como los factores ambientales, juegan un papel. Recientes estudios experimentales y clínicos sugieren que la iniciación y la patogénesis de CD y UC son multifactoriales, que implican interacciones entre factores genéticos, ambientales e inmunes. Independientemente de cómo estas interacciones promueven la inflamación intestinal crónica, cada vez es más evidente que el sistema inmunitario desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad.

Las terapias actuales para las enfermedades inflamatorias del intestino se dividen en 4 clases: 1) corticosteroides 2) aminosalicilatos, 3) inmunomoduladores y 4) antibióticos. Los fármacos aminosalicilatos tales como la sulfasalazina o la mesalamina son la base del tratamiento para la enfermedad leve a moderada. Los agentes inmunomoduladores tales como azatioprina y 6-mercaptopurina se usan como agentes ahorradores de esteroides pero tienen una variedad de efectos secundarios adversos, que a menudo impiden su uso en muchos pacientes. Los inmunomoduladores adicionales, tales como los anticuerpos monoclonales contra el factor α de necrosis tumoral (anti-TNPα) son eficaces en algunos pacientes con enfermedad de Crohn.

Después de la introducción en la medicina clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide hace 40 años, los aminosalicilatos (por ejemplo, 5-ASA) se han convertido en el tratamiento primario para la colitis ulcerosa (UC). Los aminosalicilatos (por ejemplo, 5-ASA) son agentes de inducción de primera línea para el tratamiento de la enfermedad leve a moderadamente activa, así como la terapia de mantenimiento primaria para la UC remitida, y se usan junto con corticosteroides durante la transición de terapia inductiva a terapia de mantenimiento.

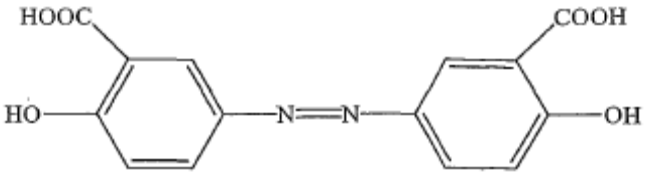
La sulfasalazina fue el prototipo original de aminosalicilato y se diseñó con el concepto de combinar un agente antibacteriano (sulfapiridina) y un agente antiinflamatorio (5-ASA):



Aunque el modo de acción de la sulfasalazina no se entiende claramente, múltiples estudios clínicos indican que la acción terapéutica principal reside en la unidad estructural 5-ASA. La principal limitación de la sulfasalazina es la tasa significativa de eventos adversos relacionados con la unidad estructural de sulfapiridina, lo que compromete la utilidad clínica de la sulfasalazina. Hasta 30 a 40 por ciento de los pacientes no pueden tolerar las dosis requeridas para proporcionar beneficios de tratamiento óptimos.

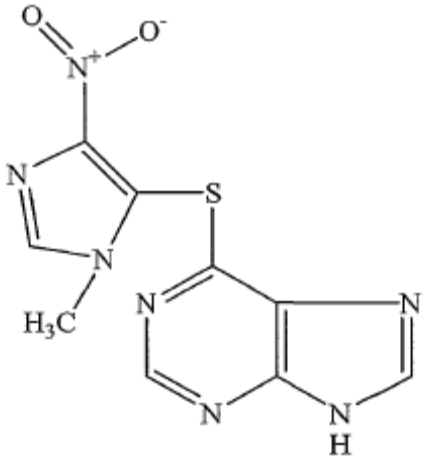
Los productos comercialmente disponibles (mesalamina, ASACOL®, PENTASA®, ROWASA®) usan diversos medios de administración de 5-ASA a la mucosa intestinal inflamada. Todos estos compuestos administran 5-ASA sin el componente sulfapiridina de la sulfasalazina que causa la mayoría de las reacciones adversas.

La olsalazina, que tiene la siguiente fórmula, se ha usado para tratar la colitis ulcerosa.

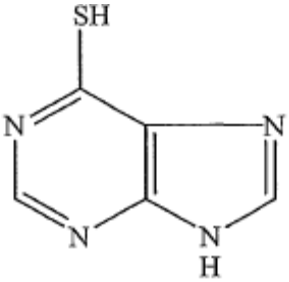


Además de ser relativamente costoso de hacer, la olsalazina puede tener efectos secundarios adversos, que incluyen diarrea.

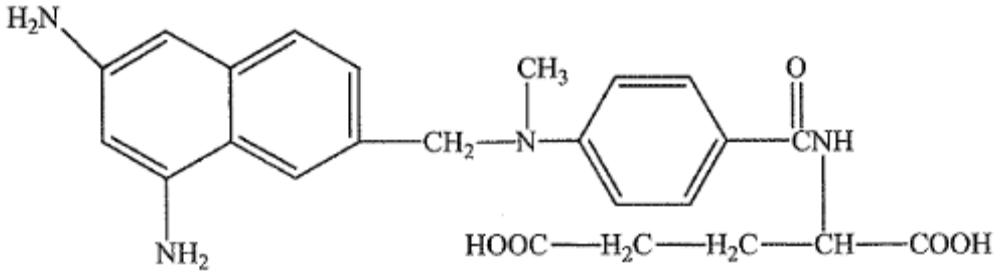
Se sabe que usar azatioprina (6-(1-metil-4-nitroimidazol-5-iltio)purina) en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. La azatioprina tiene la siguiente estructura química:



También se sabe que usar 6-mercaptopurina, un metabolito de azatioprina, para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal. La 6-mercaptopurina tiene la siguiente estructura química:

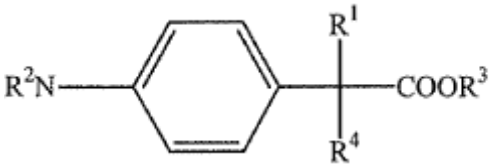


El metotrexato (ácido L-4-amino-N^{10}-metilpteroil-glutámico) también se ha usado para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal. El metotrexato tiene la siguiente estructura química:



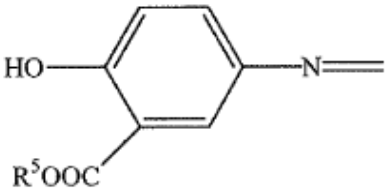
El actarit (ácido 4-acetilaminofenilacético) es un fármaco inmunomodulador aprobado en Japón en 1994 para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide. El ácido 4-aminofenilacético (4-APAA) es un original de actarit y los estudios in vivo demuestran que 4-APAA se acetila para formar actarit. Tanto el actarit como el 4-APAA poseen actividad inmunomoduladora.

El documento WO-A-02/18324 describe compuestos que tienen la fórmula (I),



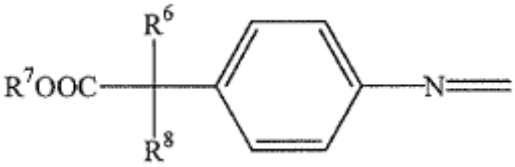
(I)

donde R^1, R^3 y R^4 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1 a C_4, y R^2 es (II),



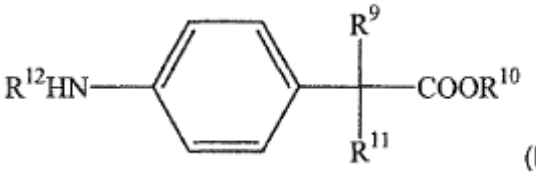
(II)

donde R^5 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1 a C_4, o (III),



(III)

donde R^6, R^7 y R^8 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1 a C_4; o los ésteres o sales farmacológicamente aceptables de los mismos. Los compuestos se pueden utilizar para la profilaxis o el tratamiento de diversas enfermedades, particularmente afecciones inflamatorias del tracto GI. También se describen métodos de tratamiento de afecciones inflamatorias del tracto GI, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, usando compuestos que tienen la fórmula (IV).



(IV)

donde R^9, R^{10} y R^{11} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1 a C_4, y R^{12} se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y -C(O)R^{13}, donde R^{13} es un alquilo C1 a C6 o un grupo arilo.

El polipéptido ciclosporina, que tradicionalmente se ha administrado a pacientes trasplantados para evitar el rechazo de órganos, también se ha usado para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal. El uso de ciclosporina para tratar la IBD puede verse limitado, sin embargo, por los diversos efectos secundarios asociados con este medicamento. Estos efectos secundarios incluyen presión arterial alta, daño renal, temblores, dolores de cabeza, convulsiones, crecimiento excesivo de vello, crecimiento excesivo de encías, confusión, coma y gota.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1 y 2 ilustran realizaciones de rutas de síntesis para compuestos APAZA™ usados en la presente invención.

La figura 3 ilustra la reducción promedio en el colon: peso corporal [% BW] usando realizaciones de la presente invención (4-APAA/DNBS y Mezcla/DNBS) en comparación con los resultados obtenidos por 5-ASA/DNBS y control (Vehículo/DNBS).

La figura 4 ilustra las puntuaciones de adhesión de colitis por DNBS conseguidas usando realizaciones de la presente invención (4-APAA/DNBS y Mezcla/DNBS) en comparación con los resultados obtenidos por 5-ASA/DNBS y control (Vehículo/DNBS y Vehículo/Simulación).

Las figuras 5 A-F muestran cambios histológicos en animales, después de la administración del compuesto APAZA™, tratamientos con sulfasalazina y placebo en animales que reciben sodio sulfato de dextrano (DSS) frente a agua destilada.

Las figuras 6 A-C muestran secciones de colon que muestran los efectos del tratamiento crónico con el dímero de 4-APAA sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A. Se prepararon secciones teñidas con H&E de colon de rata después de que las ratas se trataron durante cinco días con agua potable que contenía vehículo

(DW; A), vehículo seguido en el quinto día con tratamiento agudo con 10 μg de toxina A (B) o 100 mg/kg·día de 4-APAA seguido en el quinto día con tratamiento agudo con 10 μg de toxina A (C). Barra de escala = 100 μm.

Las figuras 7 A-C muestran secciones de colon que muestran los efectos del tratamiento crónico con 4-APAA sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A. Se prepararon secciones teñidas con H&E de colon de rata después de que las ratas se trataron durante cinco días con agua potable que contenía vehículo (DW; A), vehículo (DW) seguido el quinto día con tratamiento agudo con 10 μg de toxina A (B) o 100 mg/kg·día de 4-APAA seguido en el quinto día con tratamiento agudo con 10 μg de toxina A (C). Barra de escala = 100 μm.

Las figuras 8 A-E ilustran los efectos del tratamiento crónico con APAZA™ sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A, según se evalúa mediante tinción con H&E del tejido fijado.

Las figuras 9 A-E ilustran los efectos del tratamiento crónico con sulfasalazina sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A, según se evalúa mediante tinción con H&E del tejido fijado.

Las figuras 10 A-B ilustran los efectos del tratamiento crónico con tres dosis cada una de sulfasalazina y APAZA™ sobre la colitis inducida por la toxina A según se evalúa mediante la acumulación del fluido luminal y el contenido de MPO en el tejido.

Las figuras 11 A-F ilustran los fuertes efectos protectores de APAZA™ administrado en el agua potable durante cinco días sobre la integridad estructural del colon de rata frente a los efectos dañinos de la toxina A a la dosis de 1 mg/kg·día.

Las figuras 12 A-B ilustran los efectos del tratamiento crónico con APAZA™ a estas dosis más bajas sobre la colitis inducida por la toxina A, evaluada por la acumulación del fluido luminal y el contenido de MPO en el tejido.

Las figuras 13 A-C ilustran los efectos del tratamiento crónico con 4-APAA a la dosis de 100 mg/kg·día sobre el daño estructural inducido por toxina del colon según se evalúa mediante tinción con H&E del tejido fijado.

Las figuras 14 A-B ilustran los efectos del tratamiento crónico con 4-APAA sobre la colitis inducida por la toxina A como se evalúa mediante la acumulación del fluido luminal y el contenido de MPO en el tejido.

Las figuras 15 A-D ilustran los efectos del pretratamiento agudo con 4-APAA sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A, según se evalúa mediante tinción con H&E del tejido fijado.

Las figuras 16 A-B ilustran los efectos del pretratamiento agudo con 4-APAA sobre la colitis inducida por la toxina A, según se evalúa por la acumulación del fluido luminal y el contenido de MPO en el tejido.

Las figuras 17 A-D ilustran los efectos de la toxina A sobre la histología del colon y la inhibición de estos efectos mediante el tratamiento con 4-APAA a cuatro dosis. Se prepararon secciones teñidas con H&E de colon de rata después de que las ratas se trataron durante tres horas con toxina A (10 μg) después de un pretratamiento de 30 minutos con 4-APAA. (A) Pretratamiento con 0.01 μg de 4-APAA. (B) Pretratamiento con. 0.1 μg de 4-APAA. (C) Pretratamiento con 1.0 μg de 4-APAA. (D) Pretratamiento con 10 μg de 4-APAA. Barra de escala = 100 μm.

La figura 18 muestra los efectos de cuatro dosis de 4-APAA sobre la acumulación del fluido luminal colónico inducida por la toxina A (10 μg) y la actividad de MPO.

Las figuras 19 A-D muestran los efectos de la toxina A sobre la histología del colon y la inhibición de estos efectos mediante el tratamiento con 5-ASA a cuatro dosis. Se prepararon secciones teñidas con H&E de colon de rata después de que las ratas se trataron durante tres horas con toxina A (10 μg) después de un pretratamiento de 30 minutos con 5-ASA. (A) Pretratamiento con 0.01 μg de 5-ASA. (B) Pretratamiento con 0.1 μg de 5-ASA-(C) Pretratamiento con 1.0 μg de 5-ASA. (D) Pretratamiento con 10 μg de 5-ASA. Barra de escala = 100 μm.

La figura 20 muestra los efectos de cuatro dosis de 5-ASA sobre la acumulación del fluido luminal colónico inducida por la toxina A (10 μg) y la actividad de MPO. La toxina A estimuló significativamente la acumulación del fluido luminal y la actividad de MPO y la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A se inhibió significativamente por el tratamiento con 5-ASA en las tres dosis más altas probadas. La actividad de MPO inducida por la toxina A se inhibió significativamente por el tratamiento con 5-ASA solo a las dosis de 1.0 y 10 μg de 5-ASA, pero no a las dosis de 5-ASA de 0.01 y 0.1 μg. Los valores mostrados son la media ± SEM; N = 3. * P <0.01 frente a la toxina AV5-ASA 0; ** P <0.001 frente a la toxina A⁻/5-ASA 0; # P <0.01 frente a la toxina A+/5-ASA 0; ## P <0.001 frente a la toxina A+/5-ASA 0.

Las figuras 21 A-C muestran los efectos de la toxina A sobre la histología del colon y la inhibición de estos efectos mediante el tratamiento con 4-APAA, 5-ASA y una combinación de 4-APAA y 5-ASA. Se prepararon secciones teñidas con H&E de colon de rata después de que las ratas se trataron durante tres horas con toxina A (10 μg) después de un pretratamiento de 30 minutos con 4-APAA, 5-ASA o ambas. (A) Pretratamiento con 10 ng de 4-APAA. (B) Pretratamiento con 10 ng de 5-ASA. (C) Pretratamiento con 10 ng de 4-APAA más 10 ng de 5-ASA. Barra de escala = 100 μm.

Las figuras 22 A-B muestran los efectos de dosis bajas de 4-APAA, 5-ASA y ambos compuestos sobre la acumulación del fluido luminal colónico inducida por la toxina A (10 μg) y la actividad de MPO. La toxina A estimuló significativamente la acumulación del fluido luminal y la actividad de MPO y esta fue inhibida significativamente por ambos compuestos individualmente y por la combinación de ambos compuestos. Sin embargo, la combinación de ambos compuestos inhibió significativamente más la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A que cualquiera de los compuestos solos. La actividad de MPO inducida por la toxina A se inhibió significativamente solo por la combinación de ambos 4-APAA y 5-ASA. Los valores mostrados son la media ± SEM; N = 3. * P <0.01 frente a la toxina A-/4-APAA-/5-ASA-; ** P <0.001 frente a la toxina A-/4-APAA-/5-ASA-; # P <0.05 frente a la toxina A+; ## P <0.01 frente a la toxina A+; ### P <0.001 frente a la toxina A+; @ P <0.01 frente a la toxina A+/5-ASA+; & P <0.05 frente a la toxina A+/4-APAA+; && P <0.01 frente a la toxina A+/4-APAA+.

Descripción detallada de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier tema que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones se contempla solo a título informativo.

La invención proporciona composiciones que usan los compuestos de 4-APAA en terapias de combinación para trastornos que implican la inflamación del sistema digestivo o tejidos de la mucosa.

Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los significados indicados:

Las formas singulares "un", "uno" y "el" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "compuestos relacionados" incluye análogos, derivados y compuestos que comprenden las características estructurales básicas que son responsables de la actividad terapéutica del compuesto.

El término "sistema digestivo" como se usa en este documento se define ampliamente como los órganos que son responsables de introducir y sacar los alimentos del cuerpo y de usar los alimentos para mantener el cuerpo sano, incluyendo la boca, el esófago, el estómago, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestino delgado, colon y recto.

"Entre" debe interpretarse para incluir los puntos finales. El término "hasta" debe interpretarse para incluir el límite superior.

"Cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición que es suficiente para producir un efecto deseado, que puede ser un efecto terapéutico. La cantidad eficaz variará con la edad, el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el agente biológicamente activo particular administrado, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente, el portador farmacéuticamente aceptable usado y factores similares dentro del conocimiento y experiencia de los expertos en el arte. Según corresponda, una "cantidad eficaz" en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en el arte por referencia a los textos y literatura pertinentes y/o usando experimentación rutinaria. (Véase, por ejemplo, Remington, The Science And Practice of Pharmacy (20th ed. 2000).

"Hidrolizable" se refiere a enlaces que se hidrolizan en condiciones fisiológicas.

"Solubilidad" se refiere a la tendencia de una sustancia a mezclarse uniformemente con otra.

"Estabilidad química" se refiere a la estabilidad de un compuesto dado en entornos fisiológicos. Por ejemplo, la estabilidad química se refiere a la estabilidad del agente biológicamente activo o profármaco en entornos caracterizados por condiciones tales como, pero no limitando a, la presencia de plasma, la presencia de proteasas, la presencia de homogenato de hígado, la presencia de condiciones ácidas y la presencia de condiciones básicas.

Un componente "farmacéuticamente aceptable" tal como una sal, portador, excipiente o diluyente de una composición de acuerdo con la presente invención es un componente que (i) es compatible con los otros ingredientes de la composición porque se puede combinar con los profármacos de la presente invención sin hacer que el profármaco sea inadecuado para su fin previsto, y (ii) es apropiado para su uso con sujetos como se proporciona en este documento sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica). Los efectos secundarios son "indebidos" cuando su riesgo supera el beneficio proporcionado por la composición farmacéutica. Los ejemplos no limitantes de componentes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar tales como soluciones salinas reguladas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua, microemulsiones y diversos tipos de agentes humectantes.

Las "sales farmacéuticamente aceptables" son sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparten efectos toxicológicos indeseados. Ejemplos de tales sales son (a) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; y sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalensulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido poligalacturónico y similares; y (b) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

El término "agente terapéutico", como se usa en este documento para describir un compuesto, está destinado a cubrir diversas formas del compuesto, que incluyen sus ésteres y sales farmacéuticamente aceptables.

"Derivado funcional" se usa para describir un derivado de un compuesto original que tiene la misma o sustancialmente similar actividad farmacológica que el compuesto original.

"Tratar" o "tratamiento" se refiere a cualquier tipo de tratamiento que imparta un efecto modulador, que, por ejemplo, puede ser un efecto beneficioso para un sujeto afectado por un trastorno, enfermedad o dolencia, incluida la mejora en la condición del sujeto (p. ej., en uno o más síntomas), retraso en la progresión de la afección y/o prevención o retraso del inicio del trastorno, cambio en los parámetros clínicos, enfermedad o dolencia, etc.

"Enfermedad inflamatoria del intestino" incluye colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

"Antibiótico no absorbible" significa un compuesto que tiene actividad antibacteriana, que, cuando se administra por vía oral, da como resultado que menos del 2 por ciento del compuesto se excreta en la orina del sujeto.

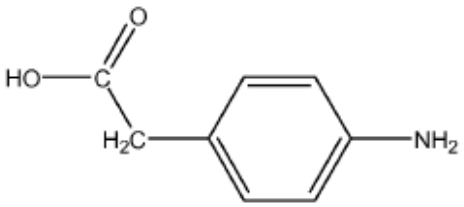
El término "compuestos de 4-APAA" como se usa en este documento se define ampliamente para incluir ácido 4-aminofenilacético y compuestos relacionados y compuestos que reaccionan en condiciones fisiológicas para formar o liberar ácido 4-aminofenilacético y compuestos relacionados, que tienen eficacia en el tratamiento de afecciones inflamatorias del sistema digestivo o tejidos de la mucosa, tales como las afecciones inflamatorias del intestino. La abreviatura "4-aceAPAA" se refiere a 4-APAA acetilado.

El término "compuestos de 5-ASA" como se usa en este documento se define ampliamente para incluir ácido 5-aminosalicílico y compuestos relacionados y compuestos que reaccionan en condiciones fisiológicas para formar o liberar ácido 5-aminosalicílico y compuestos relacionados, que tienen eficacia en el tratamiento de afecciones inflamatorias del sistema digestivo o tejidos de la mucosa, tales como las afecciones inflamatorias del intestino. La abreviatura "5-aceASA" se refiere a 5-ASA acetilado.

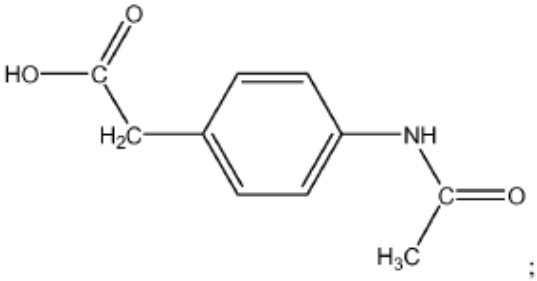
Compuestos de 4-APAA

En una realización, la invención se refiere a compuestos de 4-APAA para uso en el tratamiento de afecciones intestinales. Una clase de compuestos de 4-APAA útiles en la invención incluye compuestos de 4-APAA que no están unidos con azo a una molécula portadora. Los ejemplos de tales compuestos de 4-APAA no unidos con azo incluyen:

ácido (4-aminofenil)-acético:

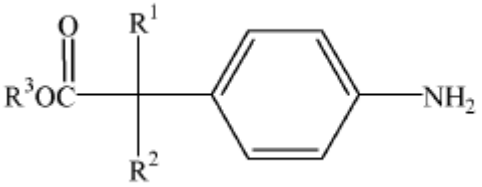


ácido (4-acetilamino-fenil)-acético:



;

derivados del ácido 4-aminofenilacético, tales como:

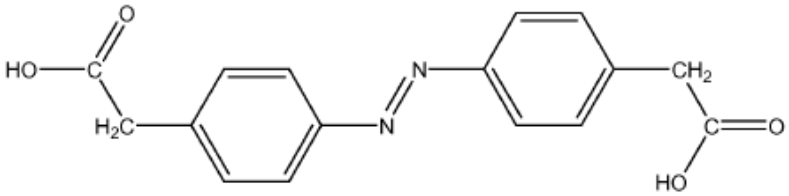


(Fórmula I),

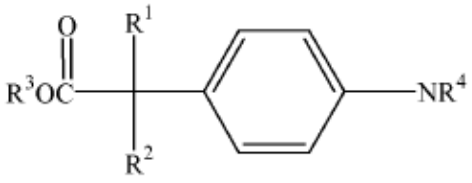
R^1 R^2 y R^3 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1 a C_4.

