

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 091**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/196** (2006.01)

**A61K 31/343** (2006.01)

**A61K 31/357** (2006.01)

**A61P 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2013 PCT/EP2013/052617**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13117744**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 13706195 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 2811993**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento de fibrosis**

30 Prioridad:

**09.02.2012 EP 12425027**  
**09.05.2012 US 201261644544 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2020**

73 Titular/es:

**NOGRA PHARMA LIMITED (100.0%)**  
**33 Sir John Rogerson's Quay**  
**Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

**BARONI, SERGIO;**  
**BELLINIA, SALVATORE y**  
**VITI, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 755 091 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

Procedimientos de tratamiento de fibrosis

**Antecedentes**

5 La fibrosis es la formación de tejido conjuntivo fibroso en exceso en un órgano o tejido en un procedimiento reparador o reactivo, por ejemplo, curación, generalmente debido a una lesión o inflamación a largo plazo. La fibrosis hace que los tejidos afectados se endurezcan y/o se hinchen y reduce el flujo de fluidos a través de estos tejidos. Como resultado, los tejidos con fibrosis pueden no funcionar correctamente.

10 Por ejemplo, la fibrosis hepática puede describirse como la respuesta de curación de heridas a la lesión hepática crónica como resultado de, por ejemplo, abuso de alcohol y/o drogas, infección viral y parasitaria (por ejemplo, hepatitis, tal como hepatitis B o C), esteatohepatitis no alcohólica (ENA), sobrecarga de hierro y cobre, y enfermedades autoinmunitarias. Todas las enfermedades hepáticas crónicas pueden provocar fibrosis hepática, con el principio de causar hepatitis B viral crónica y enfermedad hepática alcohólica. El sistema endocannabinoide hepático participa en los efectos pro y antifibrogénicos mediante la activación de distintas vías de señalización que afectan de manera diferencial a la proliferación y la muerte de los tipos de células fibrogénicas. Con el tiempo, este procedimiento puede provocar cirrosis hepática en la que la organización arquitectónica de las unidades funcionales del hígado se interrumpe tanto que el flujo sanguíneo a través del hígado y la función hepática se interrumpan.

20 La fibrosis hepática representa un desafío común y difícil de importancia mundial. Actualmente, el único tratamiento curativo para la cirrosis terminal es el trasplante, pero, incluso en el mundo desarrollado, el número de órganos donantes disponibles y el estado clínico del receptor potencial limitan la aplicabilidad de esta técnica. El desarrollo de fibrosis, y particularmente cirrosis, se asocia con una morbilidad y mortalidad significativas. Así pues, existe un imperativo considerable para desarrollar estrategias antifibróticas que sean aplicables a la fibrosis hepática.

25 La fibrosis renal causa una morbilidad y mortalidad significativas como la lesión primaria adquirida que conduce a la necesidad de diálisis o trasplante de riñón. La fibrosis puede producirse en el componente de filtración o reabsorción de la nefrona, la unidad funcional del riñón. La fibrosis también puede producirse en el corazón, por ejemplo, la fibrosis cardíaca puede producirse como un engrosamiento de una válvula cardíaca.

La fibrosis intestinal es una complicación común de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que puede volverse sintomática y puede requerir intervención quirúrgica si se produce la formación de estenosis. La mayoría de los mecanismos tradicionales y novedosos subyacentes a la fibrosis intestinal están asociados con la inflamación crónica.

30 Johnson y col., (Inflamm Bowel Dis, 2012, 18, 460 - 471), describe una serie de experimentos en los que el antibiótico levofloxacino se usa para tratar la inflamación intestinal en un modelo de ratón de fibrosis intestinal que se inicia por la infección por *Salmonella typhimurium*. Los resultados descritos allí indican que la erradicación del estímulo inflamatorio no previno la fibrosis.

El documento WO20081004557 describe agonistas de PPAPy para la inducción de la expresión de péptidos antimicrobianos catiónicos como estimulantes inmunoprotectores.

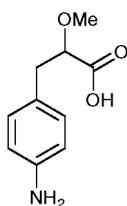
35 El documento WO2007010514 describe compuestos que son específicos para los receptores PPAR y los receptores EGF y el uso de dichos compuestos en el tratamiento del cáncer.

El documento WO2010091892 describe compuestos de alquilamido que pueden modular la actividad de los receptores PPAR y/o EGF.

40 Yu y col., (Int. J. Biochem. Cell Biol., 2010, 42, 948-957) describe una serie de experimentos que analizan el potencial para el tratamiento de la esteatohepatitis y la fibrosis inducidas por una dieta deficiente en metionina colina (MCD) mediante la transducción de un adenovirus que expresa PPAPy.

**Sumario**

En un aspecto, la presente invención proporciona ácido 2-metoxi-3- (4'-aminofenil) propiónico (compuesto 34) representado por la fórmula:



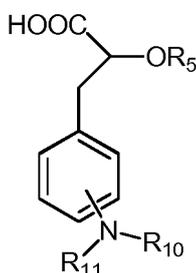
45

o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la fibrosis, en el que la fibrosis se selecciona de fibrosis intestinal o fibrosis pulmonar idiopática, como se expone en las reivindicaciones.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido 2-metoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico (compuesto 34), o una sal farmacéuticamente aceptable o un estereoisómero del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de un paciente que padece fibrosis, en el que la fibrosis se selecciona de fibrosis intestinal o fibrosis pulmonar idiopática, como se expone en las reivindicaciones.

**Descripción**

- 10 En el presente documento se desvelan, por ejemplo, son procedimientos para tratar la fibrosis que comprenden administrar compuestos desvelados en el presente documento a un paciente. También se desvelan compuestos para su uso en tales procedimientos. Por ejemplo, se desvela un procedimiento para prevenir o tratar la fibrosis hepática y/o fibrosis intestinal en un sujeto o paciente que lo necesite o que padezca la misma, que comprende administrar una cantidad terapéutica y/o farmacéuticamente aceptable de un compuesto representado por:



- 15 en el que

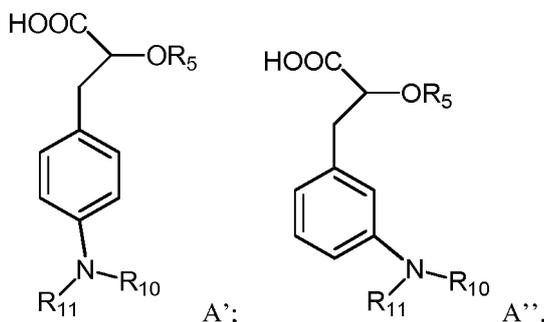
R<sub>10</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 R<sub>11</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y -C(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 R<sub>5</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 20 R<sub>5</sub> puede ser H.

Las funcionalidades alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y/o R<sub>5</sub> se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en: metilo, etilo, propilo, pentilo y hexilo. La funcionalidad alquilo puede ser lineal o ramificada. Las funcionalidades metil y etil alquilo son particularmente preferidas, siendo metilo la funcionalidad de alquilo más preferida.

- 25 Adecuadamente, el nitrógeno puede estar unido al anillo en las posiciones 2', 3', 4' o 5'. Preferentemente, el nitrógeno se une en la posición 3' o 4'. La posición 4' es la más preferida.

Los compuestos contemplados a modo de ejemplo de la divulgación pueden incluir las fórmulas A' y A'', en la que R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>5</sub> se han proporcionado anteriormente y en el presente documento:



- R<sub>5</sub> puede ser H.

- 30 Las funcionalidades alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y/o R<sub>5</sub> se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en: metilo, etilo, propilo, pentilo y hexilo. La funcionalidad alquilo puede ser lineal o ramificada. Las funcionalidades metil y etil alquilo son particularmente preferidas, siendo metilo la funcionalidad de alquilo más preferida. R<sub>5</sub> puede ser metilo, etilo, propilo o es, por ejemplo, metilo.

- 35 También se desvela en el presente documento un procedimiento para prevenir o tratar la fibrosis hepática o intestinal, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una preparación farmacéutica que comprende un agente

PPAPy tal como un compuesto desvelado en el presente documento. En el presente documento se desvelan procedimientos para prevenir o tratar la fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal y/o fibrosis sistémica nefrogénica, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una preparación farmacéutica que comprende un agente PPAPy tal como un compuesto desvelado en el presente documento. Por ejemplo, los procedimientos desvelados en el presente documento pueden incluir procedimientos en los que el paciente es un ser humano. En consecuencia, los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse en el tratamiento y/o prevención de estas enfermedades/afecciones.

Estos y otros aspectos y ventajas de la divulgación serán evidentes al considerar las siguientes figuras, descripción detallada y reivindicaciones.

#### 10 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 representa la evolución del peso corporal de los ratones tras la administración de CCl<sub>4</sub>, JWH-133 y compuesto 34.

La Figura 2 (A) muestra una explicación de las puntuaciones de metavir y (B) muestra el efecto de CCl<sub>4</sub>, JWH-133+ CCl<sub>4</sub> y compuesto 34+ CCl<sub>4</sub> en el hígado y especifica una puntuación de metavir para cada grupo.

15 La Figura 3 (A) representa la puntuación de metavir y (B) la puntuación de metavir adaptada de hígados de ratones sometidos a CCl<sub>4</sub>, JWH- 133+ CCl<sub>4</sub> y compuesto 34+ CCl<sub>4</sub>.

La figura 4 representa el efecto de CCl<sub>4</sub>, JWH-133+ CCl<sub>4</sub> y compuesto 34+ CCl<sub>4</sub> en  $\alpha$ -SMA y colágeno 1.

La Figura 5 representa el calendario de estudio de la fibrosis intestinal.

La Figura 6 representa el efecto del compuesto 34 en el colon de los ratones que tienen fibrosis intestinal.

20 La figura 7 representa el efecto antiinflamatorio del compuesto 34 en el colon de ratones que tienen fibrosis intestinal.

La Figura 8 representa el efecto del compuesto 34 en el colon de los ratones que tienen fibrosis intestinal.

La Figura 9 representa el efecto del compuesto 34 en el colon de ratones que tienen fibrosis intestinal usando un análisis inmunohistoquímico de los principales marcadores de fibrosis (Colágeno I-III, CTGF, SMAD 2/3, PDGF,  $\alpha$ -SMA y TGF- $\beta$ 1).

25 La Figura 10 representa el efecto del compuesto 34 en el colon de ratones que tienen fibrosis intestinal usando un análisis de transferencia Western.

La Figura 11 muestra una curva de peso corporal en ratones tratados con DSS y DSS + GED.

30 La Figura 12 muestra el nivel de fibrosis en el colon de los ratones tratados con DSS y DSS + GED en comparación con los ratones de control que reciben agua regular.

La Figura 13 representa los hallazgos microscópicos del colon de colitis crónica de ratones DSS y DSS + GED.

Los tejidos de colon se fijaron en PFA al 4 % y las secciones transversales (4  $\mu$ m) se tiñeron con May-Grunwald-Giemsa (H&E) y tricromo de Masson. Los ratones DSS mostraron un grado inflamatorio severo y fibrosis tanto en la submucosa como en la serosa en comparación con los controles, mientras que el tratamiento con GED determinó la restauración de la arquitectura normal de la pared intestinal. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM; \*= $p$ <0,05; \*\*= $p$ < 0,01 y \*\*\*= $p$ <0,005 frente a H<sub>2</sub>O.

La Figura 14 muestra la inmunohistoquímica y la inmunotransferencia de los principales marcadores de fibrosis.

La microfotografía muestra una reducción significativa de colágeno I-III (a),  $\alpha$ -SMA (b) en ratones DSS tratados con GED, en comparación con los ratones con colitis crónica inducida por DSS. Los niveles de proteína de estos marcadores también se midieron mediante transferencia Western confirmando el perfil de expresión inducido por GED. Se muestran los puntos de transferencia representativos. \*= $p$ < 0,05, \*\*= $p$ < 0,01. N = 6 ratones para el grupo de control, 8 ratones para el grupo DSS, 8 ratones para el grupo DSS + GED.

40 La Figura 15 representa una microfotografía que muestra una reducción significativa de TGF- $\beta$ 1 (a), SMAD 2/3 (b), CTGF (c) en los ratones DSS tratados con GED, en comparación con los ratones con colitis crónica inducida por DSS.

45 La Figura 16 muestra el efecto de la administración de GED sobre los niveles de proteína IL-13 en ratones tratados con DSS crónico y en sus mediadores corriente abajo, TGF- $\beta$ 1 y CTGF. IL-13, Los niveles de proteína TGF- $\beta$ 1 y CTGF se determinaron mediante análisis de transferencia Western. Los datos se presentan como porcentaje de los valores medios de los controles. Se muestran los puntos de transferencia representativos. \*\* =  $p$  < 0,01..N = 6 ratones para el grupo de control, 8 ratones para el grupo DSS, 8 ratones para el grupo DSS + GED.

50

#### **Descripción detallada**

La divulgación se basa, en parte, al descubrir que ciertos compuestos desvelados en el presente documento tienen la capacidad de prevenir o tratar la fibrosis, por ejemplo, en el hígado o en el colon. En un aspecto, la divulgación se refiere a procedimientos para prevenir o tratar la fibrosis, por ejemplo, fibrosis hepática y/o fibrosis intestinal, en pacientes que lo necesitan. Los procedimientos desvelados comprenden administrar un compuesto desvelado en el presente documento.

55

Antes de una descripción más detallada, ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se recogen en el presente documento. Estas definiciones deben leerse a la luz del resto de la divulgación y deben ser entendidas por un experto en la materia. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica entiende habitualmente.

60

Un "paciente", "sujeto" o "huésped" a tratar por el procedimiento sujeto puede significar un animal humano o no humano, por ejemplo, un pequeño mamífero, tal como un ratón o una rata, e incluyendo caballo, vaca, perro, gato, etc.

5 La expresión "agente terapéutico" es reconocido en la técnica y se refiere a cualquier resto químico que es una sustancia biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa localmente y/o sistémicamente en un sujeto. Los ejemplos de agentes terapéuticos, también conocidos como "fármacos", se describen en referencias bibliográficas bien conocidas, como el índice Merck, el Physicians Desk Reference y el Pharmacological Basis of Therapeutics, e incluyen, aunque no de forma limitativa, medicamentos; vitaminas; suplementos minerales; sustancias utilizadas para el tratamiento, prevención, diagnosis, cura o mitigación de una enfermedad o dolencia; sustancias que afectan a la estructura o función del cuerpo; o profármacos, que se vuelven biológicamente activas o más activas después de haber sido colocados en un entorno fisiológico.

15 La expresión "efecto terapéutico" es reconocida en la técnica y se refiere a un efecto local y/o sistémico en animales, particularmente mamíferos y, más particularmente, seres humanos causados por una sustancia farmacológicamente activa. Por lo tanto, el término significa cualquier sustancia destinada para su uso en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades o en la mejora del desarrollo y/o condiciones físicas o mentales deseables en un animal o ser humano. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de dicha sustancia que produce algún efecto local o sistémico deseado en una proporción beneficios/riesgos razonable aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente efectiva de dicha sustancia variará dependiendo del sujeto y la condición de la enfermedad a tratar, del peso y de la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad o afección, la forma de administración y similares, que un experto en la materia puede determinar fácilmente. Por ejemplo, ciertas composiciones de la presente divulgación pueden administrarse en una cantidad suficiente para producir una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a dicho tratamiento.

20 El término "tratar" está reconocido en la técnica y se refiere a curar así como a mejorar al menos un síntoma de cualquier afección o enfermedad.

25 El término "alquilo" es reconocido en la técnica e incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En determinados aspectos de la divulgación, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene aproximadamente 30 átomos de carbono o menos en su cadena principal (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> para cadena lineal, C<sub>3</sub>-C<sub>30</sub> para cadena ramificada) y, como alternativa, aproximadamente 20 o menos, por ejemplo, de 1 a 6 carbonos. Igualmente, los cicloalquilos tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en su estructura de anillo, y como alternativa, aproximadamente 5, 6 o 7 carbonos en la estructura de anillo. El término "alquilo" también se define para incluir alquilos sustituidos con halógeno.

35 Por otra parte, el término "alquilo" (o "alquilo inferior") incluye "alquilos sustituidos", que se refiere a restos alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan a un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo. Dichos sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un hidroxilo, un carbonilo (tal como a carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo, o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato, o un tioformiato), un alcoxilo, un fosforilo, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterocicilo, un aralquilo o un resto aromático o heteroaromático. Los expertos en la materia entenderán que los restos sustituidos sobre la cadena de hidrocarburo pueden estar en sí mismos sustituidos, si es apropiado. Por ejemplo, los sustituyentes de un alquilo sustituido pueden incluir formas sustituidas y no sustituidas de amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato), y grupos sililo, así como éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos y ésteres), -CN y similares. Ejemplos de alquilos sustituidos se describen a continuación. Los cicloalquilos pueden estar sustituidos además con alquilos, alquenilos, alcoxis, alquiltios, aminoalquilos, alquilos sustituidos con carbonilo, -CN, y similares.

40 Los términos orto, meta y para son reconocidos en la técnica y se refieren a bencenos 1,2-, 1,3- y 1,4-disustituidos, respectivamente. Por ejemplo, los nombres 1,2-dimetilbenceno y orto-dimetilbenceno son sinónimos.

La definición de cada expresión, por ejemplo, alquilo, m, n, y similares, cuando se producen más de una vez en cualquier estructura, se pretende que sea independiente de su definición en otra parte de la misma estructura.

