(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 755 183**

(51) Int. CI.:

A61K 31/428 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2015 PCT/EP2015/063196**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189401**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015 E 15728018 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3154543**

(54) Título: **Compuestos ppar para uso en el tratamiento de enfermedades fibróticas**

(30) Prioridad:

13.06.2014 EP 14305894
13.06.2014 EP 14305895
13.06.2014 EP 14305896
13.06.2014 EP 14305897
24.12.2014 EP 14307187

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

(73) Titular/es:

INVENTIVA (100.0%)
50, rue de Dijon
21121 Daix, FR

(72) Inventor/es:

KONSTANTINOVA, IRENA;
LUCCARINI, JEAN-MICHEL;
JUNIEN, JEAN-LOUIS y
BROQUA, PIERRE

(74) Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro María

Observaciones:

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

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos ppar para uso en el tratamiento de enfermedades fibróticas

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de un agonista pan-PPAR, o de una composición farmacéutica que contiene dicho agonista, para el tratamiento de enfermedades fibróticas.

Antecedentes de la invención

La fibrosis hepática es el resultado de una interacción compleja entre diferentes tipos de células.Se caracteriza por el reclutamiento de células inflamatorias en respuesta a lesiones crónicas y por la activación de células estrella hepáticas (HSCs), que conduce a la acumulación de matriz extracelular. La esteatosis coexiste comúnmente con inflamación hepática y lesión hepatocelular. El aumento de la tensión oxidativa es un factor común en todas las enfermedades hepáticas crónicas que conduce a la fibrosis, independientemente de su etiología. Los hepatocitos dañados, las HSCs y las células inflamatorias de infiltración son las fuentes principales de especies de oxígeno reactivo (ROS). De hecho, la tensión oxidativa inducirá el reclutamiento de células inflamatorias y la activación de HSCs. Por lo tanto, en un contexto de daño crónico de hígado, ocurrirá un círculo vicioso de daño de hepatocitos, producción de ROS, activación de HSC y reclutamiento de células inflamatorias, que amplifica la respuesta fibrogénica al daño.

Los medios para un tratamiento eficaz de las enfermedades fibróticas del hígado, tal como enfermedad de hígado graso de no alcohólico (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), son aún insuficientes. No hay tratamiento establecido para pacientes con NASH y se prueban varias opciones terapéuticas en ensayo clínico (Vuppalanchi R y Chalasani N, Hepatology 2009, 49(1): 306-317; Dowman J.K y col., Q. J. Med. 2010, 103(2):71-83). Estos estudios involucran el uso de muchas familias diferentes de compuestos químicos (fibratos, tiazolidinedionas, biguanidas, estatinas, cannabinoides) y blancos terapéuticos (receptores nucleares, receptores de angiotensina, receptores de cannabinoide, HMG-CoA reductasa). Recientemente, estudios que involucran tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona) han mostrado que estos fármacos pueden mejorar la condición del hígado, pero el tratamiento con estos fármacos no es sin efectos indeseados tales como mayores riesgos de insuficiencia cardíaca congestiva y osteoporosis, así como también ganancia de peso con efectos psicológicos en el paciente (Dowman J.K y col., op. cit.; Shiri-Sverdlov R y col., J. Hepatol. 2006, 44: 732-41; Neuschwyer-Tetri y col., Hepatology 2003, 38:1008-1017). Ensayos clínicos que involucran la administración de cannabinoides han planteado la preocupación de interrupción neuropsiquiátrica (Vuppalanchi R. y Chalasani N., op. cit.). Otras terapias actualmente en curso buscan evaluar fármacos NASH como antioxidantes, pero ninguno de estos tratamientos ha mostrado aun resultados convincentes (Nelson A. y col., J. Clin. Gastroenterol. 2009, 43: 990-994). Candidatos para el tratamiento de enfermedades hepáticas se describen en WO 2011/064350 y US 2013/108573. Existe aún una necesidad, sin embargo, de compuestos que sean adecuados para el tratamiento de enfermedades hepáticas, en particular de compuestos que puedan apuntar a objetivos como los varios componentes del proceso fibrótico tales como esteatosis, inflamación y deposición de colágeno y sean carentes de los efectos secundarios observados con los fármacos actualmente bajo evaluación.

La enfermedad crónica de riñón (CKD), también conocida como enfermedad renal crónica, es una pérdida progresiva de la función renal en un periodo de meses o años. La CKD tiene su significado general en la técnica y se utiliza para clasificar numerosas condiciones que afectan el riñón, la destrucción del parénquima renal y la pérdida de nefrones funcionales o glomérulos. Se debe notar además que la CKD puede resultar de diferentes causas, pero la trayectoria final es fibrosis renal. Ejemplos de etiología de CKD incluyen, pero no están limitados a, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, glomerulonefritis, enfermedades de riñón poliquístico y rechazo de injerto de riñón. La fibrosis renal, caracterizada por glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial, es la manifestación común de una amplia variedad de enfermedades crónicas de riñón. La patogénesis de la fibrosis renal es, en esencia, un proceso monótono que se caracteriza por una acumulación y deposición excesiva de componentes de matriz extracelular (ECM). La fibrosis renal es un proceso progresivo que finalmente conduce a insuficiencia renal en etapa terminal, un trastorno devastador que requiere diálisis o trasplante de riñón. Sin embargo, no hay tratamiento específico que muestre inequívocamente que ralentiza el empeoramiento de la enfermedad crónica de riñón. El daño al riñón está asociado con la liberación de citocinas/factores de crecimiento tales como TGF-β, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) por células dañadas o de infiltración. Un incremento de producción de TGF-β es uno de los mecanismos más importantes en la patogénesis de fibrogénesis renal. El TGF-β1 estimula la activación de célula fibroblasto e induce la expresión de matriz a través de su interacción con receptores de TGF-β, los cuales están compuestos principalmente por dos familias de proteínas – receptores tipo I (TPRI) y tipo II (TPRII). El TGF-β1 se une a TβRII, lo que resulta en reclutamiento de TβRI para formar un complejo heteromérico de receptor del TGF-β. El complejo fosforila y activa Smad2 y Smad3, los dos Smads principales que median los eventos profibróticos. Otras trayectorias de señalización tal como quinasa extracelular regulada 1/2 (ERK1/2) también pueden ser activadas en respuesta a la activación del receptor del TGF-β. La ERK1/2 activada contribuye a la apoptosis de célula tubular en el riñón obstructivo. Puesto que la activación de señalización del TGF-β es considerada como el mayor mecanismo

que promueve directamente la activación de fibroblastos y la progresión de fibrosis, la intervención terapéutica de esta trayectoria podría ser considerada como una estrategia para detener o prevenir la fibrosis renal. Los candidatos para el tratamiento de CKD se describen en WO 2012/159107 y WO 2014/013005. Existe aún una necesidad, sin embargo, de compuestos que sean adecuados para el tratamiento de CKD.

El remodelado fibrótico de pulmón ocurre en condiciones de enfermedad pulmonar tal como síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma. La fibrosis pulmonar se caracteriza por la deposición excesiva de matriz extracelular en el intersticio, que resulta en insuficiencia respiratoria. La fibrosis pulmonar puede ser causada por un número de diferentes condiciones, que incluyen sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedad vascular del colágeno y exposición por inhalación. En un número significativo de pacientes, no se puede encontrar causa subyacente para la fibrosis pulmonar. Estas condiciones de etiología desconocida han sido denominadas neumonías intersticiales idiopáticas. La forma más común de neumonía intersticial idiopática es la fibrosis pulmonar idiopática (IPF). La histopatología primaria encontrada en la IPF es la de la neumonía intersticial usual con heterogeneidad temporal de zonas alteARNntes de fibrosis intersticial con focos fibroblásticos (es decir, fibrosis más reciente), inflamación, cambios de panal (es decir, fibrosis más antigua) y arquitectura normal de pulmón (es decir, sin evidencia de fibrosis). Candidatos para el tratamiento de IPF se describen en WO 2004/103296. Candidatos para el tratamiento de trastornos pulmonares fibróticos se describen en WO 2009/149188. Recientemente, estudios que involucran tiazolidinedionas tal como rosiglitazona han mostrado que estos fármacos pueden mejorar la fibrosis pulmonar, pero el tratamiento con estos fármacos no está sin efectos indeseados tales como mayores riesgos de insuficiencia cardíaca congestiva (Kung J. y col., Expert Opin. Drug Saf. 2012, 11(4):565-579). La pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona) tiene propiedades anti-fibróticas y está aprobada en Europa y Japón para el tratamiento de IPF. Existe aún una necesidad, sin embargo, de compuestos alternativos que sean adecuados para el tratamiento de trastornos pulmonares fibróticos.

Los trastornos fibróticos se caracterizan por deposición anormal y excesiva de colágeno y otros componentes de matriz extracelular (ECM) en varios tejidos. Aunque su etiología es muy diversa, la presencia de fibroblastos productores de ECM que muestran un fenotipo activado en los tejidos afectados son típicos de las enfermedades fibróticas. La activación de fibroblastos se caracteriza por un marcado incremento en la actividad transcripcional de los genes que codifican colágenos tipo I y tipo III y fibronectina, iniciación de la expresión de alfa-actina de músculo liso (α-SMA) y la reducción de actividades degradantes de ECM. El trastorno fibrótico sistémico más frecuente es la fibrosis sistémica la cual es una rara enfermedad crónica de causa desconocida. Es un trastorno sistémico clínicamente heterogéneo, que afecta el tejido conectivo de la piel, los órganos internos y las paredes de los vasos sanguíneos. Se caracteriza por alteraciones de la microvasculatura, alteraciones del sistema inmune y por deposición masiva de colágeno y otras substancias de matriz en el tejido conectivo. Las funciones básicas de varios tipos de células (células endoteliales, linfocitos T, monocitos, fibroblastos, mastocitos) así como también la producción y efectos de las citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión son conocidos por estar involucrados en el desarrollo de esta enfermedad. La fibrosis sistémica es aludida con frecuencia como escleroderma. El espectro de las enfermedades esclerodermatosas comprende una amplia variedad de entidades clínicas tales como morfea (en parches, lineal y generalizada), seudoescleroderma y los síndromes de superposición con manifestaciones cutáneas e histopatológicas similares. Además, la patofisiología compleja de la fibrosis sistémica, que involucra factores genéticos, factores ambientales, funciones vasculares y del sistema inmune, así como también fibroblastos y substancias de matriz y la complejidad de la implicación del órgano interno, resulta en enfermedades esclerodermatosas que se estudian con frecuencia como enfermedades autoinmunes o del tejido conectivo. Por lo tanto, la fibrosis sistémica ha sido un reto para los facultativos con respecto a los procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. La diagnosis clínica de la fibrosis sistémica involucra con frecuencia la atención de varias disciplinas (por ejemplo dermatólogos, reumatólogos, neumólogos, nefrólogos y gastroenterólogos) y puede incluir procedimientos invasivos tales como una biopsia del tejido fibrótico y/o piel para confirmación. Candidatos para el tratamiento de fibrosis sistémica se describen en US 2013/0287794 y US 2014/0038956. Existe aún una necesidad, sin embargo, de compuestos alternativos que sean adecuados para el tratamiento de fibrosis sistémica.

Los receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPARs) son un grupo de proteínas de receptor nuclear que funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión de genes. PPARs juegan papeles esenciales en la regulación de diferenciación, desarrollo y metabolismo celulares (carbohidrato, lípido, proteína). Se han identificado tres subtipos de PPARs:

- PPARα, los cuales se expresan principalmente en hígado, riñón, corazón, músculo, tejido adiposo y pulmones;
- PPARγ, los cuales se expresan en virtualmente todos los tejidos;
- PPARδ, los cuales se observan en una variedad de tejidos/células notablemente en los sistemas cardiovascular, urinario, respiratorio, digestivo y musculoesquelético.

Los agonistas de PPAR son fármacos que actúan sobre los PPARs. Se utilizan para el tratamiento de síntomas de las enfermedades metabólicas, principalmente para bajar triglicéridos y azúcar en sangre. Los agonistas de PPARα consisten esencialmente de la clase de fibratos (por ejemplo fenofibrato). Los agonistas PPARγ consisten esencialmente de tiazolidinedionas (por ejemplo rosiglitazona y pioglitazona). Los agonistas PPARδ incluyen GW501516, un compuesto candidato que fue eventualmente discontinuado debido a asuntos de seguridad.

La expresión de receptores de PPAR se modifica en enfermedades de fibrosis. Por ejemplo, disminuir la expresión de PPARγ ha sido descrito de manera reproducible en biopsias de piel, así como también en fibroblastos de piel explantados de pacientes de escleroderma sistémica (Lakota y col., Arthritis Res. Ther. 2012 May 1;14(3)). También se reportó una expresión más baja de PPARγ en fibroblastos de pulmón de pacientes de escleroderma (Bogatkevich y col., Pulm. Med. Vol 2012; 2012). Los agonistas de PPARγ rosiglitazona y pioglitazona protegen roedores de fibrosis piel y pulmón inducida por bleomicina *in vivo* y previenen la activación de trayectorias profibróticas y procesos *in vitro* en líneas de células fibroblasto y en fibroblastos primarios (Aoki y col., Respiration. 2009;77(3):311-9; Samah y col., Eur J Pharmacol. 2012 Aug 15;689(l-3)). Los receptores PPARα también modulan la respuesta profibrótica a diferentes estímulos. En el pulmón, fenofibrato, un agonista de PPARα específico, previno la fibrosis inducida por bleomicina (Samah y col. 2012 op cit). Además, el agonista de PPARδ GW0742 ha mostrado que reduce la inflamación de pulmón inducida por instilación de bleomicina en ratones (Galuppo y col., Int J Immunopathol Pharmacol. 2010 Oct-Dec;23(4):1033-46).

Breve descripción de la invención

Se ha encontrado ahora que los agonista pan-PPARs, es decir compuestos que activan todos los tres receptores de PPAR (PPARα, PPARγ y PPARδ), ejercen efectos benéficos en el tratamiento de varias condiciones fibróticas. La presente invención por lo tanto proporciona un agonista pan-PPAR para uso en un método de tratamiento de una condición fibrótica. La invención también proporciona composiciones y métodos para tratar una condición fibrótica.

En una realización, la condición fibrótica es una condición que afecta cualquier órgano que puede desarrollar fibrosis, tal como el corazón, el pulmón, el hígado, el riñón, el tracto gastrointestinal, la piel, etc.

En otra realización, la condición fibrótica se selecciona de: fibrosis hepática, enfermedad de hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad crónica de riñón, un trastorno pulmonar fibrótico tal como fibrosis pulmonar idiopática y escleroderma sistémica.

En aún otra realización, que puede combinarse con las previas, el agonista pan-PPAR está destinado para administración oral.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra niveles de triglicéridos en plasma de ratones expuestos a CCl_4 tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.
La figura 2 muestra deposición de colágeno en ratones expuestos a CCl_4 tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.
La figura 3 muestra la expresión de TGFβ-1 en ratones expuestos a CCl_4 tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.
La figura 4 muestra la expresión de Col1a en ratones expuestos a CCl_4 tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.
La figura 5 muestra la expresión de α-SMA en ratones expuestos a CCl_4 tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.
La figura 6 muestra la expresión de MCP-1 en ratones expuestos a CCl_4 tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.
La figura 7 muestra la expresión de fibronectina en ratones expuestos a CCl_4 tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.
Leyendas para las figuras 1 a 7: en el grupo de aceite las barras representan, de izquierda a derecha, vehículo, compuesto A (100 mg/kg) y rosiglitazona; en el grupo de $CC1_4$ las barras representan, de izquierda a derecha, vehículo, compuesto A (30 mg/kg), compuesto A (100 mg/kg) y rosiglitazona.
La figura 8 muestra niveles de urea en suero de ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo, captopril, rosiglitazona, pioglitazona y compuesto A.
La figura 9 muestra volúmenes de orina de ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo, captopril, rosiglitazona, pioglitazona y compuesto A.
La figura 10 muestra niveles de albúmina en orina de ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo, captopril, rosiglitazona, pioglitazona y compuesto A.
La figura 11 muestra niveles de osteopontina of ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo, captopril, rosiglitazona, pioglitazona y compuesto A.
La figura 12 muestra niveles de MCP-1 de ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo, captopril, rosiglitazona, pioglitazona y compuesto A.
La figura 13 muestra la expresión de TGFβR1 de ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo, captopril, rosiglitazona, pioglitazona y compuesto A.
La figura 14 muestra la expresión de Col1a de ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo, captopril, rosiglitazona, pioglitazona y compuesto A.
La figura 15 muestra la expresión de Col3a de ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo, captopril, rosiglitazona, pioglitazona y compuesto A.

La figura 16 muestra el número de glomérulos patológicos en ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo y compuesto A.

Leyendas para las figuras 8 a 15: las barras representan, de izquierda a derecha, ratones de control, ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo, ratones expuestos a anti-GBM tratados con captopril, ratones expuestos a anti-GBM tratados con rosiglitazona, ratones expuestos a anti-GBM tratados con pioglitazona, ratones expuestos a anti-GBM tratados con el compuesto A (30 mg/kg) y ratones expuestos a anti-GBM tratados con el compuesto A (100 mg/kg). Leyendas para la figura 16: las barras representan, de izquierda a derecha, ratones expuestos a anti-GBM tratados con vehículo y ratones expuestos a anti-GBM tratados con el compuesto A (100 mg/kg).

La figura 17 muestra la deposición de colágeno en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 18 muestra niveles de TIMP-1 en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 19 muestra niveles de MCP-1 en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 20 muestra niveles de osteopontina en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 21 muestra la expresión de TGFβR1 en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 22 muestra la expresión de Col1a en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 23 muestra la expresión de Col3a en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 24 muestra la expresión de TIMP-1 en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 25 muestra la expresión de MCP-1 en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 26 muestra la expresión de osteopontina en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 27 muestra la expresión de fibronectina en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

Leyendas para las figuras 17 a 27: en el grupo salino las barras representan, de izquierda a derecha, vehículo, compuesto A (100 mg/kg) y rosiglitazona; en el grupo de bleomicina las barras representan, de izquierda a derecha, vehículo, compuesto A (30 mg/kg), compuesto A (100 mg/kg) y rosiglitazona.

La figura 28 muestra el espesor dérmico de ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 29 muestra el contenido de hidroxiprolina en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

La figura 30 muestra el contenido de colágeno en ratones expuestos a bleomicina tratados con vehículo, compuesto A y rosiglitazona.

Leyendas para las figuras 28 a 30: Bleo = bleomicina; IVA30 = compuesto A (30 mg/kg); IVA100 = compuesto A (100 mg/kg); Ros = rosiglitazona.

