

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 493**

51 Int. Cl.:
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07814746 .9**
96 Fecha de presentación: **07.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2059234**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA REDUCIR O ALIVIAR LA INFLAMACIÓN EN EL TUBO DIGESTIVO.**

30 Prioridad:
08.09.2006 US 825075 P
02.10.2006 US 827807 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.03.2012

73 Titular/es:
ORE PHARMACEUTICALS INC.
610 PROFESSIONAL DRIVE
GAITHERSBURG, MD 20879, US

72 Inventor/es:
TARTAGLIA, Louis, Anthony;
BARNES, Thomas, Michael;
COOPERSMITH, Robert, Mark;
MALSTROM, Scott, Edward;
WHITE, David, William y
PICARELLA, Dominic

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 376 493 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para reducir o aliviar la inflamación en el tubo digestivo.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a farmacoterapia para enfermedades inflamatorias del tubo digestivo tales como enfermedad inflamatoria intestinal. Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos para reducir o aliviar la inflamación en un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria del tubo digestivo.

Antecedentes

Antecedentes generales de la IBD

10 El tubo digestivo, también denominado el conducto alimentario (conducto de digestión) o el intestino, es parte del sistema digestivo, es decir, el sistema de órganos dentro de los animales pluricelulares que ingiere el alimento, lo digiere para extraer energía y nutrientes, y expulsa los residuos restantes. Este proceso se llama digestión. Como se define en el presente documento, el tubo digestivo incluye aquellos órganos a través de los que pasan el alimento o las excreciones sólidas durante el proceso digestivo, pero excluye aquellos órganos del sistema digestivo, adyacentes a y que conectan con el tubo digestivo, que almacenan y/u segregan sustancias que ayudan a la digestión, por ejemplo, hígado, vesícula biliar y páncreas. Esta definición es ampliamente consistente con la dada en trabajos de referencia estándar tales como el Diccionario médico ilustrado de Dorland, 30ª ed. (2003), Saunders, Filadelfia, que define el tubo digestivo como aquella parte del sistema digestivo formada por el esófago, el estómago y los intestinos, excepto que, por conveniencia en el presente documento, también se incluyen la boca y la faringe. En un varón adulto humano normal, el tubo digestivo desde la boca hasta el ano es aproximadamente de 7,5 metros de largo y consiste en porciones superiores e inferiores con los siguientes componentes:

- tubo digestivo superior: boca (cavidad oral o bucal; incluye glándulas salivales, mucosa oral, dientes y lengua), faringe, esófago (garganta) y cardias, estómago, que incluye el antro y el píloro y el esfínter pilórico;
- tubo digestivo inferior: intestino o intestinos, que consiste en (a) intestino delgado, que tiene tres partes: duodeno, yeyuno y íleon; (b) intestino grueso, que tiene tres partes: ciego (incluyendo el apéndice vermiforme que es un divertículo del intestino ciego), colon (colon ascendente, colon transverso, colon descendente y pliegue sigmoide), y recto; y (c) ano.

25 El término "tubo gastrointestinal" o "tubo GI" a veces se usa en el presente documento, como en general en la técnica, para referirse a todo el tubo digestivo. Si se usa en su sentido estricto, queriendo decir la parte del tubo digestivo formado por estómago e intestinos, este uso se especifica expresamente en el presente documento o será requerido por el contexto.

30 La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es una clase de enfermedades idiopáticas del tubo digestivo que se cree que provoca una reacción autoinmunitaria. Se reconocen dos tipos importantes de IBD: colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC). La CU, también conocida como proctocolitis idiopática, se limita normalmente al colon; la EC, también denominada enteritis regional, ileítis terminal o ileocolitis granulomatosa, puede afectar a cualquier segmento o segmentos del tubo digestivo desde la boca hasta el ano. Cuando se usa en el presente documento el término "enfermedad inflamatoria intestinal" o "IBD", en particular con referencia a la EC, se entenderá que incluye manifestaciones en cualquier parte del tubo digestivo, no exclusivamente en el intestino.

35 La CU y la EC muestran diferencias significativas, pero ambas enfermedades comparten varias manifestaciones intestinales y extraintestinales, aunque algunas de ellas tienden a producirse más comúnmente en una enfermedad o en la otra. Tanto la CU como la EC muestran normalmente una intensidad y gravedad que aumenta y desciende. Cuando un paciente con IBD tiene síntomas que indican una inflamación significativa, se considera que la enfermedad está en un estadio activo; se dice que un paciente de este tipo tiene una "reagudización" de la IBD. Cuando la inflamación es de una gravedad menor o ausente y el paciente es sustancialmente asintomático, se considera que la enfermedad está en remisión. En la mayoría de los casos, los síntomas se corresponden bien con el grado de inflamación presente para cualquier enfermedad, aunque esto no es universalmente cierto. En algunos pacientes, se puede necesitar una evidencia objetiva de la actividad de la enfermedad antes de administrar medicaciones con un potencial de efectos secundarios adversos significativos.

La información sobre la IBD, sus síntomas, patología y tratamiento se pueden encontrar en diversas fuentes impresas y en internet, incluyendo, por ejemplo, las citadas individualmente a continuación.

50 Bonner (2003) "Inflammatory bowel disease: advances in medical management." <http://www.fascrs.org/displaycommon.cfm?an=1&subarticlenbr=113>.

Tung & Warner (2002) Postgraduate Medicine 112(5). "Colonic inflammatory bowel disease: medical therapies for colonic Crohn's disease and ulcerative colitis." http://www.postgradmed.com/issues/2002/11_02/tung2.htm.

University of Maryland Medical Center (2002) "What are the Drug Treatments for Inflammatory Bowel Disease?" http://www.umm.edu/patiented/articles/what_drug_treatments_inflammatory_bowel_disease_000069_9.htm.

Colitis ulcerosa: síntomas y patología

5 Los pacientes con CU presentan más comúnmente diarrea hemorrágica. En casos más graves se produce dolor abdominal y cólicos, fiebre y pérdida de peso. Cuanto mayor sea la afectación del colon, más probabilidad tendrá el paciente de padecer diarrea. El tenesmo rectal (tenesmo) puede estar asociado con un recto inflamado. Los pacientes podrían tener heces formadas si su enfermedad está limitada al recto. Cuando el grado de inflamación se incrementa, se desarrollan síntomas sistémicos, incluyendo fiebre baja, malestar general, náuseas, vómitos, sudores y artralgias. La fiebre, la deshidratación y el dolor con la palpación abdominal evolucionan a CU grave, reflejando una inflamación progresiva hacia capas más profundas del colon.

10 El diagnóstico de CU se puede realizar endoscópica o radiológicamente y, con radiografías de contraste que muestran normalmente una pérdida del patrón mucoso normal y, con la enfermedad más avanzada, una pérdida de haustras en el colon. Una sigmoidoscopia o una colonoscopia revela que el recto está casi siempre afectado. La enfermedad puede estar limitada al recto (rectitis), aproximadamente en un 25 % de los pacientes; al recto, colon sigmoide y descendente (colitis del lado izquierdo), en la mayoría de los pacientes; o todo el colon (pancolitis), aproximadamente en un 10 % de los pacientes. La CU no afecta a ningún otro segmento del tubo gastrointestinal. La colectomía es curativa.

15 En la CU, existe una demarcación clara entre la mucosa afectada y la no afectada; y en el área afectada, la enfermedad es notable y uniformemente continua. La CU afecta principalmente a la mucosa y la submucosa, con formación de abscesos crípticos y úlceras en la mucosa. La mucosa normalmente parece granular y friable. En casos más graves, se forman pseudopólipos, que consisten en áreas de crecimiento hiperplásico con mucosa hinchada rodeada por mucosa inflamada con úlceras superficiales. En la CU grave, la inflamación y la necrosis se pueden extender bajo la lámina propia afectando a la submucosa y a los músculos circulares y longitudinales, aunque esto es inusual. Cuando la enfermedad se vuelve crónica, el colon se vuelve un tubo acortado rígido que carece de sus habituales pliegues haustrales (evaginación), lo que conduce a una apariencia "tubo de plomo" observada sobre un enema opaco.

20 Con respecto al pronóstico para la CU, sólo un pequeño porcentaje de pacientes tiene un único ataque y sin recidiva. Sin embargo, normalmente las remisiones y exacerbaciones son características de la CU, con ataques agudos que duran de semanas a meses. Un veinte por ciento de los pacientes requiere una colectomía, que es curativa. La morbilidad resulta principalmente de complicaciones del tratamiento médico, especialmente de esteroides a largo plazo.

25 Las causas más comunes de muerte en la IBD son peritonitis con septicemia, neoplasia maligna, enfermedad tromboembólica y complicaciones de cirugía. El megacolon tóxico, una de las complicaciones más temidas de la CU, puede conducir a perforación, septicemia y muerte. La neoplasia maligna es la complicación intestinal a largo plazo más temida de la CU, ya que el riesgo de cáncer de colon comienza a aumentar significativamente por encima del de la población general aproximadamente 8-10 años después de del diagnóstico. Se supone que la estenosis de colon en personas con CU es maligna a menos que se pruebe lo contrario (normalmente por resección).

Enfermedad de Crohn: síntomas y patología

30 En general, la presentación de EC es más insidiosa que la de CU, con dolor abdominal continuo, anorexia, diarrea, pérdida de peso y fatiga. Las heces extremadamente hemorrágicas, que son típicas de la CU, son menos comunes en la EC. Se pueden formar heces, pero predominan las heces sueltas si el colon o el íleon terminal está afectado considerablemente. La mitad de los pacientes con EC presentan enfermedad perianal (por ejemplo, fístulas o abscesos). De forma ocasional, se puede notar dolor en el cuadrante inferior derecho agudo y fiebre, imitando una apendicitis. Comúnmente, el diagnóstico sólo se establece después de varios años de dolor abdominal recurrente, fiebre y diarrea. La EC con afectación gastroduodenal puede imitar la enfermedad de úlcera péptica y puede evolucionar a obstrucción de salida gástrica.

35 La pérdida de peso se observa más comúnmente en la EC que en la CU debido al mala absorción asociada con la enfermedad de intestino delgado. Los pacientes pueden reducir su ingesta de alimentos en un esfuerzo para controlar sus síntomas. Los síntomas sistémicos son comunes e incluyen fiebre, sudores, malestar general y artralgias. Una fiebre baja puede ser la primera señal de aviso de una reagudización. Se pueden producir recidivas con tensión emocional, infecciones u otras enfermedades agudas, embarazo, desviaciones del régimen prescrito, uso de laxantes o antibióticos, o retirada de medicaciones antiinflamatorias o esteroideas.

40 Los niños pueden presentar un retraso del crecimiento y una falta o retraso en la maduración sexual. En un 10-20 % de los casos, los pacientes presentan manifestaciones extraintestinales, incluyendo artritis, uveítis o hepatopatía.

45 El diagnóstico de la EC se puede realizar endoscópica o radiológicamente, con radiografías de contraste que muestran normalmente un patrón empedrado para la mucosa, con áreas de mucosa normal alternando con áreas de

mucosa inflamada ("lesiones a saltos"). La característica patológica más importante es la afectación de todas las capas del intestino, no solo de la mucosa y la submucosa, como es característico de la CU. Una sigmoidoscopia o una colonoscopia revela que el recto está frecuentemente a salvo y que es común un predominio de colon derecho. Un noventa por ciento de los pacientes con EC presentan una afectación del íleon terminal y/o colon derecho. Es más probable que los pacientes pediátricos (aproximadamente un 20 %) presenten enfermedad limitada al intestino delgado. De forma mucho menos común, la EC afecta a las partes más proximales del tubo gastrointestinal, incluyendo la boca, la lengua, el esófago, el estómago y el duodeno.

A menudo, las estenosis y obstrucciones en personas con EC están inflamadas y frecuentemente se resuelven con tratamiento médico. Las estenosis fijas (marcadas o cicatrizadas) pueden requerir una intervención endoscópica o quirúrgica para aliviar las obstrucciones. Las fístulas y la enfermedad perianal en personas con la EC pueden ser resistentes a un tratamiento médico enérgico, incluyendo tratamiento antibiótico. A menudo se requiere una intervención quirúrgica para el tratamiento de las fístulas y la enfermedad perianal, pero ambas están asociadas con un alto riesgo alto de recidiva. El riesgo de cáncer en personas con la EC puede ser igual al de las personas con CU si todo el colon entero está afectado, y el riesgo de neoplasia maligna del intestino delgado se incrementa en personas con la EC, pero es tan probable que la neoplasia maligna surja en un área previamente normal como en un área inflamada.

El pronóstico para la EC depende de la zona y de la extensión de la enfermedad. Las remisiones y exacerbaciones periódicas son la regla. Aproximadamente un 50 % de los pacientes requieren intervención quirúrgica; un 50 % de los pacientes que experimentan cirugía requiere una segunda operación; de estos pacientes, un 50 % tiene una tercera operación. La tasa de recidiva es de un 25-50 % dentro de un año para pacientes que han respondido a un tratamiento médica. Esta tasa es más alta para pacientes que requieren cirugía.

En general, la calidad de vida es más baja con EC que con CU, en parte debido a recidivas después de cirugía realizada para la EC. La desnutrición y la anemia crónica se observan en la EC de larga duración. Los niños con EC o CU puede mostrar un retraso en el crecimiento.

Prevalencia e incidencia de la IBD

La IBD se observa más comúnmente en el norte de Europa y en América del Norte. Es una enfermedad de naciones industrializadas. En los EE.UU., aproximadamente 1 millón de personas tienen CU o EC. Antes de 1960, la incidencia registrada de CU era varias veces mayor que la de la EC. Datos más recientes sugieren que la incidencia actual de la EC se acerca a la de la CU, aunque este cambio pueda reflejar un diagnóstico y reconocimiento mejorados de la EC.

En los EE.UU., se han medido las tasas de aparición de la IBD entre personas de descendencia europea, por ejemplo, en el condado de Olmsted, Minnesota. Se notifica que en esta población, la incidencia de la CU es de 7,3 casos por 100.000 personas por año y la prevalencia es de 116 casos por 100.000 personas; la incidencia de la EC es de 5,8 casos por 100.000 personas por año y la prevalencia es de 133 casos por 100.000 personas. Se ha notificado que la incidencia de la IBD es la más alta en judíos askenazis (es decir, los que han inmigrado desde el norte de Europa), en 4-5 veces que la de la población general, seguido por poblaciones blancas no judías. Sin embargo, los datos recientes sugieren que se están incrementando las incidencias en grupos de población no judía, negra e hispánica. La proporción de hombre con respecto a mujer es aproximadamente igual tanto para CU como EC. Un estudio reciente en Italia mostró incidencias de CU y EC similares a las de los EE.UU.

La CU y la EC se diagnostican más comúnmente en adultos jóvenes (es decir, de la adolescencia tardía a la tercera década de vida). La distribución de edad de los casos de IBD nuevamente diagnosticados es de forma acampanada; la incidencia de pico se produce en personas en la parte temprana de su segunda década de vida, con la gran mayoría de los nuevos diagnósticos realizados en personas de 15-40 años de edad. Un segundo pico más pequeño se produce en pacientes de 55-65 años de edad. Sin embargo, los niños menores de 5 años y las personas ancianas se diagnostican ocasionalmente. Aproximadamente, sólo un 10 % de pacientes con IBD es menor de 18 años. La incidencia puede ser ligeramente mayor en mujeres que en hombres.

Tratamiento médico de la IBD

La asistencia a un paciente con IBD puede ser de naturaleza médica o quirúrgica, o comúnmente una combinación de ambos. Las medicaciones usadas para la IBD se dividen en diferentes clases basándose en semejanzas químicas de los agentes individuales y semejanzas en los mecanismos de acción. El enfoque médico para pacientes con IBD es la asistencia sintomática (por reagudización) y en general, sigue un enfoque escalonado para el tratamiento con medicación, con progresión del régimen médico hasta que se logra una respuesta. Con este enfoque, se usan en primer lugar los fármacos más benignos (o provisionales). Cuando no proporcionan alivio, se usan fármacos de una etapa mayor.

Los aminosalicilatos y agentes sintomáticos son fármacos de etapa I bajo este esquema; los antibióticos se consideran fármacos de etapa IA, dadas las situaciones limitadas en las que se usan. Los corticosteroides constituyen fármacos de etapa II que se usan si los fármacos de etapa I no controlan adecuadamente la IBD. Los agentes modificadores inmunológicos son fármacos de etapa III y se usan si los corticosteroides no funcionan o se requieren

durante periodos prolongados. Infliximab, un anticuerpo monoclonal contra el factor de necrosis tumoral (TNF) α , también es un fármaco de etapa III que se puede usar en algunas situaciones en pacientes con EC y CU. Los agentes experimentales son fármacos de etapa IV y sólo se usan después de que no funcionen las etapas previas, y entonces se administran sólo por médicos familiarizados con su uso. Los fármacos de todas las etapas se pueden usar de forma aditiva; en general, el objetivo es que el paciente deje los esteroides tan pronto como sea posible para evitar los efectos adversos a largo plazo de estos agentes. Las opiniones difieren en cuanto al uso de determinados agentes en este enfoque escalonado.

Etapa I (aminosalicilatos). Las preparaciones de aminosalicilatos orales disponibles para su uso en los EE.UU. incluyen sulfasalazina, mesalamina, balsalazida y olsalazina. También están disponibles formulaciones de enemas y supositorios. Todas estas son derivados del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA); las principales diferencias están en el mecanismo de suministro. Algunas de éstas también tienen efectos adversos únicos de los que carecen otros agentes de esta clase. Todos los aminosalicilatos son útiles para el tratamiento de reagudización de la IBD y para el mantenimiento de la remisión. Se ha probado que ninguno del aminosalicilatos tiene una eficacia mayor para el tratamiento de CU o EC sobre cualquiera de los otros. Todos ellos son claramente más eficaces en personas con CU que en personas con EC; en la EC, la utilidad principal es para enfermedad de colon.

Etapa IA (antibióticos). Los antibióticos metronidazol y ciprofloxacino son los antibióticos usados más comúnmente en la IBD. Los antibióticos se usan sólo con moderación en la CU porque la CU incrementa el riesgo de desarrollar colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos. Sin embargo, en la EC, se usan antibióticos para muchas indicaciones, más comúnmente para enfermedad perianal. También se usan para fístulas y masas inflamatorias en el abdomen, y pueden tener alguna eficacia en el tratamiento de ileítis. Los antibióticos tienen efectos adversos potenciales, incluyendo náusea, anorexia, diarrea, infecciones candidósicas (candidosis) y, en el caso de metronidazol, neuropatía periférica.

Etapa II (corticosteroides). Los corticosteroides son agentes antiinflamatorios de acción rápida usados en el tratamiento de la IBD sólo para la reagudización aguda de la enfermedad; los corticosteroides no tienen ningún papel en el mantenimiento de la remisión. Se pueden administrar corticosteroides por muchas vías dependiendo de la localización y de la gravedad de la enfermedad; por ejemplo, se pueden administrar por vía intravenosa (por ejemplo, metilprednisolona, hidrocortisona), por vía oral (por ejemplo prednisona, prednisolona, budesonida, dexametasona), o por vía tópica (enema, supositorio o preparados de espuma).

A menudo, se usan corticosteroides por vía intravenosa para pacientes que están gravemente enfermos y hospitalizados. En general, una vez se observa una respuesta clínica (normalmente en 1-2 días, ocasionalmente más tiempo), se puede reducir la dosis del corticosteroide por vía intravenosa. Antes del alta hospitalaria, se realiza el cambio a un corticosteroide oral; se puede llevar a cabo una reducción de dosificación adicional en un ámbito ambulatorio. De nuevo, una vez se observe una respuesta clínica, se reduce la dosis. La mayoría de los pacientes que usan corticosteroides orales sólo pueden tolerar ocasionalmente una reducción relativamente rápida después de que se logre una respuesta; ocasionalmente, es necesaria una reducción de esteroides muy prolongada para evitar una recaída. Cuando se produce la última situación, se pueden usar fármacos alternativos (modificadores inmunitarios o tratamiento anti-TNF α). Se usan corticosteroides tópicos en personas con enfermedad de colon distal de forma similar a mesalamina tópica, pero normalmente sólo para una enfermedad activa ya que los corticosteroides tópicos sólo tienen un pequeño papel en el mantenimiento de la remisión.