Otra clase de compuestos de 4-APAA útiles en la invención incluye compuestos de 4-APAA que están unidos con azo a una molécula portadora. Los ejemplos de compuestos de 4-APAA unidos con azo descritos pero no reivindicados en este documento incluyen:

el dímero unido al ácido 4-aminofenilacético azo, ácido [4-(4-carboximetil-fenilazo)-fenil]-acético:

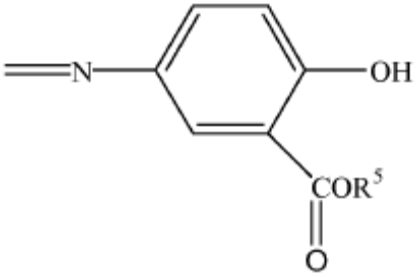


ácido 4-aminofenilacético acoplado a un compuesto de 5-ASA o acoplado a un derivado del ácido 4-aminofenilacético, tal como compuestos unidos por diazo que tienen la siguiente fórmula:

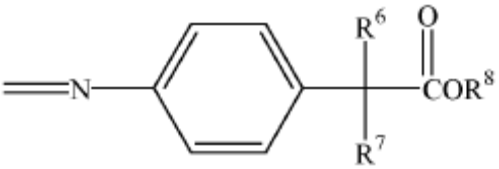


(Fórmula II)

donde R^1, R^2 y R^3 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1 a C_4, y R^4 es:

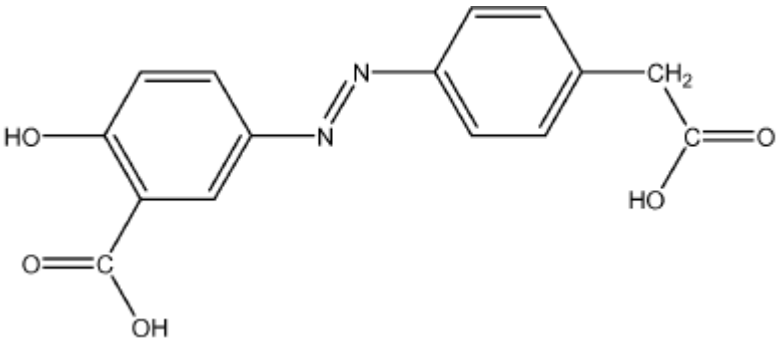


donde R^5 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1 a C_4, o

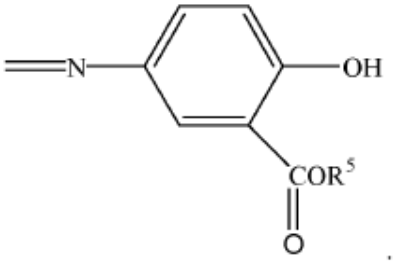


donde R^6, R^7 y R^8 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1 a C_4. Como con todos los agentes terapéuticos descritos en este documento, la divulgación incluye los ésteres o sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula II.

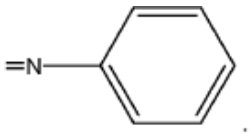
El compuesto de 4-APAA unido con azo de la invención es el compuesto APAZA™ (Nobex Corp., Durham NC), ácido 5-(4-carboximetil-fenilazo)-2-hidroxi-benzoico:



En algunos ejemplos, la divulgación emplea un compuesto de 4-APAA pero excluye el compuesto APAZA™ y/o excluye los compuestos de fórmula II anterior en la que R^4 es



La molécula portadora puede ser activa o inactiva. Las moléculas portadoras generalmente incluyen una unidad estructural de fenilamina de núcleo:



Las moléculas portadoras inactivas preferidas son aquellas que presentan poca o ninguna toxicidad; sin embargo, se apreciará que el grado de toxicidad permitido se debe equilibrar con el beneficio del fármaco. En una realización, las moléculas portadoras se eligen de manera que no se absorban fácilmente en el torrente sanguíneo después de la escisión del enlace azo en el intestino, de modo que una cantidad sustancial de la molécula portadora abandona el cuerpo con las heces. Se apreciará que se puede emplear una amplia gama de estructuras conocidas como moléculas portadoras.

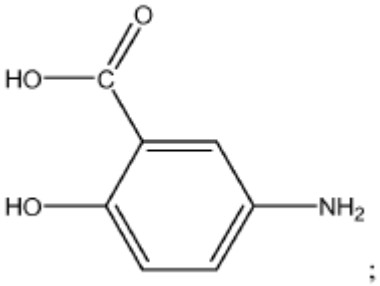
Como se analiza con más detalle a continuación, las composiciones de la invención emplean un compuesto de 4-APAA que está unido con azo a una molécula portadora y un compuesto de 4-APAA que no está unido con azo a una molécula portadora.

Compuestos de 4-APAA y compuestos de 5-ASA

La invención hace uso de terapias de combinación que emplean compuestos de 4-APAA y compuestos de 5-ASA en el tratamiento de trastornos que implican inflamación del sistema digestivo o tejidos de la mucosa, tales como afecciones inflamatorias del intestino. Como se demuestra en los ejemplos expuestos en este documento, esta combinación puede ser sinérgica con relación a cualquiera de los componentes solos. En algunos casos, la combinación de compuestos de 4-APAA con compuestos de 5-ASA puede ser aditiva.

Una clase de compuestos de 5-ASA descritos pero no reivindicados en este documento incluye compuestos de 5-ASA que no están unidos con azo a una molécula portadora. Ejemplos incluyen:

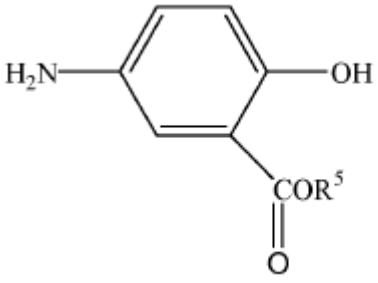
mesalamina (ácido 5-aminosalicílico o ácido 5-amino-2-hidroxi-benzoico):



;

NO-mesalamina (ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico 4-nitroxibutiléster);

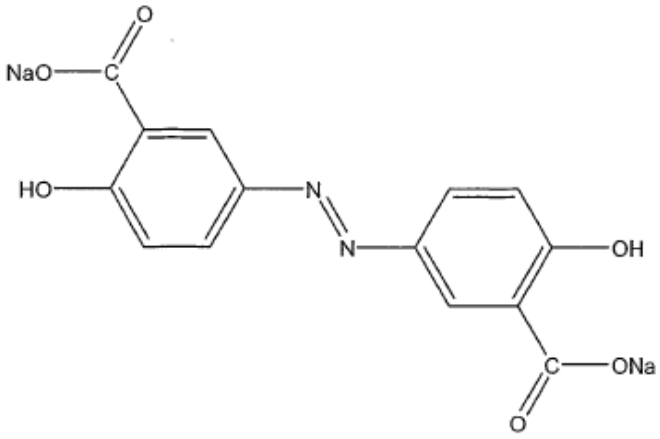
derivados del ácido 5-aminosalicílico, tales como:



(Fórmula III).

Una clase de compuestos de 5-ASA útiles en la invención incluyen compuestos de 5-ASA que están unidos con azo a una molécula portadora. Los ejemplos descritos pero no reivindicados en este documento incluyen:

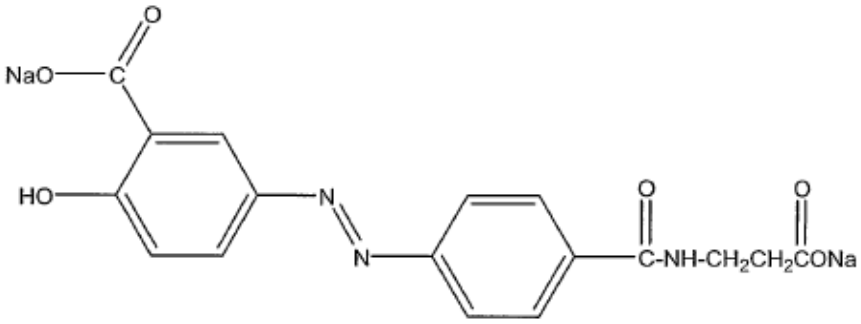
el dímero del ácido 5-aminosalicílico (olsalazina):



;

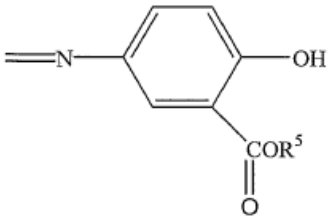
sulfasalazina (5-ASA acoplado químicamente a través de un grupo azo a sulfapiridina);

balsalazida (sal disódica del ácido (E)-5-[[- 4-[[(2-carboxietil) amino] carbonil] fenil]azo]-2-hidroxibenzoicoo):



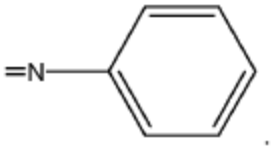
.

Se apreciará que el compuesto APAZA™ descrito anteriormente, y los compuestos de fórmula II descritos anteriormente en los que R^4 es



incluyen componentes de 5-ASA y componentes de 4-APAA y, por lo tanto, se consideran compuestos de 5-ASA, así como compuestos de 4-APAA. Los compuestos que son tanto compuestos de 5-ASA como compuestos de 4-APAA se pueden excluir específicamente de ciertas realizaciones de la invención.

La molécula portadora puede ser activa o inactiva. Las moléculas portadoras generalmente incluyen una unidad estructural de fenilamina de núcleo:



Las moléculas portadoras inactivas preferidas son aquellas que presentan poca o ninguna toxicidad; sin embargo, se apreciará que el grado de toxicidad permitido se debe equilibrar con el beneficio del fármaco. En una realización, las moléculas portadoras se eligen de manera que no se absorban fácilmente en el torrente sanguíneo después de la escisión del enlace azo en el intestino, de modo que una cantidad sustancial de la molécula portadora abandona el cuerpo con las heces. Se apreciará que se puede emplear una amplia gama de estructuras conocidas como moléculas portadoras.

Como se analiza con más detalle a continuación, las composiciones de la invención emplean un compuesto de 5-ASA que está unido con azo a una molécula portadora y un compuesto de 5-ASA que no está unido con azo a una molécula portadora.

Otros agentes terapéuticos

Además de combinaciones de compuestos de 4-APAA con compuestos de 5-ASA descritos anteriormente, algunos aspectos de la invención hacen uso de otros agentes terapéuticos para uso en métodos de tratamiento y/o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos que implican inflamación del sistema digestivo o tejidos de la mucosa. Los ejemplos incluyen antibióticos, esteroides, inmunomoduladores, suavizantes de heces, endurecedores de heces, nutracéuticos, agentes y organismos probióticos, y agentes nicotínicos.

Antibióticos. Las composiciones de la invención pueden incluir antibióticos. Los ejemplos incluyen los antibióticos usados rutinariamente para el tratamiento de afecciones inflamatorias o ulcerosas del intestino. Los ejemplos preferidos incluyen metronidazol (FLAGYL™), ciprofloxacina (CIPRO™) y rifaximina (fabricado por Salix Pharmaceuticals, Inc., Raleigh, NC).

Esteroides. Las composiciones de la invención pueden incluir esteroides, tales como esteroides rutinariamente usados para el tratamiento de afecciones ulcerosas del intestino. Los ejemplos de esteroides apropiados incluyen prednisona, prednisolona, hidrocortisona y budesonida.

Moduladores inmunes y/o supresores. Las composiciones de la invención pueden incluir moduladores inmunes. Los ejemplos incluyen inmunomoduladores rutinariamente usados para el tratamiento de afecciones inflamatorias o ulcerosas del intestino. Los inmunomoduladores preferidos incluyen inmunomoduladores de anticuerpos monoclonales, especialmente moduladores inmunes anti-TNF, tales como infliximab (REMICADE™), enteracep (ENBREL™), anakinra KINERET™), adalimumab (HUMIRA™). Otros moduladores inmunes apropiados incluyen azatioprina, mercaptopurina (por ejemplo, 6-mercaptopurina), 6-tioguanina y metotrexato. Los ejemplos de compuestos inmunosupresores apropiados incluyen ciclosporina y tacrolimus (PROGRAF™).

Agentes y organismos probióticos y nutracéuticos. Las composiciones de la invención pueden incluir diversos agentes y organismos probióticos y nutracéuticos para tratar afecciones intestinales. Los ejemplos incluyen bacterias y/o nutrientes usados para tratar afecciones intestinales descritas en este documento, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enteritis por radiación, pouchitis, enteritis de derivación, diarrea aguda, diarrea del viajero, diarrea asociada a antibióticos, infección por *Helicobacter pylori* y diarrea asociada con la inmunosupresión (por ejemplo, diarrea asociada al SIDA). Los ejemplos de agentes probióticos apropiados incluyen los usados para promover la inducción enzimática de la actividad disacaridasa, los efectos tróficos sobre la mucosa intestinal, el bloqueo de toxinas bacterianas o la inducción de respuesta inmunológica. Los ejemplos de organismos probióticos apropiados incluyen *Lactobacillus, Bifidobacterium* and *Saccharomyces boulardii* (véase, por ejemplo, Penna et al., "Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics," J Pediatr (Rio J). 76(Suppl. 1):S209-17 (2000).

Agentes nicotínicos. Las composiciones de la invención pueden incluir diversos agentes y tratamientos nicotínicos, tales como nicotina, en el tratamiento de afecciones inflamatorias de esta invención (véase, por ejemplo, Guslandi et al.,

"Distal ulcerative colitis refractory to rectal mesalamine: role of transdermal nicotine versus oral mesalamine", Can J Gastroenterol. 16(5):293-6 (2002).

Métodos de tratamiento y composiciones farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas para tratar trastornos que implican inflamación del sistema digestivo o tejidos de la mucosa. Los ejemplos de afecciones adecuadamente tratadas usando las composiciones de la invención incluyen afecciones inflamatorias de la boca tales como mucositis, enfermedades infecciosas (por ejemplo, enfermedades víricas, bacterianas y fúngicas) y enfermedad de Crohn; afecciones inflamatorias del esófago tales como esofagitis, afecciones que resultan de una lesión química (por ejemplo, ingestión de lejía), enfermedad por reflujo gastroesofágico, reflujo de ácidos biliares, esófago de Barrett, enfermedad de Crohn y estenosis esofágica; afecciones inflamatorias del estómago, tales como gastritis (por ejemplo, infección por *Helicobacter pylori*, enfermedad acidóptica y gastritis atrófica), enfermedad ulcerosa péptica, lesiones precancerosas del estómago, dispepsia no ulcerosa y enfermedad de Crohn; afecciones inflamatorias del intestino, tales como enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colon espástico, sobrecrecimiento bacteriano, desequilibrio de levadura, enfermedad de úlcera péptica y fisuras del intestino, diarrea del viajero, pouchitis, enfermedad inflamatoria intestinal ("IBD", por ejemplo, ulcerativa colitis y enfermedad de Crohn), y diversas formas de colitis, tales como colitis por derivación, colitis no específica, colitis ulcerativa, colitis infecciosa (por ejemplo, colitis pseudomembranosa tal como colitis por *Clostridium difficile*, enteritis por salmonela, infecciones por shigella, yersiniosis, criptosporidiosis, infecciones microsporidiales e infecciones virales), colitis inducida por radiación, colitis en el huésped inmunocomprometido (por ejemplo, tiflitis), condiciones precancerosas del colon (por ejemplo, displasia, afecciones inflamatorias del intestino y pólipos de colon), proctitis, inflamación asociada con hemorroides, proctalgia fugax y fisuras rectales; afecciones del hígado, la vesícula biliar y/o las vías bilaterales, tales como hepatitis, colangitis, colangitis esclerosante, cirrosis biliares primarias y colecistitis; y absceso intestinal Las composiciones de la invención también son útiles en el tratamiento del síndrome del intestino irritable.

Métodos de tratamiento

De acuerdo con otras realizaciones de la presente divulgación, los métodos de tratamiento de a un sujeto que necesita tal tratamiento incluyen administrar una cantidad eficaz de una composición de esta invención al sujeto y/o administrar una cantidad eficaz de una composición de esta invención al sistema digestivo y/o los tejidos de la mucosa de un sujeto. La cantidad eficaz variará algo de la composición a la composición, y estará sujeta al sujeto, y dependerá de factores tales como la edad, la especie, el género y/o la condición del sujeto y la ruta y el modo de administración. Tales dosificaciones se pueden determinar de acuerdo con procedimientos farmacológicos de rutina conocidos por los expertos en el arte. En algunos ejemplos, una dosis desde aproximadamente 100 μg a aproximadamente 100 mg/kg tendrá eficacia, con todos los pesos calculados en base al peso de la composición y/o ingrediente activo (por ejemplo, compuesto de 4-APAA). Se puede emplear una dosificación desde aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg para administración oral. Por lo general, se puede emplear una dosificación desde aproximadamente 0.5 mg/kg a 5 mg/kg para inyección intramuscular. La frecuencia de administración puede ser de una, dos o tres veces por día/semana/mes/año o según sea necesario para tratar la afección. La duración del tratamiento depende del tipo de afección que se trate y puede durar tanto como la vida del paciente.

Los sujetos apropiados para ser tratados de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, sujetos de mamíferos y aves, y son preferiblemente mamíferos. Los mamíferos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, caninos, felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, porcinos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos, primates, humanos y similares, y mamíferos en el útero. Cualquier sujeto mamífero que necesite ser tratado de acuerdo con la presente divulgación es apropiado. Se prefieren sujetos humanos. Los sujetos humanos de ambos sexos y en cualquier etapa de desarrollo (esto es, neonato, infante, juvenil, adolescente, adulto) se pueden tratar de acuerdo con la presente divulgación. Las aves ilustrativas de la presente divulgación incluyen pollos, patos, pavos, gansos, codornices, faisán, ratites (por ejemplo, avestruz) y aves domesticadas (por ejemplo, loros y canarios) y aves in ovo.

La presente divulgación se refiere principalmente al tratamiento de sujetos humanos, pero la invención también se puede llevar a cabo en sujetos animales, particularmente mamíferos tales como ratones, ratas, perros, gatos, ganado y caballos con fines veterinarios, y para cribado de fármacos y fines de desarrollo de fármacos.

El método descrito generalmente implica la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de 4-APAA, solo o en combinación con otros compuestos como se describe en este documento, a un sujeto que tiene un trastorno que implica inflamación del sistema digestivo y/o tejidos de la mucosa. En ciertas realizaciones, el trastorno es una afección intestinal, y el compuesto de 4-APAA se administra como un componente de una formulación que libera el compuesto de 4-APAA en el lumen del intestino de una manera que lo pone en contacto con un sitio de enfermedad, tales como tejido inflamado o ulcerado (véase, por ejemplo, Chourasia et al., "Pharmaceutical Approaches to Colon Targeted Drug Delivery Systems," J Pharm Pharmaceut Sci 6(1):33-66 (2003).

El compuesto de 4-APAA se puede administrar como una monoterapia. Alternativamente, el compuesto de 4-APAA se puede administrar como un componente de un régimen de terapia de combinación que emplea al menos un compuesto de 4-APAA y uno o más de otros compuestos. Cuando se usa una terapia de combinación, los diversos compuestos terapéuticos pueden administrarse por separado o juntos como componentes de una única formulación. La siguiente tabla proporciona ejemplos ilustrativos:

No	Compuesto 1	Compuesto 2	Otros compuestos
1	compuesto 4-APAA unido con azo	compuesto de 5-ASA no unido con azo	Opcional
2	compuesto 4-APAA no unido con azo	compuesto de 5-ASA unido con azo	Opcional
3	compuesto 4-APAA unido con azo	compuesto 4-APAA no unido con azo	Opcional
4	compuesto de 5-ASA unido con azo	compuesto de 5-ASA no unido con azo	Opcional
5	compuesto APAZA™	compuesto de 5-ASA no unido con azo	Opcional
6	compuesto APAZA™	compuesto 4-APAA no unido con azo	Opcional
7	compuesto APAZA™	compuesto de 5-ASA no unido con azo	compuesto 4-APAA no unido con azo
8	compuesto 4-APAA no unido con azo	compuesto de 5-ASA unido con azo	Esteroide local (por ejemplo, budesonida)
9	compuesto 4-APAA no unido con azo	compuesto de 5-ASA unido con azo	Antibiótico

Dependiendo de la afección específica o estado de enfermedad que se va a tratar, se administran a los sujetos compuestos de la presente invención en cualquier dosificación terapéuticamente eficaz y segura apropiada, como puede determinarse fácilmente dentro de la experiencia en la técnica y sin excesiva experimentación a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, el compuesto de 4-APAA se administra adecuadamente en una cantidad que varía desde aproximadamente 0.001 mg/kg·día a aproximadamente 500 mg/kg·día, desde aproximadamente 0.01 mg/kg·día a aproximadamente 100 mg/kg·día, desde aproximadamente 0.1 mg/kg·día a aproximadamente 10 mg/kg·día, o aproximadamente 1 mg/kg·día.

Los compuestos de 4-APAA, compuestos de 5-ASA y otros compuestos usados en las composiciones de la invención se pueden administrar o suministrar per se así como en forma de ésteres, sales y otros derivados fisiológicamente funcionales farmacéuticamente aceptables de los mismos y/o en un portador farmacéuticamente aceptable.

Formulaciones

La invención proporciona composiciones de formulación farmacéutica para uso en los métodos de la divulgación. Las formulaciones farmacéuticas se seleccionan para facilitar la administración de un compuesto de 4-APAA a un sujeto. El compuesto de 4-APAA se puede administrar solo o con uno o más compuestos terapéuticos adicionales, tales como un segundo compuesto de 4-APAA, un compuesto de 5-ASA y/o cualquier compuesto como se describe en este documento.