La figura 31 muestra la activación de los receptores humanos PPARα, γ y δ por el compuesto A como una función de la concentración de dicho compuesto.

La figura 32 muestra la activación de los receptores de murino PPARα, γ y δ por el compuesto A como una función de la concentración de dicho compuesto.

La figura 33 muestra el efecto del compuesto A, ácido fenofíbrico y rosiglitazona en proliferación inducida por PDGF en fibroblastos primarios humanos de pulmón.

La figura 34 muestra el efecto del compuesto A, ácido fenofíbrico y rosiglitazona en la proliferación inducida por PDGF en fibroblastos dérmicos primarios humanos.

La figura 35 muestra el efecto del compuesto A, ácido fenofíbrico y rosiglitazona en FMT inducida por TGFP en fibroblastos de pulmón primarios humanos.

La figura 36 muestra el efecto del compuesto A, ácido fenofíbrico y rosiglitazona en FMT inducida por TGFP en fibroblastos dérmicos primarios humanos.

Leyendas para las figuras 33 a 36: Rosi = rosiglitazona; Feno = ácido fenofíbrico.

En las figuras 1 a 36, el compuesto A es ácido 5-cloro-1-[(6-benzotiazolil)sulfonil]-1H-indol-2-butanoico.

Descripción detallada de la invención

El daño crónico de hígado causado por grasas, alcohol, virus o substancia química puede inducir la activación de célula estrella hepática para secretar una gran cantidad de matriz extracelular tal como colágeno, lo que puede conducir a fibrosis hepática como una consecuencia de sobre-deposición de matriz extracelular.

La enfermedad crónica de riñón (CKD) es el resultado de varios agresiones al riñón, que afecta aproximadamente al 10 % de la población normal. Es un proceso progresivo marcado por fibrosis intersticial. El auxiliar primario del

tratamiento en pacientes con CKD es prevenir o por lo menos ralentizar la progresión de CKD.

La fibrosis pulmonar llamada también fibrosis pulmonar idiopática (IPF), fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar inflamatoria o alveolitis fibrosante, es un trastorno pulmonar inflamatorio y un grupo heterogéneo de condiciones caracterizadas por formación anormal de tejido fibroso entre alveolos causada por alveolitis que comprende una infiltración celular inflamatoria hacia septos alveolares con fibrosis resultantes. Los efectos de IPF son crónicos, progresivos y con frecuencia fatales. Un número de investigaciones sobre fibrosis pulmonar han indicado que la expresión sostenida y aumentada de algunas citocinas en el pulmón son relevantes para el reclutamiento de células inflamatorias y acumulación de componentes de matriz extracelular seguido por remodelado de la arquitectura de pulmón. En particular, se demostró que las citocinas proinflamatorias tales como TNF-α e interleucina IL-1β juegan papeles importantes en la formación de neumonitis y fibrosis pulmonar. Además, las citocinas profibróticas tales como TGF-α y CTGF juegan también papeles críticos en la patogénesis de la fibrosis pulmonar.

La escleroderma es una enfermedad que causa piel engrosada y grados variables de disfunción orgánica que resulta de vasculopatía de vasos pequeños y fibrosis inmuno-mediada. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son extremadamente heterogéneas y dependen de la presencia y grado de implicación de órganos internos. Los pacientes pueden presentarse con un espectro de enfermedad que fluctúa desde fibrosis de piel localizada solamente (escleroderma localizada) hasta un trastorno sistémico con implicación tanto cutánea como de órgano interno. La escleroderma localizada incluye varias formas de esclerosis cutánea sin implicación de órganos internos. Estas formas de escleroderma pueden ser desfigurantes, pero solamente rara vez requieren terapia sistémica para controlar la actividad de la enfermedad. La esclerosis sistémica se divide además en dos subconjuntos de enfermedad, dependiendo del grado de implicación de la piel y órganos. La presencia de esclerosis sistémica difusa indica la presencia de esclerosis cutánea extensiva sobre las extremidades proximales, tronco y cara. Los pacientes con esclerosis sistémica limitada tienen fibrosis limitada en las manos, antebrazos, pies, piernas y cara. Ambas esclerosis sistémicas difusa y limitada están asociadas con la implicación de órganos internos; sin embargo, los pacientes con esclerosis sistémica difusa están en mayor riesgo de disfunción de órgano mayor clínicamente significativa. Algunos pacientes con esclerosis sistémica limitada pueden clasificarse además como que tienen el síndrome de CREST, con calcinosis acompañante, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasias cutáneas. La escleroderma sine esclerosis es un trastorno raro en el cual los pacientes desarrollan daño vascular y fibrótico en órganos internos en la ausencia de esclerosis cutánea. La patofisiología de la esclerosis sistémica involucra daño vascular y activación de fibroblastos y colágeno y se sobreproducen otras proteínas extracelulares en varios tejidos. La escleroderma se caracteriza por la activación del sistema inmune, disfunción endotelial y actividad incrementada de fibroblasto. Los eventos precisos incitadores que conducen al desarrollo de esclerosis sistémica son desconocidos actualmente. Varias citocinas que incluyen interleucina-4 y el factor de crecimiento transformante-beta (TGF-β) han estado implicados en la activación de fibroblasto en pacientes con escleroderma. Estas citocinas son liberadas desde células inmunes activadas, fibroblastos y células endoteliales. Los fibroblastos activados elaboran colágeno estructuralmente normal y otras proteínas extracelulares de matriz en la piel y varios órganos internos.

La presente invención se basa en el hallazgo de que un agonista de pan-PPAR ejerce efectos benéficos en el tratamiento de las condiciones fibróticas tales como aquéllas antes descritas. En el contexto de la presente invención, el término "agonista de pan-PPAR" quiere decir un compuesto que activa significativamente cada uno de los receptores PPARα, PPARγ y PPARδ, es decir un compuesto que individualmente sería considerado como un agonista de PPARα, un agonista de PPARγ y un agonista de PPARδ con base en sus valores de EC50 respectivos. De acuerdo con la presente invención, la activación significativa de los receptores PPARα, PPARγ y PPARδ se logra cuando la EC50 para cada receptor es $< 10^{-6}$M. Las EC50s para los tres subtipos de receptor difieren de preferencia en menos de 2 órdenes de magnitud (es decir la proporción de la EC50 para dos subtipos de receptor es ya sea menos de 100 o más de 0,01). En una realización el agonista de pan-PPAR no es bezafibrato.

En un aspecto, la invención proporciona, por lo tanto, un agonista de pan-PPAR para uso en el tratamiento de una condición fibrótica.

En una realización, la condición fibrótica es una condición que afecta cualquier órgano que puede desarrollar fibrosis, tal como el corazón, el pulmón, el hígado, el riñón, el tracto gastrointestinal, la piel, etc.

En una realización más, la condición fibrótica se selecciona de: fibrosis hepática, enfermedad de hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad crónica de riñón, un trastorno pulmonar fibrótico, escleroderma sistémica.

Todavía en una realización más, la condición fibrótica es una enfermedad del hígado, de preferencia fibrosis hepática, enfermedad de hígado graso o esteatohepatitis no alcohólica.

Todavía en una realización más, la condición fibrótica es una enfermedad crónica de riñón. La enfermedad se selecciona notablemente de nefropatía (por ejemplo nefropatía membranosa, nefropatía diabética y nefropatía hipertensa), glomerulonefritis (por ejemplo glomerulonefritis membranosa y glomerulonefritis membranoproliferativa tal como glomerulonefritis rápidamente progresiva), nefritis intersticial, nefritis lúpica, síndrome nefrótico idiopático

(por ejemplo síndrome nefrótico de cambio mínimo y glomeruloesclerosis focal segmentaria), uropatía obstructiva, enfermedad de riñón poliquístico (por ejemplo enfermedad renal poliquística autosómica dominante y enfermedad renal poliquística autosómica recesiva) y rechazo de injerto de riñón (por ejemplo rechazo agudo y crónico de riñón).

Todavía en una realización más, la condición fibrótica es un trastorno pulmonar fibrótico, de preferencia fibrosis pulmonar idiopática.

Todavía en una realización más, la condición fibrótica es una fibrosis de piel tal como escleroderma sistémica.

Todavía en una realización más, la cual puede combinarse con cualquiera de las realizaciones previas, el agonista de pan-PPAR está destinado para administración oral.

El agonista de pan-PPAR puede ser formulado en una composición farmacéutica para administración.

En otro aspecto, la invención, por lo tanto, proporciona una composición farmacéutica que incluye un agonista de pan-PPAR, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una condición fibrótica como se describe antes en las varias realizaciones del primer aspecto de la invención. En una realización, la composición comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de pan-PPAR. En el contexto de la invención, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente de agonista de pan-PPAR para proporcionar el efecto deseado. Finalmente, el médico asistente decide la cantidad apropiada y régimen de dosificación.

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona el uso de un agonista de pan-PPAR en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una condición fibrótica como se describe antes en las varias realizaciones del primer aspecto de la invención.

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de una condición fibrótica como se describe antes en las varias realizaciones del primer aspecto de la invención, el cual comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de pan-PPAR. El sujeto es típicamente un mamífero, de preferencia un humano. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" tiene el mismo significado que el antes mencionado.

El agonista de pan-PPAR será administrado generalmente como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término 'excipiente' se utiliza en la presente para describir cualquier ingrediente diferente al agonista de pan-PPAR. La selección de excipiente(s) dependerá en un alto grado de factores tales como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad y la naturaleza de la forma de dosificación.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la entrega del agonista de pan-PPAR y métodos para su preparación serán fácilmente aparentes a aquellos expertos en la técnica. Tales composiciones y métodos para su preparación se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ovena edición (Mack Publishing Company, 1995), incorporado en la presente por referencia.

Administración oral

El agonista de pan-PPAR puede ser administrado oralmente. La administración oral puede involucrar la deglución, de manera que el compuesto entra al tracto gastrointestinal y/o bucal, lingual o administración sublingual mediante la cual el compuesto entra a la corriente sanguínea directamente desde la boca. Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen sistemas sólido, semi-sólido y líquido tales como tabletas; cápsulas suaves o duras que contienen multi- o nano-partículas, líquidos o polvos; pastillas en forma de rombo (que incluyen cargas líquidas); gomas para mascar; geles; formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvulos; rocíos; y parches bucales/mucoadhesivos.

Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elíxires. Tales formulaciones pueden emplearse como cargas en cápsulas suaves o duras (hechas, por ejemplo, de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa) y típicamente comprenden un portador, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa o un aceite adecuado y uno o más agentes emulsiónantes y/o agentes de suspensión. Las formulaciones líquidas también se pueden preparar mediante la reconstitución de un sólido, por ejemplo, a partir de una bolsita.

Para formas de dosificación en tableta o en cápsula, que dependen de la dosis, el fármaco puede constituir desde 1 % en peso hasta 80 % en peso de la forma de dosificación, más típicamente desde 5 % en peso hasta 60 % en peso de la forma de dosificación. Además del fármaco, las tabletas generalmente contienen un desintegrante Ejemplos de desintegrantes incluyen glicolato sódico de almidón, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, polivinilpirrolidona, metil celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropil celulosa inferior substituida con alquilo, almidón, almidón pregelatinaizado y alginato de sodio. Generalmente, el desintegrante comprenderá desde 1 % en peso hasta 25 % en peso, de preferencia desde 5 % en peso hasta 20 %

en peso de la forma de dosificación.

Los aglutinantes se utilizan generalmente para impartir cualidades cohesivas a una formulación en tableta. Los aglutinantes adecuados incluyen celulosa microcristalina, gelatina, azúcares, polietilenglicol, gomas naturales y sintéticas, polivinilpirrolidona, almidón pregelatinizado, hidroxipropil celulosa e hidroxipropil metilcelulosa. Las tabletas también pueden contener diluyentes, tales como lactosa (monohidrato, monohidrato secado por rociado, anhidro y los similares), manitol, xilitol, dextrosa, sacarosa, sorbitol, celulosa microcristalina, almidón y fosfato dibásico de calcio dihidratado.

Las tabletas o las cápsulas pueden comprender también opcionalmente agentes tensoactivos, tales como lauril sulfato de sodio y polisorbato 80 y deslizantes tales como dióxido de silicio y talco. Cuando están presentes, los agentes tensoactivos pueden comprender desde 0,2 % en peso hasta 5 % en peso de la tableta y los deslizantes pueden comprender desde 0,2 % en peso hasta 1 % en peso de la tableta.

Las tabletas generalmente contienen también lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, estearil fumarato de sodio y mezclas de estearato de magnesio con lauril sulfato de sodio. Los lubricantes comprenden generalmente desde 0,25 % en peso hasta 10 % en peso, de preferencia desde 0,5 % en peso hasta 3 % en peso de la tableta.

Otros posibles ingredientes incluyen anti-oxidantes, colorantes, agentes saborizantes, conservadores y agentes para enmascarar sabor.

Las tabletas de ejemplo contienen hasta aproximadamente 80 % en peso de fármaco, desde aproximadamente 10 % en peso hasta aproximadamente 90 % en peso de aglutinante, desde aproximadamente 0 % en peso hasta aproximadamente 85 % en peso de diluyente, desde aproximadamente 2 % en peso hasta aproximadamente 10 % en peso de desintegrante y desde aproximadamente 0,25 % en peso hasta aproximadamente 10 % en peso de lubricante.

Las mezclas de tableta se pueden comprimir directamente o mediante rodillos para formar las tabletas. Las mezclas o porciones de mezclas para tableta alternativamente pueden ser granuladas en húmedo, en seco o fundidas, congeladas en fundido o extruidas antes de comprimirse. La formulación final puede comprender una o más capas y puede recubrirse o no recubrirse; puede aún ser encapsulada.

Administración parenteral

El agonista de pan-PPAR puede administrarse también directamente a la corriente sanguínea, al músculo o a un órgano interno. Los medios adecuados para administración parenteral incluyen intravenoso, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesteARNl, intracranial, intramuscular, intrasinovial y subcutáneo. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen aguja (incluida la microaguja) inyectores, inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

Las formulaciones parenterales son típicamente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes amortiguadores (de preferencia de un pH desde 3 hasta 9), pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular más adecuadamente como una solución estéril no acuosa o como una forma seca para ser utilizada en conjunto con un vehículo adecuado tal como agua estéril, libre de pirógenos.

La preparación de formulaciones parenterales bajo condiciones estériles, por ejemplo, mediante liofilización, puede hacerse fácilmente con el uso de técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por aquellos expertos en la técnica.

La solubilidad del agonista de pan-PPAR utilizado en la preparación de soluciones parenterales puede ser incrementada mediante el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes o tecnologías de aumento de solubilidad como SMEDDS (*Self micro emulsifying drug delivery system*).

Las formulaciones para administración parenteral pueden ser formuladas para liberación de inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, en pulsos, controlada, dirigida y programada. El agonista de pan-PPAR puede ser formulado como una suspensión o como un sólido, semi-sólido o líquido tixotrópico para administración como un depósito implantado que proporciona la liberación modificada del compuesto activo. Ejemplos de tales formulaciones incluyen stents recubiertos con fármaco y semi-sólidos y suspensiones que comprenden microesferas cargadas con fármaco de ácido poli(*dl*-láctico-coglicólico) (PGLA).

Administración inhalada/intranasal

El agonista de pan-PPAR puede ser administrado también de manera intranasal o por inhalación, típicamente en la forma de un polvo seco (ya sea solo, como una mezcla, por ejemplo, en una mezcla seca con lactosa o como una

partícula de componentes mezclados, por ejemplo, mezclados con fosfolípidos, tal como fosfatidilcolina) desde un inhalador de polvo seco, como un rocío de aerosol desde un contenedor presurizado, bomba, rocío, atomizador (de preferencia un atomizador que usa la electrohidrodinámica para producir una niebla fina) o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado, tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano o como gotas nasales. Para uso intranasal, el polvo puede comprender un agente bioadhesivo, por ejemplo, quitosano o ciclodextrina.

El contenedor presurizado, bomba, rocío, atomizador o nebulizador contiene una solución o suspensión de agonista pan-PPAR que comprende, por ejemplo, etanol, etanol acuoso o un agente alternativo adecuado para dispersar, solubilizar o extender la liberación del activo, propulsor(es) como solvente y un tensoactivo opcional, tal como trioleato de sorbitán, ácido oleico o un ácido oligoláctico.

Antes de usar en un polvo seco o formulación en suspensión, el producto de fármaco se microniza hasta un tamaño adecuado para entrega por inhalación (típicamente menos de 5 micrones). Esto se puede lograr mediante cualquier método de trituración apropiado, tal como molienda de chorro en espiral, molienda de chorro de lecho fluido, procesamiento de fluido supercrítico para formar nanopartículas, homogenización a alta presión o secado por rocío.

Cápsulas (hechas, por ejemplo, a partir de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), burbujas y cartuchos para uso en un inhalador o insuflador puede ser formulados para contener una mezcla de polvos de agonista pan-PPAR, una base adecuada de polvo tal como lactosa o almidón y un modificador de desempeño tal como /-leucina, manitol o estearato de magnesio. La lactosa puede ser anhidra o en forma de monohidrato, de preferencia el último. Otros excipientes adecuados incluyen dextrano, glucosa, maltosa, sorbitol, xilitol, fructuosa, sacarosa y trehalosa.

Una formulación adecuada en solución para uso en un atomizador que usa la electrohidrodinámica para producir una niebla fina puede contener desde 1 µg hasta 20 mg de agonista pan-PPAR por actuación y el volumen de actuación puede variar desde 1 µl hasta 100 µl. Una formulación típica puede comprender el agonista de pan-PPAR, propilenglicol, agua estéril, etanol y cloruro de sodio. Solventes alternativos que pueden ser utilizados en lugar de propilenglicol incluyen glicerol y polietilenglicol.

Se pueden agregar sabores adecuados, tales como mentol y levomentol o edulcorantes, tales como sacarina o sacarina sódica, a esas formulaciones de la invención destinadas para administración inhalada/intranasal.

Las formulaciones para administración inhalada/intranasal pueden ser formuladas para liberación inmediata y/o modificada con uso de, por ejemplo, PGLA. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, en pulsos, controlada, dirigida y programada.

En el caso de inhaladores y aerosoles de polvo seco, la unidad de dosificación se determina por medio de una válvula que entrega una cantidad medida. Las unidades de acuerdo con la invención están arregladas típicamente para administrar una dosis medida o "bocanada" que contiene desde 1 g hasta 10 mg de agonista pan-PPAR. La dosis diaria global estará típicamente en el rango de 1 µg a 200 mg que puede ser administrada en una sola dosis o, más usualmente, como dosis dividida durante el día.