Las complicaciones potenciales del uso de corticosteroides son múltiples e incluyen alteraciones de fluidos y electrolitos, osteoporosis, necrosis aséptica, úlceras pépticas, cataratas, disfunciones neurológicas y endocrinas, complicaciones infecciosas, y desórdenes psiquiátricos ocasionales (incluyendo psicosis).

Etapa III (modificadores inmunitarios). Los modificadores inmunitarios azatioprina y 6-mercaptopurina (6-MP) se usan en pacientes con la IBD en los que la remisión es difícil de mantener sólo con aminosalicilatos. Los modificadores inmunitarios funcionan provocando una reducción en el recuento de linfocitos, y debido a este mecanismo de acción, el inicio de su acción es relativamente lento (normalmente de 2-3 meses). Se usan más comúnmente por su acción ahorradora de esteroides en personas con enfermedad refractaria; también se usan como tratamiento primario para fístulas y para el mantenimiento de la remisión en pacientes intolerantes de aminosalicilatos.

El uso de estos agentes exige la monitorización de parámetros sanguíneos; pueden provocar neutropenia o pancitopenia significativa, lo que garantizaría una reducción o interrupción de la dosis. Otros efectos adversos de los modificadores inmunitarios incluyen fiebre, erupción cutánea, complicaciones infecciosas, hepatitis, pancreatitis y depresión de médula ósea. La razón más común para interrumpir los modificadores inmunitarios dentro de las primeras semanas es el desarrollo de dolor abdominal; ocasionalmente, se produce una pancreatitis bioquímica demostrable. Se han planteado preocupaciones sobre el desarrollo de neoplasia maligna en pacientes que toman azatioprina y 6-MP.

Infliximab es un agente de etapa III adicional que funciona con un mecanismo diferente. Infliximab es un anticuerpo monoclonal anti-TNF α que está aprobado actualmente por la Agencia estadounidense del medicamento (FDA) tanto para CU como para EC, aunque parece que tiene una tasa de eficacia mayor en la EC. En general, se administra

infiximab como infusiones de 5 mg/kg para el tratamiento de IBD de moderada a grave. Se administra como 3 infusiones separadas de 5 mg/kg en las semanas 0, 2 y 6, a menudo seguido por dosis cada 8 semanas para el mantenimiento de la remisión. Para la EC, la tasa de respuesta es de un 80 % y la inducción de la tasa de remisión es de un 50 % después de una única dosis; con múltiples dosificaciones, se consiguen mayores tasas de remisión. Para la CU, las tasas de respuesta son de un 50-70 %. Infiximab también está indicado para el tratamiento de EC fistulizante; para esta indicación, la fístula responde (se cierra) en un 68 % de los pacientes tratados con infiximab, aunque un 12 % desarrolla un absceso. Se puede mantener la respuesta continuando una dosificación regular (es decir, cada 8 semanas) después de la dosis de inducción.

El tratamiento con infiximab es extremadamente caro y también puede provocar efectos adversos, incluyendo comúnmente hipersensibilidad y síntomas similares a la gripe. Se han notificado casos raros reacciones similares a lupus y neoplasias malignas linfoproliferativas, aunque sigue siendo incierto si las neoplasias malignas están relacionadas con el fármaco o con el proceso de enfermedad subyacente.

Etapa IV (tratamientos experimentales). Los agentes experimentales usados en la EC incluyen metotrexato (12,5-25 mg/semana por vía oral o intramuscular), talidomida (50-300 mg/día por vía oral) e interleucina 11 (1 mg/semana por vía subcutánea). Los agentes experimentales usados en la CU incluyen ciclosporina A en una dosis de 2-4 mg/kg/día por vía intravenosa (nivel de medida; se cambia a una dosificación oral en 2-3 veces la dosis intravenosa), nicotina en 14-21 mg/día por medio de parche tópico, enema de butirato (100 ml por el recto dos veces al día) y heparina (10.000 U por vía subcutánea dos veces al día). Están asociadas múltiples contraindicaciones, interacciones y precauciones con estos fármacos.

Gastritis crónica

La gastritis crónica, una inflamación crónica de la mucosa de estómago, a menudo está provocada por infección con la bacteria *Helicobacter pylori*, pero también puede estar provocada por el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), autoinmunidad, alergia u otros factores. Normalmente, la gastritis infecciosa se trata con tratamiento de fármaco múltiple, comprendiendo un antibiótico para eliminar la infección subyacente, y uno o más fármacos para tratar la mucosa inflamada. Los fármacos actuales, usados con antibióticos para tratar la gastritis infecciosa o bien solos para tratar otras formas de gastritis, son de dos clases principales: inhibidores de la bomba de protones y bloqueadores de los receptores H₂, de los que ambos actúan inhibiendo la secreción de ácido gástrico. Sin embargo, en muchos casos estos procedimientos son ineficaces o no completamente eficaces, y se necesitan nuevas modalidades de tratamiento.

Antecedentes de la invención

Se sabe que la actividad inflamatoria en la IBD provoca la activación del factor nuclear κB (NF-κB). Véase, por ejemplo, Schreiber y col. (1998) Gut 42:477-484, concluyendo que, en ambas IBD, pero particularmente en la EC, el incremento en la activación de NF-κB puede estar implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria, y que la inhibición de la activación de NF-κB puede representar un mecanismo por el que los esteroides ejercen un efecto antiinflamatorio en la IBD.

Además, se ha informado que el anticuerpo anti-TNFα infiximab, que puede ser un tratamiento eficaz para la IBD, disminuye la actividad de NF-κB, al menos en la EC (véase Guidi y col. (2005) Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 18(1):155-164).

En cambio, se ha informado que un incremento en la actividad de NF-κB precede a una recaída de los síntomas en pacientes de EC que muestran que no mantienen una respuesta a infiximab (véase Nikolaus y col. (2000) Lancet 356(9240):1475-1479).

La vía de señalización de NF-κB está implicada en un amplio rango de efectos proinflamatorios. Véase, por ejemplo, Schreiber y col. (1998), *supra*. Se sabe que la angiotensina II (AII), un miembro del sistema renina-angiotensina (RAS) y el producto primario de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), ejerce efectos proinflamatorios en una variedad de tejidos, por medio de sus receptores de tipo 1 y tipo 2 (AT₁ y AT₂ respectivamente) y, en muchos casos, finalmente a través de la activación de NF-κB, como se indica a continuación.

En la vía clásica de la síntesis de AII en el RAS circulante, el precursor de AII es angiotensinógeno, que se produce principalmente en el hígado y después se escinde por renina para formar angiotensina I (AI), que se convierte por ACE en AII, que se lleva a diferentes células diana por medio del sistema circulatorio. Véase, por ejemplo, Inokuchi y col. (2005) Gut 54:349-356, y las fuentes citadas en él. Además, se han identificado sistemas renina-angiotensina específicos de tejido en muchos órganos, lo que sugiere que diferentes tejidos tienen la capacidad de sintetizar AII independientemente del RAS circulante, incluyendo riñón, cerebro, aorta, glándula suprarrenal, corazón, estómago y colon.

Donoghue y col. (2000) Circ. Res. 87:1-9 informaron de la identificación de una carboxipeptidasa relacionada con ACE a partir de la secuenciación de una colección de ADNc de ventrículo con insuficiencia cardíaca humano. Se estableció que esta carboxipeptidasa, ACE2, era el primer homólogo humano conocido de ACE. Los autores

informaron además que los dominios catalíticos de metaloproteasa de ACE2 y ACE son un 42 % idénticos, y que, al contrario que la ACE más ubicua, los transcritos de ACE2 sólo se encuentran en el corazón, el riñón y los testículos en los 23 tejidos humanos examinados.

5 La patente de los EE.UU. n.º 6.194.556 para Acton y col. da a conocer genes novedosos que codifican ACE2. También se dan a conocer ensayos terapéuticos, diagnósticos y de exploración basados en estos genes.

10 Harmer y col. (2002) FEBS Lett. 532:107-110 informaron del mapeo cuantitativo del perfil de expresión transcripcional de ACE2 (y las dos isoformas de ACE) en 72 tejidos humanos. Aparentemente, el estudio confirmó que la expresión de ACE2 es alta en tejidos renales y cardiovasculares. También se informó que ACE2 muestra niveles de expresión comparablemente altos en el sistema gastrointestinal, en particular en el íleon, duodeno, yeyuno, intestino ciego y colon. Los autores propusieron que para probar la importancia funcional de ACE2, se debí dar alguna consideración a un papel en la fisiología y fisiopatología gastrointestinal.

Rice y col. (2003) Bull. Br. Soc. Cardiovasc. Res. 16(2):5-11 revisaron los papeles funcionales potenciales de ACE2 e indicaron que su expresión se localiza principalmente en los testículos, el riñón, el corazón y los intestinos.

15 Ferreira y Santos (2005) Braz. J. Med. Biol. Res. 38:499-507 han resumido vías importantes del RAS, incluyendo papeles de ACE y ACE2, como se muestra en la figura 1, en el presente documento.

Como evidencia de la implicación de la angiotensina II, el producto principal de ACE, en una variedad de efectos proinflamatorios, véase, por ejemplo:

20 • Phillips y Kagiyama (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3(4):569-577, que revisaron la literatura mostrando que la angiotensina II era un factor clave, por medio de la activación del factor nuclear κB (NF- κB), en la promoción de la inflamación, entre otros, en la aterosclerosis;

• Costanzo y col. (2003) J. Cell Physiol. 195(3):402-410, que informaron de la regulación por aumento por angiotensina II de moléculas de adhesión de células endoteliales implicadas en la aterosclerosis, por medio de citocinas inflamatorias a través de la activación de NF- κB activación;

25 • Sanz-Rosa y col. (2005) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 288:H111-H115, que informaron que el bloqueo en el receptor AT_1 reduce el nivel de mediadores inflamatorios vasculares y circulantes tales como NF- κB y TNF- α en hipertensión espontánea;

• Esteban y col. (2004) J. Am. Soc. Nephrol. 15:1514-1529, que informaron que la angiotensina II, por medio de AT_1 y AT_2 , activa el NF- κB y de este modo promueve la inflamación en el riñón obstruido; y

30 • Inokuchi y col. (2005), *supra*, que informaron que ratones inactivados en el gen de angiotensinógeno, que tienen niveles bajos de angiotensina II, se mejora la colitis inflamatoria inducida por el ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), y que el bloqueo del receptor AT_1 también mejoró la colitis inducida por TNBS.

Se ha postulado el antagonismo del RAS como una estrategia profiláctica para la enfermedad inflamatoria intestinal mediada inmunitaria (Inokuchi y col. (2005), *supra*).

35 Se ha encontrado que los efectos proinflamatorios del producto de ACE angiotensina II se contrarrestan generalmente por ACE2 en determinados estudios que provocan una alteración de ACE2 y/o mutantes que carecen del gen de ACE2. Véase, por ejemplo:

• Crackower y col. (2002) Nature 417(6891):822-828, que informaron que la alteración de ACE2 o la delección del gen de ACE2 en determinados modelos de rata eleva el nivel de angiotensina II;

40 • Huentelman y col. (2005) Exp. Physiol. 90(5):783-790, que informaron que la inyección de un vector que codifica ACE2 protege a los ratones naturales contra fibrosis e hipertrofia cardiaca inducida por angiotensina II; y

• Imai y col. (2005) Nature 436(7047):112-116, que informaron que la delección del gen de ACE o dar la proteína ACE2 a ratones naturales protege contra la lesión de pulmón aguda inducida por ácido.

Se ha encontrado que el producto primario de ACE2, concretamente angiotensina (1-7), por medio de su receptor (Mas), se opone a las funciones del producto de ACE angiotensina II. Véase, por ejemplo:

45 • Guy y col. (2005) Biochim. Biophys. Acta 1751(1):2-8, que revisaron la literatura indicando, entre otros, que ACE2 regula la función cardiaca y renal por el control de niveles de angiotensina II relativos a angiotensina (1-7), y por lo tanto, puede contrarrestar los efectos de ACE dentro del RAS;

50 • Ferreira y Santos (2005), *supra*, que revisaron la literatura indicando, entre otros que los beneficios de los inhibidores de ACE pueden ser en parte mediados por el producto de ACE2 angiotensina (1-7), con niveles de plasma que se incrementan mucho después de la administración crónica de inhibidores de ACE;

• Mendes y col. (2005) Regul. Pept. 125(1-3):29-34, que informaron que la infusión de angiotensina (1-7) reduce los niveles de angiotensina II en el corazón y postularon que esta reducción puede contribuir a efectos beneficiosos de angiotensina (1-7); y

5 • Tallant y Clark (2003) Hypertension 42:574-579, que informaron que la angiotensina (1-7) reduce el crecimiento de músculo liso después de lesión vascular, y contrarresta la estimulación por angiotensina II del crecimiento y la actividad de cinasa de proteína activada por mitógeno (MAP) en células de músculo liso vascular de ratas.

Por tanto, parece que niveles bajos de angiotensina II mejoran la colitis inflamatoria (Inokuchi y col. (2005), *supra*), y parece que la actividad de ACE2 contrarresta los efectos inflamatorios de angiotensina II en una variedad de tejidos, ya sea incrementando los niveles de angiotensina (1-7) o bien reduciendo los niveles de angiotensina II o ambos.

10 Por lo tanto, en un supuesto, la promoción de la actividad de ACE2 podría ser de interés para reducir la inflamación en enfermedades tales como la IBD. Huentelman y col. (2004) Hypertension 44:903-906 propusieron, de forma parecida, que la activación *in vivo* de ACE2 podría conducir a la protección y al tratamiento exitoso de la hipertensión y de otras enfermedades cardiovasculares, contrarrestando los efectos vasoconstrictores potentes de la angiotensina II.

15 La patente de los EE.UU. n.º 6.194.556 citada anteriormente, que da a conocer genes novedosos que codifican ACE2, propone en la columna 60, línea 36-54 que: "Aún otras enfermedades o afecciones en las que se sobreproduce bradicinina y en las que pueden ser útiles tratamientos de agonistas de ACE-2 que pueden inactivar bradicinina incluyen afecciones patológicas tales como choque septicémico y hemorrágico, anafilaxis, artritis, rinitis, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis, y otras afecciones que incluyen pancreatitis aguda, síndrome de evacuación gástrica rápida post-gastrectomía, síndrome carcinoideo, migraña, y angioedema hereditario"

20 (referencias omitidas).

En la técnica se han descrito agentes que inhiben, en lugar de promover, la actividad de ACE2. Por ejemplo, Huentelman y col. (2004), *supra*, notificaron esfuerzos para identificar compuestos inhibidores de ACE2 que inhiben la infección por SARS-CoV, el coronavirus responsable del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), para el que se ha encontrado que ACE2 es un receptor funcional. Entre los compuestos así identificados estaban NAAE

25 (N-(2-aminoetil)-1-aziridina-etanamina).

La patente de los EE.UU. n.º 6.900.033 para Parry y col. da a conocer péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos específicos que se dice que se unen específicamente a la proteína de ACE2 o a polipéptidos similares a ACE2. Se propone en la columna 53, líneas 63-65 del mismo que "un nivel de a[n]giotensina II anormalmente alto podría resultar de la actividad anormalmente baja de ACE-2" y en la columna 63, línea 21-32 del mismo que "los polipéptidos de unión a ACE-2 ... que activan la transducción de señal inducida por ACE-2 se pueden administrar a un animal para tratar, evitar o mejorar una enfermedad o trastorno asociado a expresión de ACE-2, carencia de función de ACE-2, expresión de sustrato de ACE-2 aberrante o carencia de función de sustrato de ACE-2. Estos polipéptidos de unión a ACE-2 pueden potenciar o activar todas o bien un subconjunto de las actividades biológicas de la acción del sustrato mediado por ACE-2...". Además, en la columna 71, línea 26-37 del mismo, se dice que los polipéptidos

30 "de la invención" (no se especifica si de activación o inhibidores), entre otros son útiles "para tratar, evitar o mejorar la inflamación, incluyendo, pero sin limitarse a, la inflamación asociada a infección (por ejemplo, choque septicémico, septicemia o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), lesión por isquemia-reperusión, politraumatismo, dolor, letalidad por endotoxinas, artritis (por ejemplo, artrosis y artritis reumatoide), rechazo hiperagudo mediado por el complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citocinas y quimiocinas, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, y que resulta de la sobreproducción de citocinas (por ejemplo, TNF o IL-1)." Por separado, los péptidos de unión a ACE2 que se ha notificado que inhiben ACE2 *in vitro* se identifican en la tabla 2 en las columnas 127-130 del mismo.

35

40

Huang y col. (2003) J. Biol. Chem. 278(18):15532-15540 notificaron que un péptido inhibidor de ACE2 de este tipo, concretamente DX600, mostró un valor K_i de ACE2 de 2,8 nM.

45 Li y col. (2005) Am. J. Physiol. Renal Physiol. 288:F353-F362 notificaron que DX600 bloqueó la generación mediada por angiotensina I de angiotensina (1-7) en segmentos de nefronas de ratas.

La patente de los EE.UU. n.º 6.632.830 para Acton y col. da a conocer compuestos que comprenden un resto de coordinación de cinc y un resto que imita un aminoácido, que se dice que útil para modular la actividad de ACE2. Más en particular, se dan a conocer compuestos que inhiben ACE2 de una fórmula genérica presentada en él. Se dice que esos compuestos son útiles para tratar un "estado asociado a ACE-2" en un paciente. Se dice que los "estados asociados a ACE-2" incluyen tensión arterial alta y enfermedades y trastornos relacionadas con esto, en particular hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, hipertrofia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio y cardiomiopatía; estados asociados con la regulación de la proliferación de células lisas, en particular proliferación de células de músculo liso; enfermedades y trastornos renales; otros estados hiperadrenérgicos; afecciones asociadas a cinetensina incluyendo las provocadas por, o que contribuyen a, liberación de histamina anormal, por ejemplo en reacciones alérgicas locales o sistémicas que incluyen eccema, asma y choque anafiláctico; infertilidad u otros trastornos relacionados maduración de gametos; trastornos

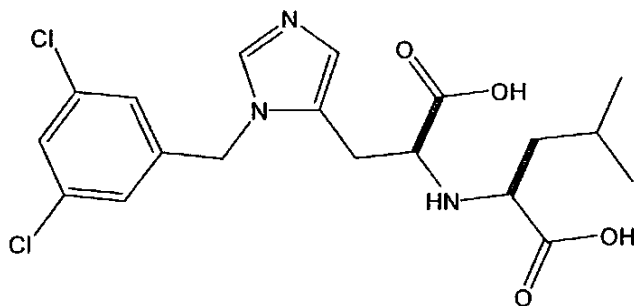
50

55

cognitivos; trastornos asociados con bradicinina y bradicinina des-Arg; y "otros ejemplos" (columna 36, línea 58-67 del mismo) que se dice que incluyen "SIRS ..., septicemia, politraumatismo, enfermedad inflamatoria intestinal, dolor agudo y crónico, destrucción ósea en artritis reumatoide y artrosis y enfermedad periodontal, dismenorrea, parto prematuro, edema cerebral tras lesión focal, lesión axónica difusa, apoplejía, lesión por reperfusión y vasoespasmo cerebral después de hemorragia subaracnoidea, trastornos alérgicos que incluyen asma, síndrome de dificultad respiratoria, cicatrización de herida y formación de cicatriz."

5

Dales y col. (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:11852-11853 notificaron valores de CI_{50} de ACE2 de un rango de estos compuestos. El más activo de éstos fue el compuesto 16, identificado en el documento como el que tiene la fórmula



10 Se prepararon los cuatro estereoisómeros del compuesto 16, y se notificó la mayor potencia para el isómero S,S, que aparentemente tenía una CI_{50} para ACE2 de 0,44 nM. El isómero S,S del compuesto anterior, ácido 2-[1-carboxi-2-[3-(3,5-diclorobencil)-3H-imidazol-4-il]-etilamino]-4-metilpentanoico, se denomina en el presente documento como GL1001 y se había denominado previamente como MLN-4760.