En la fabricación de una composición farmacéutica según las realizaciones de la presente invención, el (los) agente (s) terapéutico (s) se mezclan por lo general con, entre otros, un portador farmacéuticamente aceptable. El portador debe, por supuesto, ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente en la composición farmacéutica y no debe ser perjudicial para el sujeto. El portador puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y se formula preferiblemente con el (los) agente (s) terapéutico (s) como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido, que puede contener desde aproximadamente 0.01 o 0.5% a aproximadamente 95% o 99% en peso del (de

los) agente (s) terapéutico (s). Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante cualquiera de las técnicas de farmacia bien conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, mezclar los componentes, que incluyen opcionalmente uno o más ingredientes accesorios. El (los) agente (s) terapéutico (s) se proporcionan en una cantidad eficaz para lograr el efecto farmacológico deseado, como se describió anteriormente, y en una cantidad apropiada para alcanzar la dosis diaria deseada.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención están diseñadas para administrar el (los) agente (s) terapéutico (s) al sitio de la enfermedad. Por ejemplo, cuando la afección es la enfermedad de Crohn, se puede formular una composición oral para administrar el (los) agente (s) terapéutico (s) al tejido ulcerado o inflamado en el intestino grueso y/o el colon, liberando el (los) agente (s) terapéutico (s) a lo largo del intestino delgado y el colon, y/o a lo largo de la porción distal del intestino delgado y en el colon. De manera similar, cuando la enfermedad es una colitis ulcerosa, se puede formular una composición oral para liberar el (los) agente (s) terapéutico (s) a lo largo de la porción distal del intestino delgado y en el colon, o a lo largo del colon. Además, cuando el sitio de la enfermedad está en el colon (por ejemplo, colitis ulcerosa), el (los) agente (s) terapéutico (s) se pueden formular como un supositorio o un enema.

Otras formulaciones apropiadas incluyen, por ejemplo, composiciones orales tales como lavados bucales para el tratamiento de afecciones inflamatorias de la cavidad oral o garganta; composiciones vaginales para el tratamiento de afecciones inflamatorias de la cavidad o abertura vaginal; formulaciones intrauterinas para afecciones inflamatorias del útero; formulaciones oculares, tales como gotas para los ojos o pomadas para el tratamiento de afecciones inflamatorias del ojo o la conjuntiva; así como formulaciones tópicas para la aplicación dérmica para tratar afecciones inflamatorias de la piel.

Las formulaciones de la presente invención apropiadas para administración oral se pueden presentar como unidades de dosificación discretas tales como cápsulas, sellos, comprimidos o comprimidos para deshacer en la boca, conteniendo cada una cantidad predeterminada de un compuesto de 4-APAA, opcionalmente con un compuesto de 5-ASA, un segundo compuesto de 4-APAA y/u otro compuesto terapéutico. El componente de agente terapéutico de la formulación puede, por ejemplo, tomar la forma de un polvo o gránulos. Los gránulos se pueden recubrir ellos mismos, por ejemplo, recubiertos entéricamente. Las formulaciones también se pueden proporcionar de manera apropiada como suspensiones, por ejemplo, en un licor acuoso o un líquido no acuoso, tal como un jarabe, un elixir, una emulsión o una poción.

Las formulaciones orales para el tratamiento de condiciones intestinales son preferiblemente formas de dosificación sólidas y pueden incluir cualquiera de una amplia variedad de componentes conocidos para ayudar a los agentes terapéuticos a pasar a través del estómago y liberarse en el intestino, tales como en el intestino delgado proximal, intestino delgado distal, y/o en el colon. Además, las composiciones se pueden preparar para liberar un primer agente en el estómago y uno o más agentes adicionales en el intestino delgado o colon. Ejemplos de tales estrategias se describen en la siguiente tabla:

No.	Estómago	Intestino delgado	Intestino delgado distal	Colon
1	compuesto de 5-ASA	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
2	compuesto de 5-ASA	compuesto de 5-ASA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
3	compuesto de 5-ASA	Ninguno	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
4	compuesto de 5-ASA	compuesto de 5-ASA	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
5	compuesto de 4-APAA	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
6	compuesto de 4-APAA	compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y 4-APAA Compuesto
7	compuesto de 4-APAA	Ninguno	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA

8	compuesto de 4-APAA	compuesto de 4-APAA	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
9	Ninguno	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
10	Ninguno	compuesto de 5-ASA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
11	Ninguno	Ninguno	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
12	Ninguno	compuesto de 5-ASA	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
13	Ninguno	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
14	Ninguno	compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
15	Ninguno	Ninguno	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA
15	Ninguno	compuesto de 4-APAA	Ninguno	compuesto de 5-ASA y compuesto de 4-APAA

Los componentes preferidos para composiciones para administración oral para la administración del agente terapéutico a un sitio de enfermedad en el intestino delgado o colon incluyen los siguientes: uno o una combinación de componentes seleccionados del grupo que consiste en: recubrimientos unidos con AZO, recubrimientos entéricos, recubrimientos sensibles al pH, recubrimientos que se disuelven en un intervalo de pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7, polímeros metacrílicos, recubrimientos de liberación prolongada, microcápsulas, recubrimientos biodegradables y recubrimientos sensibles a la reducción.

Métodos de síntesis

Los agentes terapéuticos de la presente invención están disponibles comercialmente o se pueden preparar según los métodos de la divulgación usando materiales de partida y reactivos conocidos. Por ejemplo, las rutas de síntesis ilustradas en las figuras 1 y 2 son útiles para preparar el agente terapéutico APAZA™ y compuestos relacionados. Las variaciones en los métodos de síntesis generales descritos serán fácilmente evidentes para los expertos en el arte.

Ahora se describirán aspectos particulares de la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos. Debe apreciarse que estos ejemplos tienen el propósito de ilustrar aspectos de la presente invención, y no limitan el alcance de la invención.

Ejemplos

Síntesis de compuestos de la presente invención

Se tomaron puntos de fusión en un aparato de punto de fusión capilar Mel-Temp II de Laboratory Devices y no se corrigieron. Los espectros ^{1}HRMN se obtuvieron en un espectrómetro Varian Unity 600 MHz. Los cambios químicos (δ) se informan como partes por millón (ppm) en relación con el estándar interno tetrametilsilano. Los espectros ultravioleta y visible se obtuvieron con un espectrofotómetro Beckman DU 640i. La espectroscopía infrarroja se obtuvo en un Nicolet Impact 410 y los datos de espectroscopía de masas por bombardeo rápido de átomos (FAB) se obtuvieron por M-Scan Inc. Todos los reactivos se usaron tal como se recibió de Aldrich Chemical Co.

Síntesis del ácido 5- [4-(1-carboxi-etil)-fenilazo] -2-hidroxi-benzoico

Ácido 2-(4-amino-fenil)-propiónico. Un matraz de tres bocas, secado al horno, de 500 mL, equipado con una barra de agitación, se cargó con ácido (R, S) 2-(4-nitrofenil) propiónico (5.00 g, 25.6 mmol), alcohol etílico absoluto (200 mL) y paladio (10% en peso sobre carbono activado, 0.27 g, 2.56 mmol). Se introdujo un entorno de hidrógeno en el matraz y

la mezcla se agitó luego a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción en bruto se filtró a través de Celite y el alcohol etílico se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se secó a vacío durante la noche dando como resultado un sólido de color amarillo claro (70% de rendimiento, 2.98 g): mp 125-129 °C, ^{1}H RMN (DMSO-d_6): d 1.24 (3H, s), 1.26 (3H, s), 3.41 (1H, s), 3.43 (2H, s), 6.46 (2H, d, *J*= 7.6 Hz), 6.91 (2H, d, *J*= 7.6 Hz); IR (KBr) 2596, 2189, 1630, 1581, 1441, 1375, 1277, 1192, 1052, 876 cm^{-1}; FAB-MS (NBA) *m*/*z* 165 $(M+H)^+$.

Ácido 5-[4-(1-carboxi-etil)-fenilazo]-2-hidroxi-benzoico. Como se preparó en el procedimiento anterior, el ácido 2-(4-aminofenil)-propiónico (3.90 g, 23.6 mmol) disuelto en una solución acuosa de HCl (75 mL, 36.5- 38.0% de HCl en 8 mL de H_2O) se colocó en un vaso de precipitados de 200 mL y enfriado a 0 °C en un baño de hielo. Cuando la solución se estabilizó a 0 °C, se añadió gota a gota nitrito de sodio (1.79 g, 26.0 mmol) en agua (2 mL). La temperatura se mantuvo a 0-5 °C y la solución de sal de diazonio resultante se agitó durante 15 min.

Mientras se agitaba la solución de sal de diazonio, se cargó un vaso de precipitados de 800 mL equipado con una barra de agitación, termómetro y sonda de pH (modelo 420A de Orión con sonda de pH semimicro Orion) con sal sódica de ácido salicílico (11.3 g, 20.8 mmol) disuelta en hidróxido de sodio (4.25 g, 106 mmol) y H_2O (100 mL). Usando un baño de hielo, la solución de ácido salicílico se enfrió a 17 °C y la solución de sal de diazonio se añadió lentamente en porciones de 10 mL. Durante toda la adición, el pH se mantuvo a 13.2-13.3 con la adición de hidróxido de sodio acuoso, y la temperatura se mantuvo entre 17-18 ºC con la adición de hielo. Una vez completada la adición, la solución roja oscura resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se continuó la agitación durante 90 minutos. Tras la acidificación a pH 3.5 con HCl concentrado (~20 mL, 36.5-38%), se precipitó un sólido de color rojo oscuro y se recogió por filtración al vacío.

El producto en bruto (8.49 g, 27.0 mmol) se suspendió en H_2O (300 mL) y se calentó a 70 ºC, durante 30 minutos. para eliminar el exceso de ácido salicílico. La suspensión se enfrió a 50 °C y se recogió un sólido mediante filtración por succión. El sólido recogido se purificó después por cromatografía instantánea (SiO_2: acetato de etilo/hexanos, 1:1). Se cargó el producto en bruto (2.50 g, 7.95 mmol) en DMF (~ 4.5 mL) y se recogieron fracciones de color amarillo, se combinaron y se concentraron a presión reducida. Después de secar al vacío, el producto purificado se obtuvo como un sólido de color naranja con un rendimiento del 55% (1.38 g): mp 147 ºC, ^{1}H RMN (DMSO-d_6): d 1.38 (3H, s), 1.39 (3H, s), 3.76 (1H, s), 3.78 (1H, s), 7.11 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.46 (2H, d, *J*=7.8 Hz), 7.80 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 8.03 (1H, d, *J*=9.0 Hz), 8.30 (1H, s); IR (KBr) 2973, 1921, 1708, 1652, 1577, 1477, 1339, 1289, 1226, 1164, 1101, 1013, 857, 663 cm^{-1}; UV-Vis (MeOH) ?$_{max}$ = 355 nm, e = 23,700 mol^{-1}cm^{-1}L; FAB-MS (NBA) *m*/*z* 313 $(M)^-$.

Síntesis del ácido 5-(4-carboximetil-fenilazo)-2-hidroxi-benzoico [agente terapéutico APAZA™].

Se colocó ácido 4-aminofenilacético (10.0 g, 66.2 mmol) disuelto en una solución acuosa de HCl (20 mL, 36.5-38.0% de HCl en 200 mL de H_2O) en un vaso de precipitados de 500 mL y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Cuando la solución se estabilizó a 0 ºC, se añadió nitrito de sodio (5.02 g, 72.8 mmol) en agua (50 mL) lentamente en porciones de 5 mL. La temperatura se mantuvo a 0-5 °C y la solución de sal de diazonio resultante se agitó durante 15 minutos.

Mientras se agitaba la solución de sal de diazonio, se cargó un vaso de precipitados de 2 L con una barra de agitación, termómetro y sonda de pH (modelo 420A de Orión con sonda de pH semimicro Orion) con sal sódica de ácido salicílico (31.8 g, 198 mmol) en hidróxido de sodio (11.9 g, 230 mmol) y agua (200 mL). Usando un baño de hielo, la solución de ácido salicílico se enfrió a 17 °C y la solución de sal de diazonio se añadió lentamente en porciones de 25 mL. Durante la adición, el pH se mantuvo en 13.2-13.3 con la adición de hidróxido de sodio acuoso, y la temperatura se mantuvo entre 17-18 ºC con la adición de hielo. Después de que se completara la adición, la solución de color rojo oscuro resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se continuó la agitación durante 30 minutos adicionales. Tras la acidificación a pH 3 con HCl concentrado (~50 mL, 36.5-38%), precipitó un sólido de color marrón y se recogió mediante filtración por succión.

El producto en bruto se purificó por cromatografía instantánea (SiO_2: acetato de etilo/hexanos, 1:1). En una columna rellena con malla 70-230, gel de sílice de 60Å con área de superficie BET de ~ 500 m2/g y volumen de poro de 0.75 cm^3/g, el producto en bruto (11.5 g, 38.2 mmol) en DMF (~12 mL) fue cargado. Las fracciones fueron recolectadas y combinadas en base al color. La primera banda era de color amarillo y contenía exceso de ácido salicílico, así como trazas del producto deseado. La segunda banda era de color naranja y contenía el producto deseado, y la tercera banda era de color rojo y contenía impurezas desconocidas. Todas las fracciones se combinaron y se concentraron a presión reducida y se secaron al vacío.

El producto purificado se obtuvo como un sólido de color naranja con un rendimiento del 28% (2.75 g): mp 204 °C; (2.75g): mp 204°C; ^{1}H RMN (DMSO-d_6) d 3.67 (2H, s), 7.11 (1H, d, *J*= 9.0 Hz), 7.44 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.79 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 8.02 (1H, d of d, *J*= 2.4 Hz, 9.0 Hz), 8.29 (1H, s); IR (KBr) 3098,1696, 1614, 1458, 1345, 1195, 838 cm-1; UV-Vis (MeOH) ?$_{max}$ = 350 nm, e = 25,700 mol^{-1} cm^{-1} L; FAB-MS (NBA) positiva *m*/*z* 301 $(M+H)^+$, FAB-MS(NBA) negativa *m*/*z* 299 (M)-.

Síntesis del ácido 4-(4-carboximetil-fenilazo)-fenilacético

Se suspendió el ácido 4-aminofenilacético (3.75 g, 24.8 mmol) en agua (75 mL) y se añadió ácido clorhídrico concentrado (8 mL). La solución se enfrió a 0 ºC en un baño de hielo con agitación rápida. Se añadió nitrito de sodio (1.80 g, 26.1 mmol) en agua (20 mL) gota a gota a la solución de ácido 4-aminofenilacético con agitación rápida. Se tuvo cuidado de mantener la temperatura entre 0-5 °C en todo momento, especialmente durante la adición de $NaNO_2$. La reacción se agitó durante 20 min adicionales. Mientras tanto, se disolvió ácido fenilacético (10.1 g, 74.4 mmol) en una solución acuosa de NaOH (4.50 g, 113 mmol de NaOH en 100 mL de H_2O). La solución se agitó vigorosamente a 17 °C y a pH 13.3. La solución de sal de diazonio se añadió gota a gota a la solución de ácido fenilacético. Es de suma importancia mantener la temperatura de la solución de ácido fenilacético entre 17-18 °C y el pH entre 13.2-13.3 en todo momento, especialmente durante la adición de sal de diazonio. La temperatura se reguló mediante la adición de hielo y el pH se reguló mediante la adición de NaOH 8 M. Después de que se completara la adición, la solución se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos adicionales. La mezcla de reacción se filtró por succión para eliminar cualquier partícula no disuelta o productos secundarios no deseados. El filtrado se acidificó con HCl acuoso (10 mL de HCl concentrado en 20 mL de H_2O), que produjo un precipitado de color rojo oscuro. El precipitado se recogió mediante filtración por succión y se lavó varias veces con H_2O fría, hasta que el filtrado fue transparente. El sólido recogido se secó al aire durante la noche para dar el compuesto deseado en forma de un sólido de color rojo con un rendimiento del 37%: IR (KBr) 3030 (br), 1696,1658, 1452, 1414, 1201, 850, 675 cm^{-1} FABMS *m*/*z* 299 $(M + H)^+$, 320 (M + Na); ^1H RMN (DMSO-d_6) d 3.47 (s, 4H), 7.33 (4H, d, *J*= 8.1 Hz), 7.84 (4H, d, *J*= 8.4 Hz).

Metabolismo de APAZA™ después de la administración oral

La degradación del agente terapéutico APAZA™ (ácido 5-(4-carboximetil-fenilazo)-2-hidroxi-benzoico) y sulfasalazina (usada como control) y la generación de sus metabolitos cuando estos compuestos se dosificaron por vía oral a las ratas se les midió para poder confirmar que tanto el agente terapéutico APAZA™ como la sulfasalazina experimentan reducción azo bacteriana y producen sus metabolitos ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y sulfapiridina para sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y ácido 4-aminofenil acético (4-APAA) para el agente terapéutico APAZA™.

Este experimento se realizó para confirmar que un compuesto azo, el agente terapéutico APAZA™, se somete a un proceso de reducción bacteriana y produce sus metabolitos en el metabolismo in vivo. La cuantificación de sus metabolitos también se llevó a cabo. La sulfasalazina, que no forma parte de la presente invención, se usó como control ya que se produce una escisión del enlace azo similar por parte de las bacterias con ella, lo que da como resultado el ácido 5-aminosalicílico y la sulfapiridina como sus metabolitos. Tanto el agente terapéutico APAZA™ como la sulfasalazina se degradaron y sus metabolitos se produjeron como se esperaba.

Para la orina, los compuestos parentales y sus metabolitos se detectaron solo con la recolección del día 1. El resto de las recolecciones no mostraron ningún compuesto. Para las heces, los compuestos fueron detectables hasta la recolección del día 2.

Las ratas que se dosificaron con el agente terapéutico APAZA™ (rata 1, 2 y 3) mostraron el agente terapéutico APAZA™, 4-APAA, actarit y 5-ASA acetilado en orina. Las ratas con dosis de sulfasalazina (rata 4, 5 y 6) mostraron sulfasalazina, sulfapiridina y 5-ASA acetilado en la orina. Solo se detectó 5-ASA acetilado en las heces, independientemente de los compuestos administrados. El 5-ASA se convirtió rápidamente en 5-ASA acetilado.

Es interesante observar que mientras que las ratas dosificadas con sulfasalazina producían sus metabolitos, 5-ASA (5-ASA acetilado en este caso) y sulfapiridina, en proporción 1:1, las ratas con la dosificación del agente terapéutico APAZA™ produjeron de 7 a 10 veces más de 4-APAA que 5-ASA acetilado.

Se cree que la mayoría de la sulfasalazina ingerida viaja por el intestino delgado hacia el colon y experimenta una reducción azo bacteriana para liberar sulfapiridina y compuestos de 5-ASA. Los resultados de este estudio confirman esta creencia y muestran que el agente terapéutico APAZA™ se somete a una reducción azo bacteriana similar.

Se usaron un total de 8 ratas para el experimento y se usó metilcelulosa como un vehículo. La cantidad de dosificación fue de 100 mg/kg por rata. Se dosificaron tres ratas con el agente terapéutico APAZA™ y se dosificaron las otras tres ratas con sulfasalazina. Se usaron dos ratas como control y se dosificaron con metilcelulosa. Tanto la orina como las heces se recogieron durante 4 días y se analizaron por HPLC.

Se recogió orina todos los días y se centrifugaron 300 μL de alícuota de cada muestra durante 10 minutos a 5000 g. Se inyectaron 80 μL de sobrenadante para su análisis. Las heces también se recogieron cada día y se homogeneizaron con una mezcla 1:1 de agua y acetonitrilo. Esta mezcla se centrifugó luego durante 20 minutos a 5000 g. Se inyectaron 80 μL de sobrenadante para su análisis.

Se usó un HPLC Waters 2690 para el análisis de muestras de la siguiente manera:

Programación de fase móvil: Gradiente

Fase móvil: A = agua + 0.1% de TFA; B = Acetonitrilo + 0.1% de TFA

Velocidad de flujo: 1 mL/min.

Columna: Phenomenex Max RP, 80 Å, 4.6 mm x 250 mm

Configuración de PDA: Espectro recogido: 210-400nm; cromatograma extraído: 280 y/u otro

Tiempo de análisis/muestra: Aproximadamente 50 min.

Tiempo	Velocidad de flujo (mL/minuto)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
-	1	100	0
40	1	50	50
43	1	5	95
44	1	95	5
50	1	95	5

El 5-ASA se convirtió rápidamente en 5-ASA acetilado (5-aceASA). Se generó la misma cantidad de 5-ASA acetilado tanto del agente terapéutico APAZA™ como de la sulfasalazina en la orina. El 5-ASA acetilado y la sulfapiridina se produjeron en una proporción 1:1 a partir de orina de rata dosificada con sulfasalazina. Se produjo aproximadamente de 7 a 10 veces más de 4-APAA que 5-ASA acetilado de la orina de rata dosificada con el agente terapéutico APAZA™. Solo se detectó 5-ASA acetilado de las heces independientemente del compuesto dosificado. Se detectó más 5-ASA acetilado en las heces que en la orina.