Administración tópica

El agonista de pan-PPAR puede ser administrado también tópicamente, (intra)dérmicamente o transdérmicamente, a la piel o la mucosa. Las formulaciones típicas para este propósito incluyen geles, hidrogeles, lociones, soluciones, cremas, ungüentos, polvos finos, vendajes, espumas, películas, parches para la piel, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendas y microemulsiónes. También se pueden usar liposomas. Los portadores típicos incluyen alcohol, agua, aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Se pueden incorporar mejoradores de penetración.

Otros medios de administración tópica incluyen la entrega por electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis y microaguja o inyección sin aguja (por ejemplo Powderject™, Bioject™, etc.).

Las formulaciones para administración tópica pueden ser formuladas para liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, en pulsos, controlada, dirigida y programada.

Las administraciones oral y parenteral son adecuadas independientemente del tipo de condición fibrótica. La administración tópica es adecuada cuando la condición fibrótica es, por ejemplo, escleroderma sistémica, administración inhalada/intranasal es adecuada cuando la condición fibrótica es, por ejemplo, fibrosis pulmonar o escleroderma sistémica.

Para administración oral, el agonista de pan-PPAR puede ser administrado a un paciente en niveles de dosificación en el rango desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 3.000 mg por día, de preferencia, desde aproximadamente 500 mg hasta aproximadamente 3.000 mg por día. La dosis total diaria puede ser administrada

en dosis solas o divididas. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede contener típicamente desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1000 mg de agonista pan-PPAR, por ejemplo 100, 200, 500, 750 o 1000 mg de agonista pan-PPAR.

Se prepararon típicamente suspensiones de agonista pan-PPAR en solución al 1 % de metilcelulosa y en 1 % metilcelulosa + 0,5 % de poloxámero. Se prepararon también cápsulas que contienen 25, 50 o 200 mg de agonista pan-PPAR. Se prepararon también IV formulaciones donde el agonista de pan-PPAR está disuelto en 30 %/70 % peso/peso de PEG400/0,05 M búfer de fosfato, pH 8 (25-100 µg/ml).

Todavía en una realización más, la cual puede combinarse con cualquiera de las realizaciones previas de cualquiera de los aspectos de la invención, el agonista de pan-PPAR es ácido 5-cloro-1-[(6-benzotiazolil)sulfonil]-1H-indol-2-butanoico (aludido también como "compuesto A"). El compuesto A y su método de preparación se describen en WO 2007/026097. Se ha encontrado que el compuesto A activa cada uno de los receptores PPARα, PPARγ y PPARδ. El compuesto A se puede utilizar en el contexto de la presente invención en la forma de una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables. El término 'solvato' se usa en la presente para describir un complejo molecular que comprende el compuesto A y una o más moléculas de solvente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, etanol. El término 'hidrato' se emplea cuando dicho solvente es agua. Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto A incluyen las sales de adición de ácido y base del mismo.

Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen las sales de acetato, adipato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonate, bisulfato/sulfato, borato, camsilato, citrato, ciclamato, edisilato, esilato, formato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenzato, hidrocloruro/cloruro, hidrobromuro/bromuro, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno fosfato/dihidrógeno fosfato, piroglutamato, sacarato, estearato, succinato, tannato, tartrato, tosilato, trifluoroacetato y xinofoato.

Las sales de bases adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen las sales de aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y zinc. Las hemisales de ácidos y bases se pueden formar también, por ejemplo, sales de hemisulfato y hemicalcio.

Se pueden preparar sales del compuesto A farmacéuticamente aceptable mediante uno o más de tres métodos:

(i) mediante reacción del compuesto con el ácido o la base deseada;
(ii) mediante remoción de un grupo protector lábil ácido o básico de un precursor adecuado del compuesto o mediante la abertura de anillo de un precursor cíclico adecuado, por ejemplo, una lactona o lactama, con el uso del ácido o base deseada; o
(iii) mediante conversión de una sal del compuesto en otra mediante reacción con un ácido o base apropiada o por medio de una columna adecuada de intercambio de iones.

Las tres reacciones se llevan a cabo típicamente en solución. La sal resultante puede precipitar y recolectarse mediante filtración o puede recuperarse por evaporación del solvente. El grado de ionización en la sal resultante puede variar desde completamente ionizada hasta casi no ionizada.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: efecto del compuesto A sobre el desarrollo de fibrosis hepática inducida con tetracloruro de carbono en ratones y comparación con agonista de PPARγ conocido

Se ha informado (Yao T y col., Am J Physiol. 1994 Sep;267(3 Pt 1):G476-84) que el tetracloruro de carbono (CCl_4) induce disfunción mitocondrial de hepatocito y tensión oxidativa en un modelo de ratón, que conduce a la deposición de colágeno y fibrosis hepática. El efecto del compuesto A y rosiglitazona, un agonista de PPARγ conocido, ha sido evaluado en consecuencia en un modelo de murino de fibrosis hepática inducida con CCl_4.

Los ratones se trataron oralmente todos los días durante 22 días con el compuesto A en dos diferentes dosis (30 y 100 mg/kg/día) y con el compuesto de referencia de PPARγ rosiglitazona a 5 mg/kg/día. Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se cultivaron muestras de plasma e hígados. Se cuantificaron la deposición de colágeno y la expresión de genes que se sabe que están involucrados en la inflamación de hígado y fibrosis y se midieron algunos biomarcadores plasmáticos relacionados.

Los ratones tratados oralmente expuestos a CCl_4 con vehículo durante 22 días mostraron una fibrosis hepática como se muestra por el incremento estadísticamente significativo de nivel de colágeno en el tejido del hígado. El tratamiento con el compuesto A redujo significativamente la fibrosis hepática en 80 % (30 mg/kg/día) y en 89 % (100 mg/kg/día), respectivamente y mejoró muchos de los marcadores relacionados. El tratamiento con rosiglitazona redujo la fibrosis hepática en 54 % solamente mientras que la mayoría de los marcadores permanecieron sin cambio

o aun empeoraron.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo con el uso de 56 ratones machos C57BL/6J (JANVIER LABS, C.S. 4105, Saint-Berthevin, Francia), con peso de 21 a 24 g al inicio del experimento. Los animales fueron alojados en grupos de 3 a 10 en jaulas de polipropileno (área del piso = 1032 cm^2) bajo condiciones estándar: temperatura ambiente (22±2 °C), higrometría (55±10 %), ciclo de luz/oscuridad (12h/12h), remplazo de aire (15 a 20 volúmenes/hora), agua y alimento (SDS, RM1) *ad libitum*. Los ratones se dejaron habituar durante por lo menos 5 días antes del experimento. Los ratones se numeraron con marcas en su cola con el uso de marcadores indelebles.

Suspensiones listas para usar de compuesto A (3 mg/mL y 10 mg/mL) y rosiglitazona (0,5 mg/mL) se almacenaron a 5±3 °C. Las formulaciones listas para usar de vehículo (metil celulosa 400 cP 1 % + 0,1 % Poloxamer 188) se almacenaron también a 5±3 °C. Se preparó tetracloruro de carbono ($CC1_4$) fresco (Sigma Chemical co, Saint Quentin Fallavier, Francia) cada día de dosificación en aceite de girasol (v/v, 1/11).

Dosificación

Los ratones se ubicaron en los siguientes grupos:

1. Aceite de girasol (dos veces a la semana durante 3 semanas, ip)/vehículo (una vez al día durante 22 días po), n=7,
2. Aceite de girasol (dos veces a la semana durante 3 semanas, ip)/compuesto A (100 mg/kg/d una vez al día durante 22 días po), n=8,
3. Aceite de girasol (dos veces a la semana durante 3 semanas, ip)/rosiglitazona (5 mg/kg/d una vez al día durante 22 días po), n=8
4. CCl_4 (3,5 mL/kg, dos veces a la semana durante 3 semanas, ip)/vehículo (una vez al día durante 22 días po), n=8,
5. $CC1_4$ (3,5 mL kg, dos veces a la semana durante 3 semanas, ip)/compuesto A (30 mg/kg/d una vez al día durante 22 días po), n=8,
6. CCl_4 (3,5 mL/kg, dos veces a la semana durante 3 semanas, ip)/compuesto A (100 mg/kg/d una vez al día durante 22 días po), n=7,
7. CCl_4 (3,5 mL/kg, dos veces a la semana durante 3 semanas, ip)/rosiglitazona (5 mg/kg/d una vez al día durante 22 días po), n=8.

Dos días a la semana durante 3 semanas, los ratones fueron administrados intraperitonealmente en la mañana con ya sea 100 µL de $CC1_4$ (3,5 mL/kg en aceite de girasol (v/v, 1/11)) o 100 µL de aceite de girasol. En paralelo, los ratones se trataron oralmente una vez al día durante 22 días (día 0 a día 21) con vehículo, compuesto A o rosiglitazona. En los días con administraciones concomitantes de vehículo, compuesto A o rosiglitazona y $CC1_4$, vehículo, compuesto A o rosiglitazona se administraron 6 horas antes de la administración de aceite de girasol o de $CC1_4$. El volumen de administración de los compuestos de prueba fue de 10 mL/kg de peso corporal para administraciones orales.

Muestreo terminal de sangre

En el día 21, 2 horas después de la dosificación, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (60 mg/kg, ip) y se recolectó sangre con el uso de punción cardíaca. La hora exacta de la dosificación y la hora de recolección de muestras se anotaron para cada animal. Las muestras de sangre (0,9 mL de sangre total) se coloraron en tubos de recolección de litio-heparina de 2 mL preenfriados. Las muestras de sangre se mezclaron suavemente, se colocaron en hielo triturado y se centrifugaron dentro de los 30 min a partir del muestreo a aproximadamente 1500 x g durante 10 min a aproximadamente +4 °C. Para cada muestra de sangre, el plasma resultante fue separado en 2 alícuotas (por lo menos 100 ih cada una) y se transfirieron con el uso de material plástico desechable en tubos de polipropileno. Las muestras fueron transferidas inmediatamente en la posición vertical a un congelador donde se mantuvieron a -20 °C.

Después del muestreo terminal de sangre, se removió el tejido del hígado:

- Una primera muestra de tejido (aproximadamente 50 mg) se cultivó y fijó con paraformaldehído y a 5±3 °C,
- Una segunda muestra de tejido (200 mg) se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -20 °C.

Parámetros medidos

Colágeno

Para la cuantificación de colágeno, se tiñeron secciones con rojo de Picro-Sirius y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer. Todas las diapositivas fueron digitalizadas y 5 campos que no se superponen de 3 secciones diferentes

se analizaron aleatoriamente por medio del software de imagen J (versión 1.42, N.I.H., USA). Para todas las diapositivas, el análisis se efectuó mediante un experimento sencillo estrictamente en las mismas condiciones.

Expresión de gen

La extracción de mARN se realizó en muestras pequeñas congeladas de hígado (50 a 100 mg). Brevemente, las muestras se molieron criogénicamente con mortero y mano de mortero. Las muestras se homogeneizaron posteriormente con el uso de bolas (2X5 mn) y 1 ml de reactivo de lisis de Qiazol (Qiagen Ref 79306) en un aparato Retsch MM300. La extracción de ARN de homogeneizados de hígado se finalizó con el paquete de lípidos de Qiagen Rneasy (Ref 74804) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN se determinó con Nanodrop (ND2000 Thermo Scientific) y la calidad de ARN se verificó con Bioanalyzer (2100 Agilent Technology).

La síntesis de cDNA cebado aleatoriamente se llevó a cabo en 100 ng de ARN total con el uso del paquete iScript (BIORAD ref 170 a 8891) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se llevó a cabo con 7,5 ng de equivalentes de ARN en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 (ABI Prism 7900 Sequence Detection System) (APPLIED BIOSYSTEMS) con el uso de Iq ITaq SYBR Green Universal Rox (Ref 1725124 Biorad) y con el uso de cebadores de QPCR dedicados. Para algunos mARN transcritos, la cuantificación se realizó con el uso de sondas TaqMan etiquetadas con el fluorocromo FAM y con el uso de Universal PCR MasterMix No AmpErase UNG (APPLIED BIOSYSTEMS ref 4324020). Los cebadores utilizados para los ensayos se enlistan en la siguiente tabla:

Nombre de blanco	Nombre de blanco completo	Nombres de cebador	Secuencias (5'-3')
RplpO	proteína ribosomal, grande, P0	Fw2Rplp0 PE Rev2Rplp0 PE	ctgatgggcaagaacaccat (SEQ ID NO:1) gtgaggtcctccttggtgaa (SEQ ID NO:2)
Tgfb1	factor de crecimineto transformante, beta 1	MTgfb1FW MTgfb1REV	accggcccttcctgctcctc (SEQ ID NO:3) gccgcacacagcagttcttc (SEQ ID NO:4)
Col1a1	colágeno, tipo 1, alfa 1	MCol1a1FW MCol1a1REV	aaaggtgctgatggttctcc (SEQ ID NO:5) gggaccgggaggaccactgg (SEQ ID NO:6)
Fn1	fibronectina 1	MFn1FW MFn1REV	gttgtctgacgctggctttaag (SEQ ID NO:7) cccacttctctccgatcttgta (SEQ ID NO:8)
Acta 2 (a-SMA)	Actina, alfa 2, músculo liso, aorta	Macta2FW Macta2REV	cagggagtaatggttggaatg (SEQ ID NO:9) tttccatgtcgtcccagttg (SEQ ID NO:10)
Ccl2 (MCP-1)	Quimiocina(motivo C C) ligando 2	MCcl2FW MCcl2REV	aggtccctgtcatgcttctg (SEQ ID NO:11) gcctactcattgggatcatc (SEQ ID NO:12)

La PCR en tiempo real se realizó en datos brutos del aparato ABI PRISM 7900 de ABI7900 se exportaron en formato de texto. El análisis se efectuó en Excel, la cantidad relativa de transcripción se calculó con el uso de el "método Delta Delta CT" (Livak y col. Methods 2001), con el uso de Rplp0 como gen constitutivo para normalización y datos medios de los animales no tratados (grupo de vehículo) como control de referencia. Cada muestra de ARN fueron transcritas inversamente y cuantificadas por triplicado.

Biomarcadores de hígado

Protocolo de extracción de proteínas de hígado:

Extracción con T-PER®: reactivo de extracción de proteínas de tejido, prod#78510 (lote: NG 174004), Thermo Scientific con: Halt Proteasa Inhibitor Single-Use Cocktail, libre de EDTA (100X) - Prod # 78425 - Lote # NL178051 Thermo Fischer.

Las muestras de hígado y sobrenadantes se mantuvieron en hielo durante todo el experimento. Para extracción, el fabricante recomienda 10 mg de tejido para 100 µl T-Per + 1 µl de "Halt-proteasa" (100X).

Se prepararon 50 ml de búfer T-Per, a los cuales se agregaron 500 µ1 de "Halt-proteasa" (100X) y la mezcla se mantuvo en hielo. Muestras de 50 a 70 mg de hígado recién descongeladas se pesaron y cortaron en piezas pequeñas y se agregó 1 ml de PBS frío para lavar el tejido. La mezcla fue centrifugada a 500 g durante 5 min a 4°C y el sobrenadante fue desechado. Se agregaron 100 µ1/10 mg de T-Per + antiproteasas (100X), se trituró el hígado con un Potter, con 5 o 6 torsiones, arriba y abajo. La mezcla fue centrifugada a 10000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se removió, se dividió en alícuotas y se mantuvo a -20 °C para la medición subsecuente de biomarcadores. Se utilizaron muestras de 10 µl para dosificar proteínas mediante la técnica BCA, después de

dilución 1/10^{avo} en H_20 mq siguiendo el procedimiento descrito en MOS: BAP-03-062-01 (paquete BCA - Paquete de ensayo de proteína de BCA Pierce - Pierce Thermo scientific, Ref: 23225).

Todas las proteínas fueron cuantificadas con paquete ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

TIMP-1: Ratón TIMP-1, R&D SYSTEMS®, Ref: TM100
TGF-β1: Quantikine Ratón/Rat/Porcine/Canine TGF-β1 immunoensayo, R&D SYSTEMS®, ref: MB100B

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Todos los parámetros fueron analizados con el uso de software Graphpad (versión 5.1). Los parámetros fueron analizados como sigue:

- Con el uso de la prueba t de estudiante para muestras independientes para comparar el grupo 1 versus el grupo 4 para validar el experimento (efecto de CCl_4),
- Con el uso de la prueba t de estudiante para muestras independientes para comparar el grupo 1 versus el grupo 2 y el grupo 1 versus el grupo 3 para investigar el efecto del compuesto A o rosiglitazona sola,
- Con el uso de ANOVA de una vía (tratamiento) para comparar el grupo 4 versus los grupos (5, 6) tratados con el compuesto A para investigar el efecto del compuesto A sobre fibrosis hepática inducida con CCl_4. Como se encontró que ANOVA fue significativa, se utilizó una prueba de Dunnett,
- Con el uso de prueba t de estudiante para muestras independientes para comparar el grupo 4 versus grupos tratados con rosiglitazona (grupo 7) para investigar el efecto de rosiglitazona en Fibrosis hepática inducida con CCl_4.

En las figuras 1 a 7, * indica un valor $p < 0,05$; ** indica un valor $p < 0,01$; *** indica un valor $p < 0,001$.

Resultados

1/ Triglicéridos en plasma

En ratones expuestos a CCl_4, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) se redujeron significativamente los triglicéridos en plasma en comparación con el vehículo ($p<0,05$ y $p<0,01$, respectivamente) mientras que la rosiglitazona incrementó los triglicéridos en plasma sin alcanzar significancia (figura 1).

2/ Deposición de colágeno

En ratones expuestos a CCl_4 el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) disminuyó significativamente lo niveles de colágeno en comparación con el vehículo (-80 %, $p<0,01$ y -89 %, $p<0,001$, respectivamente) y la rosiglitazona disminuyó significativamente los niveles de colágeno (-54 %, $p<0,05$) (figura 2).

3/ Expresión de TGFβ-1

En ratones expuestos a CCl_4, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de TGFβ-1 en comparación con el vehículo ($p<0,01$ y $p<0,001$, respectivamente) mientras que la rosiglitazona significativamente aumentó (upregulated) la expresión de TGFβ-1 ($p<0,001$) (figura 3).

4/ Expresión de colágeno tipo I, alfa I (Col1α)

En ratones expuestos a CCl_4, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de Col1α en comparación con el vehículo ($p<0,05$ y $p<0,001$, respectivamente) mientras que la rosiglitazona aumentó la expresión de Col1α sin alcanzar significancia (figura 4).

5/ Expresión de α-SMA

En ratones expuestos a CCl_4, el compuesto A (100 mg/kg/día) inhibió la expresión de *α*-SMA en comparación con el vehículo sin alcanzar significancia mientras que la rosiglitazona aumentó la expresión de *α*-SMA sin alcanzar significancia (figura 5).