50 Ciertos compuestos contenidos en las composiciones de la presente divulgación pueden existir en formas geométricas o estereoisoméricas particulares. Además, los compuestos de la presente divulgación también pueden ser ópticamente activos. La presente divulgación contempla todos estos compuestos, incluyendo isómeros *cis* y *trans*, enantiómeros *R* y *S*, diastereómeros, (D)-isómeros, (L)-isómeros, las mezclas racémicas de los mismos y otras mezclas de los mismos, que se encuentran dentro del ámbito de la divulgación. En un sustituyente, tal como un grupo alquilo, puede haber átomos de carbono asimétricos adicionales. Se pretende incluir a todos esos isómeros, así como sus mezclas, en el presente documento divulgación.

55 Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que dicha sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente y que la sustitución da como resultado un compuesto

estable, por ejemplo, que no se transforma espontáneamente, tal como por reorganización, ciclación, eliminación u otra reacción.

Se contempla que el término "sustituido" incluye todos los sustituyentes permitidos de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permitidos incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y sin ramificar, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento anteriormente. Los sustituyentes permitidos pueden ser uno o más y los mismos o diferentes compuestos orgánicos adecuados. Para los fines de la presente divulgación, los heteroátomos, tales como nitrógeno, pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en el presente documento que satisfaga las valencias de los heteroátomos. La presente divulgación no pretende estar limitada de ninguna manera por los sustituyentes permitidos de los compuestos orgánicos.

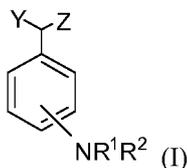
Para los fines de la presente divulgación, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 67ª Ed., 1986-87, parte interior. También a los fines de esta divulgación, se contempla que el término "hidrocarburo" incluya todos los compuestos permisibles que tienen al menos un átomo de hidrógeno y un átomo de carbono. En un aspecto amplio, los hidrocarburos permitidos incluyen compuestos orgánicos acíclicos y cíclicos, ramificados y sin ramificar, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos que pueden estar sustituidos o no sustituidos.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" está reconocida en la técnica y se refiere a los relativamente no tóxicos, sales de compuestos de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos, que incluyen, por ejemplo, los contenidos en las composiciones de la presente divulgación.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica y se refiere a un material composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, involucrado en llevar o transportar cualquier composición del sujeto o componente del mismo desde un órgano o porción del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con la composición del sujeto y sus componentes y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

### **Compuestos**

Los compuestos contemplados para su uso en uno o más de los procedimientos desvelados incluyen compuestos representados por la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero o estereoisómero de los mismos:



en la que:

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1-6</sub>; o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden tomarse junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo aromático o alifático con 5 o 6 átomos; Y y Z se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, OH, COOH, -OR<sup>3</sup>, -CH(OR<sub>3</sub>)COOH; y

R<sup>3</sup> se selecciona de entre el grupo que consiste en H, fenilo, bencilo, vinilo, alilo, alquilo C<sub>1-6</sub> o alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con uno o más halógenos; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

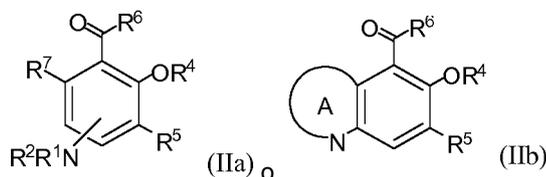
Adecuadamente, las funcionalidades alquilo C<sub>1-6</sub> pueden seleccionarse de forma independientemente del grupo que consiste en: metilo, etilo, propilo, pentilo y hexilo. La funcionalidad alquilo puede ser lineal o ramificada. Las funcionalidades metil y etil alquilo son particularmente preferidas, siendo metilo la funcionalidad de alquilo más preferida.

Y puede ser H o COOH. Por ejemplo, Y puede ser H y Z puede ser CH(OR<sup>3</sup>)COOH o Y puede ser COOH y Z puede ser -OR<sup>3</sup>. R<sup>3</sup> puede ser metilo, etilo, n-propilo o isopropilo.

El resto NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> de fórmula I puede estar en la posición 4' o puede estar en la posición 3'. Por ejemplo, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden ser H.

Adecuadamente, R<sub>3</sub> puede ser H.

5 Los compuestos desvelados en el presente documento también incluyen los representados por las fórmulas IIa o IIb o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero o estereoisómero de:



en la que:

10 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1-6</sub>; o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden tomarse junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo aromático o alifático con 5 o 6 átomos; R<sup>6</sup> está seleccionado entre el grupo que consiste en -NR<sup>9</sup>OH, OH y -OR<sup>9</sup>;

R<sup>9</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> se selecciona de entre el grupo que consiste en H, halo, fenilo, bencilo, vinilo, alilo, alquilo C<sub>1-6</sub> y alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con uno o más halógenos;

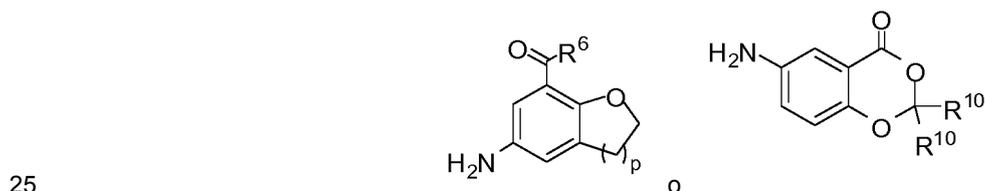
15 R<sup>5</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en hidrógeno o halo, o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, o R<sup>4</sup> y R<sup>6</sup>, juntos, forman un anillo heterocíclico condensado con 5 o 6 átomos, opcionalmente sustituido con halógeno o alquilo C<sub>1-6</sub>; y

A es un anillo heterocíclico condensado; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 Adecuadamente, las funcionalidades alquilo C<sub>1-6</sub> pueden seleccionarse de forma independientemente del grupo que consiste en: metilo, etilo, propilo, pentilo y hexilo. La funcionalidad alquilo puede ser lineal o ramificada. Las funcionalidades metil y etil alquilo son particularmente preferidas, siendo metilo la funcionalidad de alquilo más preferida.

El resto NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> de fórmula IIa puede estar en la posición 4' o puede estar en la posición 3'. R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden ser H. R<sup>9</sup> puede ser metilo, etilo, n-propilo o isopropilo.

En el presente documento también se desvelan compuestos que pueden estar representados por



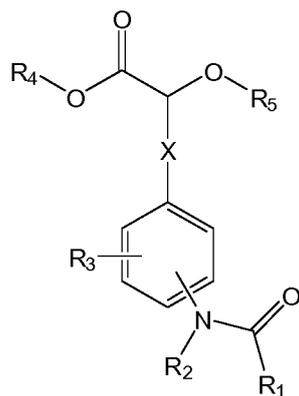
25 en el que p es 1 o 2;

R<sup>6</sup> está seleccionado de entre el grupo que consiste en OH o -OR<sup>9</sup>, en el que R<sup>9</sup> es como se ha definido anteriormente; y

30 R<sup>10</sup> se selecciona independientemente cada vez que está presente del grupo que consiste en H, halógeno o alquilo C<sub>1-6</sub>, por ejemplo, metilo o etilo.

La divulgación también proporciona, al menos en parte, compuestos representados por las fórmulas representadas a continuación, para su uso en los procedimientos desvelados.

Por ejemplo, descritos en el presente documento para su uso en los procedimientos desvelados son compuestos de fórmula III:



III

en la que X es alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados de entre halógeno o hidroxilo;

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>;

5 R<sub>2</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sub>3</sub> se selecciona independientemente, cada vez que está presente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ciano, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, hidroxilo y nitro;

R<sub>4</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sub>5</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

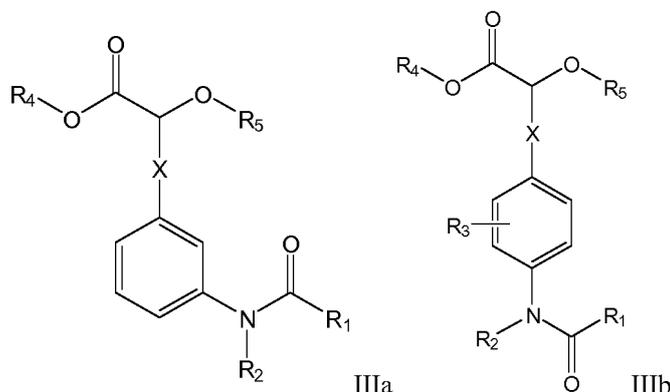
10 o sales o N-óxidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Adecuadamente, R<sub>5</sub> puede ser H.

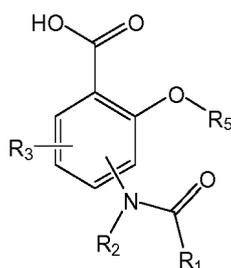
Adecuadamente, las funcionalidades alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> pueden seleccionarse de forma independientemente del grupo que consiste en: metilo, etilo, propilo, pentilo y hexilo. La funcionalidad alquilo puede ser lineal o ramificada. Las funcionalidades metil y etil alquilo son particularmente preferidas, siendo metilo la funcionalidad de alquilo más preferida.

15 R<sub>1</sub> de fórmula III puede ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tal como metilo. R<sub>2</sub> puede ser hidrógeno. R<sub>3</sub> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno e hidroxilo. R<sub>3</sub> puede ser hidrógeno. R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> pueden ser cada uno alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. R<sub>4</sub> puede ser hidrógeno y R<sub>5</sub> puede ser metilo. X puede ser (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, en la que n es 1 o 2, tal como 1.

20 El resto -NR<sub>2</sub>-COR<sub>1</sub> de fórmula III puede estar en la posición meta o para respecto a X como se muestra en las fórmulas IIIa y IIIb.



La divulgación también proporciona compuestos representados por la fórmula IV, como se muestra a continuación, que puede usarse en los procedimientos desvelados, por ejemplo:

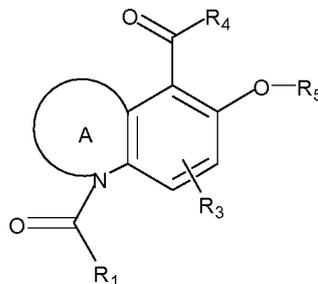


IV

- 5 en la que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>;  
 R<sub>2</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 R<sub>3</sub> se selecciona independientemente, cada vez que está presente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ciano, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, hidroxilo y nitro;  
 R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

o sales o N-óxidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos de Fórmula V también se desvelan como se muestra a continuación:



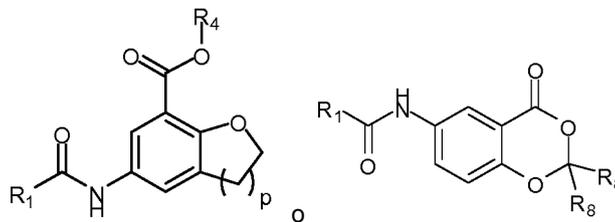
V

- 10 en la que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>;  
 R<sub>3</sub> se selecciona independientemente, cada vez que está presente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ciano, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, hidroxilo y nitro;  
 15 R<sub>4</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y A es un heterociclo fusionado de cinco o seis miembros;

o sales o N-óxidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

R<sub>1</sub> puede ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tal como metilo. R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> pueden ser cada uno alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tal como metilo. R<sub>2</sub> puede ser hidrógeno.

- 20 También se desvela un compuesto que puede ser representado por

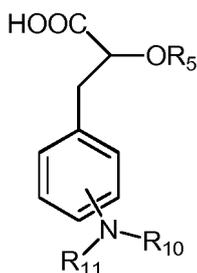


en el que p es 1 o 2;

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>;  
 R<sub>4</sub> y R<sub>8</sub> cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

- 25 o sales o N-óxidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Por ejemplo, los compuestos desvelados en el presente documento para su uso en los procedimientos descritos incluyen compuestos de fórmula A:

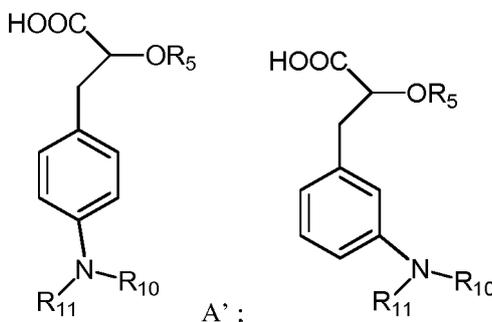


R<sub>10</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (por ejemplo, metilo);

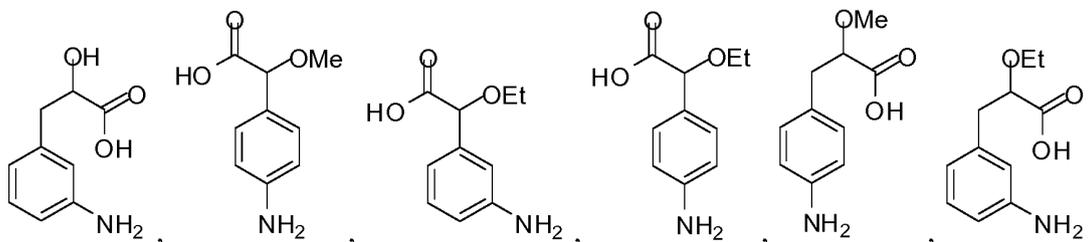
R<sub>11</sub> se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y -C(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; (por ejemplo, R<sub>11</sub> puede ser H, metilo, -C(O)-metilo o -C(O)-etilo).

- 5 R<sub>5</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (por ejemplo, R<sub>5</sub> tal vez metilo, etilo o propilo); o sales o N-óxidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

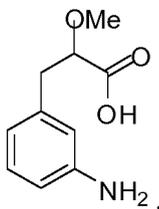
Por ejemplo, en el presente documento se describen para su uso en los procedimientos desvelados las fórmulas A' y A'':



- 10 Los ejemplos de compuestos en el presente documento para su uso en los procedimientos desvelados incluyen:



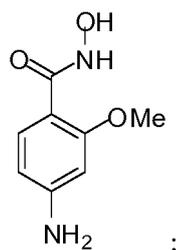
y



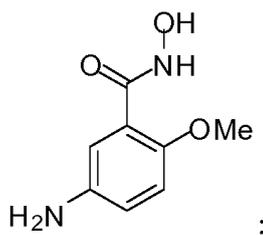
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 Los compuestos desvelados en el presente documento incluyen: 4-amino-N-hidroxi-2-metoxibenzamida (compuesto 13); ácido 6-metoxi quinolin-5-carboxílico (compuesto 36); ácido 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-5-carboxílico (compuesto 37); y ácido 5-diisopropilaminosalicílico (compuesto 38).

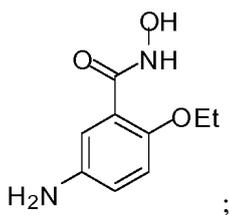
Otros compuestos desvelados en el presente documento incluyen los representados por: (compuesto 13):



(compuesto 14):



(compuesto 26):

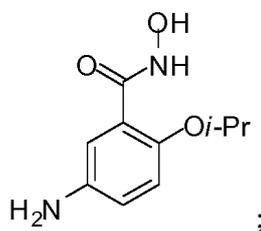


5

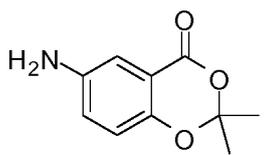
(compuesto 17):



(compuesto 31):



10 (compuesto 28):



15

Los compuestos desvelados en el presente documento incluyen mezclas racémicas y enantiómeros de compuestos, por ejemplo: ácido (±)-2-hidroxi-3-(3'-aminofenil)propiónico (compuesto 20); ácido (±)-2-metoxi-2-(4'-aminofenil)acético (compuesto 23); ácido (±)-2-etoxi-2-(3'-aminofenil)acético (compuesto 32); ácido (±)-2-etoxi-2-(4'-aminofenil)acético (compuesto 33); ácido (±)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 34) "±34" (forma racémica); ácido (±)-2-etoxi-3-(4'-aminofenil) propiónico (compuesto 39); ácido (±)-2-etoxi-3-(3'-aminofenil) propiónico

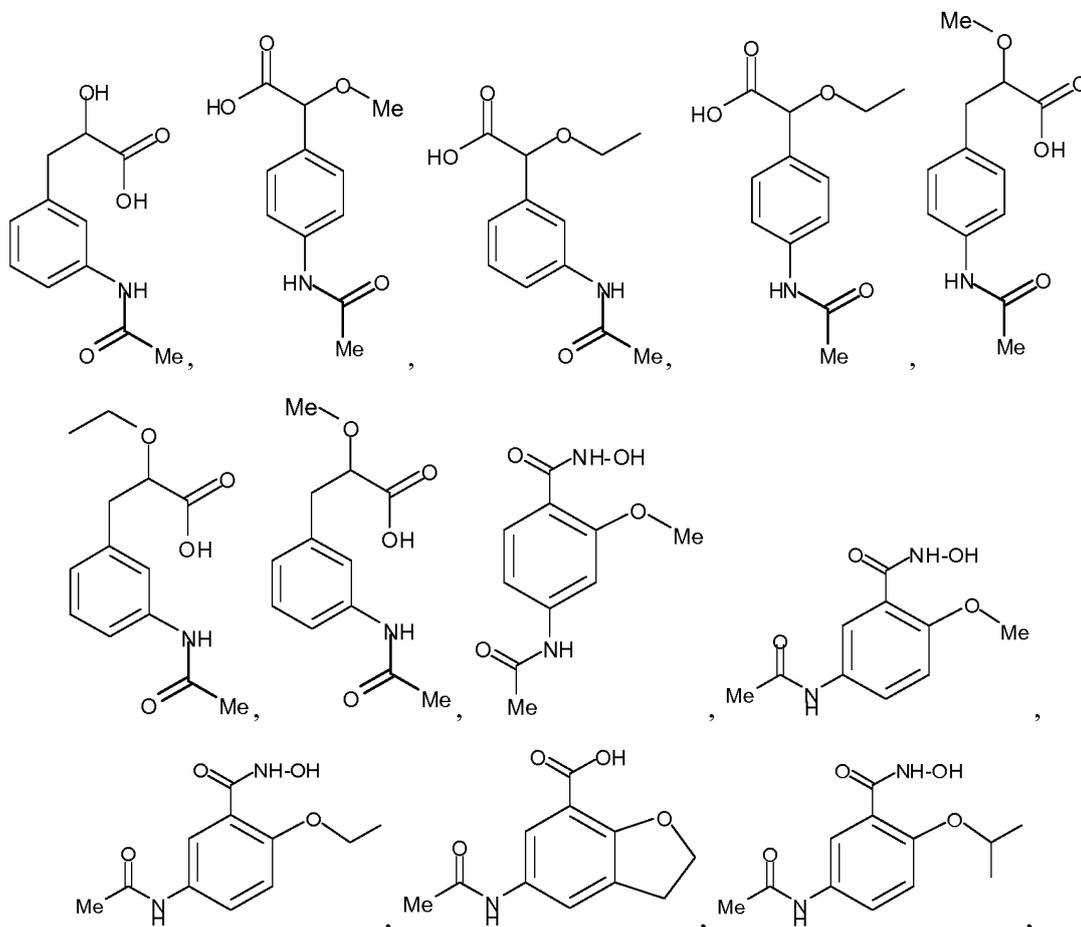
(compuesto 40).

