

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 639**

51 Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2012 PCT/US2012/040380**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170290**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2012 E 12796691 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2717692**

54 Título: **Ácidos tetrahidrocannabinol-11-oicos para su uso en el tratamiento de enfermedades fibróticas**

30 Prioridad:

04.06.2011 US 201161493435 P
31.05.2012 US 201213485044

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.04.2020

73 Titular/es:

CORBUS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
100 River Ridge Drive
Norwood, MA 02062, US

72 Inventor/es:

ZURIER, ROBERT, B. y
SELVI, ENRICO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 753 639 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

Ácidos tetrahidrocannabinol-11-oicos para su uso en el tratamiento de enfermedades fibróticas

Campo de la invención

5 Esta invención pertenece al campo de la química medicinal y se refiere al tratamiento de la fibrosis pulmonar en sujetos.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades fibróticas, incluyendo la fibrosis pulmonar, la esclerosis sistémica, la cirrosis hepática, la enfermedad cardiovascular, la enfermedad renal progresiva y la degeneración macular, son una de las causas principales de la morbilidad y la mortalidad y pueden afectar a todos los tejidos y sistemas orgánicos. La remodelación del tejido fibrótico también puede influir en la metástasis del cáncer y acelerar el rechazo crónico en injertos en receptores de trasplantes. Sin embargo, a pesar de su enorme impacto en la salud humana, actualmente no hay todavía tratamientos aprobados que aborden directamente el/los mecanismo(s) de la fibrosis.

15 Milam *et al*, 2008, American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology, 294 (5): 891-901 han descrito que los agonistas del PPAR inhiben los fenotipos profibróticos en fibroblastos de pulmón humano y la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

Compendio de la invención

Esta invención pertenece al campo de la química medicinal y se refiere al tratamiento de la fibrosis pulmonar en sujetos.

20 La invención proporciona una composición que comprende ácido ajulémico para usar en el tratamiento de la fibrosis pulmonar en sujetos.

25 En una realización, dicha composición se administra por vía oral. En una realización, dicha composición se administra por vía intravenosa. En una realización, dicha composición se administra a través de un implante o parche. En una realización, dicho implante o parche proporciona una liberación lenta de dicha composición. En una realización, dicha composición se administra por inhalación. En una realización, dicha composición se administra en un comprimido.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de esta invención, se definen varios términos a continuación. Los términos definidos en este documento tienen los significados comúnmente entendidos por una persona experta en las áreas relevantes para la presente invención.

30 Los compuestos o composiciones descritos también deben incluir, en algunas realizaciones, sus tautómeros, sus isómeros geométricos, sus formas ópticamente activas como enantiómeros, diastereómeros y sus formas de racemato, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, polimorfos y combinaciones de los mismos.

35 El término "epímeros", como se usa en el presente documento, se refiere a diastereómeros que difieren en la configuración de un solo centro estereogénico. Los diastereómeros son una clase de estereoisómeros que no son superponibles, no son imágenes especulares entre sí, a diferencia de los enantiómeros que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

40 La expresión "vehículos comunes", como se usa en el presente documento, se refiere a aquellos que se emplean en preparaciones farmacéuticas estándar e incluye excipientes, aglutinantes y desintegradores cuya elección depende de la forma de dosificación específica utilizada. Ejemplos típicos del excipiente son almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y celulosa; los aglutinantes ilustrativos son polivinilpirrolidona, almidón, sacarosa, hidroxipropilcelulosa y goma arábiga; los desintegrantes ilustrativos incluyen almidón, agar, gelatina en polvo, celulosa y CMC. También se pueden emplear otros excipientes, aglutinantes y desintegrantes comunes.

45 Las formulaciones de la composición farmacéutica de la presente invención que son adecuadas para la administración peroral se pueden proporcionar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos o suspensiones en soluciones no acuosas tales como jarabes, emulsiones o preparaciones, cada una conteniendo uno o más de los compuestos activos en cantidades predeterminadas.

Los gránulos pueden proporcionarse preparando primero una mezcla a fondo de uno o más de los ingredientes activos con uno o más de los componentes auxiliares mostrados anteriormente, luego moliendo la mezcla y clasificando los gránulos mediante tamizado a través de un tamiz.

50 El comprimido puede prepararse comprimiendo o formando uno o más de los ingredientes activos, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares.

Las cápsulas se pueden preparar haciendo primero un polvo o gránulos como una mezcla a fondo de uno o más de los ingredientes activos con uno o más componentes auxiliares, luego cargando la mezcla en una cápsula apropiada en una máquina de envasado, etc.

5 La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse como supositorios (para la administración rectal) con la ayuda de un vehículo común tal como la manteca de cacao. La composición farmacéutica de la presente invención también se puede formular en una forma de dosificación adecuada para su administración no parenteral mediante el envasado de uno o más ingredientes activos como sólidos secos en un recipiente estéril purgado con nitrógeno. La formulación seca resultante puede administrarse a pacientes de forma no parenteral después de dispersarse o disolverse en una cantidad dada de agua aséptica.

10 Si se desea, las formulaciones pueden contener además uno o más componentes auxiliares seleccionados entre excipientes, tampones, agentes aromatizantes, aglutinantes, tensioactivos, agentes espesantes y lubricantes.

15 La dosis, por supuesto, variará con la vía de administración, la gravedad de la enfermedad a tratar y el paciente a tratar, pero la dosis exacta finalmente elegida debe dejarse en manos del criterio del médico responsable del tratamiento. Si se determina una dosis deseada, el ingrediente activo puede administrarse una vez al día o, alternativamente, puede administrarse en tantas porciones como se considere apropiado a los intervalos adecuados. El ingrediente activo puede administrarse directamente sin mezclarse con ningún otro componente. Sin embargo, por varias razones, típicamente con el fin de proporcionar cierta facilidad para controlar el nivel de dosis, el compuesto activo se administra preferiblemente en una forma de dosificación farmacéutica.

20 El término "sales", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sal que forme complejos con los compuestos identificados contenidos en el presente documento, mientras se retenga la función deseada, por ejemplo, la actividad biológica. Los ejemplos de tales sales incluyen, entre otros, sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico) y sales formadas con ácidos orgánicos tales como, entre otras, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglútamico, ácido naftalenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico y ácido poligalacturónico. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición de bases que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales metálicas, tales como sales hechas de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc, o sales hechas de bases orgánicas que incluyen aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas cíclicas, tales como cafeína, arginina, dietilamina, N-etilpiperidina, histidina, glucamina, isopropilamina, lisina, morfina, N-etilmorfina, piperazina, piperidina, trietilamina, trimetilamina. Todas estas sales pueden prepararse por medios convencionales a partir del compuesto correspondiente de la invención haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o la base apropiados con el compuesto de la invención. A menos que se indique específicamente lo contrario, la presente invención contempla, en algunas realizaciones, sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos especificados.

40 El término "alquilo" cuando se usa sin el modificador "sustituido" se refiere a un grupo monovalente no aromático con un átomo de carbono saturado como el punto de unión, una estructura lineal o ramificada, de ciclo, cíclica o acíclica, sin dobles o triples enlaces carbono-carbono, y ningún átomo que no sea carbono e hidrógeno. Los grupos, $-\text{CH}_3$ (Me), $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (Et), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (*n*-Pr), $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (*iso*-Pr o *i*-Pr), $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ (ciclopropilo), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (*n*-Bu), $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ (*sec*-butilo o *sec*-Bu), $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (*iso*-butilo o *i*-Bu), $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (*terc*-butilo o *t*-Bu), $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (*neo*-pentilo), ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo son ejemplos no limitantes de grupos alquilo. La expresión "alquilo sustituido" se refiere a un grupo monovalente no aromático con un átomo de carbono saturado como punto de unión, una estructura lineal o ramificada, ciclo, cíclica o acíclica, sin dobles o triples enlaces carbono-carbono y, al menos, un átomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Los siguientes grupos son ejemplos no limitantes de grupos alquilo sustituidos: $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{CH}_2\text{SH}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ y $-\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$.

50 El término "alcohol" se refiere a cualquiera de una clase de compuestos orgánicos que contienen el grupo funcional hidroxilo ($-\text{OH}$), excepto aquellos en los que el grupo OH está unido a un anillo aromático (fenoles).

55 El término "arilo", cuando se usa sin el modificador "sustituido", se refiere a un grupo monovalente con un átomo de carbono aromático como punto de unión, formando dicho átomo de carbono parte de una estructura de anillo aromático de seis miembros en donde los átomos del anillo son todos de carbono, y en el que el grupo monovalente consiste en átomos no distintos a carbono e hidrógeno. Ejemplos no limitantes de grupos arilo incluyen fenilo (Ph), metilfenilo, $\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_2$ (dimetilfenilo), $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_3$ (etilfenilo), $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (propilfenilo), $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}(\text{CH}_2)_2$, $-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ (metilfenilfenilo), $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CH}_2$ (vinilfenilo), $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CCH}_3$, naftilo y el grupo monovalente derivado del bifenilo. La expresión "arilo sustituido" se refiere a un grupo monovalente con un átomo de carbono aromático como punto de unión, formando parte dicho átomo de carbono de una estructura de anillo aromático de seis miembros en el que los átomos del anillo son todos carbono, y

en el que el grupo monovalente tiene además al menos un átomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo sustituidos incluyen los grupos: -C₆H₄F, -C₆H₄Cl, -C₆H₄Br, -C₆H₄I, -C₆H₄OH, -C₆H₄OCH₃, -C₆H₄OCH₂CH₃, -C₆H₄OC(O)CH₃, -C₆H₄NH₂, -C₆H₄NHCH₃, -C₆H₄N(CH₃)₂, -C₆H₄CH₂OH, -C₆H₄CH₂OC(O)CH₃, -C₆H₄CH₂NH₂, -C₆H₄CF₃, -C₆H₄CN, -C₆H₄CHO, -C₆H₄CHO, -C₆H₄C(O)CH₃, -C₆H₄C(O)C₆H₅, -C₆H₄CO₂H, -C₆H₄CO₂CH₃, -C₆H₄CONH₂, -C₆H₄CONHCH₃, y -C₆H₄CON(CH₃)₂.

Además, se pretende que los átomos que forman los compuestos de la presente invención incluyan todas las formas isotópicas de tales átomos. Los isótopos, como se usan en el presente documento, incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio, y los isótopos de carbono incluyen ¹³C y ¹⁴C. De manera similar, se contempla que uno o más átomo(s) de carbono de un compuesto de la presente invención puedan ser reemplazados por un átomo(s) de silicio. Además, se contempla que uno o más átomo(s) de oxígeno de un compuesto descrito en el presente documento puedan reemplazarse por un átomo(s) de azufre o selenio.

En estructuras en las que la estereoquímica no se indica explícitamente, se supone que se considera cualquiera de las estereoquímicas y se reivindican ambos isómeros.

Cualquier valencia indefinida en un átomo de alguna de las estructuras mostradas en esta solicitud representa implícitamente algún átomo de hidrógeno unido al átomo.

El término "eficaz", como ese término se usa en la memoria descriptiva y/o reivindicaciones, significa adecuado para lograr un resultado deseado o esperado.

Un "isómero" de un primer compuesto es un compuesto separado en el que cada molécula contiene los mismos átomos constituyentes que el primer compuesto, pero donde la configuración de esos átomos en tres dimensiones difiere.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a un organismo mamífero vivo, como un ser humano, mono, vaca, oveja, cabra, perro, gato, ratón, rata, conejillo de indias o especies transgénicas del mismo. En ciertas realizaciones, el paciente o sujeto es un primate. Ejemplos no limitantes de sujetos humanos son adultos, jóvenes, niños y fetos.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa lo que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y no es biológica ni de otro modo indeseable e incluye lo que es aceptable para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano.

"Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales de compuestos de la presente invención que son farmacéuticamente aceptables, como se definió anteriormente, y que poseen la actividad farmacológica deseada. Dichas sales incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o con ácidos orgánicos tales como ácido 1, 2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 3-fenilpropiónico, 4,4'-metilénbis(ácido 3-hidroxi-2-en-1-carboxílico), ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido acético, ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos sulfúricos alifáticos, ácidos sulfúricos aromáticos, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido canforsulfónico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido etanosulfónico, ácido fumárico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido hidroxinaftoico, ácido láctico, ácido laurilsulfúrico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido mucónico, ácido *o*-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido oxálico, ácido *p*-clorobencenosulfónico, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácido propiónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido butilacético terciario, ácido trimetilacético. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición de bases que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes y son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de aluminio e hidróxido de calcio. Las bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina. Debe reconocerse que el anión o catión particular que forma parte de cualquier sal de esta invención no es crítico, siempre que la sal, en su conjunto, sea farmacológicamente aceptable. Se presentan otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y sus métodos de preparación y uso en el Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P. H. Stahl y C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002) [1].

Como se usa en el presente documento, "predominantemente un enantiómero" significa que un compuesto contiene al menos aproximadamente el 85% de un enantiómero, o más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de un enantiómero, o incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de un enantiómero, o lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 99% de un enantiómero. De manera similar, la frase "sustancialmente libre de otros isómeros ópticos" significa que la composición contiene como máximo aproximadamente 15% de otro enantiómero o diastereómero, más preferiblemente como máximo aproximadamente 10% de otro enantiómero o diastereómero, incluso más preferiblemente como máximo aproximadamente 5% de otro enantiómero o diastereómero, y lo más preferiblemente como máximo aproximadamente 1% de otro enantiómero o diastereómero.

La "prevención" o "prevenir" incluye: (1) inhibir la aparición de una enfermedad en un sujeto o paciente que puede estar en riesgo y/o predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o muestra alguna o todas las patologías o síntomas de la enfermedad, y/o (2) ralentizar el inicio de la patología o sintomatología de una enfermedad en un sujeto o paciente que puede estar en riesgo y/o predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o muestra algunas o todas las patologías o sintomatologías de la enfermedad.

Un "estereoisómero" o "isómero óptico" es un isómero de un compuesto dado en el que los mismos átomos están unidos a los mismos otros átomos, pero en el que difiere la configuración de esos átomos en tres dimensiones. Los "enantiómeros" son estereoisómeros de un compuesto dado que son imágenes especulares entre sí, como las manos izquierda y derecha. Los "diastereómeros" son estereoisómeros de un compuesto dado que no son enantiómeros.

Los enantiómeros son compuestos que individualmente tienen propiedades que se dice que tienen "actividad óptica" y consisten en moléculas con al menos un centro quiral, casi siempre un átomo de carbono. Si un compuesto particular es dextrorrotario, su enantiómero será levorrotario, y viceversa. De hecho, los enantiómeros rotarán la luz polarizada el mismo número de grados, pero en direcciones opuestas. "Dextrorrotación" y "levorrotación" (también deletreada laevorrotación) se refieren, respectivamente, a las propiedades de la luz polarizada del plano rotatorio en sentido horario (para la dextrorrotación) o en sentido antihorario (para la levorrotación). Un compuesto con dextrorrotación se llama "dextrorrotario", mientras que un compuesto con levorrotación se llama "levorrotario". Una medida estándar del grado en que un compuesto es dextrorrotario o levorrotario es la cantidad llamada "rotación específica" "[α]". Los compuestos dextrorrotarios tienen una rotación específica positiva, mientras que los compuestos levorrotarios la tienen negativa. Se dice que dos enantiómeros tienen rotaciones específicas iguales y opuestas. Los compuestos dextrorrotarios llevan el prefijo "(+)-" o "d-". Del mismo modo, un compuesto levorrotario suele tener el prefijo "(-)-" o "l-". Estos prefijos "d-" y "l-" no deben confundirse con los prefijos "D-" y "L-" en función de la configuración real de cada enantiómero, siendo considerada la forma D la versión sintetizada a partir del compuesto (+) natural. Una mezcla de enantiómeros de los compuestos tiene el prefijo "(±)-". Una mezcla igual de enantiómeros de los compuestos se considera "ópticamente inactiva".

La invención contempla que para cualquier estereocentro o eje de quiralidad para el cual no se ha definido la estereoquímica, ese estereocentro o eje de quiralidad puede estar presente en su forma R, forma S, o como una mezcla de las formas R y S, incluidas las formas mezclas racémicas y no racémicas.

La presente invención contempla las composiciones descritas anteriormente en "cantidades terapéuticamente eficaces" o "cantidades farmacéuticamente eficaces", lo que significa aquella cantidad que, cuando se administra a un sujeto o paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para llevar a cabo dicho tratamiento en dicha enfermedad, o para mejorar o reducir uno o más síntomas de una enfermedad o afección (p. ej., reducir el engrosamiento dérmico).

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" no se limitan al caso en el que el sujeto (por ejemplo, un paciente) se cura y la enfermedad se erradica. Más bien, la presente invención también contempla un tratamiento que simplemente reduce los síntomas, mejora (hasta cierto punto) y/o retrasa la progresión de la enfermedad. No se pretende que la presente invención se limite a casos en los que se cura una enfermedad o afección. Es suficiente que se reduzcan los síntomas. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o mencionado en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto activo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, como agua y aceites, incluidos los del petróleo, origen animal, vegetal o sintético, como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser una solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Cuando se administra a un sujeto, los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferiblemente estériles. El agua puede ser un vehículo cuando el compuesto activo se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH.

Los azúcares farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, sacarosa, dextrosa, maltosa, galactosa, ramnosa y lactosa. Los alcoholes de azúcar farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, manitol, xilitol y sorbitol.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la fórmula para los derivados del ácido (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oico.