6/ Expresión de MCP-1

En ratones expuestos a CCl_4, el compuesto A (100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de MCP-1 en comparación con el vehículo ($p<0,05$) mientras que la rosiglitazona no tuvo efecto (figura 6).

7/ Expresión de fibronectina

En ratones expuestos a CCl_4, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de

fibronectina en comparación con el vehículo ($p<0,001$) mientras que la rosiglitazona aumentó la expresión de fibronectina sin alcanzar significancia (figura 7).

Los resultados anteriores muestran que la administración oral de compuesto A (30 o 100 mg/kg/día) durante 22 días en el ratón macho C57BL/6J redujo la fibrosis hepática inducida con CCl_4. Un efecto dependiente de la dosis fue obtenido con el compuesto y se obsevó una disminución máxima de 90 % en niveles de colágeno con el compuesto A a 100 mg/kg/día y mejoró significativamente la mayoría de los marcadores asociados. En contraste, la rosiglitazona tvo un efecto mucho menos marcado mientras que cuando mucho no tiene efecto en otros marcadores.

Ejemplo 2: Efecto del compuesto A en el desarrollo de glomerulonefritis inducida con anti-GBM en ratones y comparación con agonistas PPARγ conocidos y con un ICE conocido.

La glomerulonefritis inducida con anti-GBM (glomerular basement membrane) en ratones es un modelo *in vivo* comúnmente utilizado para evaluar el potencial de nuevas entidades químicas contra CKD). El efecto del compuesto A, de la rosiglitazona y la pioglitazona (agonistas PPARγ conocidos) y de enzima de conversión captopril (un ICE conocido - inhibidor de la (angiotensina)), ha sido evaluado en consecuencia en tal modelo.

Los ratones fueron tratados diariamente de manera oral durante 7 días con el compuesto A en dos diferentes dosis (30 y 100 mg kg/día), con los compuestos de referencia PPARγ rosiglitazona (a 3 mg/kg/día) y pioglitazona (a 30 mg/kg/día) y con el compuesto ICE de referencia captopril a 10 mg/kg/día. Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se cultivaron muestras de plasma y riñones. La expresión de genes que son conocidos por estar implicados en CKD fue cuantificada y se midieron los niveles plasmáticos de los parámetros del riñón.

Los ratones expuestos a anti-GBM oralmente tratados con vehículo durante 7 días mostraron una glomerulonefritis y una fibrosis como se muestra por el incremento estadísticamente significativo de urea en orina, albúminauria, osteopontina de riñón, niveles de proteína MCP-1 en riñón, expresión de mARN de Col1 y Col3 en comparación con el vehículo. El tratamiento con el compuesto A a 30 y 100 mg/kg/día durante 7 días redujo la urea en orina, albúminauria, osteopontina de riñón, niveles de MCP-1 en riñón, expresión de mARN de Col1 y Col3 en comparación con el vehículo (con significancia a 100 mg/kg/día). En comparación, el captopril tuvo un efecto similar al del compuesto A en urea en orina, albúminauria, osteopontina de riñón, niveles de proteína MCP-1 en riñón, pero no redujeron significativamente la expresión de Col1 y Col3; rosiglitazona y pioglitazona, sin embargo, aumentó significativamente la osteopontina de riñón y los niveles de MCP-1 en riñón en comparación con el vehículo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo con el uso de ratones hembra C57BL/6J (CERJ janvier, camino de Chênes secs, Le Genest Saint Isle - Francia), de 8 a 10 semanas de edad en el inicio del experimento. Los animales se asignaron aleatoriamente a cajas de polipropileno (área del piso = 1032 cm^2) en grupos de 3 a 4, con base en el peso. Los ratones se marcaron individualmente en la oreja. Se dejaron habituar durante una semana antes del experimento bajo condiciones estándar: temperatura ambiente (22±2 °C), higrometría (55±10 %), ciclo de luz/oscuridad (12h/12h), remplazo de aire (15 a 20 volúmenes/hora), agua y alimento (SDS, RMl) *ad libitum*.

Suspensiones listas para usar de compuesto A (3 mg/mL y 10 mg/mL, que corresponden a una dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente) en vehículo [1 % metilcelulosa (METOLOSE SM400, 400Cps) + 0,1 % de Poloxamer 188] se almacenaron a 5 °C hasta su uso. Las suspensiones listas para usar de rosiglitazona (0,3 mg/mL, que corresponde a una dosis de 3 mg/kg) en vehículo se almacenaron a 5 °C hasta uso.

Suspensiones listas para usar de pioglitazona (3 mg/mL, que corresponde a una dosis de 30 mg/kg) en vehículo se almacenaron a 5 °C hasta su uso.

Suspensiones listas para usar de captopril (1 mg/mL, que corresponde a una dosis de 10 mg/kg) en vehículo se almacenaron a 5 °C hasta su uso.

La preparación de anticuerpo IgG de oveja (ab37385, Abcam) se llevó a cabo a 4 °C en hielo. El anticuerpo se disolvió en suero fisiológico para obtener una solución de 4 mg/ml. Por separado, se homogeneizó adyuvante de Freund completo (CFA) con un vórtice. Una jeringa de bloqueo luer de 5 ml se llenó con 2,5 ml de CFA. Otra jeringa de bloqueo luer de 5 ml se llenó con 2,5 ml de solución de IgG de oveja. Ambas jeringas se conectaron con una aguja para micro emulsión teniendo cuidado de remover todas las burbujas de aire. La solución de IgG de oveja se pasó en CFA. La mezcla entre las dos jeringas fue forzada repetidamente durante 5 minutos hasta que sae observó un incremento notable de resistencia. La aguja para micro emulsión fue remplazada entonces por un acoplador inox luer hembra/luer hembra. La mezcla entre las dos jeringas se forzó otra vez durante unos pocos minutos. La tensión superficial del agua se probó entonces. Se llenaron jeringas de bloqueo luer de 1 ml, teniendo cuidado de remover las burbujas de aire. Una aguja de 23G fue agregada a las jeringas que se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Se almacenó suero de glomérulos anti-rata de oveja (GBM) ((PTX-001S, Probetex) a 5 °C hasta su uso.

Dosificación

Los ratones se ubicaron en los siguientes grupos:

Grupo	Número de ratones	Emulsión de inmunización IgG/HR37Ra de oveja	Anticuerpo anti-GBM de reto	Tratamiento
1	10	200 µg/500 µg	no	Vehículo
2	10		300 µl	Vehículo
3	10			Captopril 10 mg/kg
4	10			Rosiglitazona 3 mg/kg
5	10			Pioglitazona 30 mg/kg
6	10			Compuesto A 30 mg/kg
7	10			Compuesto A 100 mg/kg

5 días antes de la administración de anticuerpo anti-GBM, los animales fueron inmunizados mediante inyección subcutánea en tres sitios (una sobre cada cadera y una en la nuca del cuello) de 100 µl de emulsión de IgG/CFA de oveja (200 µg de IgG/500 µg de oveja de Mycobacterium tuberculosis H37Ra), bajo anestesia de O_2/isoflurano (IL/3 %).

En el día 0, los ratones fueron pesados y colocados bajo una rampa de lámpara de calor durante aproximadamente 20 a 30 minutos para permitir la vasodilatación de las venas caudales y mejor visibilidad para inyección. Cada animal fue restringido en un como de inyección. A los ratones se les dio una inyección intravenosa de 300 µl de suero de anticuerpo anti-GBM. Después los ratones fueron administrados oralmente con el compuesto A, rosiglitazona, pioglitazona y captopril y el tratamiento se continuó una vez al día (en la mañana) durante 7 días adicionales. Los ratones se pesaron aproximadamente cada tercer día.

En el día 6 los ratones se pesaron y transfirieron a una caja de diuresis donde donde permanecieron durante 24 h. Se pesaron baberos antes y después de diuresis con el fin de medir la cantidad de agua tomada. En el día 7 los ratones se pesaron, recibieron tratamiento oral y se regresaron a su caja inicial. Se recolectaron las orinas, se centrifugaron, se midieron y se congelaron varias alícuotas a -80 °C para ensayos subsecuentes (urea, creatinina, albúmina...).

En la tarde del día 7 los ratones fueron anestesiados con una mezcla de O_2/isoflurano (IL/3 %) y se realizó un muestreo de sangre, en el seno retroorbitario, con una pipeta Pasteur. 400 µl de sangre entera fueron transferidos a un microtubo seco. Los sueros fueron obtenidos después de 30 min de coagulación y 2 centrifugaciones a 6000 rpm durante 15 minutos, a 4 °C. Los sueros fueron divididos en alícuotas y congelados a -80 °C para ensayos subsecuentes (urea, creatinina, proteínas, adiponectina). Después, los ratones fueron sometidos a eutanasia mediante dislocación cervical y los riñones se cultivaron y se pesaron. El córtex de un riñón por ratón fue aislado. Se mantuvieron pieza pequeñas para análisis de expresión de ARN subsecuente como se detalla más adelante. El resto fue congelado directamente en nitrógeno líquido para ensayos subsecuentes (TGFbeta-1, OPN, MCP-1...). Del riñón restante, una mitad se colocó en un individual casete histológico en formalina amortiguada al 10 % durante 24 horas para análisis histológico.

Parámetros medidos

Expresión de gen

Se realizó la extracción de mARN en muestras pequeñas congeladas de riñón (50 a 100 mg). Brevemente, las muestras se molieron criogénicamente con mortero y mano de mortero. Las muestras se homogeneizaron posteriormente con el uso de bolas (2X5mn) y 1 ml de reactivo de lisis de Qiazol (Qiagen Ref 79306) en un aparato Retsch MM300. La extracción de ARN de homogeneizados de riñón se finalizó con el paquete de lípidos de Qiagen Rneasy (Ref 74804) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN se determinó con

Nanodrop (ND2000 Thermo Scientific) y la calidad de ARN se verificó con Bioanalyzer (2100 Agilent Technology).

La síntesis de cDNA cebado se llevó a cabo aleatoriamente en 100 ng de ARN total con el uso del paquete iScript (BIORAD ref 170 a 8891) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se llevó a cabo con 7,5 ng de equivalentes de ARN en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 (ABI Prism 7900 Sequence Detection System) (APPLIED BIOSYSTEMS) con el uso de Iq ITaq SYBR Green Universal Rox (Ref 1725124 Biorad) y con el uso de cebadores de QPCR dedicados. Para algunos mARN transcritos, la cuantificación se realizó con el uso de sondas TaqMan etiquetadas con el fluorocromo FAM y con el uso de Universal PCR MasterMix No AmpErase UNG (APPLIED BIOSYSTEMS ref 4324020). Los cebadores utilizados para los ensayos se enlistan en la siguiente tabla:

Nombre de blanco	Nombre de blanco completo	Nombres de cebador	Secuencias (5'-3')
RplpO	proteína ribosomal, grande, PO	Fw2Rplp0 PE Rev2Rplp0 PE	ctgatgggcaagaacaccat (SEQ ID NO:1) gtgaggtcctccttggtgaa (SEQ ID NO:2)
Tgfbr1	factor de crecimiento transformante, beta receptor I	MTgfbr1FW MTgfbr1REV	ggtcttgcccatcttcacat (SEQ ID NO:13) caacaggttccatttttcttca (SEQ ID NO:14)
Col1a1	colágeno, tipo I, alfa 1	MCol1a1FW MCol1a1REV	aaaggtgctgatggttctcc (SEQ ID NO:5) gggaccgggaggaccactgg (SEQ ID NO: 6)
Col3a1	colágeno, tipo III, alfa 1	MCol3a1FW MCol3a1REV	gggatcaaatgaaggcgaat (SEQ ID NO: 15) tgggtagtctcattgccttgc (SEQ ID NO:16)

La PCR en tiempo real se realizó sobre datos brutos del aparato ABI PRISM 7900 de ABI7900 fueron exportados en formato de texto. El análisis se efectuó en Excel, la cantidad relativa de transcripción se calculó con el uso del "Método Delta Delta CT" (Livak y col. Methods 2001), con el uso de Rplp0 como gen constitutivo para normalización y datos medios de los animales no tratados (grupo de vehículo) como control de referencia. Cada muestra de ARN fue transcrita inversamente y cuantificada por triplicado.

Orina, plasma y biomarcadores de riñón

Los ensayos de suero y orina (urea, creatinina, albúmina y proteínas) se llevaron a cabo con un aparato Konelab y pruebas colorimétricas correspondientes.

La micro-albúminauria se ensayó con un paquete fluorescente: ensayo fluorescente azul de albúmina (Active Motif, Ref: 15002).

Todas las proteínas de riñón fueron cuantificadas con el paquete ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

- Osteopontina: inmunoensayo de osteopontina de ratón Quantikine (Inmunoensayo Quantikine para osteopontina en ratón), R&D SYSTEMS®, Ref:MOST00

- MCP-1: Paquete ELISA Quantikine Ratón CCL2/JE/MCP-1, R&D SYSTEMS®, ref: MJE00

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Todos los parámetros fueron analizados con el uso de software Graphpad (versión 5.1). Los parámetros fueron analizados con el uso de ANOVA de una vía (tratamiento) para comparar grupos (1, 2, 3 4, 5, 6 y 7). Cuando ANOVA se encontró significativo, se utilizó una prueba de Dunnett para comparar el grupo 2 con todos los otros grupos.

En las figuras 8 a 16, * indica un valor $p<0,05$; ** indica un valor $p<0,01$; *** indica un valor $p<0,001$.

Resultados

1/ Urea en suero

En ratones expuestos anti-GBM, el compuesto A (100 mg/kg/día) redujo significativamente los niveles de urea en comparación con el vehículo ($p<0,01$) mientras que el captopril redujo el nivel de urea sin alcanzar significancia y tanto la rosiglitazona como la pioglitazona incrementaron los niveles de urea sin alcanzar significancia (figura 8).

2/ Volumen de orina

En ratones expuestos anti-GBM, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) redujo el volumen de orina en comparación con el vehículo sin alcanzar significancia, mientras que el captopril también redujo el volumen de orina sin alcanzar significancia y la rosiglitazona y la pioglitazona incrementaron cada una la albúmina en orina sin alcanzar significancia (figura 9).

3/ Albúmina en orina

En ratones expuestos anti-GBM, el compuesto A (100 mg/kg/día) redujo los niveles de albúmina en comparación con el vehículo sin alcanzar significancia, mientras que el captopril también redujo los niveles de albúmina sin alcanzar significancia, la rosiglitazona incrementó los niveles de albúmina sin alcanzar significancia y la pioglitazona aumentó significativamente los niveles de albúmina ($p<0,001$) (figura 10).

4/ Osteopontina de riñón

En ratones expuestos anti-GBM, el compuesto A (100 mg/kg/día) redujo significativamente los niveles de osteopontina en comparación con el vehículo ($p<0,05$), mientras que el captopril también redujo significativamente los niveles de osteopontina ($p<0,05$) y la rosiglitazona y la pioglitazona aumentaron cada una significativamente los niveles de osteopontina ($p<0,01$ y $p<0,05$, respectivamente) (figura 11).

5/ MCP-1 en riñón

En ratones expuestos anti-GBM, el compuesto A (100 mg/kg/día) redujo significativamente los niveles de MCP-1 en comparación con el vehículo ($p<0,001$), mientras que el captopril redujo también significativamente los niveles de MCP-1 ($p<0,01$) y la rosiglitazona y la pioglitazona aumentaron cada una significativamente los niveles de MCP-1 ($p<0,05$) (figura 12).

6/ Expresión de TGFβR-1

En ratones expuestos anti-GBM, el compuesto A (100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de TGFβR-1 en comparación con el vehículo ($p<0,01$), mientras que el captopril no tuvo efecto en la expresión de TGFβ-R1 y la rosiglitazona y la pioglitazona aumentaron cada una la expresión de TGFβR-1 sin alcanzar significancia, (figura 13).

7/ Expresión de colágeno tipo I, alfa I (Col1a)

En ratones expuestos anti-GBM, el compuesto A (100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de Col1a en comparación con el vehículo ($p<0,01$), mientras que el captopril no tuvo efecto en la expresión de Col1a y la rosiglitazona y la pioglitazona aumentaron cada una significativamente la expresión de Col1a ($p<0,001$) (figura 14).

8/ Expresión de colágeno tipo III, alfa I (Col3a)

En ratones expuestos anti-GBM, el compuesto A (100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de Col3a en comparación con el vehículo ($p<0,001$), mientras que el captopril no tuvo efecto en la expresión de Col3a, la rosiglitazona aumentó significativamente la expresión de Col3a ($p<0,05$) y la pioglitazona aumentó la expresión de Col3a sin alcanzar significancia (figura 15).

9/ Glomérulos patológicos

En ratones expuestos anti-GBM, el compuesto A (100 mg kg/día) redujo significativamente el número de glomérulos patológicos ($p<0,001$) (figura 16).

Ejemplo 3: efecto del compuesto A en el desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones y comparación con un agonista de PPARγ conocido

La fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones es un modelo *in vivo* comúnmente utilizado para evaluar el potencial anti-fibrótico de nuevas entidades químicas (Corbel y col., 2001; Manoury y col., 2006). El efecto del compuesto A y la rosiglitazona, un agonista de PPARγ conocido, en consecuencia ha sido evaluado en tal modelo. Se ha seleccionado el ratón C57BL/6J para evaluar los efectos de los compuestos de prueba puesto que es propenso a desarrollar una respuesta inflamatoria temprana seguida por remodelado fibrótico en pulmón después de la administración de bleomicina.

Los ratones fueron tratados diariamente de manera oral durante 15 días con el compuesto A en dos diferentes dosis (30 y 100 mg/kg/día) y con rosiglitazona a 5 mg/kg/día. Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se cultivaron muestras de plasma e hígados. La expresión de genes que se sabe que están implicados en el proceso de inflamación pulmonar se cuantificó y se midieron los niveles plasmáticos de los parámetros de pulmón.