Por ejemplo, los compuestos usados en los procedimientos desvelados en el presente documento pueden ser enantiómeros de las siguientes mezclas racémicas: ácido (R,S)-2-hidroxi-2-(3-aminofenil)acético (compuesto 10); ácido (R,S)-2-hidroxi-2-(4-aminofenil)acético (compuesto 11); ácido (R,S)-2-hidroxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 21); ácido (R, S) -2-metoxi-2-(3'-aminofenil) acético (compuesto 22); ácido (R,S)-2-metoxi-3-(3'-aminofenil)propiónico (compuesto 35); ácido (R,S)-2-metoxi-3-(4-aminofenil)propiónico (compuesto 34), así como enantiómeros, por ejemplo: ácido (+) 2-S-metoxi-3-(4-aminofenil)propiónico; ácido (-) 2-R-metoxi-3-(4-aminofenil) propiónico. En algunos aspectos de la divulgación, se prefieren el ácido (R, S)-2-hidroxi-3-(4'-aminofenil) propiónico (compuesto 21) o el ácido (±)-2-hidroxi-3-(3'-aminofenil) propiónico (compuesto 20).

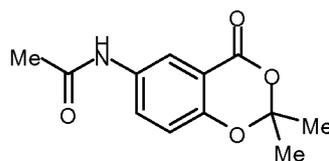
Otras mezclas de compuestos racémicos de compuestos desvelados en el presente documento incluyen: por ejemplo, ácido (±)-2-hidroxi-2-(3'-aminofenil) acético (compuesto 10); ácido (±)-2-hidroxi-2-(4'-aminofenil)acético (compuesto 11); ácido (±)-2-hidroxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 21) y ácido (±)-2-metoxi-2-(3'-aminofenil)acético (compuesto 22).

Los compuestos adicionales desvelados en el presente documento para su uso en los procedimientos descritos incluyen: ácido 5-aminosalicil-hidroxámico (compuesto 5); ácido 3-dimetilaminosalicílico (compuesto 6); ácido 2-metoxi-4-aminobenzoico (compuesto 7); ácido 2-metoxi-5-aminobenzoico (compuesto 8); ácido 5-metilaminosalicílico (compuesto 9); ácido 4-metilaminosalicílico (compuesto 12); ácido 4-acetilaminosalicílico (compuesto 16); ácido 2-etoxi-4-aminobenzoico (compuesto 18); ácido 2-etoxi-5-aminobenzoico (compuesto 19); ácido 4-dimetilaminosalicílico (compuesto 24); ácido 2-etoxi-4-aminobenzoilhidroxámico (compuesto 25); ácido 6-hidroxiquinolin-5-carboxílico (compuesto 27); ácido 2-(2-propil)oxi-4-aminobenzoico (compuesto 30); ácido 4-(1-piperazinil)salicílico (compuesto 41); ácido (R,S) 5-oxa-quinolin-6-carboxílico (compuesto 15); ácido 6-metoxi quinolin-5-carboxílico (compuesto 36); ácido 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-5-carboxílico (compuesto 37); ácido 5-diisopropilaminosalicílico (compuesto 38); y ácido 4-diisopropilaminosalicílico (compuesto 42).

En el presente documento se desvelan compuestos y composiciones farmacéuticas, que comprenden al menos un compuesto, se pueden seleccionar del grupo que consiste en: ácido N-acetil-(R)-(-)-3-(4-aminofenil) -2-metoxipropiónico, ácido N-acetil-(R)-(-)-3-(4-aminofenil) -2-metoxipropiónico; y ácido N-acetil-(S)-(-)-3-(4-aminofenil) -2-metoxipropiónico racémico; o un compuesto seleccionado de:



30



o sales o N-óxidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otros compuestos desvelados incluyen el compuesto 20, compuesto 21,4-acetamino-N-hidroxi-2-metoxibenzamida; ácido 1-acetil-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-5-carboxílico, ácido 5-acetamido-2-hidroxibenzoico (por ejemplo, ácido 5-aminosalicílico acetilado) o sales o N-óxidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

También se desvelan en el presente documento para su uso en los procedimientos descritos las composiciones que incluyen un compuesto representado por las fórmulas representadas y, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los procedimientos para preparar compuestos contemplados se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos WO2007/010516 y WO2007/010514, cada uno incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad.

### **Procedimientos**

Los procedimientos para prevenir o tratar la fibrosis, tales como fibrosis hepática y/o fibrosis intestinal, forman parte de esta divulgación. Dichos procedimientos pueden comprender administrar a un paciente que lo necesite o a un paciente en riesgo, una preparación farmacéutica que comprende un agente PPARy, tal como un compuesto desvelado en el presente documento, por ejemplo, Fórmulas I, IIa o IIb, por ejemplo, compuestos 17, 29, 34 o 39. Por ejemplo, se proporciona un procedimiento para prevenir o tratar la fibrosis hepática que comprende administrar a un paciente que lo necesite un compuesto desvelado en el presente documento. Alternativamente, se proporciona un procedimiento para prevenir o tratar la fibrosis intestinal que comprende administrar a un paciente que lo necesite un compuesto desvelado en el presente documento.

Los pacientes tratados con el procedimiento anterior pueden o no tener fibrosis detectable. El paciente puede tener al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o incluso 50 % o más de reducción en la cantidad de fibrosis presente en el paciente después de administrar un compuesto desvelado, por ejemplo, los compuestos 17, 29, 34 o 39, después de, por ejemplo, 1 día, 2 días, 1 semana, 1 mes o 6 meses o más. La administración de dicho compuesto puede realizarse, por ejemplo, al menos a diario. El compuesto puede administrarse por vía oral. El retraso de la manifestación clínica de fibrosis en un paciente como consecuencia de la administración de un compuesto desvelado en el presente documento puede ser al menos, por ejemplo, 6 meses, 1 año, 18 meses o incluso 2 años o más en comparación con un paciente al que no se le administra un compuesto como el que se desvela en el presente documento.

Un paciente necesitado puede tener fibrosis hepática que se ha convertido en cirrosis. Un paciente con riesgo de fibrosis hepática puede incluir los pacientes con hepatitis B, hepatitis C o esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La NASH está incluida en el espectro de enfermedades del hígado graso no alcohólico, incluyendo esteatosis y cirrosis. La NASH es un componente del síndrome metabólico, que se caracteriza por obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemia, y, en última instancia, puede conducir a carcinoma hepatocelular.

Los procedimientos para tratar trastornos asociados con la fibrosis hepática también se desvelan en el presente documento, tal como el tratamiento de al menos uno de: ciertas enfermedades de almacenamiento y errores innatos del metabolismo, tal como, deficiencia de alfa 1-antitripsina, enfermedades por almacenamiento de cobre (por ejemplo, enfermedad de Wilson), fructosemia, galactosemia, enfermedades de almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, Tipos III, IV, VI, IX y X), síndromes de sobrecarga de hierro (por ejemplo, hemocromatosis), anomalías lipídicas (por ejemplo, enfermedad de Gaucher), trastornos peroxisomales (por ejemplo, síndrome de Zellweger) y tirosinemia; infecciones bacterianas (por ejemplo, brucelosis); infecciones parasitarias (por ejemplo, equinococosis); NASH; infecciones virales (por ejemplo, hepatitis B o hepatitis C, incluyendo hepatitis crónica B o C); síndrome de Budd-Chiari; insuficiencia cardíaca; enfermedad venooclusiva hepática; y trombosis de la vena porta. Los procedimientos para tratar la fibrosis hepática congénita también se desvelan en el presente documento. La composición puede administrarse por vía oral.

El abuso de drogas y/o alcohol se ha implicado en casos de fibrosis hepática. En el presente documento se describen procedimientos para tratar la fibrosis hepática en un paciente con antecedentes de abuso de drogas y/o alcohol. Por ejemplo, Un paciente con antecedentes de abuso de al menos uno de los siguientes: alcohol, amiodarona, clorpromazina, isoniazida, metotrexato, metildopa, oxifenisatina y tolbutamida.

Un paciente con riesgo de fibrosis intestinal puede incluir pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad de Crohn. Un paciente en riesgo también puede incluir a los pacientes con una edad temprana en el momento del diagnóstico de enfermedad de Crohn o colitis, enfermedad colónica extensa y/o grave, pacientes con presencia de colangitis esclerosante primaria y/o pacientes con antecedentes familiares de cáncer.

También se desvelan procedimientos para tratar trastornos asociados con fibrosis intestinal, tal como el tratamiento de al menos uno de: colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad de Crohn.

5 En el presente documento se desvelan procedimientos para prevenir o tratar la fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal o fibrosis sistémica nefrogénica, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una preparación farmacéutica que comprende un agente PPARy, tal como un compuesto desvelado en el presente documento.

10 Los compuestos desvelados en el presente documento pueden usarse solos o en combinación entre sí, donde al menos dos compuestos de la divulgación se usan juntos en una composición única o como parte de un régimen de tratamiento. Los compuestos desvelados en el presente documento también pueden usarse en combinación con otros fármacos para tratar el abuso de drogas y/o alcohol, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal o fibrosis sistémica nefrogénica, abuso de drogas y/o alcohol.

15 Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva de componente activo estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 1 mg/kg a 10 mg/kg. La cantidad a administrada dependerá de variables tales como el tipo o el ámbito de la enfermedad o indicación a tratar, el estado general de salud del paciente en particular, la eficacia biológica relativa de la proteína de unión administrada, la formulación de la proteína de unión, la presencia y los tipos de excipientes en la formulación y la vía de administración. Se entiende que la dosis inicial administrada se puede aumentar más allá del nivel superior con el fin de alcanzar rápidamente el nivel en sangre o el nivel en tejido deseado o la dosis inicial puede ser más pequeña que la dosis óptima y la dosis diaria puede aumentarse progresivamente durante el curso del tratamiento según la situación concreta. Se puede optimizar la dosificación humana, por ejemplo, en un estudio convencional de fase I de aumento de dosis diseñado para pasar de 0,5 mg/kg a 20 mg/kg. La frecuencia de dosificación puede variar, dependiendo de factores tales como la vía de administración, la cantidad de dosificación y la enfermedad que se está tratando. Las frecuencias de dosificación de ejemplo son una vez al día, una vez a la semana y una vez cada dos semanas.

25 Las formulaciones o composiciones desveladas en el presente documento comprenden un compuesto desvelado y típicamente incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Las composiciones desveladas en el presente documento pueden administrarse por diversos medios, dependiendo de su uso pretendido, como es bien sabido en la técnica. Por ejemplo, si las composiciones de la presente divulgación se administran por vía oral, pueden formularse como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes. Alternativamente, las formulaciones de la presente divulgación se pueden administrar parenteralmente como inyecciones (intravenosa, intramuscular o subcutánea), preparaciones para infusión por goteo o supositorios. Para la aplicación por la ruta de la membrana mucosa oftálmica, las composiciones de la presente divulgación pueden formularse como gotas para los ojos o ungüentos para los ojos. Estas formulaciones pueden prepararse por medios convencionales, y, si se desea, las composiciones se pueden mezclar con cualquier aditivo convencional, tal como un excipiente, un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un corrector, un agente solubilizante, un auxiliar de la suspensión, un agente emulsionante o un agente de recubrimiento.

40 En las formulaciones de la divulgación sujeto, agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden estar presentes en los agentes formulados.

45 Las composiciones objeto desveladas en el presente documento pueden ser adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal, aerosol y/o administración parenteral. Las formulaciones se pueden presentar de forma cómoda en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la materia de farmacia. La cantidad de composición que se puede combinar con un material portador para producir una dosis única varía según el sujeto a tratar y el modo particular de administración.

Los procedimientos para preparar las formulaciones desveladas en el presente documento incluyen la etapa de asociar composiciones de la presente divulgación con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme e íntima los agentes con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y, a continuación, si fuera necesario, moldear el producto.

50 Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o de tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga), contenido cada uno una cantidad predeterminada de una composición sujeto del mismo como principio activo. Las composiciones de la presente divulgación también se pueden administrar como un bolo, electuario o pasta.

55 En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos con película, comprimidos recubiertos de azúcar, polvos, gránulos y similares), la composición sujeto se mezcla con

5 uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o expansores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tal como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, algunos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) acelerantes de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tal como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonítica; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones pueden comprender también agentes tampón. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden usar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas, usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

15 Las formulaciones y composiciones pueden incluir cristales micronizados de los compuestos desvelados. La micronización puede realizarse en cristales de los compuestos solos, o en una mezcla de cristales y una parte o la totalidad de excipientes o vehículos farmacéuticos. El tamaño medio de partícula de los cristales micronizados de un compuesto desvelado puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 micrómetros, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 110 micrómetros.

20 Un comprimido se puede preparar por compresión o moldeo, de manera opcional con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos por compresión se pueden preparar usando un aglutinante, (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla de la composición objeto humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos recubiertos con película o comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente se pueden ranurar o preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica.

30 Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de la composición objeto, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tal como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceite de algodón, de cacahuete, maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de sorbitán de ácido graso, ciclodextrinas y mezclas de los mismos.

35 Las suspensiones, además de la composición objeto, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, isoestearil alcoholes etoxilados, polioxietilén sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma de tragacanto, y mezclas de los mismos.

40 Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que se puede preparar mezclando una composición objeto con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o un salicilato, y que sea sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura del cuerpo y, por lo tanto, se derretirá en la cavidad corporal y liberará el agente activo. Las formulaciones que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverización que contienen vehículos tales que en la técnica se sabe son apropiados.

45 Las formas de dosificación para la administración transdérmica o tópica de una composición objeto incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con conservantes, tampones, o propulsores, que puedan ser necesarios.

50 Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de una composición objeto, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

55 Los polvos y aerosoles pueden contener, además de una composición objeto, excipientes, tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Las composiciones y compuestos de la presente divulgación se pueden administrar alternativamente en aerosol. Esto se logra preparando un aerosol acuoso, una preparación liposómica o partículas sólidas que contienen el compuesto. Se podría usar una suspensión no acuosa (por ejemplo, propulsor de fluorocarbono). Se pueden usar nebulizadores

sónicos porque minimizan la exposición del agente a cizallamiento, lo que puede dar como resultado la degradación de los compuestos contenidos en las composiciones objeto.

Generalmente, se fabrica un aerosol acuoso formulando una suspensión o solución acuosa de una composición objeto junto con vehículos y estabilizantes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y estabilizantes varían con los requisitos de la composición objeto en particular, pero típicamente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas como seroalbúmina, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos, tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles generalmente se preparan a partir de soluciones isotónicas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación adecuadas para administración parenteral comprenden una composición desvelada en combinación con una o más soluciones isotónicas acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, o agentes de suspensión o espesantes.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y ciclodextrinas. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. La eficacia del tratamiento con las composiciones objeto puede determinarse de varias maneras conocidas por los expertos en la técnica.

A lo largo de la descripción, cuando se describe que las composiciones tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, se contempla que las composiciones también consisten esencialmente en, o consisten en, los componentes citados. Análogamente, cuando se describe que los procedimientos tienen, incluyen o comprende etapas de procedimiento específicas, los procedimientos también consisten esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento citadas. Excepto donde se indique lo contrario, el orden de las etapas o el orden para realizar ciertas acciones son inmutables siempre que la divulgación siga siendo operable. Por otra parte, a menos que se indique otra cosa, se pueden llevar a cabo dos o más etapas o acciones simultáneamente.

### **Ejemplos**

La divulgación se ilustra con más detalle en los ejemplos siguientes. Los siguientes ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no deben interpretarse como limitantes del ámbito o contenido de la divulgación de ninguna manera.

#### **Ejemplo 1: Estudio de fibrosis hepática**

Se indujo fibrosis hepática en ratones macho C57bl6 (Charles River, l'Arbresle, Francia) mediante inyección de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). Los ratones C57bl6 pesaron 22-25 g y se mantuvieron en condiciones de laboratorio durante 1 semana antes del experimento. Los animales fueron alojados 5 por jaula con comida y agua disponibles *ad libitum*.