15 La publicación de la solicitud de patente de los EE.UU. n.º 2004/0082496 de Acton y col. da a conocer compuestos adicionales que se dice que son útiles para modular la actividad de ACE2. Los procedimientos de uso de los inhibidores y de las composiciones farmacéuticas que contienen los inhibidores para tratar un trastorno de peso corporal, para disminuir el apetito, para incrementar la masa muscular, para disminuir la grasa corporal, para tratar

- diabetes y para tratar un estado asociado a un metabolismo de lípidos alterado, también se describen.

20 La solicitud de patente internacional WO 00/66104 A da a conocer compuestos de inhibición de ACE-2 y procedimientos de uso de los compuestos y las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos.

25 La solicitud de patente internacional WO 02/098448 A da a conocer polipéptidos de unión que comprenden secuencias de aminoácidos específicas que se unen específicamente a la proteína de ACE-2 o polipéptidos similares a ACE-2. Se pueden usar los polipéptidos de unión en procedimientos para detectar, aislar, o purificar proteína de ACE-2 o polipéptidos similares a ACE-2 en soluciones o mezclas, o muestras biológicas. El documento también se refiere a procedimientos y composiciones para detectar, diagnosticar, pronosticar, evitar, tratar o mejorar una enfermedad o trastorno asociado a una expresión del receptor de ACE-2 o de ACE-2 aberrante o una función inapropiada de ACE-2 o del receptor de ACE-2, que comprende el uso de polipéptidos de unión a ACE-2 o fragmentos o variantes de los mismos, que se unen específicamente a ACE-2

30 La solicitud de patente de los EE.UU. US 2005/203164 A1 de Teitelbaum y col. da a conocer composiciones y procedimientos para tratar y evitar la enfermedad inflamatoria intestinal y otros trastornos gastrointestinales (por ejemplo, síndrome del intestino corto). En particular, el documento da a conocer procedimientos de tratamiento de síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal y otros trastornos gastrointestinales usando inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (ACE).

35 Vickers y col. (J. Biol. Chem., Vol. 277, páginas 14838-14843) han mostrado que la enzima de ACE2 hidroliza varios péptidos de sustrato, no limitados a angiotensina II. (Véase la tabla 1 en la parte superior de la página 14841). Uno de estos sustratos es Apelin-13. La inhibición de ACE2 promueve el péptido apelina disminuyendo su degradación. ACE2 retira el aminoácido carboxiterminal de apelina y esta acción disminuye la actividad de apelina.

40 Han y col. (Regul. Pept., Vol. 142, página 131-137; primera publicación electrónica en febrero de 2007, es decir, después de la fecha de prioridad de la presente solicitud, y por lo tanto que no constituye técnica anterior) han demostrado que apelina puede promover la reparación del epitelio intestinal en pacientes con colitis e IBD. Por lo tanto, se puede concluir que ACE2 es adverso para esa reparación, y por lo tanto, un inhibidor de ACE2 sería beneficioso en colitis o IBD asociada con niveles de ACE-2 altos.

Como se indica anteriormente, las farmacoterapias existentes para la IBD y la gastritis crónica tienen desventajas que incluyen una o más de eficacia mala o poco fiable, efectos secundarios adversos y alto coste. Se mantiene la

necesidad de encontrar farmacoterapias adicionales para enfermedades inflamatorias del tubo digestivo tales como la IBD y la gastritis crónica, más en particular para cualquiera o ambas de CU y EC, para ampliar el rango de opciones disponibles para el médico que trata y para el paciente de IBD o gastritis crónica.

Sumario de la invención

- 5 La presente invención proporciona un medicamento para su uso en la reducción o el alivio de inflamación o un proceso patológico asociado a ésta o secundario a ésta en un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria del tubo digestivo, caracterizado porque el medicamento comprende ácido (S,S)-2-[1-carboxi-2-[3-(3,5-diclorobencil)-3H-imidazol-4-il]etilamino]-4-metilpentanoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y se administra al sujeto en una cantidad eficaz antiinflamatoria.
- 10 La presente invención proporciona además una combinación terapéutica que comprende ácido (S,S)-2-[1-carboxi-2-[3-(3,5-diclorobencil)-3H-imidazol-4-il]etilamino]-4-metilpentanoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en aminosalicilatos, corticosteroides, inmunodepresores, agentes anti-TNF α y combinaciones de los mismos.
- 15 Se puede usar el medicamento en un procedimiento para promover la cicatrización de úlceras en la mucosa en un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria del tubo digestivo.
- Se puede usar el medicamento en un procedimiento para inducir o mantener la remisión de una enfermedad inflamatoria del tubo digestivo en un sujeto.
- De acuerdo con cada una de las realizaciones anteriores, la enfermedad inflamatoria puede ser, por ejemplo, gastritis crónica.
- 20 De forma alternativa, de acuerdo con cada una de las realizaciones anteriores, la enfermedad inflamatoria puede ser, por ejemplo, IBD, más en particular CU o EC.
- Se puede usar el medicamento en un procedimiento para evitar el tratamiento con corticosteroides en un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria intestinal refractaria a aminosalicilato, opcionalmente en tratamiento adyuvante con un aminosalicilato, pero en ausencia de corticosteroides.
- 25 Otras realizaciones, incluyendo aspectos particulares de las realizaciones resumidas anteriormente, serán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es una representación esquemática de vías enzimáticas del sistema renina-angiotensina (RAS) implicado en la generación de péptidos de angiotensina. Clave:

- 30 ACE =Enzima convertidora de angiotensina;
- AMP = aminopeptidasa;
- Ang = angiotensina;
- AT₁ = receptor de tipo 1 de angiotensina II;
- AT₁₋₇ = receptor de angiotensina (1-7);
- 35 AT₂ = receptor de tipo 2 de angiotensina II;
- D-Amp = dipeptidil aminopeptidasa;
- IRAP = aminopeptidasa reguladora de insulina;
- NEP = endopeptidasa neutra 24,11;
- PCP = prolil carboxipeptidasa;
- 40 PEP = prolil endopeptidasa.

(De Ferreira y Santos (2005), *supra*.)

La fig. 2 es una representación gráfica de la inhibición por GL1001 de la activación inducida por TNF α de NF- κ B en células indicadoras HeLa recombinantes, como se describe en el ejemplo 2.

La fig. 3 es una representación gráfica de la inhibición por GL1001 de la transcripción dependiente de NF- κ B basal *in vivo* en ratones indicadores recombinantes, como se describe en el ejemplo 3.

5 La fig4 es una representación gráfica de la inhibición por GL1001 de señalización de NF- κ B inducida por LPS *in vivo* en ratones, como se describe en el ejemplo 4. Se pretrataron los ratones con GL1001 (subcutánea) durante 1 hora antes del tratamiento con LPS . Se trataron todos los ratones con 0,1 mg/kg de LPS (i.v.). Se usó ROI abdominal para los datos cuantitativos (2,76 x 3,7 cm). Promedio \pm EEM, n=5 para cada grupo; * p<0,05, ** p<0,01, ANOVA y prueba t de Student entre tratamientos y controles.

10 La fig. 5 es una representación gráfica de la inhibición por GL1001 de señalización de NF- κ B inducida por LPS *in vivo* en ratones, como se describe en el ejemplo 4. Se pretrataron los ratones macho con GL1001 y LPS, y se sometieron a imagen, como en la fig. 4. Promedio \pm EEM, n=5 para cada grupo; * p<0,05, ** p<0,01, ANOVA y prueba t de Student entre tratamientos y controles.

La fig. 6 es una representación gráfica de la inhibición por GL1001 de la transcripción dependiente de NF- κ B inducida por LPS en órganos seleccionados de ratones indicadores recombinantes, como se describe en el ejemplo 4.

15 La fig. 7 es una representación gráfica de los resultados de diagnóstico por imagen *in vivo* y análisis de ROI abdominal. Se sometieron a imagen ratones usando diagnóstico por imagen como se analiza en el ejemplo 5. Se usó una región de interés que abarca la cavidad abdominal para el análisis de fotón. Promedio \pm EEM, n=4 grupo de agua de control, n=10 para DSS + solución salina y DSS + 100 mg/kg de GL1001. Se usaron ANOVA y prueba t de Student para someter a prueba la importancia entre los grupos de tratamiento de DSS + solución salina y DSS + GL1001.

20 La fig. 8 es una representación gráfica de los resultados que muestran la captación de fluido por ratón. Se pesaron diariamente los frascos de agua y se representó el consumo de fluido como gramos de agua consumidos por ratón, como se describe en el ejemplo 5. Promedio \pm EEM, n=4 grupo de agua de control, n=10 para DSS + solución salina y DSS + 100 mg/kg de GL1001. Se usaron ANOVA y prueba t de Student para someter a prueba la importancia entre los grupos de tratamiento de DSS + solución salina y DSS + GL1001; *p<0,05.

25 La fig. 9 es una representación gráfica de los resultados que muestran la inhibición de IBD (como se mide por índice de actividad de IBD) por GL1001. Se determinó el índice para cada ratón en cada punto de tiempo como se describe en la tabla 3 del ejemplo 5. Promedio \pm EEM; se usaron ANOVA y prueba t de Student para someter a prueba la importancia entre los grupos de tratamiento de DSS + solución salina de control y DSS + GL1001, * p<0,05, ** p<0,01.

30 La fig. 10 es una representación gráfica de los resultados que muestran un cambio de peso corporal en respuesta al tratamiento de DSS, como se describe en el ejemplo 5. Se muestran los pesos corporales relativos sobre el transcurso de tiempo del experimento. Promedio \pm EEM; se usaron ANOVA y prueba t de Student para someter a prueba la importancia entre los grupos de tratamiento de DSS + solución salina de control y DSS + GL1001; * p<0,05, ** p<0,01.

35 La fig. 11 es una representación gráfica de las medidas de proporción de peso de órgano/peso corporal que indican que los ratones tratados con GL1001 tienen una reducción en el incremento de peso de órgano inducido por DSS en comparación con los controles de DSS, como se describe en el ejemplo 5. Promedio \pm EEM; se usaron ANOVA y prueba t de Student para someter a prueba la importancia entre los grupos de tratamiento de DSS + solución salina de control y DSS + GL1001, ** p<0,01.

40 La fig. 12 es una representación gráfica de los resultados que muestran que el intestino ciego y el intestino grueso demuestran un incremento en luciferasa en el grupo de tratamiento de control de DSS en un análisis de lisado de órgano de luciferasa. El ensayo se realizó como se describe en el ejemplo 5. Promedio \pm EEM; prox = proximal, dist = distal.

45 La fig. 13 es una representación gráfica de los resultados que muestran que la administración subcutánea una vez al día de GL1001 en 100 mg/kg reduce diferentes efectos histopatológicos (inflamación, destrucción críptica y erosión o ulceración epitelial, como se mide respectivamente por puntuaciones de inflamación, glandulares y de erosión en una escala de 0-5 , y una puntuación histopatológica total) en colon distal de ratones tratados con DSS, como se describe en el ejemplo 6.

La fig. 14 presenta micrografías comparativas que muestran cambios histológicos en colon distal de ratones tratados con DSS que resultan de la administración subcutánea una vez al día de GL1001 en 100 mg/kg, como se describe en el ejemplo 6.

50 La fig. 15 es una representación gráfica de los resultados del estudio del ejemplo 7, que muestra que la administración subcutánea dos veces al día (b.i.d.) de 300 mg/kg de GL1001 reduce la pérdida de peso en porcentaje de ratones tratados con DSS. No se observa ningún efecto significativo de sulfasalazina (150 mg/kg b.i.d.).

La fig. 16 es una representación gráfica de los resultados del estudio del ejemplo 7, que muestra que la administración subcutánea dos veces al día (b.i.d.) de 300 mg/kg de GL1001 o 150 mg/kg de sulfasalazina reduce el prolapso rectal en ratones tratados con DSS.

La fig. 17 es una representación gráfica de los resultados del estudio del ejemplo 7, que muestra que la administración subcutánea dos veces al día (b.i.d.) de 300 mg/kg de GL1001 reduce la consistencia de heces en ratones tratados con DSS. No se observa ningún efecto significativo de sulfasalazina (150 mg/kg b.i.d.).

5 La fig. 18 es una representación gráfica de los resultados del estudio del ejemplo 7, que muestra que la administración subcutánea dos veces al día (b.i.d.) de 300 mg/kg de GL1001 o 150 mg/kg de sulfasalazina reduce la sangre oculta en heces en ratones tratados con DSS.

La fig. 19 es una representación gráfica de los resultados del estudio del ejemplo 7, que muestra que la administración subcutánea dos veces al día (b.i.d.) de 300 mg/kg de GL1001 o 150 mg/kg de sulfasalazina inhibe la reducción en la longitud del colon de ratones tratados con DSS.

10 La fig. 20 es una representación gráfica de los resultados del estudio del ejemplo 7, que muestra que la administración subcutánea dos veces al día (b.i.d.) de 300 mg/kg de GL1001 o 150 mg/kg de sulfasalazina reduce la puntuación de inflamación de colon distal en ratones tratados con DSS.

15 La fig. 21 es una representación gráfica de los resultados del estudio del ejemplo 7, que muestra que la administración subcutánea dos veces al día (b.i.d.) de 300 mg/kg de GL1001 o 150 mg/kg de sulfasalazina reduce la puntuación de criptas de colon distal en ratones tratados con DSS.

La fig. 22 es una representación gráfica de los resultados del estudio del ejemplo 7, que muestra que la administración subcutánea dos veces al día (b.i.d.) de 300 mg/kg de GL1001 a reduce la puntuación de erosión de colon distal en ratones tratados con DSS.

20 La fig. 23 es una representación gráfica de los resultados del estudio del ejemplo 7, que muestra que la administración subcutánea dos veces al día (b.i.d.) de 300 mg/kg de GL1001 o 150 mg/kg de sulfasalazina reduce la puntuación de histopatología total de colon distal en ratones tratados con DSS.

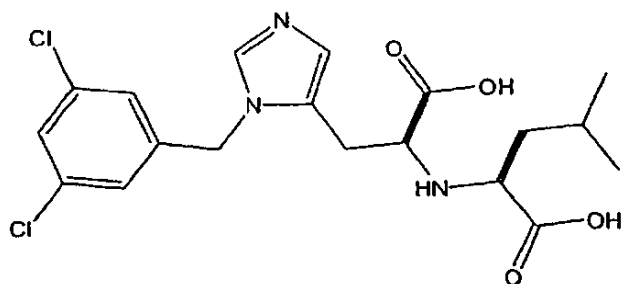
Descripción detallada

25 El inhibidor de ACE2 usado de acuerdo con la presente invención (GL1001) tiene una afinidad relativamente alta para ACE2, como se expresa, por ejemplo, por CI_{50} o K_i , ya se mida *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el inhibidor de ACE2 seleccionado es uno que muestre *in vitro* una CI_{50} de ACE2 y/o una K_i de ACE2 no mayor de aproximadamente 1000 nM, por ejemplo, no mayor de aproximadamente 500 nM, no mayor de aproximadamente 250 nM, o no mayor de aproximadamente 100 nM.

30 Se sabe que los inhibidores de ACE2 no sólo difieren en su afinidad por ACE2 sino también en su selectividad por la unión a ACE2 al contrario que la ACE más ubicua. En una realización, el inhibidor de ACE2 muestra selectividad por ACE2 frente a ACE, como se expresa por la proporción de $CI_{50}(ACE)$ con respecto a $CI_{50}(ACE2)$, de al menos aproximadamente 10^2 , por ejemplo, al menos aproximadamente 10^3 , o al menos aproximadamente 10^4 .

35 El compuesto está en la configuración (S,S) es de forma sustancial enantioméricamente puro. Por ejemplo, el compuesto puede mostrar una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, en peso de todas las formas enantioméricas del presente compuesto.

La presente invención implica el uso de ácido (S,S)-2-[1-carboxi-2-[3-(3,5-diclorobencil)-3H-imidazol-4-il]-etil-amino]-4-metilpentanoico, también conocido como GL1001, que es el enantiómero (S,S) de un compuesto que tiene la fórmula



40 como se da a conocer, por ejemplo, por Dales y col. (2002), *supra*, junto con un proceso para preparar tal compuesto. En resumen, este proceso comprende tratar éster metílico de (S)-histidina con Boc_2O para proporcionar un derivado de histidina completamente protegido. Después, se alquila selectivamente el nitrógeno de imidazol N-3 usando el triflato de alcohol 3,5-diclorobencílico. Después de la desprotección de Boc, la aminación reductora entre el derivado de histidina alquilado resultante y un β -cetoéster proporciona un compuesto de diéster de amina, que por hidrólisis

proporciona ácido 2-[1-carboxi-2-[3-(3,5-diclorobencil)-3H-imidazol-4-il]-etilamino]-4-metilpentanoico como una mezcla de diastereómeros. Se pueden separar los diastereómeros y purificar usando HPLC y cristalización.

Se pueden usar otros procesos para preparar GL1001, incluyendo, sin limitación, procesos descritos en la patente de los EE.UU. n.º 6.632.830 referenciada anteriormente.

- 5 Los procedimientos proporcionados en el presente documento son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de todo o cualquier parte o partes del tubo digestivo de un sujeto. En particular, los presentes procedimientos son útiles en el tratamiento de gastritis crónica e IBD, incluyendo CU y EC.

Un "sujeto" en el presente documento es un animal de sangre caliente, en general, un mamífero tal como, por ejemplo, un gato, perro, caballo, vaca, cerdo, ratón, rata o primate, incluyendo un ser humano. En una realización, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un paciente que tiene una enfermedad inflamatoria diagnosticada clínicamente del tubo digestivo, tal como gastritis crónica o IBD, incluyendo CU y EC. Los modelos animales en las investigaciones experimentales pertinentes a la enfermedad humana también son ejemplos de "sujetos" en el presente documento, y pueden incluir por ejemplo roedores (por ejemplo, ratón, rata, cobaya), lagomorfos (por ejemplo, conejo), carnívoros (por ejemplo, gato, perro), o primates no humanos (por ejemplo, mono, chimpancé). Además, el sujeto puede ser un animal (por ejemplo, un animal doméstico, de granja, de trabajo, de competición o de zoológico) en asistencia veterinaria.

Varios compuestos útiles de acuerdo con la presente invención tienen restos ácidos y/o básicos que, bajo condiciones adecuadas, pueden formar sales con ácidos adecuados. Por ejemplo, GL1001 tiene dos restos ácido que, bajo condiciones adecuadas, puede formar sales con bases adecuadas, y un grupo amino que, bajo condiciones adecuadas, puede formar sales con ácidos adecuados. También se pueden formar sales internas. Se puede usar el compuesto en su forma de ácido/base libre o en forma de una sal interna, una sal de adición del ácido o una sal con una base.

Las sales de adición de ácido se pueden formar de forma ilustrativa con ácidos inorgánicos tales como ácidos minerales, por ejemplo ácido sulfúrico, ácidos fosfóricos o ácidos halohídricos (por ejemplo, clorhídrico o bromhídrico); con ácidos carboxílicos orgánicos tales como (a) ácidos alcano-C₁₋₄-carboxílicos que pueden estar sustituidos o no sustituidos (por ejemplo, halosustituidos), por ejemplo, ácido acético, (b) ácidos dicarboxílicos sustituidos o no sustituidos, por ejemplo ácidos oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tereftálico, (c) ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácidos ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico, (d) aminoácidos, por ejemplo ácidos aspártico o glutámico, o (e) ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos tales como ácidos alcano-C₁₋₄-sulfónicos o arilsulfónicos que pueden estar no sustituidos (por ejemplo, halosustituidos), por ejemplo, ácido metanosulfónico o ácido p-toluensulfónico.