Los ratones tratados oralmente expuestos a bleomicina con vehículo durante 15 días mostraron una fibrosis pulmonar como se muestra mediante el incremento estadísticamente significativo de osteopontina en pulmón, MCP-1 de pulmón y niveles de TIMP-1 en pulmón. El tratamiento con el compuesto A a 30 y 100 mg/kg/día durante 15 días redujo significativamente los niveles de TIMP-1 en pulmón en comparación con el vehículo; los niveles de MCP-1 de pulmón y osteopontina fueron reducidos también en comparación con el vehículo sin alcanzar significado estadístico. En contraste, cuando los ratones expuestos a bleomicina fueron tratados diariamente de manera oral con rosiglitazona con 5 mg/kg/día durante 15 días, la osteopontina en pulmón, MCP-1 de pulmón y niveles de TIMP-1 en pulmón se incrementaron en comparación con el vehículo sin alcanzar significado estadístico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo con el uso de 77 ratones machos C57BL/6J (JANVIER LABS, C.S. 4105, Saint-Berthevin F-53 41, Francia), con peso de 20 a 25 g en el inicio del experimento. Los animales fueron alojados en grupos de 3 a 10 en jaulas de polipropileno (área del piso = 1032 cm^2) bajo condiciones estándar: temperatura ambiente (22±2 °C), higrometría (55±10 %), ciclo de luz/oscuridad (12h/12h), remplazo de aire (15 a 20 volúmenes/hora), agua y alimento (SDS, RM1) *ad libitum*. Los ratones se dejaron para que se acomodaran ellos mismos durante por lo menos 5 días antes del experimento. Los ratones se numeraron con marcas en su cola con el uso de marcadores indelebles.

El compuesto A (3 mg/mL y 10 mg/mL) y la rosiglitazona (0,5 mg/mL) fueron formulados en metilcelulosa al 1 % (METOLOSE SM400, 400 Cps) + Poloxamer 188 al 0,1 % como suspensiones listas para usar y almacenadas a 5±3 °C durante el estudio. Se utilizaron metilcelulosa al 1 % (METOLOSE SM400, 400Cps) + Poloxamer 188 al 0,1 % como vehículo y se almacenaron a 5±3 °C durante el estudio. Se disolvió bleomicina (Laboratoire Bellon) en NaCl al 0,9 % (CDM Lavoisier, Francia) justo antes de usar.

Dosificación

Los ratones se distribuyeron en los siguientes grupos:

1. 0,9 % NaCl + vehículo (una vez al día durante 15 días po), n=11,
2. 0,9 % NaCl + compuesto A (100 mg/kg/día una vez al día durante 15 días po), n=11,
3. 0,9 % NaCl + rosiglitazona (5 mg kg/día una vez al día durante 15 días po), n=11,
4. bleomicina (0,3 mg) + vehículo (una vez al día durante 15 días po), n=10,
5. bleomicina (0,3 mg) + compuesto A (30 mg/kg/día una vez al día durante 15 días po), n=9,
6. bleomicina (0,3 mg) + compuesto A (100 mg/kg/día una vez al día durante 15 días po), n=7,
7. bleomicina (0,3 mg) + rosiglitazona (5 mg/kg/día una vez al día durante 15 días po), n=6.

En el día 1, los ratones se anestesiaron con etomidato (15 a 20 mg/kg, ip) y después se les administró intranasalmente sulfato de bleomicina (0,3 mg (300 IU) en 0,9 % NaCl (50 µL/ratón (25 µL/fosa nasal)) o con 0,9 % NaCl (50 µL/ratón (25 µL/fosa nasal)). Los ratones se trataron oralmente una vez al día durante 15 días (día 0 a día 14) con vehículo, compuesto A o rosiglitazona. La administración de vehículo, compuesto A o rosiglitazona en el día 1 se realizó 6 horas antes de la administración de 0,9 % NaCl o bleomicina. El volumen de administración de los compuestos de prueba fue de 10 mL/kg de peso corporal para administraciones orales.

Muestreo terminal de sangre

En el día 14, 2 horas después de la dosificación, los animales se anestesiaron con pentobarbital (60 mg/kg, ip) y se recolectó sangre con el uso de punción cardíaca. La hora exacta de la dosificación y la hora de recolección de muestras se anotaron para cada animal. El muestreo de sangre (0,9 mL de sangre total) se colocó en tubos de recolección de litio-heparina de 2 mL preenfriados. Las muestras de sangre se mezclaron suavemente, se colocaron en hielo triturado y se centrifugaron dentro de los 30 min a partir del muestreo a aproximadamente 1500 x g durante 10 min a aproximadamente +4 °C. Para cada muestreo de sangre, el plasma resultante fue separado en 2 alícuotas (por lo menos 100 µL, cada una) y se transfirieron con el uso de material plástico desechable a tubos de polipropileno. Las muestras fueron transferidas inmediatamente en la posición vertical a un congelador donde se mantuvieron a -20 °C.

Extirpación de pulmón

Después del muestreo terminal de sangre, se extirpó el tejido del pulmón:

- Una primera muestra de tejido (lóbulo medio) se cultivó y se fijó con paraformaldehído y se mantuvo a 5±3 °C.
- Una segunda muestra de tejido (lóbulo derecho) se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a - 20 °C.

Parámetros medidos

Colágeno

Para la cuantificación de colágeno, se tiñeron secciones con rojo Picro-Sirius y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer. Todas las diapositivas fueron digitalizadas y 5 campos que no se superponen de 3 secciones diferentes se analizaron aleatoriamente por medio del software de imagen J (versión 1.42, N.I.H., USA). Para todas las diapositivas, el análisis se efectuó mediante un experimento sencillo estrictamente en las mismas condiciones.

Expresión de gen

La extracción de mARN se realizó en pequeñas muestras congeladas de pulmón (50 a 100 mg). Brevemente, las muestras se molieron criogénicamente con mortero y mano de mortero. Las muestras se homogeneizaron posteriormente con el uso de bolas (2X5mn) y 1 ml de reactivo de lisis de Qiazol (Qiagen Ref 79306) en un aparato Retsch MM300. La extracción de ARN de homogeneizados de pulmón se finalizó con el paquete de lípidos de Qiagen Rneasy (Ref 74804) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN se determinó con Nanodrop (ND2000 Thermo Scientific) y la calidad de ARN se verificó con Bioanalyzer (2100 Agilent Technology).

La síntesis de cDNA cebado aleatoriamente se llevó a cabo en 100 ng de ARN total con el uso del paquete iScript (BIORAD ref 170 a 8891) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se llevó a cabo con 7,5 ng de equivalentes de ARN en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 (ABI Prism 7900 Sequence Detection System) (APPLIED BIOSISTEMAS) con el uso de Iq ITaq SYBR Green Universal Rox (Ref 1725124 Biorad) y con el uso de cebadores de QPCR dedicados. Para algunos mARN transcritos, la cuantificación se realizó con el uso de sondas TaqMan etiquetadas con el fluorocromo FAM y con el uso de Universal PCR MasterMix No AmpErase UNG (APPLIED BIOSISTEMAS ref 4324020). Los cebadores y la sonda utilizados para los ensayos se enumeran en la siguiente tabla:

Nombre de blanco	Nombre de blanco completo	Nombres de cebador	Secuencias (5'-3')
RplpO	proteína ribosomal, grande, P0	Fw2Rplp0 PE Rev2Rplp0 PE	ctgatgggcaagaacaccat (SEQ ID NO:1) gtgaggtcctccttggtgaa (SEQ ID NO:2)
Tgfbr1	factor de crecimiento transformante, beta receptor I	MTgfbr1FW MTgfbr1REV	ggtcttgcccatcttcacat (SEO ID NO: 13) caacaggttccatttttcttca (SEO ID NO:14)
Col1a1	colágeno, tipo I, alfa 1	MCol1a1FW MCol1a1REV	aaaggtgctgatggttctcc (SEO ID NO:5) gggaccgggaggaccactgg (SEO ID NO:6)
Col3a1	colágeno, tipo III, alfa 1	MCol3a1FW MCol3a1REV	gggatcaaatgaaggcgaat (SEQ ID NO:15) tgggtagtctcattgccttgc (SEQ ID NO:16)
Spp1 (Osteopontina)	fosfoproteína secretada 1	MSpp1FW MSpp1REV	ctccaatcgtccctacagtc (SEQ ID NO:17) ggtcctcatctgtggcatca (SEQ ID NO:18)
Ccl2 (MCP-1)	quimiocina (motivo C-C) ligando 2	MCcl2FW MCcl2REV	aggtccctgtcatgcttctg (SEQ ID NO: 11) gcctactcattgggatcatc (SEQ ID NO:12)
Fn1	fibronectina 1	MFn1FW MFn1REV	gttgtctgacgctggctttaag (SEQ ID NO:19) cccacttctctccgatcttgta (SEQ ID NO:20)

Nombre de blanco	Nombre de blanco completo	Assay ID_probe Taqman
Timp-1	Inhibidor de metalopeptidasa TIMP	MmO1341361_m1

La PCR en tiempo real se realizó con datos brutos del aparato ABI PRISM 7900 de ABI7900 se exportaron en formato de texto. El análisis se efectuó en Excel, la cantidad relativa de transcripción se calculó con el uso del "Método Delta Delta CT" (Livak y col. Methods 2001), con el uso de Rplp0 como gen constitutivo para normalización y datos medios de los animales no tratados (grupo de vehículo) como control de referencia. Cada muestra de ARN fue transcrita inversamente y cuantificada por triplicado.

Biomarcadores de proteína de pulmón

Protocolo de extracción de proteínas de pulmón:

Extracción con T-PER®: Reactivo de extracción de proteínas de tejido, prod#78510 (lote: NG 174004), Thermo Scientific con: cóctel de un solo uso de inhibidor de Halt Proteasa, libre de EDTA (100X) - Prod # 78425 - Lote # NL178051 Thermo Fischer.

Las muestras de pulmón y sobrenadantes se mantuvieron en hielo durante todo el experimento. Para la extracción, el fabricante recomienda 10 mg de tejido para 100 µl de T-Per + 1 µl de "Halt-proteasa" (100X).

Se prepararon 50 ml de búfer T-Per, a los cuales se agregaron 500 µ1 de "Halt-proteasa" (100X) y la mezcla se mantuvo en hielo. Las muestras de 50 a 70 mg de pulmón recién descongeladas se pesaron y se cortaron en piezas pequeñas y se agregó 1 ml de PBS frío para lavar el tejido. La mezcla fue centrifugada a 500 g durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante fue desechado. Se agregaron 100 µl/10 mg de T-Per + antiproteasas (100X), se trituró el pulmón con un Potter, con 5 o 6 torsiones, arriba y abajo. La mezcla fue centrifugada a 10000 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se removió, se dividió en alícuotas y se mantuvo a -20 °C para la medición subsecuente de biomarcadores. Las muestras de 10 µl se utilizaron para dosificar proteínas mediante la técnica BCA, después de dilución $1/10^{imo}$ en H_2O mq siguiendo el procedimiento descrito en MOS: BAP-03-062-01 (Kit BCA - Paquete de ensayo de proteína de Pierce BCA - Pierce Thermo scientific, Ref: 23225).

Todas las proteínas fueron cuantificadas con el paquete ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

- osteopontina: Inmunoensayo Quantikine para osteopontina en ratón, R&D SYSTEMS®, Ref :MOST00
- MCP-1: Paquete ELISA Quantikine para CCL2/JE/MCP-1 de ratón, R&D SIYTEMS®, ref: MJE00
- TIMP-1: TIMP-1 en ratón, R&D SYSTEMS®, Ref: TM100.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Todos los parámetros fueron analizados con el uso de software Graphpad (versión 5.1). Los parámetros fueron analizados como sigue:

- Con el uso de ANOVA de una vía (tratamiento) para comparar grupos (1, 2 y 3). Cuando se encontró que ANOVA era significativa, se utilizó una prueba de Dunnett para comparar el grupo 1 con el grupo 2 y con el grupo 3.
- Con el uso de ANOVA de una vía (tratamiento) para comparar grupos (1, 4, 5, 6 y 7). Cuando se encontró que ANOVA era significativa, se utilizó una prueba de Dunnett para comparar el grupo 1 con el grupo 4, con el grupo 5, con el grupo 6 y con el grupo 7).

En las figuras 17 a 27, * indica un valor p<0,05; ** indica un valor p<0,01; *** indica un valor p<0,001.

RESULTADOS

1/ Deposición de colágeno

En ratones expuestos a bleomicina el compuesto A (100 mg/kg/día) disminuyó significativamente la deposición de niveles de colágeno en comparación con el vehículo (p<0,05), la rosiglitazona también disminuyó significativamente los niveles de colágeno (p<0,05) (figura 17).

2/ TIMP-1 en pulmón

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) redujo significativamente los niveles de TIMP-1 en comparación con el vehículo (p<0,05) mientras que la rosiglitazona incrementó los niveles de TIMP-1 sin alcanzar significancia (figura 18).

3/ MCP-1 en pulmón

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) redujo los niveles de MCP-1 en comparación con el vehículo sin alcanzar significancia mientras que la rosiglitazona incrementó los niveles de MCP-1 sin alcanzar significancia (figura 19).

4/ Osteopontina en pulmón

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) redujo los niveles de osteopontina en comparación con el vehículo sin alcanzar significancia mientras que la rosiglitazona incrementó los niveles de osteopontina sin alcanzar significancia (figura 20).

5/ Expresión de TGFβR-1

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de TGFβR-1 en comparación con el vehículo ($p<0,05$). La rosiglitazona también inhibió significativamente la expresión de TGFβ-1 ($p<0,05$) (figura 21).

6/ Expresión de colágeno tipo I, alfa I (Col1a)

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de Col1a en comparación con el vehículo ($p<0,001$) mientras que la rosiglitazona aumentó la expresión de Col1a sin alcanzar significancia (figura 22).

7/ Expresión de colágeno tipo III, alfa I (Col3a)

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de Col3a en comparación con el vehículo ($p<0,001$) mientras que la rosiglitazona inhibió la expresión de Col3a sin alcanzar significancia (figura 23).

8/ Expresión de TIMP-1

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) inhibió la expresión de TIMP-1 en comparación con el vehículo sin alcanzar significancia mientras que la rosiglitazona significativamente aumentó la expresión de TIMP-1 ($p<0,05$) (figura 24).

9/ Expresión de MCP-1

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (30 y 100 mg/kg día) inhibió la expresión de MCP-1 en comparación con el vehículo sin alcanzar significancia mientras que la rosiglitazona aumentó la expresión de TIMP-1 sin alcanzar significancia (figura 25).

10/ Expresión de osteopontina

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (30 y 100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de osteopontina en comparación con el vehículo ($p<0,05$) mientras que la rosiglitazona no tuvo efecto sobre la osteopontina (figura 26).

11/ Expresión de fibronectina

En ratones expuestos a bleomicina, el compuesto A (100 mg/kg/día) inhibió significativamente la expresión de fibronectina en comparación con el vehículo ($p<0,05$) mientras que la rosiglitazona aumentó la expresión de fibronectina sin alcanzar significancia (figura 27).

Los resultados anteriores muestran que la administración oral de compuesto A (30 o 100 mg/kg/día) a ratones machos C57BL/6J redujo el incremento de niveles inflamatorio/fibrótico de los biomarcadores inducidos por instilación de bleomicina en pulmón mientras que la rosiglitazona no tuvo efecto o incluso un efecto perjudicial en estos biomarcadores. Tomados conjuntamente, estos datos muestran que el compuesto A redujo la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones.

Ejemplo 4: efecto del compuesto A en el desarrollo de fibrosis de piel en ratones inducida por bleomicina y comparación con un agonista de PPARγ conocido

El compuesto A fue probado en un modelo de murino de fibrosis de piel inducida por bleomicina. Los ratones fueron tratados diariamente de manera oral durante 21 días con el compuesto A en dos diferentes dosis (30 y 100 mg/kg/día) y con el compuesto de referencia PPARγ rosiglitazona a 5 mg/kg/día. Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de piel. La expresión de genes que es conocida por estar implicada en la trayectoria de la fibrosis sistémica fue cuantificada y se determinaron el espesor dérmico y contenido de colágeno.

Los ratones tratados oralmente expuestos a bleomicina con vehículo durante 21 días mostró fibrosis de piel como se muestra por el incremento estadísticamente significativo de espesor dérmico y el contenido de colágeno. El tratamiento con el compuesto A a 30 y 100 mg/kg/día durante 21 días redujo significativamente el espesor dérmico y el contenido de colágeno en comparación con el vehículo. Un efecto similar fue observado en ratones expuestos a bleomicina tratados diariamente de manera oral con rosiglitazona a 5 mg/kg/día durante 21 días, aunque el efecto fue menos marcado con respecto al espesor dérmico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones machos C56BL/6 de 6 semanas de edad (Janvier, Le Genest-Saint-

Isle, Francia). Los animales fueron alojados en grupos de 3 a 10 en jaulas de polipropileno (área del piso = 1032 cm^2) bajo condiciones estándar: temperatura ambiente (22±2 °C), higrometría (55±10 %), ciclo de luz/oscuridad (12h/12h), remplazo de aire (15 a 20 volúmenes/hora), agua y alimento (SDS, RM1) *ad libitum*. Los ratones se dejaron que se acomodaran ellos mismos durante por lo menos 5 días antes del experimento. Los ratones se numeraron con marcas en su cola con el uso de marcadores indelebles.

El compuesto A (3 mg/mL y 10 mg/mL) y la rosiglitazona (0,5 mg/mL) fueron formulados en 1 % metilcelulosa (METOLOSE SM400, 400Cps) + 0,1 % Poloxamer 188 como suspensiones listas para usar y se almacenaron a 5±3 °C durante el estudio. Se utilizaron 1 % metilcelulosa (METOLOSE SM400, 400Cps) + 0,1 % Poloxamer 188 como vehículo y se almacenaron a 5±3 °C durante el estudio.

Dosificación

Los ratones se distribuyeron en los siguientes grupos:

1. 0,9 % NaCl + vehículo (una vez al día durante 21 días po), n=7,
2. 0,9 % NaCl + compuesto A (100 mg/kg/día una vez al día durante 21 días po), n=8,
3. 0,9 % NaCl + compuesto A (30 mg/kg/día una vez al día durante 21 días po), n=8,
4. bleomicina (0,3 mg) + rosiglitazona (5 mg/kg/día una vez al día durante 21 días po), n=8,
5. bleomicina (0,3 mg) + vehículo (una vez al día durante 21 días po), n=6,
6. bleomicina (0,3 mg) + compuesto A (100 mg/kg día una vez al día durante 21 días po), n=7,
7. bleomicina (0,3 mg) + compuesto A (30 mg/kg/día una vez al día durante 21 días po),

La fibrosis de piel fue inducida mediante inyecciones diarias de bleomicina (100 µL de bleomicina (Laboratoire Bellon, Francia) disuelta en 0,9 % NaCl (CDM Lavoisier, Francia) a una concentración de 0,5 mg/ml, administrada 6 días/semana en áreas definidas de 1 cm^2 en la espalda superior). Se utilizó 0,9 % NaCl como control (inyecciones subcutáneas de 100 µL).

Los ratones se trataron oralmente una vez al día durante 21 días con vehículo, compuesto A o rosiglitazona. La administración del vehículo, compuesto A o rosiglitazona en el día 1 se realizó 4 horas antes de la administración de 0,9 % NaCl o bleomicina.

Muestreo de piel

En el día 21, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se tomaron muestras de piel y se procesaron para análisis.