El estudio consistió en 5 grupos de prueba (véase la Tabla 1): sonda de control (CG), control intraperitoneal (CIP), tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), compuesto 34 y agente JWH-133 (véase Julien y col., (2005) Gastroenterology 128: 742-755 (para JWH-133, un agonista específico de CB2 y un agente antifibrogénico)).

**TABLA 1**

<b>Grupo de prueba</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Calendario de dosificación</b>
control de sonda oral (5 ratones)	Solución de carboximetilcelulosa (vehículo de sonda oral) y aceite de oliva (vehículo CCl <sub>4</sub> )	Diariamente durante >5 semanas
control intraperitoneal (5 ratones)	DMSO/Tween (vehículo JWH-133) y aceite de oliva (vehículo CCl <sub>4</sub> )	Diariamente durante >5 semanas
tetracloruro de carbono (10 ratones)	CCl <sub>4</sub> en aceite de oliva mediante administración intraperitoneal (200 ul)	3 veces a la semana (cada dos días) durante > 5 semanas

(continuación)

Grupo de prueba	Tratamiento	Calendario de dosificación
compuesto 34 (10 ratones)	Solución 30 mM del compuesto 34 en CMC al 0,5 % administrada por sonda oral (200 $\mu$ l) y CCl <sub>4</sub> en aceite de oliva mediante administración intraperitoneal (200 $\mu$ l)	34: Diariamente durante >5 semanas CCl <sub>4</sub> : 3 veces a la semana durante >5 semanas
Agente JWH-133 (10 ratones)	3 mg/kg de JWH-133 en DMSO/Tween mediante administración intraperitoneal (100 $\mu$ l) y CCl <sub>4</sub> en aceite de oliva mediante administración intraperitoneal (200 $\mu$ l)	JWH: Diariamente durante >5 semanas CCl <sub>4</sub> : 3 veces a la semana durante >5 semanas

Se evaluó la efectividad del compuesto 34 (ligando específico de PPAR $\gamma$ ) en comparación con JWH-133 (agente antifibrogénico). El compuesto 34 se administró por vía oral en combinación con inyecciones de CCl<sub>4</sub> durante aproximadamente 5 semanas. El compuesto 34 se dosificó diariamente a 200  $\mu$ l de una solución 30 mM. JWH-133 se administró diariamente a través de inyecciones intraperitoneales a 3 mg/kg (volumen de dosis = 100  $\mu$ l). El modelo de fibrosis hepática es inducido por la exposición crónica a dosis aumentadas de CCl<sub>4</sub> durante 5 semanas. La primera semana, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de CCl<sub>4</sub>, resuspendida en aceite de oliva, a la dosis de 80  $\mu$ l/kg de peso corporal de ratones dos veces a la semana. La semana 2, se realizaron 3 inyecciones de CCl<sub>4</sub> a la dosis de 160  $\mu$ l/kg cada dos días. La semana 3, se realizaron 3 inyecciones de CCl<sub>4</sub> a la dosis de 240  $\mu$ l/kg cada dos días. La semana 4, se realizaron 3 inyecciones de CCl<sub>4</sub> a la dosis de 320  $\mu$ l/kg cada dos días. Se sacrificó a los ratones la semana 5, 3 días después de la última administración de CCl<sub>4</sub>.

Se registraron los pesos corporales durante la duración del experimento. Como se ve en la figura 1, no se detectaron diferencias en la evolución del peso corporal entre los diferentes grupos de ratones.

Los hígados se extirparon y las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis. Una porción de cada parte del hígado se fijó en formalina al 10 % para histología.

### **Ejemplo 2: Análisis histológico del estudio de fibrosis hepática**

Se procesó el tejido hepático fijado con formalina y se tiñeron secciones de parafina de 5  $\mu$ m de grosor con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción con rojo Picrosirius (coloración específica para colágeno en secciones de tejido) para evaluar el grado de fibrosis en el hígado. Cada sección se analizó a ciegas por 3 experimentadores diferentes para la cuantificación del grado de fibrosis para cada lóbulo del hígado (5) usando la puntuación de Metavir (véase la Figura 2A para el cuadro de puntuación de Metavir). Las fotografías que se ven en la figura 2B se obtuvieron con un objetivo 20x. El grupo de control tenía una puntuación F0 y el grupo de CCl<sub>4</sub> tenía una puntuación F3, indicando fibrosis del hígado. El Compuesto 34 (GED) mostró una mayor reducción en la fibrosis que el grupo JWH-133 con puntuaciones respectivas de F1 para el Compuesto 34 y F2 para JWH-133.

Como cabía esperar, no se observó fibrosis en los dos grupos de ratones de control (sonda de control (CG) e IP control (CIP)). En el grupo de ratones fibróticos (grupo de CCl<sub>4</sub>) que recibía solo vehículo, se observó una puntuación media de  $2,5 \pm 0,5$  correspondiente a fibrosis de moderada a grave según la puntuación de Metavir (véase la figura 3A). Para ratones fibróticos que reciben JWH-133 o compuesto 34 (GED), se observó una puntuación de  $2 \pm 0$  y  $2,1 \pm 0,2$ , respectivamente. Se observó una disminución en el grado de fibrosis de fibrosis severa a moderada con una eficacia similar tanto para JWH-133 como para GED.

Estos resultados se confirmaron usando una puntuación de Metavir adaptada (FIG. 3B): cada sección del hígado fue analizada a ciegas por 2 investigadores para la cuantificación a bajo aumento (X5) de > 30 vías porta clasificadas de F0 a F4 de acuerdo con la puntuación METAVIR (Puntuación (de 1 sección) =  $\zeta$  (PTF1 + PTF2 + PTF3 + PTF4)). Usando esta puntuación se demostró que JWH y GED disminuyen respectivamente en 14,2 % y 12,5 % de la puntuación fibrótica en comparación con los animales no tratados y que el efecto terapéutico de las 2 moléculas probadas parece similar.

### **Ejemplo 3: Análisis de expresión génica del estudio de fibrosis hepática**

El efecto de la administración del compuesto 34 (GED) y el agonista específico de CB2 (JWH-133) se evaluó sobre el nivel de expresión génica de las citocinas (IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y genes implicados en el mecanismo de fibrosis por PCR cuantitativa en tiempo real.

El ARN total se aisló de los hígados utilizando el kit Rneasy (Macherey Nagel, Hoerd, Francia) según las instrucciones del fabricante. La cuantificación de ARN se realizó mediante espectrofotometría. Después del tratamiento a 37 °C durante 30 minutos con 20-50 unidades de DNasa I libre de RNasa (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, E.UU.), LOS cebadores oligo-dT (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, EE.UU.) Se utilizaron para sintetizar ADNc monocatenario. Los ARNm se cuantificaron utilizando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia) con oligonucleótidos específicos murinos (véase la Tabla 2) en un GeneAmp Abiprism 7000 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia). En cada ensayo, se incluyeron controles calibrados y sin molde. Cada muestra se procesó por triplicado. La

intensidad del tinte verde SYBR se analizó utilizando el software Abiprism 7000 SDS (Applera, Courtaboeuf, Francia). Todos los resultados se normalizaron con respecto del gen doméstico no afectado de  $\beta$ -actina.

TABLA 2

Genes murinos	Secuencias del cebador (5' → 3')
$\beta$ -actina	F:5'-gggTCAgAAggATTCCTATg-3' (SEQ ID NO: 1) R: 5'-ggTCTCAAACATgATCTggg-3' (SEQ ID NO: 2)
TNF- $\alpha$	F:5'-TgggAgTAgACAAggTACAACCC-3' (SEQ ID NO: 3) R:5' CATCTTTCTCAAAATTCgAgTgACAA-3' (SEQ ID NO: 4)
IL-1 $\beta$	F:5'-gATCCACACTCTCCAgCTgCA-3' (SEQ ID NO: 5) R:5'-CAACCAACAAGTgATATTCTCCATg-3' (SEQ ID NO: 6)
Colágeno-1	F: 5'- GAG TAC TGG ATC GAC CCT AAC CAA -3' (SEQ ID NO: 7) R: 5'- ACA CAG GTC TGA CCT GTC TCC AT -3' (SEQ ID NO: 8)
$\alpha$ -SMA	F: 5'- CCT GAC GGG CAG GTG ATC -3' (SEQ ID NO: 9) I: 5'-ATG AAAGAT GGC TGG AAG AGAGTC T-3' (SEQ ID NO: 10)

5 No hubo modificación significativa de la expresión del gen de citocinas en los diferentes grupos de ratones. Con respecto a los genes implicados en el mecanismo de la fibrosis, se observó un aumento de la expresión de  $\alpha$ -SMA y colágeno-1 en animales con fibrosis (grupo CCl<sub>4</sub>) en comparación con los animales control (grupos CG y CIP). Como se ve en la figura 4 y la tabla 3, hubo una disminución en el nivel de  $\alpha$ -SMA y colágeno-1 en los grupos de ratones GED y JWH-133 en comparación con el grupo CCl<sub>4</sub> (control de fibrosis). Para el nivel de colágeno-1, la disminución fue significativa para el grupo de ratones tratados con el compuesto 34 en comparación con los ratones CCl<sub>4</sub> con respectivamente,  $42,81 \pm 14,81$ ,  $p=0,03$  frente a  $75,15 \pm 5,23$ . Estos datos biológicos junto con la mejora histológica observada en ratones tratados con el compuesto 34 sugieren que el compuesto 34 puede tener propiedades antifibróticas terapéuticas.

TABLA 3

Grupo	Colágeno-1	$\alpha$ -SMA
CCl <sub>4</sub>	$138,12 \pm 34,68$	$65,51 \pm 22,24$
JWH-133 + CCl <sub>4</sub>	$87,59 \pm 16,97$	$30,07 \pm 4,7$
Compuesto 34 + CCl <sub>4</sub>	$75,15 \pm 5,23$ , $p=0,03$	$42,81 \pm 14,81$

#### **Ejemplo 4: Análisis de enzimas sanguíneas hepáticas del estudio de fibrosis hepática**

15 El efecto de la administración oral del compuesto 34 (GED) y el agonista CB2 específico (JWH-133) se evaluó en diferentes parámetros bioquímicos hepáticos en el suero de ratones: enzimas hepáticas (alanina aminotransferasa (AST) y aspartato aminotransferasa (ALT)), Gamma GT y la fosfatasa alcalina.

20 Como cabía esperar, 4 días después de la administración de CCl<sub>4</sub>, sin mejora de AST, se observó ALT y Alk P en cualquier grupo de ratones. El compuesto 34 no se asoció con ninguna mejora de las enzimas hepáticas sanguíneas que sugiriera una ausencia de toxicidad hepática.

25 Según lo evaluado por histología y marcadores hepáticos, JWH-133 y el compuesto 34 tienen efectos antifibróticos similares en ratones con fibrosis hepática inducida por inyecciones repetidas de CCl<sub>4</sub>. Como cabía esperar, JWH disminuye las lesiones fibróticas hepáticas en un 14 % y normaliza la concentración hepática de ARNm de colágeno-1. El compuesto 34 tiene un efecto similar sin toxicidad hepática. Los datos sugieren que el compuesto 34 puede ser el primer compuesto con propiedades tanto antiinflamatorias como antifibróticas.

#### **Ejemplo 5: Estudio de fibrosis intestinal**

Este ejemplo describe un experimento para evaluar el efecto del compuesto 34 sobre la fibrosis intestinal. Se indujo colitis crónica en ratones C57bl6 en 3 ciclos de DSS al 2,5 % (40.000-50.000 de PM, TdB Consultancy AB, Suecia) disuelto en agua potable estéril durante 5 días, seguido de 7 días de agua potable regular.

30 El estudio consistió en 3 grupos de prueba (véase la Tabla 4): grupo control, Grupo de control DSS, Grupo GED (compuesto 34).

TABLA 4

Grupo de prueba	Tratamiento	Calendario de dosificación
control (10 ratones)	H <sub>2</sub> O	Diariamente durante 36 días

(continuación)

Grupo de prueba	Tratamiento	Calendario de dosificación
Control DSS (25 ratones)	2,5 % DSS en H <sub>2</sub> O de bebida	5 días en tratamiento, 7 días de descanso por 36 días
compuesto 34 (25 ratones)	Solución 30 mM del compuesto 34 en CMC al 0,5 % administrada por sonda oral (200 µl) y DSS al 2,5 % al beber H <sub>2</sub> O	comp. 34: diariamente del día 13 al 36 DSS: 5 días en tratamiento, 7 días de descanso por 36 días

5 El compuesto 34 se usó en su dosis óptima (30 mM) y se administró por sonda oral diariamente después del segundo ciclo de DSS y hasta el sacrificio. Los ratones que recibieron DSS se revisaron dos veces por semana para el desarrollo de colitis mediante el control del peso corporal. La eutanasia de los ratones se realizó una semana después del tercer ciclo de DSS (véase la Figura 5). La evaluación del tamaño y peso del colon se evaluó posmortem.

### Ejemplo 6: Análisis del estudio de fibrosis intestinal

#### A. Relación en colon de peso/tamaño

10 La fibrosis intestinal se caracteriza por un acortamiento y engrosamiento del colon y adherencias. La medida de la relación peso/tamaño del colon es un indicador del nivel de inflamación y fibrosis. Como se ve en la figura 6A, se observó un aumento significativo del 124 % en la relación peso/tamaño del colon en los ratones DSS que recibieron el vehículo en comparación con los ratones de control que solo recibieron agua regular, con, respectivamente,  $44,98 \pm 6,31$  frente a  $20,11 \pm 3,91$ ,  $p < 0,05$ . Estos resultados se ilustran mediante un importante acortamiento del colon en ratones DSS (Figura 6B). El compuesto 34 provoca una reducción del 34 % en el efecto profibrótico del DSS, lo que conduce a una disminución significativa de la relación peso/tamaño del colon de  $38,13 \pm 7,82$  frente a  $44,98 \pm 6,31$  ( $p < 0,05$ ) en comparación con los ratones DSS que reciben el vehículo (FIG. 6A). En consecuencia, reduce los signos morfológicos de fibrosis, tal como el acortamiento y el engrosamiento del colon, y disminuye los depósitos de colágeno en el colon (FIG. 6B).

#### B. Nivel de inflamación estimado por histología

20 Se tomaron muestras de los anillos de la parte transversal del colon (posmortem) y se fijaron en formaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina para el análisis histológico. Se tiñeron secciones (4 µm) con tinción de May-Grunwald-Giemsa y dos investigadores realizaron una puntuación histológica multiparamétrica (de 0 a 18) de forma enmascarada. Esta tinción permitió la cuantificación de la inflamación. Se asignaron grados histológicos, que reflejan el nivel de inflamación, en función de la intensidad del infiltrado celular en la mucosa, su extensión en las capas submucosas y la presencia de lesiones epiteliales (véase la Tabla 5).

25

TABLA 5

Segmento	Grado	Descripción
Gravedad	0	Ninguna
	1	Ligera
	2	Moderada
	3	Grave
ámbito	0	Ninguna
	1	Mucosa
	2	Mucosa y submucosa
Regeneración	3	Transmural
	4	Sin reparación de tejidos
	3	Epitelio superficial no intacto
	2	Regeneración con agotamiento de criptas
Daño en las criptas	1	Regeneración casi completa
	0	Regeneración completa o tejido normal
	0	Ninguna
	1	Basal 1/3 dañado
Porcentaje de afectación	2	Basal 2/3 dañados
	3	Solo epitelio superficial intacto
	4	Pérdida de toda la cripta y el epitelio
	1	1-25 %
	2	26-50 %
	3	51-75 %

(continuación)

Segmento	Grado	Descripción
	4	76-100 %

El estado inflamatorio se evaluó a nivel histológico para cada colon de ratones usando una tinción MGG clásica. Como cabía esperar, se observó una inflamación significativa de 8,4 pt y fuerte en el grupo de ratones que recibieron el DSS en comparación con los ratones de control que recibieron agua normal, con, respectivamente,  $3,77 \pm 0,80$  frente a  $0,50 \pm 0,33$ ,  $p < 0,05$  (véase la FIG. 7). Este resultado confirma la inducción de la inflamación con los 3 ciclos de DSS. Se observó una disminución significativa en el nivel de inflamación en ratones DSS que recibieron el compuesto 34 en comparación con los ratones DSS que recibieron solo el vehículo con, respectivamente,  $2,18 \pm 0,48$  frente a  $3,77 \pm 0,80$ ,  $p < 0,05$ .

### C. Nivel de fibrosis

#### C1. Evaluación por tinción con rojo Picrosirius

Las muestras de colon obtenidas se fijaron rápidamente con formalina tamponada al 10 % en PBS (pH 7,4) durante 3 horas, se deshidrataron en etanol graduado y se incrustaron en parafina de fusión a baja temperatura. Se procesó el tejido colónico fijado con formalina y se tiñeron secciones de parafina de 5  $\mu\text{m}$  de espesor con tinción de rojo Picrosirius para análisis histológico. Se obtuvieron imágenes con un objetivo x20. Cada sección fue analizada de forma enmascarada por 3 experimentadores diferentes para la cuantificación del grado de fibrosis usando una puntuación de 0 a 4.

Se observó un aumento significativo del nivel de fibrosis en el colon de los ratones DSS en comparación con los ratones de control con  $2,27 \pm 0,12$  frente a  $1,12 \pm 0,07$  respectivamente (véase la figura 8). Este resultado confirma que la inflamación crónica inducida por 3 ciclos de DSS induce fibrosis intestinal. También confirma que la administración del compuesto 34 a ratones DSS disminuye el nivel de fibrosis en comparación con los ratones DSS que reciben solo el vehículo ( $1,625 \pm 0,15$  frente a  $2,27 \pm 0,12$ ,  $p < 0,05$ ).