La Figura 2 muestra un esquema sintético para derivados de ácidos (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oicos.

La Figura 3 muestra varios derivados del ácido (3R,4R)- Δ^8 -tetrahidrocannabinol-11-oico.

Figura 4. El ácido ajulémico (AjA) previene la fibrosis dérmica inducida por bleomicina (BLM). (A) El engrosamiento dérmico, la hipertrofia epidérmica, la atrofia de la grasa subcutánea y la infiltración de leucocitos en las capas dérmicas profundas y los espacios perivasculares se observaron en la piel lesionada de ratones expuestos a BLM. El tratamiento con AjA (1 mg/kg/día) conservó la arquitectura dérmica y las capas de grasa subcutánea, y redujo notablemente la infiltración de leucocitos. Tinción con hematoxilina y eosina. Aumento original x10. (B) Histogramas que muestran el grosor dérmico de la piel lesionada. Después de 21 días de tratamiento con AjA (1 mg/kg/día), el grosor dérmico fue igual al del grupo control. (C) Histogramas que muestran el contenido de hidroxiprolina de la piel dañada. Después de 21 días de tratamiento con AjA (1 mg/kg/día), el grosor dérmico fue igual al del grupo de control. (D) Histogramas que muestran una reducción significativa en el número de células fibroblásticas con forma de huso positivas para α -actina de músculo liso α (α -SMA) por campo microscópico alto después del tratamiento con AjA. Cada grupo de tratamiento, n = 8. Todos los valores son medias \pm DE. El análisis de varianza se utilizó para comparar medias múltiples, seguido de la prueba *post hoc* de Student-Newman Keuls para comparaciones múltiples.

La Figura 5 muestra los efectos antifibróticos del ácido ajulémico (AjA) en ratones AdTGFbRI. (A) La fibrosis dérmica en ratones AdTGFbRI tratados con AjA (1 mg/kg/día) se redujo en comparación con los ratones control. Tinción con hematoxilina y eosina. Aumento original x10. (B) Histogramas que muestran una reducción significativa en el espesor dérmico de la piel dañada con AdTGFbRI después del tratamiento con AjA. (C) El contenido de hidroxiprolina de la piel dañada con AdTGFbRI se redujo después del tratamiento con AjA. (D) Histogramas que muestran una reducción significativa en las células fibroblásticas positivas para la actina del músculo liso α (α -SMA) por campo microscópico alto después del tratamiento con AjA de ratones AdTGFbRI. Cada grupo de tratamiento, n = 8. Todos los valores son medias \pm DE. El análisis de varianza se utilizó para comparar medias múltiples, seguido de la prueba *post hoc* de Student-Newman Keuls para comparaciones múltiples.

La Figura 6 muestra que el ácido ajulémico (AjA) inhibe la progresión de la fibrosis dérmica en un modelo modificado de fibrosis inducida por bleomicina (BLM) de 6 semanas. (A) El tratamiento con AjA (1 mg/kg/día) evitó una mayor acumulación de matriz, pero no indujo la regresión de la fibrosis preexistente. Tinción con hematoxilina y eosina. Aumento original x10. (B) El tratamiento con AjA redujo el espesor dérmico de la piel dañada durante las últimas 3 semanas. (C) Histogramas que muestran el contenido de hidroxiprolina de la piel dañada. El tratamiento con AjA interrumpió la deposición de colágeno durante las últimas 3 semanas, sin regresión de la acumulación de matriz extracelular preexistente. (D) Histogramas que muestran una reducción significativa en el número de células fibroblásticas en forma de huso positivas para actina del músculo liso α (α -SMA) por campo microscópico alto después del tratamiento con AjA. Cada grupo de tratamiento, n = 8. Todos los valores son medias \pm DE. El análisis de la varianza se utilizó para comparar medias múltiples, seguido de la prueba *post hoc* de Student-Newman Keuls para comparaciones múltiples.

La Figura 7. El ácido ajulémico (AjA) disminuye la neosíntesis de colágeno en fibroblastos de esclerosis sistémica cutánea difusa (dcSSc) de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento con AjA (0,1, 1, 5 y 10 μ M) indujo una reducción dependiente de la dosis de los niveles propéptídicos de procolágeno tipo I (PIP) en el sobrenadante de los fibroblastos SSc. Los resultados son la media \pm DE cinco experimentos independientes. * p <0,001 frente a no tratado.

La Figura 8 muestra que los efectos antifibróticos del ácido ajulémico (AjA) están mediados por el receptor y activado por proliferador de peroxisomas (PPAR- γ). (A) El efecto inhibitorio de AjA sobre la producción propéptídica de procolágeno tipo I (PIP) se revirtió por completo mediante la preincubación de las células con el antagonista irreversible de PPAR- γ GW9662 a 10 μ M. Los resultados son la media \pm DE de cinco experimentos independientes. *p <0,001 frente a no tratado. (B) AjA mejoró la producción de 15d-PGJ2 en los fibroblastos de una esclerosis sistémica (SSc). Se encontraron cantidades más pequeñas del ligando natural de PPAR- γ , 15d-PGJ2, en el sobrenadante de fibroblastos de SSc cutáneo difuso (dcSSc) en comparación con las cantidades de controles sanos. Después del tratamiento con AjA, los niveles de sobrenadante de 15d-PGJ2 aumentaron significativamente de una manera dependiente de la dosis. Los resultados son la media \pm DE de cinco experimentos independientes. #p <0,001 frente a fibroblastos sanos; *p <0,001 frente a no tratado. (C) AjA aumentó la expresión de PPAR- γ en fibroblastos dcSSc. dcSSc y fibroblastos sanos fueron tratados con AjA a concentraciones crecientes (0,1, 1, 5 y 10 μ M). A las 24 h después del tratamiento, se lisaron las células y se analizaron los niveles de proteína PPAR- γ mediante transferencia Western (a) y densitometría (b). Se observaron niveles más bajos de PPAR- γ en los fibroblastos dcSSc que en los controles sanos. Después del tratamiento con AjA (5 μ M y 10 μ M), la expresión de la proteína PPAR- γ aumentó significativamente. Los resultados son la media \pm DE de tres experimentos independientes. #p <0,001 frente a fibroblastos sanos; * p <0,001 frente a no tratado.

La Figura 9 muestra histogramas que muestran el contenido de hidroxiprolina de la piel dañada. Después de 21 días de tratamiento con AjA (1 mg/kg/día), el contenido de colágeno medido por hidroxiprolina fue igual al grupo control. (media \pm DE) *p <0,001, ANOVA.

La Figura 10 muestra la activación de fibroblastos inhibida por AjA inducida por bleomicina. (A) La inmunohistoquímica muestra una fuerte regulación negativa de las células alfa-SMA positivas después del

tratamiento con AjA (1 mg/kg/día). Aumento original 10x. (B) células fibroblásticas en forma de huso alfa-SMA positivas por campo microscópico alto. (media ± DE) *p <0,001. ANOVA.

La Figura 11 muestra la síntesis de colágeno inhibida por AjA en fibroblastos SSc a través de PPAR-γ. El tratamiento con AjA (0,1, 1, 5 y 10 μM) indujo una reducción dependiente de la dosis de los niveles de PIP en el sobrenadante de los fibroblastos SSc. El efecto inhibitorio de AjA sobre la producción de PIP se revirtió por completo mediante la incubación previa de las células con el antagonista irreversible PPAR-γ GW9662 a 10 μM. (media ± DE) *p <0,001; ANOVA.

La Figura 12 muestra que AjA regula negativamente la liberación de TGF-beta en fibroblastos SSc. (A) El tratamiento con AjA (5 y 10 microM) dio como resultado una reducción significativa de TGF-beta en el sobrenadante. (B) El máximo de inhibición de TGF-beta se observó después de 2 horas de tratamiento con AjA (10 microM) y permaneció significativamente regulado a la baja hasta 24 horas. *p <0,001 frente a fibroblastos de control; *p <0,001 frente no tratado; ANOVA.

La Figura 13 muestra la histología del día 21 del pulmón de control (vehículo), bleomicina y bleomicina + ácido ajulémico (5 mg/kg qd x 2 Id). En el grupo BLM, la histología reveló una fuerte inflamación con áreas fibróticas parenquimatosas difusas. Después del tratamiento con AjA, se redujo la infiltración parenquimatosa de leucocitos (más evidente en el grupo AjA 5 mg/kg) y se inhibió significativamente la fibrosis.

La Figura 14 muestra el contenido del día 21 de hidroxiprolina en los pulmones de control, bleomicina y bleomicina + 1 mg/kg y 5 mg/kg de ácido ajulémico administrados cada día x 21 días.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende ácido ajulémico para su uso en el tratamiento de la fibrosis pulmonar en sujetos de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Las referencias relacionadas con los derivados de tetrahidrocannabinol distintos del ácido ajulémico y las referencias relacionadas con el tratamiento de enfermedades distintas de la fibrosis pulmonar se proporcionan únicamente con fines informativos. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapias.

1. Derivados de THC

El tetrahidrocannabinol (THC) es el principal componente psicoactivo de la marihuana. Además de los efectos que alteran el estado de ánimo, se ha mostrado que el THC exhibe otras actividades, algunas de las cuales pueden tener valores terapéuticos, incluidas ciertas propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antieméticas. El valor terapéutico potencial del THC ha llevado a la búsqueda de compuestos relacionados que mientras minimizan los efectos psicoactivos conservan las actividades de su potencial valor medicinal.

Por ejemplo, el ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)-Δ8-tetrahydro-cannabinol-9-carboxílico, también conocido como ácido ajulémico, (nombre IUPAC de ácido (6aR,10aR)-3-(1,1-dimetilheptil)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hidroxi-6,6-dimetil-6H-dibenzo(b,d)piran-9-carboxílico), es un agente potencial para el tratamiento del dolor y la inflamación, ya sea solo o en combinación con otros agentes. Este compuesto es un agonista mixto de CB1 y CB2, que ha demostrado cierta evidencia clínica respecto a su eficacia y seguridad en voluntarios sanos normales y pacientes con dolor neuropático refractario y traumático. El conocimiento actual de la investigación de los cannabinoides en el dolor y la inflamación sugiere que los receptores CB1 y CB2 desempeñan un papel importante en el inicio y el mantenimiento de la señalización post-sináptica y los mecanismos inmunes relacionados con la nocicepción, la sensibilización, la transmisión de la señal del dolor y el procesamiento del dolor. El ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)-Δ8-tetrahydro-cannabinol-9-carboxílico tiene una alta afinidad por los receptores CB1 y CB2.

2. Enfermedad fibrótica

La fibrosis es la acumulación anormal de tejido fibroso que puede aparecer como parte del proceso de curación de heridas en los tejidos dañados. Los ejemplos de la fibrosis incluyen fibrosis hepática, fibrosis pulmonar (por ejemplo, silicosis, asbestosis, fibrosis pulmonar idiopática), fibrosis oral, fibrosis endomiocárdica, fibrosis retroperitoneal, fibrosis deltoidea, fibrosis renal (incluida la nefropatía diabética) y glomeruloesclerosis. La fibrosis hepática, por ejemplo, aparece como parte de la respuesta de curación de heridas en las lesiones hepáticas crónicas. La fibrosis puede aparecer como una complicación de la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, el alcoholismo, la esquistosomiasis, la hepatitis viral, la obstrucción de las vías biliares, la exposición a toxinas y los trastornos metabólicos. Se cree que la formación de tejido fibrótico representa un intento por parte del cuerpo de encapsular el tejido lesionado. La fibrosis hepática se caracteriza por una acumulación de matriz extracelular que se puede distinguir cualitativamente de la del hígado normal. Si no se controla, la fibrosis hepática progresa hasta la cirrosis (definida por la presencia de nódulos encapsulados), la insuficiencia hepática y la muerte. La fibrosis endomiocárdica es un trastorno idiopático que se caracteriza por el desarrollo de miocardiopatías restrictivas. En la fibrosis endomiocárdica, el proceso subyacente produce fibrosis parcheada de la superficie endocárdica del corazón, lo que conduce a una distensibilidad reducida y, en última instancia, a una fisiología restrictiva a medida que la

superficie endomiocárdica se involucra de manera más general. La fibrosis endocárdica implica principalmente los tractos de entrada de los ventrículos derecho e izquierdo y puede afectar las válvulas auriculoventriculares, lo que conduce a la insuficiencia tricúspide y mitral. La fibrosis submucosa oral es una enfermedad crónica y debilitante de la cavidad oral caracterizada por inflamación y fibrosis progresiva de los tejidos submucosos (lámina propia y tejidos conectivos más profundos). Da como resultado una marcada rigidez y una eventual incapacidad para abrir la boca. La mucosa bucal es el sitio más comúnmente involucrado, pero cualquier parte de la cavidad oral puede estar involucrada, incluso la faringe. La fibrosis retroperitoneal se caracteriza por el desarrollo de fibrosis extensa en todo el retroperitoneo, típicamente centrada sobre la superficie anterior de la cuarta y quinta vértebra lumbar. Esta fibrosis conduce al atrapamiento y la obstrucción de las estructuras retroperitoneales, especialmente los uréteres. En la mayoría de los casos, la etiología es desconocida.

La esclerodermia es una enfermedad fibrótica que afecta aproximadamente a 19 casos por 1 millón de personas. La causa de la esclerodermia es desconocida. Se cree que las anomalías implican autoinmunidad y alteración de la función de las células endoteliales y los fibroblastos. De hecho, la esclerodermia sistémica es probablemente la más grave de las enfermedades autoinmunes con un 50% de mortalidad en los 5 años posteriores al diagnóstico.

La esclerodermia es una enfermedad del tejido conectivo caracterizada por la fibrosis de la piel y los órganos internos, que conduce a una insuficiencia orgánica y a la muerte. La esclerodermia tiene un espectro de manifestaciones y una variedad de implicaciones terapéuticas. Comprende esclerodermia localizada, esclerodermia sistémica, trastornos similares a la esclerodermia y esclerodermia sinusoidal.

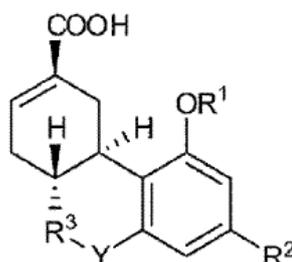
Mientras que la esclerodermia localizada es una enfermedad dermatológica rara asociada con la fibrosis y con manifestaciones limitadas a la piel, la esclerodermia sistémica es una enfermedad multisistémica con un cierto riesgo variable de afectación de los órganos internos y una cierta variación en el grado de la enfermedad cutánea. La esclerodermia sistémica puede ser difusa o limitada. La esclerodermia sistémica limitada también se llama CREST (calcinosis, disfunción esofágica de Raynaud, esclerodactilia, telangiectasias). La esclerodermia sistémica comprende: enfermedad pulmonar de esclerodermia, crisis renal de esclerodermia, manifestaciones cardíacas, debilidad muscular que incluye fatiga o CREST limitado, dismotilidad y espasmos gastrointestinales, y anomalías en el sistema nervioso central, periférico y autónomo. Se cree que los trastornos similares a la esclerodermia están relacionados con la exposición a entornos industriales. En la enfermedad sinusoidal se encuentran implicaciones de los órganos internos sin que se produzcan cambios en la piel.

Los principales síntomas o manifestaciones de la esclerodermia y, en particular, de la esclerodermia sistémica son la síntesis y el depósito de un exceso de colágeno inapropiado, disfunción endotelial, espasmos, colapsos y obliteración por fibrosis. En términos diagnósticos, un parámetro clínico importante es el engrosamiento de la piel proximal a las articulaciones metacarpofalángicas. El fenómeno de Raynaud es un componente frecuente y casi universal de la esclerodermia. Se diagnostica por cambios de color de la piel tras la exposición al frío. La isquemia y el engrosamiento de la piel son síntomas de la enfermedad de Raynaud.

Varios procesos biológicos subyacentes están implicados en el inicio, la gravedad y la progresión de la enfermedad e incluyen disfunción vascular, activación y daño de las células endoteliales, acumulación de leucocitos, producción de autoanticuerpos y, lo que es más importante, una respuesta fibrótica incontrolada que puede conducir a la muerte. Los fibroblastos tienen un papel fundamental en la patogénesis de esta enfermedad. Los fibroblastos primarios obtenidos de pacientes con esclerodermia exhiben muchas de las propiedades características de la enfermedad observadas *in vivo*, especialmente el aumento de la síntesis y deposición de la matriz extracelular, en particular de colágeno y fibronectina, y la producción de citocinas y factores del crecimiento alterado, como TGF-beta y CTGF ("Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts *in vitro*" J. Clin. Invest. 54, pág. 880-89 LeRoy (1974)) [2].

No hay ningún tratamiento que cure la esclerodermia. Terapias innovadoras, aunque de alto riesgo, han propuesto el trasplante autólogo de células madre. En particular, actualmente no hay tratamientos para la esclerodermia que afecta al proceso fibrótico. La identificación de los genes asociados con el riesgo de la enfermedad y la progresión de la esclerodermia puede conducir al desarrollo de estrategias eficaces para la intervención en diversas etapas de la enfermedad. Aunque actualmente no existe ninguna cura para la esclerodermia, actualmente se utilizan varios agentes o tratamientos para tratar los síntomas de la esclerodermia.