Día 1		el agente terapéutico APAZA™ dosificado				
		Dosis total(mg)	el agente terapéutico APAZA™ (mg)	4APAA (mg)	Actarit (mg)	5ASA acetilado (mg)
Orina	Rata 1	22.0	0.48	3.456	0.0717	0.299
	Rata 2	23.5	0.3546	3.177		0.422
	Rata 3	22.5	0.4707	4.674		0.298
		Sulfasalazina dosificada				
		Dosis total(mg)	Sulfasalazina (mg)		Sulfapiridina (mg)	5ASA acetilado (mg)
	Rata 4	21	0.00882		0.337	0.288
	Rata 5	22.5	0.01279		0.305	0.328
	Rata 6	21	0.01092		0.41	0.39

		el agente terapéutico APAZA™ dosificado	
Heces		Dosis total(mg)	5ASA acetilado (mg)
	Rata 1	22	1.9254
	Rata 2	23.5	1.9519
	Rata 3	22.5	1.2437
		Sulfasalazina dosificada	
		Dosis total(mg)	5ASA acetilado (mg)
	Rata 4	21	1.2158
	Rata 5	22.5	1.3708
	Rata 6	21	0.9033

Día 2		el agente terapéutico APAZA™ dosificado	
Heces		Dosis total(mg)	5ASA acetilado (mg)
	Rata 1	22	0.2562
	Rata 2	23.5	0.7755
	Rata 3	22.5	0.1827
		Sulfasalazina dosificada	
		Dosis total(mg)	5ASA acetilado (mg)
	Rata 4	21	0.2
	Rata 5	22.5	0.2584
	Rata 6	21	0.1458

Efectos biológicos de los compuestos de la presente invención

El objetivo de este estudio fue evaluar histológicamente y comparar los efectos de tres agentes terapéuticos diferentes administrados por vía intrarrectal (dos veces al día durante cuatro días) a ratas macho Lewis después de la administración intrarrectal de ácido dinitrobenceno sulfónico (DNBS). DNBS indujo colitis en ratas según un modelo experimental establecido (véase, por ejemplo, Bertran et al., "Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis", Gut. 38(6):899-904 (1996), y Blau et al., "Relation between colonic inflammation severity and total low-molecular-weight antioxidant profiles in experimental colitis", Dig Dis Sci. 45(6): 1180-1187 (2000), cuyas divulgaciones completas se incorporan en este documento como referencia). Los grupos Simulado y DNBS sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente. La distribución de los animales a cada grupo se presenta en la tabla 1:

GRUPO	NÚMERO DE ANIMALES
Simulado	6
DNBS	5

5-ASA	6
4-APAA	6
Mezcla de 5-ASA y 4-APAA	4

Se analizaron especímenes recortados de colon de 27 ratas macho, que incluyen micrótomo y tinción con hematoxilina y eosina. Los 27 portaobjetos resultantes (1 sección transversal por portaobjetos) se examinaron por microscopio. Excepto por una rata del grupo Simulado y una rata del grupo DNBS, todas las diapositivas tenían sus etiquetas pegadas para facilitar la lectura a ciegas. Las lesiones se clasificaron en una escala de 1-5 (1 = mínimo, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = moderadamente grave, 5 = grave).

El cambio histomorfológico principal observado en las secciones de colon de todas las ratas tratadas con DNBS (independientemente de cualquier tratamiento adicional) fue de necrosis de tipo coagulante de longitud total a espesor completo. No se observó necrosis en las ratas tratadas con solución salina/metilcelulosa (grupo Simulado). En todos los casos, las áreas necróticas se caracterizaron por una pérdida dramática de detalles celulares y afinidad de tinción; en tales áreas, solo se conservaron los contornos "fantasmas" de la arquitectura del colon. Ocasionalmente, el colapso segmentario o "deserción" de una capa de tejido intestinal era evidente. Los tejidos necróticos fueron fuertemente invadidos por tipos mixtos de bacterias. En las secciones que no estaban completamente necróticas, el patrón de necrosis tendía a ser laminar, afectando por lo general a la mucosa y la submucosa a la vez que conservaba partes de la muscularis externa y/o adventitia (serosa y mesenterio adyacente). En estas secciones, una zona densa de neutrófilos cariorrécticos dividió las capas internas necróticas de las capas externas menos afectadas. Se observó vasculitis necrotizante fibrinoide de los vasos sanguíneos submucosos en todas las ratas tratadas con DNBS. Se observó vasculitis tanto en regiones necróticas como no necróticas, a menudo acompañadas de trombosis (trombos fibrinosos, fibrinocelulares y/o bacterianos) y hemorragia submucosa de mínima a moderada (con o sin acumulación de fibrina). Algunos sitios hemorrágicos contenían macrófagos cargados de pigmento (siderófagos, no diagnosticados por separado). En todas las secciones de ratas tratadas con DNBS, la serosa y el mesenterio adyacente se expandieron mediante proliferación fibrovascular leve a moderadamente grave (tejido de granulación precoz). Las secciones de dos ratas (#4 y #11, mezcla de grupo 5-ASA y 4-APAA), cada una contenía un segmento único, corto y claramente demarcado de mucosa no necrótica y no ulcerada. Los cambios dentro de estos segmentos de la mucosa comparativamente no afectados se limitaron a hiperplasia epitelial de la cripta de mínima a leve, mínima dilatación de la cripta e infiltración neutrofílica mínima.

La puntuación de gravedad de la necrosis colónica se basó en el grado de afectación tisular; sin embargo, el grado 5 (grave) se reservó para lesiones en las que la necrosis daba como resultado una pérdida extensa de tejido. Debido a que el patrón de necrosis a menudo variaba de una sección a otra, las capas intestinales individuales se puntuaron por separado. En general, las puntuaciones promedio de gravedad para la necrosis fueron comparables entre los cuatro grupos de ratas tratadas con DNBS, que se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Simulado	DNBS	5-ASA	4-APAA	Mezcla 5-ASA & 4-APAA
No. de animales	(6)	(5)	(6)	(6)	(4)
Mucosa	0.00	4.20	4.50	4.33	3.50
Submucosa	0.00	4.20	4.17	4.00	4.25
Muscularis	0.00	3.60	3.5	3.17	3.00
Adventitia	0.00	1.40	1.67	1.67	1.50

El puntaje promedio para la necrosis de la mucosa en el grupo de mezcla de 5-ASA y 4-APAA fue menor que las puntuaciones en los otros grupos de ratas tratadas con DNBS debido a las áreas de mucosa no afectadas en dos animales de la mezcla de grupo 5 ASA y 4-APAA.

El cambio histomorfológico principal observado en las secciones de colon de todas las ratas tratadas con DNBS (independientemente de cualquier tratamiento adicional) fue de necrosis de tipo coagulante de longitud completa a espesor parcial a completo. Los cambios asociados incluyeron invasión bacteriana masiva del tejido necrótico, vasculitis fibrinoide necrosante con trombosis y hemorragia e infiltración pesada de neutrófilos. No se observó necrosis en las

ratas tratadas con solución salina/metilcelulosa (grupo Simulado). La gravedad (extensión) de la necrosis fue comparable entre los cuatro grupos de ratas tratadas con DNBS (DNBS, 5-ASA, 4-APAA y mezcla de 5-ASA y 4-APAA), excepto que segmentos individuales de la mucosa no se afectaron comparativamente en 2/4 ratas del grupo mezcla de 5-ASA y 4-APAA.

Actividad antiinflamatoria de la mezcla de fármacos

Se indujo colitis con ácido dinitrobenceno sulfónico (DNBS) (sin anestesia con éter) en 4 grupos de 6 ratas Lewis cada uno. Un grupo de DNBS se dosificó con vehículo (0.7% de metilcelulosa) así como un grupo simulado adicional de 6 animales que recibieron un enema de solución salina en lugar de DNBS. La dosificación intrarrectal (ir) se realizó en animales conscientes b.i.d. por 4 días. Los tratamientos farmacológicos fueron los siguientes:

Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA): 50 mg/kg

Ácido 4-aminofenilacético (4-APAA): 49.5 mg/kg (equimolar a 5-ASA)

Mezcla: 5-ASA+ 4-APAA: 50 mg/kg + 49.5 mg/kg

Los fármacos se suspendieron en el vehículo mencionado anteriormente y el personal cegó a los grupos de fármacos. Se registraron los pesos diarios y las puntuaciones de diarrea. En el 5º día se sacrificaron las ratas postirritantes, se realizaron laparotomías y se puntuaron para adherencias y estenosis intestinales; se registraron los pesos colectómicos y del colon, los dos puntos se abrieron longitudinalmente y las inflamaciones/ulceraciones se puntuaron.

Los resultados ilustrados en las figuras 3 y 4 indicaron que 5-ASA, 4-APAA y la mezcla producen una actividad antiinflamatoria similar (~31% de reducción en el colon: peso corporal [% BW]). La gravedad de la inflamación se acercó al máximo. Es posible que la gravedad se pueda ajustar mediante la reducción de la dosis de DNBS y se realizó un pequeño estudio para probar esta hipótesis. Es posible que con un insulto más leve haya evidencia de una mayor separación de los efectos del tratamiento.

Se indujo colitis por DNBS en 6 ratas Lewis (3 a 30 mg por rata y 3 a 15 mg por DNBS en rata) y se dejó desarrollar durante 5 días sin tratamiento para determinar la gravedad de la inflamación. Se observó diarrea los días 1-4 y las ratas se sacrificaron el día 5, se puntuaron y se determinó el peso corporal del colon. Los resultados indican que 15 mg por DNBS de rata produce una inflamación más leve pero incoherente en comparación con 30 mg por rata. El resultado de 30 mg de DNBS fue consistente con el visto previamente.

Estudios farmacocinéticos

Los estudios farmacocinéticos iniciales de dosis única con el compuesto APAZA™ se han llevado a cabo en perros y ratones. Se completó un estudio para determinar la farmacocinética del plasma y la eliminación del compuesto APAZA™ y sus metabolitos (5-ASA, 4-APAA, 5-aceASA y 4-aceAPAA) después de la administración de dosis orales únicas a ratones CD-1 machos. Para APAZA™, los valores de C_{max}, AUC_{∞} y $t_{½}$ fueron de 5.93 μg/mL, 7.43 μg/mL·h y 3.34 h. Cuando se normalizaron a valores molares, los valores de C_{max} para todos los metabolitos APAZA™ fueron menores que APAZA™; los valores variaron de 2.68 a 13.8 μM. Sin embargo, el valor normalizado APAZA™ AUC_{∞} no fue mayor que todos los demás metabolitos; estos valores variaron de 11.2 a 111 μg/M·h. Con la excepción del 5-ASA acetilado, los valores $t_{½}$ para los metabolitos oscilaron entre 1.06-3.34 horas. El valor $t_{½}$ para 5-ASA acetilado fue de 11.27 horas. Las concentraciones plasmáticas de APAZA™, 4-APAA, 5-aceASA y 4-aceAPAA estaban por debajo del límite de detección a las 24 horas. Los valores de T_{max} para APAZA™ y sus metabolitos fueron de 1 hora y 4 horas, respectivamente. APAZA™ y sus metabolitos se eliminaron a través de vías fecales y urinarias con un 44.5% de la dosis recuperada como APAZA™, 5-ASA, 4-APAA, 5-aceASA o 4-aceAPAA a las 24 horas.

Los niveles en plasma de APAZA™ aumentaron de una manera relacionada con la dosis en el intervalo de dosis de 100 a 1000 mg/kg cuando se administra como una dosis oral única a perros Beagle. La administración oral de una dosis única de 1000 mg/kg a perros dio como resultado una concentración media de APAZA™ máxima en plasma (C_{max}) de 9.78 μg/mL en hombres y 2.64 μg/mL en mujeres, tiempo hasta la concentración en plasma máxima (t_{max}) de 15.0 y 24.0 horas en hombres y mujeres, respectivamente, área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo (AUC_{0-t}) de 95.4 μg·h/mL y 40.8 μg·h/mL para perros machos y hembras, respectivamente.

Los efectos del agente terapéutico 5-ASA, 4-APAA y APAZA™ se compararon en estudios usando ácido 2, 4-dinitrobencenosulfónico (DNBS), sodio sulfato de dextrano (DSS) y modelos de colitis con toxina A en ratas. En un modelo de colitis crónica con DSS, el compuesto APAZA™ conservaba la estructura histológica del colon normal y evitaba un aumento en la proporción del peso húmedo del colon: peso corporal; ambos, si son anormales, son indicadores de colitis. Los efectos después de la administración de dosis equimolares de ambos compuestos APAZA™ y sulfasalazina oral y rectal en un modelo de colitis por DNBS indican que ambos compuestos tienen cierta actividad.

Los resultados de los estudios completados en los modelos de colitis aguda con toxina A apuntan a la conclusión de que el 4-APAA administrado a ratas ya sea por vía oral en agua potable o por administración tópica al colon redujo sustancialmente la inflamación intestinal como lo demuestra la extravasación plasmática reducida, infiltración de neutrófilos y preservación de histoarquitectura normal. Además, el compuesto APAZA™ redujo la colitis inducida por la toxina A concentraciones 10-100 veces más bajas que las de la sulfasalazina. En conjunto, estos efectos beneficiosos del compuesto APAZA™ y sus componentes en estos 3 modelos de colitis conducen a la conclusión de que APAZA™ es un agente útil en el tratamiento de la colitis. Estudios posteriores indican efectos sinérgicos de 5-ASA unido con azo a 4-APAA para formar el compuesto APAZA™.

Efectos de las dosis rectales equimolares de 5-ASA, 4-APAA y una mezcla de 5-ASA y 4-APAA en la colitis por DNBS en la rata

Se evaluaron los efectos antiinflamatorios de las dosis rectales equimolares de 5-ASA y 4-APAA administradas por separado o como una mezcla en un modelo de colitis por DNBS en ratas.

Se compararon los efectos antiinflamatorios de 3 tratamientos diferentes en un modelo de colitis por DNBS en 30 ratas Lewis macho que pesaban entre 218 y 260 gramos.

Los animales se dividieron en 5 grupos de 6 animales en cada grupo:

0.7% de metilcelulosa (vehículo) + solución salina normal

0.7% de metilcelulosa (vehículo) + solución etanólica de ácido 2,4-dinitrobencenosulfónico (DNBS) 30 mg

5-ASA a 100 mg/kg·día + 30 mg de DNBS/por vía rectal

4-APAA a 99 mg/kg·día + 30 mg de DNBS/por vía rectal

Mezcla 5-ASA+ 4-APAA (APAZA™) a 199 mg/kg·día + 30 mg de DNBS/por vía rectal

Se indujo colitis experimental bajo anestesia leve (ketamina/xilazina) en 4 de 5 grupos instilando DNBS (30 mg) por vía rectal a un volumen de 0.5 mL a ratas en ayunas. Cada grupo de animales recibió dosis rectales dos veces al día (*dos veces*) de ya sea vehículo (0.7% metilcelulosa) o compuestos de prueba (5-ASA, 4-APAA o APAZA™) durante 4 días comenzando 24 horas después de que ya se ha instilado la solución salina normal o el irritante DNBS. El peso corporal y la incidencia de diarrea se registraron diariamente. Cada animal en los 4 grupos DNBS y en el grupo salino paralelo único se sacrificó 5 días después de la irritación. Se realizaron laparotomías y colectomías y los animales se puntuaron para determinar la presencia y la gravedad de las adherencias intestinales, las estenosis, la inflamación y la ulceración. Colon: se determinaron las proporciones de peso corporal y se examinó el tejido histológicamente.

Se observó inflamación severa en todos los grupos tratados con DNBS como se evidencia por adherencias intestinales, ulceraciones, aumento del peso del colon, necrosis tisular y signos clínicos de pérdida de peso y diarrea. No hubo diferencias estadísticas entre los grupos en ninguno de los parámetros observados.

Las proporciones de colon neto: peso corporal se redujeron en ~ 30% en los 3 grupos de tratamiento activos (4-APAA, 5-ASA y mezcla de 4-APAA + 5-ASA). Además, no se observaron diferencias en la media de los pesos del tejido seco húmedo colónico para los animales tratados con DNBS.

Comparación del tratamiento con vehículo con el DNBS, las puntuaciones de adhesión se redujeron ~25%, 17% y 38% en los grupos 4-APAA, 5-ASA y 5-ASA+ 4-APAA, respectivamente. Además, las puntuaciones de necrosis tisular fueron más bajas en el grupo 5-ASA+ 4-APAA debido a las áreas no afectadas en 2 de 4 animales en relación con otros animales DNBS que recibieron tratamiento activo.

La administración de DNBS rectal produjo inflamación local de colon con destrucción, engrosamiento y adherencias de tejido segmentario. Las tendencias hacia la mejora en los 3 grupos de tratamiento no discriminaron la efectividad de la mezcla 5-ASA + 4-APAA de los componentes individuales.

Efectos de las dosis equimolares de APAZA™ y sulfasalazina en la colitis por DNBS en la rata

El estudio AA-PH-003 se diseñó para evaluar la eficacia antiinflamatoria de dosis orales y rectales de APAZA™ y sulfasalazina en el modelo de colitis por DNBS en ratas.

Durante este estudio, se administraron los siguientes compuestos: vehículo (0.7% de metilcelulosa, 30 mg de DNBS, agua desionizada, 200 mg/kg·día de APAZA™ y 265.6 mg/kg·día de sulfasalazina.

Se estudiaron 35 ratas Lewis macho adultas (peso corporal 200-250 g). Los animales se dividieron en 7 grupos con 5 animales en cada grupo.

Vehículo (0.7% de metilcelulosa)/por vía rectal + solución salina normal/por vía rectal

Vehículo/por vía rectal + 30 mg de DNBS/por vía rectal

Vehículo/por vía oral (sonda nasogástrica) + 30 mg de DNBS/por vía rectal

200 mg/kg/por vía rectal de APAZA™ + 30 mg de DNBS/por vía rectal

200 mg/kg/por vía oral (sonda nasogástrica) de APAZA™ + 30 mg de DNBS/por vía rectal

265.6 mg/kg/por vía rectal de sulfasalazina + 30 mg de DNBS/por vía rectal

265.6 mg/kg/por vía oral (sonda nasogástrica) de sulfasalazina + 30 mg de DNBS/por vía rectal

Se indujo colitis experimental en 6 de los 7 grupos; y los 7 grupos recibieron dosis dos veces ya sea por vía rectal u oral (por sonda nasogástrica) de ya sea vehículo o compuestos de prueba durante los 4 días posteriores a la inducción de la colitis. El peso corporal de los animales y la incidencia de diarrea se registraron diariamente. Se recogieron la orina y las heces los días 1 y 3 para la determinación de APAZA™ y sus metabolitos (5-ASA, 4-APAA, 4-aceAPAA y 5-aceASA). Los animales en los grupos DNBS y el grupo de agua desionizada paralela se sacrificaron el día 5. Se realizaron laparotomías y colectomías y los animales se puntuaron para determinar la presencia y la gravedad de las adherencias intestinales, estenosis, inflamación y ulceración. Se determinaron las proporciones de colon:peso corporal y se realizó una histopatología de colon.

La siguiente tabla proporciona un resumen de los datos usados para determinar la eficacia de las dosis oral y rectal de APAZA™ y sulfasalazina en un modelo de colitis por DNBS en ratas.

Grupo	Proporción colon neto:peso corporal	Puntuaciones de inflamación colónica*	Media de la longitud del colon (cm)	Longitud de inflamación colónica (cm)	Puntuación de diarrea promedio Día 3	Media del peso corporal (g)	Histopatología del colon (# lesiones graves)
Vehículo (0.7% de metilcelulosa)/por vía rectal + Solución salina normal/por vía rectal	No se realizó	0	14.8	0	0	227.8	No se realizó
Vehículo/por vía rectal + 30 mg de DNBS	0.2087	1.5	12.8	1.7	2	215.2	No se realizó
Vehículo/por vía oral + 30 mg de DNBS	0.3023	1.4	12.3	2.5	2.6	209.2	13
200 mg/kg/por vía rectal de APAZA™ + 30 mg de DNBS	0.1983	1.3	12.4	1.6	2	218.6	No se realizó
200 mg/kg/por vía oral de APAZA™ + 30 mg de DNBS	0.2309	1.4	12.3	2.5	2	213.8	2
265.6 mg/kg/por vía rectal de	0.179	1	12.8	1.8	2	217.0	No se realizó

sulfasalazina + 30 mg de DNBS							
265.6 mg/kg/ por vía oral de sulfasalazina + 30 mg de DNBS	0.1862	1.4	12.9	2.3	2.4	215.4	8
* Escala de puntuación de inflamación colónica: 0 = sin inflamación macroscópica; 1 = evidencia macroscópica leve (enrojecimiento mínimo de la mucosa, edema) 2 = evidencia macroscópica severa (enrojecimiento pronunciado de la mucosa, edema y/o ulceración)							

En base a los datos resumidos proporcionados en la tabla anterior:

Se observó una reducción del 38.4% y del 23.8% en relación con el control en la proporción de colon neto:peso corporal (%BW) en los grupos de sulfasalazina y APAZA™ oral, respectivamente. No se observó significación estadística entre los grupos.

Las puntuaciones de inflamación colónica, la media de las longitudes del colon, la longitud de la inflamación del colon, las puntuaciones promedio de diarrea y la media de los pesos corporales fueron similares cuando los animales se trataron por vía oral con APAZA™, sulfasalazina o placebo.

Mientras que la incidencia de úlceras mucosas fue similar entre todos los grupos, las úlceras fueron menos graves en los tejidos de las ratas tratadas con APAZA™ en comparación con los tejidos de los animales tratados con placebo y con sulfasalazina.

Se observó una reducción mínima en las proporciones de colon neto:peso corporal (%BW), puntuaciones de inflamación colónica similares, media de longitudes de colon similares, ninguna diferencia en las puntuaciones promedio de diarrea y media de pesos corporales similares en los grupos APAZA™ y sulfasalazina rectales paralelos. No se observó significación estadística para ninguno de los parámetros de eficacia definidos.

Aunque equívocos, los resultados de las proporciones de colon neto:peso corporal (%BW) en las puntaciones de inflamación son indicativos de que el APAZA™ y la sulfasalazina oral y rectal tenían cierta actividad en un modelo de colitis por DNBS en ratas. Además, los hallazgos histológicos llevan a la conclusión de que APAZA™ reduce la gravedad de la ulceración y la consiguiente fibrosis en la colitis por DNBS.

Efectos de APAZA™ y sulfasalazina en colitis por sodio sulfato de dextrano en la Rata

Se determinó la eficacia de APAZA™ y sulfasalazina en la mejora de la inflamación intestinal en un modelo de colitis inducida por sodio sulfato de dextrano (DSS) en ratas Sprague-Dawley.

Se estudiaron treinta y seis ratas macho Sprague-Dawley que tenían 7-8 semanas de edad y pesaban 240-260 g. Los animales se dividieron en 6 grupos con 6 animales en cada grupo:

Placebo (0.7% de metilcelulosa) dos veces por vía oral (sonda nasogástrica), agua destilada (DW) como agua potable

100 mg/kg/dos veces por vía oral (sonda nasogástrica) de APAZA™, DW como agua potable

133 mg/kg/dos veces por vía oral (sonda nasogástrica) de sulfasalazina, DW como agua potable

Placebo (0.7% de metilcelulosa) dos veces oral (por sonda nasogástrica), 5% de DSS como agua potable

100 mg/kg/dos veces por vía oral (sonda nasogástrica) de APAZA™, 5% de DSS como agua potable

133 mg/kg/dos veces por vía oral (sonda nasogástrica) de sulfasalazina, 5% de DSS como agua potable

Se indujo colitis experimental administrando una solución al 5% de DSS en agua potable durante 10 días con un solo grupo de control de ratas que recibían solo DW. Un día antes de la administración de DSS y continuando durante un total de 11 días consecutivos, cada grupo de ratas se trató dos veces al día con APAZA™, sulfasalazina o placebo. Después de completar el período de tratamiento, se sacrificaron las ratas y se evaluó la eficacia de los fármacos de prueba en la inhibición de la colitis mediante lo siguiente:

Puntuación del índice de actividad de la enfermedad:

Puntuación	Pérdida de peso	Consistencia de las heces	Hemorragia rectal
0	Ninguno	Normal	Ninguno
1	1-5%		
2	5-10%	Suelta	Hemoccult +
3	10-20%		
4	>20%	Diarrea	Sangrado intenso

Peso corporal

Proporciones peso húmedo de colon: peso corporal

Actividad de mieloperoxidasa colónica (MPO)

Cambios histopatológicos del colon

En ambas las ratas tratadas con APAZA™ y placebo que tomaron DSS, la puntación DAI estuvo entre 0-1, lo que indica un embotamiento de los síntomas (pérdida de peso, diarrea y hemorragia rectal) asociados con la colitis por DSS. En las ratas tratadas con sulfasalazina que bebieron DSS, la puntación DAI fue significativamente mayor que la puntación DAI de las ratas tratadas con sulfasalazina que tomaron DW el día 2 y en los días 5-10, lo que indica un aumento en la gravedad de los síntomas asociados con la colitis por DSS.