#### C2. Evaluación mediante tinción tricrómica de Masson

En esta evaluación del nivel de fibrosis colónica se utilizó una tinción tricrómica de Masson y colágeno. Las muestras de colon obtenidas se fijaron rápidamente con formalina tamponada al 10 % en PBS (pH 7,4) durante 3 horas, se deshidrataron en etanol graduado y se incrustaron en parafina de fusión a baja temperatura. Se incubaron secciones seriadas de 3  $\mu\text{m}$  durante 40 minutos en metanol y solución de peróxido de hidrógeno al 3 % y, después, se aclararon en PBS. La fibrosis intestinal se calificó como ausente, leve o severa, dependiendo de la densidad y la extensión de la tinción del tejido conjuntivo positivo para tricromo y la alteración de la arquitectura del tejido.

#### C3. Evaluación de los niveles de colágeno

Para el análisis inmunohistoquímico, las muestras de tejido del colon se fijaron en solución fresca de paraformaldehído al 4 % (PFA)/PBS durante 3 horas a temperatura ambiente, se deshidrataron en etanol graduado en serie y se incrustaron en parafina de fusión a baja temperatura. Se incubaron secciones de 3  $\mu\text{m}$  de espesor en metanol durante 40 minutos y, a continuación, en peróxido de hidrógeno al 3 % durante 5 minutos. Las muestras se incubaron durante la noche con anticuerpos específicos contra el colágeno de los tipos I-III (Abcam), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) (Abcam), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), SMAD2/3, los principales marcadores de fibrosis. Las muestras se lavaron durante 5 minutos con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina-biotina-peroxidasa (Dako LSAB Corporation, cod K0675, Dako-Cytomation, Milano). Después de un lavado en PBS durante 10 minutos, las secciones se sometieron a incubación con 3,3'-diaminobencidina-tetrahidrocloruro durante 1-3 minutos.

La especificidad de la reacción inmunitaria se realizó omitiendo los anticuerpos primarios. Finalmente, las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se observaron con el microscopio óptico Olympus BX51 Light Microscope (Olympus, Optical Co. Ltd., Tokio, Japón).

En el análisis inmunohistoquímico (x 20) de los colágenos I-VII en colon de DSS y ratones de control, la tinción de los colágenos I-VII en el intestino grueso de ratones DSS se localizó principalmente en el tejido conjuntivo de la submucosa y la muscularis propria, donde se observó tinción fuerte del colágeno (véase la figura 9). Como se muestra en la Figura 9, la administración del compuesto 34 está asociada con una disminución en la tinción de colágeno que indica que ha mejorado la fibrosis y reduce el desarrollo de fibrosis intestinal.

Además de los efectos antiinflamatorios, la administración del compuesto 34 disminuye rápidamente los acontecimientos moleculares que conducen a la fibrosis y previene las lesiones fibróticas intestinales inducidas por DSS en ratones.

Para el análisis de transferencia Western, se homogeneizaron 0,5 cm de muestras de colon congeladas en tampón RIPA que contenía Tris HCl 50 mM a pH 7,6, NaCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, EDTA 5 mM, 1 % de Triton-X y 10 % de glicerol, suplementado con fluoruro de sodio (NaF) 100 mM, ortovanadato de sodio 2 mM ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), pirofosfato de sodio 10 mM ( $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), fenilmetanosulfona 1 mM (PMSF) y un cóctel clásico de inhibidor de la proteasa que contiene

10 µg/ml de leupeptina y aprotinina.

Para cada muestra, se separaron 30 µg de proteína por PAGE y se sometieron a electrotransferencia. Se incubaron membranas de nitrocelulosa (100 % de pureza) (de acuerdo con un protocolo específico para cada anticuerpo) con anticuerpos primarios dirigidos contra CTGF, Colágeno-I y GAPDH (adquirido en Abcam, Cambridge, Reino Unido; 1:1000 durante 2 horas a TA), diluido en leche descremada al 5 % en TBS-t al 0,1%. Las membranas se lavaron posteriormente en TBS-t al 0,1 % y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (anti-conejo y anti-ratón; Sigma Aldrich; 1: 20000 durante 1 hora a temperatura ambiente) diluido en leche descremada al 5 % en TBS-t al 0,1 %. Por último, se realizó inmunodetección con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Scientific Pierce, Erembodegem) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las membranas se expusieron a la película de autorradiografía (Fuji Photo Film Co., Dusseldorf, Alemania). La densidad óptica de las bandas objetivo se determinó utilizando un densitómetro asistido por ordenador y el software de dominio público ImageJ (W. S., Rasband, ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2011). Los niveles de tejido se expresaron como unidades de densidad óptica (DO) por cantidad de proteínas totales, normalizados con control interno GAPDH y los resultados se expresaron como un porcentaje de los grupos de control.

Usando los procedimientos IHC y anticuerpos específicos, se observó una reducción de los principales marcadores de fibrosis (colágeno I-III, CTGF, SMAD 2/3, PDGF, α-SMA y TGF-β1) en el colon de ratones DSS que habían recibido el GED en comparación con los ratones colíticos que recibieron el vehículo (véase la Figura 9A-9E).

Estos resultados se confirmaron usando un procedimiento de transferencia Western y se cuantificaron los diferentes marcadores de fibrosis en muestras de colon completo (véase la figura 10). Tal como se observa en la Tabla 6, se observó una disminución significativa de la expresión de colágeno I, CTGF e IL-13 en los ratones colíticos tratados con GED en comparación con los ratones colíticos que recibieron solo el vehículo (Colágeno I 90,75 ± 19,91 frente a 284,4±63,86, p = 0,012, para CTG 55,75±17,53 frente a 115,1±16,88, p=0,029 e IL-13 88,88±14,01 frente a 189,5±28,71, p = 0,007).

**TABLA 6**

	<b>DSS</b>	<b>DSS + GED</b>	<b>p</b>
<b>α-SMA</b>	125,4 ± 19,45	97,88 ± 15,66	0,282
<b>Colágeno I</b>	284,4 ± 63,86	90,75 ± 19,91	0,012
<b>CTGF</b>	115,1 ± 16,88	55,75 ± 17,53	0,029
<b>IL-13</b>	189,5 ± 28,71	88,88 ± 14,01	0,007
<b>TGF-β1</b>	153,6 ± 26,25	130,5 ± 28,02	0,5

### **Ejemplo 7: Estudio de fibrosis intestinal**

Este ejemplo describe un experimento para evaluar el efecto del compuesto 34 (GED) en el tratamiento de la fibrosis intestinal.

#### **Materiales y procedimientos**

##### **Experimentos *in vitro***

En el estudio se incluyó un total de 60 ratones C57BL/6 de tipo salvaje, adquiridos de Janvier (Le Genest-St-Isle, Francia). Todos los ratones se mantuvieron en una instalación específica libre de patógenos del Instituto Pasteur en Lille (Francia). Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices gubernamentales N ° 68/609/CEE.

##### **Inducción de colitis crónica**

Se indujo colitis crónica y fibrosis en ratones mediante la administración oral de 2,5 % (p/v) de DSS en agua potable, en tres ciclos (5 días de DSS, 7 días de agua). Se monitorizó a los animales diariamente para la ingesta de alimentos y líquidos y se pesaron al comienzo del estudio y posteriormente regularmente cada tres días.

#### **Diseño experimental**

Los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos: i. DSS e ii. DSS + GED. Cada grupo consistió en 25 ratones y se comparó con 10 animales de control, que solo recibieron agua. El GED (30 mg/kg/ratón) se disolvió en una solución que contenía 0,5 % de sal de sodio de carboximetilcelulosa (CMC; PM: 90.000 Da; Sigma Aldrich) y Tween 80 al 1 % y se administró diariamente por sonda oral (100 µl/ratón). El GED se administró al comienzo del segundo ciclo.

##### **Curso de evaluación de la colitis**

Se observó a los animales diariamente para la ingesta de líquidos, cambios de peso y se les examinó para detectar

signos de colitis, incluyendo pérdida de peso, diarrea, hemorragia y prolapso rectal, así como signos de inflamación sistémica, tal como piloerección, letargo y exudados periorbitales.

#### Recuperación y preparación de muestras

5 Finalmente, siete días después de la última administración del ciclo de DSS, se sacrificó a los animales de cada grupo mediante dislocación cervical con anestesia profunda con CO<sub>2</sub> y se les realizó una laparotomía. Se visualizó el colon y rápidamente se extirpó. Se midió la longitud de todo el colon-recto y el peso de los 8 cm distales del colon-recto.

#### Evaluación de las lesiones colónicas macroscópicas y microscópicas

10 Las lesiones colónicas macroscópicas, incluyendo dilatación, engrosamiento y estenosis, fueron puntuadas por un observador independiente, que no conocía el tratamiento de los ratones. Se extirparon muestras de tejido del colon e inmediatamente se congelaron o fijaron en solución de formaldehído al 4 %/PBS durante 3 horas a temperatura ambiente, seguido del procedimiento estándar para la inclusión en parafina. Los tejidos incluidos en parafina cortados transversalmente a 3 µm se sometieron a tinción con hematoxilina/eosina, para evaluar el grado de inflamación y tinción tricromática de Masson para evaluar mejor el tejido conjuntivo y la fibrosis. A continuación, las secciones teñidas fueron evaluadas de forma enmascarada con un microscopio Olympus BX51 Light Microscope (Olympus, Optical Co. 15 Ltd., Tokio, Japón) por dos anatomo-patólogos que han realizado la puntuación histológica, evaluando: i. presencia de úlceras (0= ausentes, 1= úlceras pequeñas, 2= úlceras grandes); ii. el grado inflamatorio (0=ausente 1= leve, 2= moderado y 3= grave); iii. profundidad de las lesiones (0=ausente, 1= lesiones que se extienden en la submucosa, 2= lesiones en la muscularis propia y 3= lesiones en la serosa); iv. grado de fibrosis (0=ausente 1= leve, 2= moderado y 3= grave). El grado de inflamación intestinal se evaluó de acuerdo con la densidad y la extensión del infiltrado inflamatorio crónico, pérdida de células caliciformes y engrosamiento de la pared intestinal. Se obtuvo una puntuación microscópica total como la suma de todas las puntuaciones (puntuación máxima posible= 10). 20

La fibrosis intestinal se calificó como ausente, leve o severa, dependiendo de la densidad y extensión de la tinción del tejido conectivo positivo para tricromo y la alteración de la arquitectura del tejido.

#### Inmunohistoquímica

25 Las muestras de tejido del colon, disecado y fijado en solución fresca de formaldehído (FA)/PBS al 4 % durante 3 horas a temperatura ambiente, se deshidrataron en etanol graduado en serie y se incrustaron en parafina de fusión a baja temperatura. Se incubaron secciones de 3 µm de espesor en una solución de metanol y peróxido de hidrógeno al 3 % durante 45 minutos.

30 Las muestras se incubaron durante la noche con anticuerpos específicos contra la actina del músculo liso α (α-SMA, Abcam), colágeno de tipos I-III (Abcam), TGF-β1 (Abcam), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) (Abcam), pSmad3 y Smad3 (Cell Signaling), Smad7 (Imgenex) PPAPγ (Cell Signaling). Las muestras se lavaron durante 5 minutos con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina-biotina-peroxidasa (Dako LSAB Corporation, cod K0675, Dako-Cyto- mation, Milano). Después de un lavado en PBS durante 10 minutos, las secciones se sometieron a incubación con 3,3-diaminobencidina-tetrahidrocloruro durante 1-3 minutos. La 35 contratinción de los núcleos se obtuvo por hematoxilina eosina. La especificidad de la reacción inmunitaria se realizó manteniendo los anticuerpos primarios. Finalmente, las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se observaron bajo el microscopio óptico Olympus BX51 Light Microscope (Olympus, Optical Co. Ltd., Tokio, Japón).

#### Análisis de transferencia de tipo Western

40 Se cortaron 0,5 cm de muestras de colon congeladas y se homogeneizaron mecánicamente en tampón RIPA que contenía TrisHCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 5 mM, 1 % de Triton-X y 10 % de glicerol, suplementado con fluoruro de sodio (NaF) 100 mM, ortovanadato de sodio 2 mM (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), pirofosfato de sodio 10 mM (NaPPi), fenilmetanosulfona 1 mM de (PMSF) y un cóctel clásico de inhibidor de la proteasa que contiene 10 µg/ml de leupeptina y aprotinina.

45 Se separaron 30 µg de proteína para cada muestra mediante PAGE y se realizó electrotransferencia. Se incubaron membranas de nitrocelulosa 100 % puras (de acuerdo con un protocolo específico para cada anticuerpo) con anticuerpos primarios dirigidos contra TGF-β1, CTGF, α-SMA, Colágeno-I y GAPDH (adquirido en Abcam, Cambridge, Reino Unido; 1 : 1000 durante 2 horas a TA) e IL-13 (adquirida en línea en Antibodies online; 1 : 1000 durante 2 horas a TA), diluido en leche descremada al 5 % en TBS-t al 0,1 %. Las membranas se lavaron posteriormente en TBS-t al 0,1 % y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (anti-conejo y anti- 50 ratón; Sigma Aldrich; 1: 20000 durante 1 hora a temperatura ambiente) diluido en leche descremada al 5 % en TBS-t al 0,1 %. Por último, la inmunodetección se realizó con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Scientific Pierce, Erembodegem) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las membranas se expusieron a la película de autorradiografía (Fuji Photo Film Co., Dusseldorf, Alemania). La densidad óptica de las bandas objetivo se determinó utilizando un densitómetro asistido por ordenador y el software de dominio público ImageJ (W. S., Rasband, ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2011). Los niveles de tejido se expresaron como unidades de densidad óptica (DO) por cantidad de proteínas totales, normalizando con control interno GAPDH y los resultados se expresaron como porcentaje de grupos de control. 55

**Experimentos *in vivo*****Cultivos celulares**

La línea celular de cáncer de colon humano HT-29 (ATCC HTB-38) y fibroblastos intestinales de colon (ATCC CDD-18 humano co) se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y medio Eagle modificado por alfa, respectivamente, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina suplementados con suero bovino fetal al 10 % (FBS). Los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera humidificada de 95 % de aire y 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

**Generación de células con PPARγ silenciado**

Se obtuvieron HT29 con PPAPy silenciado utilizando el sistema pSUPER.retro (OligoEngine). Las secuencias objetivo directa e inversa correspondientes a los nucleótidos 105-123 del ARNm de PPAPy humano (5'-GCCCTTCACTACTGTTGAC-3' (SEQ ID NO: 11)) se clonaron en los sitios de restricción BglIII/XhoI del vector pSUPERretro (pRS), dando el producto ShPPAR. También se generó un plásmido pRS de control negativo que contenía la secuencia 5'-ACGCTGAGTACTTCGAAAT-3' (SEQ ID NO:12) dirigido contra el gen de la luciferasa (construcción hLuc). Ambas construcciones se transfectaron en células HT-29 y Caco-2 utilizando la tecnología Nucleofector de AmaxaBiosystems, según el protocolo del fabricante. Los clones transfectados de forma estable se seleccionaron 24 horas después de la transfección con medio de cultivo completo suplementado con puromicina (5 µg/ml). El silenciamiento de la expresión de PPARγ se verificó mediante RT-PCR cuantitativa y análisis de transferencia Western. Una vez establecido, Las líneas celulares ShPPAR y ShLuc se mantuvieron en medio completo suplementado con 25 µg/ml de puromicina.

**Diseño experimental**

El fenotipo fibrótico se indujo estimulando hCCD-18 y HT29 con TGF-β 1ng/ml y 10 ng/ml durante 4 días, respectivamente, disuelto en medio sin suero. Se administró 1 mM para GED (195,22 g/mol) durante el período de diferenciación. Además, se ha investigado la posible dependencia de la activación de PPAPy utilizando GW9662, un antagonista específico de este receptor. Se ha administrado GW9662 10<sup>-5</sup> M 4 horas antes para comenzar la diferenciación inducida por TGFβ.

**RT-PCR cuantitativa**

El ARN total se extrajo con un kit de ARN de Nucleospin (Macherey-Nagel, Hoerdt, Francia). Después de la inactivación de ARNasa, el ARN total se limpió de ADN genómico traza a través de un tratamiento con ADNasa y se eluyó sin ARNasa, agua sin DEPC. La pureza del ARN se evaluó mediante espectroscopia UV en un sistema Nanodrop de 220 a 350 nm y se perfiló en un bioanalizador Agilent 2100. Se usó un µg de ARN total para realizar una RT-PCR cuantitativa utilizando LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I de Roche Diagnostics (Indianapolis, IN) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

**RESULTADOS****Experimentos *in vivo*****Hallazgos clínicos y macroscópicos sobre colitis crónica en ratones**

La administración oral crónica de DSS indujo la pérdida de peso corporal en todos los ratones crónicos a partir del último día del primer ciclo de DSS (día 5). El día 10, los ratones que recibieron DSS mostraron un peso corporal más bajo en comparación con los ratones control con, respectivamente, 23,88 ± 0,31 frente a 25,27 ± 0,35 p <0,05 (Fig. 11)

Se observó diarrea moderada a grave en el 70 % de los ratones tratados con DSS y el 50 % de los ratones GED el séptimo día de la administración oral de DSS. En el mismo período se observaron manifestaciones sistémicas, tales como piloerección, exudados periorbitales y/o letargo, en el 40 % de los ratones DSS y e 30 % de los ratones GED. En ninguna etapa se observó sangrado rectal obvio o prolapso rectal. Se sacrificó a los ratones el día 15 y el día 30, respectivamente, y el colon se sometió a una evaluación macroscópica midiendo el peso del colon (referido a los últimos 8 cm del intestino grueso distal) y la longitud del colon y observando la presencia de adherencias, contracciones, dilatación, espesor que se calificó como 0 si está ausente; 1 si es leve o moderada; y 2 si es grave. La puntuación macroscópica total se calculó como la suma de todas estas puntuaciones.