Las sales con bases adecuadas incluyen sales metálicas, tales como sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, por ejemplo sales de sodio, potasio o magnesio, o sales con amoniaco o una amina orgánica, tales como morfolina, tiomorfolina, piperidina, pirrolidina, una mono, di o tri-alquilamina inferior, por ejemplo etilamina, terc-butilamina, dietilamina, diisopropilamina, trietilamina, tributilamina o dimetilpropilamina, o una mono, di o tri-(hidroxi alquilo inferior)amina, por ejemplo monoetanolamina, dietanolamina o trietanolamina.

De forma alternativa, se puede usar un profármaco del compuesto o una sal de este profármaco. Un profármaco es un compuesto, normalmente que tiene por sí mismo una actividad débil o no farmacéutica, que se escinde, se metaboliza o de otro modo se convierte en el cuerpo de un sujeto en un compuesto activo, en este caso un compuesto inhibidor de ACE2. Ejemplos de profármacos son ésteres, en particular ésteres de alcanóilo y más en particular ésteres de alcanóilo C₁₋₆. Otros ejemplos incluyen carbamatos, carbonatos, cetales, acetales, fosfatos, fosfonatos, sulfatos y sulfonatos. Se dan a conocer diferentes profármacos de GL1001, y procedimientos para preparar estos profármacos, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. n.º 6.632.830 y en la solicitud de patente publicada de los EE.UU. n.º 2004/0082496 anteriormente referenciadas.

El inhibidor de ACE2 (GL1001) debería administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad antiinflamatoriamente eficaz. Lo que constituye una cantidad terapéuticamente o antiinflamatoriamente eficaz depende de varios factores, incluyendo la edad y el peso corporal del sujeto particular, la naturaleza, estadio y gravedad de la enfermedad, el efecto particular buscado (por ejemplo, reducción de la inflamación, alivio de síntomas, mantenimiento de la remisión, etc.) y otros factores, pero para la mayoría de los sujetos, sería adecuada una cantidad de dosificación de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5000 mg/día, más normalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 mg/día. En realizaciones particulares, la dosificación empleada es de aproximadamente 10 a aproximadamente 800 mg/día, de aproximadamente 50 a aproximadamente 750 mg/día o de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 mg/día; de forma ilustrativa de aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 15,0, aproximadamente.200, aproximadamente 25,0, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 550, aproximadamente 600, aproximadamente 650, aproximadamente 700 o aproximadamente 750 mg/día.

Cuando se usa una sal o profármaco del compuesto inhibidor de ACE2, la cantidad administrada debería ser una cantidad que suministre una dosificación diaria del compuesto como se indicó anteriormente.

Por tanto, un procedimiento para tratar una enfermedad inflamatoria del tubo digestivo en un sujeto puede comprender administrar al sujeto el inhibidor de ACE2 (GL1001) en una cantidad de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5000 mg/día, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 mg/día, de aproximadamente 10 a aproximadamente 800 mg/día, de aproximadamente 50 a aproximadamente 750 mg/día o de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 mg/día; de forma ilustrativa de aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 550, aproximadamente 600, aproximadamente 650, aproximadamente 700 o aproximadamente 750 mg/día.

Las dosificaciones anteriores se dan sobre una base *per diem* pero no se debe interpretar que se tenga que administrar necesariamente con una frecuencia de una vez al día. De hecho el compuesto, o sal o profármaco del mismo, se puede administrar en cualquier frecuencia adecuada, por ejemplo como se determina convencionalmente por un médico teniendo en cuenta varios factores, pero de forma típica aproximadamente cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, cada dos días, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes o una vez al mes. El compuesto, o sal o profármaco del mismo, se puede administrar de forma alternativa más o menos continuamente, por ejemplo, por infusión parenteral en un ambiente de hospital. En algunas situaciones, se puede administrar una única dosis, pero más normalmente, la administración es de acuerdo con un régimen que implique una dosificación repetida durante un periodo de tratamiento. En un régimen de este tipo, la dosificación diaria y/o la frecuencia de administración se puede variar, si se desea, durante el transcurso del periodo de tratamiento, por ejemplo, introduciendo al sujeto el compuesto en una dosis relativamente baja y después incrementando la dosis en uno o más etapas hasta que se alcanza una dosis completa.

En general, el periodo de tratamiento duran tanto como se necesite para lograr un resultado deseado, por ejemplo, inducción o mantenimiento de la remisión, alivio de los síntomas, etc. En algunas situaciones será útil administrar el fármaco de forma intermitente, por ejemplo, durante periodos de tratamiento de días, semanas o meses separado por periodos sin tratamiento. Esta administración intermitente se puede controlar, por ejemplo, para corresponder con reagudizaciones de la enfermedad.

La administración puede ser por cualquier vía adecuada, incluyendo sin limitación las vías oral, bucal, sublingual, intranasal, intraocular, rectal, vaginal, transdérmica o parenteral (por ejemplo, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratraqueal, intraventricular, intraperitoneal, etc.), e incluyendo por inhalación o implantación.

Mientras sea posible administrar el compuesto, o una sal o profármaco del mismo no formulado como ingrediente farmacéutico activo (API) solo, en general será preferible administrar el API en una composición farmacéutica que comprenda el API y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. El/Los excipiente(s) en conjunto proporcionan un vehículo o portador para el API. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para todas las vías de administración posibles se conocen bien en la técnica y se pueden preparar de acuerdo con los principios y procedimientos fijados en los manuales y textos estándares tales como los citados individualmente a continuación.

USIP, ed. (2005) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª ed., Lippincott, Williams y Wilkins.

Allen y col. (2004) Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8ª ed., Lippincott, Williams y Wilkins.

Se describen excipientes adecuados, por ejemplo, en Kibbe, ed. (2000) Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª ed., American Pharmaceutical Association.

Los ejemplos de formulaciones que se pueden usar como vehículos para el suministro del API en la práctica de la presente invención incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, píldoras, pastillas para chupar, gomas de mascar, cremas, ungüentos, geles, preparaciones liposomales, preparaciones nanoparticuladas, preparaciones inyectables, enemas, supositorios, polvos inhalables, líquidos pulverizables, aerosoles, parches, depósitos e implantes.

De forma ilustrativa, en una formulación líquida adecuada, por ejemplo, para suministro parenteral, intranasal u oral, el API puede estar presente en solución o suspensión, o en alguna otra forma de dispersión, en un medio líquido que comprende un diluyente tal como agua. Los excipientes adicionales que pueden estar presentes en una formulación de este tipo incluyen un agente tonificante, un tampón (por ejemplo, un tampón de tris, fosfato, imidazol o bicarbonato), un agente de dispersión o suspensión y/o un conservante. Una formulación de este tipo puede contener micro- o nanoparticulados, micelas y/o liposomas. Una formulación parenteral se puede preparar en forma reconstituible seca, requiriendo la adición de un vehículo líquido tal como agua o solución salina antes de la administración por inyección.

Para suministro rectal, el API puede estar presente en forma dispersada en un líquido adecuado (por ejemplo, como un enema), un medio semi-sólido (por ejemplo, como una crema o ungüento) o sólido (por ejemplo, como un supositorio). El medio puede ser hidrófilo o lipófilo.

5 Para suministro oral, el API puede estar formulado en forma líquida o sólida, por ejemplo, como forma de dosificación unitaria sólida tal como un comprimido o cápsula. Una forma de dosificación de este tipo comprende normalmente como excipientes uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables, agentes de unión, disgregantes, agentes humectantes y/o agentes antifricción (lubricantes, antiadherentes y/o deslizantes). Muchos excipientes tienen dos o más funciones en una composición farmacéutica. En el presente documento, la caracterización de que un excipiente particular tiene una determinada función, por ejemplo, diluyente, agente de unión, disgregante, etc., no se debe ver como limitante de esa función.

10 Los diluyentes adecuados de forma ilustrativa incluyen, individualmente o bien en combinación, lactosa, incluyendo lactosa anhidra y monohidrato de lactosa; lactitol; maltitol; manitol; sorbitol; xilitol; dextrosa y monohidrato de dextrosa; fructosa; sacarosa y diluyentes a base de sacarosa tales como azúcar compresible, azúcar de pastelería y esferas de azúcar; maltosa; inositol; sólidos de cereales hidrolizados; almidones (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, almidón de tapioca, etc.), componentes de almidón tales como amilosa y dextratos, y almidones modificados o procesados tales como almidón pregelatinizado; dextrinas; celulosas incluyendo celulosa pulverizada, celulosa microcristalina, celulosa microcristalina silicificada, fuentes de grado alimenticio de celulosa α y amorfa y celulosa pulverizada, y acetato de celulosa; sales de calcio incluyendo carbonato de calcio, fosfato de calcio tribásico, dihidrato de fosfato de calcio dibásico, monohidrato de sulfato de calcio monobásico, sulfato de calcio y trihidrato de lactato de calcio granular; carbonato de magnesio; óxido de magnesio; bentonita; caolín; cloruro de sodio; y similares. Estos diluyentes, si están presentes, constituyen normalmente en total de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 99 %, por ejemplo de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 85 %, o de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 80 %, en peso de la composición. El diluyente o diluyentes seleccionados preferentemente muestran propiedades de flujo adecuadas y, cuando se deseen comprimidos, compresibilidad.

La lactosa, la celulosa microcristalina y el almidón, individualmente o bien en combinación, son diluyentes particularmente útiles.

30 Los agentes de unión o adhesivos son excipientes útiles, particularmente cuando la composición está en forma de un comprimido. Estos agentes de unión y adhesivos deberían impartir cohesión suficiente a la mezcla con la que se forman comprimidos para permitir operaciones de procesamiento normal tales como dimensionamiento, lubricación, compresión y envasado, pero que permita que el comprimido se desintegre y que la composición se absorba después de la ingestión. Agentes de unión y adhesivos adecuados incluyen, individualmente o bien en combinación, goma arábica; tragacanto; glucosa; polidextrosa; almidón incluyendo almidón pregelatinizado; gelatina; celulosas modificadas incluyendo metilcelulosa, carmelosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC o hipromelosa), hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa y etilcelulosa; dextrinas incluyendo maltodextrina; zeína; ácido algínico y sales de ácido algínico, por ejemplo, alginato de sodio; silicato de aluminio y magnesio; bentonita; polietilenglicol (PEG); óxido de polietileno; goma guar; ácidos polisacáridos; polivinilpirrolidona (povidona), por ejemplo povidona K-15, K-30 y K-29/32; ácidos poliacrílicos (carbómeros); polimetacrilatos; y similares. Uno o más agentes de unión y/o adhesivos, si están presentes, constituyen normalmente en total de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 25 %, por ejemplo de aproximadamente un 0,75 % a aproximadamente un 15 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %, en peso de la composición.

40 La povidona es un agente de unión particularmente útil para formulaciones de comprimido, y, si está presente, constituye normalmente de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 15 %, por ejemplo, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 8 %, en peso de la composición.

50 Los disgregantes adecuados incluyen, individualmente o bien en combinación, almidones incluyendo almidón pregelatinizado y glicolato de almidón de sodio; arcillas; silicato de aluminio y magnesio; disgregantes a base de celulosa tales como celulosa pulverizada, celulosa microcristalina, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, carmelosa, carmelosa de calcio, carmelosa de sodio y croscarmelosa de sodio; alginatos; povidona; crospovidona; polacrilina de potasio; gomas tales como gomas agar, guar, algarroba, karaya, pectina y tragacanto; dióxido de silicio coloidal; y similares. Uno o más disgregantes, si están presentes, constituyen normalmente en total de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 30 %, por ejemplo de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 5 %, en peso de la composición.

55 La croscarmelosa de sodio y crospovidona, individualmente o bien en combinación, son disgregantes particularmente útiles para formulaciones de comprimido o cápsula, y, si están presentes, constituyen normalmente en total de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 10 %, por ejemplo de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 7 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, en peso de la composición.

Los agentes humectantes, si están presentes, se seleccionan normalmente para mantener el fármaco o fármacos en asociación cercana con agua, una condición que se cree que mejora la biodisponibilidad de la composición. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos que se pueden usar como agentes humectantes incluyen, individualmente o bien en combinación, compuestos de amonio cuaternario, por ejemplo cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y cloruro de cetilpiridinio; dioctilsulfosuccinato de sodio; alquilfenil éteres de polioxietileno, por ejemplo nonoxinol 9, nonoxinol 10 y octoxinol 9; poloxámeros (copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno); glicéridos de ácidos grasos de polioxietileno y aceites, por ejemplo mono y diglicéridos caprílicos/cápricos de polioxietileno (8), aceite de ricino de polioxietileno (35) y aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno (40); alquil éteres de polioxietileno, por ejemplo ceteth-10, laureth-4, laureth-23, oleth-2, oleth-10, oleth-20, steareth-2, steareth-10, steareth-20, steareth-100 y (20) cetostearyl éter de polioxietileno; ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, por ejemplo estearato de polioxietileno (20), estearato de polioxietileno (40) y estearato de polioxietileno (100); ésteres de sorbitano; ésteres de sorbitano de polioxietileno, por ejemplo polisorbato 20 y polisorbato 80; ésteres de ácidos grasos de propilenglicol, por ejemplo laurato de propilenglicol; laurilsulfato de sodio; ácidos grasos y sales de los mismos, por ejemplo ácido oleico, oleato de sodio y oleato de trietanolamina; ésteres de ácidos grasos de glicerilo, por ejemplo monooleato de glicerilo, monostearato de glicerilo y palmitoestearato de glicerilo; ésteres de sorbitano, por ejemplo monolaurato de sorbitano, monooleato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano y monoestearato de sorbitano; tiloxapol; y similares. Uno o más agentes humectantes, si están presentes, constituyen normalmente en total de aproximadamente un 0,25 % a aproximadamente un 15 %, preferentemente de aproximadamente un 0,4 % a aproximadamente un 10 %, y más preferentemente de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 5 %, en peso de la composición.

Los agentes humectantes que son tensioactivos aniónicos son particularmente útiles. De forma ilustrativa, el lauril sulfato de sodio, si está presente, constituye normalmente de aproximadamente un 0,25 % a aproximadamente un 7 %, por ejemplo de aproximadamente un 0,4 % a aproximadamente un 4 %, o de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 2 %, en peso de la composición.

Los lubricantes reducen la fricción entre una mezcla para formar comprimidos y el equipo para formar comprimidos durante la compresión de las formulaciones de comprimido. Los lubricantes adecuados incluyen, individualmente o bien en combinación, behenato de glicerilo; ácido esteárico y sales del mismo, incluyendo estearatos de magnesio, calcio y sodio; aceites vegetales hidrogenados; palmitoestearato de glicerilo; talco; ceras; benzoato de sodio; acetato de sodio; fumarato de sodio; estearil fumarato de sodio; PEG (por ejemplo, PEG 4000 y PEG 6000); poloxámeros; alcohol polivinílico; oleato de sodio; lauril sulfato de sodio; lauril sulfato de magnesio; y similares. Uno o más lubricantes, si están presentes, constituyen normalmente en total de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 10 %, por ejemplo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 8 %, o de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 5 %, en peso de la composición. El estearato de magnesio es un lubricante particularmente útil.

Los antiadherentes reducen la adhesión de una formulación de comprimido a las superficies del equipo. Los antiadherentes adecuados incluyen, individualmente o bien en combinación, talco, dióxido de silicio coloidal, almidón, DL-leucina, lauril sulfato de sodio y estearatos metálicos. Uno o más antiadherentes, si están presentes, constituyen normalmente en total de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, por ejemplo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 %, o de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 2 %, en peso de la composición.

Los deslizantes mejoran las propiedades de flujo y reducen las estáticas en una mezcla para formar comprimidos. Los deslizantes adecuados incluyen, individualmente o bien en combinación, dióxido de silicio coloidal, almidón, celulosa pulverizada, lauril sulfato de sodio y trisilicato de magnesio y estearatos metálicos. Uno o más deslizantes, si están presentes, constituyen normalmente en total de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, por ejemplo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 %, o de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 2 %, en peso de la composición.

El talco y el dióxido de silicio coloidal, individualmente o bien en combinación, son antiadherentes y deslizantes particularmente útiles.

Se conocen otros excipientes tales como agentes de tamponación, estabilizadores, antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, aromatizantes y edulcorantes en la técnica farmacéutica y se pueden usar. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden comprender un núcleo que esté recubierto, por ejemplo con una película no funcional o un recubrimiento que modifica la liberación o entérico. Las cápsulas pueden tener envolturas duras o blandas que comprenden, por ejemplo, gelatina y/o HPMC, opcionalmente junto con uno o más plastificantes.

Una composición farmacéutica útil en el presente documento contiene normalmente el compuesto o sal o profármaco del mismo en una cantidad de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 %, más normalmente de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 90 % o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 60 %, en peso de la composición. Una forma de dosificación unitaria tal como un comprimido o cápsula puede contener convenientemente una cantidad del compuesto proporcionando una única dosis, aunque cuando la dosis requerida es mayor, puede ser necesario o deseable administrar una pluralidad de formas de dosificación como una única dosis. De forma ilustrativa, una forma de dosificación unitaria puede comprender el compuesto en una cantidad de

aproximadamente 10 a aproximadamente 800 mg, por ejemplo de aproximadamente 50 a aproximadamente 750 mg o de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 mg; o, en ejemplos ilustrativos particulares, de aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 550, aproximadamente 600, aproximadamente 650, aproximadamente 700 o aproximadamente 750 mg.

A menos que el contexto lo demande de otro modo, el término "tratar" "tratando" o "tratamiento" en el presente documento incluye el uso preventivo o profiláctico de un agente, por ejemplo un inhibidor de ACE2, en un sujeto con riesgo de, o que tiene un pronóstico que incluye, una enfermedad inflamatoria del tubo digestivo, así como el uso de un agente de este tipo en un sujeto que ya ha experimentado una enfermedad de este tipo, como tratamiento para aliviar, mitigar, reducir la intensidad de o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad o una causa subyacente de la misma. Por lo tanto, el tratamiento incluye (a) evitar que se produzca un estado o enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto al estado o enfermedad pero en el que el estado o enfermedad aún no se ha diagnosticado; (b) inhibir el estado o enfermedad, incluyendo detener su desarrollo; y/o (c) mitigar, aliviar o mejorar el estado o enfermedad, o signos y síntomas primarios o secundarios del mismo, incluyendo promover, inducir o mantener la remisión de la enfermedad.

De acuerdo con procedimientos de la invención, se ha encontrado sorprendentemente que un inhibidor de ACE2, GL1001, inhibe la activación inducida de TNF α de NF- κ B en células indicadoras HeLa recombinantes. Este hallazgo se notifica con mayor detalle a continuación en el ejemplo 2. Se podría predecir que el efecto de un inhibidor de ACE2 en el sistema de renina-angiotensina (RAS) implique un incremento en el nivel de angiotensina II (véase la fig. 1), que, como se indica anteriormente está implicado en una variedad de efectos proinflamatorios. Los presentes inventores han encontrado, en contra de esta predicción, que la activación de NF- κ B, un mediador clave para la síntesis de citocinas proinflamatorias, no se promueve pero se inhibe por el inhibidor de ACE2 .

Además se ha encontrado sorprendentemente que el inhibidor de ACE2 GL1001 inhibe la transcripción dependiente de NF- κ B basal *in vivo* en ratones indicadores recombinantes. Este hallazgo se notifica con mayor detalle a continuación en el ejemplo 3, y parece que apoyar además un efecto antiinflamatorio del inhibidor de ACE2 que es contrario a lo esperado basado en la comprensión actual del papel de ACE2 en el RAS.

También se ha encontrado sorprendentemente que en un modelo de ratón para IBD (el modelo de ratón de dextrano sulfato de sodio (DSS)), la administración del inhibidor de ACE2 GL1001 retrasó la progresión de la enfermedad. Esto es una fuerte evidencia que sugiere la efectividad terapéutica de los inhibidores de ACE2 en la IBD humana.