Se describe en este documento que los compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula (I)

en donde R¹ es hidrógeno, COCH₃ o COCH₂CH₃; R² es un grupo alquilo C5-C12 ramificado que puede tener opcionalmente un anillo aromático terminal, u opcionalmente un grupo alquilo OCHCH₃(CH₂)_m ramificado que puede tener un anillo aromático terminal, en donde m comprende de 0 a 7; R³ es hidrógeno, un grupo alquilo C1-8 o un grupo alcanol C1-8; e Y es nulo o un grupo puente de NH u oxígeno, siempre que cuando Y sea oxígeno y R² sea un alquilo C5-C12 ramificado, R³ no sea CHCH₃, y se pueden usar sus sales, ésteres o solvatos farmacéuticamente aceptables para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades fibróticas.

En particular, se describe en este documento que la administración de ácidos (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oicos, tal como el ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)-Δ8-tetrahidro-cannabinol-9-carboxílico, también conocido como el ácido ajulémico, es eficaz en el tratamiento de la fibrosis tisular del pulmón y la piel, como se demuestra utilizando un modelo animal bastante conocido de la esclerodermia.

De acuerdo con la presente descripción, el ácido ajulémico y otros ácidos (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oicos, o composiciones que contienen estos compuestos, pueden usarse en el tratamiento y/o la prevención de diversas enfermedades fibróticas, incluida la esclerodermia, esclerosis sistémica, trastornos similares a la esclerodermia, esclerodermia sinusoidal, cirrosis hepática, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, contractura de Dupuytren, queloides, enfermedad renal crónica y otras anomalías cicatriciales/cicatrizantes, adherencias postoperatorias y fibrosis reactiva.

Se pueden usar diversas formas de dosificación del ácido ajulémico y otros ácidos (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oicos en los métodos de la presente invención para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas. En ciertas realizaciones, la forma de dosificación es una forma de dosificación oral tal como un comprimido o una cápsula o comprimido con cubierta entérica o cápsula de liberación osmótica o una combinación única de excipientes formulados de tal manera que entreguen en un período de 24 horas no más de 240 mg y no menos de 5 mg de ácido ajulémico u otros ácidos (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oicos, más preferiblemente no más de 180 mg y no menos de 15 mg (por ejemplo, de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 30 mg). En otras realizaciones, la forma de dosificación es un parche tópico, gel, pomada, crema, aerosol o formulación inhalada.

En otras realizaciones, la forma de dosificación incluye un agente adicional o se proporciona junto con una segunda forma de dosificación, que incluye el agente adicional. Los agentes adicionales ejemplares incluyen un agente analgésico tal como un AINE u opiáceo, o un agente antiinflamatorio. En otras realizaciones, la forma de dosificación comprende una cápsula en la que la cápsula contiene una mezcla de materiales para proporcionar una formulación de liberación sostenida deseada.

En otras realizaciones, la forma de dosificación comprende un comprimido recubierto con un recubrimiento semipermeable. En ciertas realizaciones, el comprimido comprende dos capas, una capa que contiene ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oico y una segunda capa denominada capa de "empuje". El recubrimiento semipermeable se usa para permitir que un fluido (por ejemplo, agua) entre en el comprimido y erosione una capa o capas. En ciertas realizaciones, esta forma de dosificación de liberación sostenida comprende además un orificio láser perforado en el centro del comprimido recubierto. La capa que contiene ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oico comprende ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oico, un agente desintegrante, un agente que potencia la viscosidad, un agente aglutinante y un agente osmótico. La capa de empuje comprende un agente desintegrante, un agente aglutinante, un agente osmótico y un agente que potencia la viscosidad.

En otro aspecto, la invención presenta una forma de dosificación del ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)-Δ8-tetrahidro-cannabinol-9-carboxílico u otro ácido (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oico que es una forma de dosificación de liberación controlada, que proporciona una liberación controlada del ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)-Δ8-tetrahidro-cannabinol-9-carboxílico o el otro ácido (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oico.

En otras realizaciones, la forma de dosificación comprende un comprimido que comprende una matriz biocompatible y ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)-Δ8-tetrahidrocannabinol-11-oico. La forma de dosificación de liberación sostenida también puede comprender una cápsula de cubierta dura que contiene microesferas biopoliméricas que contienen el agente terapéuticamente activo. La matriz biocompatible y las microesferas biopoliméricas contienen

5 poros para liberar y administrar el fármaco. Estos poros se forman mezclando la matriz biocompatible de la
microesfera de biopolímero con un agente formador de poros. Cada matriz biocompatible o microesfera de
biopolímero está compuesta de un polímero biocompatible o una mezcla de polímeros biocompatibles. La matriz y
las microesferas pueden formarse disolviendo el polímero biocompatible y el agente activo (compuesto descrito en
este documento) en un disolvente y agregando un agente formador de poros (por ejemplo, una sal volátil). La
evaporación del disolvente y el agente formador de poros proporciona una matriz o microesfera que contiene el
compuesto activo. En otras realizaciones, la forma de dosificación de liberación sostenida comprende un
comprimido, en la que el comprimido contiene ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico y
uno o más polímeros y en donde el comprimido se puede preparar comprimiendo el ácido ajulémico u otro ácido
10 (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico y uno o más polímeros. En algunas realizaciones, el polímero o los
polímeros pueden comprender un polímero higroscópico formulado con ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)- Δ 8-
tetrahidrocannabinol-11-oico. Tras la exposición a la humedad, el comprimido se disuelve y se hincha. Esta
hinchazón permite que la forma de dosificación de liberación sostenida permanezca en el tracto gastrointestinal
superior. La velocidad de hinchamiento de la mezcla de polímeros se puede variar usando diferentes grados de
15 poli(óxido de etileno).

En otras realizaciones, la forma de dosificación de liberación sostenida comprende una cápsula que contiene
además núcleos de partículas recubiertos con una suspensión de agente activo y un agente aglutinante que
posteriormente se recubre con un polímero. El polímero puede ser un polímero que controle la velocidad. En
general, la velocidad de administración del polímero que controla la velocidad está determinada por la velocidad a la
que se disuelve el agente activo.
20

Como se señaló anteriormente, los solicitantes han descubierto que la administración de ácidos (3R,4R)- Δ 8-
tetrahidrocannabinol-11-oicos, tales como el ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-9-
carboxílico, también conocido como ácido ajulémico, puede usarse para tratar o prevenir enfermedades fibróticas en
sujetos.

25 A. Síntesis de ácidos (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oicos

En una realización, los ácidos (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oicos, tales como el ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-
dimetilheptil)- Δ 8-tetrahidro-cannabinol-9-carboxílico se sintetizan de acuerdo con el esquema de la Figura 2.

B. Formulaciones de dosificaciones unitarias

30 Se pueden administrar varias formas de dosificación del ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)- Δ 8-
tetrahidrocannabinol-9-carboxílico y otros ácidos (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oicos a sujetos para el
tratamiento y/o la prevención de enfermedades fibróticas en sujetos. Las formas de dosificación ejemplares incluyen
formas de dosificación oral (por ejemplo, un comprimido o cápsula), formas de dosificación tópicas tales como un
parche tópico, geles y ungüentos, y formas de dosificación inhaladas tales como inhaladores, nebulizadores,
aerosoles y pulverizadores.

35 En ciertas realizaciones, el ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)- Δ 8-tetrahidro-cannabinol-9-carboxílico u otro ácido
(3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico se formula en una forma de dosificación en la que una sola dosis consiste
en aproximadamente 5 mg a aproximadamente 120 mg una vez al día o de aproximadamente 2 mg a
aproximadamente 40 mg hasta 3 veces al día.

40 En otras realizaciones, el ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)- Δ 8-tetrahidro-cannabinol-9-carboxílico u otro ácido
(3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico se formula en una forma de dosificación en la que una sola dosis consiste
en aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,8 mg/kg por peso del sujeto. En otras realizaciones, la forma de
dosificación se administra hasta 3 veces al día y de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 2,4 mg/kg por peso
del sujeto una vez al día.

C. Formulaciones

45 En algunas realizaciones, uno o más de los agentes terapéuticos que se pueden usar en los métodos de la presente
invención para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas se formulan con un vehículo, portador o adyuvante
farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere
a un vehículo, portador o adyuvante que puede administrarse a un paciente, junto con un compuesto que puede
usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas, y que no destruye
50 la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para administrar una
cantidad terapéutica del compuesto.

Los vehículos, adyuvantes y portadores farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las formas de
dosificación de esta invención incluyen, entre otros, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio,
lecitina, sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes (SEDDS) tales como d-E-tocoferol
polietilenglicol 1000 succinato; tensioactivos usados en formas farmacéuticas de dosificación tales como Tweens u
otras matrices poliméricas de administración similares; proteínas séricas tales como albúmina sérica humana;
sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de
55

ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales; o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato potásico, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietilenglicol-polietilenpolioxipropileno y grasa de lana. También pueden usarse ciclodextrinas, tales como las alfa, beta y γ -ciclodextrinas, o sus derivados modificados químicamente como las hidroxialquil ciclodextrinas, incluidas las 2- y 3-hidroxipropil-beta ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados ventajosamente para mejorar la administración de los compuestos de las fórmulas descritas en este documento que pueden usarse en los métodos de la presente invención para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas. Se pueden encontrar otras excepciones adecuadas en Handbook of Pharmaceutical Excipients, R. C. Rowe, *et. al.*, Pharmaceutical Press, 2009. En ciertas realizaciones, las formulaciones de dosificación unitaria se combinan para la liberación inmediata, aunque también se describen formulaciones de dosificación unitaria para la liberación retardada o prolongada de uno o ambos agentes.

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos que pueden usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas se formulan en una única dosis unitaria de modo que los agentes se liberen de la dosificación en diferentes momentos.

En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando se administran uno o más de los agentes terapéuticos una o dos veces al día, el agente se formula para proporcionar una liberación prolongada. Por ejemplo, el agente está formulado con un recubrimiento entérico. En una realización alternativa, el agente se formula usando un sistema de administración de liberación controlada bifásico, proporcionando así un tiempo prolongado de residencia gástrica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema de administración incluye (1) una fase particulada sólida interna formada de gránulos sustancialmente uniformes que contienen un producto farmacéutico que tiene una alta solubilidad en agua, y uno o más polímeros hidrófilos, uno o más polímeros hidrófobos y/o uno o más materiales hidrófobos, tales como una o más ceras, alcoholes grasos y/o ésteres de ácidos grasos, y (2) una fase continua sólida externa en la que los gránulos anteriores de la fase particulada sólida interna están embebidos y dispersados por toda la fase continua sólida externa, incluyendo uno o más polímeros hidrófobos, uno o más polímeros hidrófobos y/o uno o más materiales hidrófobos, tales como una o más ceras, alcoholes grasos y/o ésteres de ácidos grasos, que pueden comprimirse en comprimidos o rellenarse en cápsulas. En algunas realizaciones, el agente se incorpora en matrices poliméricas compuestas de polímeros hidrófilos que se hinchan tras la imbibición de agua a un tamaño que es lo suficientemente grande como para promover la retención de la forma de dosificación en el estómago durante el modo alimentado.

En algunas realizaciones, el ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)- Δ 8-tetrahydro-cannabinol-9-carboxílico está formulado como una combinación de formas de liberación controlada y de acción rápida.

En algunas realizaciones, el ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)- Δ 8-tetrahydrocannabinol-9-carboxílico se formula con una única propiedad de liberación. Por ejemplo, no está presente en una forma de liberación modificada, por ejemplo, una forma de liberación controlada.

Las composiciones descritas en el presente documento que pueden usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas pueden tomarse justo antes o con cada una de las tres comidas, cada una de las dos comidas principales o una comida. En otras realizaciones, una composición descrita en el presente documento puede administrarse una vez al día o dos veces al día y no necesita administrarse justo antes de una comida o junto con ésta.

Las formas de dosificación de esta invención que pueden usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas pueden administrarse por vía oral, parental, mediante aerosoles de inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado, preferiblemente por administración oral o administración por inyección. Las composiciones farmacéuticas de esta invención que pueden usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas pueden contener cualquier vehículo, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable no tóxico convencional. En algunos casos, el pH de la formulación puede ajustarse con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de administración. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

Las formas de dosificación que pueden usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse están el manitol, el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolventes o medios de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como, por ej., el ácido oleico y sus derivados

glicéridos, son útiles en la preparación de sustancias inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables tales como emulsiones y/o suspensiones. Otros tensioactivos de uso común, tales como Tweens o Spans y/u otros agentes emulsionantes similares o potenciadores de biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, también pueden usarse para fines de formulación.

Los agentes descritos en el presente documento que pueden usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas se administran preferiblemente por vía oral, por ejemplo, como un componente en una forma de dosificación. Las formas de dosificación pueden contener cualesquiera vehículos, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. En algunos casos, el pH de la formulación puede ajustarse con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de administración.

Las formas de dosificación de esta invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral, incluidas, entre otras, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se suelen agregar agentes lubricantes, como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones y/o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo se puede suspender o disolver en una fase oleosa y se combina con agentes emulsionantes y/o de suspensión. Si se desea, se pueden agregar ciertos agentes edulcorantes y/o aromatizantes y/o colorantes.

Las formas de dosificación de esta invención que pueden usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas también pueden administrarse en forma de supositorios para la administración rectal. Estas composiciones pueden prepararse mezclando un compuesto de esta invención que puede usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura rectal y, por lo tanto, que se derrita en el recto para liberar los componentes activos. Dichos materiales incluyen, entre otros, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

La administración tópica de las formas de dosificación de esta invención, que se pueden usar en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas, es útil cuando el tratamiento deseado involucra áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica. Para la aplicación tópica en la piel, la forma de dosificación debe formularse con una pomada adecuada que contenga los componentes activos suspendidos o disueltos en un vehículo. Los portadores para la administración tópica de los compuestos descritos en este documento que se pueden usar en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas incluyen, entre otros, aceite mineral, petróleo líquido, petróleo blanco, compuestos de propilenglicol, polioxiethyleno y polioxiopropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica, que se puede usar en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas, se puede formular con una loción o crema adecuada que contenga el compuesto activo suspendido o disuelto en un vehículo con agentes emulsionantes adecuados. Los vehículos adecuados incluyen, entre otros, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas de esta invención que pueden usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas también pueden aplicarse tópicamente al tracto intestinal inferior mediante formulación de supositorios rectales o en una formulación adecuada de enemas. También se incluyen parches transdérmicos tópicos.

Las formas de dosificación que pueden usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas pueden administrarse mediante aerosoles nasales o por inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas reconocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Cuando las formas de dosificación de esta invención, que pueden usarse en los métodos de la presente invención para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas, comprenden una combinación de un compuesto de las fórmulas descritas en este documento y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, ambos compuestos y el agente adicional deben estar presente a niveles de dosificación de entre aproximadamente 1 y 100%, y más preferiblemente entre aproximadamente 5 y 95% de la dosis normalmente administrada en un régimen de monoterapia. Otros agentes pueden administrarse por separado, como parte de un régimen de dosis múltiple, a partir de los compuestos descritos en este documento. Alternativamente, esos agentes pueden ser parte de una única forma de dosificación, mezclada junto con los compuestos de esta invención en una única composición.

En ciertas realizaciones, la forma de dosificación que puede usarse en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas comprende una cápsula, en la que la cápsula comprende una mezcla de materiales para proporcionar la liberación sostenida deseada.

5 En otras realizaciones, la forma de dosificación que se puede usar en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas comprende un comprimido recubierto con un recubrimiento semipermeable. En ciertas realizaciones, el comprimido comprende dos capas, una capa que contiene ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico y una segunda capa denominada capa de "empuje". El recubrimiento semipermeable se usa para permitir que un fluido (por ejemplo, agua) ingrese al comprimido y erosione una capa o varias capas. En ciertas realizaciones, la forma de dosificación de liberación sostenida comprende además un
10 orificio láser perforado en el centro del comprimido recubierto. El ácido ajulémico u otra capa que contiene ácido (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico comprende ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico, un agente desintegrante, un agente que mejora la viscosidad, un agente aglutinante y un agente osmótico. La capa de empuje comprende un agente desintegrante, un agente aglutinante, un agente osmótico y un agente potenciador de la viscosidad.

15 En otras realizaciones, la forma de dosificación que se puede usar en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas comprende un comprimido que comprende una matriz biocompatible y un ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico. La forma de dosificación de liberación sostenida también puede comprender una cápsula de cubierta dura que contenga microesferas biopoliméricas que contengan el agente terapéuticamente activo. La matriz biocompatible y las microesferas biopoliméricas contienen
20 poros para liberar y administrar el fármaco. Estos poros se forman mezclando la matriz biocompatible o la microesfera biopolimérica con un agente formador de poros. Cada matriz biocompatible de microesferas biopoliméricas está compuesta de un polímero biocompatible o una mezcla de polímeros biocompatibles. La matriz y las microesferas pueden formarse disolviendo el polímero biocompatible y el agente activo (compuesto descrito en este documento) en un disolvente y agregando un agente formador de poros (por ejemplo, una sal volátil). La
25 evaporación del disolvente y el agente formador de poros proporciona una matriz o microesfera que contiene el compuesto activo.