La Tabla 7 resume los efectos de la administración de GED en curso y los hallazgos macroscópicos de la colitis crónica inducida por DSS en ratones, lo que indica que el GED mejora las lesiones macroscópicas en la colitis inducida por DSS crónica y reduce los signos morfológicos de fibrosis.

Todas las características macroscópicas observadas en los tratamientos con DSS mostraron, en ambos modelos, una variación significativa que indicó una capacidad efectiva de DSS para inducir un daño tisular grave. El tratamiento con GED mejoró todas las lesiones macroscópicas, lo que determinó diferencias significativas entre DSS y DSS más las puntuaciones macroscópicas totales de GED. El peso del colon y la relación peso del colon/peso corporal no mostraron variaciones significativas después del tratamiento con GED, al tiempo que la longitud del colon pareció restaurada

significativamente. La observación directa del colon mostró, de hecho, un acortamiento u dilatación evidentes en la mayoría de las muestras tratadas con DSS y una remisión de estas características en los ratones tratados con GED.

**TABLA 7. Efecto de la administración de GED en curso y hallazgos macroscópicos de la colitis crónica**

Parámetros	CRÓNICA		
	H <sub>2</sub> O	DSS	DSS + GED
Duración del tratamiento con DSS	30 días	30 días	15 días
Mortalidad (n. ratones)	0	2	0
Peso corporal	28,95 ± 0,331	25,93 ± 0,223 **	25,132 ± 0,458 **
Peso del colon	0,171 ± 0,005	0,283 ± 0,006***	0,269 ± 0,007***
Relación peso del colon/peso corporal	0,29 ± 0,0051	0,26 ± 0,007**	0,27 ± 0,012 **/¥¥
Longitud del colon	8,52 ± 0,093	6,304 ± 0,0,09**	7,092 ± 0,16**/
Dilatación	NP	1,35 ± 0,165**	1,12 ± 0,185 **/¥¥
Espesor	NP	1 ± 0,154**	0,48 ± 0,108 **/¥
Estenosis	NP	0,364 ± 0,151**	0,32 ± 0,114 **/¥
Adherencias	NP	0,348 ± 0,135**	0,12 ± 0,1 ¥¥
<b>Puntuación macroscópica total</b>	<b>NP</b>	<b>3,112 ± 0,31 **</b>	<b>2,02 ± 0,26 **/¥¥</b>

Los datos se expresan como la media ± SEM; np = no presente; \* = p < 0,05 frente a H<sub>2</sub>O; \*\* = p < 0,01 frente a H<sub>2</sub>O; \*\*\* = p < 0,005 frente a H<sub>2</sub>O; ¥ = p < 0,05 frente a DSS; ¥¥ = p < 0,01 frente a DSS; ¥¥¥ = p < 0,005 frente a DSS

5 Así pues, la relación peso/tamaño del colon se utilizó como indicador adicional del nivel de inflamación y fibrosis. Se observó un aumento significativo del 124 % en la proporción en los ratones que recibieron DSS en comparación con los ratones de control que recibieron solo agua regular, con, respectivamente, 44,98 ± 6,31 frente a 20,11 ± 3,91 (p < 0,05). El GED condujo a una disminución significativa de la relación peso/tamaño del colon en comparación con los ratones DSS (38,13 ± 7,82 frente a 44,98 ± 6,31 (p < 0,05)), causando una reducción del 26 % con respecto al efecto fibrótico del DSS. En consecuencia, El GED puede reducir los signos morfológicos de fibrosis, como el acortamiento y el engrosamiento del colon.

#### **Hallazgos microscópicos en LA colitis crónica**

15 Se puntuaron varios parámetros histológicos según la intensidad del infiltrado celular en la mucosa, la extensión de la inflamación en las capas submucosas y la presencia de lesiones epiteliales y deposición de colágeno. Se observó una inflamación significativa y fuerte en el grupo de ratones que recibieron el DSS en comparación con los ratones de control que recibieron agua regular. Las características histológicas en ambos modelos mostraron ulceración y degeneración de la mucosa, disminución de las células calciformes, amplia infiltración celular inflamatoria y edema submucoso. Todos estos hallazgos parecían más enfatizados en la colitis crónica inducida por DSS y era evidente un amplio engrosamiento de la pared del colon. Además, el modelo crónico mostró una regeneración evidente de las criptas y una posible recuperación espontánea del grado inflamatorio en los tratamientos a largo plazo (Fig. 12).

20 El nivel de fibrosis se observó mediante la tinción tricrómica de Masson, específico para la deposición de colágeno. Se observó un aumento significativo del nivel de fibrosis no solo en el colon de los ratones DSS en comparación con los ratones control, sino también entre los dos tratamientos (Fig. 12). Esta evidencia, junto con la observación de un menor grado inflamatorio, parece consistente con el postulado de que la fibrosis comienza a partir de una respuesta inflamatoria pero, posteriormente, puede progresar independientemente de ello.

25 Se asignaron puntuaciones microscópicas totales y se demostró que el alto grado inflamatorio y los niveles de fibrosis, inducido por 1 y 3 ciclos de DSS, disminuyó significativamente después de la administración oral diaria de GED (3,36 ± 0,55 para GED frente a 6,45 ± 0,82 para DSS, p < 0,01) (figura 12).

#### **Evaluación de los niveles de tejido de los principales marcadores de fibrosis**

30 Los niveles de tejido de los principales marcadores de fibrosis en el modelo crónico de colitis inducida por DSS se evaluaron mediante análisis inmunohistoquímico y se confirmaron mediante inmunotransferencia. Así pues, se observó una marcada reducción de colágeno I-III (Fig. 13a) y α-SMA (Fig. 13b), los marcadores específicos de la diferenciación de los fibroblastos, en colon de ratones sometidos a la administración oral de tratamiento con GED, en comparación con los ratones que solo recibieron DSS. Los niveles de expresión de colágeno I-III y α-SMA se midieron en 6 ratones de control, 8 ratones DSS y 8 ratones DSS + GED. Tanto la inmunohistoquímica como la transferencia Western mostraron que todos los principales marcadores de fibrosis aumentaron significativamente en el grupo de ratones que recibieron el DSS en comparación con los ratones de control que recibieron agua regular, y que la administración diaria de GED está asociada con su expresión reducida. Los niveles de expresión de cada proteína se expresaron como porcentaje de la media del grupo de control y cada marcador de interés se normalizó con una proteína de limpieza como GAPDH. Se observó un marcado aumento de la expresión de colágeno I-III (184%) en ratones DSS en comparación con el grupo de control, así como una regulación al alza moderada del 25 % para α-SMA. La

administración oral de GED en ratones con colitis crónica inducida por DSS causó una reducción en los niveles de expresión de estas proteínas, más significativamente marcado para el colágeno I-III ( $90,75 \% \pm 19,9 \%$  para GED frente a  $284,4 \% \pm 63,8 \%$  para DSS,  $p < 0,005$ ).

***GED controla la vía TGF $\beta$ /Smad y su activador específico, IL13.***

- 5 La capacidad de GED para controlar la ruta TGF $\beta$ /Smad a diferentes niveles se observó mediante análisis inmunohistoquímico y demostró una reducción marcada de los diferentes miembros involucrados en esta ruta, tales como TGF- $\beta$ 1, Smad3, CTGF (datos no mostrados).

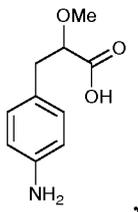
10 El beneficio de GED en la prevención o el tratamiento de la fibrosis intestinal en relación con las variaciones en los niveles de expresión de IL-13 se observó en la Fig. 14a). La IL-13 es un activador específico de la vía TGF  $\beta$ /Smad y este aspecto se confirmó por la disminución consiguiente en los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 (Fig. 14b) y CTGF (Fig. 14c). El aumento de la expresión de IL-13 en ratones DSS se restableció significativamente mediante la administración oral de GED con  $88,88 \% \pm 14,01 \%$  para GED frente a  $189,5 \% \pm 28,71 \%$  para DSS,  $p < 0,01$ . La consiguiente reducción de los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 y CTGF se confirmaron mediante análisis de inmunotransferencia, con marcada significación para CTGF ( $55,57 \% \pm 17,53 \%$  para GED frente a  $115,1 \% \pm 16,88$

15  $\%$  para DSS,  $p < 0,05$ ). Los niveles de expresión se expresaron como porcentaje de densidad óptica en comparación con el grupo control y se normalizaron con GAPDH.

20 Por tanto, las realizaciones anteriores se deben considerar en todos los aspectos como ilustrativas y no como limitantes de la invención descrita en el presente documento. Por tanto, el ámbito de la invención está indicado en las reivindicaciones adjuntas y no en la descripción anterior y, por consiguiente, se pretende que todos los cambios que entren dentro del significado y del ámbito de las reivindicaciones estén incluidos en ellas.

## REIVINDICACIONES

1. El compuesto ácido 2-metoxi-3- (4'-aminofenil) propiónico (compuesto 34) representado por la fórmula:



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable o un estereoisómero del mismo, para su uso en el tratamiento de la fibrosis, en el que la fibrosis se selecciona de fibrosis intestinal o fibrosis pulmonar idiopática.
2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es ácido (S)-2-metoxi-3- (4'-aminofenil)propiónico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es ácido (R)-2-metoxi-3- (4'-aminofenil)propiónico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 4. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la fibrosis es fibrosis intestinal.
5. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la fibrosis es fibrosis pulmonar idiopática.
- 15 6. Una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido 2-metoxi-3-(4'-aminofenil)propiónico (compuesto 34), o una sal farmacéuticamente aceptable o un estereoisómero del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de un paciente que padece fibrosis, en el que la fibrosis se selecciona de fibrosis intestinal o fibrosis pulmonar idiopática.
- 20 7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, comprendiendo la preparación farmacéutica una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido (S)-2-metoxi-3-(4'-aminofenil)propiónico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, comprendiendo la preparación farmacéutica una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido (R)-2-metoxi-3- (4'-aminofenil)propiónico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 9. La preparación farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en la que la preparación farmacéutica es para administración oral.
10. La preparación farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en la que el paciente es un ser humano.
11. La preparación farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que la fibrosis es fibrosis intestinal.
- 30 12. La preparación farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que la fibrosis es fibrosis pulmonar idiopática.
13. La preparación farmacéutica para su uso en el tratamiento de un paciente que padece fibrosis intestinal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en el que el paciente sufre actualmente o ha padecido hepatitis B o hepatitis C, o en el que el paciente tiene cirrosis.
- 35 14. La preparación farmacéutica para su uso en el tratamiento de un paciente que padece fibrosis intestinal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en el que el paciente también sufre enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal o colitis ulcerosa.

FIG. 1

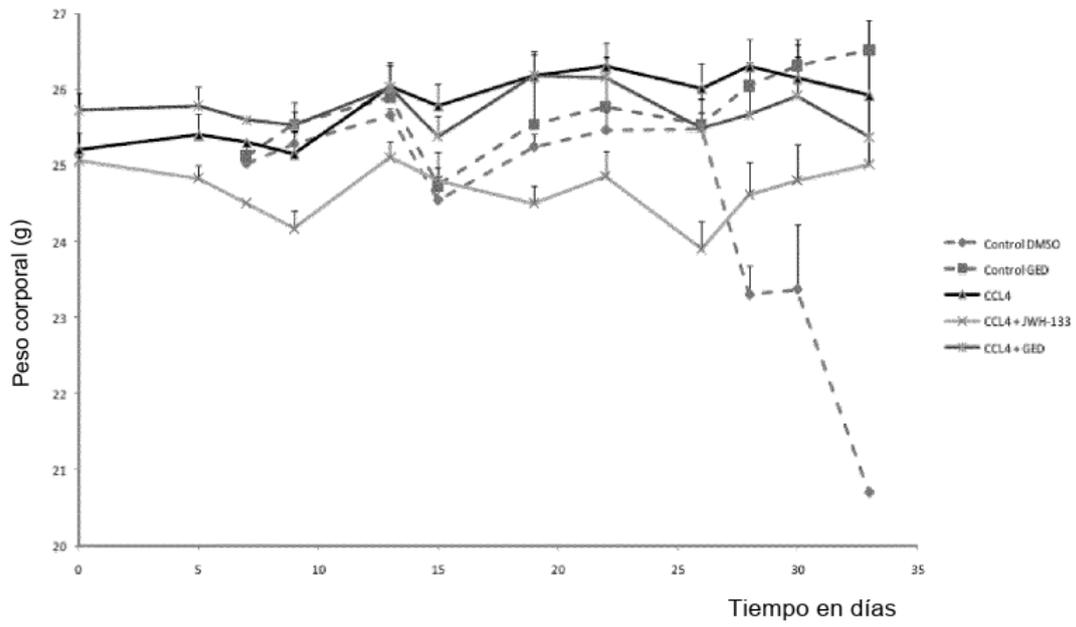


FIG. 2A

Puntuación Metavir (Actividad A0→A3 y Fibrosis F0→F4)		
	Actividad (necrosis e inflamación)	Fibrosis
0	A0	F0
baja	A1	F1
moderada	A2	F2
intensa	A3	F3
Cirrosis		F4

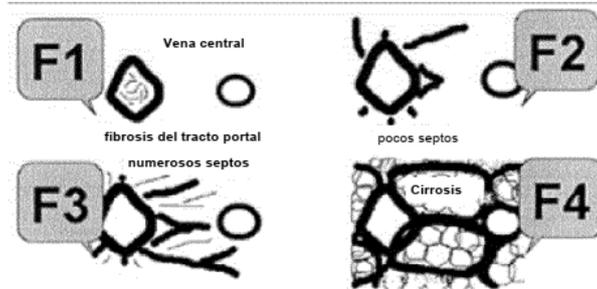
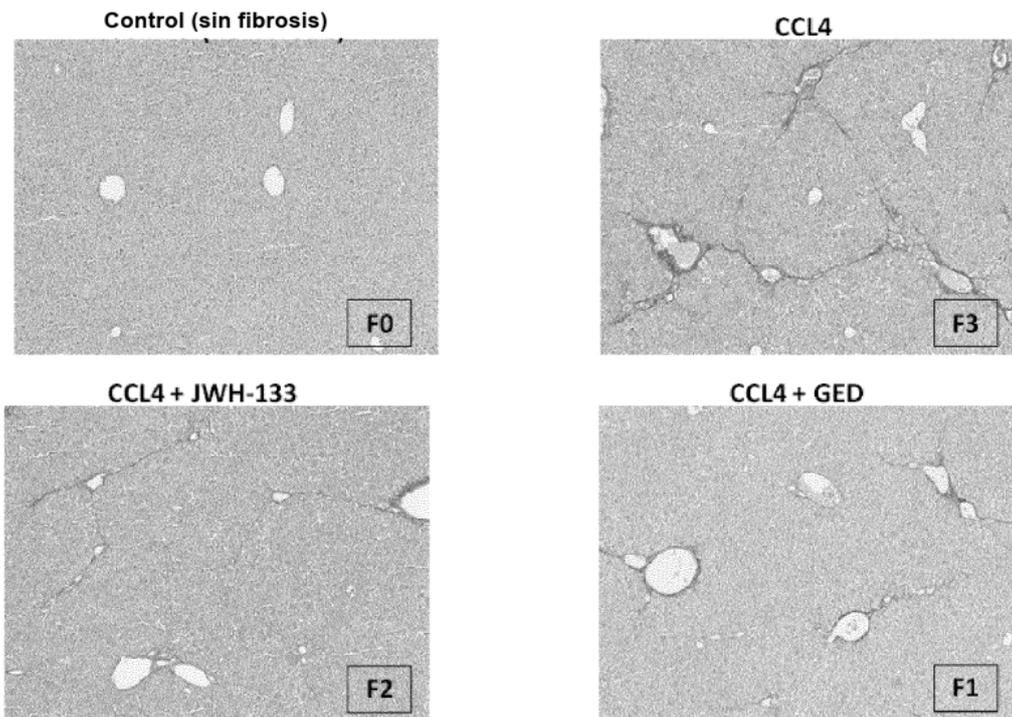
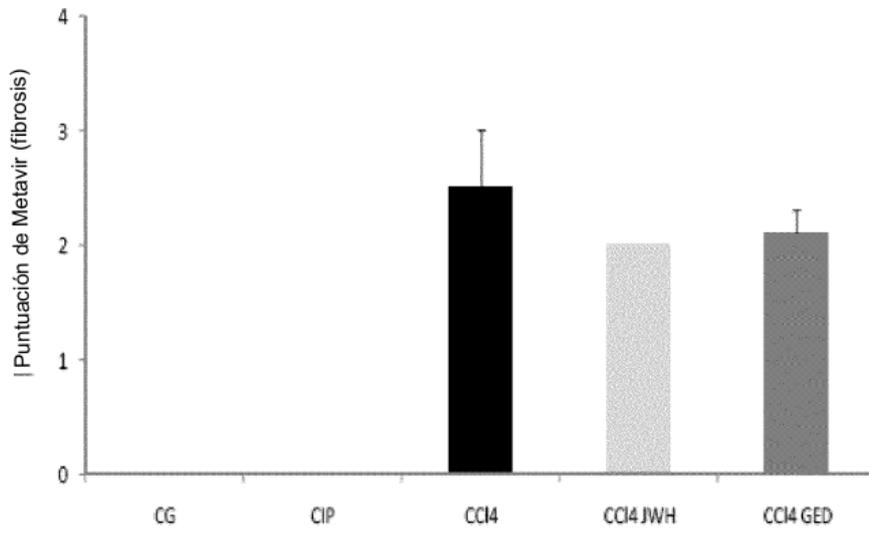