También se ha encontrado sorprendentemente que la expresión de ARNm de ACE2 en tejidos del tubo digestivo se eleva de forma especialmente fuerte en gastritis crónica. Por consiguiente, se contempla que la elevación de ACE2 en gastritis crónica es un factor patógeno potencial en esa enfermedad y que la administración de un inhibidor de ACE2 tal como GL1001 es beneficioso en el tratamiento de gastritis crónica.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene la enfermedad de Crohn (EC). La EC puede estar activa o en remisión. El grado de actividad de la EC se puede cuantificar usando cualquier índice o puntuación adecuado. Se han revisado diferentes índices, por ejemplo, por Naber y de Jong (2003) *Neth. J. Med.* 61(4):105-110.

"Índice de actividad" como se usa en el presente documento para la enfermedad de Crohn se define como el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI) desarrollado por Best y col. (1976) *Gastroenterology* 70(3):439-444. Un índice de actividad no menor de aproximadamente 220 se asocia generalmente con EC activa.

Para un sujeto que tiene EC activa, el inhibidor de ACE2 se puede administrar de acuerdo con un régimen, incluyendo dosis, frecuencia y periodo de tratamiento, eficaces para lograr una disminución clínicamente significativa en el índice de actividad. En diferentes realizaciones, se obtiene una disminución de al menos aproximadamente 30 puntos, al menos aproximadamente 50 puntos, al menos aproximadamente 70 puntos o al menos aproximadamente 90 puntos en el índice de actividad. La disminución, de acuerdo con algunas realizaciones, es suficiente para llevar el índice de actividad por debajo de aproximadamente 220 o para lograr una remisión clínica de la EC.

El sujeto que tiene EC puede tener, en algunas realizaciones, EC fistulizante. En ese caso, el inhibidor de ACE2 se puede administrar de acuerdo con un régimen, incluyendo dosis, frecuencia y periodo de tratamiento, eficaz por ejemplo para lograr una reducción en fistulas drenantes o para mantener el cierre de la fístula.

El sujeto que tiene EC, en algunas realizaciones, es un paciente pediátrico.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene colitis ulcerosa (CU). La CU puede estar activa o en remisión. Se puede cuantificar el grado de actividad de la CU usando cualquiera de los índices disponibles para esta enfermedad, incluyendo la puntuación de Mayo como se referencia por Naber y de Jong (2003), *supra*.

Los procedimientos de la presente invención pueden ser útiles, por ejemplo, en sujetos que tienen CU de moderadamente a severamente activa, mostrando normalmente una puntuación de Mayo no menor de

- aproximadamente 6. Para ese sujeto, el inhibidor de ACE2 se puede administrar de acuerdo con un régimen, incluyendo dosis, frecuencia y periodo de tratamiento, eficaces para lograr una disminución clínicamente significativa en la puntuación de Mayo. En diferentes realizaciones, se obtiene una disminución de al menos aproximadamente 2 puntos, al menos aproximadamente 3 puntos, al menos aproximadamente 4 puntos o al menos aproximadamente 5 puntos; o una disminución de al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 % o al menos aproximadamente un 50 %, en la puntuación de Mayo. En una realización, se obtiene una disminución de al menos aproximadamente un 30 % y al menos aproximadamente 3 puntos. La disminución, de acuerdo con algunas realizaciones, es suficiente para llevar la puntuación de Mayo por debajo de aproximadamente 6 o para lograr una remisión clínica de la CU.
- 5 El sujeto que tiene CU puede tener cualquiera de las variantes o tipos conocidos de CU, incluyendo proctitis ulcerosa, colitis de lado izquierdo, pancolitis y colitis fulminante. En pacientes con colitis fulminante, el tratamiento de acuerdo con los presentes procedimientos puede reducir el riesgo de complicaciones serias tales como rotura de colon y megacolon tóxico.
- 10 Los procedimientos de la invención también pueden ser útiles en sujetos que tienen IBD (EC o bien CU) que esté en un periodo de inactividad o remisión. Para estos sujetos, el inhibidor de ACE2 se puede administrar de acuerdo con un régimen, incluyendo dosis, frecuencia y periodo de tratamiento, eficaces para lograr una prolongación del periodo de inactividad o remisión.
- 15 En algunas realizaciones, la administración del inhibidor de ACE2 se asocia con o da como resultado un alivio de al menos un signo o síntoma de la IBD. Los ejemplos de signos o síntomas que se pueden aliviar incluyen, sin limitación, diarrea (que puede ser suficientemente grave como para dar como resultado deshidratación e incluso choque), heces sueltas, dolor abdominal (que puede ser de moderado a grave y se puede acompañar por náusea y/o vómito), cólico abdominal, dolor rectal, tenesmo, hemorragia rectal, sangre en heces (incluyendo sangre oculta en los casos menos graves), apetito reducido, pérdida de peso, y combinaciones de los mismos. Los síntomas secundarios que también se pueden aliviar incluyen fiebre, sudores nocturnos, fatiga e inflamación que se extiende fuera del tubo digestivo, por ejemplo hasta las articulaciones (artritis) y/o piel.
- 20 En una realización más particular, se alivia al menos un signo o síntoma seleccionado de diarrea, hemorragia rectal, pérdida de peso y combinaciones de los mismos.
- 25 En varias realizaciones, el sujeto tiene la IBD (EC o bien CU) esto es, o se ha vuelto, refractaria a un tratamiento de referencia que comprende la administración de una dosis completa de al menos un fármaco de referencia seleccionado del grupo que consta de aminosalicilatos, corticosteroides, inmunodepresores, antibióticos y combinaciones de los mismos. El tratamiento de referencia para el que el sujeto es refractario puede comprender un tratamiento de primera línea o segunda línea.
- 30 Se cree, sin estar limitado a la teoría, que los inhibidores de ACE2 tienen un mecanismo de acción sobre la IBD que es diferente del de los fármacos de referencia. La utilidad de los inhibidores de ACE2 en el tratamiento de la IBD refractaria puede reflejar en cierta medida este mecanismo de acción diferente, pero no se basa en él.
- 35 En un sujeto con IBD refractaria, el inhibidor de ACE2 se puede administrar en monoterapia o conjuntamente con el tratamiento de referencia o con una porción del mismo. En una realización, por ejemplo, el inhibidor de ACE2 se administra, al menos inicialmente, conjuntamente con el tratamiento de referencia. En otra realización, el inhibidor de ACE2 se administra conjuntamente con el al menos un fármaco de referencia, que se administra en menos de una dosis completa. En otra realización más, el inhibidor de ACE2 se administra conjuntamente con el al menos un fármaco de referencia de acuerdo con un régimen, incluyendo dosis, frecuencia y periodo de tratamiento, en el que, después de lograr una remisión clínica de la IBD, el al menos un fármaco de referencia se retira. La retirada del al menos un fármaco de referencia se puede implementar todo de una vez, pero se implementa más típicamente durante un periodo de tiempo por reducción de dosis reducida o escalonada.
- 40 La retirada, por ejemplo por reducción de dosis reducida, a menudo es especialmente deseable cuando el al menos un fármaco de referencia comprende un corticosteroide, debido a los efectos secundarios adversos que pueden acompañar el uso prolongado de un fármaco de este tipo.
- 45 En otra realización, el inhibidor de ACE2 se administra a un sujeto que tiene IBD esto es, o que se ha vuelto, refractaria a un tratamiento de primera línea que comprende un aminosalicilato, realizando esta administración en lugar de un corticosteroide. Por lo tanto se proporciona un procedimiento para evitar el tratamiento con corticosteroides en un sujeto que tiene IBD refractaria a aminosalicilatos, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de ACE2, opcionalmente en tratamiento adyuvante con un aminosalicilato, pero en ausencia de corticosteroides. Evitar los corticosteroides es de particular importancia en sujetos que tienen antecedentes de reacción adversa a corticosteroides o que tienen factores de riesgo que los predisponen a esa reacción adversa.
- 50 Ya sea o no refractaria la enfermedad a otros fármacos, el inhibidor de ACE2 se puede administrar en tratamiento conjunto con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, agentes que tratan signos, síntomas, causas subyacentes, factores contributivos o estados secundarios asociados con la IBD.
- 55

El término "combinación terapéutica" en el presente documento se refiere a una pluralidad de agentes que, cuando se administran a un sujetos juntos o por separado, son activos conjuntamente en la obtención de un beneficio terapéutico para el sujeto. Esta administración se denomina "tratamiento de combinación", "tratamiento conjunto", "tratamiento adyuvante" o "tratamiento complementario." Por ejemplo, un agente puede potenciar o realzar el efecto terapéutico de otro, o reducir un efecto secundario adverso de otro, o uno o más agentes se pueden administrar eficazmente en una dosis más baja que cuando se usan solos, o pueden proporcionar un beneficio terapéutico mayor que cuando se usan solo, o pueden tratar de forma complementaria diferentes aspectos, síntomas o factores etiológicos de una enfermedad o estado.

Por ejemplo, el inhibidor de ACE2 se puede administrar en tratamiento de combinación o adyuvante con al menos un agente adicional seleccionado de aminosalicilatos, corticosteroides, inmunodepresores, agentes anti-TNF α y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de aminosalicilatos incluyen balsalazida, mesalamina, olsalazina, sulfasalazina, sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y combinaciones de las mismas.

Los ejemplos no limitantes de corticosteroides incluyen beclometazona, dipropionato de beclometazona, budesonida, dexametasona, fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, prednisolona-21-metasulfobenzoato, tixocortol, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de inmunosupresores incluyen azatioprina, ciclosporina (por ejemplo, ciclosporina A), mercaptopurina, metotrexato, tacrolimus, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.

En una realización, el inhibidor de ACE2 se administra en tratamiento de combinación o adyuvante con un agente anti-TNF α tal como infliximab.

Los dos o más agentes activos administrados en tratamiento de combinación o adyuvante se pueden formular en una preparación farmacéutica (forma de dosificación única) para su administración al sujeto al mismo tiempo, o en dos o más preparaciones distintas (formas de dosificación separadas) para su administración al sujeto al mismo tiempo o en tiempos diferente, por ejemplo, secuencialmente. Las dos preparaciones distintas se pueden formular para su administración por la misma vía o por vías diferentes.

Opcionalmente, las formas de dosificación separadas se pueden envasar conjuntamente, por ejemplo, en un único recipiente o en una pluralidad de recipientes dentro de un único envase exterior, o presentar conjuntamente en un envasado separado ("presentación común"). Como ejemplo de envasado conjunto o presentación común, se contempla un kit que comprende, en un primer recipiente, el inhibidor de ACE2 y, en un segundo recipiente, un agente adicional como cualquiera de los mencionado anteriormente. En otro ejemplo, el inhibidor de ACE2 y el agente adicional se envasan por separado y están disponibles para su venta independientemente entre sí, pero se comercializan conjuntamente o se promocionan conjuntamente para su uso de acuerdo con la invención. Las formas de dosificación separadas también se pueden presentar a un sujeto por separado e independientemente, para su uso de acuerdo con la invención.

Dependiendo de las formas de dosificación, que pueden ser idénticas o diferentes, por ejemplo, formas de dosificación de liberación rápida, formas de dosificación de liberación controlada o formas de liberación lenta, el inhibidor de ACE2 y el agente adicional se pueden administrar en el mismo programa o en programas diferentes, por ejemplo en una base diaria, semanal o mensual.

Ejemplo

Ejemplo 1: Expresión de ARNm de ACE2 en estados normal y de enfermedad.

Donoghue y col. (2000), *supra*, notificaron que encontraron transcritos de ACE2 principalmente en corazón, riñón y testículos, de un total de 23 tejidos humanos normales examinados, y proteína de ACE2 (por medio de inmunohistoquímica) predominantemente en el endotelio de vasos coronarios e intrarrenales y en el epitelio tubular renal.

Además, Tipnis y col. (2000) J. Biol. Chem. 275(43):33238-33243 notificaron análisis de transferencia Northern que muestran que el transcrito de ARNm de ACE2 se expresa más altamente en testículos, riñón y corazón.

Komatsu y col. (2002) DNA Seq. 13:217-220 notificaron una clonación molecular de carboxipeptidasa relacionada con enzima convertidora de angiotensina de ratón (mACE2) que muestra un 83 % de identidad con ACE2 humana, y análisis de transferencia Northern que muestra que los transcritos se expresaron principalmente en riñón y pulmones.

Más recientemente, Gembardt y col. (2005) Peptides 26:1270-1277 analizaron la expresión de ARNm de ACE2 y proteína en diferentes tejidos normales de ratones y ratas, notificando al menos niveles detectables de ARNm de

ACE2 en todos los órganos sometidos a prueba de ambas especies (ventrículo, riñón, pulmón, hígado, testículos, vesícula biliar, prosencéfalo, bazo, timo, estómago, íleon, colon, tronco encefálico, atrio y tejido adiposo). En ambas especies el tejido de íleon mostró la expresión más alta de ARNm de ACE2, excediendo la expresión de ARNm de ACE2 a la de la rata en este órgano y también en el riñón y colon.

- 5 Burrell y col. (2005) Eur. Heart J. 26:369-375 recientemente notificaron que el infarto de miocardio incrementa la expresión de ACE2 en corazón de rata y de ser humano.

Ahora se ha examinado la expresión de ARNm de ACE2 en determinados tejidos humanos de sujetos normales y enfermos, usando el sistema BioExpress® de Gene Logic Inc. Este sistema incluye datos de expresión de ARNm de aproximadamente 18.000 muestras, de las que aproximadamente un 90 % son de tejidos humanos, comprendiendo 10 muestras tanto normales y de enfermos de aproximadamente 435 estados de enfermedad. En resumen, se procesaron muestras de tejido humano, de biopsia quirúrgica o bien retiradas post-mortem, para el análisis del perfil de expresión de ARNm usando Affymetrix GeneChips®. Se examinó cada muestra de tejido por un patólogo con certificado de especialidad para confirmar el diagnóstico patológico. Se llevaron a cabo el aislamiento de ARN, la síntesis de ADNc, la amplificación y marcaje de ARNc, hibridaciones, y normalización de señal usando protocolos de 15 Affymetrix estándar. Se realizó un análisis computacional usando software de Genesis Enterprise System® y el sistema de software Ascenta® (Gene Logic Inc).

De acuerdo con Donoghue y col. (2000), *supra*, y Tipnis y col. (2000), *supra*, el presente estudio mostró niveles relativamente altos de transcritos de ACE2 en corazón, riñón y testículos humanos normales (datos no mostrados). Sin embargo, excluyendo esos tres tejidos normales, los 8 primeros niveles de expresión más altos de ARNm en ACE2 en 70 tejidos humanos normales adicionales que se examinaron se enumeran en la tabla 1 a continuación, en 20 orden descendiente de nivel de expresión medio (dado como el "nivel relativo promedio", es decir, nivel de señal del conjunto de muestras en unidades arbitrarias, normalizado con respecto al nivel de señal más bajo en todas las muestras sometidas a prueba, promediado para dos fragmentos de sonda diferentes).

Estos 8 primeros tejidos normales en la tabla 1 (y corazón, riñón y testículos también) mostraron niveles relativos promedio de expresión de ARNm de ACE2 mayores de 4,0, mientras que los 62 tejidos normales restantes 25 examinados mostraron niveles relativos promedio menores de 4,0.

La tabla 1 también muestra que cuatro de los primeros niveles de expresión más altos de ARNm de ACE2 en tejidos humanos normales (distintos de corazón, riñón y testículos) estaban en componentes del tubo gastrointestinal, concretamente (en orden descendiente del nivel de expresión): duodeno, intestino delgado, colon y estómago.

- 30 Tabla 1. Niveles relativos de expresión de ARNm de ACE2 en tejidos normales

Conjunto de muestras	Nivel relativo promedio
Duodeno	221,2
Intestino delgado	167,9
Vesícula biliar	109,9
Colon	13,6
Estómago	10,1
Ovario	5,7
Páncreas	4,3
Hígado	4,2

El examen de la expresión de ARNm de ACE2 en estados de enfermedad englobados por el sistema BioExpress® mostraron elevación de ARNm de ACE2 sólo en pocos estados, principalmente estados inflamatorios de componentes del tubo gastrointestinal. Por lo tanto, la tabla 2 muestra que se levó la expresión de ARNm de ACE2 (en 35 orden descendiente de promedio en veces de cambio frente a normal) en estados inflamatorios del estómago (gastritis crónica), glándula salival principal (excluyendo parótida) (sialadenitis crónica), y colon (enfermedad de Crohn, activo (inflamación crónica o aguda)). En contraste, los niveles de ARNm de ACE2 en colon con colitis ulcerosa activa (inflamación crónica o aguda), y en intestino delgado con enfermedad de Crohn activa (inflamación crónica o aguda), se mantuvieron sustancialmente sin cambios de los niveles ya significativos en los tejidos normales correspondientes mostrados en la tabla 1.

40

Tabla 2. Efectos de estados inflamatorios en la expresión de ARNm de ACE2 en tejidos del tubo digestivo

Conjunto de muestras	Promedio en veces de cambio frente a normal
Estómago gastritis crónica	8,2
Glándula salival principal (excluyendo parótida), sialadenitis crónica	7,5
Colon, enfermedad de Crohn, activa (inflamación crónica)	2,2
Colon, enfermedad de Crohn, activa (inflamación aguda)	1,7
Colon, colitis ulcerosa, activa (inflamación crónica)	0,9
Colon, colitis ulcerosa, activa (inflamación aguda)	1,0
Intestino delgado, enfermedad de Crohn, activa (inflamación crónica)	0,4
Intestino delgado, enfermedad de Crohn, activa (inflamación aguda)	0,8

Los hallazgos anteriores tomados conjuntamente muestran que 4 de los 11 primeros niveles de expresión más altos de ARNm de ACE2 encontrados en tejidos humanos normales están en componentes del tubo digestivo, y que la mayoría de los estados de enfermedad examinados que implican expresión de ARNm de ACE2 elevada son estados inflamatorios del tubo digestivo. Por consiguiente, estos hallazgos sugieren que los niveles altos de expresión de ARNm de ACE2 podrían ser un factor patógeno y, por tanto, la reducción de la actividad de ACE2 podría proporcionar un beneficio terapéutico, en al menos algunos estados inflamatorios del tubo digestivo, en particular en el estómago (gastritis crónica), glándula salival principal (sialadenitis crónica), y colon (enfermedad de Crohn con inflamación crónica o aguda). Además, aunque los niveles de ARNm de ACE2 no fueron elevados en colon con colitis ulcerosa o en intestino delgado con enfermedad de Crohn, los niveles ya sustanciales de ese ARNm en colon el intestino delgado normales sugieren al menos que la actividad de ACE2 está presente y, por lo tanto, todavía podría constituir un factor patógeno en estos dos tejidos enfermos.

Ejemplo 2: Inhibición por GL1001 de activación inducida por TNF α de NF- κ B en células indicadores HeLa recombinantes.

Tanto en IBD humana como en modelos murinos de IBD, la inflamación probablemente puede depender, al menos en parte, de la activación y translocación nuclear de miembros de la familia de NF- κ B. Véase, por ejemplo, Fichtner-Feigl y col. (2005) J. Clin. Invest. 115:3057-3071 y las fuentes citadas en él. Por tanto, en inflamaciones mediadas por Th1 dependientes de IL-12 y/o IL-23, la síntesis de estas citocinas se regula por factores de transcripción de NF- κ B. En inflamaciones mediadas por Th2 dependientes de IL-4 o IL-13, la síntesis de estas citocinas también es dependiente de factores de transcripción de NF- κ B, aunque más indirectamente que la de IL-12 e IL-23. Por tanto, un procedimiento de tratamiento de la inflamación de IBD puede ser para administrar agentes que inhiban la actividad de NF- κ B, y de hecho Fichtner-Feigl y col. (2005), *supra*, ha demostrado que oligonucleótidos de señuelo de NF- κ B (ODN) que evitan la activación de NF- κ B de la expresión génica son eficaces en el tratamiento y la prevención de diferentes modelos de IBD mediada por Th1 y Th2 en ratones, incluyendo colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) aguda, como se evalúa por evolución clínica y efecto sobre la producción de citocina Th1; colitis inducida por TNBS crónica, inhibiendo tanto la producción de IL-23/IL-17 como el desarrollo de fibrosis; y colitis inducida por oxazolona, un proceso inflamatorio mediado por Th2.