En otras realizaciones, la forma de dosificación de liberación sostenida que se puede usar en los métodos descritos en este documento para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas comprende un comprimido, en la que el comprimido contiene ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico y uno o más polímeros, y en donde el
30 comprimido se puede preparar comprimiendo el ácido ajulémico u otro ácido (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico y uno o más polímeros. En algunas realizaciones, el polímero o los polímeros pueden comprender un polímero higroscópico formulado con el ácido ajulémico u otro agente activo del ácido (3R,4R)- Δ 8-tetrahidrocannabinol-11-oico (es decir, un compuesto descrito en este documento). Tras la exposición a la humedad, el comprimido se disuelve y se hincha. Esta hinchazón permite que la forma de dosificación de liberación sostenida permanezca en el tracto gastrointestinal superior. La velocidad de hinchamiento de la mezcla de polímeros se puede variar usando
35 diferentes grados de poli(óxido de etileno).

En otras realizaciones, la forma de dosificación de liberación sostenida, que se puede usar en los métodos de la presente invención para prevenir y/o tratar afecciones fibróticas, comprende una cápsula que integra además núcleos de partículas recubiertos con una suspensión de agente activo y un agente aglutinante que se recubre
40 posteriormente con un polímero. El polímero puede ser un polímero que controle la velocidad. En general, la velocidad de administración del polímero que controla la velocidad está determinada por la velocidad a la que se disuelve el agente activo.

Los ejemplos de cápsulas incluyen, entre otras, cápsulas de gelatina, HPMC, de cubierta dura, cubierta blanda o cualquier otra cápsula adecuada que contenga una mezcla de liberación sostenida.

45 Los disolventes utilizados en las formas de dosificación de liberación sostenida anteriores incluyen, entre otros, acetato de etilo, triacetina, dimetil sulfóxido (DIVISO), carbonato de propileno, N-metilpirrolidona (NMP), alcohol etílico, alcohol bencílico, glicofurol, alfa-tocoferol, Miglyol 810, alcohol isopropílico, ftalato de dietilo, polietilenglicol 400 (PEG 400), citrato de trietilo y benzoato de bencilo.

50 Los modificadores de la viscosidad utilizados en las formas de dosificación de liberación sostenida anteriores incluyen, entre otros, triglicéridos caprílicos/cápricos (Miglyol 810), miristato de isopropilo (IPM), oleato de etilo, citrato de trietilo, ftalato de dimetilo, benzoato de bencilo y diversos grados de óxido de polietileno. El vehículo líquido de alta viscosidad usado en las formas de dosificación de liberación sostenida anteriores incluye, entre otros, acetato isobutirato de sacarosa (SAIB) y acetato butirato de celulosa (CAB) 381-20.

55 Los ejemplos de materiales que forman capas semipermeables preferidas incluyen, entre otros, polímeros celulósicos tales como acetato de celulosa, acilato de celulosa, diacilato de celulosa, triacilato de celulosa, diacetato de celulosa, triacetato de celulosa o cualquiera de sus mezclas; copolímeros de etilen-vinilacetato, polietileno, copolímeros de etileno, poliolefinas, incluidos copolímeros de óxido de etileno (por ejemplo, Engage® - Dupont Dow Elastomers), poliamidas, materiales celulósicos, poliuretanos, amidas bloqueadas con poliéter y copolímeros (por ejemplo, PEBAX®, butirato de acetato celulósico y poli(acetato de vinilo)). Los ejemplos de agentes desintegrantes

que pueden emplearse en las formas de dosificación de liberación sostenida anteriores incluyen, entre otros, croscarmelosa de sodio, crospovidona, alginato de sodio o excipientes similares.

Los ejemplos de agentes aglutinantes que pueden emplearse en las formas de dosificación de liberación sostenida anteriores incluyen, entre otros, hidroxialquilcelulosa, una hidroxialquilalquilcelulosa o una polivinilpirrolidona.

- 5 Los ejemplos de agentes osmóticos que pueden emplearse en las formas de dosificación de liberación sostenida anteriores incluyen, entre otros, sorbitol, manitol, cloruro de sodio u otras sales. Los ejemplos de polímeros biocompatibles empleados en las formas de dosificación de liberación sostenida anteriores incluyen, entre otros, poli (hidroxilácidos), polianhídridos, poliortoésteres, poliamidas, policarbonatos, polilalquilenos, polilalquilenglicoles, poli(óxidos de alquileo), poli(tereftalatos de alquileo), alcoholes polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, polisiloxanos, poli(alcoholes vinílicos), poli(acetato de vinilo), poliestireno, poliuretanos y sus copolímeros, celulosas sintéticas, ácidos poliacrílicos, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico) y poli(lactida-co-caprolactona), etileno-vinilacetato, copolímeros y sus mezclas.

- 15 Los ejemplos de polímeros higroscópicos que pueden emplearse en las formas de dosificación de liberación sostenida anteriores incluyen poli(óxido de etileno) (por ejemplo, polyox® con PM de 4.000.000 a 10.000.000), celulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, ácidos poliacrílicos reticulados y goma de xantano.

Los ejemplos de polímeros que controlan la velocidad que pueden emplearse en las formas de dosificación de liberación sostenida anteriores incluyen acrilato polimérico, laca de metacrilato o sus mezclas, laca de acrilato polimérico, laca de metacrilato, una resina acrílica que comprende un copolímero de ésteres de ácido acrílico y metacrílico o una laca de metacrilato de amonio con un plastificante.

20 D. Métodos de tratamiento

Los compuestos y las composiciones descritas en este documento pueden administrarse a células en cultivo, p. ej., *in vitro* o *ex vivo*, o a un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y/o diagnosticar una variedad de enfermedades fibróticas, incluidas las que se describen a continuación.

- 25 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se define como la administración de un compuesto, por ejemplo, por cualquier vía, por ejemplo, por vía oral, a un sujeto. El compuesto puede administrarse solo o en combinación con un segundo compuesto. El sujeto, por ejemplo, un paciente, puede ser uno que tiene un trastorno (por ejemplo, un trastorno como se describe en el presente documento), un síntoma de un trastorno o una predisposición hacia un trastorno. El tratamiento puede ser el resultado de, solo o en conjunto, curar, paliar, aliviar, aplacar, modificar, remediar, reparar, mejorar o afectar el trastorno, uno o más síntomas del trastorno o la predisposición hacia el trastorno. En una realización, el tratamiento alivia o mejora la fibrosis. En una realización, el tratamiento previene al menos un síntoma del trastorno o retrasa la aparición de al menos un síntoma del trastorno. El efecto está más allá de lo que se observa en ausencia de tratamiento.

- 35 Como se usa en el presente documento, una cantidad de un compuesto eficaz para tratar un trastorno, o una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto que es eficaz, tras la administración de dosis únicas o múltiples a un sujeto, en el tratamiento de una célula, para lograr un tratamiento.

Como se usa en el presente documento, una cantidad de un compuesto eficaz para prevenir un trastorno, o "una cantidad profilácticamente eficaz" del compuesto se refiere a una cantidad eficaz, tras la administración de dosis únicas o múltiples al sujeto, para prevenir o retrasar la aparición del inicio o la recurrencia de un trastorno o un síntoma del trastorno.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos. Los sujetos humanos ejemplares incluyen un paciente humano que tiene un trastorno, por ejemplo, un trastorno descrito en este documento o un sujeto normal. La expresión "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados, por ejemplo, no mamíferos (como pollos, anfibios, reptiles) y mamíferos, como primates no humanos, animales domésticos y/o agrícolas útiles, por ejemplo, ovejas, perros, gatos, vacas, cerdos, etc. En una realización, el animal es distinto de un roedor, por ejemplo, una rata o un ratón, o un primate no humano.

E. Titulación de un paciente

- 50 El tratamiento de los sujetos puede optimizarse titulado al sujeto, por ejemplo, de modo que el tratamiento pueda iniciarse con dosis subóptimas o sin efecto de cada compuesto y aumentarse para determinar la dosis óptima del ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)- Δ^8 -tetrahidro-cannabinol-9-carboxílico u otro ácido (3R,4R)- Δ^8 -tetrahidrocannabinol-11-oico para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades fibróticas en el sujeto.

El tratamiento de un sujeto con el ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)- Δ^8 -tetrahidrocannabinol-9-carboxílico u otro ácido (3R,4R)- Δ^8 -tetrahidrocannabinol-11-oico puede causar efectos secundarios como mareos, boca seca, desorientación, euforia, dolor de cabeza, náuseas, palidez, somnolencia y vómitos.

Los efectos secundarios se pueden modular hasta cierto punto comenzando con una dosis baja y titulando lentamente la dosis al alza, por ejemplo, durante el curso del tratamiento, por ejemplo, durante semanas, meses o años.

5 En algunas realizaciones, el paciente se titula para minimizar los eventos adversos y lograr un nivel terapéutico de la forma de dosificación apropiada del ácido (6aR,10aR)-4-(1,1-dimetilheptil)- Δ^8 -tetrahidro-cannabinol-9-carboxílico u otro ácido (3R,4R)- Δ^8 -tetrahidrocannabinol-11-oico.

F. Kits

10 Las formas de dosificación descritas en este documento pueden proporcionarse como kits. Los kits incluyen (a) un compuesto utilizado en un método descrito en este documento y, opcionalmente, (b) un prospecto. El prospecto puede ser descriptivo, instructivo, comercial u otro material relacionado con los métodos descritos en este documento y/o el uso de la forma de dosificación para los métodos descritos en este documento.

15 El prospecto de los kits no está limitado en su forma. En una realización, el prospecto puede incluir información sobre la producción del compuesto, el peso molecular del compuesto, la concentración, la fecha de vencimiento, la información del lote o del sitio de producción, etc. En una realización, el prospecto se refiere a métodos para administrar el compuesto.

En una realización, el prospecto puede incluir instrucciones para usar un compuesto descrito en este documento de una manera adecuada para realizar los métodos descritos en este documento, por ejemplo, llevar a cabo una reacción para producir el compuesto descrito en este documento.

20 El prospecto de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el prospecto, por ejemplo, las instrucciones, se proporciona en forma impresa, por ejemplo, un texto impreso, un dibujo y/o una fotografía, por ejemplo, una etiqueta o una hoja impresa. Sin embargo, el prospecto también se puede proporcionar en otros formatos, como Braille, material legible por computadora, grabación de video o grabación de audio. En otra realización, el prospecto del kit es información de contacto, por ejemplo, una dirección postal, dirección de correo electrónico, sitio web o número de teléfono, donde los usuarios del kit pueden obtener información sustancial sobre el compuesto descrito en este documento y/o sus usos en los métodos descritos en este documento. Por supuesto, el prospecto también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

30 Además de la forma de dosificación descrita en el presente documento, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como un disolvente o tampón, un estabilizador, un conservante, un agente aromatizante (por ejemplo, un antagonista amargo o un edulcorante), una fragancia, un colorante o agente colorante, por ejemplo, para teñir o colorear uno o más componentes en el kit, u otro ingrediente cosmético, y/o un segundo agente para tratar una afección o trastorno descrito en este documento. Alternativamente, pueden incluirse otros ingredientes en el kit, pero en diferentes composiciones o recipientes que el compuesto descrito en este documento. En tales realizaciones, el kit puede incluir instrucciones para mezclar el compuesto descrito en este documento y los otros ingredientes, o para usar el compuesto descrito en este documento junto con los otros ingredientes.

35 En algunas realizaciones, los componentes del kit se almacenan en condiciones inertes (por ejemplo, en nitrógeno u otro gas inerte, tal como argón). En algunas realizaciones, los componentes del kit se almacenan en condiciones anhidras (por ejemplo, con un desecante). En algunas realizaciones, los componentes se almacenan en un recipiente que impida el paso de la luz, tal como un vial ámbar.

40 La forma de dosificación descrita en el presente documento se puede proporcionar en cualquier forma, por ejemplo, líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que el compuesto descrito en el presente documento sea sustancialmente puro y/o estéril. Cuando se proporciona el compuesto descrito en este documento en una solución líquida, la solución líquida es preferiblemente una solución acuosa, prefiriéndose una solución acuosa estéril. Cuando el compuesto descrito en este documento se proporciona como una forma seca, la reconstitución generalmente se realiza mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua estéril o tampón, se puede proporcionar opcionalmente en el kit.

50 El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene la forma de dosificación descrita en este documento. En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes, divisores o compartimentos separados para la composición y el prospecto. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringa, y el prospecto puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otras realizaciones, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un contenedor único, no dividido. Por ejemplo, la forma de dosificación está contenida en una botella, vial o jeringa que tiene unido el prospecto como una etiqueta. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de recipientes individuales, cada uno de los cuales contiene una o más formas de dosificación unitarias (por ejemplo, una forma de dosificación descrita en este documento) de un compuesto descrito en este documento. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de aluminio o paquetes de ampollas, cada uno de los cuales contiene una única dosis unitaria de la forma de dosificación descrita en este documento.

Los envases de los kits pueden ser herméticos, impermeables (p. ej., impermeables a los cambios de humedad o evaporación) y/o herméticos a la luz.

- 5 El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para el uso de la forma de dosificación, por ejemplo, una jeringa, pipeta, fórceps, cuchara graduada, hisopo (por ejemplo, un hisopo de algodón o un hisopo de madera), o cualquier dispositivo de este tipo.

Parte experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar además ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo de referencia 1

- 10 El ácido ajulémico cannabinoide sintético ejerce potentes efectos antifibróticos en modelos experimentales de esclerosis sistémica

Introducción

- 15 Los cannabinoides desempeñan papeles clave en diversos procesos biológicos, incluida la inflamación, la inmunomodulación y la respuesta vasomotora. [3, 4] Además, el sistema cannabinoide también podría estar implicado en la patogénesis de la fibrosis [5, 6]. El sistema endocannabinoide comprende los dos receptores cannabinoides específicos, CB1 y CB2, sus ligandos endógenos y la maquinaria dedicada a la síntesis y degradación de endocannabinoides [7]. En los modelos experimentales de fibrosis dérmica, los receptores cannabinoides CB1 y CB2 modulan la fibrogénesis anulando la inflamación subyacente [8, 9]. Además, los agonistas cannabinoides pueden limitar la producción de matriz extracelular (ECM) al interrumpir la cascada de TGF-beta y regular a la baja la proliferación y activación de fibroblastos dérmicos [10, 11]. Estos datos abogan por un papel
20 directo de los cannabinoides en la limitación de la fibrosis, independientemente de sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. Sin embargo, sus mecanismos moleculares precisos quedan por dilucidar.

- Actualmente, los cannabinoides no se aceptan como agentes terapéuticos debido a sus efectos psicoactivos. Existe un creciente interés en el desarrollo de compuestos sintéticos sin actividad cannabimimética en el sistema nervioso central. El ácido ajulémico (ácido 1,1'-dimetilheptil-THC-11-oico) es un análogo sintético del tetrahidrocannabinol, exento de efectos psicotrópicos relevantes [12]. Es un potente agente antiinflamatorio y analgésico *in vivo* [12]. Los primeros datos en humanos indican que el AjA es bien tolerado y puede reducir el dolor neuropático crónico sin efectos psicotrópicos significativos en dosis de hasta 80 mg/día [13]. Aunque, AJA es capaz de activar los efectos centrales mediados por CB 1 cruzando la barrera hematoencefálica, la cantidad que la atraviesa parece no ser
30 suficiente para desencadenar la psicoactividad en humanos [14, 15]. Además de su afinidad por los receptores CB 1 y CB 2, AjA también se une y activa el receptor y activado por la proliferación de peroxisoma (PPAR-γ) [16]. PPAR-γ puede ser activado por algunos endocannabinoides y, a su vez, la activación de PPAR-γ puede modular el sistema endocannabinoide, lo que sugiere una relación recíproca [17]. De hecho, los efectos agonistas de los endocannabinoides sobre PPAR-γ contribuyen a los efectos reguladores de los endocannabinoides sobre la inflamación y la vasoactividad [12].
35

Además, evidencias recientes sugieren un papel clave para PPAR-γ en la fibrogénesis. La supresión de PPAR-γ puede contribuir a la activación incontrolada de los fibroblastos [18]. De hecho, PPAR-γ y su ligando natural 15-desoxi-A12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) ejercen efectos antifibróticos al suprimir la producción de colágeno y la activación de fibroblastos en la fibrosis inducida por bleomicina [19, 20].

- 40 La esclerosis sistémica (SSc) es una enfermedad autoinmune en la cual la lesión vascular y la inflamación conducen a una fibrosis progresiva de los tejidos [21]. De hecho, la supresión de PPAR-γ puede contribuir a la activación incontrolada de fibroblastos en SSc [18]. De hecho, PPAR-γ y su ligando natural, 15-desoxi-A12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) ejercen efectos antifibróticos al suprimir la producción de colágeno y la activación de fibroblastos en modelos de fibrosis inducidos por bleomicina en ratones [19, 20]. Por lo tanto, los receptores de cannabinoides y PPAR-γ se han sugerido como posibles objetivos terapéuticos en SSc. Teniendo en cuenta que las dosis terapéuticas de AjA activan simultáneamente los receptores PPAR-γ y cannabinoides sin afectar el SNC, se podría suponer que AjA también podría ser eficaz para prevenir la fibrosis en modelos experimentales de SSc.
45

Materiales y métodos

Fibrosis dérmica inducida por bleomicina

- 50 Se indujo fibrosis cutánea en dos grupos de ratones DBA/2J de 6 semanas de edad mediante inyección local de bleomicina. Brevemente, se administraron 100 microlitros de BLM disuelto en NaCl al 0,9% a una concentración de 0,5 mg/ml cada dos días, en áreas bien definidas (1 cm²) de la parte superior de la espalda. Un grupo de ratones con expuesto a BLM recibió AjA por vía oral a 1 mg/kg/día, disuelto en aceite de semilla. Se usaron inyecciones subcutáneas de 100 µl de NaCl al 0,9% como controles. Después de 21 días, los animales fueron sacrificados por

dislocación cervical. La piel inyectada se retiró y se procesó para su análisis. Cada grupo de tratamiento consistió en ocho ratones. El comité ético local aprobó todos los experimentos con animales [22].