Todos los animales que bebían DW ganaron peso durante el período de tratamiento de 11 días, mientras que todas las ratas que bebieron la solución de DSS perdieron peso. Sin embargo, las únicas diferencias estadísticamente significativas en los pesos corporales entre las ratas que bebieron DW frente a DSS se encontraron en las ratas tratadas con sulfasalazina los días 10 y 11.

No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de peso húmedo del colon: peso corporal en ratas tratadas con APAZA™ y tomando ya sea DW o DSS. Las proporciones de peso húmedo del colon: peso corporal en ratas que bebieron DSS y se trataron con sulfasalazina o placebo aumentaron en comparación con las ratas que bebieron DW.

La mieloperoxidasa (MPO) es un marcador enzimático útil para cuantificar el grado de inflamación y para estimar la infiltración de neutrófilos en el tejido. La actividad MPO colónica fue similar después de la administración oral de APAZA™ o placebo a ratas que recibieron DSS, en las ratas tratadas con sulfasalazina que bebieron DSS se observó un aumento significativo en la actividad MPO tisular. Este hallazgo bioquímico confirma la observación histológica de la infiltración intensa de células inflamatorias, incluidos los neutrófilos, en el colon de ratas que beben DSS y se tratan con sulfasalazina.

Se evaluaron los cambios histológicos en animales, después de la administración de APAZA™, sulfasalazina y tratamientos con placebo, en animales que recibieron DSS frente a DW, como se muestra en la figura 5. El DSS causó colitis severa con pérdida de criptas, edema vascular e infiltración intensa de células inflamatorias en ratas tratadas con placebo (f) o sulfasalazina (d). Las ratas tratadas con placebo tuvieron menos daño colónico que las que recibieron sulfasalazina, pero aún tenían algo de acortamiento de criptas e infiltración de células inflamatorias en la mucosa. Por el contrario, las ratas DSS tratadas con APAZA™ (b) estaban ampliamente protegidas contra los efectos perjudiciales para los tejidos del DSS, siendo la histología del colon casi normal.

En conclusión, APAZA™ inhibió la colitis inducida por DSS más eficazmente que sulfasalazina o placebo en términos de puntuaciones más bajas de DAI (menos síntomas observados asociados con colitis), prevención del aumento proporción de peso húmedo en el colon: peso corporal, una disminución en la actividad MPO y preservación de la estructura histológica normal. Los resultados sorprendentes en los animales tratados con sulfasalazina/DSS no pudieron explicarse por ningún error metodológico específico durante la realización del experimento.

Administración oral de la inhibición del dímero de 4-APAA de la colitis inducida por la toxina A en ratas anestesiadas

Dieciocho ratas macho Sprague-Dawley adultas, con un peso de 175-225 gramos, se dividieron en 3 grupos, cada uno de los cuales consistía en 6 animales:

100 mg/kg-día por vía oral del dímero de 4-APAA (AA-013) + Toxina A (10 μg) inyectada en el lumen del colon

Vehículo (DW) por vía oral + Toxina A (10 μg) inyectada en el lumen del colon

Vehículo (DW) por vía oral

Después de 5 días de administración del dímero de 4-APAA en agua potable, se administraron tanto ketamina (67 mg/kg) como xilazina (33 mg/kg), se creó quirúrgicamente un segmento de colon aislado y 10 μg de toxina A de *Clostridium difficile* se inyectó en el lumen del colon. Después de 3 horas, se sacrificaron las ratas y se evaluó la inflamación colónica cuantificando la acumulación del fluido luminal y el contenido de mieloperoxidasa (MPO) en el tejido del colon. Además, se completó la evaluación histológica de los segmentos de colon tratados.

Los efectos del tratamiento crónico con 4-APAA sobre la colitis inducida por la toxina A se evaluaron mediante acumulación del fluido luminal y contenido de MPO en tejido. La respuesta al dímero de 4-APAA se comparó sobre la base del porcentaje de inhibición de las respuestas a la toxina A sola. El dímero de 4-APAA inhibió 21 ± 8% de la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A y 60 ± 9% de la actividad MPO inducida por la toxina A

Los efectos del tratamiento crónico con el dímero de 4-APAA sobre el daño estructural inducido por toxina A del colon se muestran en la figura 6. La toxina A causó daño generalizado a la integridad estructural del colon (pérdida de plegamiento de la mucosa, ulceración de la superficie epitelial, la pérdida de células caliciformes y la infiltración de células del sistema inmunitario). El tratamiento crónico con el dímero de 4-APAA oral (mg/kg·día) inhibió parcialmente la inflamación colónica inducida después de una inyección de toxina A en el colon de ratas. El dímero de 4-APAA inhibió significativamente la actividad de MPO inducida por la toxina A pero no inhibió ni el daño estructural ni la acumulación del fluido luminal causada por la toxina A.

Administración oral crónica de la inhibición de 4-APAA de la colitis inducida por la toxina A en ratas anestesiadas

Dieciocho ratas Sprague-Dawley machos adultas que pesaban 175-222 gramos se dividieron en 3 grupos, cada uno de los cuales consistía en 6 animales:

100 mg/kg por vía oral de 4-APAA (AA-002) + Toxina A (10 μg) inyectada en el lumen del colon

Vehículo (DW) por vía oral + Toxina A (10 μg) inyectada en el lumen del colon

Vehículo (DW) por vía oral

Después de 5 días de administración de 4-APAA en agua potable, se administraron tanto ketamina (67 mg/kg) como xilazina (33 mg/kg), se creó quirúrgicamente un segmento colónico aislado y 10 μg de toxina A de *Clostridium difficile*. fue inyectado en el lumen del colon. Después de 3 horas, se sacrificaron las ratas y se evaluó la inflamación colónica cuantificando la acumulación del fluido luminal y el contenido de mieloperoxidasa (MPO) en el tejido del colon. Además, se completó la evaluación histológica de los segmentos de colon tratados.

Los efectos del tratamiento crónico con 4-APAA sobre la colitis inducida por la toxina A se evaluaron mediante acumulación del fluido luminal y contenido de MPO en tejido. La administración oral crónica de 4-APAA antes de la administración de la toxina A inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A y la actividad de MPO. Las respuestas a 4-APAA se compararon sobre la base del porcentaje de inhibición en comparación con la respuesta a la toxina A sola. Se inhibió la acumulación de fluido luminal de toxina 84 ± 6% y la actividad de MPO se redujo en 89 ± 8% después de la administración de 4-APAA.

Los efectos del tratamiento crónico con 4-APAA sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A se evaluaron histológicamente, como se muestra en la figura 7. Se puede ver que la toxina A causa daño generalizado a la integridad estructural de la del colon, incluida la pérdida del plegamiento de la mucosa, la ulceración de la superficie epitelial, la pérdida de células caliciformes y la infiltración de células del sistema inmunitario, incluidos neutrófilos. La administración oral de 4-APAA durante 5 días protegió la integridad estructural del colon contra los efectos dañinos de la toxina A.

Los resultados de la parte 2 de este estudio son indicativos de que el tratamiento con 4-APAA es un inhibidor eficaz de la inflamación colónica aguda inducida por la toxina A en ratas Sprague-Dawley.

Inhibición de colitis inducida por la toxina A de *Clostridium difficile* en ratas por APAZA™ y 4-APAA

Se ensayó el compuesto APAZA™ [molécula de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) unido a una molécula del ácido 4-aminofenilacético (4-APAA) mediante un enlace azo] por su capacidad para inhibir la colitis aguda en ratas causadas por la toxina A de *Clostridium difficile*. Cuando se administra crónicamente durante 5 días en agua potable, APAZA™ inhibió significativamente la actividad de la mieloperoxidasa inducida por la toxina A (MPO), la acumulación del fluido luminal y el daño estructural al colon a dosis de 1-100 mg/kg·día. Para comparación, se administró sulfasalazina en dosis idénticas y se descubrió que inhibía significativamente la colitis inducida por la toxina A solo a la dosis de 100 mg/kg·día. Cuando 4-APAA solo se administró de forma crónica en agua potable, también inhibió la inflamación colónica inducida por la toxina A a una dosis de 100 mg/kg·día.

Para determinar si 4-APAA tiene un efecto antiinflamatorio directo sobre el colon en lugar de un efecto sistémico, se administró 4-APAA de forma aguda a segmentos colónicos aislados preparados quirúrgicamente mediante inyección intraluminal en ratas anestesiadas 30 minutos antes de inyectar la toxina A. 4-APAA inhibió fuerte y significativamente la colitis inducida por la toxina A en este experimento a dosis tan bajas como 10 μg/segmento. Se concluye que APAZA™ es un potente inhibidor de la inflamación colónica inducida por la toxina A en ratas y que su constituyente, 4-APAA, es responsable de esta mayor protección contra la colitis en comparación con el componente 5-ASA de la sulfasalazina.

Materiales. La sulfasalazina y 4-APAA se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La toxina A se adquirió de TechLab, Inc. (Blacksburg, VA). APAZA™ se sintetizó como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,583,128. Las ratas se compraron de Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA).

Administración de fármacos. En estudios que utilizaron administración crónica, se administraron sulfasalazina, APAZA™ y 4-APAA en el agua potable a dosis que oscilaban entre 0.1 - 100 mg/kg·d, durante 5 días. La sulfasalazina y APAZA™ se disolvieron inicialmente en NaOH 0.1 N a 30 veces la concentración final deseada y luego el pH se ajustó a 8.5 con HCl 1 N y la solución se diluyó 30 veces con agua destilada. 4-APAA se disolvió en agua. El quinto día, las ratas se dejaron en ayunas durante la noche (con acceso a agua potable ± sulfasalazina, APAZA™, o 4-APAA ad lib), se anestesiaron y se crearon segmentos de colon aislados quirúrgicamente como se describe a continuación. En estudios que utilizaron administración aguda, las ratas se pretrataron mediante inyección de 4-APAA a dosis de 10 o 100 μg en 200 μL de PBS (pH 7.4) en el lumen del segmento colónico usando una aguja de jeringa 27 ga. La toxina A (10 μg) en 200 μL de PBS (pH 7.4) se analizó solo o se inyectó en el lumen del segmento colónico 30 minutos después de 4-APAA usando una aguja de jeringa 27 ga.

Cirugía. Se crearon segmentos de colon aislados en ratas macho Sprague-Dawley (150-175 g) como se describió previamente para segmentos ileales aislados (véase, Gastroenterol. 111:1272-1280 (1996) y Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 947-951 (1994). Ratas en ayunas durante la noche con acceso libre al agua potable fueron anestesiadas por inyección intramuscular de 67 mg/kg de ketamina: 33 mg/kg de xilazina. Se realizó una incisión abdominal en la línea media y segmentos de colon de 5 cm de longitud se hicieron por unión con suturas de seda 4-0, teniendo cuidado de no alterar el suministro vascular. Se inyectó la toxina A (10 μg) en 400 μL de PBS (pH 7.4) en el lumen del segmento del colon usando una aguja de jeringa 27 ga. Las ratas de control se preparan de manera similar y sus segmentos de colon fueron inyectados con los vehículos. La incisión de la línea media se cerró luego con una sutura continua, y las ratas se colocaron en una almohadilla térmica a 37 °C, durante 3 horas. Después de 3 horas, las ratas fueron sacrificadas y las muestras de los segmentos de colon tratados se tomaron para el análisis in vitro.

Histopatología. La gravedad del daño histológico del colon se evaluó usando secciones fijadas con formalina, embebidas en parafina, teñidas con H&E.

Acumulación del fluido luminal. La acumulación del fluido luminal se midió gravimétricamente. Después de 3 horas de tratamiento, los segmentos colónicos aislados se retiraron, se pesaron y se midieron sus longitudes. La acumulación del fluido luminal se expresa como mg de peso húmedo por cm de longitud.

Actividad de mieloperoxidasa. La actividad mieloperoxidasa (MPO) se midió como se describió previamente (véase, J. Invest. Dermatol. 78: 206-209 (1982)). Brevemente, trozos de control y segmentos de colon tratados se homogeneizaron en bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0.5% en KH_2P0_4 50 mM (pH 6), se congelaron/descongelaron tres veces, se centrifugaron a 4 °C, durante 2 minutos y luego se leyó la absorbancia de cada sobrenadante a 460 nm a los 0, 30 y 60 segundos después de la adición de 2.9 ml de diclorhidrato de o-dianisidina a 0.1 ml de sobrenadante. El cambio máximo en la absorbancia por minuto se usó para calcular las unidades de actividad de MPO basadas en el índice de absorbancia molar de la o-dianisidina oxidada de 1.13 x 104 M^{-1} cm^{-1}. Los resultados se expresan como unidades de actividad MPO por mg de peso húmedo del tejido.

Análisis estadístico. Los resultados se expresan como la media ± SEM. Las diferencias entre los grupos de tres o más fueron examinadas por ANOVA de una vía con la prueba posterior Tukey-Kramer. Las diferencias entre las medias de dos grupos se analizaron mediante la prueba t no aparejada. P <0.05 se consideró significativo. Todas las pruebas se realizaron con GraphPad Instat, versión 3.05 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados. Los efectos del tratamiento crónico con APAZA™ sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A, según se evalúa mediante tinción H&E del tejido fijado se muestran en la figura 8. APAZA™ se administra en el agua potable en las tres dosis (1, 10 y 100 mg/kg·día) protegió fuertemente la integridad estructural del colon de rata frente a los efectos dañinos de la toxina A. El grado de protección proporcionado por APAZA™ pareció ser prácticamente completo en las tres dosis, por lo que hubo poca evidencia de un efecto relacionado con la dosis. Además, hubo poca variabilidad entre las diversas preparaciones histológicas para los efectos de APAZA™ a diferencia de lo que se observó para la dosis más alta de sulfasalazina que se describe a continuación.

También se evaluaron los efectos de la sulfasalazina sobre la colitis inducida por la toxina A en ratas. La sulfasalazina es un inhibidor bien establecido de la inflamación intestinal crónica, por lo que fue útil establecer su potencia y eficacia en el modelo de colitis aguda por toxina A de rata para evaluar los efectos relativos de APAZA™. Los efectos del tratamiento crónico con sulfasalazina sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A evaluado por la tinción con H&E del tejido fijado se muestran en la figura 9. La toxina A causa daño generalizado a la integridad estructural del colon de la rata. Lo más notable es la pérdida de plegamiento de la mucosa, que puede ser una función del músculo liso de la muscularis mucosa. Además, la toxina A parece causar ulceración de la superficie epitelial, pérdida de células caliciformes e infiltración de células del sistema inmunitario, incluidos neutrófilos. La sulfasalazina administrada en el agua potable a dosis de 1 y 10 mg/kg·día tuvo poco efecto sobre la integridad estructural del colon de rata frente a los efectos dañinos de la toxina A. La figura 9 muestra que la sulfasalazina en estas dosis no evitó la pérdida de plegamiento de la mucosa, la pérdida de células caliciformes o la infiltración de células del sistema inmunitario causada por la toxina A. Sin embargo, a la dosis de 100 mg/kg·día de sulfasalazina inhibió el daño histológico inducido por la toxina A (figura 9, panel E). Curiosamente, parece haber una variabilidad significativa en la protección histológica proporcionada por la sulfasalazina a la dosis de 100 mg/kg·día.

Los efectos del tratamiento crónico con tres dosis cada una de sulfasalazina y APAZA™ sobre la colitis inducida por la toxina A, según se evalúa por la acumulación del fluido luminal y el contenido de MPO en el tejido se muestran en la figura 10. La acumulación del fluido luminal y actividad de MPO fuertemente estimulada por la toxina A en la rata de colon. El tratamiento crónico de las ratas con 1 mg/kg·día de sulfasalazina antes de la administración de la toxina A no inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A ni la actividad de MPO inducida por la toxina A. A una dosis de 10 mg/kg·día, la sulfasalazina inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A, pero no la actividad MPO estimulada por la toxina A. En la dosis de 100 mg/kg·día, la sulfasalazina inhibió significativamente tanto la acumulación del fluido luminal y la actividad MPO inducida por la toxina A. En contraste, el tratamiento crónico con APAZA™ inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal y la actividad MPO inducida por la toxina A en las tres dosis probadas (1, 10 y 100 mg/kg·día). El grado de inhibición con la dosis más baja de APAZA™ probada, 1 mg/kg·día, fue equivalente al grado de inhibición observado en respuesta a la dosis más alta de sulfasalazina probada, 100 mg/kg·día.

Para determinar la potencia de APAZA™ para la inhibición de la colitis inducida por la toxina A en ratas, se realizó un estudio adicional usando dosis más bajas de APAZA™. Como se muestra en la figura 11, APAZA™ administrado en el agua potable durante 5 días protege fuertemente la integridad estructural del colon de rata contra los efectos dañinos de la toxina A a la dosis de 1 mg/kg·día, confirmando el resultado anterior. A la dosis de 0.5 mg/kg·día, APAZA™ protegió parcialmente la integridad estructural del colon de la rata contra la toxina A. A esta dosis, APAZA™ pareció proporcionar una protección casi completa contra la ulceración de la mucosa superficial pero no contra la pérdida de plegamiento de la mucosa o infiltración de células inmunitarias inducidas por la toxina A. APAZA™ parecía tener poco o ningún efecto protector contra los efectos estructuralmente dañinos de la toxina A a la dosis de 0.1 mg/kg·día. De este modo, la curva dosis-respuesta completa para APAZA™ para inhibir la colitis en este modelo parece ocurrir entre dosis de 0.1 y 1 mg/kg-día. La sulfasalazina en una dosis de 1 mg/kg·día tuvo poco efecto sobre la colitis por toxina A, confirmando el resultado anterior.

Los efectos del tratamiento crónico con APAZA™ a estas dosis más bajas de colitis inducida por la toxina A, según se evalúa por la acumulación del fluido luminal y contenido de MPO en tejido se muestran en la figura 12. El tratamiento crónico de las ratas con 1 mg/kg·día de la sulfasalazina no inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A o la actividad de MPO inducida por la toxina A, como antes. Por el contrario, el tratamiento crónico con APAZA™ inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A a las dosis de 0.5 y 1 mg/kg·día y la actividad de MPO a 1 mg/kg·día. De este modo, APAZA™ parecía ser al menos 10-20 veces más potente que la sulfasalazina en estas acciones. La potencia de APAZA™ para la inhibición de la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A y la actividad de MPO se correspondía estrechamente con su potencia para la inhibición del daño estructural inducido por toxina A.

Se realizó la administración crónica de 4-APAA solo en el agua potable con el fin de determinar si la unidad estructural 4-APAA de APAZA™ por sí mismo inhibe la colitis por toxina A. Los efectos del tratamiento crónico con 4-APAA a la dosis de 100 mg/kg·d sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A, según se evalúa mediante tinción con H&E del tejido fijado se muestran en la figura 13. 4-APAA administrado en el agua potable protegió fuertemente la integridad estructural del colon de rata contra los efectos dañinos de la toxina A. La figura 13 muestra que el plegamiento de la mucosa normal se conserva cuando las ratas se tratan crónicamente con 4-APAA antes de la administración de la toxina A. Además, 4-APAA inhibió fuertemente la ulceración de la superficie epitelial inducida por la toxina A, preservó las células caliciformes e inhibió la infiltración de células inmunes en el colon.

Los efectos del tratamiento crónico con 4-APAA en la colitis inducida por la toxina A, según se evalúa por la acumulación del fluido luminal y el contenido de MPO en tejido se muestran en la figura 14. El tratamiento crónico de las ratas con 4-APAA antes de la administración de la toxina A inhibió tanto la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A como la actividad de MPO. El fluido luminal y las respuestas de MPO a 4-APAA se compararon sobre la base del porcentaje de inhibición de las respuestas a la toxina A sola. 4-APAA inhibió 84 ± 6% de la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A y 89 ± 8% de la actividad de MPO inducida por la toxina A (P = 0.63). De este modo, 4-APAA inhibió por igual estos dos índices de inflamación colónica.

El tratamiento agudo del colon inyectando 4-APAA intraluminalmente 30 minutos antes de la administración de la toxina A se usó para determinar si 4-APAA inhibe la colitis por toxina A por vía tópica en el colon a dosis muy bajas. Los efectos del pretratamiento agudo con 4-APAA sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A según se evalúa por tinción con H&E del tejido fijado se muestran en la figura 15. 4-APAA a ambas dosis de 10 y 100 μg protegieron fuertemente la integridad estructural del colon de rata contra los efectos perjudiciales de la toxina A. La figura 15 muestra que el plegamiento de la mucosa normal se conserva cuando el colon se pretrata durante 30 minutos con 4-APAA antes de la administración de la toxina A. Además, 4-APAA inhibió fuertemente la ulceración de la superficie epitelial inducida por la toxina A, preservó las células caliciformes, e inhibió la infiltración de células inmunes en el colon. La dosis de 100 μg de 4-APAA pareció inhibir los efectos inflamatorios de la toxina A ligeramente mejor que la dosis de 10 μg de 4-APAA.

Los efectos del pretratamiento agudo con 4-APAA sobre colitis inducida por la toxina A según se evalúa por acumulación del fluido luminal y contenido de MPO de tejido se muestran en la figura 16. El pretratamiento del colon con 10 o 100 μg de 4-APAA 30 minutos antes de la administración de toxina A inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal y la actividad de MPO inducida por la toxina A. La inhibición de 4-APAA de la acumulación del fluido luminal fue parcial, pero la inhibición de la actividad de MPO estuvo casi completa. La dosis de 100 μg de 4-APAA fue más eficaz que la dosis de 10 μg para inhibir la acumulación del fluido luminal, pero las dos dosis inhibieron la actividad de MPO de manera similar. Las respuestas a las dos dosis de 4-APAA se compararon sobre la base del porcentaje de inhibición de las respuestas a la toxina A sola. Para la inhibición de la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A, 100 μg de 4-APAA fue significativamente más potente que 10 μg (80 ± 5% de inhibición frente a 52 ± 4% de inhibición, P <0.001). Sin embargo, las respuestas de MPO a las dos dosis de 4-APAA no fueron significativamente diferentes (91 ± 8% de inhibición para dosis de 10 μg y 89 ± 10% de inhibición para dosis de 100 μg; p = 0.87).