Para someter a prueba el inhibidor de ACE2 GL1001 para determinar la actividad antiinflamatoria pertinente a IBD, se examinaron los efectos del compuesto sobre la activación de transcripción dependiente de NF- κ B por TNF α en células indicadoras recombinantes que contenían una construcción con un gen indicador de luciferasa bajo el control de secuencias reguladoras dependientes de NF- κ B, permitiendo de este modo la detección de la transcripción dependiente de NF- κ B midiendo la enzima indicadora usando un ensayo de actividad de luciferasa convencional basado en la detección de luz generada.

En particular, se hicieron crecer células HeLa (Colección estadounidense de cultivos tipo) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con un 10 % suero fetal bovino y se transfectaron de forma transitoria con una construcción de NF- κ B - *luc* (Stratagene, Inc.), como sigue (con todas las etapas de incubación en a 37 °C a menos que se establezca de otro modo). Se sembraron las células y se hicieron crecer hasta aproximadamente un 70 % de confluencia en una placa de cultivo celular de 10 cm. Se añadió ADN plasmídico (10 μ g) a 1 ml de medio DMEM libre de suero en un tubo. Después, se pipeteó lentamente reactivo de transfección Eugene 6 (30 μ l) (Roche) al tubo y se mezclaron suavemente los contenidos por inversión. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se añadió gota a gota a las células en una placa de 10 cm. Después de la incubación durante 24 horas, se

separaron las células de la placa con tripsina-EDTA (Gibco-BRL), se transfirieron a pocillos en una placa de prueba de 96 pocillos blanca de fondo transparente (Fisher) con 100 μ l por pocillo de DMEM libre de suero, a una densidad de 3×10^4 células por pocillo, y se dejó unir durante la noche. Después de añadió el compuesto (GL1001) a los pocillos en una concentración de aproximadamente 0, 0,008, 0,04, 0,2, 1,0 ó 5,0 μ M, seguido inmediatamente por adición de TNF α (R&D) hasta una concentración final de 20 ng/ml. Después de incubación durante 6 horas, se añadieron 100 μ l de tampón luciferasa Bright-Glo (Promega, n.º de catálogo E2610), y se incubó la placa a temperatura ambiente, con agitación suave, durante 10 min. Después se midió la bioluminiscencia usando un luminómetro Veritas (Turner BioSystems). Cada punto de datos representado representa la bioluminiscencia promedio de 4 pocillos independientes.

Como se muestra en la fig. 2, GL1001 inhibió significativamente la activación inducida por TNF α de la transcripción dependiente de NF- κ B en todas las concentraciones sometidas a prueba, con más de un 80 % de inhibición a 8 nM y una inhibición máxima por encima de un 95 % en 0,2 μ M. Estos resultados indican que el inhibidor de ACE2 GL1001 tiene una actividad antiinflamatoria potente, concretamente inhibición de activación de la vía de señalización de NF- κ B por la citocina inflamatoria TNF α , que es pertinente a IBD. Los presentes inventores no conocen ningún informe previo de esta actividad antiinflamatoria para cualquier inhibidor de ACE2.

Ejemplo 3: Inhibición por GL1001 de transcripción dependiente de NF- κ B basal *in vivo* en ratones indicadores recombinantes.

Se sometió a prueba adicionalmente GL1001 para determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* examinando sus efectos sobre niveles basales de transcripción dependiente de NF- κ B en ratones modificados en la línea germinal con una construcción que contiene un potenciador de NF- κ B enlazado a un gen de luciferasa (es decir, ratones con NF- κ B::Luc), de modo que este constructo indicador de NF- κ B está presente en todas las células de los ratones.

Más en particular, se generaron ratones con NF- κ B::Luc transgénicos usando tres elementos de respuesta de NF- κ B del promotor de cadena ligera de Igk: fusionados a un gen de luciferasa de luciérnaga como se describe por Carlsen y col. (2002) J. Immunol. 168:1441-1446. Se usó microinyección pronuclear de ADN de construcción purificado para generar fundadores transgénicos en el precedente de C57BL/6 XCBA/J. Posteriormente se cruzaron de nuevo los fundadores para el precedente albino C57BL/6. Se aprobaron todos los protocolos experimentales por el Institutional Animal Care and Use Committee y conforme a la guía ILAR para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Para someter a imagen *in vivo*, se inyectaron por vía intraperitoneal ratones con NF- κ B::Luc con luciferina (150 mg/kg) 10 minutos antes de someterlos a imagen, se anestesiaron (usando un 1-3 % de isoflurano) y se colocaron en una caja con cámara oscura. Se sometieron a imagen los ratones durante hasta dos minutos de los aspectos dorsales o ventrales en configuraciones de alta resolución con un campo de vista de 20 cm. Se detectó la luz emitida desde el transgén por un sistema de imagen IVIS® serie 200 (Xenogen Corporation, Alameda, CA), se digitalizó y se mostró en un monitor. El software de Living Image® (Xenogen Corporation, Alameda, CA; véase Rice y col. (2002) J. Biomed. Opta. 6:432-440) muestra datos de la cámara usando una escala de pseudocolor con colores que representan variaciones de intensidad de señal. Los datos de señal también se cuantificaron y archivaron usando el software de Living Image®. Se cuantificaron fotones de luz usando una región ovalada de interés (ROI) de tamaños variables dependiendo del procedimiento, como se describe además a continuación.

Para ensayos de luciferasa, se extrajeron órganos y se ultracongelaron en nitrógeno líquido. Se colocaron todas las muestras de tejido en tampón de lisis con inhibidores (tampón de lisis pasivo (Promega) y cóctel de inhibidores de proteasa mini completo (Roche, Indianápolis, IN)), y se homogeneizó usando un homogeneizador de tejido (Handishear, Hand-held homogenizer, VirTis, Gardiner, NY). Se centrifugaron los homogenados de tejido y se usaron los lisados aclarados para ensayos de con luminómetro y transferencia western. Para los ensayos con luminómetro, se preparó un sustrato de ensayo de luciferasa (Luciferase Assay System, Promega) como se indica por el fabricante y se colocó en cubetas desechables. Se mezclaron los homogenados de tejido (20 μ l) y el sustrato (100 μ l) y se tomaron medidas en un luminómetro de microplacas Veritas (Turner Designs, Sunnyvale, CA) con los parámetros de un retraso de 2 segundos, 10 segundos. Se obtuvieron lecturas de luminiscencia de fondo y se restaron las lecturas de fondo de los datos luminiscentes. se determinaron concentraciones de proteína usando el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL) siguiendo los protocolos del fabricante y se analizó usando un lector de microplacas sincronizable VERSAmax y software de Softmax Pro versión 3.1.2 asociado (Molecular Devices, Sunnyvale CA). Se calculó la luminiscencia para cada uno de los lisados de proteína como unidades arbitrarias de luz por microgramo de proteína. Los análisis estadísticos incluyen MEAN, SEM y ANOVA y prueba t de Student entre grupos de tratamiento.

Para someter a prueba los efectos *in vivo* de GL1001 en niveles basales de transcripción dependiente de NF- κ B, se sometieron ratas con NF- κ B::Luc macho a imagen *in vivo* cuantitativa del área abdominal (usando un ROI fijo de 2,76 x 3,7 cm) como se describe anteriormente, inmediatamente antes, y 2, 4 y 6 horas después de la administración subcutánea de 0, 3, 30 ó 100 mg/kg de GL1001 en solución salina. La imagen de cuerpo entero mostró que GL1001 inhibió significativamente los niveles *in vivo* basales de transcripción dependiente de NF- κ B del gen indicador de luciferasa, principalmente en la región abdominal. Como se muestra por los datos de imagen cuantitativos en la fig. 3, 4 horas después de la administración de LPS, GL1001 inhibió significativamente los niveles *in vivo* basales de transcripción dependiente de NF- κ B en el ROI abdominal seleccionado por encima de un 40 % en 300 mg/kg ($p < 0,01$ por ANOVA y prueba t de Student), y en un grado menor pero aún así significativo en ambas dosis más bajas.

Al contrario de los resultados observados en ratones con NF- κ B::Luc, no se observó ningún efecto significativo de GL1001 en niveles *in vivo* basales de expresión de luciferasa indicadora en ratones con AP-1::Luc construidos de forma similar a los presentes ratones con NF- κ B::Luc (datos no mostrados), en los que la transcripción indicadora estaba conducida por una respuesta de elemento potenciador a la proteína activadora 1 (AP-1), un protooncogen conocido que se cree que está implicado en la proliferación celular y en la promoción de tumor.

Ejemplo 4: GL1001 inhibe la transcripción dependiente de NF- κ B inducido por LPS *in vivo* en ratones indicadores recombinantes.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS), un componente importante de la pared celular de bacterias gram-negativas, es una molécula biológicamente muy activa que estimula macrófagos para producir y liberar TNF α . Véase, por ejemplo, Jersmann y cols. (2001) *Infection and Immunity* 69(3): 1273-1279, y las fuentes citadas en él. Una de las asociaciones reconocidas de infección bacteriana con acontecimientos cardiovasculares es la activación de endotelio y la regulación por aumento de las moléculas de adhesión. Se ha encontrado que los dos mediadores proinflamatorios principales implicados en la causalidad de acontecimientos cardiovasculares, LPS bacteriano y TNF α , cooperan para potenciar las propiedades adhesivas de células endoteliales incrementando de forma sinérgica la expresión de moléculas de adhesión endoteliales humanas a través de la activación de las vías de señalización de proteína cinasa activada por mitógeno p38 y NF- κ B.

Además, se sometió a prueba GL1001 para determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* examinando sus efectos en transcripción dependiente de NF- κ B inducida por LPS bacteriana, en ratones con NF- κ B::Luc. En particular, se indujo inflamación en estos ratones a las 6-10 semanas de edad por administración de 0,5 mg/kg (i.v.) de LPS soluble (sLPS; Sigma) una hora después de la administración de GL1001. Los ratones se sometieron a imagen abdominal cuantitativa 2, 4 y 6 h después de la administración de LPS, como se describe anteriormente. En experimentos de confirmación, y en el punto de tiempo con la modulación más grande de señal de luciferasa, los ratones se sometieron a eutanasia y se recogieron los tejidos y se preservaron para un análisis posterior. Se cuantificó la señal de luciferasa desde varias regiones de interés. Los análisis estadísticos incluyen MEAN, SEM y ANOVA y prueba t de Student entre grupos de tratamiento.

La imagen de cuerpo entero mostró que GL1001 inhibió significativamente los niveles *in vivo* inducidos por LPS de transcripción dependiente de NF- κ B del gen indicador de luciferasa, de nuevo principalmente en la región abdominal. Como se muestra por los datos de imagen cuantitativos en la fig. 4, LPS indujo una fuerte señal de luciferasa dependiente de NF- κ B, indicando una fuerte respuesta de señalización de NF- κ B, como se esperaba. En cambio, los ratones que se pretrataron con GL1001 mostraron una respuesta de señalización de NF- κ B inducida por LPS significativamente reducida, que se pudo medir cuantitativamente en la región abdominal. Como se observó inhibición de la actividad de luciferasa dependiente de NF- κ B en todo el rango de dosis de GL1001 en este experimento (30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg), se repitió el experimento usando un rango de dosis ligeramente menor (3-100 mg/kg). Como se muestra en la fig. 5, en este rango de dosis menor, GL1001 redujo significativamente la señalización de NF- κ B inducida por LPS en 30 y 100 mg/kg. Estos resultados muestran que la administración sistémica (subcutánea) del inhibidor de ACE2 GL1001 mostraba una actividad antiinflamatoria *in vivo* significativa, predominantemente en la región abdominal, frente a transcripción dependiente de NF- κ B inducida por LPS bacteriana así como frente a transcripción dependiente de NF- κ B basal.

El examen de los órganos seleccionados de ratones con NF- κ B::Luc tratados con 0,5 mg/kg de LPS y GL1001 en 30 mg/kg o sólo con 0,5 mg/kg de LPS (fig. 6) mostró una reducción significativa (de aproximadamente 37 veces) de la transcripción dependiente de NF- κ B inducida por LPS en estómagos de ratones tratados con GL1001, comparado con ratones tratados sólo con LPS, pero ninguna disminución estadísticamente significativa en la señalización de NF- κ B inducida por LPS en páncreas ni en útero, ni en ningún otro órgano o parte de órgano que se analizó (datos no mostrados), concretamente, hígado, riñón, bazo, intestino delgado, intestino grueso (colon), ganglios linfáticos mesentéricos, intestino ciego (primera parte del colon después del intestino delgado), ovario, útero, ganglios linfáticos submandibulares, cerebro, corazón y pulmón.

La inhibición de GL1001 de la actividad de NF- κ B inducida por LPS en el estómago de ratón es compatible con la presente observación (anterior) de expresión de ARNm de ACE2 en tejido de estómago normal de sujetos humanos, y con el informe de expresión de ARNm de ACE2 en el estómago de ratón por Gembardt y col. (2005), *supra*. El hecho de que no se observara ninguna inhibición de la actividad de NF- κ B inducida por LPS en otros tejidos murinos previamente notificados por expresar niveles altos de ARNm de ACE2 (por ejemplo, riñón, intestino delgado o colon; véase Gembardt y col. (2005), *supra*) muestra que el efecto inhibitorio sobre la señalización de NF- κ B inducida por LPS predominantemente en la región abdominal después de administración sistémica (subcutánea) de GL1001 se debe principalmente a alguna actividad de este inhibidor de ACE2 en el estómago.

Ejemplo 5: GL1001 inhibe la IBD inducida en ratones por dextrano sulfato de sodio (DSS).

Se sometió a prueba adicionalmente GL1001 para determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* examinando sus efectos sobre colitis inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS) en ratones. Este modelo de IBD muestra cambios morfológicos reproducibles, que son muy similares a los observados en pacientes con colitis ulcerosa. Véase, por

ejemplo, Hollenbach y col. (2004) FASEB J. 18(13):1550-1552. Véase también Bryne y col. (2006), Current Opinion in Drug Discovery & Development 8(2):207-217 y fuentes citadas en él. Estas patologías incluyen inflamación del colon de lado izquierdo predominante, regeneración prominente de las células mucosales de colon con displasia que conduce a cáncer de colon, acortamiento del intestino grueso, daño de criptas focales, e hiperplasia linfocítica frecuente en ambos sistemas biológicos. Además, de acuerdo con Hollenbach y col. (2004), *supra*, la colitis inducida en DSS en ratones tiene un valor alto al evaluar la eficacia de agentes terapéuticos usado comúnmente en el tratamiento de colitis, ya que todas las sustancias terapéuticamente beneficiosas en la IBD humana también mostraron que reducen la actividad de la enfermedad en este modelo de ratón.

Se diseñó el estudio con tres grupos: control (5 ratones), 2,5 % de DSS solo (10 ratones), y 2,5 % de DSS con tratamiento de GL1001 (100 mg/kg subcutáneo por día) (10 ratones). Se usaron ratones con NF-κB::Luc para medir la activación de NF-κB como indicador de actividad inflamatoria, como se describió anteriormente. En particular, se midió la actividad de luciferasa específica de órgano, además del peso corporal, captación de fluido, sangre oculta en heces, pesos de órgano e infiltración neutrófila (ensayo de MPO). A ratones precedentes albinos BL/6 con NF-κB::luc de 6-8 semanas de edad se les proporcionó un 2,5 % de dextrano sulfato de sodio (DSS, PM 40.000; MP Biomedicals) en el agua de bebida. Se pesaron los ratones, se sometieron a imagen y se dosificaron con GL1001 diariamente. Se recogieron muestras fecales del fondo de las jaulas para cada grupo de tratamiento y se sometió a prueba para determinar la consistencia fecal y la sangre oculta usando cinta Hemocult como indica el fabricante (Fisher Scientific) y se midió el consumo de fluido. Al finalizar el estudio, se retiró el tubo gastrointestinal, se limpiaron y se pesaron las diferentes secciones, se prepararon las muestras de tejido para los ensayos bioluminescentes y para mieloperoxidasa (kit de ensayo de mieloperoxidasa, Cytostore) para ver la infiltración neutrófila.

Se pesaron los ratones y se sometieron a imagen en el momento de la administración diaria de GL1001 o de control del vehículo. Se adquirieron imágenes biofotónicas de los ratones cada día, como se describe anteriormente, mostrándose los resultados de imagen abdominal cuantitativa en la fig. 7. En este experimento, se produce una disminución inicial en la expresión de luciferasa conducida por NF-κB en ambos grupos que recibieron tratamiento de DSS, con una divergencia no estadísticamente significativa en la expresión de luciferasa que se mantuvo entre los grupos de DSS solo y DSS + 100 mg/kg de GL1001 durante el experimento comenzando el día 6 del estudio. Se monitorizó el consumo de agua para todos los animales y tasas de consumo similares indican que los ratones tratados con DSS recibieron todas cantidades similares de DSS (fig. 8).

Se monitorizó la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal usando un índice de actividad de enfermedad inflamatoria intestinal que consiste en la suma de la pérdida de peso en porcentaje, la consistencia de las heces y la sangre oculta en heces dividido entre 3. La tabla 3 muestra el sistema de clasificación para cada uno de los parámetros medidos.

Tabla 3. Sistema de puntuación del índice de actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal

Puntuación	Pérdida de peso (%)	Consistencia de heces	Sangre en heces
0	0 o ganancia	Normal	Negativo
1	1-4,9	Blanda	+/-
2	5,0-9,9	Mixto (blanda y diarrea)	+
3	10-15	Diarrea	++
4	>15	Diarrea hemorrágica	Sangre gruesa

Se observó un leve retraso en la actividad de la enfermedad en el grupo de GL1001 entre los días 3 y 8 del estudio como se muestra en los resultados para el índice de actividad de enfermedad inflamatoria intestinal que se representa en la fig. 9. La reducción en peso corporal se retrasó significativamente entre los días 4 y 9 en el grupo que recibía GL1001 en comparación con el grupo de tratamiento sólo de DSS (fig. 10).

Al final del estudio, se retiraron los órganos seleccionados del tubo gastrointestinal, se limpiaron y se pesaron, y se determinó la proporción de peso de órgano con respecto al peso corporal final. Como se muestra en la 11, se observaron incrementos en el peso de órgano inducido por DSS significativos, y se evitaron completamente por GL1001, tanto en el intestino ciego como en el intestino grueso (colon), pero no en el estómago ni en el intestino delgado.

Además, se homogeneizaron secciones del tubo gastrointestinal, así como hígado y riñón como controles, y se registró la expresión de luciferasa como unidades de luz por µg de proteína, en la fig. 12. Los órganos que muestran un incremento en la expresión de luciferasa fueron el intestino ciego y el intestino grueso en el grupo sólo con DSS. El grupo tratado con GL1001 mostró niveles de expresión de luciferasa similares a los del grupo de control que sólo recibió agua.

En resumen, se mostró que el inhibidor de ACE2 GL1001 mostraba una actividad antiinflamatoria *in vivo* en dextrano colitis inducida por sulfato de sodio (DSS) en ratones, ya que todos los ensayos de parámetros relacionados con la enfermedad mostraron diferencias significativas o bien tendencias correspondientes entre los grupos de tratamiento de DSS y de DSS + GL1001. El hecho de que la administración sistémica (subcutánea) de GL1001 redujera los pesos de los órganos y de que DSS indujera la señalización de NF- κ B en el intestino ciego y en el resto del intestino grueso (colon) muestra que este inhibidor de ACE2 tiene una actividad antiinflamatoria en porciones del tubo gastrointestinal pertinentes a ambas formas de IBD humana, es decir CU y EC, además de dicha actividad frente a la señalización de NF- κ B inducida por LPS y basal en el estómago.

Además, GL1001 retrasó significativamente la progresión de la enfermedad en la primera semana de este estudio, como se muestra por reducciones en el índice de actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo. Este índice de actividad representa una evaluación compuesta de los tres síntomas de la IBD, concretamente, pérdida de peso, consistencia de heces (es decir, diarrea) y sangre en heces (es decir, heces hemorrágicas). Como se mencionó anteriormente en el presente documento, los pacientes con CU presentan más comúnmente diarrea hemorrágica, y la pérdida de peso también se produce en los casos más graves. De forma similar, los pacientes con EC en general tienen diarrea continua y pérdida de peso, y también pueden tener heces hemorrágicas.