5 Para someter a prueba AjA en fibrosis establecida menos dependiente de mecanismos inflamatorios, se evaluó un modelo modificado de fibrosis dérmica inducida por bleomicina,²⁴ en el que los ratones fueron expuestos a bleomicina durante 6 semanas y el tratamiento con AjA comenzó durante las últimas 3 semanas de inyecciones de bleomicina. Brevemente, un grupo de ratones fue sacrificado después de recibir inyecciones de bleomicina subcutánea durante 6 semanas. El segundo grupo recibió inyecciones de bleomicina durante 3 semanas seguidas de inyecciones de NaCl al 0,9% durante las siguientes 3 semanas para controlar la regresión espontánea de la fibrosis. El tercer grupo fue expuesto a bleomicina durante 6 semanas y fue tratado en paralelo con AjA (1 mg/kg/día; administración oral) durante las últimas 3 semanas de inyecciones de bleomicina. Dos grupos de ratones, que recibieron inyecciones subcutáneas de 100 µl de NaCl al 0,9% durante 3 semanas y 6 semanas, respectivamente, se usaron como controles. La piel inyectada se retiró y se procesó para su análisis.

15 Para evaluar el efecto de AjA en un modelo diferente de fibrosis esclerodermia, se estudió un modelo de fibrosis dérmica dependiente de TGFP. La fibrosis dérmica se indujo en ratones C57BL/6 machos sin patógenos mediante inyecciones intracutáneas de adenovirus atenuados de tipo V que sobreexpresaban el receptor I de TGFβ constitutivamente activo (AdTGFβRI) como se ha descrito previamente [23]. Se analizaron tres grupos de ratones. Un grupo fue tratado en paralelo por vía oral con AjA (1 mg/kg/día) durante las últimas 4 semanas. Los ratones infectados con adenovirus de tipo V atenuados que codificaban solo para LacZ y tratados solo con el disolvente de AjA sirvieron como controles. Los animales fueron sacrificados después de 8 semanas por dislocación cervical y se retiró la piel de la espalda para su análisis. Cada grupo de tratamiento consistía en ocho ratones.

Análisis histológico

25 Se tomaron tres muestras de piel dañada de cada animal de cada grupo y se tiñeron secciones de piel de 5 µm (tres para cada muestra de piel) con hematoxilina y eosina. El espesor dérmico se calculó con un aumento microscópico de 10x midiendo la distancia entre la unión dérmica y epidérmica y la unión de grasa dérmica y subcutánea (micrómetros) en cinco campos seleccionados al azar para cada sección de piel. Los resultados se expresaron como media ± DE. Dos examinadores diferentes realizaron la evaluación en ensayos a ciego [23].

Determinación del contenido de hidroxiprolina

30 El contenido de colágeno de la piel dañada se evaluó mediante cuantificación colorimétrica de hidroxiprolina en tres biopsias de piel diferentes (punzón de 3 mm) tomadas de cada animal en cada grupo. Las absorbancias se midieron a 560 nm por triplicado. Los resultados se expresaron como µg de hidroxiprolina por biopsia (media ± DE) [24].

Detección de miofibroblastos

35 Se procesaron secciones de la piel (5 µm) para evaluar la expresión de una actina del músculo liso (α-SMA) (anticuerpo monoclonal de ratón - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.). Después de la desparafinación, las secciones de la piel se incubaron con 3% de albúmina sérica bovina durante 30 minutos para bloquear la unión inespecífica, seguido de una incubación con H₂O₂ al 3% durante 5 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. La tinción con α-SMA se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando el kit M.O.M (Vector, Reino Unido). La tinción se visualizó con diaminobencidina, usando un kit de sustrato de peroxidasa (Dako, Glostrup, Dinamarca). El recuento de células se realizó en ensayo a ciego por dos operadores diferentes, con un aumento de 40x, en cinco campos de microscopio no contiguos de tres secciones de cada muestra de piel dañada. Los resultados se expresan como media ± DE de células fibroblásticas positivas en forma de huso por campo [25].

Pacientes y cultivos de fibroblastos

45 Se obtuvieron cultivos de fibroblastos a partir de muestras de biopsia de piel afectada de 5 pacientes con SSc. Los fibroblastos dérmicos se obtuvieron mediante una biopsia por punción de 5 mm desde el borde delantero de la piel afectada en el antebrazo de cinco pacientes afectados por SSc cutáneo difuso (dcSSc) en la fase fibrótica. Todos los pacientes cumplieron los criterios para la clasificación SSc propuestos por LeRoy *et al.* [26]. Ningún paciente fue tratado con agentes inmunosupresores o corticosteroides, ni tomaba cannabinoides para uso recreativo o terapéutico en el momento de la biopsia (Tabla 1). Se obtuvieron fibroblastos de control de muestras de biopsia de piel de 5 voluntarios sanos de la misma edad y sexo. Los fibroblastos de la piel se expandieron por cultivo de crecimiento en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco Invitrogen) como se ha descrito anteriormente [27]. Se utilizaron fibroblastos de los pasajes 3-6 para los experimentos. Todos los pacientes y voluntarios sanos dieron su consentimiento informado por escrito mediante formularios aprobados por las juntas de revisión institucional locales.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de pacientes con esclerosis sistémica cutánea difusa (dcSSc)*

Características	Valor
Sexo (H/M), n	1/4

Edad, media (intervalo), años	52 (35-72)
Duración de la enfermedad, media (intervalo), años†	6 (3-12)
Enfermedad cutánea difusa	5
Número de Scl-70 positivos	5
Potenciales agentes modificadores de la enfermedad	0
Análogos de prostaciclina	5
Bloqueadores de canales de calcio	4
Procinética	4

*dcSSc se determinó de acuerdo con los criterios de LeRoy *et al* [28].

†Desde la primera manifestación que no es de Raynaud.

Experimentos de estimulación

- 5 Se cultivaron SSc y fibroblastos dérmicos sanos en DMEM que contenía 2,5% de suero de ternera fetal (FCS) durante 24 horas antes de los experimentos. Los fibroblastos dérmicos se incubaron con AjA (JB Therapeutics, Newton, MA, EE. UU.) y se disolvieron en dimetilsulfóxido a concentraciones de 0,1, 1, 5 y 10 microM durante 24 horas. Los experimentos con el antagonista irreversible PPAR- γ GW9662 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido), 1 y 10 microM, se realizaron incubando los fibroblastos dérmicos durante 15 minutos antes del tratamiento con AjA. Viabilidad celular
- 10 Se colocaron fibroblastos SSc y sanos en placas a una densidad de 100.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos y se trataron con AjA a concentraciones de 0,1, 1, 5 y 10 μ M durante 24 horas en presencia o ausencia de GW9662 a concentraciones de 1 y 10 μ M. La actividad metabólica celular se midió mediante ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Después de la eliminación de 100 μ l del medio de crecimiento, se añadió MTT a una concentración final de 3 mg/ml, y las células se incubaron a 37°C durante 4 horas más. Los cristales de formazán se disolvieron en DMSO y la densidad óptica se midió a 570 nm utilizando un espectrofotómetro [29].

Determinación de la concentración de colágeno en el sobrenadante

- 20 El sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C antes y después del tratamiento con AjA \pm GW9662. Se utilizaron un kit de EIA (Takara Bio, Otsuka, Japón) y un kit de ELISA (Euroclone, Lugano, Suiza) para evaluar los niveles del sobrenadante de péptido carboxi-terminal (PIP) de procolágeno tipo I y TGF- β y PGJ2, respectivamente. Los resultados son la media \pm DE de cinco experimentos independientes.

Análisis de transferencia Western

- 25 Después de enjuagar dos veces con PBS, las células se lisaron con tampón Ripa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE. UU.). Posteriormente, los lisados celulares se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 14.000 g durante 20 minutos. Las concentraciones de proteínas se midieron usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Reinach, Suiza). Quince microgramos de proteína de cada muestra se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-10% y se transfirieron por electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa de acuerdo con protocolos estándar [30]. Después de bloquear con leche en polvo sin grasa al 1% y BSA al 1% durante 1 hora, se incubaron inmunotransferencias con anticuerpos monoclonales contra PPAR- γ (Cell Signaling, Danvers, EE. UU.) a una dilución de 1:200 durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación con anticuerpos anti-cabra de burro conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) - Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:10000 durante 45 minutos, se detectaron señales con reactivos de detección de transferencia Western ECL (Amersham Bioscience, Freiburg, Alemania) y exposición a Película de rayos X (SuperRX; Fuji, Dusseldorf, Alemania). Para confirmar la carga igual de proteínas, se determinó la cantidad de alfa-tubulina usando anticuerpos anti-a-tubulina humanos de ratón (dilución 1:1.000; Sigma) y anticuerpos anti-ratón de conejo conjugados con HRP (dilución 1:5.000; Santa Cruz). Los resultados son la media \pm DE de tres experimentos independientes.

Análisis estadístico

- 40 Los datos se expresan como la media \pm DE. El análisis de varianza (ANOVA) se usó para comparar medias múltiples, seguido por la prueba post-hoc de Student-Newman Keuls (Sigma Stat V.3.5; Sigma Stat, Ashburn, Virginia, EE. UU.). Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

Resultados: El ácido ajulémico previno la fibrosis dérmica inducida por bleomicina *in vivo*

- 45 Para evaluar el potencial de AjA como agente antifibrótico *in vivo*, se probó su eficacia en fibrosis dérmica inducida por bleomicina. Los animales fueron tratados con bleomicina sola (Grupo BLM; n = 8), bleomicina más AjA 1 mg/kg/día (grupo BLM/AjA; n = 8) y solución salina de NaCl al 0,9% (grupo control; n = 8). Después del tratamiento, el grupo BLM y el grupo BLM AjA no difirieron en términos de peso corporal, y no se registraron otros signos de toxicidad de AjA, como pelo erizado o menor actividad.

La fibrosis cutánea se cuantificó el día 21 determinando el espesor dérmico y el contenido de hidroxiprolina de la piel dañada. La piel del grupo BLM mostró una densa acumulación de ECM en la dermis y la acumulación de células inflamatorias en las capas dérmicas más profundas y los espacios perivasculares. Además, el tejido adiposo subcutáneo fue reemplazado en gran medida por tejido conectivo, Figura 4A.

5 Se observó un aumento de dos veces en el espesor dérmico en ratones inyectados con BLM en comparación con los controles ($p < 0,001$). La administración oral de AjA (1 mg/kg/día) evitó el desarrollo de fibrosis de la piel y redujo el espesor de la piel casi a niveles de control ($p < 0,001$ en comparación con los ratones control), Figura 4B. Además, en el grupo BLM/AjA, la infiltración de leucocitos subcutáneos, la acumulación de ECM y el reemplazo de la capa de grasa se redujeron, Figura 4A.

10 De acuerdo con la histología, la producción de colágeno, determinada por cuantificación del contenido dérmico de hidroxiprolina, se redujo sustancialmente en ratones tratados con AjA, Figura 4C. En el grupo BLM, los niveles de hidroxiprolina fueron más de dos veces mayores que los controles ($p < 0,001$). El tratamiento con AjA (1 mg/kg/día) anuló completamente la deposición de colágeno inducida por BLM ($p < 0,001$).

15 Los miofibroblastos, caracterizados por la proteína citoesquelética α -actina del músculo liso (α -sma), se consideran uno de los principales mediadores celulares de la fibrosis en la SSc. En ratones expuestos a BLM, el número de células fibroblásticas en forma de huso positivas para α -SMA por campo de alta potencia aumentó dos veces en comparación con los controles ($p < 0,001$). El tratamiento con AjA redujo significativamente el número de miofibroblastos en la piel dañada hasta $26 \pm 5\%$ (media \pm DE) ($p < 0,05$), Figura 4D.

El ácido ajulémico inhibe la neosíntesis del colágeno en los fibroblastos SSc al activar PPAR- γ

20 Para evaluar si AjA era eficaz en un modelo *in vivo* de fibrosis dérmica que es en gran medida independiente de los fenómenos autoinmunes e inflamatorios, se probó su eficacia en el modelo de ratón del receptor de TGF β constitutivamente activo tipo I (AdTGF β RI). Los ratones AdTGF β RI se caracterizan por presentar una fibrosis dérmica generalizada y la activación específica de los fibroblastos de la señalización de TGF β [22]. Después de 8 semanas, los ratones AdTGF β RI mostraron un aumento doble en el espesor dérmico en comparación con los ratones de control AdLacZ ($p < 0,05$). La administración oral de AjA (1 mg/kg/día) durante las últimas 4 semanas redujo el desarrollo del espesor de la piel hasta un $30 \pm 6\%$ (media \pm DE) en comparación con los ratones AdTGF β RI ($p < 0,05$) (Figura 5A, B). El tratamiento con AjA (1 mg/kg/día) indujo una reducción media de $30 \pm 13\%$ (media \pm DE) en el contenido de hidroxiprolina ($p < 0,05$) (Figura 5C). El tratamiento con AjA también redujo significativamente el número de miofibroblastos en la piel dañada hasta un $26 \pm 3\%$ ($p < 0,001$) (Figura 5D).

30 Para evaluar aún más la eficacia de AjA para el tratamiento de la fibrosis establecida, se utilizó un modelo de fibrosis dérmica inducida por bleomicina de 6 semanas. De acuerdo con estudios previos, el espesor dérmico aumentó en $76 \pm 4\%$ (media \pm DE) ($p < 0,05$ frente a controles de NaCl) después de 6 semanas de tratamiento con bleomicina. Para evaluar los efectos de AjA, los ratones expuestos a bleomicina durante 6 semanas fueron tratados en paralelo con AjA (1 mg/kg/día) durante las últimas 3 semanas de inyecciones de bleomicina. El espesor dérmico en ratones tratados con AjA durante las últimas 3 semanas se redujo en $11 \pm 17\%$ (media \pm DE) en comparación con los ratones con 6 semanas de exposición a bleomicina ($p < 0,05$). Además, el espesor dérmico en ratones tratados con AjA no difirió significativamente de los ratones expuestos a bleomicina durante 3 semanas (Figura 6A, B). Como consecuencia, se registró un aumento doble de los niveles de hidroxiprolina en el grupo de 6 semanas con exposición a bleomicina en comparación con los controles ($p < 0,001$). El tratamiento con AjA durante las últimas 3 semanas redujo la deposición de colágeno en $10 \pm 8\%$ (media \pm DE) ($p < 0,05$). Por lo tanto, la administración de AjA durante las últimas 3 semanas de exposición a bleomicina detuvo la progresión de la fibrosis, pero no alteró la acumulación de ECM preexistente (Figura 6C). El número de miofibroblastos después del tratamiento con AjA se redujo significativamente en la piel dañada hasta un $25 \pm 16\%$ (media \pm DE) en comparación con los ratones expuestos a bleomicina ($p < 0,05$) (Figura 6D).

45 El ácido ajulémico inhibe la neosíntesis de colágeno en fibroblastos dcSSc a través de PPAR- γ

Para investigar si AjA inhibía directamente la síntesis de colágeno en fibroblastos cultivados, se cuantificaron los niveles de péptido de procolágeno tipo I (PIP) en sobrenadante de dcSSc y fibroblastos cultivados sanos tratados con AjA. AjA (de 0,1 a 10 μ M) redujo los niveles de PIP liberados de los fibroblastos dcSSc de una manera dependiente de la dosis. La inhibición máxima se observó a una concentración de 10 μ M con una reducción media de PIP de hasta $60 \pm 7\%$ ($p < 0,001$) (Figura 7). Se observaron resultados similares en fibroblastos dérmicos sanos (datos no mostrados). AjA no presentó efectos tóxicos sobre los fibroblastos a las concentraciones utilizadas. La actividad metabólica medida por el ensayo MTT no se vio afectada por el tratamiento con AjA en concentraciones de hasta 10 μ M (datos no mostrados).

55 Para evaluar la dependencia de la ruta PPAR- γ , se preincubaron dcSSc y fibroblastos sanos tratados con AjA con el antagonista altamente selectivo de PPAR- γ GW9662 (1-10 μ M). El efecto inhibitorio de AjA sobre la producción de colágeno fue completamente prevenido por GW9662 a una concentración de 10 μ M ($p < 0,05$) (Figura 8A).

Además, se analizó el efecto de AjA en la expresión del ligando endógeno de PPAR- γ 15d-PGJ2. Los niveles de 15d-PGJ2 se redujeron en los sobrenadantes de fibroblastos dcSSc en comparación con los controles ($p < 0,001$).

Sin embargo, la incubación con AjA aumentó fuertemente los niveles de 15d-PGJ2 de una manera dependiente de la dosis ($p < 0,001$) (Figura 8B).

Además, se evaluó la expresión de PPAR- γ en dcSSc y fibroblastos sanos. Los niveles de proteína de PPAR- γ se redujeron en los fibroblastos dcSSc en comparación con los controles sanos. Sin embargo, el tratamiento con AjA (5 μM y 10 μM) aumentó significativamente la expresión de PPAR- γ en fibroblastos dcSSc ($p < 0,001$) (Figura 8C).