FIG. 2B



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**

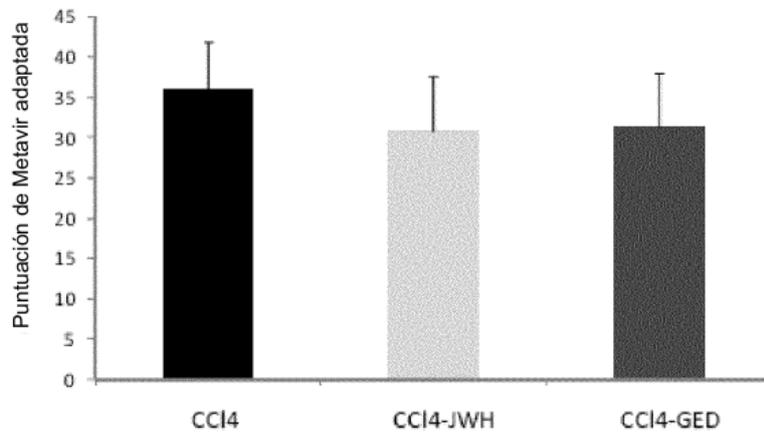
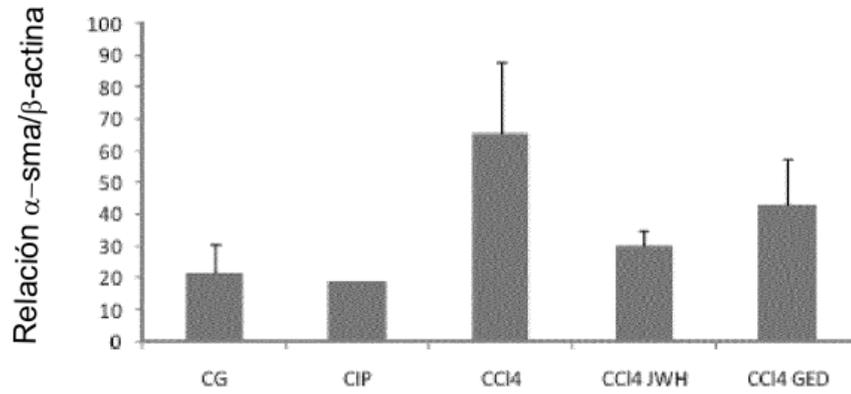


FIG. 4

$\alpha$ SMA



Colágeno 1

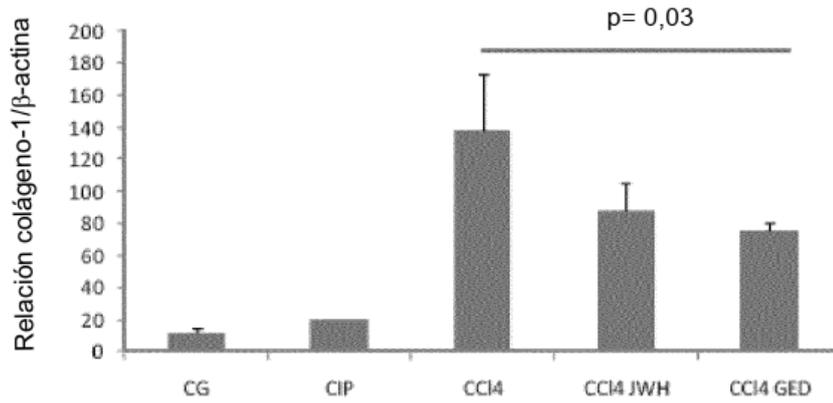


FIG. 5

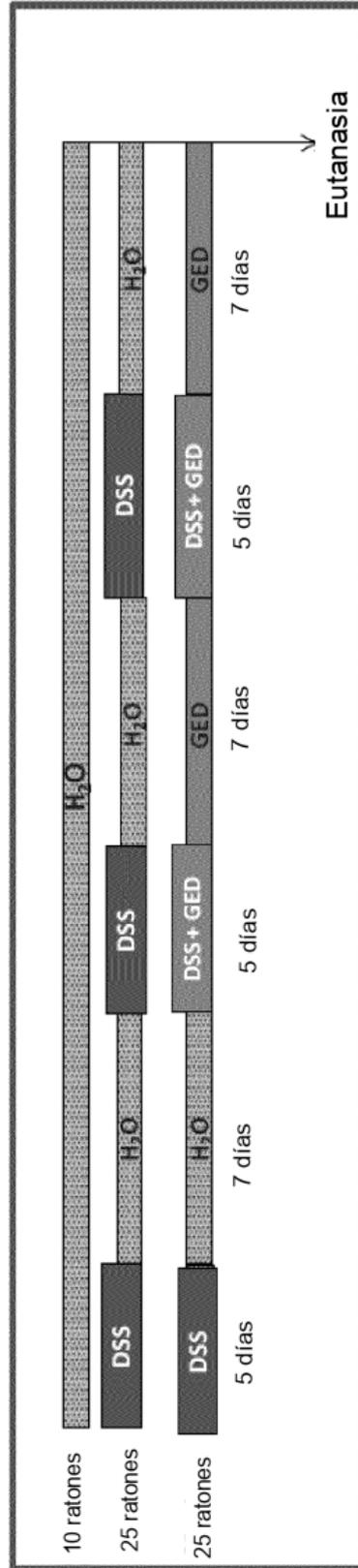


FIG. 6A

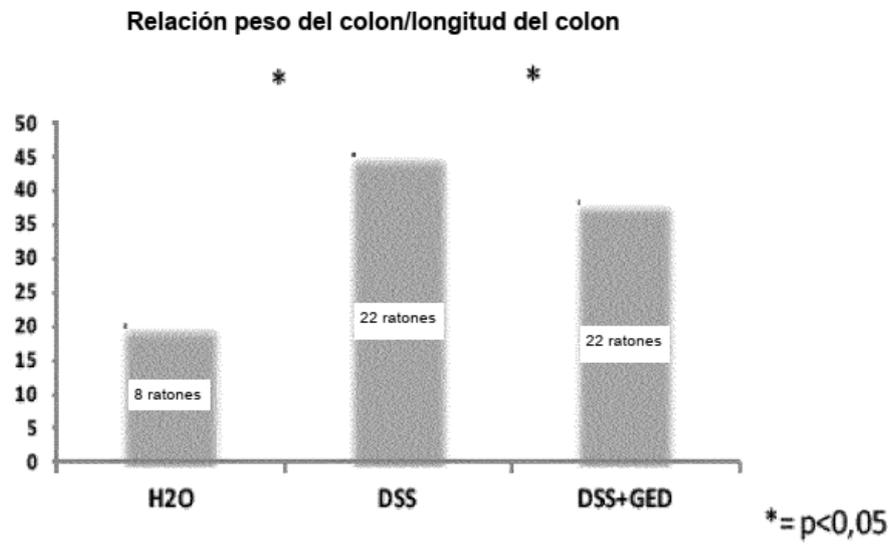


FIG. 6B

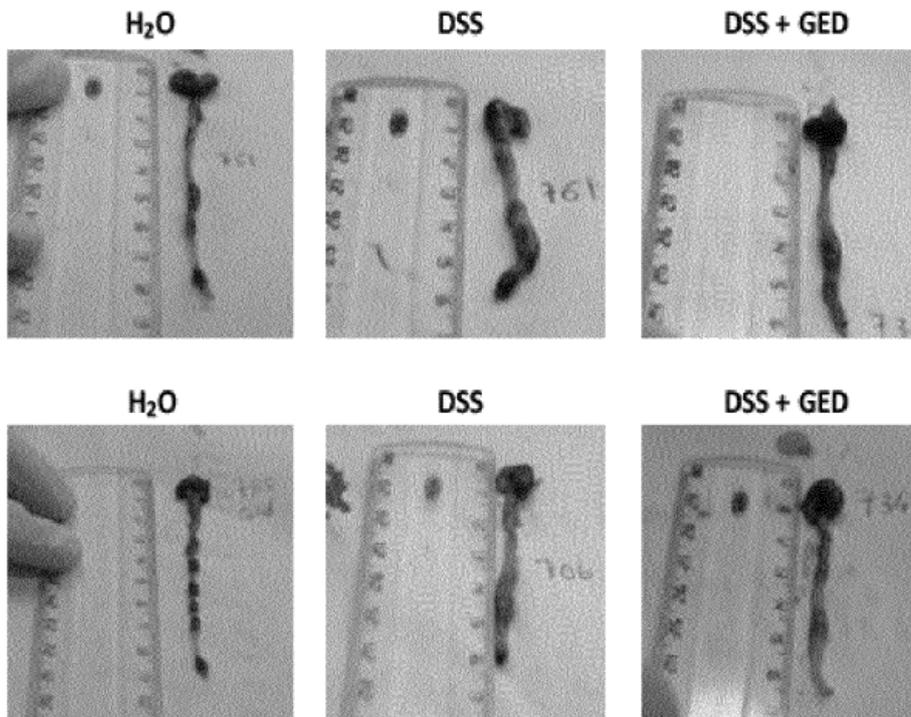


FIG. 7

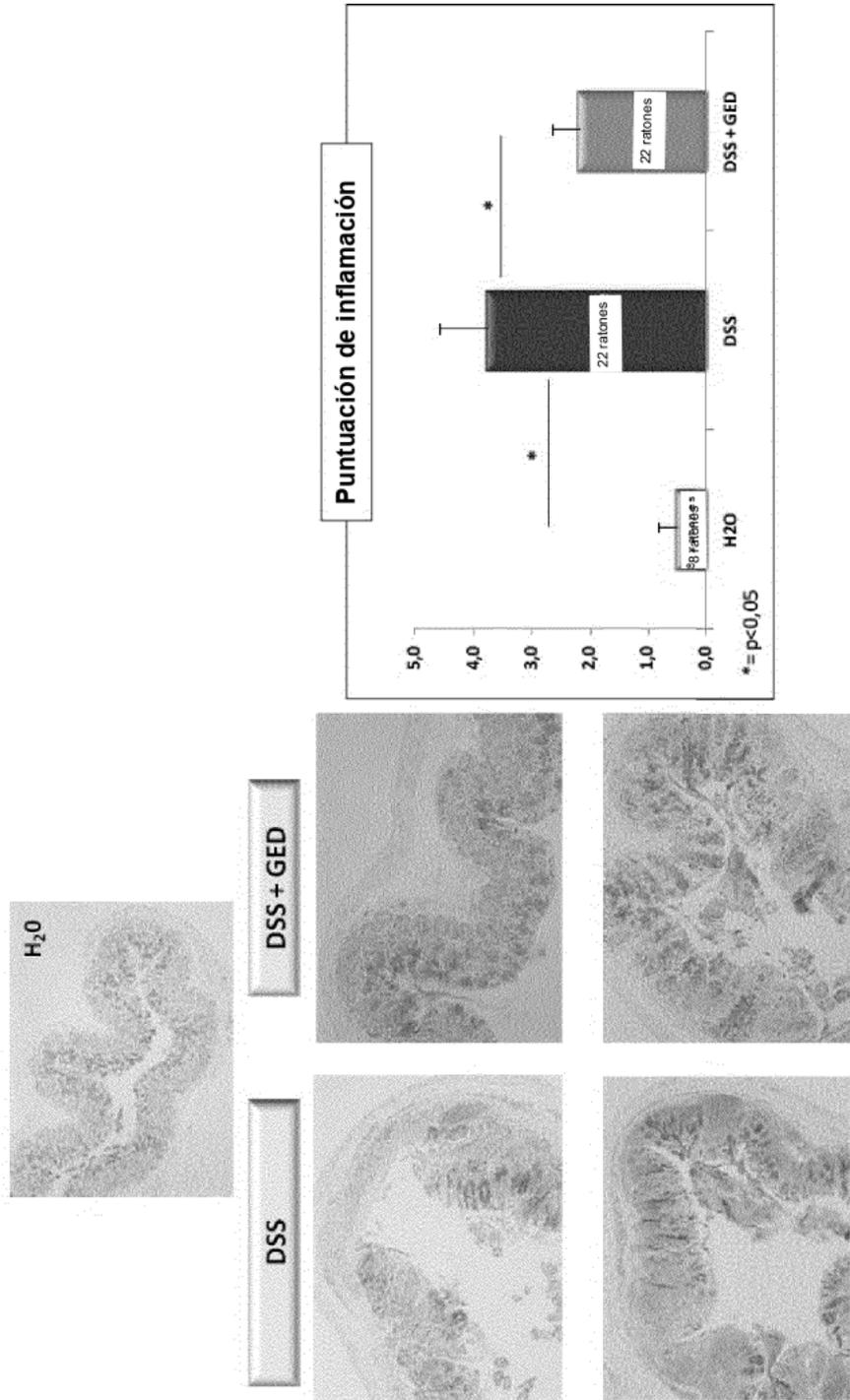
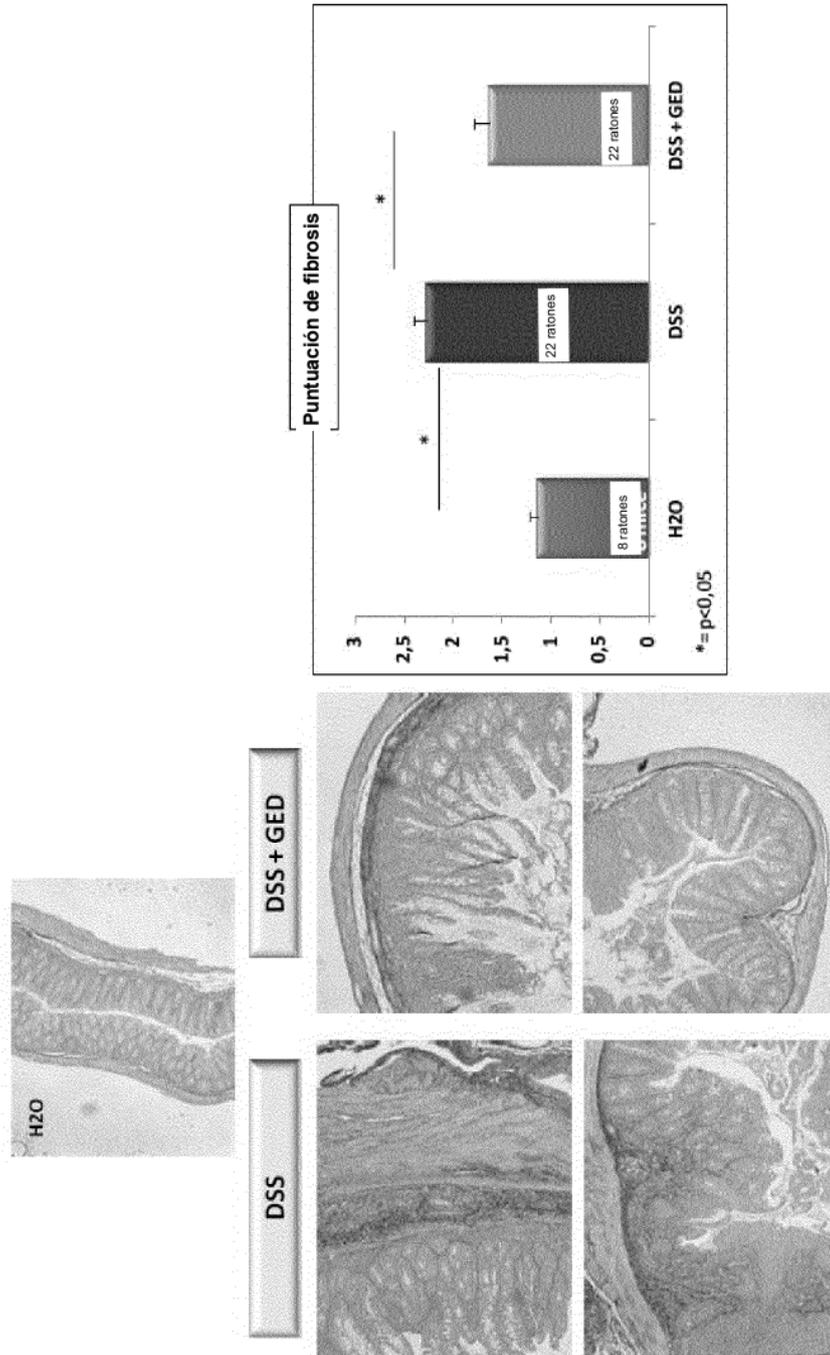
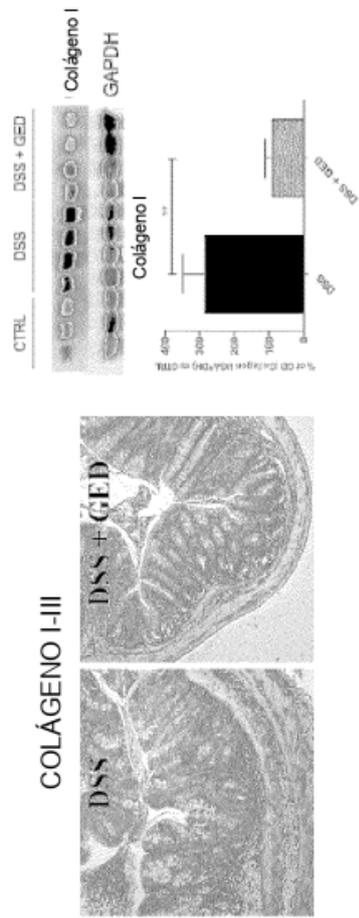