Por consiguiente, el presente estudio muestra que GL1001 trata eficazmente síntomas comunes de IBD humana en un modelo animal que aparentemente tiene un valor alto en la evaluación de la eficacia de los agentes terapéuticos usados comúnmente en el tratamiento de colitis, ya que también se mostró que todas las sustancias terapéuticamente beneficiosas en IBD humana redujeron la actividad de la enfermedad en este modelo de ratón. Véase, por ejemplo, Hollenbach y col. (2004), *supra*.

En un estudio posterior en ratones con NF- κ B::Luc, un tratamiento de un 2,5 % de DSS tendió a incrementar la señalización de NF- κ B, medida para la expresión de luciferasa, en tejidos de colon distal y linfáticos mesentéricos, aunque en general estos incrementos no fueron estadísticamente significativos. GL1001 en 300 mg/kg/día, administrado dos veces al día por alimentación oral, no disminuyó la señalización de NF- κ B inducida por DSS en este estudio. Las razones de carecer del efecto de GL1001 en este estudio no se comprenden plenamente de momento.

Ejemplo 6: GL1001 reduce los efectos histológicos inducidos por DSS en colon de ratones Balb/c.

Se diseñó un estudio con cinco grupos de ratones Balb/c: control sin tratar, DSS seguido de vehículo, DSS seguido de dexametasona 3 mg/kg/día, DSS seguido de GL1001 10 mg/kg/día, y DSS seguido de GL1001 100 mg/kg/día. La administración de DSS fue por medio de agua de bebida (DSS al 5 % en agua), desde el día 0 al día 7 del estudio. Después, el agua de bebida no incluyó DSS. La administración de vehículo, dexametasona y GL1001 fue subcutánea, una vez al día, desde el día 7 hasta el término del estudio (día 14).

Al término del estudio, se recogieron muestras de porciones proximal, transversa y distal del colon de cada animal para análisis histológicos, que incluyeron:

(a) puntuación de inflamación (0-5), basada en infiltración de leucocitos en mucosa y submucosa, absceso de criptas y edema;

(b) puntuación glandular (0-5), basada en destrucción de criptas (las criptas funcionan para producir mucina y generar epitelio); y

(c) puntuación de erosión (0-5), basada en la integridad de epitelio o grado de ulceración del mismo.

Se obtuvo una puntuación histopatológica total añadiendo las puntuaciones de (a), (b) y (c) anteriores.

No se observó ninguna mejora significativa en la actividad de la enfermedad (basada en muestras fecales) en este estudio del tratamiento con dexametasona o bien con GL1001. Sin embargo, como se muestra en la fig. 13, GL1001 en 100 mg/kg/día redujo significativamente las puntuaciones de inflamación, glandular, erosión e histopatológica total en muestras de colon distal. No se observó ningún efecto significativo histológico con dexametasona o con GL1001 en 10 mg/kg/día.

El efecto histológico (reducción en la inflamación y pérdida de glándula, y ausencia de erosión) de GL1001 en secciones de colon distal se observa claramente en la fig. 14, que presenta micrografías comparativas (50x) de secciones de histología tomadas de la sección distal del colon. En estas micrografías M indica mucosa afectada más gravemente y E indica edema.

La micrografía superior en la fig. 14 es de un animal tratado con DSS seguido de administración subcutánea una vez al día de vehículo. Se observan inflamación grave, pérdida de glándula y erosión.

La micrografía inferior en la fig. 14 es de un animal tratado con DSS seguido de administración subcutánea una vez al día de GL1001 en 100 mg/kg. La inflamación y la pérdida de glándula son suaves, y no se observa erosión. La flecha indica mucosa afectada menos gravemente.

Ejemplo 7: GL1001 inhibe la colitis inducida por DSS en ratones Balb/c.

5 Se diseñó un estudio con seis grupos de ratones Balb/c: control sin tratar, DSS seguido de vehículo, DSS seguido de GL1001 30 mg/kg/día, DSS seguido de GL1001 10 mg/kg/día, y DSS seguido de GL1001 300 mg/kg/día y DSS seguido de sulfasalazina 150 mg/kg/día. La administración de DSS fue por medio de agua de bebida, desde el día 1 al día 6 del estudio. Después, el agua de bebida no incluyó DSS. La administración de vehículo, GL1001 y sulfasalazina fue subcutánea, dos veces al día, desde el día 6 hasta el término del estudio (día 16).

Se midió el peso corporal de cada animal los días 1, 3 y 5 (pre-iniciación de GL1001 o tratamiento con sulfasalazina) y los días 7, 9, 11 y 13 (post-iniciación de GL1001 o tratamiento con sulfasalazina). En esos mismos días, se registraron medidas de actividad de enfermedad, incluyendo:

- 10 (a) prolapso rectal (0 = sin prolapso, 1 prolapso parcial, 2 prolapso moderado, 3 prolapso total);
 (b) consistencia de heces (0 = bolitas sólidas, 1 = semi-sólidas, 2 = heces blandas, 3 diarrea); y
 (c) sangre oculta en heces (0 = sin presencia de sangre, 1 = sangre oculta, 2 sangre gruesa).

Al término del estudio, se determinó la longitud del colon y se llevaron a cabo análisis histológicos como en el ejemplo 6.

15 Se obtuvieron mejoras en el peso corporal, actividad de la enfermedad, longitud de colon e histopatología con GL1001, al menos en la dosis de 300 mg/dosis/kg/día. En general, estas mejoras eran comparables a, en algunos casos aparentemente mayores que, las obtenidas con el tratamiento de sulfasalazina.

La pérdida de peso corporal durante y después de la administración de DSS alcanzó un máximo el día 9. Los efectos de determinados tratamientos sobre la pérdida de peso corporal el día 9 se muestran en la fig. 15.

20 La puntuación de prolapso rectal alcanzó un máximo en día 9. Los efectos de determinados tratamientos en el prolapso rectal el día 9 se muestran en la fig. 16. Las puntuaciones de consistencia de heces y sangre oculta en heces alcanzaron un máximo el día 7. Los efectos de determinados tratamientos en la consistencia de heces y sangre oculta en heces el día 7 se muestran en las figuras 17 y 18 respectivamente.

25 Los efectos de varios determinados tratamientos sobre la longitud del colon se muestran en la fig. 19. Los efectos de determinados tratamientos sobre las puntuaciones de inflamación, cripta (glandular), erosión e histopatológica total se muestran en las figuras 20, 21, 22 y 23 respectivamente.

Las palabras "comprenden", "comprende", y "comprendiendo" se han de interpretar de forma inclusiva, no de forma exclusiva.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un medicamento para su uso en la reducción o el alivio de inflamación o un proceso patológico asociado a ésta o secundario a ésta en un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria del tubo digestivo, **caracterizado porque** el medicamento comprende ácido (S,S)-2-[1-carboxi-2-[3-(3,5-diclorobencil)-3H-imidazol-4-il]etilamino]-4-metilpentanoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y se administra al sujeto en una cantidad antiinflamatoriamente eficaz.
2. El medicamento de la reivindicación 1, para dicho uso en el que la enfermedad es gastritis crónica.
3. El medicamento de la reivindicación 1, para dicho uso en el que la enfermedad es enfermedad inflamatoria intestinal.
- 10 4. El medicamento de la reivindicación 3, para dicho uso en el que la enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn.
5. El medicamento de la reivindicación 4, para dicho uso en el que la enfermedad de Crohn es activa y muestra un índice de actividad de no menos de aproximadamente 220, y en el que el medicamento se administra de acuerdo con un régimen eficaz para lograr una disminución en el índice de actividad de al menos aproximadamente 50 puntos, por ejemplo al menos aproximadamente 70 puntos, y/o para lograr una remisión clínica de la enfermedad de Crohn.
- 15 6. El medicamento de la reivindicación 4, para dicho uso en el que la enfermedad de Crohn es enfermedad de Crohn fistulizante, y en el que el medicamento se administrado de acuerdo con un régimen eficaz para lograr una reducción en número de fístulas drenantes y/o para mantener el cierre de la fístula.
- 20 7. El medicamento de la reivindicación 3, para dicho uso en el que la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa.
8. El medicamento de la reivindicación 7, para dicho uso en el que la colitis ulcerosa es de moderada a gravemente activa y muestra una puntuación de Mayo de no menos de aproximadamente 6, y en el que el medicamento se administra de acuerdo con un régimen eficaz para lograr una disminución en la puntuación de Mayo de al menos aproximadamente un 30 % y/o al menos aproximadamente 3 puntos, y/o para lograr una remisión clínica de la colitis ulcerosa.
- 25 9. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 ó 7, para dicho uso en el que la enfermedad inflamatoria intestinal está en un periodo de inactividad o remisión, y en el que el medicamento se administra de acuerdo con un régimen eficaz para lograr una prolongación del periodo de inactividad o remisión.
- 30 10. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 3-9, para dicho uso en el que la enfermedad inflamatoria intestinal es refractaria a un tratamiento de referencia que comprende la administración de una dosis completa de al menos un fármaco de referencia seleccionado del grupo que consiste en aminosalicilatos, corticosteroides, inmunodepresores, antibióticos y combinaciones de los mismos.
- 35 11. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 3-10, para dicho uso en el que el medicamento se administra al sujeto en tratamiento adyuvante con al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en aminosalicilatos, corticosteroides, inmunodepresores, agentes anti-TNF α y combinaciones de los mismos.
- 40 12. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 3-10, para dicho uso en el que el medicamento se administra al sujeto en tratamiento adyuvante con al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en balsalazida, mesalamina, olsalazina, sulfasalazina, beclometazona, dipropionato de beclometazona, budesonida, dexametasona, fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, prednisolona-21-metasulfobenzoato, tixocortol, azatioprina, ciclosporina, mercaptopurina, metotrexato, tacrolimus, infliximab, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.
- 45 13. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para dicho uso en el que dicha cantidad eficaz comprende una cantidad de dosificación del medicamento de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5000 mg/día, por ejemplo de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 mg/día.
- 50 14. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para dicho uso en el que el medicamento muestra in vitro una CI_{50} de ACE2 y/o una Ki de ACE2 no mayor de aproximadamente 1000 nM, por ejemplo no mayor de aproximadamente 100 nM; y/o selectividad para ACE2 frente a ACE, expresada como la proporción de $CI_{50}(ACE)$ con respecto a $CI_{50}(ACE2)$, de al menos aproximadamente 10^3 , por ejemplo al menos aproximadamente 10^4 .
- 55 15. Una combinación terapéutica que comprende ácido (S,S)-2-[1-carboxi-2-[3-(3,5-diclorobencil)-3H-imidazol-4-il]etilamino]-4-metilpentanoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en aminosalicilatos, corticosteroides, inmunodepresores, agentes anti-TNF α y combinaciones de los mismos.