Parámetros medidos:

Espesor de capa dérmica y adiposa

Se extirparon las áreas de piel lesionadas, se fijaron en 4 % formalina y se empotraron en parafina. Secciones de cinco µm de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina. El espesor dérmico se analizó en amplificación de 100 veces mediante medición de la distancia entre la junta epidérmica-dérmica y la junta dérmica-grasa subcutánea en cuatro sitios de la piel lesionada de cada ratón. Dos examinadores independientes realizaron la evaluación antes de un consenso en case de más de 10 % de variabilidad de las medidas.

Contenido de colágeno de la piel

Ensayo de hidroxiprolina

El contenido de colágeno en muestras de piel lesionada se exploró mediante ensayo de hidroxiprolina. Después de digestión de biopsias con punzón (Ø 3 mm) en HCl 6M durante tres horas a 120 °C, el pH de las muestras se ajustó a 7 con NaOH 6M. Después, las muestras se mezclaron con cloramina T 0,06M y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. En seguida, se agregaron ácido perclórico 3,15M y p-dimetilaminobenzaldehído al 20 % y las muestras se incubaron durante un adicional de 20 min a 60 °C. La absorbancia se determinó a 557 nm con un espectrofotómetro de microplaca Spectra MAX 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Ensayo Sircol

El colágeno soluble total en sobrenadantes de cultivo de células se cuantificó con el uso de un ensayo Sircol de colágeno (Biocolor). Brevemente, sobrenadante de cultivo celular se mecló con colorante rojo sirius durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugación, la granza se disolvió en reactivo alcalino. La medición se realizó con el uso de un espectrofotómetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) a una longitud de onda de 540 nm.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los datos se expresaron como media ± error estándar de la media. La prueba Student t se utilizó para análisis estadístico. Un valor p de menos de 0,05 fue considerado como un resultado estadísticamente significativo.

En las figuras 28 a 30, * indica un valor p<0,05; ** indica un valor p<0,01; *** indica un valor p <0,001.

Resultados

La inyección de bleomicina en ratones resultó en un incremento de espesor dérmico en comparación con ratones que recibieron NaCl (ver figura 28: incremento de 57 % en el grupo bleomicina + vehículo en comparación con el grupo NaCl + vehículo). La rosiglitazona y el compuesto A (30 mg/kg) redujeron significativamente el espesor dérmico en ratones expuestos a bleomicina en comparación con el vehículo (p<0,05). El compuesto A (100 mg/kg) redujo más significativamente el espesor dérmico en ratones expuestos a bleomicina en comparación con el vehículo (p<0,001).

Consistente con el espesor dérmico reducido, el contenido de hidroxiprolina en piel lesionada de ratones tratados con el compuesto A (30 y 100 mg/kg) y rosiglitazona fue significativamente menor que en piel lesionada de ratones tratados con el vehículo, el compuesto A (30 mg/kg) que es más eficiente que la rosiglitazona (figura 29).

El compuesto A (30 y 100 mg/kg) y la rosiglitazona también redujeron significativamente el contenido de colágeno en comparación con el vehículo (figura 30).

En conjunto estos resultados muestran que el compuesto A es eficiente para prevenir la fibrosis de piel. El compuesto A (100 mg/kg) ejerce incluso mejores efectos en al espesor dérmico en comparación con rosiglitazona.

Ejemplo 5: activación de receptores de PPAR humano y de murino por el compuesto A

La habilidad del compuesto A para activar los tres subtipos de receptores de PPAR se determinó mediante ensayos de transactivación transiente. Estos ensayos con base en células se llevaron a cabo con el uso de células Cos-7 transfectadas con un plásmido de expresión de receptor quimérico humano o de ratón PPARα-Gal4 (o PPARδ-Gal4 o PPARγ-Gal4) y un 5Gal4 pGL3 TK Luc plásmido reportero. Las transfecciones se realizaron mediante un agente químico (Jet PEI). Las células transfectadas se distribuyeron en placas de 384 pozos y se dejaron recuperar durante 24 h. El medio de cultivo se removió entonces y se agregó medio fresco que contiene el compuesto que se va a probar (5 µM) (concentración final que fluctúa desde 10^{-4}M a 3 10^{-10}M). Después de una incubación de una noche, se midió la expresión de luciferasa mediante adición de SteadyGlo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Se utilizaron ácido fenofíbrico a 10^{-5}M, GW501516 a 10^{-8}M y rosiglitazona a 10^{-6}M como referencias. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad en comparación con las referencias (ácido fenofíbrico para PPARα, rosiglitazona para PPARγ y GW501516 para PPARδ) tomados como 100 %. Para receptores humanos, los resultados son la media de 6 experimentos, cada uno por cuadruplicado. Para receptores de murino, los resultados son la media de 5 experimentos (PPARδ) o 6 (PPARα y γ), cada uno en cuadruplicado. Se calcularon curvas dosis-efecto y de EC50 con el uso del software Ensayo Explorer (MDL). Los resultados se presentan en la tabla a continuación y en las figuras 31 y 32.

*: estimado (estancamiento no alcanzado)

	PPARα		PPARγ		PPARδ	
	humano	ratón	humano	ratón	humano	ratón
EC50 (µM)	0,92	0,29	0,18	0,17	0,53	2*

Estos resultados muestran que el compuesto A activa los tres subtipos de receptores de PPAR con una EC50 de menos de 1 µM para cada subtipo. Se puede ver además que el compuesto A tiene una actividad balanceada entre los tres subtipos de receptores de PPAR.

En general, los resultados de los ejemplos 1 a 5 sugieren que una buena actividad de agonista de PPARδ se requiere junto con actividades de agonistas PPARα y PPARγ con el fin de ejercer un efecto pan-antifibrótico.

Ejemplo 6: efecto del compuesto A en la proliferación de fibroblastos de pulmón y dérmicos y comparación con agonistas PPARγ y PPAR conocidos

La habilidad del compuesto A para inhibir la proliferación de fibroblastos de pulmón y dérmicos inducidos por PDGF se determinó mediante la realización de ensayos de incorporación EdU (5-etinil-2'-deoxiuridina). Estos ensayos se llevaron a cabo con el uso de fibroblastos primarios de pulmón o piel humanos (Promocell). Las células se colocaron en placas de 96 pozos en medio completo de crecimiento durante 24 h, seguido por 24 h de inanición en

medio sin suero. El medio se remplazó después por medio fresco que contiene PDGF y el compuesto A que se va a probar (en concentraciones que fluctúan desde 10^{-4}M hasta 4,5 10^{-8}M) durante otras 24 h. Se agregó EdU a las células durante las últimas 16 h del tratamiento con compuesto. El medio de cultivo se removió entonces, las células se fijaron con formaldehído y la EdU incorporada en el ADN de células diving se cuantificó con el uso de ensayo fluorescente Click-it de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se utilizaron ácido fenofíbrico en concentraciones que fluctúan desde 3 10^{-4}M hasta 1,4 10^{-7}M (PPARα) y rosiglitazona en concentraciones que fluctúan desde 3 10^{-5}M hasta 1,4 10^{-8}M (PPARγ) como referencias. Los resultados se expresaron como % de células EdU-positivas del número total de células. Los resultados presentan la media de triplicados biológicos. Las curvas dosis-efecto y los valores de IC50 fueron calculados con el uso del software GraphPad Prism. Los resultados se presentan en la tabla a continuación y en las figuras 33 y 34.

	compuesto A		ácido fenofíbrico		rosiglitazonaγ	
	Pulmón	Dérmico	Pulmón	Dérmico	Pulmón	Dérmico
IC_{50} (μM)	10,90	11,50	NC	NC	NC	NC
NC: no convergente						

Ejemplo 7: efecto del compuesto A en fibroblastos para transición de miofibroblastos de pulmón y fibroblastos dérmicos y comparación con agonistas PPARγ y PPARα conocidos

La habilidad del compuesto A para inhibir fibroblastos de pulmón y dérmicos inducidos por TGFP para transición de miofibroblastos (FMT) se determinó mediante la realización de ensayos de química de inmunocitos para el marcador de miofibroblasto, α-actina de músculo liso (α-SMA). Estos ensayos se llevaron a cabo con el uso de fibroblastos primarios de pulmón o piel humanos (Promocell). Las células fueron colocadas en placas de 96 pozos en medio completo de crecimiento durante 24 h, seguido por 24 h de inanición en medio sin suero. El medio fue remplazado entonces por medio fresco que contiene TGFβ y el compuesto A que se va a probar (en concentraciones que fluctúan desde 10^{-4}M hasta 4,5 10^{-8}M) durante otras 48 h. El medio de cultivo se removió entonces, las células se fijaron con formaldehído y se tiñeron con un anticuerpo primario α-SMA de ratón (Sigma) y anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia de cabra-anti-ratón (Invitrogen). La expresión de α-SMA se cuantificó con el uso de software Meta Xpress. Ácido fenofíbrico en concentraciones que fluctúan desde 3 10^{-4}M hasta 1,4 10^{-7}M (PPARα) y rosiglitazona en concentraciones que fluctúan desde 3 10^{-5}M hasta 1,4 10^{-8}M (PPARγ) se usaron como referencias. Los resultados se expresaron como % de células α-SMA-positivas del número total de células. Los datos se normalizaron para el tratamiento TGFβ solo, que fue tomado como 100 %. Los resultados presentan la media de triplicados biológicos.

Las curvas dosis-efecto y los valores de IC50 se calcularon con el uso del software GraphPad Prism. Los resultados se presentan en la tabla a continuación y en las figuras 35 y 36.

	compuesto A		ácido fenofíbrico		rosiglitazona	
	Pulmón	Dérmico	Pulmón	Dérmico	Pulmón	Dérmico
IC_{50} (μM)	10,79	~11,18	NC	NC	NC	NC
NC: no convergente						

Conjuntamente, estos data funcionales *in vitro* demuestran que el compuesto A inhibe eficientemente la proliferación inducida por PDGF y transición de miofibroblastos inducida por TGFβ en fibroblastos primarios de pulmón y dérmicos humanos, lo que proporciona así un vínculo con los efectos anti-fibróticos observados *in vivo*. Además, estos resultados sugieren que el agonismo de pan-PPAR podría ser superior a una sola activación de PPAR en sus efectos anti-fibróticos en las células objetivo en las dos trayectorias fibrogénicas clave.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INVENTIVA

<120> Compuestos PPAR para uso en el tratamiento de enfermedades fibróticas

<130> 1H308000 0086 WO/MN

<150> EP14307187.6
<151> 2014-12-24

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 1
ctgatgggca agaacaccat 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 2
gtgaggtcct ccttggtgaa 20

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 3
accggccctt cctgctcctc 20

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 4
gccgcacaca gcagttcttc 20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
aaaggtgctg atggttctcc 20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 6
gggaccggga ggaccactgg 20

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 7
gttgtctgac gctggcttta ag 22

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 8
cccacttctc tccgatcttg ta 22

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 9
cagggagtaa tggttggaat g 21

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 10
tttccatgtc gtcccagttg 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 11
aggtccctgt catgcttctg 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 12
gcctactcat tgggatcatc 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 13
ggtcttgccc atcttcacat 20

<210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 14
caacaggttc catttttctt ca 22

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 15
gggatcaaat gaaggcgaat 20

<210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 16
tgggtagtct cattgccttg c 21

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 17
ctccaatcgt ccctacagtc 20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 18
ggtcctcatc tgtggcatca 20

<210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 19
gttgtctgac gctggcttta ag 22

<210> 20
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 20
cccacttctc tccgatcttg ta 22

REIVINDICACIONES

1. Un agonista pan-PPAR para uso en un método de tratamiento de una condición fibrótica.

2. El agonista para el uso de la reivindicación 1, en donde la condición fibrótica es una condición que afecta cualquier órgano que puede desarrollar fibrosis, tal como el corazón, el pulmón, el hígado, el riñón, el tracto gastrointestinal, la piel.

3. El agonista para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la condición fibrótica se selecciona de: fibrosis hepática, enfermedad de hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad crónica de riñón, un trastorno pulmonar fibrótico, escleroderma sistémica.

4. El agonista para el uso de la reivindicación 3, en donde la condición fibrótica es un trastorno pulmonar fibrótico.

5. El agonista para el uso de la reivindicación 4, en donde el trastorno pulmonar fibrótico es fibrosis pulmonar idiopática.

6. El agonista para el uso de la reivindicación 3, en donde la condición fibrótica es escleroderma sistémica.

7. El agonista para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho agonista está destinado para administración oral.

8. Una composición farmacéutica que contiene un agonista pan-PPAR para uso en un método de tratamiento de una condición fibrótica.

9. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 8, en donde la condición fibrótica es una condición que afecta cualquier órgano que puede desarrollar fibrosis, tal como el corazón, el pulmón, el hígado, el riñón, el tracto gastrointestinal, la piel.

10. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 8 o 9, en donde la condición fibrótica se selecciona de: fibrosis hepática, enfermedad de hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad crónica de riñón, un trastorno pulmonar fibrótico, escleroderma sistémica.

11. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 10, en donde la condición fibrótica es un trastorno pulmonar fibrótico.

12. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 11, en donde el trastorno pulmonar fibrótico es fibrosis pulmonar idiopática.

13. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 10, en donde la condición fibrótica es escleroderma sistémica.

14. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, la cual es una composición para administración oral, parenteral, tópica, inhalada o intranasal.

15. El agonista para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en donde dicho agonista es ácido 5-cloro-1-[(6-benzotiazolil)sulfonil]-1H-indol-2-butanoico.

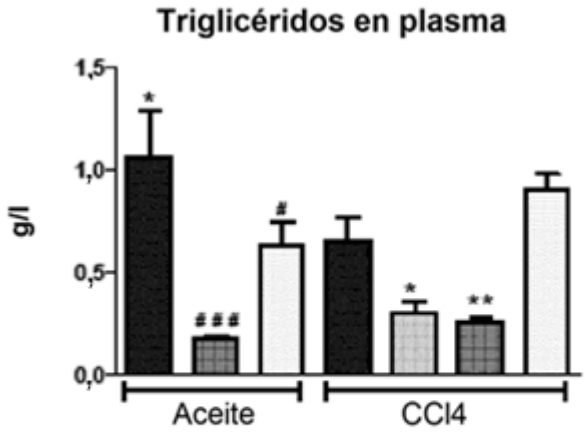

Triglicéridos en plasma
g/l
1,5
1,0
0,5
0,0
*
###
#
*
**
Aceite
CCl4

FIG.1

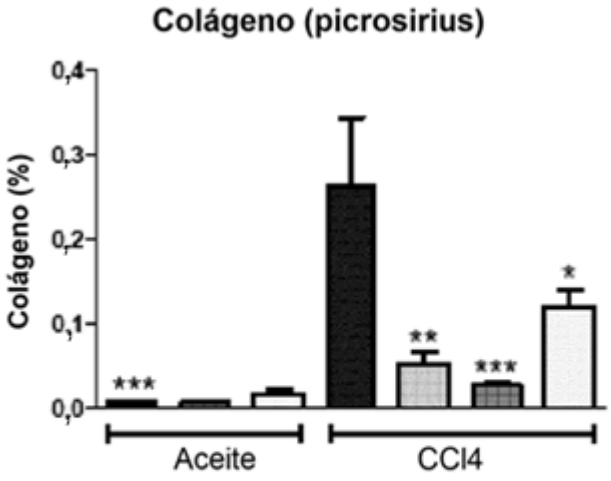

Colágeno (picrosirius)
Colágeno (%)
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
***
**
***
*
Aceite
CCl4

FIG.2

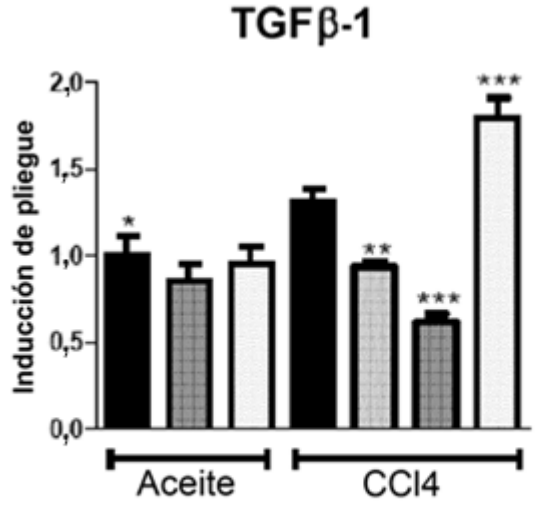

TGFβ-1
Inducción de pliegue
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
**
***
***
Aceite
CCl4

FIG.3

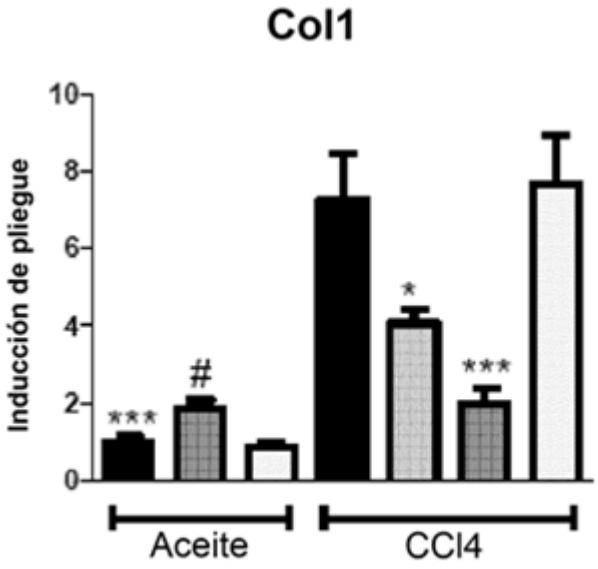

Col1
Inducción de pliegue
10
8
6
4
2
0
***
#
*
***
Aceite
CCl4

FIG.4

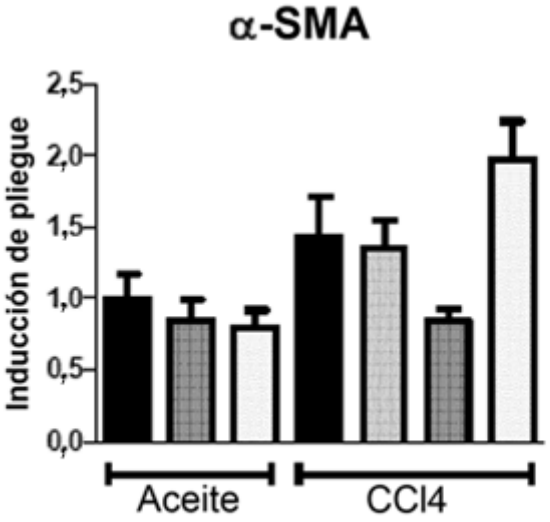

α-SMA
Inducción de pliegue
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Aceite
CCl4