Los principales hallazgos del presente estudio son que 4-APAA solo y APAZA™ (5-ASA + 4-APAA) son inhibidores eficaces de la colitis experimental en un modelo de rata y que APAZA™ es más potente que la sulfasalazina. Esta también es aparentemente la primera demostración de que la sulfasalazina inhibe fuertemente la colitis inducida por la toxina A de *Clostridium difficile* en ratas. Después de demostrar que la administración oral de sulfasalazina durante 5 días en el agua potable inhibió significativamente todos los índices de inflamación de colon, se demostró que dosis más bajas de APAZA™ administradas de manera idéntica eran igualmente eficaces. Para demostrar que la unidad estructural 4-APAA de APAZA™ era responsable del aumento de la potencia de APAZA™ sobre la sulfasalazina, se demostró que 4-APAA solo administrado crónicamente en el agua potable de la misma manera también inhibía significativamente la colitis inducida por la toxina A experimental en ratas Este resultado demuestra que la distribución sistémica de 4-APAA puede inhibir la colitis porque es probable que el 4-APAA administrado por vía oral se absorba en el cuerpo en el intestino delgado. Finalmente, este estudio muestra que la actividad inhibidora de la inflamación de 4-APAA también se produce por un efecto tópico local en el colon al demostrar que la inyección aguda de dosis muy pequeñas de 4-APAA directamente en el lumen de segmentos de colon quirúrgicamente aislados 30 minutos antes la administración de toxina A también inhibió fuertemente la colitis. Tan poco como 10 μg de 4-APAA probado de esta manera fue eficaz.

La potencia aumentada de APAZA™ frente a sulfasalazina puede deberse a la inclusión de dos unidades estructurales activos diferentes en APAZA™, 5-ASA y 4-APAA, frente a sulfasalazina, que solo contiene 5-ASA como ingrediente activo. Los estudios de dosis-respuesta mostraron que APAZA™ era aproximadamente 10-20 veces más potente que la sulfasalazina en la inhibición de la colitis inducida por la toxina A en ratas. Esta diferencia en la potencia podría explicarse si 5-ASA y 4-APAA inhiben la inflamación intestinal por diferentes mecanismos y tienen efectos sinérgicos cuando se administran juntos en un compuesto tal como APAZA™.

Potencias relativas de 4-APAA frente a 5-ASA para la inhibición de la colitis inducida por la toxina A en ratas.

Se adquirieron ratas macho Sprague-Dawley adultas (175-225 gramos de peso corporal) de Charles River Labs (Raleigh, NC). 4-APAA y 5-ASA se inyectaron por separado en el lumen de un segmento aislado del colon de la rata a dosis de 0.01, 0.1, 1 y 10 μg (en volúmenes de 200 μL) 30 minutos antes de la inyección de 10 μg de la toxina A de *Clostridium difficile*. En un estudio de seguimiento, se inyectó una dosis combinada de 10 ng (0.01 μg) cada una de 4-APAA y 5-ASA antes de la toxina A.

La duración de la dosificación fue de cinco días. La inflamación colónica se evaluó cuantificando la acumulación del fluido luminal y el contenido de mieloperoxidasa en el tejido del segmento colónico, y mediante el examen del daño estructural colónico usando secciones teñidas con hematoxilina y eosina del segmento colónico tratado.

Cirugía. Las ratas en ayunas durante la noche con acceso libre al agua se anestesiaron mediante una inyección de 67 mg/kg de ketamina: 33 mg/kg de xilazina. Se realizó una incisión abdominal en la línea media y se construyeron segmentos colónicos de 5 cm de longitud por unión con suturas de seda 4-0, teniendo cuidado de no alterar el suministro vascular. Las ratas se trataron previamente mediante inyección de 4-APAA o 5-ASA a dosis de 0.01, 0.1, 1, o 10 μg, o una dosis combinada de 4-APAA más 5-ASA a 0.01 μg cada una, en 200 μL de PBS (pH 7.4) en el lumen del segmento colónico usando una aguja de jeringa 27 ga. Se inyectó la toxina A (10 μg) en 200 μL de PBS (pH 7.4) en el lumen del segmento colónico 30 minutos después de 4-APAA o 5-ASA usando una aguja de jeringa 27 ga. La incisión de la línea media se cerró luego con una sutura continua, y las ratas se colocaron en una almohadilla térmica a 37 °C, durante 3 horas.

Acumulación del fluido luminal. La acumulación del fluido luminal se midió gravimétricamente. Después de 3 horas de tratamiento, los segmentos colónicos aislados se retiraron, se pesaron y se midieron sus longitudes. La acumulación del fluido luminal se expresa como mg de peso húmedo por cm de longitud.

Actividad de mieloperoxidasa. Se homogeneizaron trozos de control y segmentos de colon tratados en bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0.5% en KH_2PO_4 50 mM (pH 6), se congelaron/descongelaron tres veces, se centrifugaron a 4ºC durante 2 minutos y luego se leyó la absorbancia de cada sobrenadante a 460 nm a los 0, 30 y 60 segundos después de la adición de 2.9 ml de diclorhidrato de o-dianisidina a 0.1 ml de sobrenadante. El cambio máximo en la absorbancia por minuto se usó para calcular las unidades de actividad de MPO basadas en el índice de absorbancia molar de la o-dianisidina oxidada de 1.13×10^4 M^{-1} cm^{-1}. Los resultados se expresan como unidades de actividad MPO por mg de peso húmedo del tejido.

Histología. La gravedad del daño histológico de la mucosa se evaluó usando secciones fijadas con formol, embebidas en parafina y teñidas con H&E.

Métodos estadísticos. Los resultados se expresan como media ± SEM. Las diferencias entre los grupos se examinaron mediante ANOVA de una vía con la prueba posterior de Tukey-Kramer. P <0.05 se consideró significativo. Todas las pruebas se realizaron con GraphPad Instat, versión 3.05 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

Los efectos del tratamiento agudo con 4-APAA en varias dosis sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A, según se evalúa mediante tinción H&E del tejido fijado se muestran en la figura 17. Se puede ver que 4-APAA en la dosis de 0.01 μg no evitó la pérdida de plegamiento de la mucosa, ulceración superficial, pérdida de células caliciformes o infiltración de células del sistema inmunitario causada por la toxina A. Hubo una correlación entre una mayor protección del colon y una dosis creciente de 4-APAA de manera que 4-APAA a dosis de 0.1 y 1.0 μg de plegamiento de la mucosa preservado (figura 17B y C) y la ulceración superficial también estuvieron ausentes en gran parte a la dosis de 4-APAA de 1.0 μg (figura 17C). A la dosis de 4-APAA de 10 μg, el colon estaba virtualmente completamente protegido contra el daño estructural causado por la toxina A (figura 17D).

Los efectos del tratamiento con cuatro dosis de 4-APAA sobre colitis inducida por la toxina A, según se evalúa por la acumulación del fluido luminal y el contenido de MPO en tejido se muestran en la figura 18. La toxina A estimula fuerte y significativamente la acumulación del fluido luminal y la actividad de MPO en el colon de rata. El pretratamiento agudo de las ratas con las cuatro dosis de 4-APAA analizadas inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A.

La figura 19 muestra los efectos de cuatro dosis de 4-APAA sobre la acumulación del fluido luminal colónico y la actividad de MPO inducida por la toxina A (10 μg). La toxina A estimuló significativamente la acumulación del fluido luminal y la actividad de MPO y la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A se inhibió significativamente por el tratamiento con 4-APAA a todas las dosis probadas. La actividad de MPO inducida por la toxina A se inhibió significativamente con el tratamiento con 4-APAA solo a dosis de 1.0 y 10 μg de 4-APAA, pero no a las dosis de 4-APAA de 0.01 y 0.1 μg. Los valores mostrados son la media ± SEM; N = 3. * P <0.05 frente a la toxina A-/4-APAA 0; ** P <0.01

frente a la toxina A-/4-APAA 0; *** P <0.001 frente a la toxina A-/4-APAA 0; # P <0.05 frente a la toxina A+/4-APAA 0; ## P <0.01 frente a la toxina A+/4-APAA 0; ### P <0.001 frente a la toxina A+/4-APAA 0.

En contraste, el 4-APAA solo inhibió significativamente los aumentos en la actividad de MPO inducidos por la toxina A en las dos dosis más altas probadas, 1.0 y 10 μg. En general, los efectos de 4-APAA sobre la actividad de MPO se correlacionaron más estrechamente con los efectos de 4-APAA sobre la estructura del colon que con los efectos de 4-APAA sobre la acumulación del fluido luminal.

Los efectos del tratamiento agudo con 5-ASA a varias dosis sobre el daño estructural del colon inducido por la toxina A, según se evalúa mediante tinción con H&E del tejido fijado se muestran en la figura 20. Se puede ver que el 5-ASA en la dosis de 0.01 μg no evitó la pérdida del plegamiento de la mucosa, ulceración superficial, pérdida de células caliciformes o infiltración de células del sistema inmunitario causada por la toxina A. Hubo una correlación entre una mayor protección del colon y una dosis creciente de 5-ASA de tal manera que el 5-ASA a las dosis de 0.1 μg de ulceración superficial parcialmente conservada (figura 18B) y el plegamiento de la mucosa también se conservaron en gran parte a la dosis de 5-ASA de 1.0 μg (figura 18C). A la dosis de 5-ASA de 10 μg, el colon estaba virtualmente completamente protegido contra el daño estructural causado por la toxina A (figura 18D).

Los efectos del tratamiento con cuatro dosis de 5-ASA sobre la colitis inducida por la toxina A, según se evalúa por la acumulación del fluido luminal y el contenido de MPO en tejido se muestran en la figura 21. La toxina A estimula intensa y significativamente la acumulación del fluido luminal y la actividad de MPO en el colon de rata. El pretratamiento agudo de las ratas con 5-ASA a las dosis de 0.1, 1.0 y 10 μg inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A. Por el contrario, el 5-ASA solo inhibió significativamente los aumentos de la actividad de MPO inducidos por la toxina A en las dos dosis más altas probadas, 1.0 y 10 μg.

Para determinar si una combinación de dosis bajas de 4-APAA y 5-ASA inhibe la colitis por toxina A en ratas, 10 ng (= 0.01 μg) cada uno de los dos compuestos se inyectó intraluminalmente en segmentos aislados del colon de la rata 30 minutos antes de la administración de la toxina A. La figura 20 muestra que la combinación de 4-APAA y 5-ASA inhibió significativamente el daño estructural inducido por toxina A del colon de rata a dosis que por separado tuvieron poco efecto (véanse las figuras 16 y 18).

Los efectos del tratamiento con 10 ng de cada uno de 4-APAA, 5-ASA, o ambos 4-APAA y 5-ASA en la colitis inducida por la toxina A, según se evalúa por la acumulación del fluido luminal y el contenido de MPO en tejido se muestran en la figura 22. La toxina A estimula fuerte y significativamente la acumulación del fluido luminal y la actividad MPO en el colon de la rata. El pretratamiento agudo de las ratas con 10 ng de 4-APAA o 5-ASA inhibió significativamente la acumulación del fluido luminal inducida por la toxina A, pero la combinación de ambos compuestos a la misma dosis inhibió aún más fuertemente este efecto de la toxina A y esta inhibición fue significativamente diferente de la inhibición causada por cada compuesto solo. La actividad de MPO estimulada por toxina A no se inhibió significativamente por 4-APAA o 5-ASA a la dosis de 10 ng, pero la combinación de los dos compuestos a esta dosis inhibió fuerte y significativamente este efecto inflamatorio de la toxina.

Los resultados muestran que 4-APAA y 5-ASA son aproximadamente equipotentes para la inhibición de colitis inducida por la toxina A aguda en ratas cuando se administran solos, pero cuando se administran juntos parecen inhibir más la colitis por toxina A que la aditiva. La dosis más baja de 4-APAA y 5-ASA probada, 10 ng, no inhibió significativamente el daño estructural o la actividad de MPO inducidos por la toxina A, cuando los compuestos se analizaron solos, pero cuando los dos compuestos se administraron juntos a esta dosis, inhibieron fuerte y significativamente estos índices de inflamación colónica. Si bien los inventores no desean vincularse a ninguna teoría particular, estas observaciones sugieren que 4-APAA y 5-ASA pueden inhibir la inflamación intestinal por diferentes mecanismos. También se pueden realizar estudios para probar dosis de combinación más bajas de los dos compuestos para determinar la curva dosis-respuesta completa de estos efectos con el fin de determinar la dosis más baja totalmente eficaz.

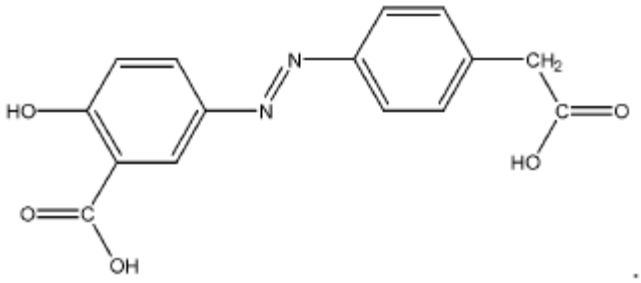
Las siguientes patentes de los Estados Unidos y solicitudes de patente se refieren a compuestos de 4-APAA, compuestos de 5-ASA y compuestos de 4-APAA unidos con azo a compuestos de 5-ASA: la Patente de los Estados Unidos 6,583,128, Immunoregulatory compounds and derivatives and methods of treating diseases therewith, presentada el 29 de agosto, 2001; Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 60/228,683, Immunoregulatory compounds and derivatives and methods of treating diseases therewith, presentada el 29 de agosto, 2000, y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 10/967,736, Immunoregulatory compounds and derivatives and methods of treating diseases therewith, presentada el 18 de octubre, 2004, y Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 60/555,551, titulada Methods and Compositions employing 4-aminophenylacetic acid compounds, presentada el 23 de marzo, 2004.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para administración oral que comprende:

(a) un compuesto de ácido 4-aminofenilacético (4-APAA) no unido con azo para administración en el intestino delgado; y

(b) un compuesto de 4-APAA unido con azo a un compuesto de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) para administración al intestino delgado distal y/o colon, el compuesto azo que tiene la siguiente estructura:

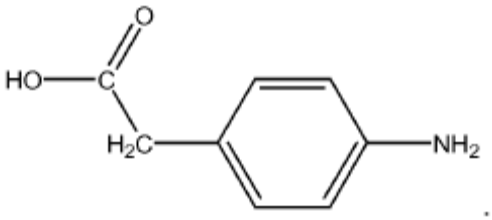


2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende además un tercer agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en: esteroides, antibióticos, moduladores inmunitarios, suavizantes de heces, endurecedores de heces, nutracéuticos, agentes y organismos probióticos, y agentes nicotínicos.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2 formulada para administrar los agentes terapéuticos al intestino delgado y al colon.

4. Una composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2 para usar como una formulación oral en el tratamiento de una afección gastrointestinal inflamatoria.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto de 4-APAA no unido con azo tiene la siguiente estructura:



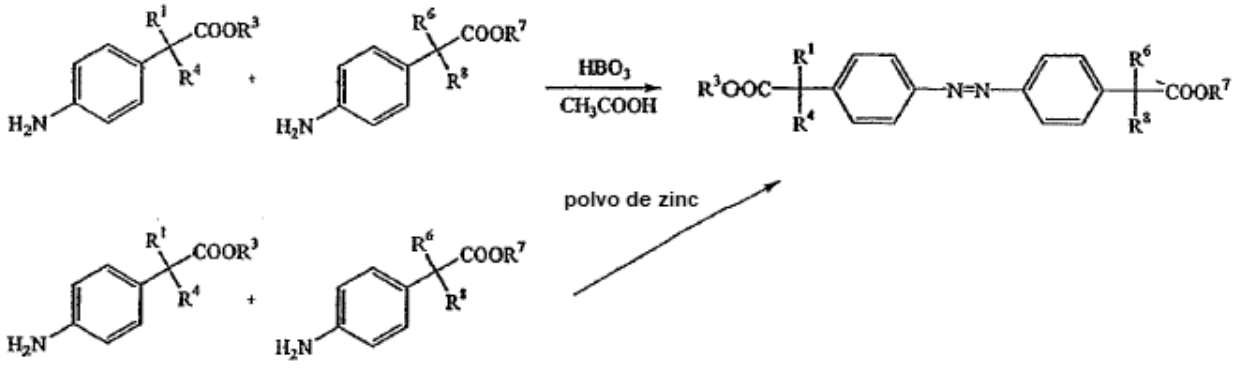


FIGURA 1

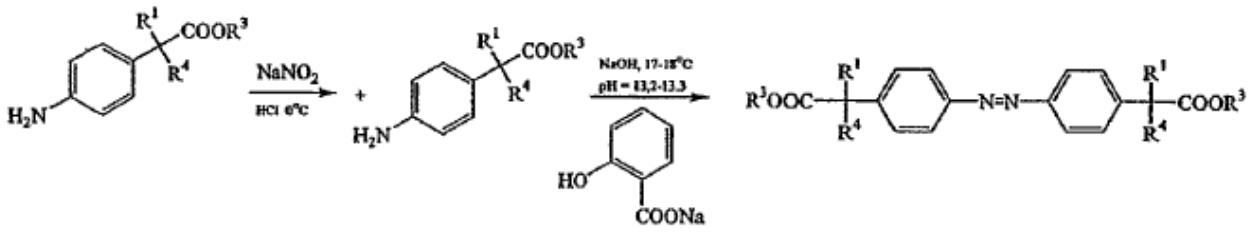

R1
COOR3
R4
H2N
NaNO2
HCl 6°C
+
NaOH, 17-18°C
pH = 13,2-13,3
HO
COONa
R3OOC
N=N

FIGURA 2

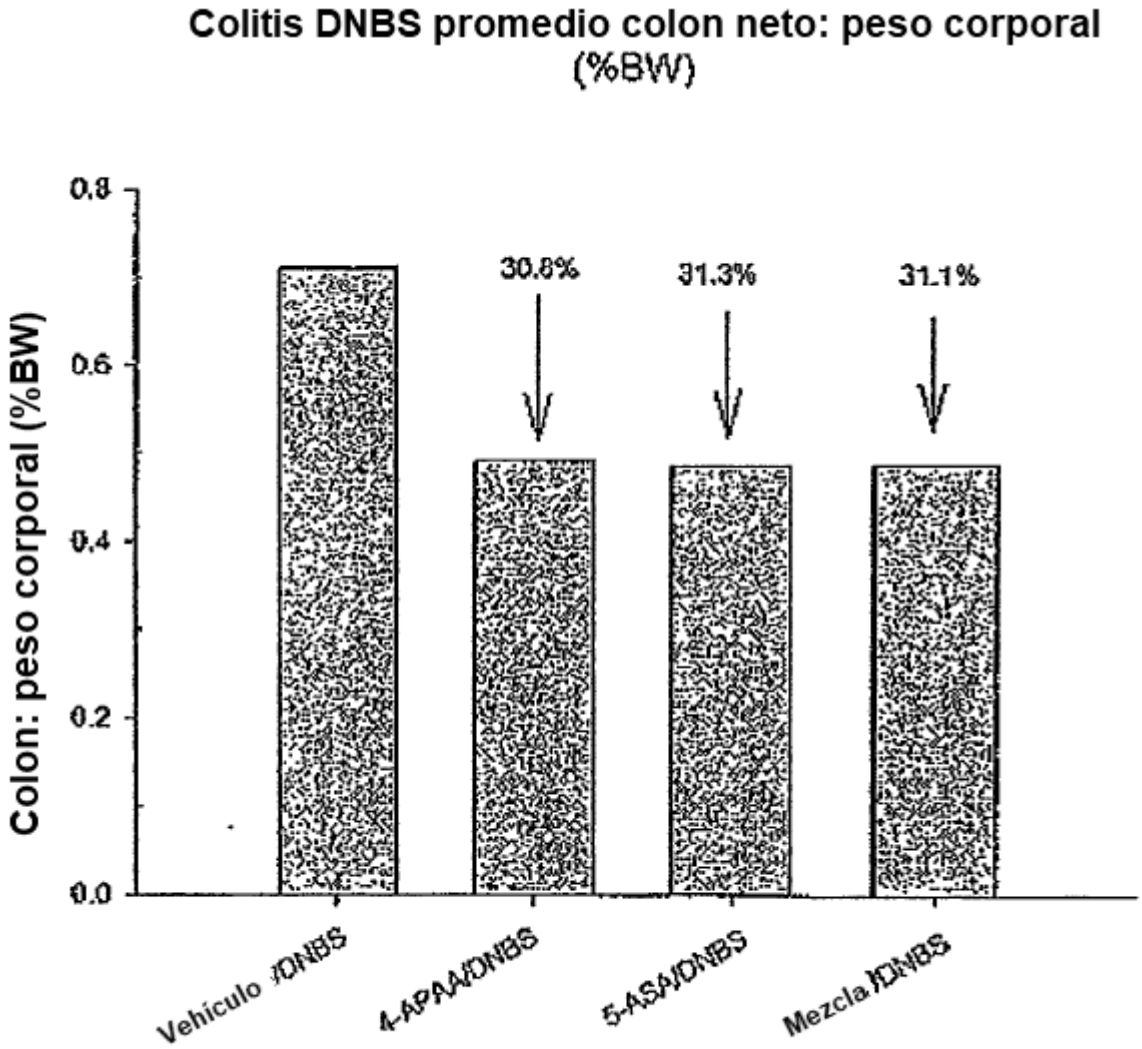

Colitis DNBS promedio colon neto: peso corporal (%BW)
Colon: peso corporal (%BW)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
30.8%
31.3%
31.1%
Vehículo /DNBS
4-APAA/DNBS
5-ASA/DNBS
Mezcla /DNBS