(TGF) se considera una de las principales citocinas profibróticas para orquestar la activación incontrolada de los fibroblastos SSc con la consiguiente sobreproducción de ECM. Además, en los fibroblastos, la señalización de TGF β está inversamente relacionada con la función fisiológica de PPAR- γ [31]. Dado que AjA suprimía la producción de colágeno a través de la activación de PPAR- γ , y reducía *in vivo* la fibrosis dérmica en el modelo de ratón del receptor de TGF β constitutivamente activo tipo I (AdTGF β RI), se evaluó su capacidad para regular negativamente el TGF β *in vitro*. Las concentraciones de TGF β en los sobrenadantes de los fibroblastos dcSSc fueron significativamente más altas que las concentraciones de TGF β en cultivos de controles sanos ($p < 0,001$). Tras la incubación con AjA, se observó una reducción significativa dependiente de la dosis en las concentraciones de TGF β (hasta 50%) en los sobrenadantes de los fibroblastos dcSSc ($p < 0,001$), con una supresión máxima a las 2 h (Figura 12).

Para investigar si AjA inhibía directamente la síntesis de colágeno en fibroblastos cultivados, se cuantificaron los niveles del péptido de procolágeno tipo I (PGP) en el sobrenadante de SSc y se trataron fibroblastos cultivados sanos con AjA. AjA, dependiente de la dosis, disminuyó los niveles de PIP liberados por los fibroblastos en concentraciones de 0,1 a 10 μM . La inhibición máxima se observó a una concentración de 10 μM con una reducción media de PIP de hasta el 60% ($p < 0,001$), Figura 12A. Se observaron resultados similares en fibroblastos dérmicos sanos (datos no mostrados).

AjA no mostró efectos tóxicos sobre los fibroblastos a las concentraciones utilizadas en este documento. La actividad metabólica medida por el ensayo MTT no se vio afectada por el tratamiento con AjA en concentraciones de hasta 10 μM (datos no mostrados).

Para evaluar una dependencia de la ruta PPAR- γ , se preincubaron SSc y fibroblastos sanos tratados con AjA con el antagonista altamente selectivo de PPAR- γ GW9662 (1-10 μM).

Curiosamente, el efecto inhibitorio de AjA sobre la producción de colágeno fue evitado por GW9662 de una manera dependiente de la dosis. A concentraciones de 10 μM , GW9662 evitó por completo los efectos antifibróticos de AjA ($p < 0,05$), Figura 11. Además, se evaluó la expresión de PPAR- γ en SSc y fibroblastos sanos. Los niveles de proteína de PPAR- γ se redujeron en los fibroblastos SSc en comparación con los controles sanos.

Sin embargo, el tratamiento con AjA (5 μM y 10 μM) restableció completamente la expresión de PPAR- γ y aumentó los niveles de PPAR- γ en los fibroblastos SSc a los niveles en fibroblastos de voluntarios sanos ($p < 0,001$). (Figura 12A-B). Además, se analizó el efecto de AjA sobre la expresión de la producción endógena de ligando PPAR- γ 15d-PGJ2. Los niveles de 15d-PGJ2 se redujeron en los sobrenadantes de los fibroblastos SSc en comparación con los controles ($p < 0,001$). Sin embargo, la incubación con AjA aumentó fuertemente los niveles de 15d-PGJ2 de manera dependiente de la dosis ($p < 0,001$), (Figura 11).

El ácido ajulémico inhibió la producción de TGF- β

El factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) se considera una de las principales citocinas profibróticas en la orquestación de la activación incontrolada de los fibroblastos SSc con la consiguiente sobreproducción de ECM. Dado que AjA suprime la producción de colágeno, se evaluó su capacidad de regulación a la baja de TGF-beta. Las concentraciones de TGF-beta en los sobrenadantes de los fibroblastos SSc fueron significativamente más altas que las concentraciones de TGF-beta en cultivos de controles sanos ($p < 0,001$). Tras la incubación con AjA, se observó una reducción significativa, dependiente de la dosis, en las concentraciones de TGF-beta (hasta 50%) en los sobrenadantes de los fibroblastos SSc ($p < 0,001$) con una supresión máxima observada a las 2 horas, Figura 12B.

Discusión

Los resultados de los experimentos descritos en este documento muestran que AjA previene eficazmente la fibrosis dérmica inducida por bleomicina en ratones. En los fibroblastos SSc, AjA inhibe la síntesis de colágeno a través del agonismo PPAR- γ .

La modulación de los receptores CB1 y CB2 limita la fibrosis de la piel al reducir la inflamación previa [8, 9]. Aunque el análogo sintético de THC AjA es un ligando de los receptores de cannabinoides clásicos CB1 y CB2 [12], los datos sugieren que AjA también puede actuar para reducir la fibrosis directamente a través de un mecanismo mediado por PPAR- γ . De acuerdo con esta noción, los datos indican que el agonista del receptor cannabinoide de alta afinidad WTN55,212-2 ejerce efectos antifibróticos que no están mediados por los receptores cannabinoides clásicos [10, 11]. Se ha postulado una estrecha relación entre el sistema endocannabinoide y la señalización PPAR- γ [17]. Las pruebas acumuladas sugieren que la alteración de la expresión y la función de PPAR- γ es importante para la patogénesis de la fibrosis en SSc [31]. Dicha menor actividad de la señalización de PPAR se contrarresta por un aumento de la cascada de TGF-beta mediada por SMAD e independiente de SMAD que conduce a fibrosis [30].

Se ha sugerido que la relación entre estos dos mediadores en condiciones fisiológicas orquesta los mecanismos que tienen lugar junto con los procesos de curación [18].

De acuerdo con estos hallazgos, se observó que una mayor liberación de TGF-beta se refleja en una disminución concomitante de PPAR-γ. Los potentes efectos estimulantes de AjA sobre PPAR-γ podrían estar mediados por efectos directos y también indirectos. Se demostró que AjA reduce la liberación de TGF-beta de los fibroblastos SSc. Además, AjA también estimula la expresión del ligando endógeno PPAR-γ PGJ2. Al inhibir el TGF-beta y estimular la liberación de PGJ2, AjA restaura completamente la señalización de PPAR-γ en los fibroblastos SSc y aumenta PPAR-γ a los niveles observados en los fibroblastos de voluntarios sanos.

También se demostró que la administración oral de AjA atenúa notablemente la fibrosis dérmica inducida en ratones DBA/2J por bleomicina. AjA reduce la activación de fibroblastos, la deposición de ECM y el posterior engrosamiento dérmico. La fibrosis dérmica inducida por bleomicina se considera un modelo experimental confiable para la SSc que refleja las primeras etapas de la enfermedad, con un mayor depósito de colágeno y otros componentes de ECM, migración de células inflamatorias a la piel y atrofia del tejido adiposo [32]. Todavía no está claro por qué en SSc se produce atrofia del tejido adiposo, a favor del reemplazo del tejido conectivo. Sin embargo, datos recientes sugieren que PPAR-γ podría desempeñar un papel central en la regulación del equilibrio entre la adipogénesis y la fibrogénesis [18]. Las evidencias acumuladas sugieren que una mayor activación de PPAR-γ favorece la adipogénesis, mientras que la disminución de PPAR-γ favorece la fibrosis tisular. Según este modelo, la regulación a la baja de PPAR-γ observada en SSc mejoraría el reclutamiento de precursores mesenquimales, estimularía la liberación de colágeno de los fibroblastos residentes e inhibiría la diferenciación adipogénica [18]. De acuerdo con esta hipótesis, AjA estimula la diferenciación de las células fibroblásticas 3T3-L1 embrionarias en adipocitos, un proceso que se sabe que está mediado por PPAR-γ [12]. En base a estos resultados, se podría sugerir que AjA podría ejercer sus efectos antifibróticos al restaurar la activación defectuosa de PPAR-γ en los fibroblastos SSc. De acuerdo con esta hipótesis, se observó que AjA estimulaba la expresión de PPAR-γ en los fibroblastos SSc regulando al alza la expresión de su ligando endógeno 15dPGJ2. Además, se muestra que la activación de PPAR-γ es esencial para los efectos antifibróticos de AjA y que la inhibición de PPAR-γ anula por completo los efectos inhibitorios de AjA en la síntesis de colágeno. Además, el tratamiento de ratones expuestos a bleomicina con AjA no solo previene la fibrosis, sino también la atrofia característica del subcutis.

Los resultados de los estudios presentados en este documento muestran que AjA reduce la infiltración de la dermis por las células inflamatorias. No se puede excluir la posibilidad de que los efectos antiinflamatorios de AjA también puedan contribuir a su actividad antifibrótica *in vivo*, en particular porque el modelo de ratón de fibrosis inducida por bleomicina responde a fármacos antiinflamatorios [22]. Sin embargo, también se observaron potentes efectos antifibróticos directos de concentraciones farmacológicamente relevantes de AjA en fibroblastos cultivados en ausencia de células inflamatorias. Otros estudios *in vivo* con modelos de SSc menos dependientes de la inflamación ayudarán a analizar aún más detalladamente las contribuciones relativas de los efectos antifibróticos directos sobre los fibroblastos y los efectos antifibróticos indirectos mediados por la inhibición de las células inflamatorias.

En conclusión, se ha demostrado que AjA ejerce potentes efectos antifibróticos *in vitro* e *in vivo* estimulando la señalización de PPAR-γ. Los cannabinoides y los agonistas de PPAR-γ podrían ser fármacos ideales para SSc, ya que pueden modular la fibrosis, la inflamación y la vasodilatación, todos los cuales están desregulados en SSc. Estos hallazgos también podrían tener implicaciones traduccionales directas porque las dosis terapéuticas de AjA son bien toleradas en humanos sin efectos no deseados en el sistema nervioso central.

Referencias

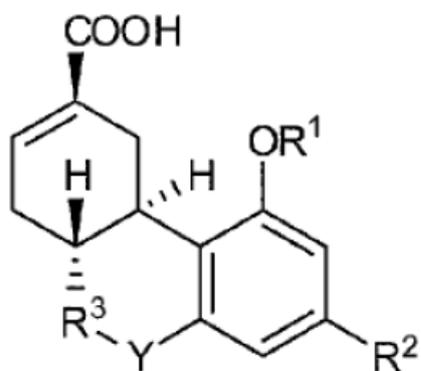
1. Stahl, P. H. y Wermuth, C. G., (Eds.) (2002) Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties Selection and Use, Verlag Helvetica Chimica Acta/Wiley-VCH, Zurich.
2. LeRoy, E. C. (1974) Increased Collagen Synthesis by Scleroderma Skin Fibroblasts *in vitro* a Possible Defect in the Regulation or Activation of the Scleroderma Fibroblast, J. Clin. Invest. 54(4), 880-889.
3. Klein, T. W. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics, Nat. Rev. Immunol. 5(5), 400-411.
4. Pertwee, R. G. (2009) Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines, Br. J. Pharmacol. 156(3), 397-411.
5. Teixeira-Clerc, F. *et al.* (2008) Le système endocannabinoïde, une nouvelle cible pour le traitement de la fibrose hépatique, Pathol. Biol. 56(1), 36-38.
6. Michalski, C. *et al.* (2008) Cannabinoids reduce markers of inflammation and fibrosis in pancreatic stellate cells, PLoS One 3(2), e1701.
7. Pertwee, R. G. (2005) Pharmacological actions of cannabinoids, Handb. Exp. Pharmacol.(168), 1-51.
8. Akhmetshina, A. *et al.* (2009) The cannabinoid receptor CB2 exerts antifibrotic effects in experimental dermal fibrosis, Arthritis. Rheum. 60(4), 1129-1136.

9. Marquart, S. *et al.* (2010) Inactivation of the cannabinoid receptor CB1 prevents leukocyte infiltration and experimental fibrosis, *Arthritis. Rheum.* 62(11), 3467-3476.
10. Servettaz, A. *et al.* (2010) Targeting the Cannabinoid Pathway Limits the Development of Fibrosis and Autoimmunity in a Mouse Model of Systemic Sclerosis, *The American Journal of Pathology* 177(1), 187-196.
- 5 11. Balistreri, E. *et al.* (2011) The cannabinoid WIN55, 212-2 abrogates dermal fibrosis in scleroderma bleomycin model, *Ann. Rheum. Dis.* 70(4), 695-699.
12. Burstein, S. (2005) Ajulemic acid (IP-751): Synthesis, proof of principle, toxicity studies, and clinical trials, *AAPS J.* 7(1), E143-E148.
- 10 13. Salim, K. *et al.* (2005) Pain measurements and side effect profile of the novel cannabinoid ajulemic acid, *Neuropharmacology* 48(8), 1164-1171.
14. Vann, R. E. *et al.* (2007) Cannabimimetic Properties of Ajulemic Acid, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320(2), 678-686.
15. Karst, M. (2007) Comments on "Cannabimimetic Properties of Ajulemic Acid", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322(1), 420-421.
16. Liu, J. *et al.* (2003) Activation and Binding of Peroxisome Proliferator- Activated Receptor γ by Synthetic Cannabinoid Ajulemic Acid, *Mol. Pharmacol.* 63(5), 983-992.
17. O'Sullivan, S. E. (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors, *Br. J. Pharmacol.* 152(5), 576-582.
18. Wei, J. *et al.* (2010) PPAR γ downregulation by TGF β in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis, *PLoS One* 5(11), e13778.
- 20 19. Genovese, T. *et al.* (2005) Effect of rosiglitazone and 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 on bleomycin-induced lung injury, *Eur. Respir. J.* 25(2), 225-234.
20. Kapoor, M. *et al.* (2009) Loss of peroxisome proliferator-activated receptor γ in mouse fibroblasts results in increased susceptibility to bleomycin-induced skin fibrosis, *Arthritis. Rheum.* 60(9), 2822-2829.
- 25 21. Varga, J. y Abraham, D. (2007) Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder, *J. Clin. Invest.* 117(3), 557-567.
22. Beyer, C. *et al.* (2010) Animal models of systemic sclerosis: Prospects and limitations, *Arthritis. Rheum.* 62(10), 2831-2844.
23. Avouac, J. *et al.* (2012) Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor β -mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis, *Arthritis. Rheum.* 64(5), 1642-1652.
- 30 24. Reich, N. *et al.* (2010) The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis, *Arthritis. Rheum.* 62(1), 280-290.
25. Akhmetshina, A. *et al.* (2009) Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis, *Arthritis. Rheum.* 60(1), 219-224.
- 35 26. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. (1980) Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma), *Arthritis. Rheum.* 23(5), 581-590.
27. Garcia-Gonzalez, E. *et al.* (2009) Cannabinoids inhibit fibrogenesis in diffuse systemic sclerosis fibroblasts, *Rheumatology* 48(9), 1050-1056.
- 40 28. Gonzalez, E. G. *et al.* (2012) Synthetic cannabinoid ajulemic acid exerts potent antifibrotic effects in experimental models of systemic sclerosis, *Ann. Rheum. Dis.* (E-pub April 4, 2012).
29. Venalis, P. *et al.* (2009) Lack of inhibitory effects of the anti-fibrotic drug imatinib on endothelial cell functions *in vitro* and *in vivo*, *J. Cell. Mol. Med.* 13(10), 4185-4191.
30. Kulkarni, A. A. *et al.* (2011) PPAR- γ ligands repress TGF β -induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis, *PLoS One* 6(1), e15909.
- 45 31. Wei, J. *et al.* (2011) Fibrosis in systemic sclerosis: Emerging concepts and implications targeted therapy, *Autoimmun. Rev.* 10(5), 267-275.
32. Yamamoto, T. (2010) Animal model of systemic sclerosis, *The Journal of Dermatology* 37(1), 26-41.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende ácido ajulémico para su uso en el tratamiento de la fibrosis pulmonar en un sujeto.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha composición se administra por vía oral.
- 5 3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha composición se administra por vía intravenosa.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha composición se administra a través de un implante o parche.
5. La composición para el uso de la reivindicación 4, en donde dicho implante o parche proporciona una liberación lenta de dicha composición.
- 10 6. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha composición se administra por inhalación.
7. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha composición se administra en un comprimido.