FIG.5

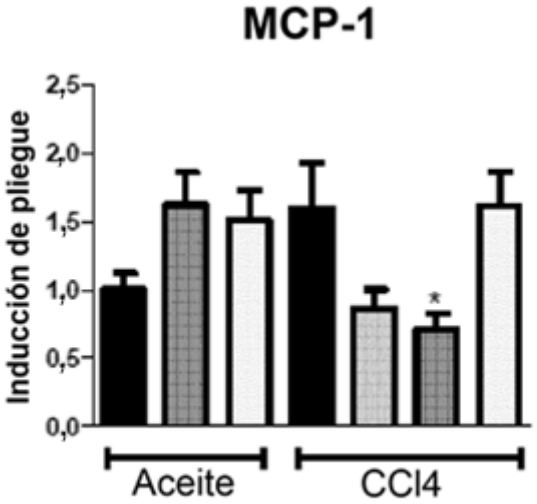

MCP-1
Inducción de pliegue
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
Aceite
CCl4

FIG.6

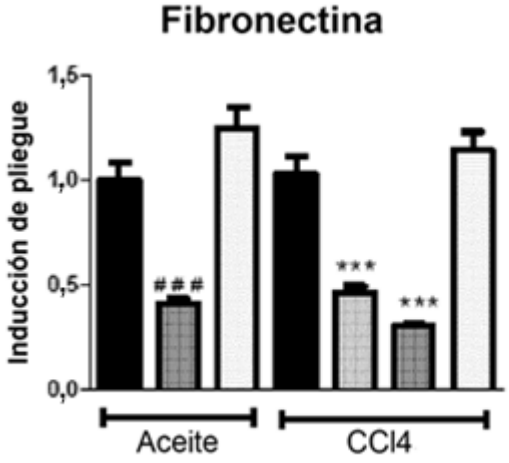
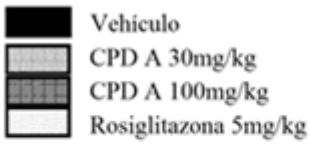


FIG.7



Leyenda para las figuras 1 a 7

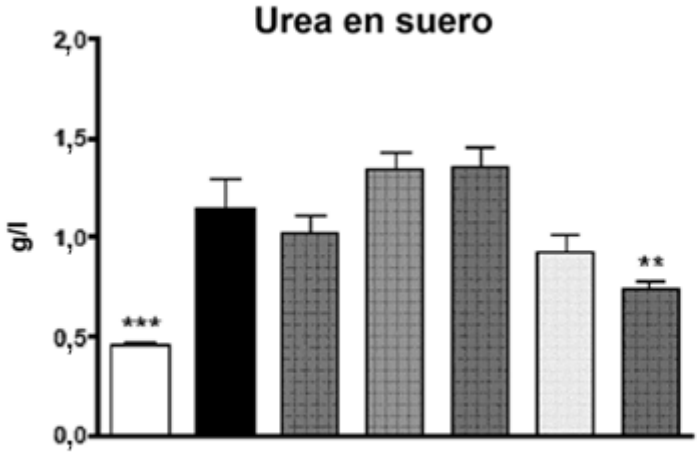


FIG.8

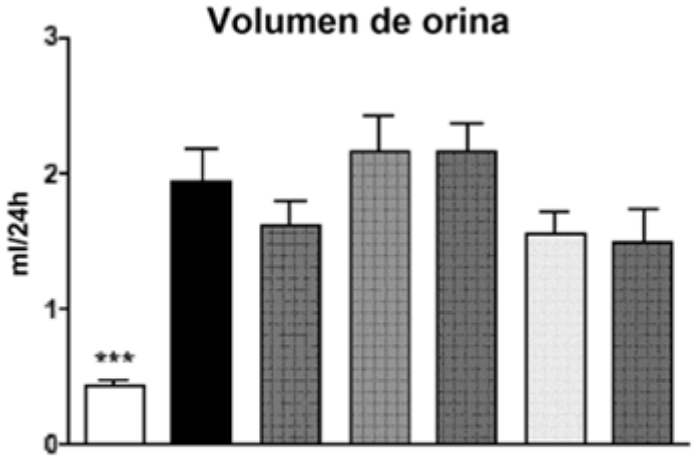


FIG.9

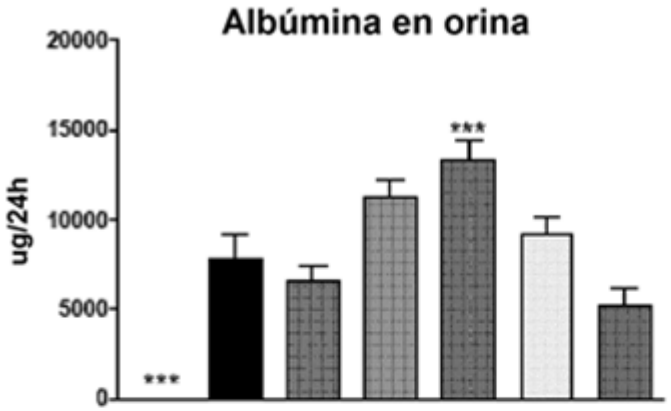

Albúmina en orina
20000
15000
10000
5000
0
ug/24h
***
***

FIG.10

Osteopontina en riñón
400
300
200
100
0
ng/mg de proteínas
***
*
**
*
*

FIG.11

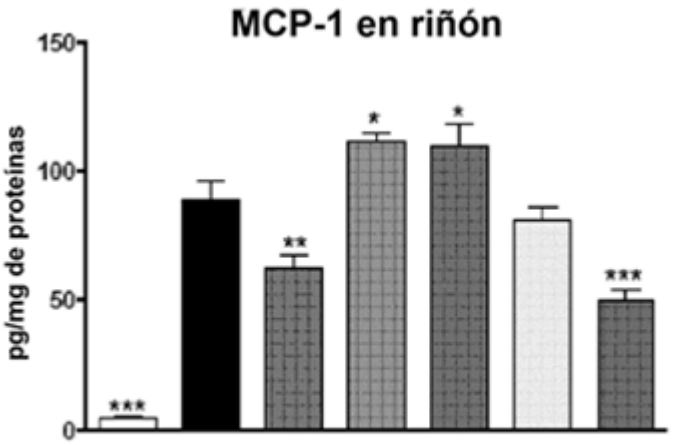

MCP-1 en riñón
pg/mg de proteínas
150
100
50
0
***
**
*
*
***

FIG.12

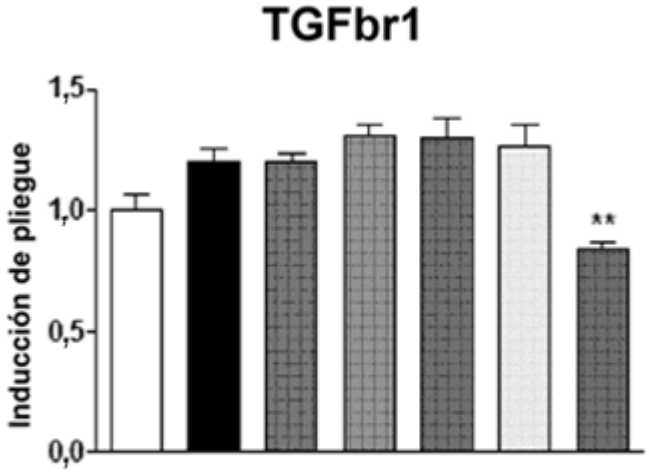

TGFbr1
Inducción de pliegue
1,5
1,0
0,5
0,0
**

FIG.13

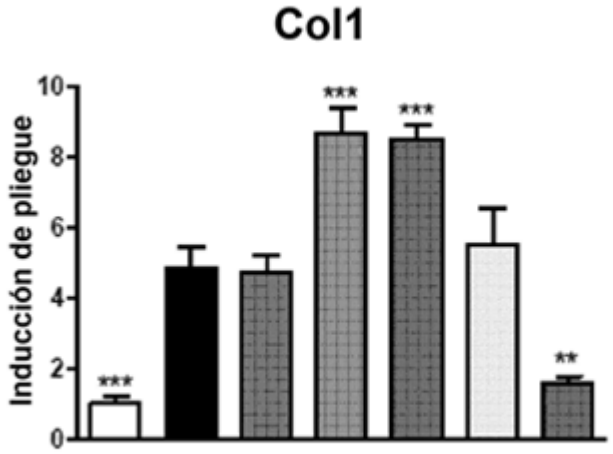

Col1
Inducción de pliegue
10
8
6
4
2
0
***
***
***
**

FIG.14

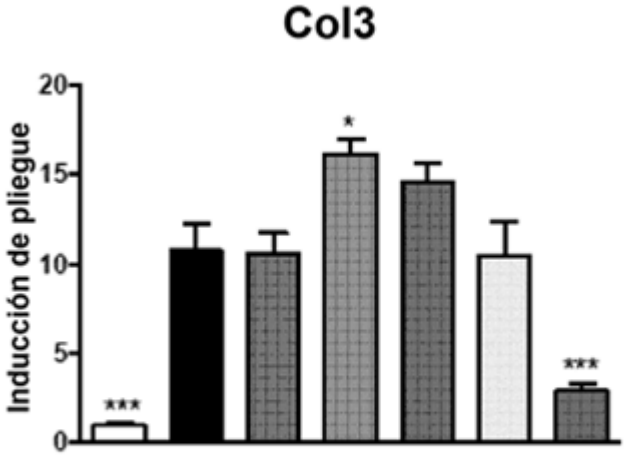

Col3
Inducción de pliegue
20
15
10
5
0
***
*
***

FIG.15

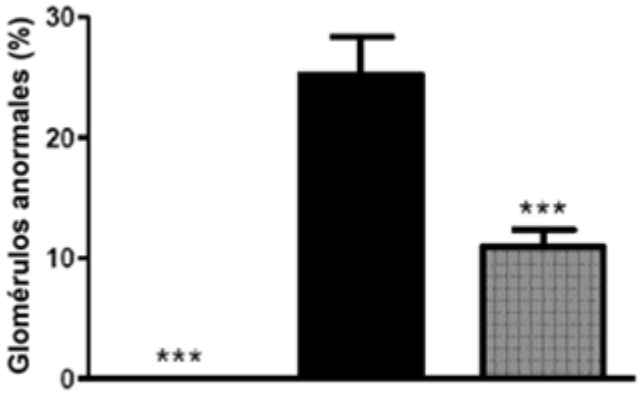
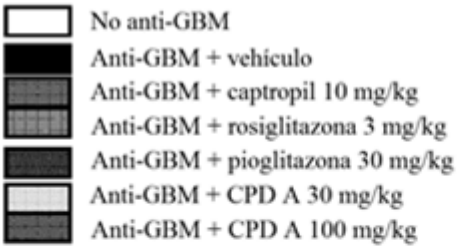


FIG.16



Leyenda para las figuras 8 a 16

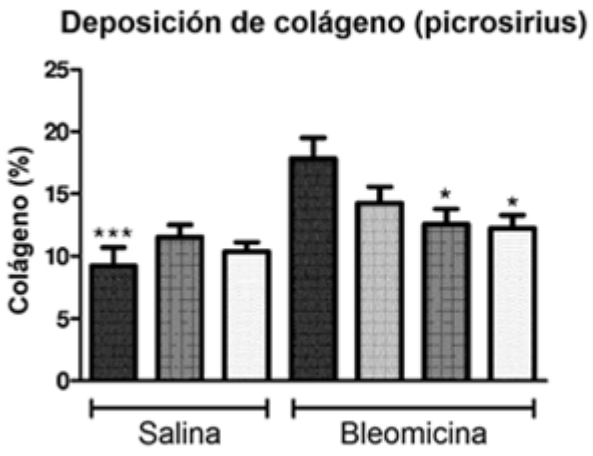

Deposición de colágeno (picrosirius)
Colágeno (%)
25
20
15
10
5
0
***
*
*
Salina
Bleomicina

FIG.17

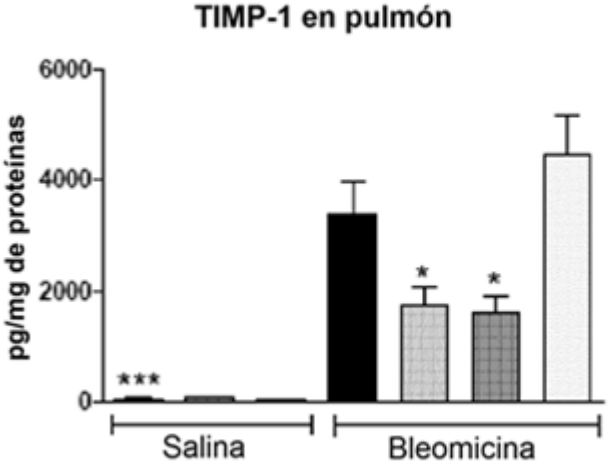

TIMP-1 en pulmón
pg/mg de proteínas
6000
4000
2000
0
***
*
*
Salina
Bleomicina

FIG.18

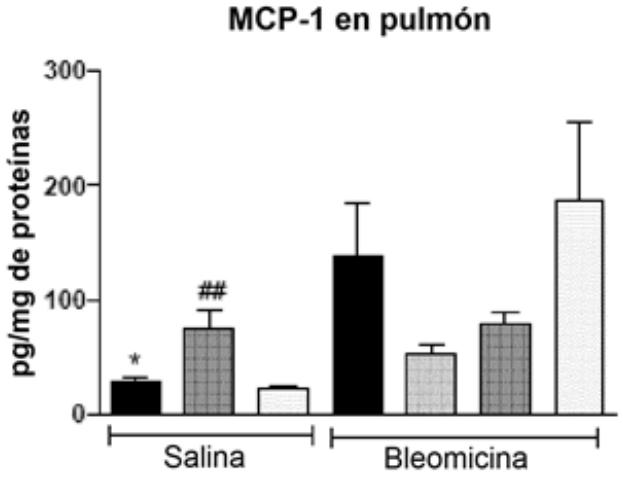

MCP-1 en pulmón
pg/mg de proteínas
300
200
100
0
*
##
Salina
Bleomicina

FIG.19

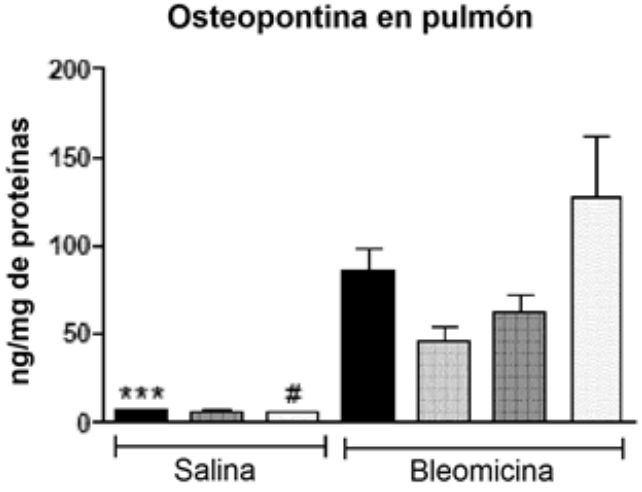

Osteopontina en pulmón
ng/mg de proteínas
200
150
100
50
0
***
#
Salina
Bleomicina

FIG.20

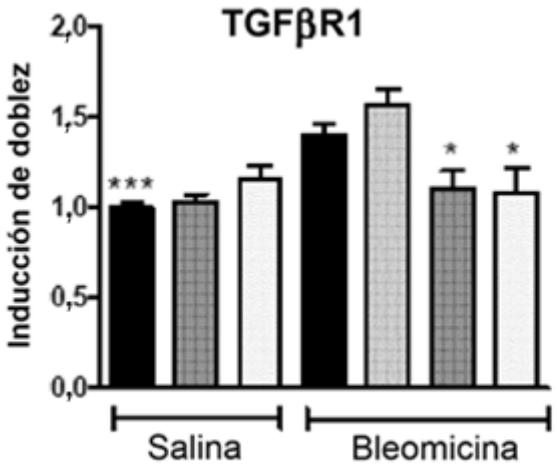

TGFβR1
Inducción de doblez
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
***
*
*
Salina
Bleomicina