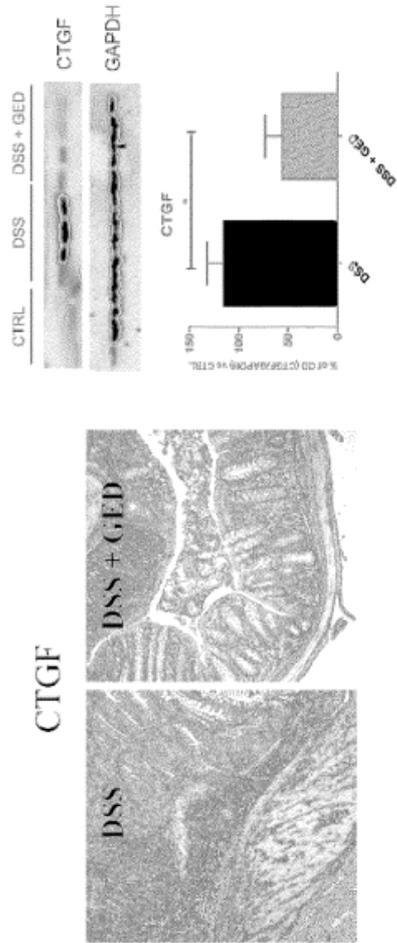
FIG. 8



**FIG. 9A**



**FIG. 9B**



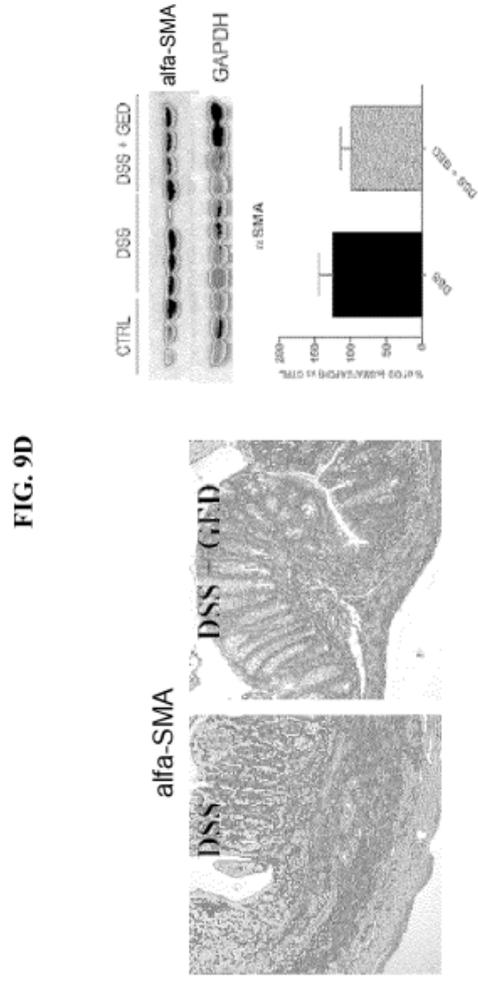
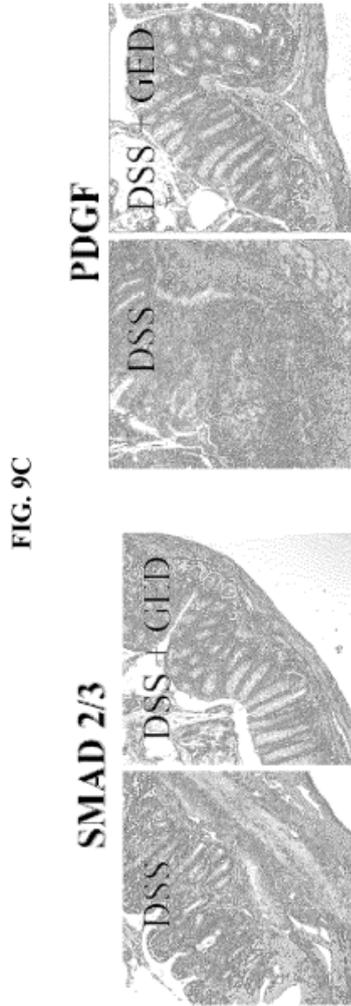


FIG. 9E

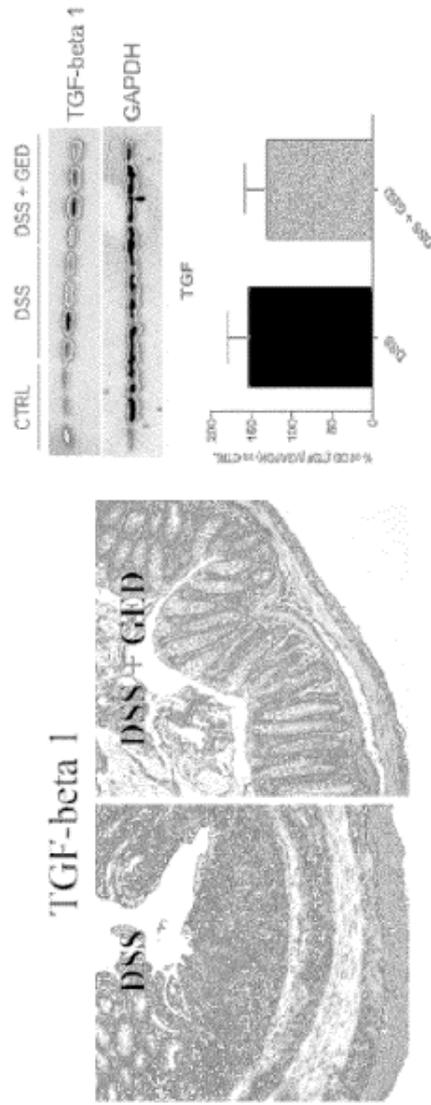


FIG. 10

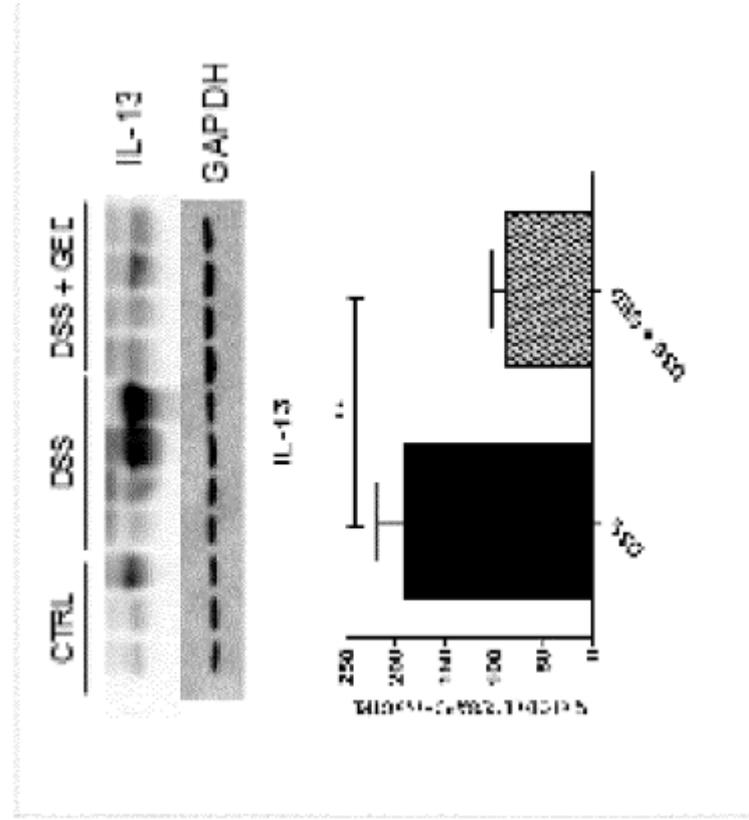


Fig. 11

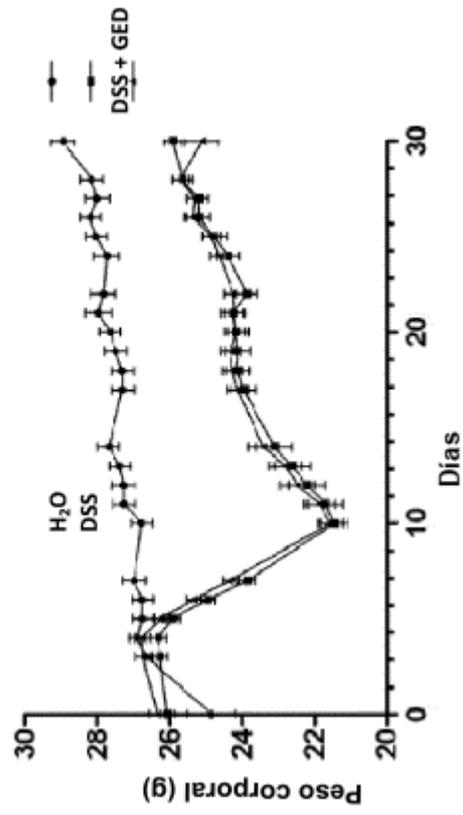


Fig. 12

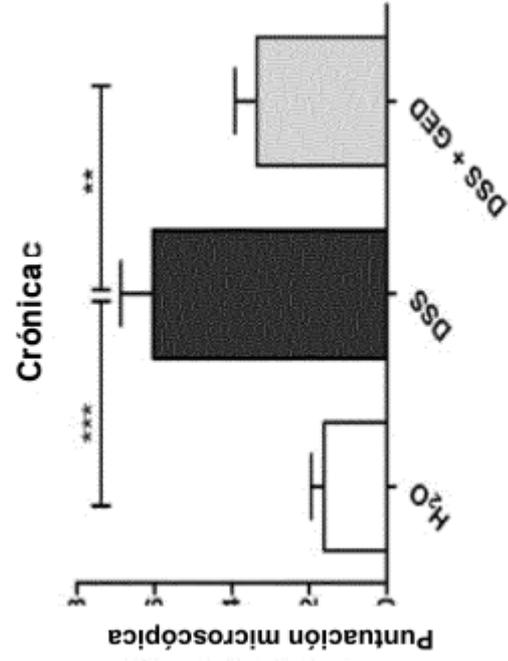


Figura 13

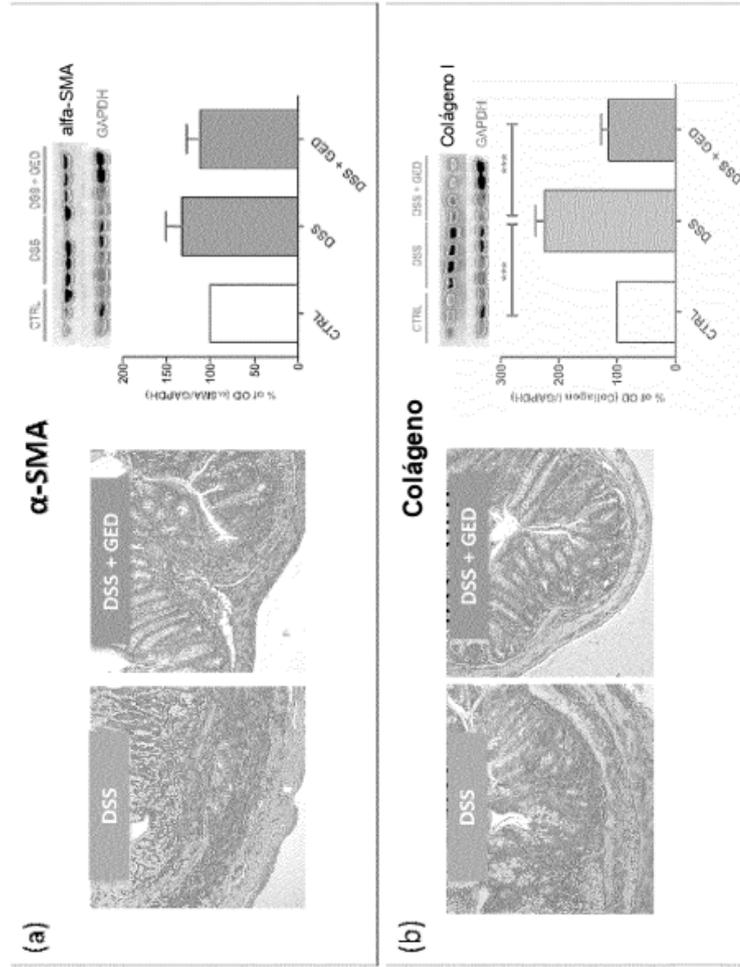


Figura 14

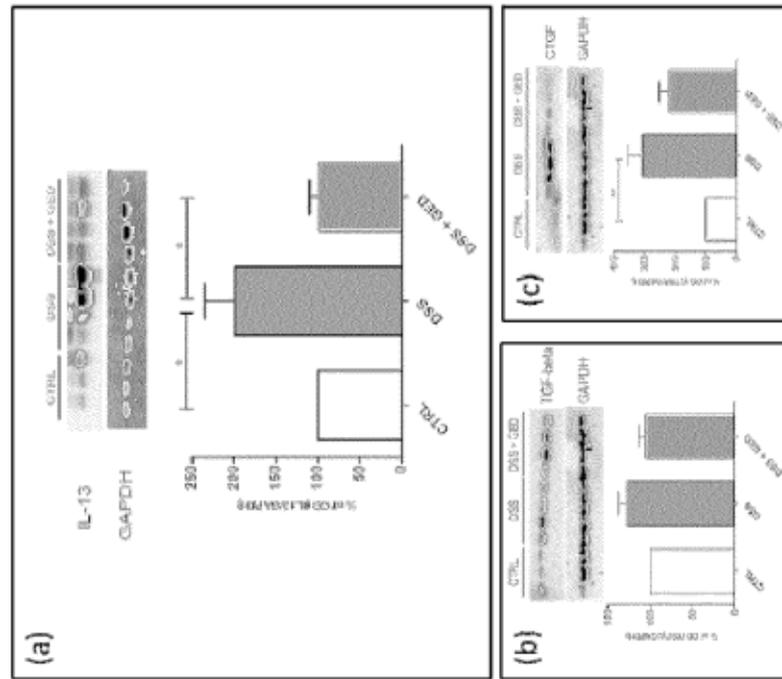


Figura 15

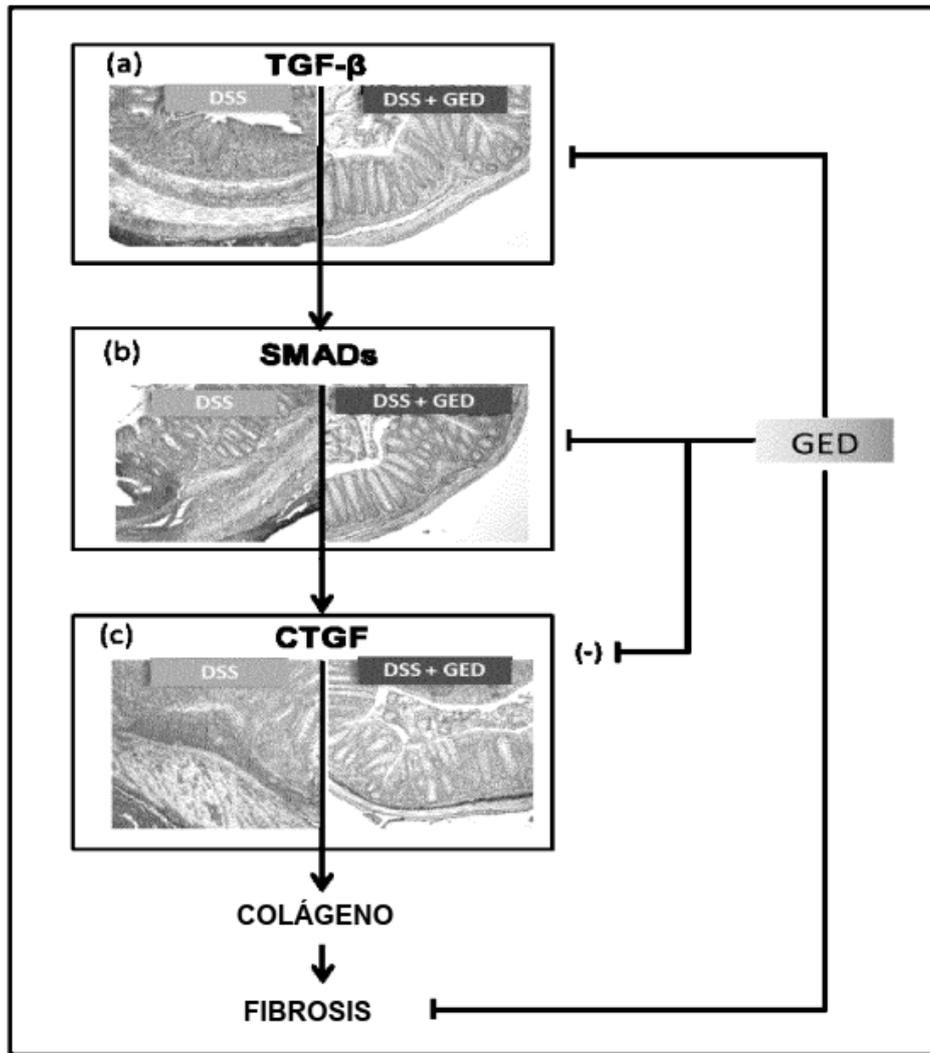


Figura 16