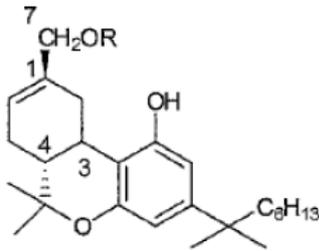
FIGURA 1



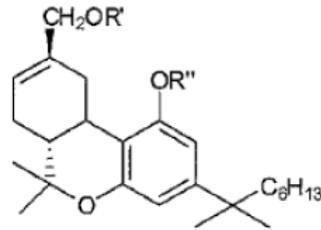
Fórmula 1

FIGURA 2

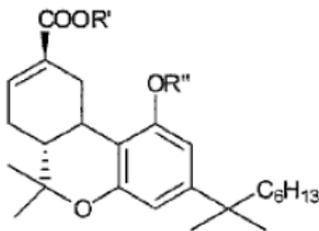
Esquema sintético para derivados de ácidos (3R,4R)-
delta 8-tetrahidrocannabinol-11-oicos



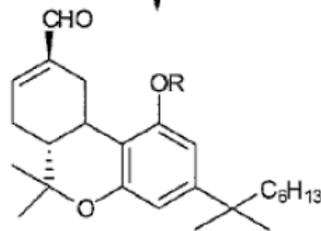
1a: R = H
b: R = COC(CH₃)₃



4a: R' = H; R'' = Si(CH₃)₂-t-C₄H₉
b: R' = COC(CH₃)₃; R'' = Si(CH₃)₂-t-C₄H₉
c: R' = H; R'' = CH₃



3a: R' = R'' = H
b: R' = H; R'' = Si(CH₃)₂-t-C₄H₉
c: R' = H; R'' = COCH₃
d: R' = H; R'' = CH₃
e: R' = CH₃; R'' = H