FIG.21

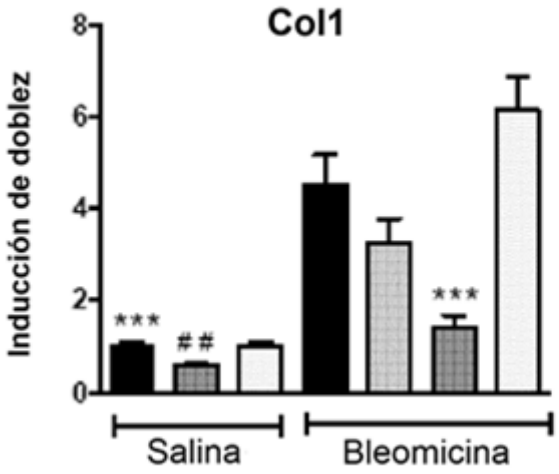

Col1
Inducción de doblez
8
6
4
2
0
***
##
***
Salina
Bleomicina

FIG.22

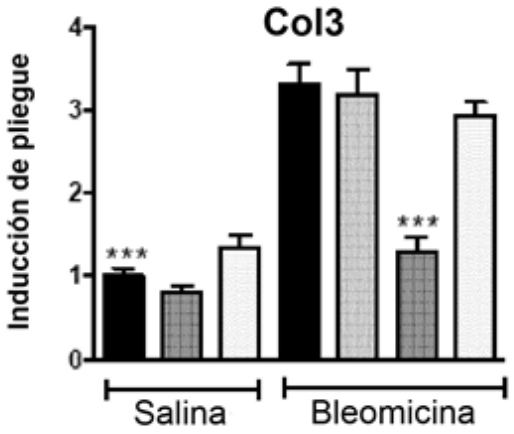

Col3
Inducción de pliegue
4
3
2
1
0
***
***
Salina
Bleomicina

FIG.23

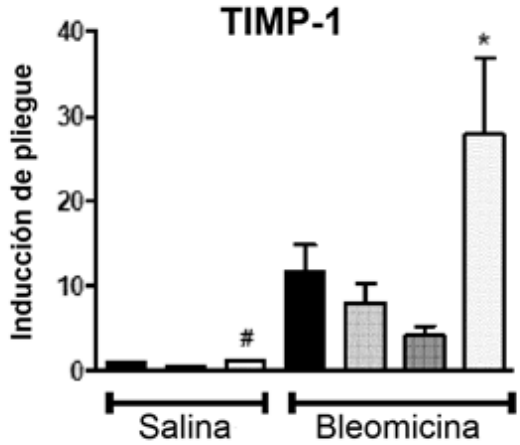

TIMP-1
Inducción de pliegue
40
30
20
10
0
#
*
Salina
Bleomicina

FIG.24

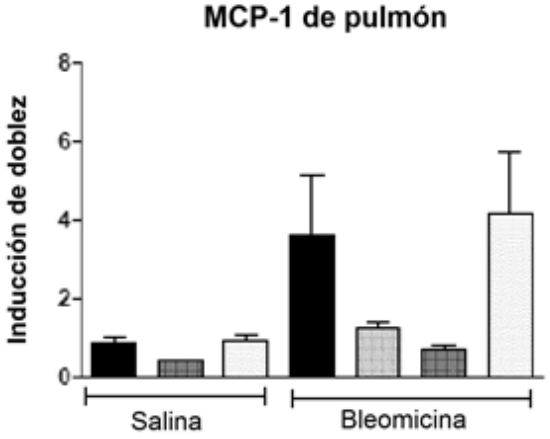

MCP-1 de pulmón
Inducción de doblez
8
6
4
2
0
Salina
Bleomicina

FIG.25

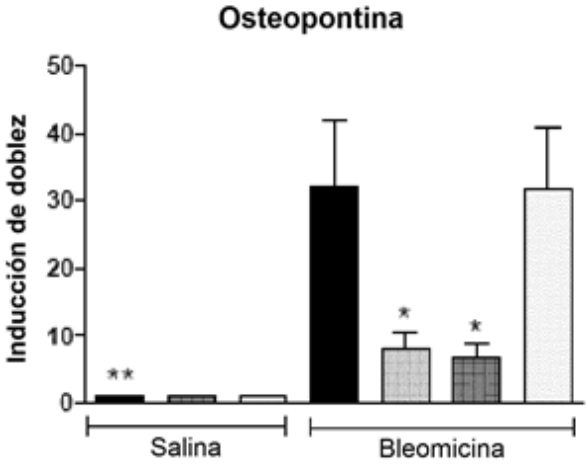

Osteopontina
Inducción de doblez
50
40
30
20
10
0
**
*
*
Salina
Bleomicina

FIG.26

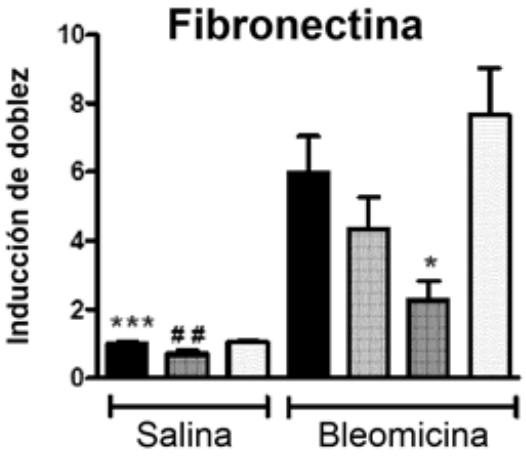


FIG.27

Vehículo
CPD A 30mg/kg
CPD A 100mg/kg
Rosiglitazona 5mg/kg

Leyenda para las figuras 17 a 27

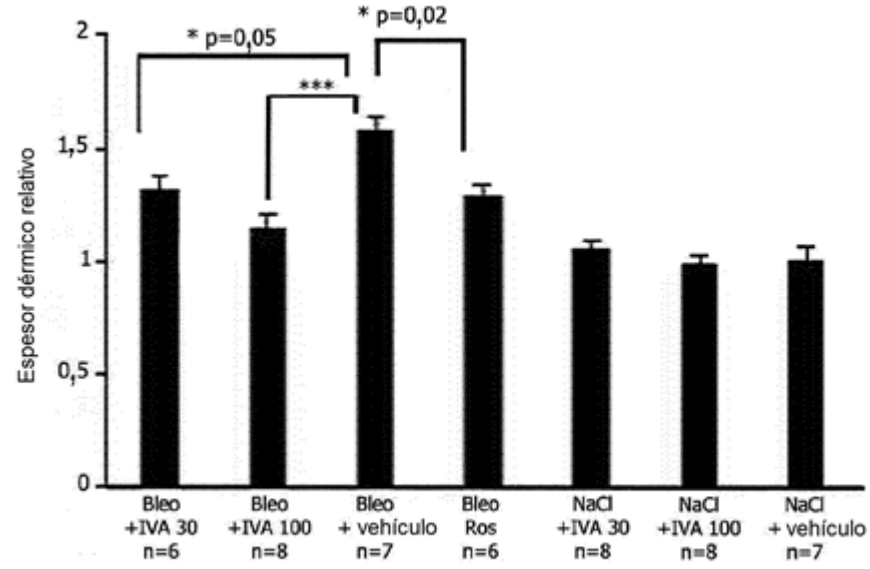

* p=0,05
* p=0,02
***
Espesor dérmico relativo
2
1,5
1
0,5
0
Bleo +IVA 30 n=6
Bleo +IVA 100 n=8
Bleo + vehículo n=7
Bleo Ros n=6
NaCl +IVA 30 n=8
NaCl +IVA 100 n=8
NaCl + vehículo n=7

FIG.28

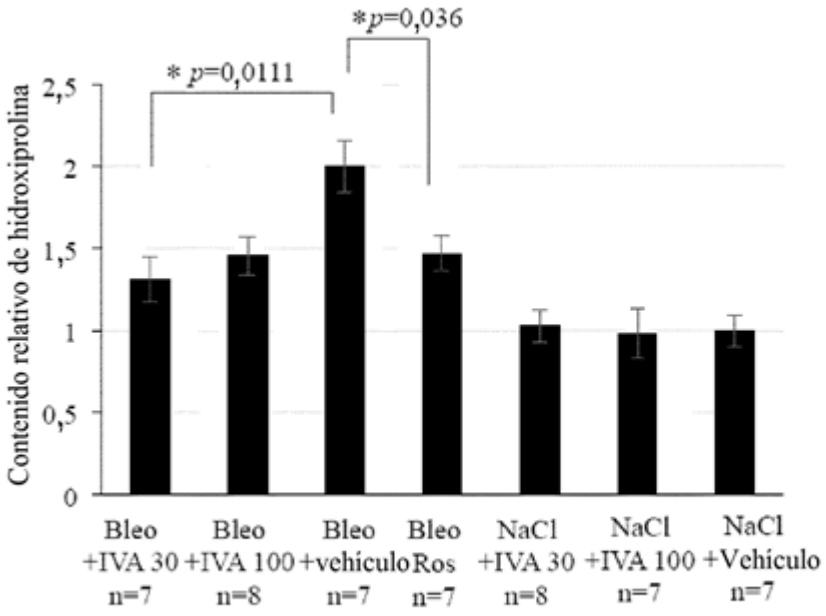

*p=0,036
* p=0,0111
Contenido relativo de hidroxiprolina
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Bleo +IVA 30 n=7
Bleo +IVA 100 n=8
Bleo +vehículo n=7
Bleo Ros n=7
NaCl +IVA 30 n=8
NaCl +IVA 100 n=7
NaCl +Vehículo n=7

FIG.29

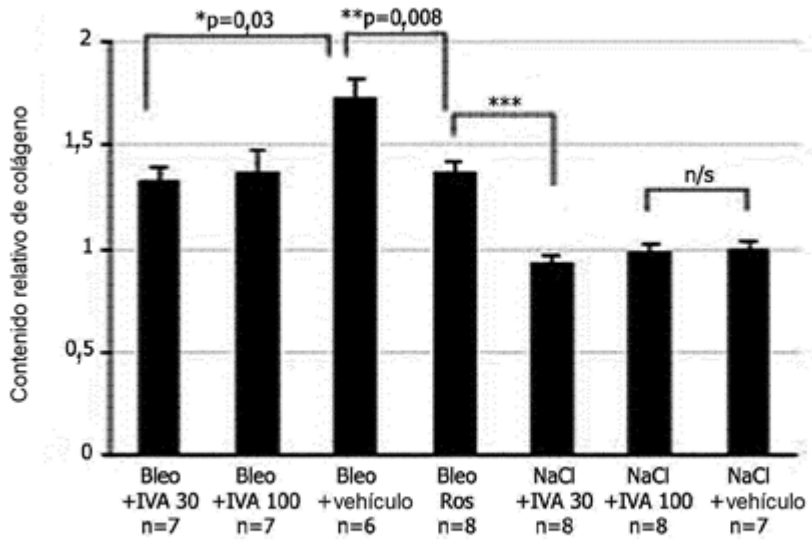

*p=0,03
**p=0,008
***
n/s
Contenido relativo de colágeno
2
1,5
1
0,5
0
Bleo +IVA 30 n=7
Bleo +IVA 100 n=7
Bleo +vehículo n=6
Bleo Ros n=8
NaCl +IVA 30 n=8
NaCl +IVA 100 n=8
NaCl +vehículo n=7

FIG.30

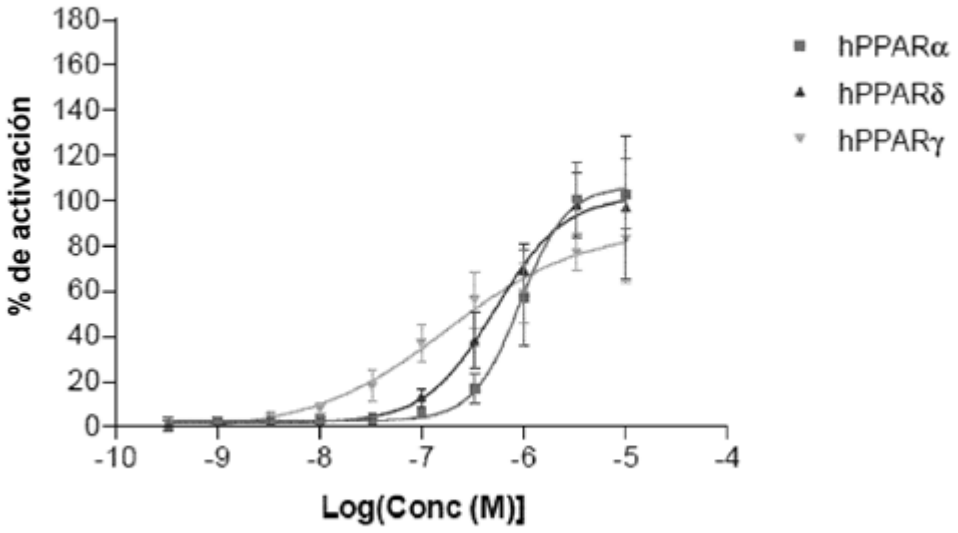

% de activación
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
Log(Conc (M)]
hPPARα
hPPARδ
hPPARγ

FIG.31

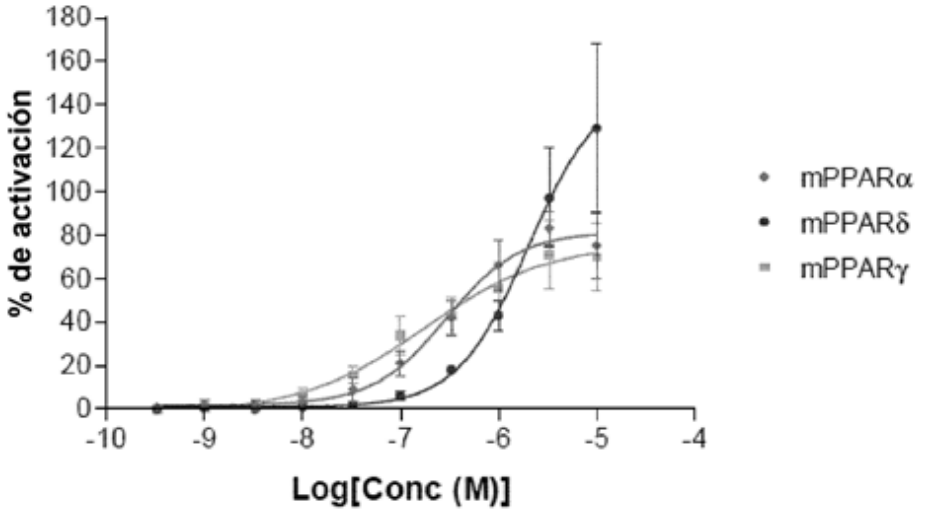

% de activación
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
Log[Conc (M)]
mPPARα
mPPARδ
mPPARγ

FIG.32

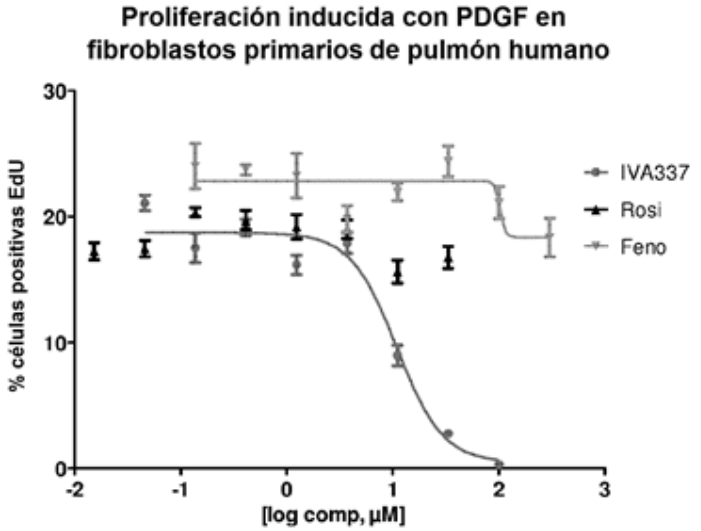

Proliferación inducida con PDGF en
fibroblastos primarios de pulmón humano
% células positivas EdU
30
20
10
0
-2
-1
0
1
2
3
[log comp, µM]
IVA337
Rosi
Feno

FIG.33

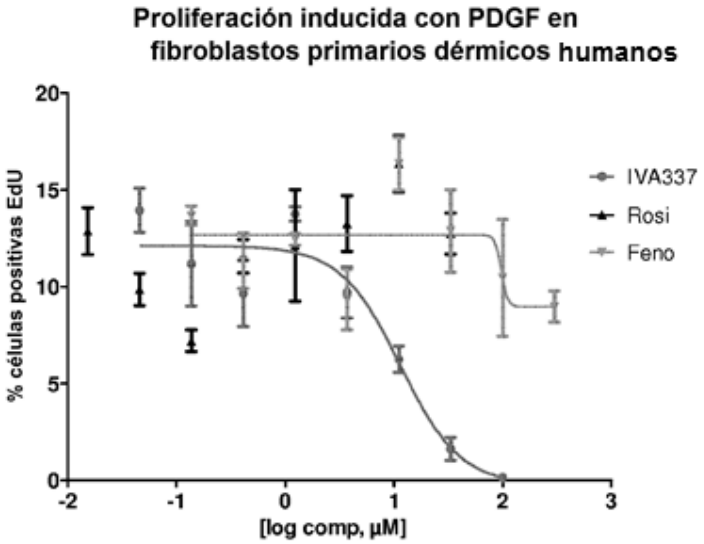

Proliferación inducida con PDGF en
fibroblastos primarios dérmicos humanos
% células positivas EdU
20
15
10
5
0
-2
-1
0
1
2
3
[log comp, µM]
IVA337
Rosi
Feno

FIG.34

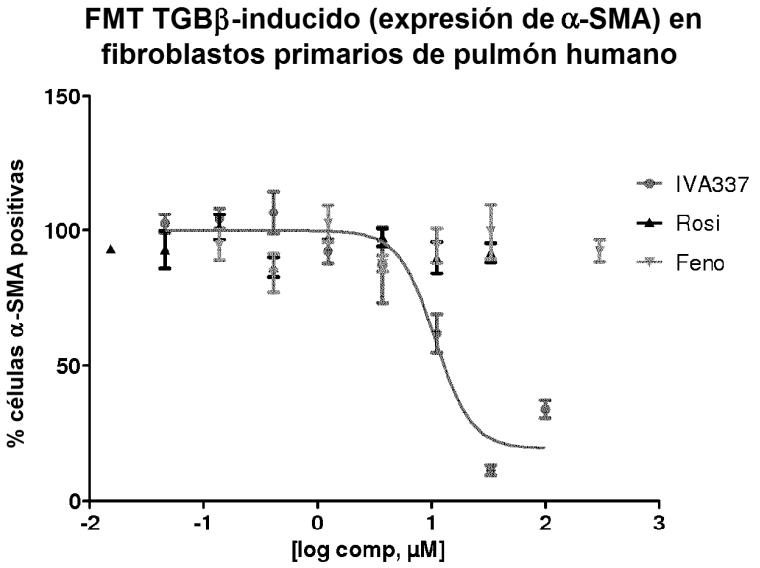

FMT TGBβ-inducido (expresión de α-SMA) en fibroblastos primarios de pulmón humano
% células α-SMA positivas
150
100
50
0
-2
-1
0
1
2
3
[log comp, µM]
IVA337
Rosi
Feno

FIG.35

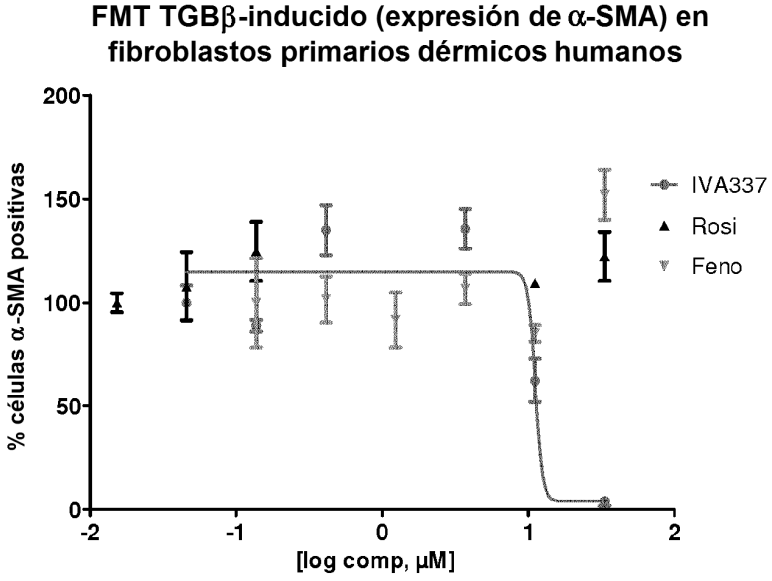

FMT TGBβ-inducido (expresión de α-SMA) en fibroblastos primarios dérmicos humanos
% células α-SMA positivas
200
150
100
50
0
-2
-1
0
1
2
[log comp, µM]
IVA337
Rosi
Feno

FIG.36