FIGURA 3

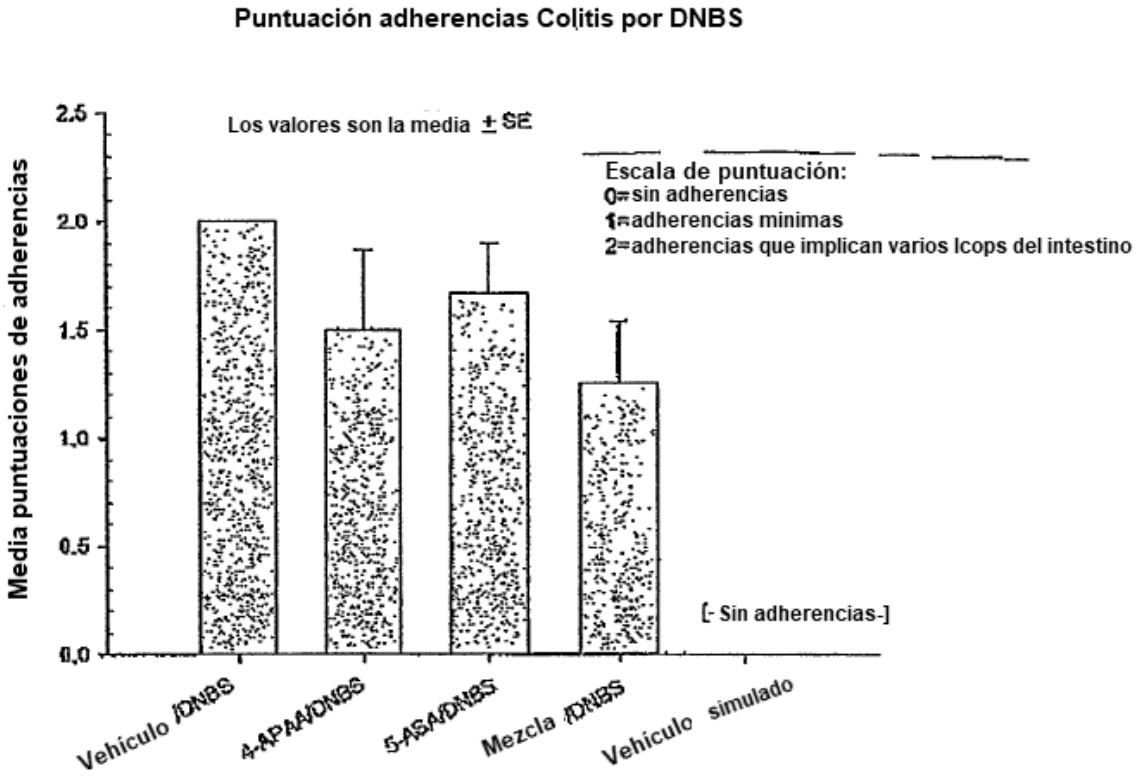

Puntuación adherencias Colitis por DNBS
Los valores son la media ± SE
Escala de puntuación:
0=sin adherencias
1=adherencias minimas
2=adherencias que implican varios lcops del intestino
Media puntuaciones de adherencias
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
[- Sin adherencias-]
Vehículo /DNBS
4-APAA/DNBS
5-ASA/DNBS
Mezcla /DNBS
Vehículo simulado

FIGURA 4

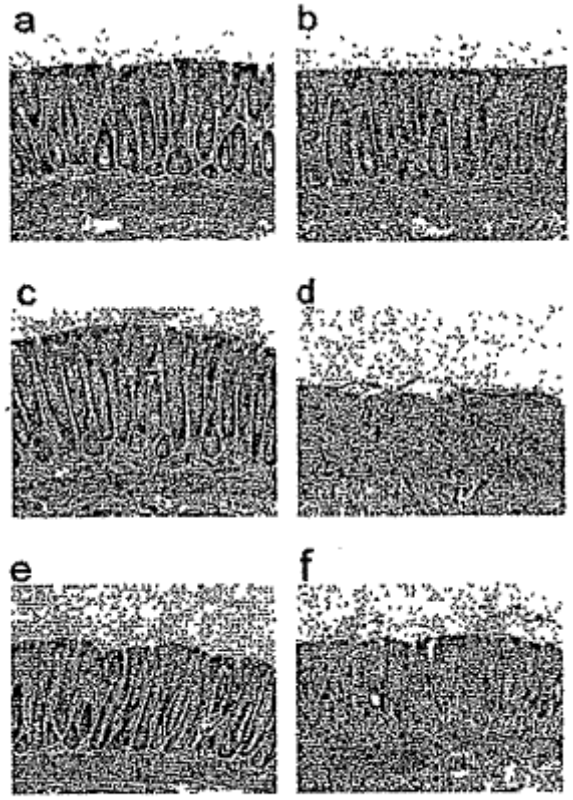


FIGURA 5

FIGURA 6

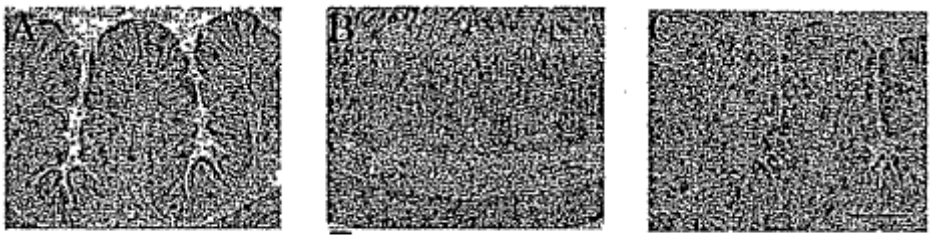


FIGURA 7

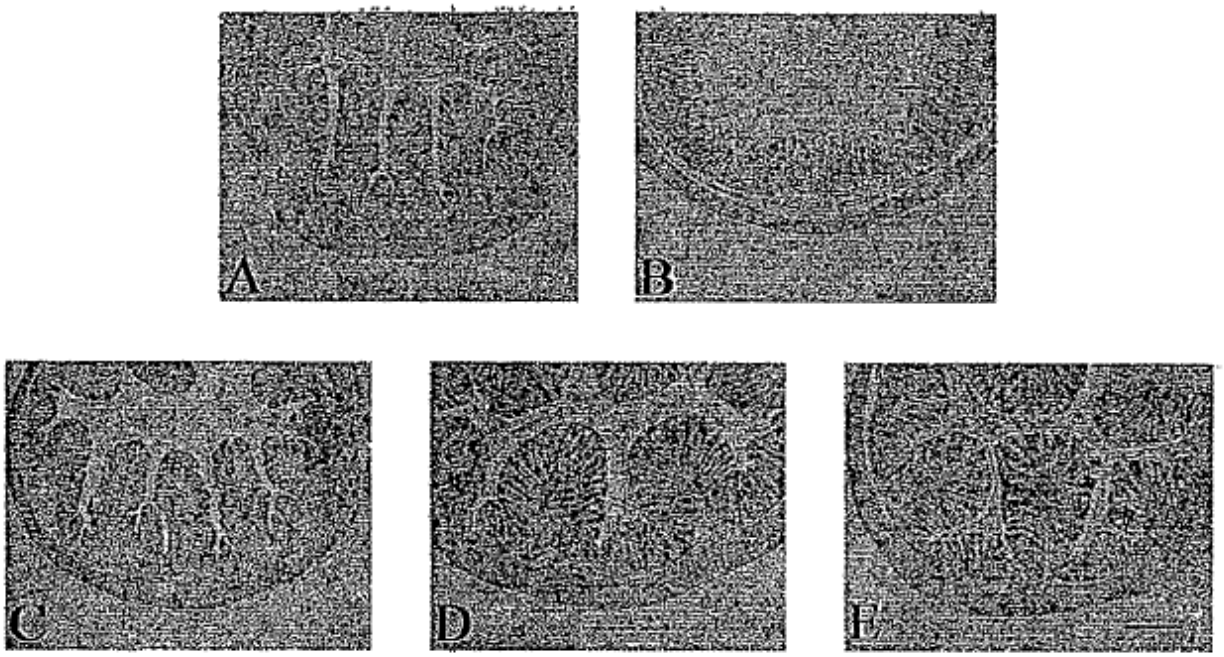


FIGURA 8

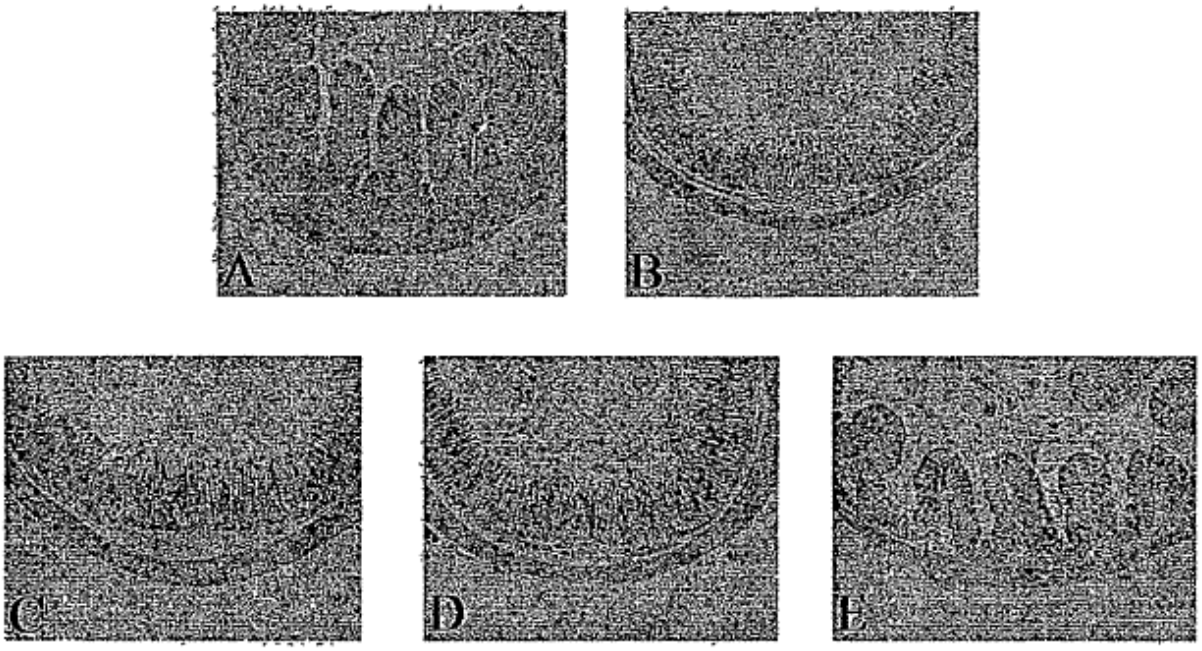


FIGURA 9

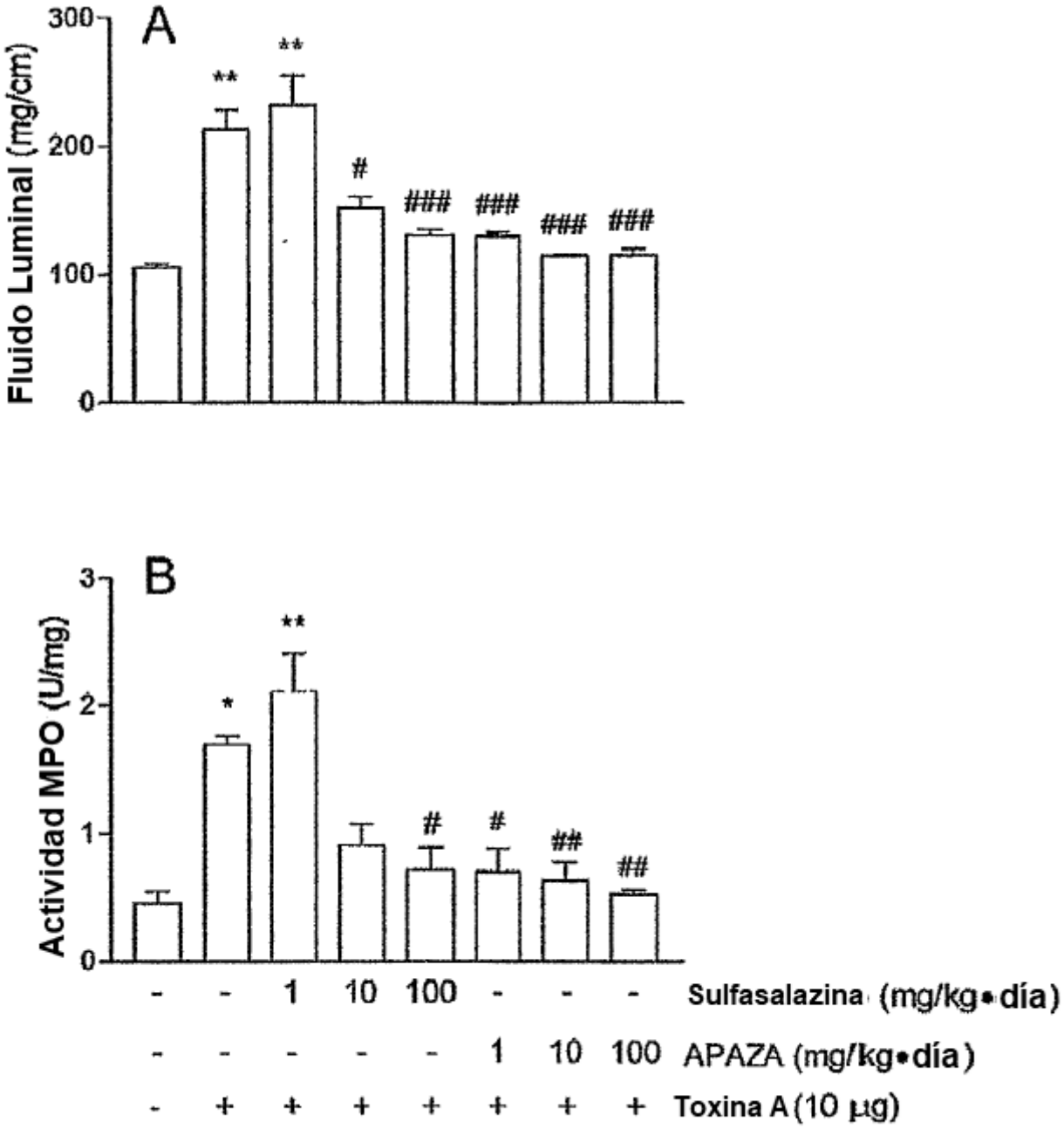

A
Fluido Luminal (mg/cm)
300
200
100
0
**
**
#
###
###
###
###
B
Actividad MPO (U/mg)
3
2
1
0
*
**
#
#
##
##
- - 1 10 100 - - - Sulfasalazina (mg/kg•día)
- - - - - 1 10 100 APAZA (mg/kg•día)
- + + + + + + + Toxina A (10 µg)

FIGURA 10

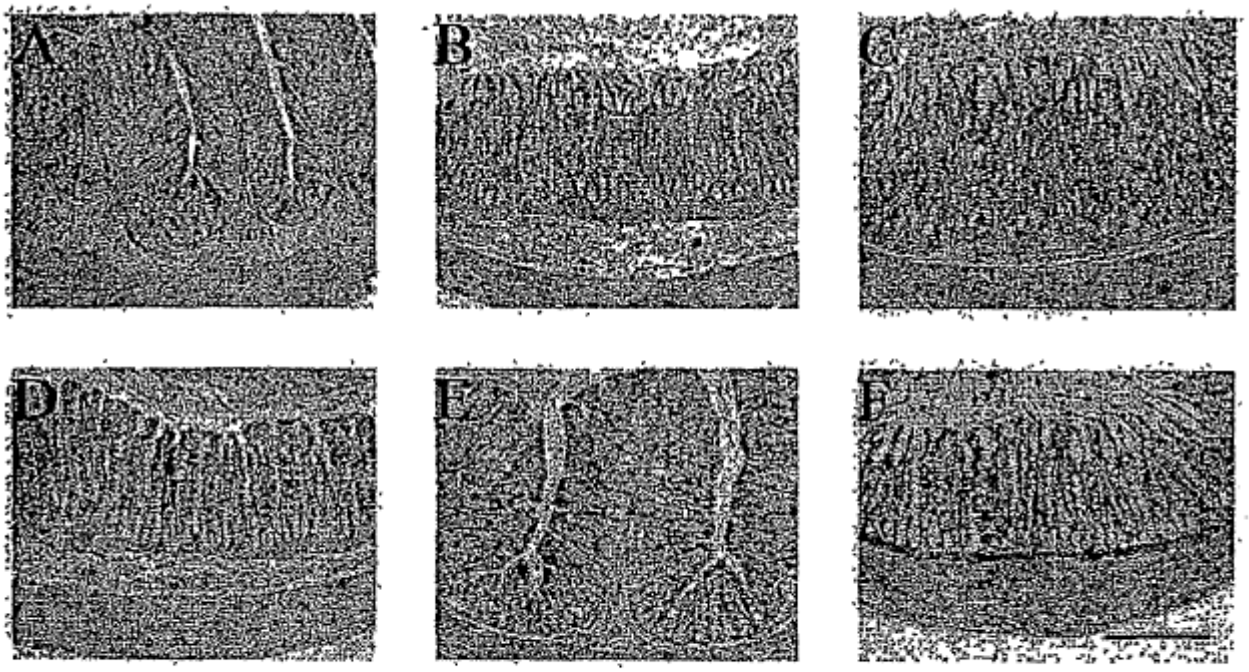


FIGURA 11

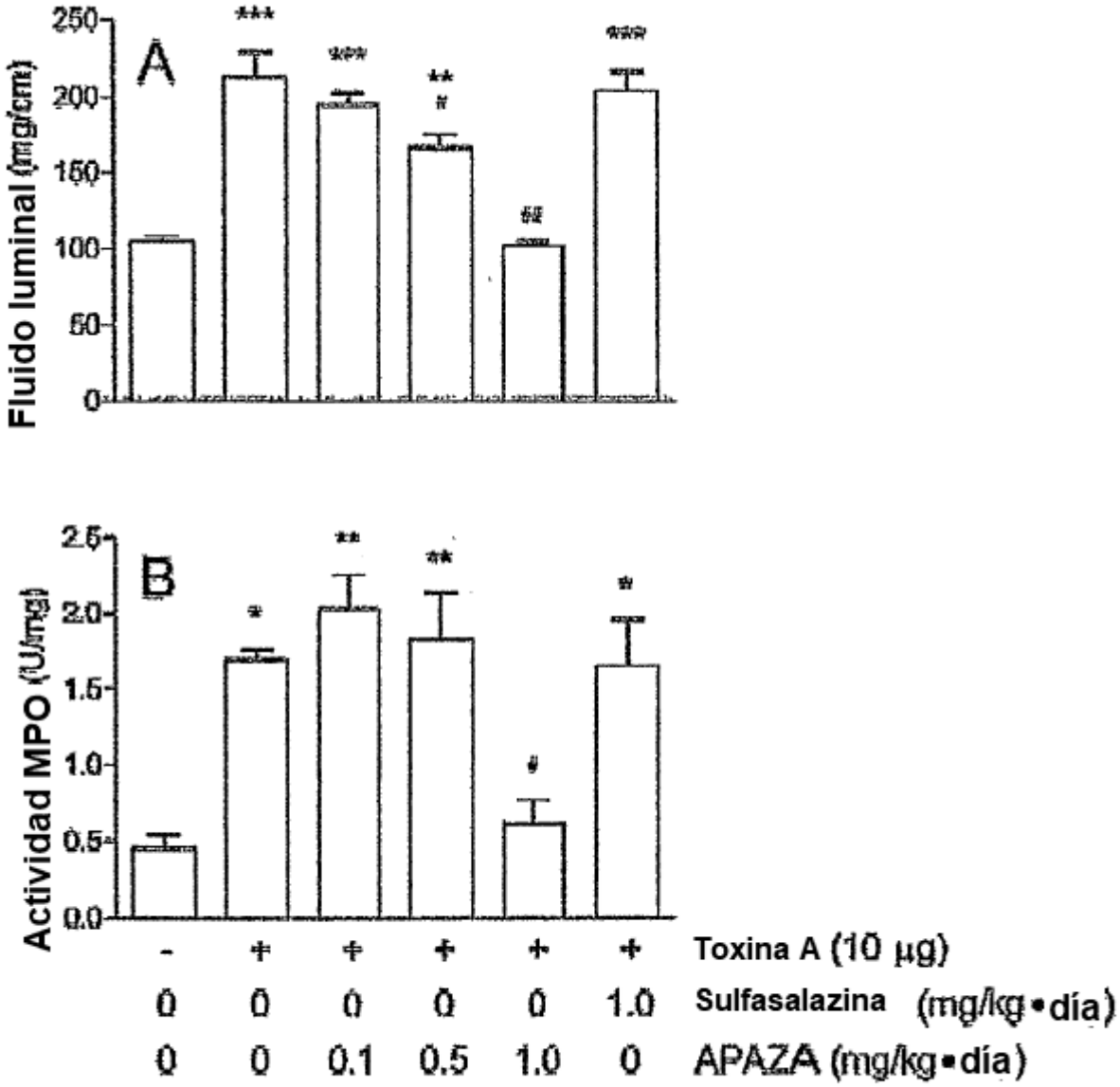

A
Fluido luminal (mg/cm)
250
200
150
100
50
0
B
Actividad MPO (U/mg)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
- + + + + +
Toxina A (10 µg)
0 0 0 0 0 1.0
Sulfasalazina (mg/kg•día)
0 0 0.1 0.5 1.0 0
APAZA (mg/kg•día)