5a: R = H
b: R = Si(CH₃)₂-t-C₄H₉
c: R = CH₃

FIGURA 3

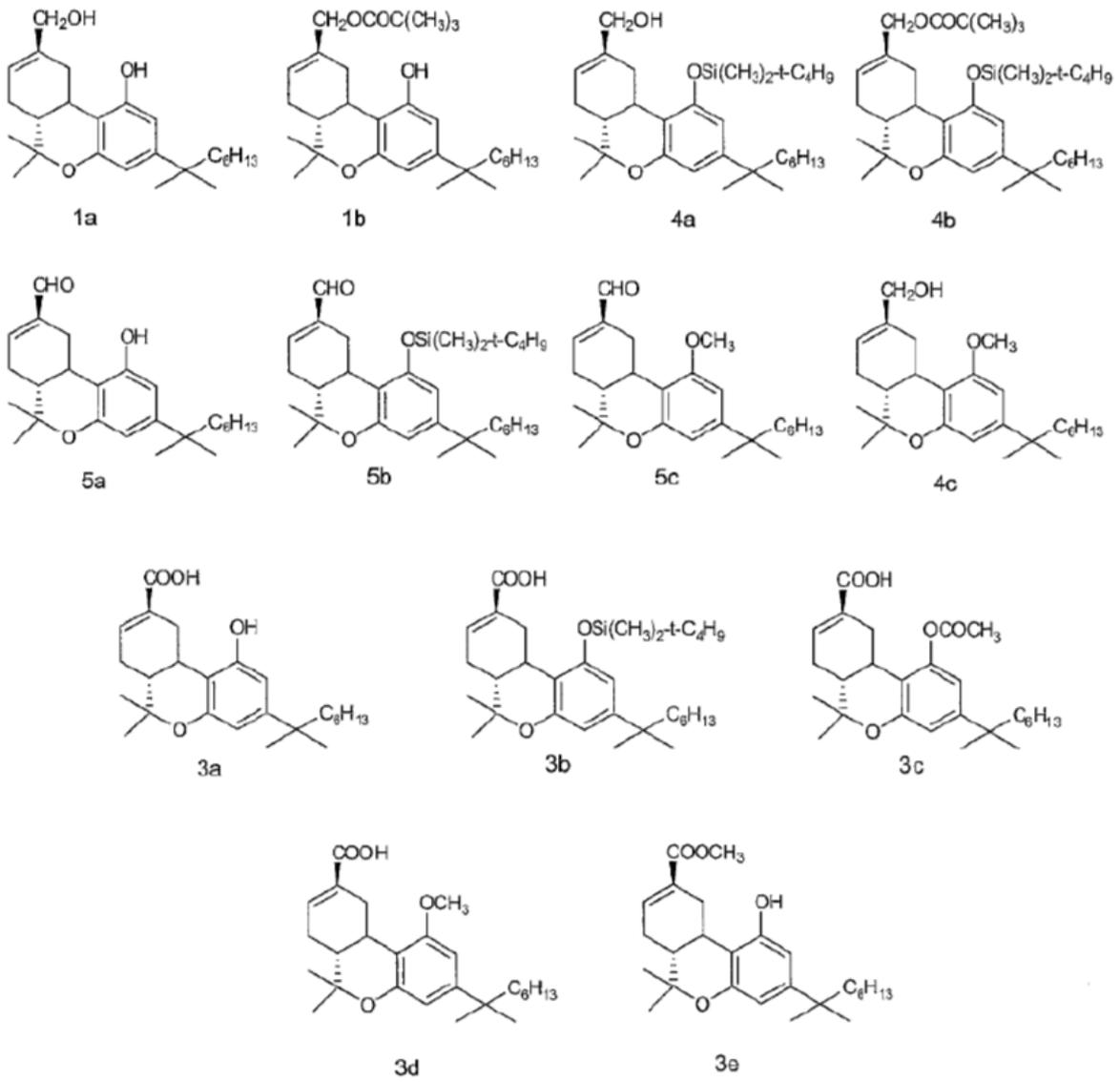


FIGURA 4

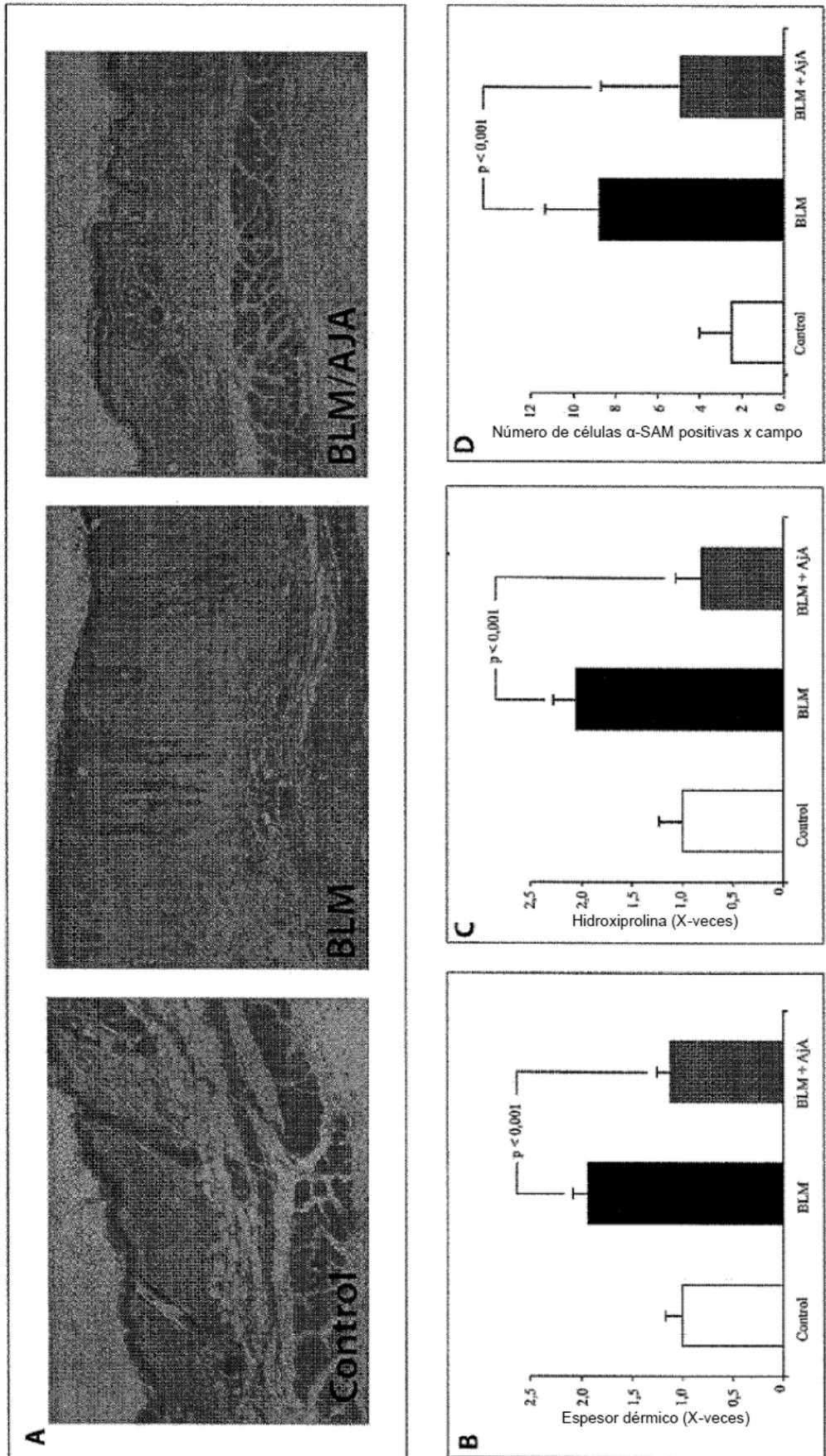


FIGURA 5

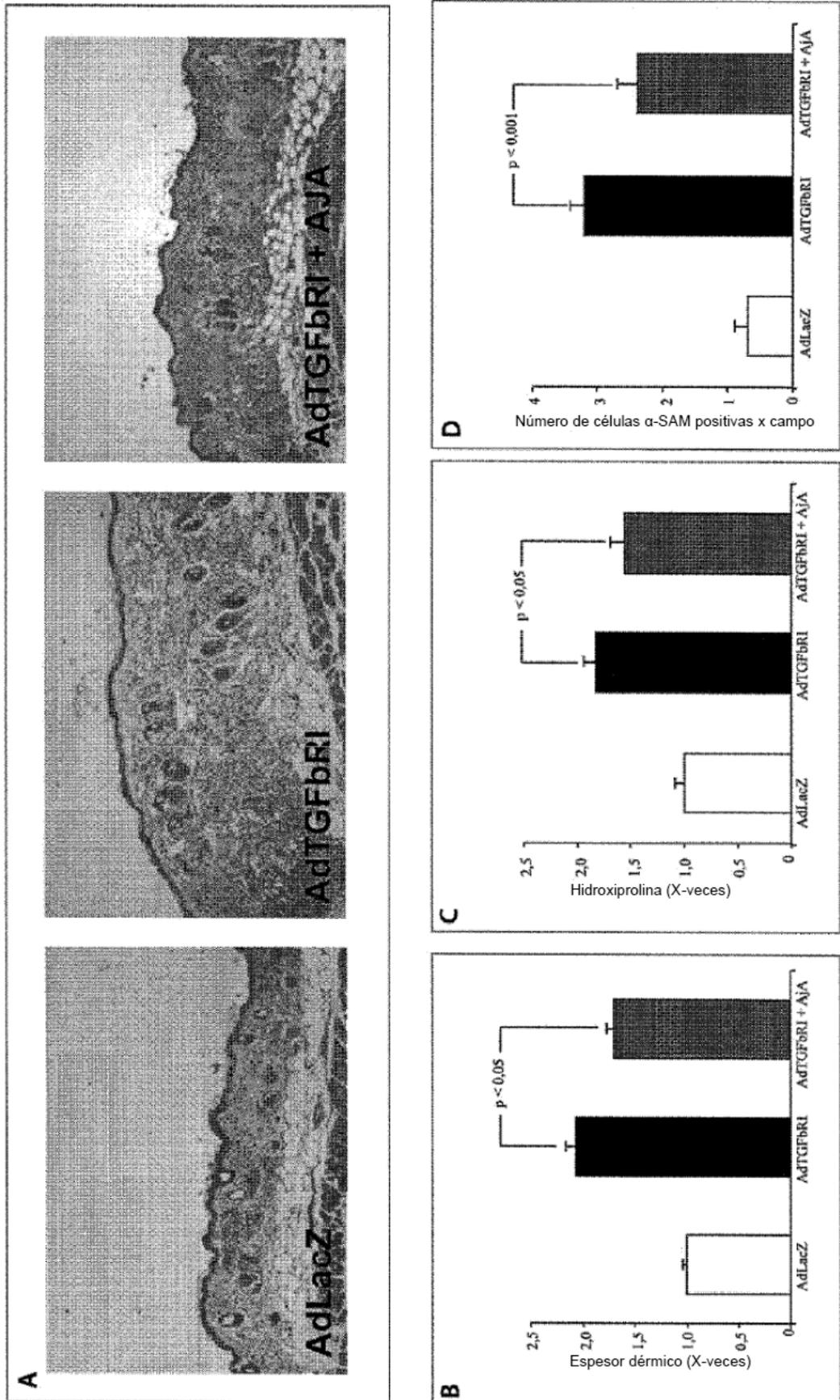


FIGURA 6

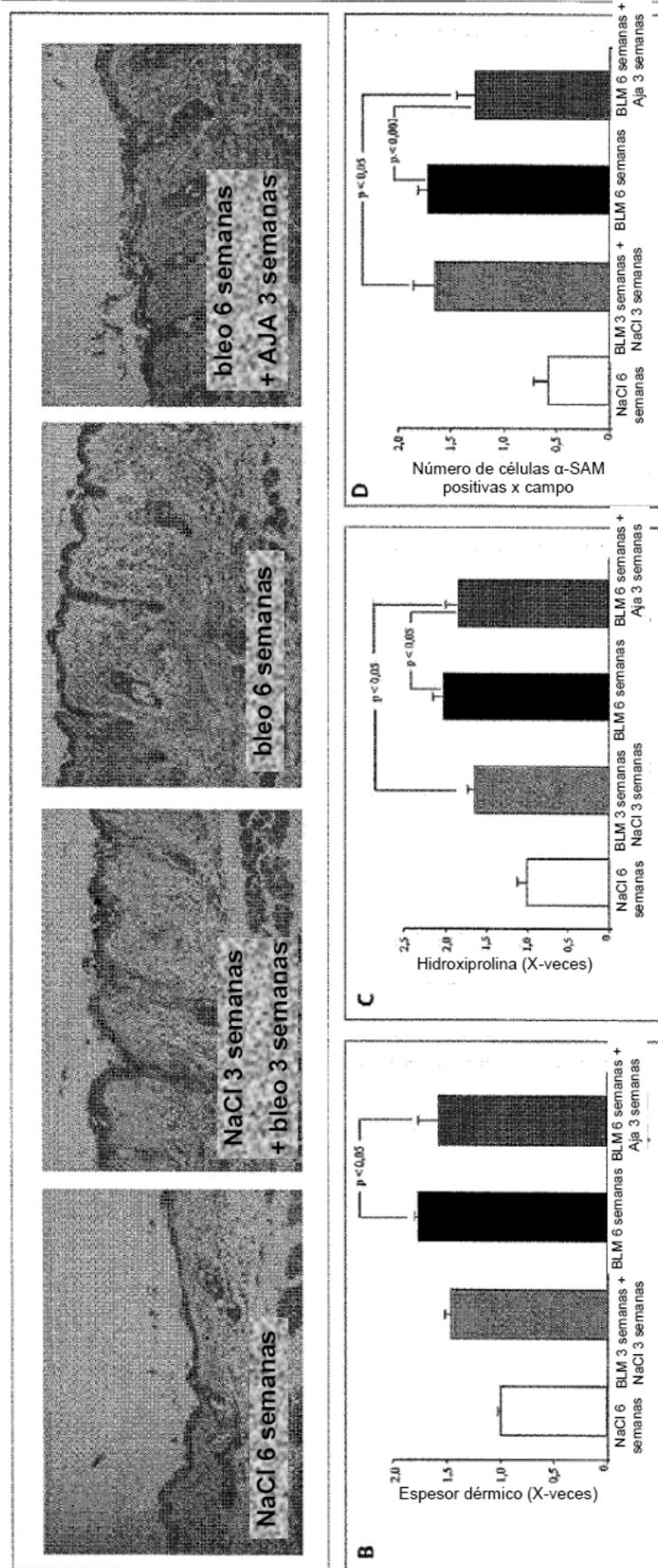


FIGURA 7

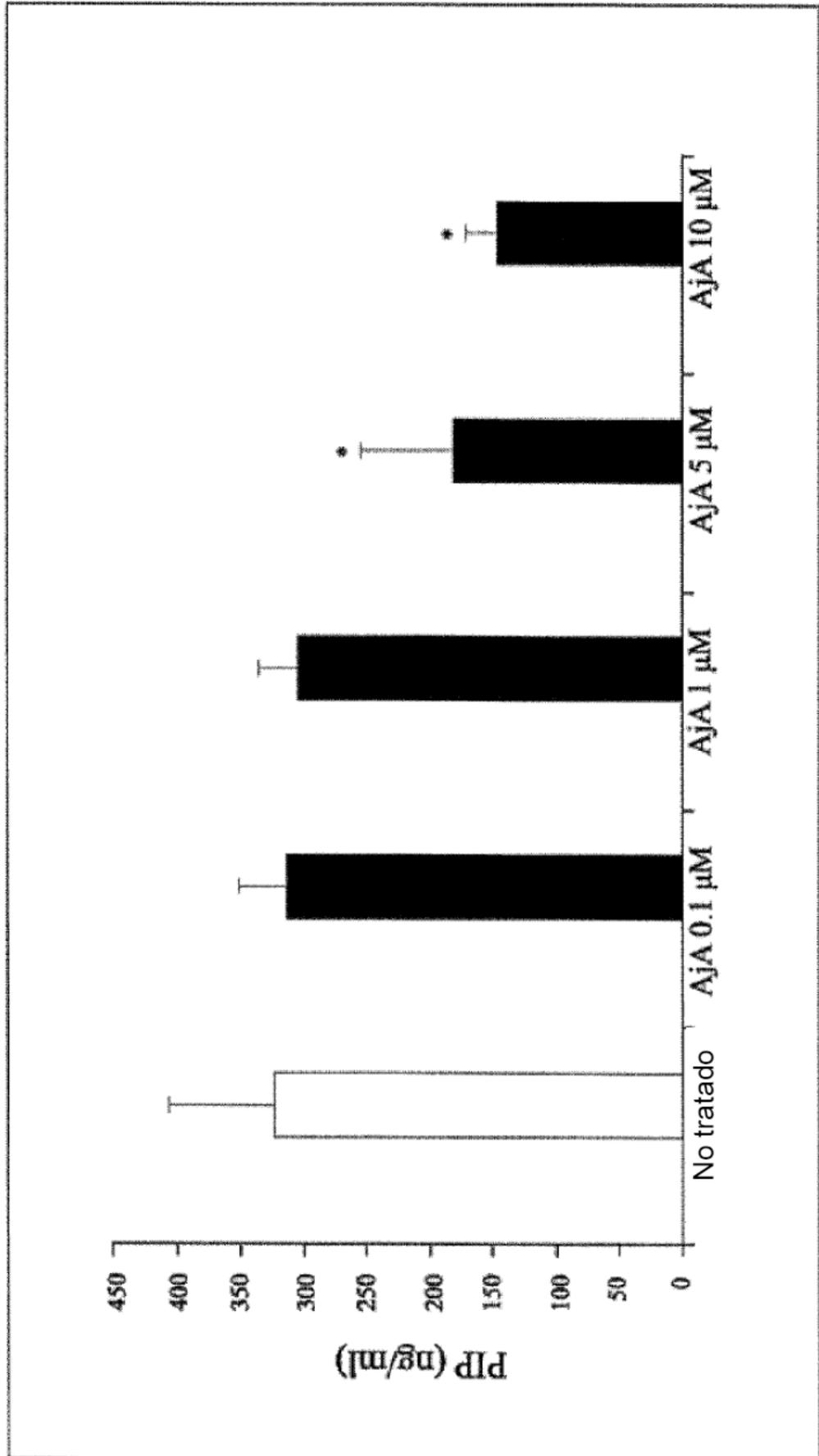


FIGURA 8

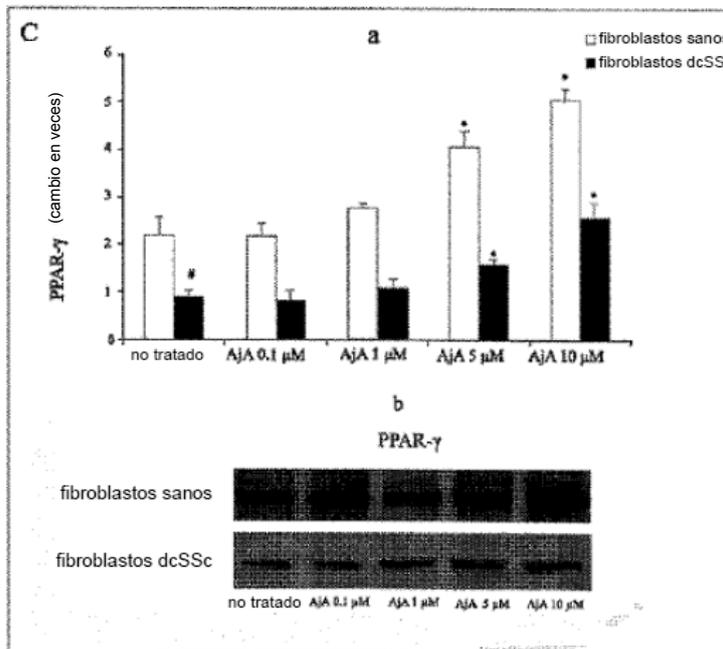
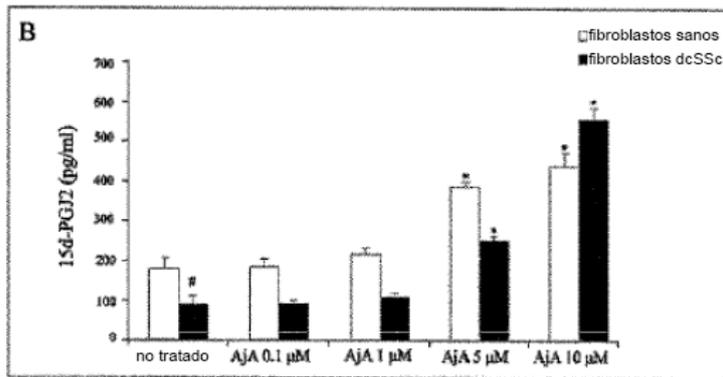
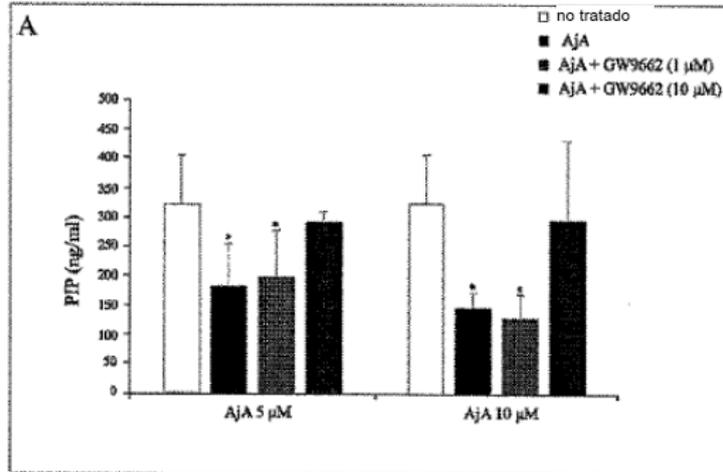


FIGURA 9

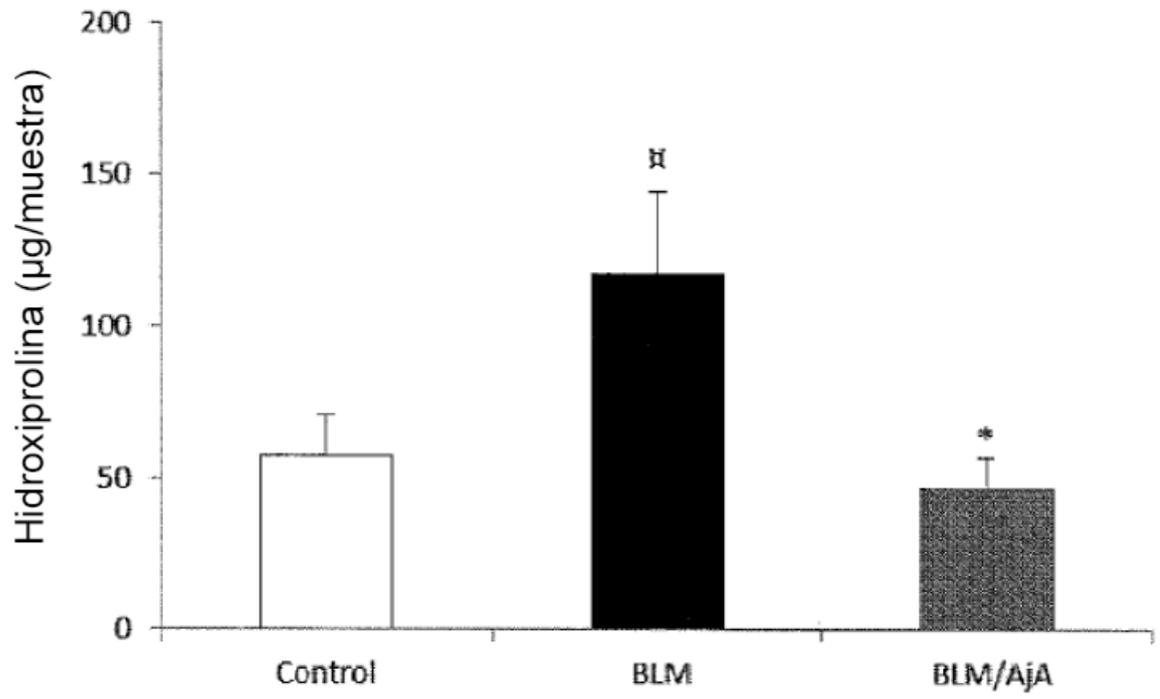


FIGURA 10



FIGURA 11

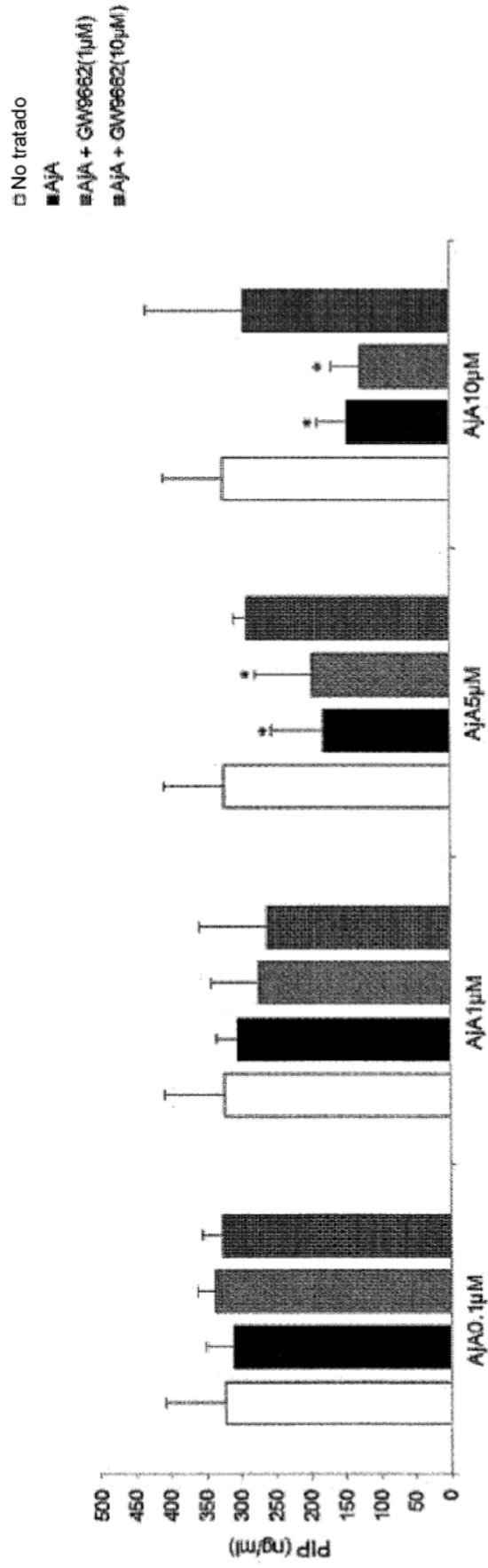


FIGURA 12

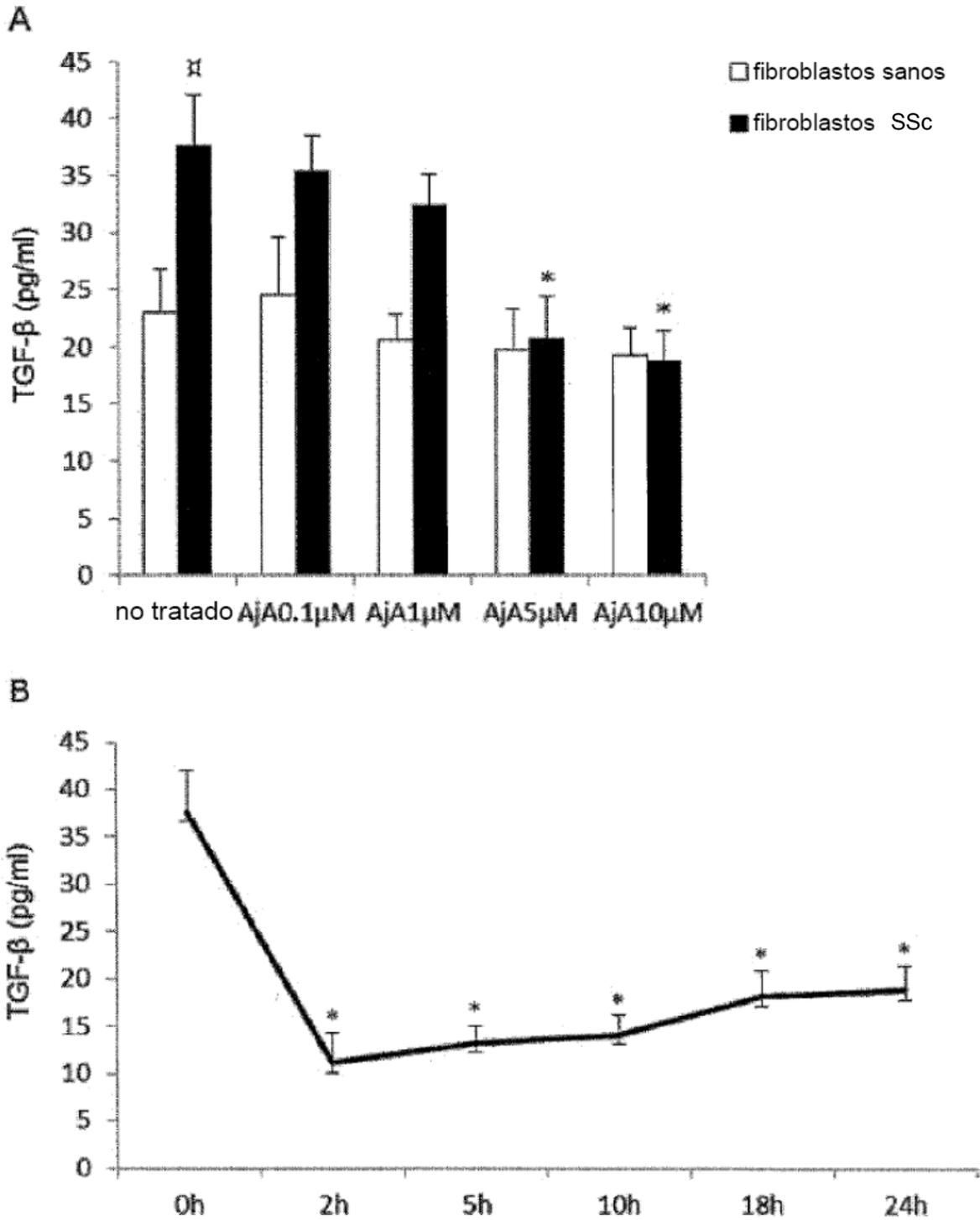
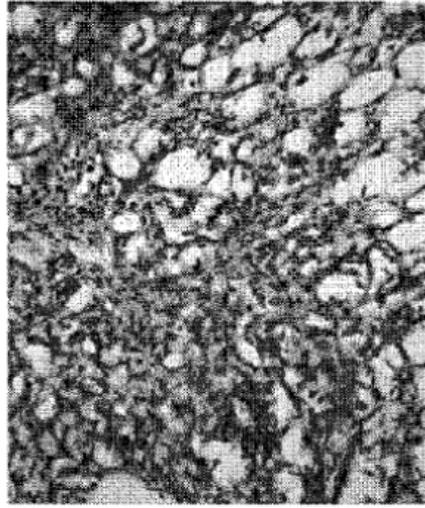
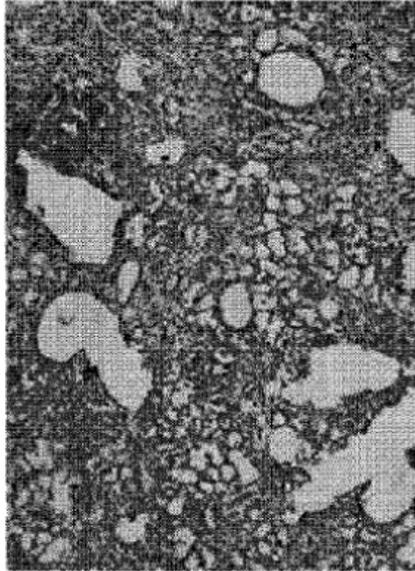


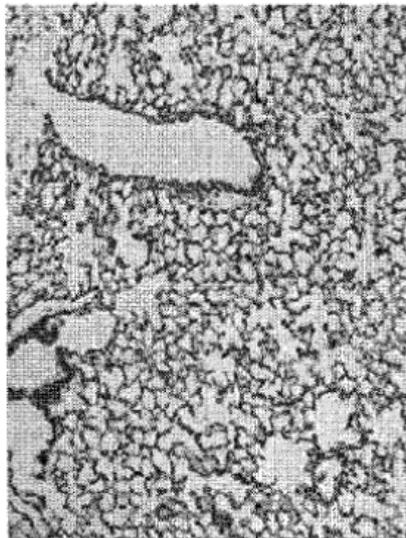
FIGURA 13



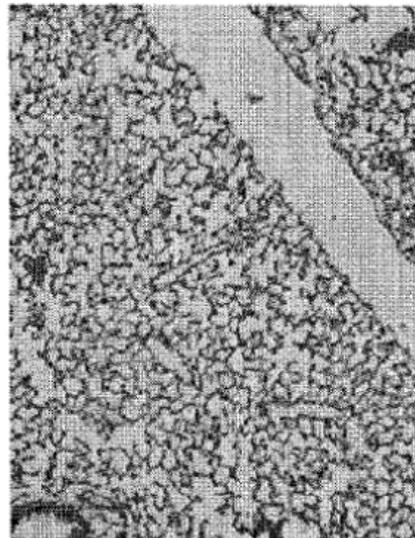
BLM(x20)



BLM (x10)



Control (x10)



BLM+AJA 5mg/kg

FIGURA 14

	n	media	DE	*p (vs blm)	*p (vs ctrl)
CONTROLES	5	174.32	35.03950628	0.000466543	
BLM	5	300.94	35.48912509		0.000466543
BLM+AJA1mg/kg	5	172.73	29.17	0.001942806	0.949950450
BLM+AJA5mg/kg	5	208.72	38.20	0.004210398	0.176174756

Contenido de hidroxiprolina en los pulmones