FIGURA 12

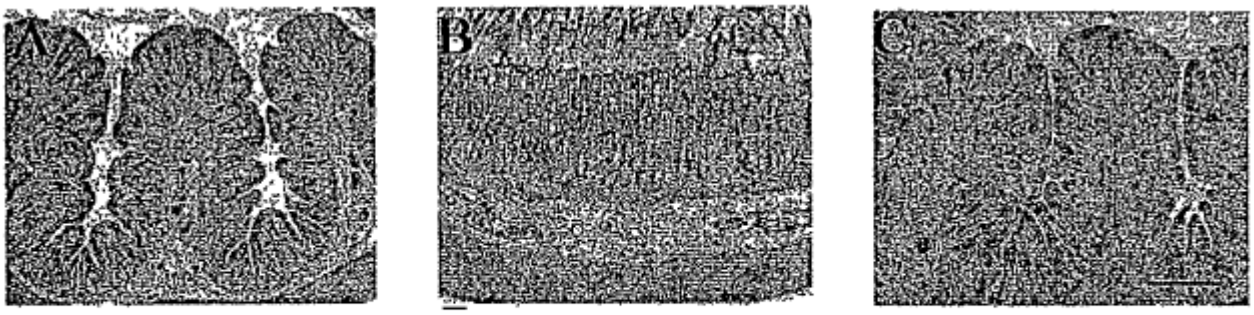


FIGURA 13

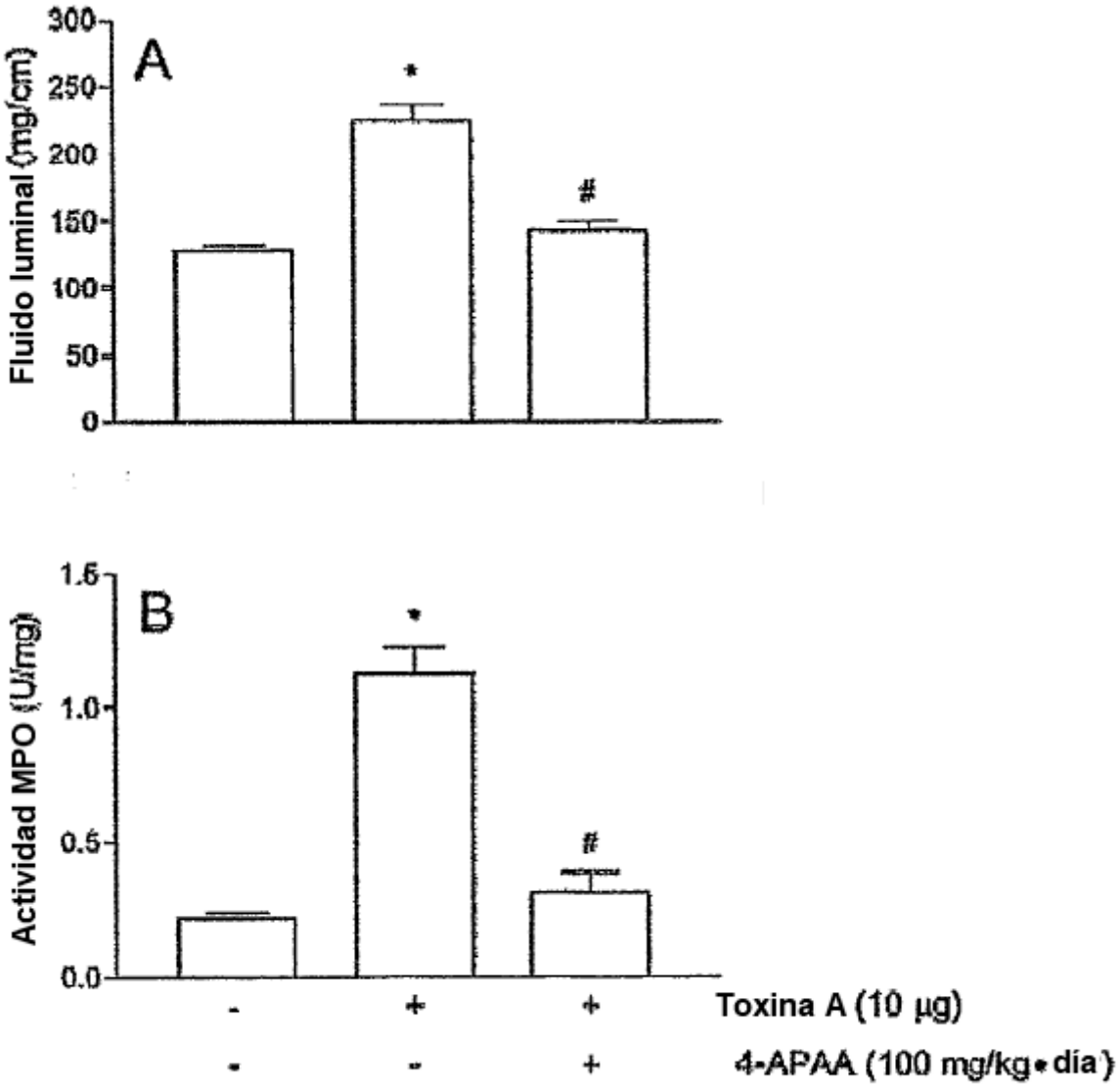

A
Fluido luminal (mg/cm)
300
250
200
150
100
50
0
*
#
B
Actividad MPO (U/mg)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
-
+
+
Toxina A (10 µg)
-
-
+
4-APAA (100 mg/kg•día)

FIGURA 14

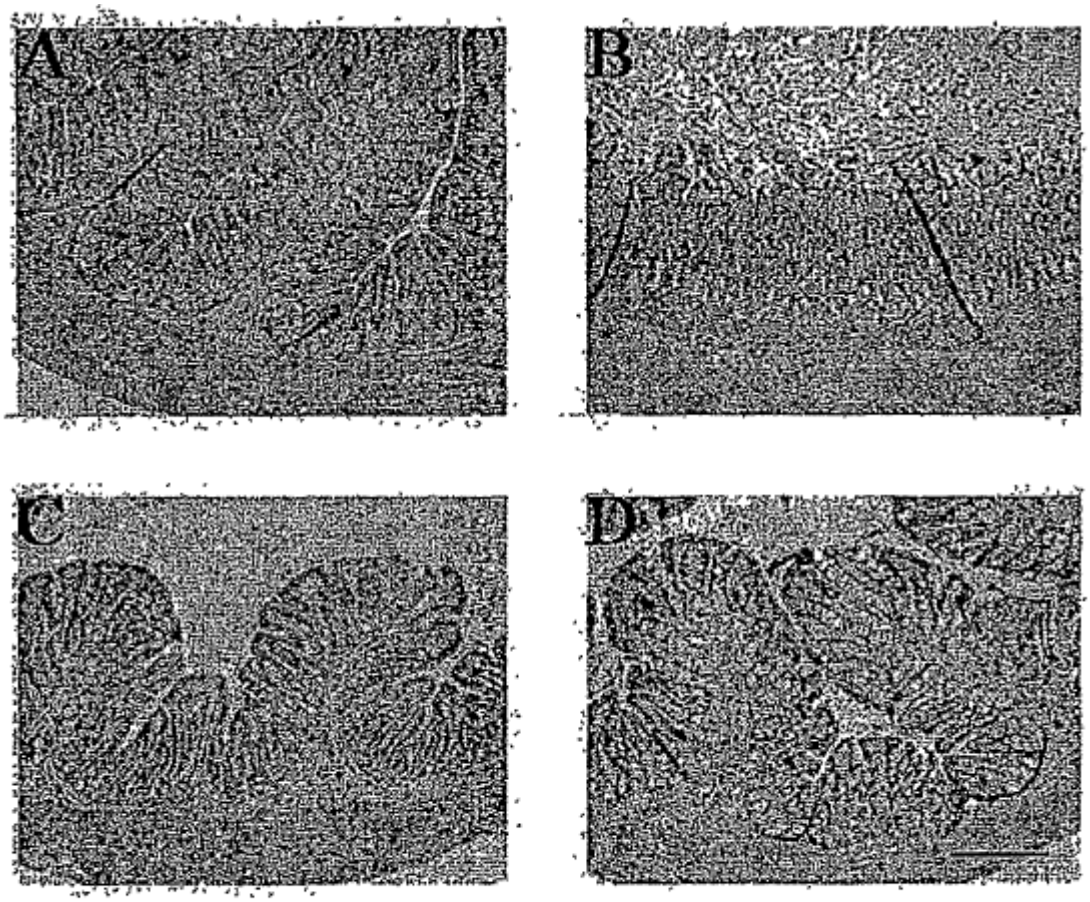


FIGURA 15

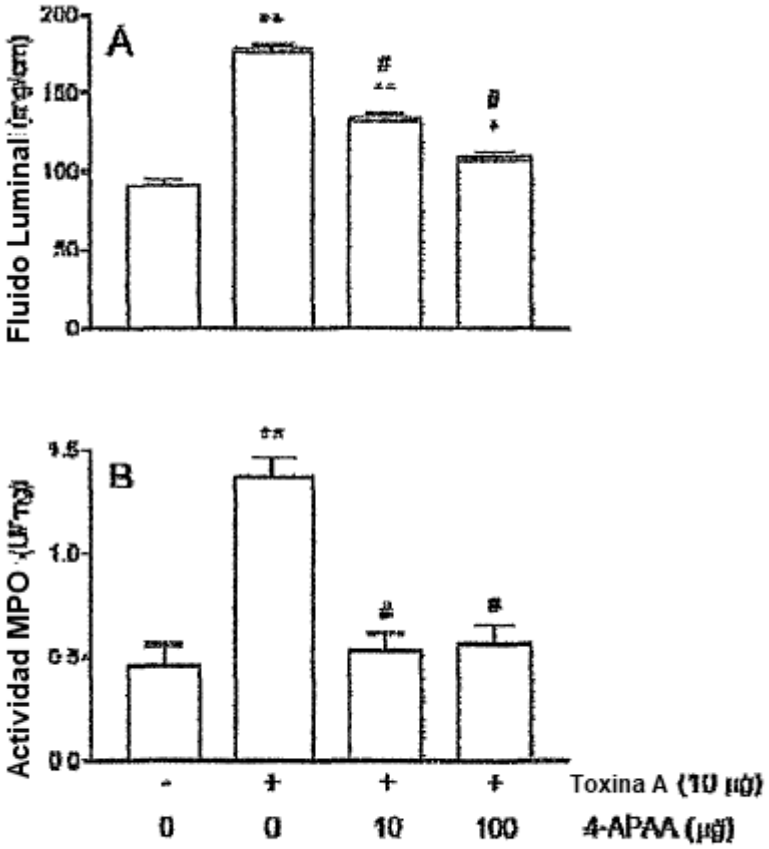

A
Fluido Luminal
200
150
100
50
0
B
Actividad MPO
1.5
1.0
0.5
0.0
-
+
+
+
Toxina A (10 µg)
0
0
10
100
4-APAA (µg)

FIGURA 16

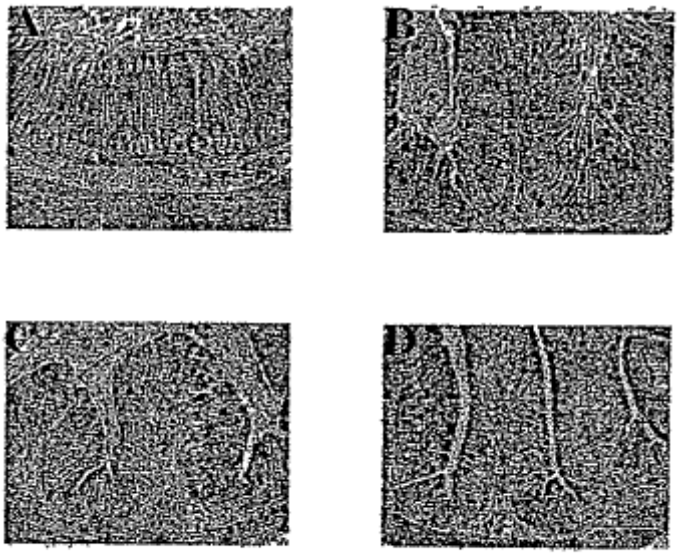


FIGURA 17

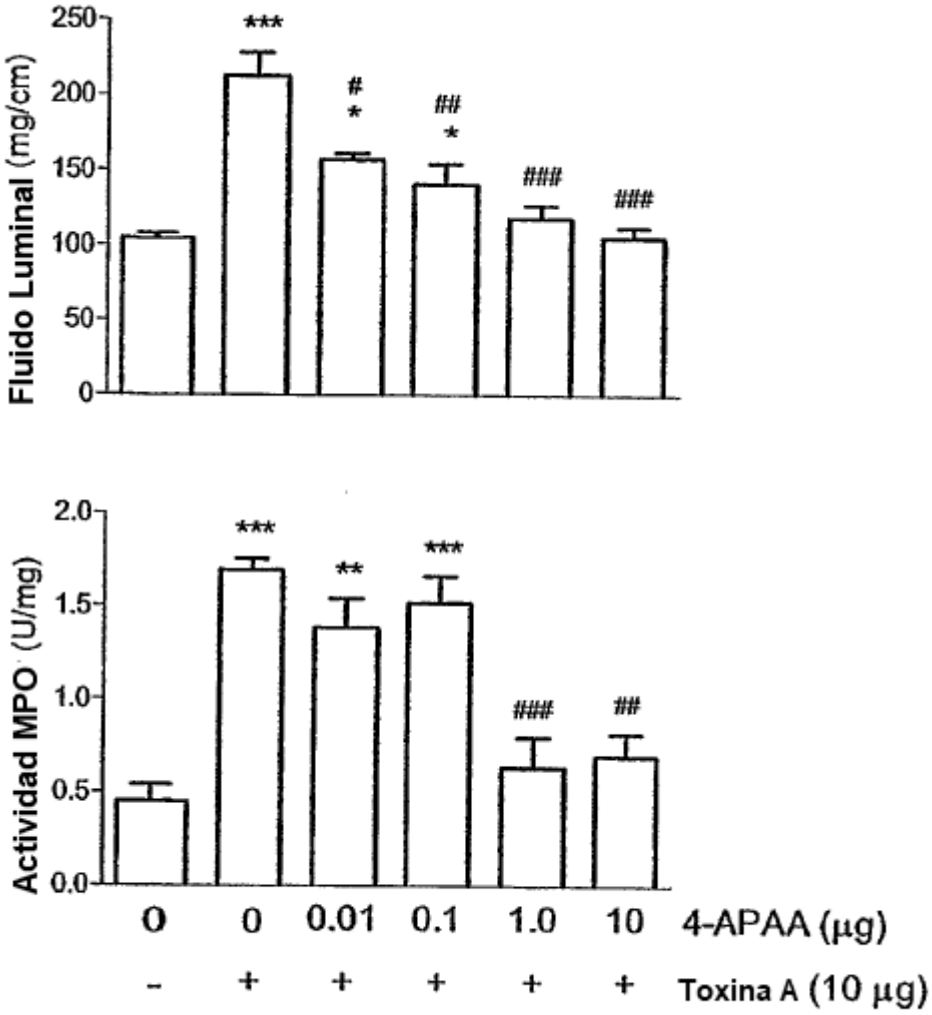

Fluido Luminal (mg/cm)
250
200
150
100
50
0
***
#
*
##
*
###
###
Actividad MPO (U/mg)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
***
###
##
0
0
0.01
0.1
1.0
10
4-APAA (µg)
-
+
+
+
+
+
Toxina A (10 µg)

FIGURA 18

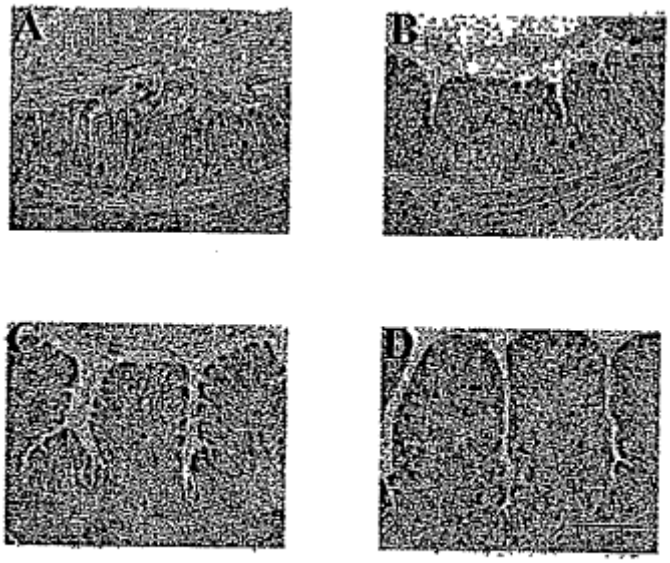


FIGURA 19

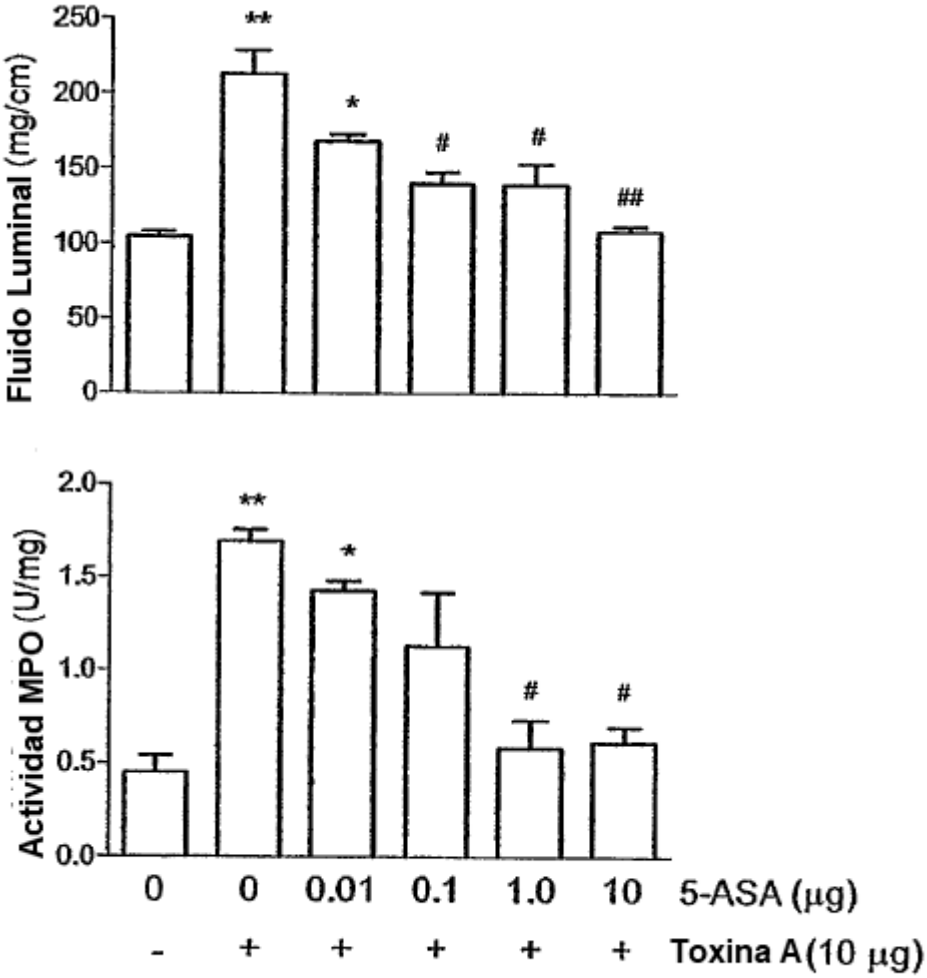

Fluido Luminal (mg/cm)
250
200
150
100
50
0
**
*
#
#
##
Actividad MPO (U/mg)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*
#
#
0
0
0.01
0.1
1.0
10
5-ASA (μg)
-
+
+
+
+
+
Toxina A (10 μg)

FIGURA 20

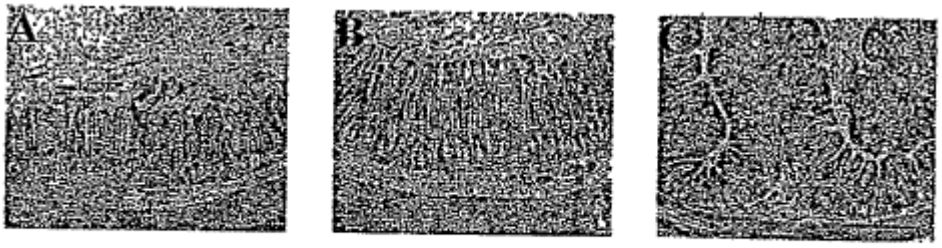


FIGURA 21

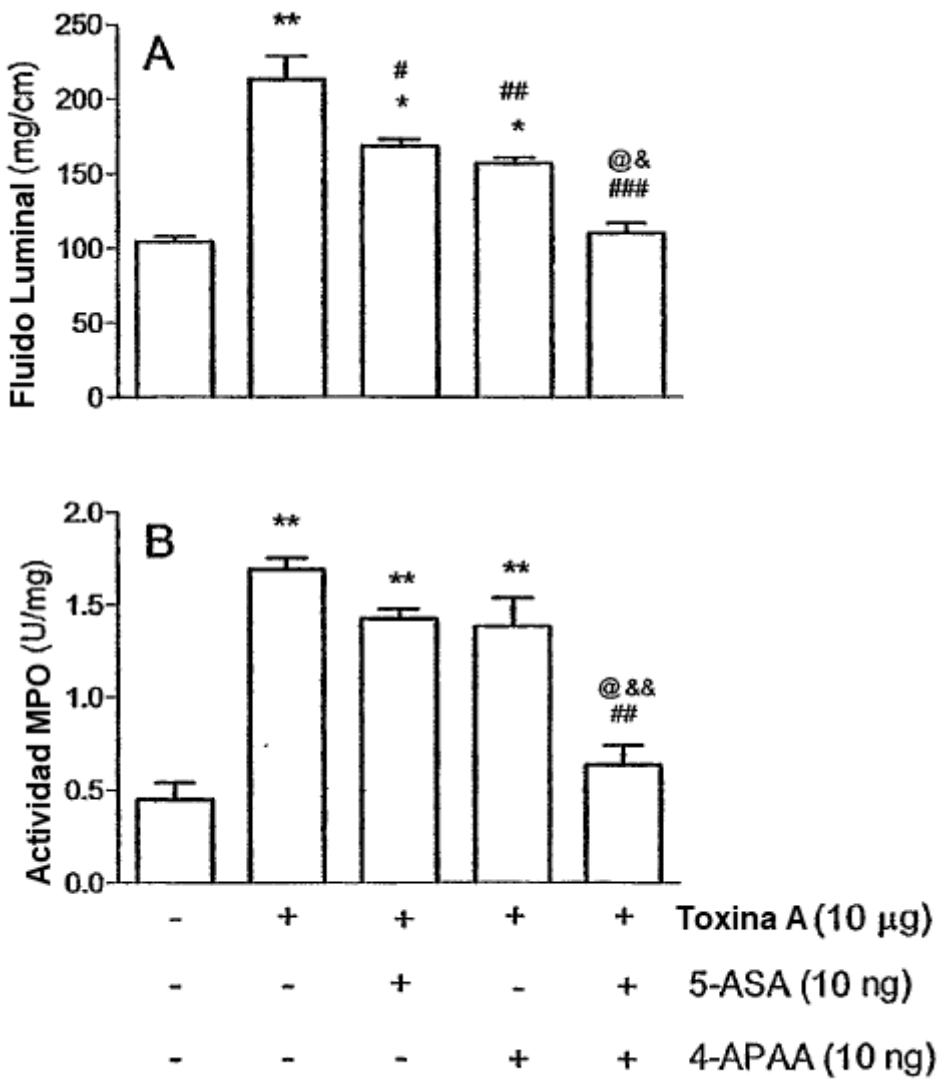

A
Fluido Luminal (mg/cm)
250
200
150
100
50
0
**
#
*
##
*
@&
###
B
Actividad MPO (U/mg)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
**
@ &&
##
- + + + + Toxina A (10 µg)
- - + - + 5-ASA (10 ng)
- - - + + 4-APAA (10 ng)

FIGURA 22