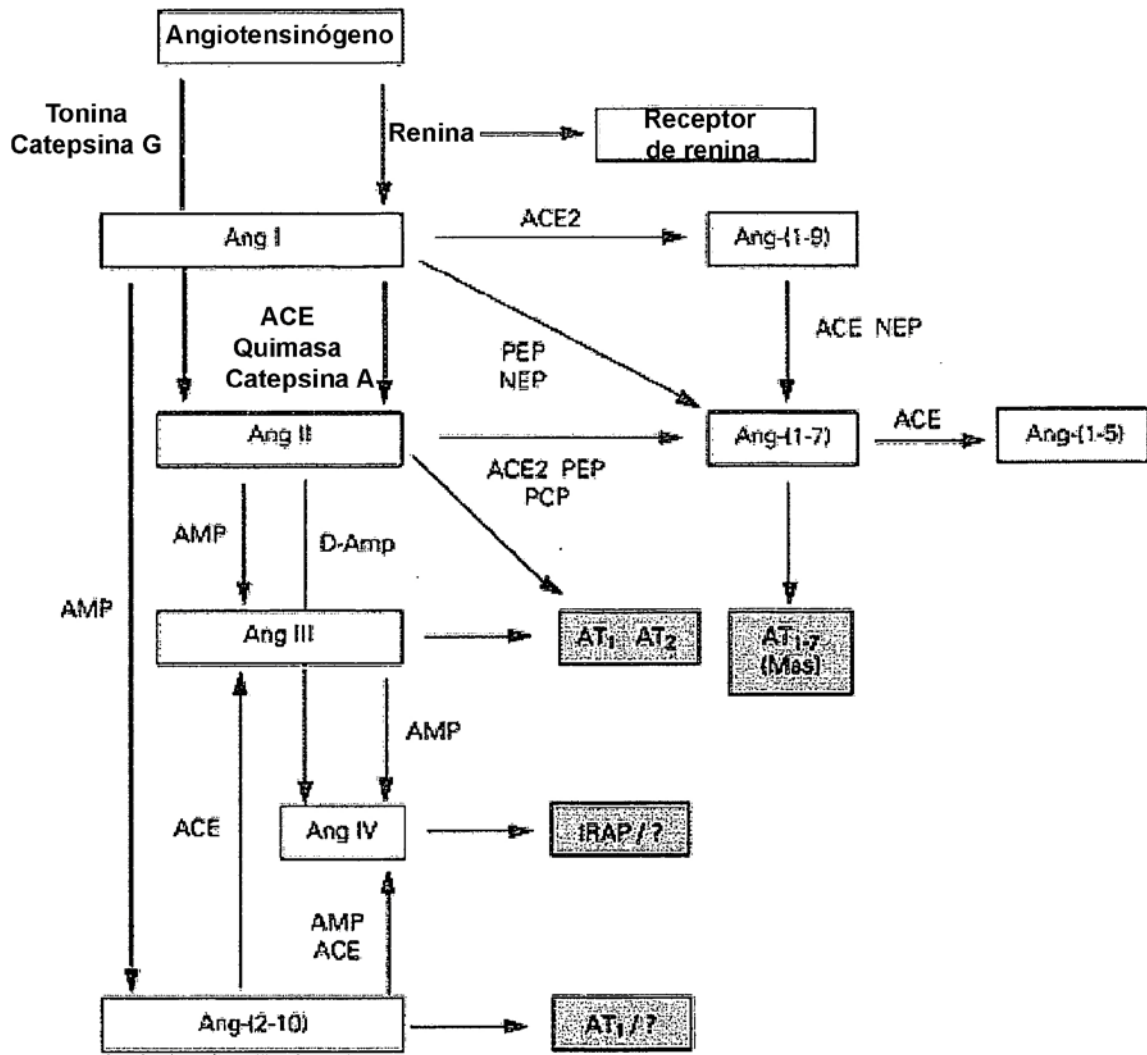


Fig. 1

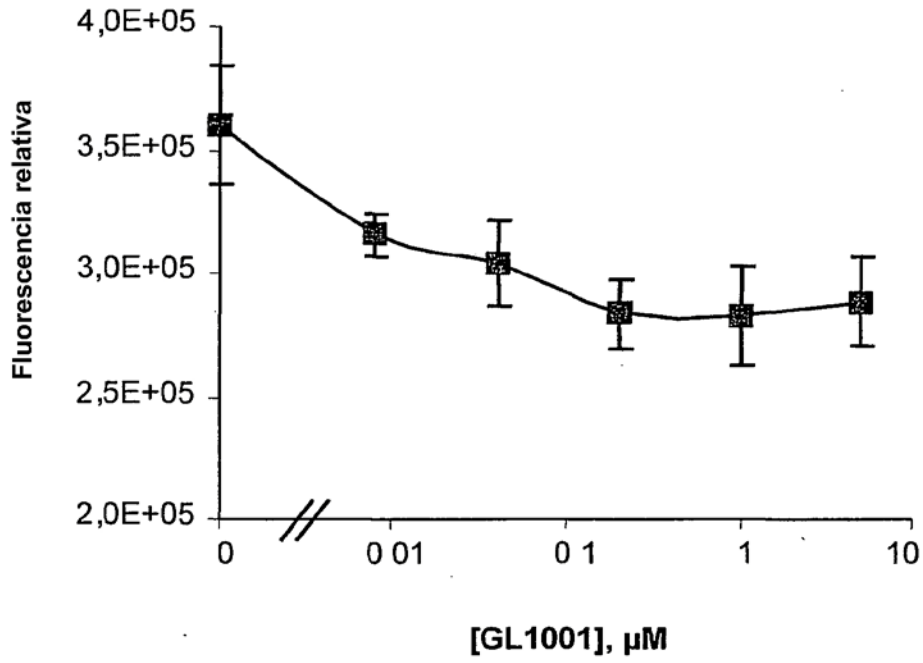


Fig. 2

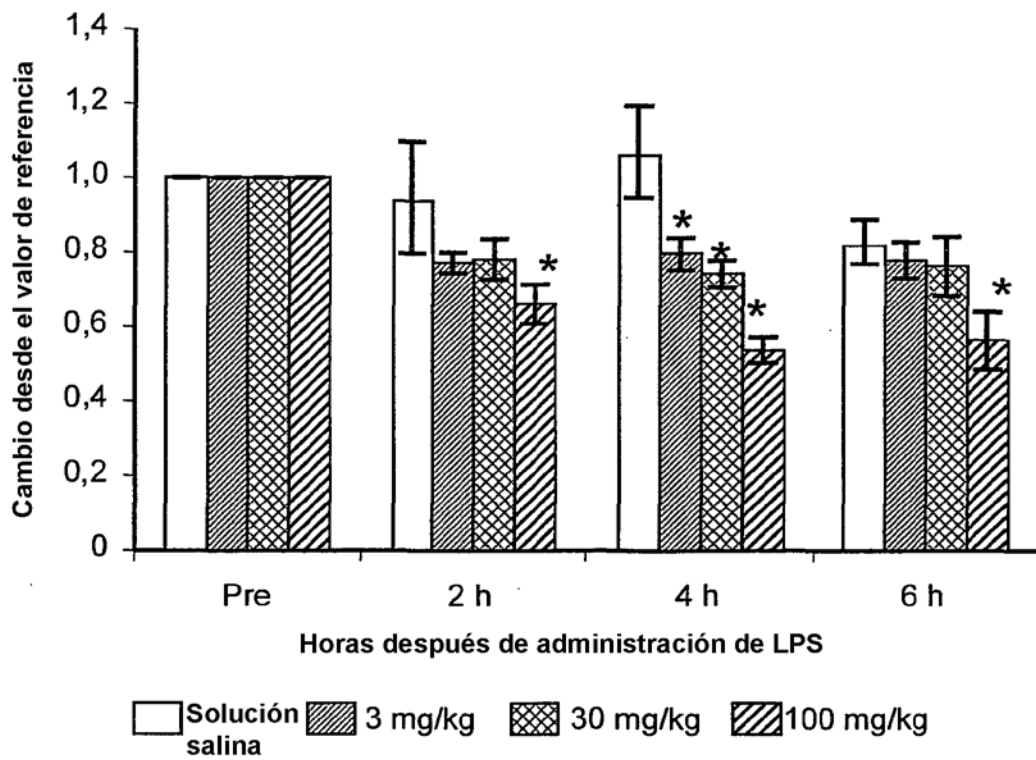


Fig. 3

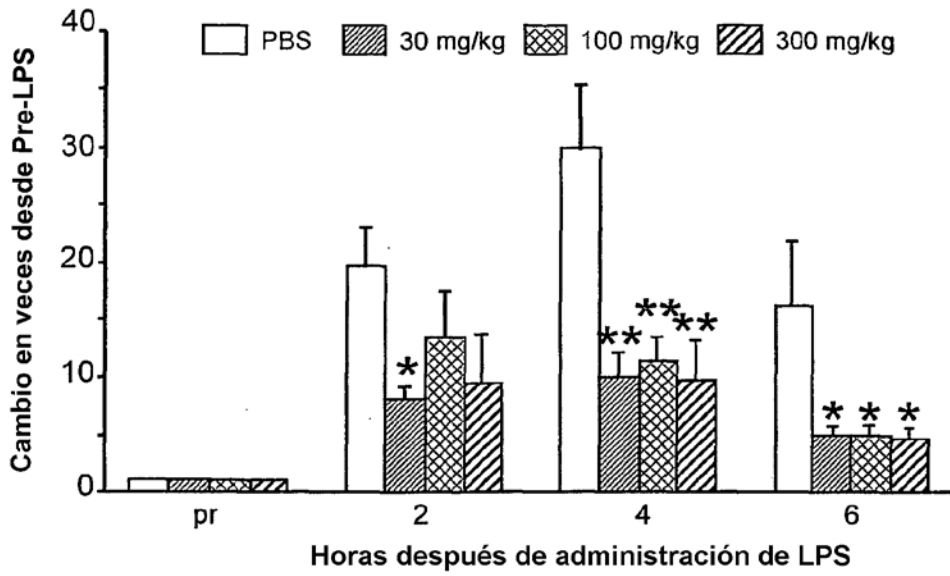


Fig. 4

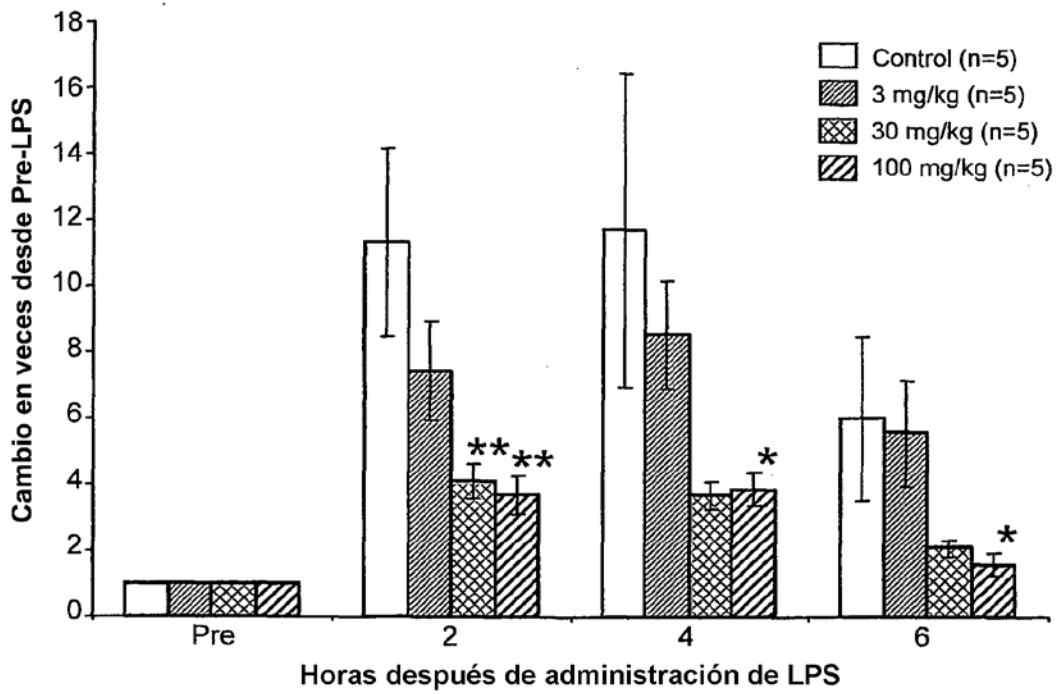


Fig. 5

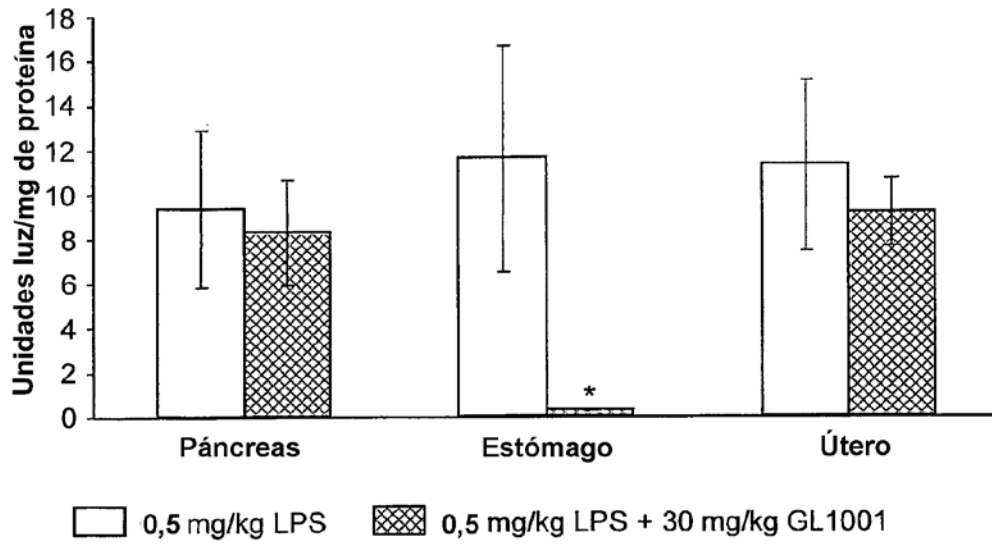


Fig. 6

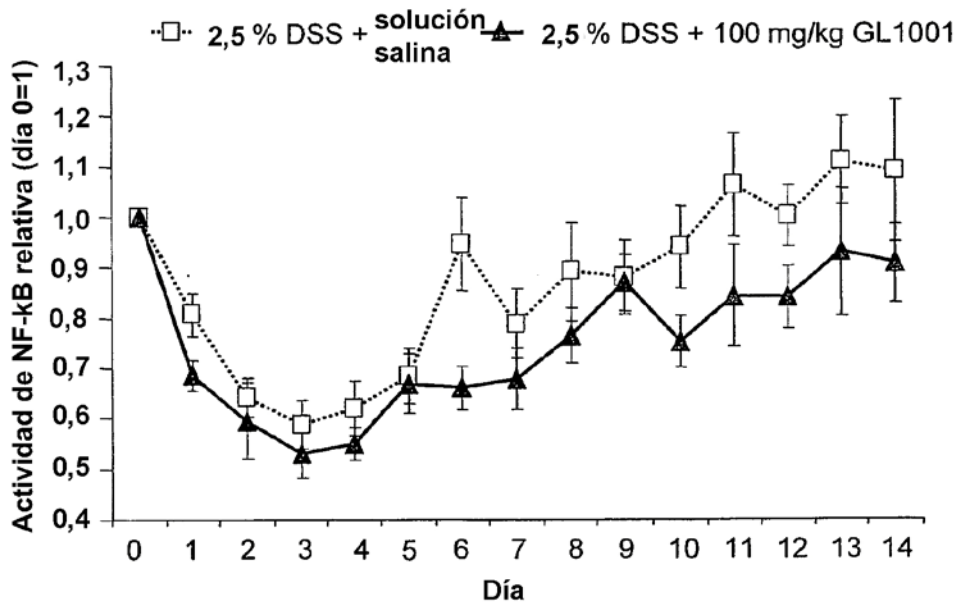


Fig. 7

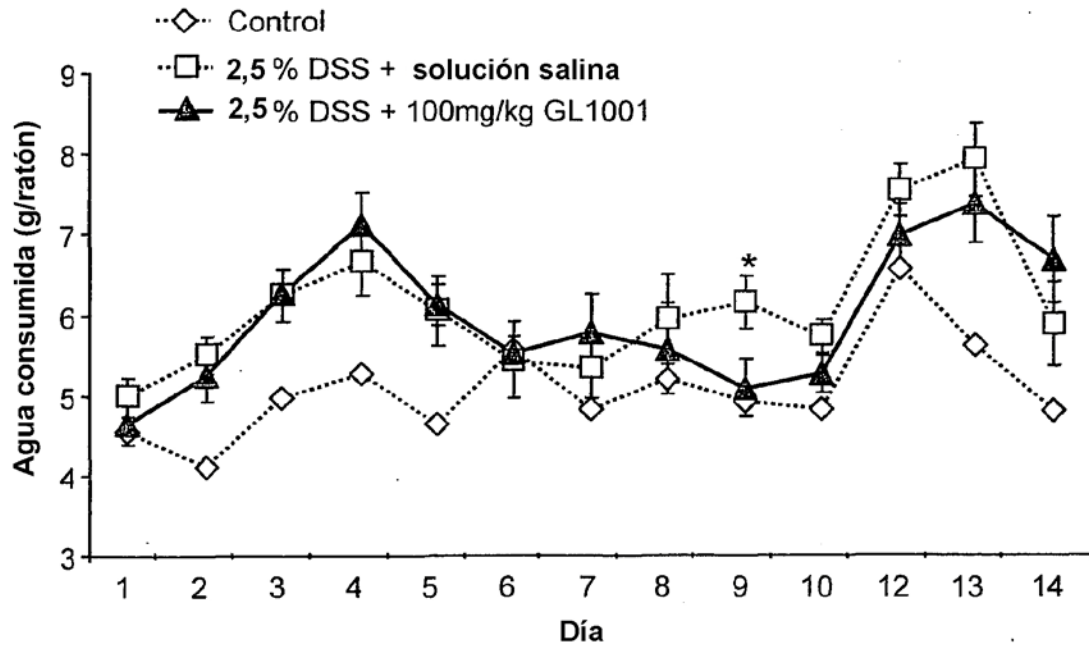


Fig. 8

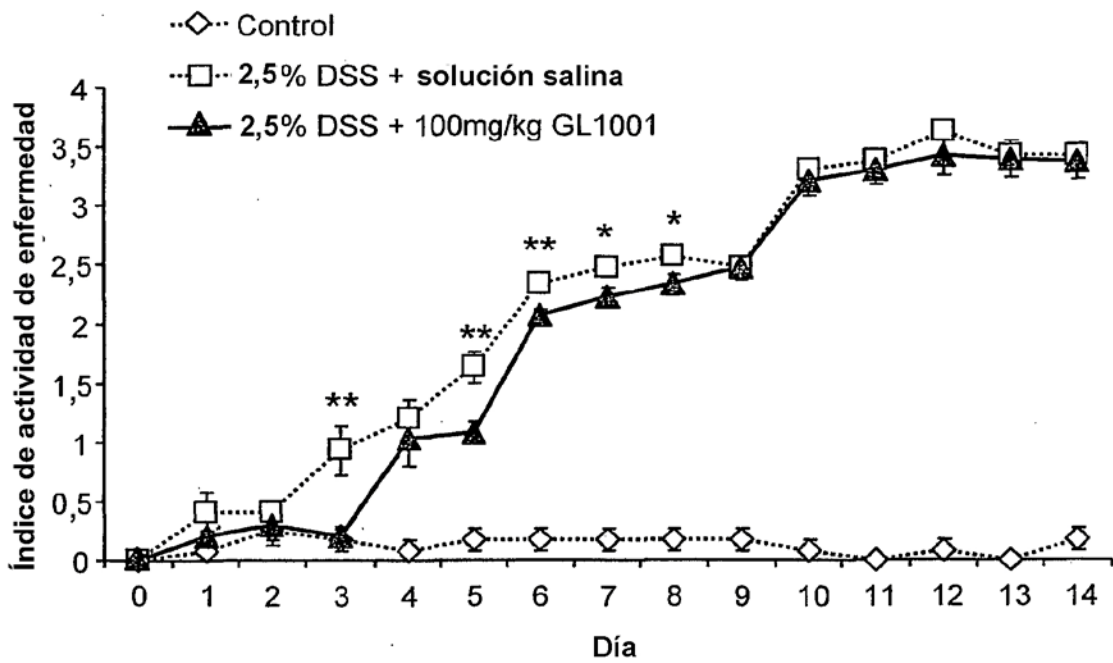


Fig. 9

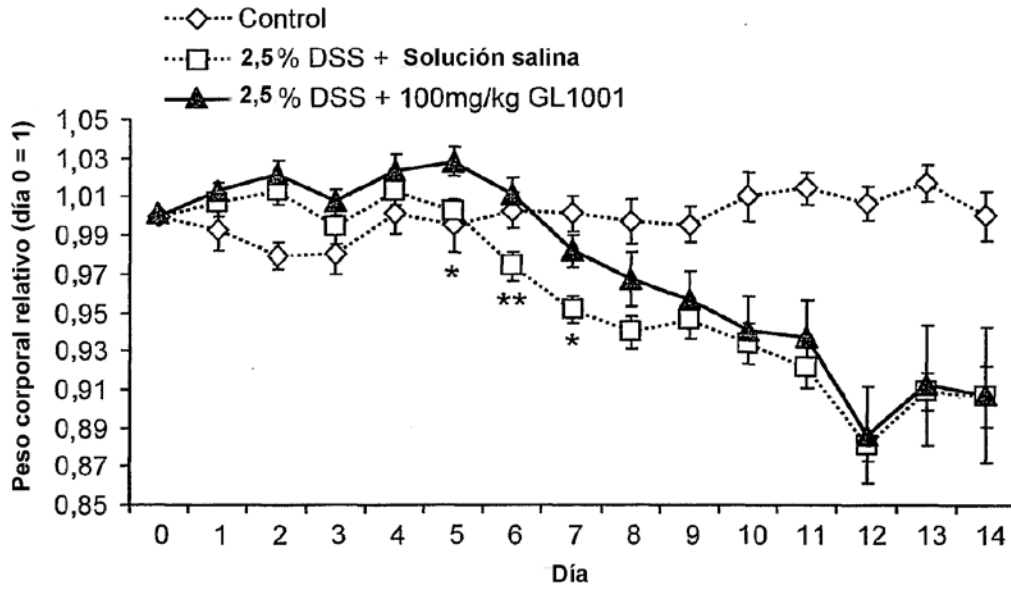


Fig. 10

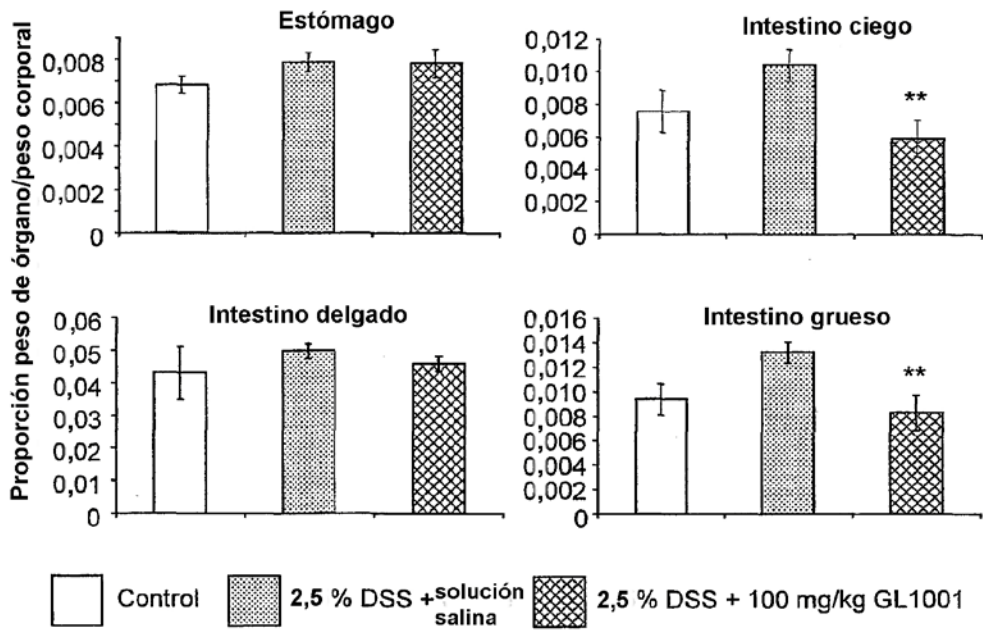


Fig. 11

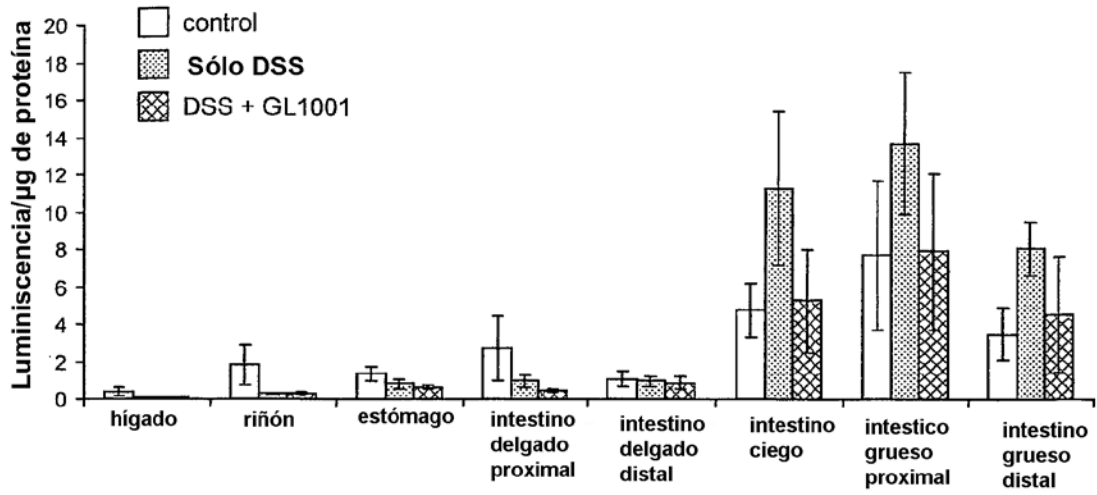


Fig. 12

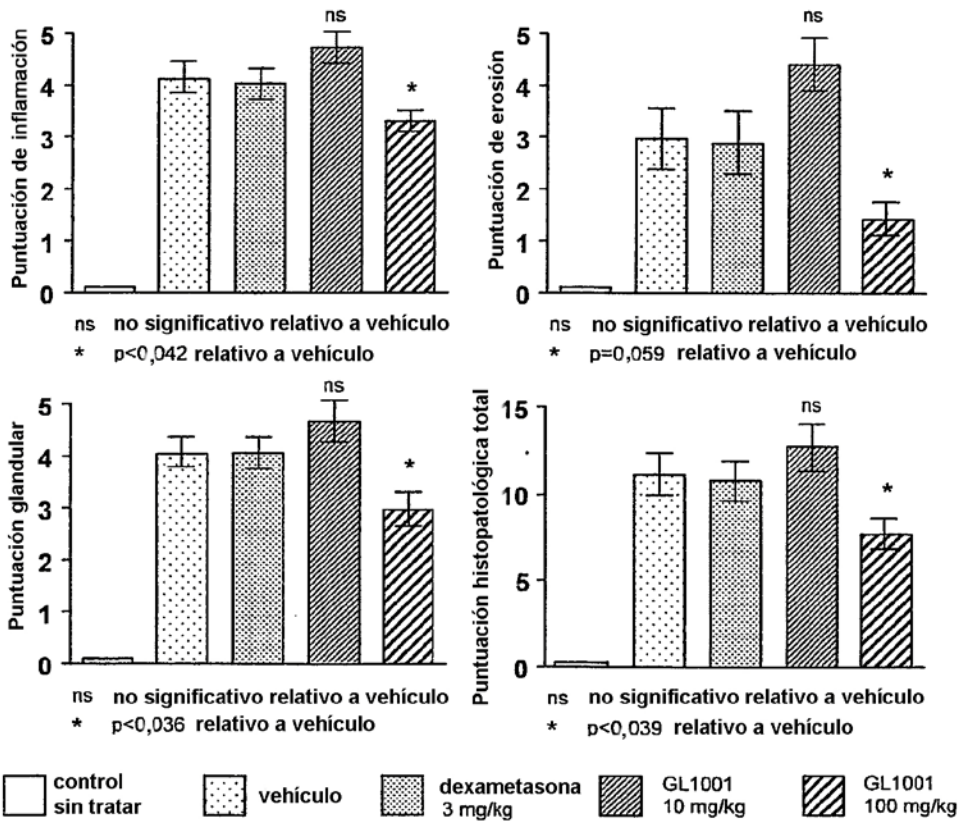
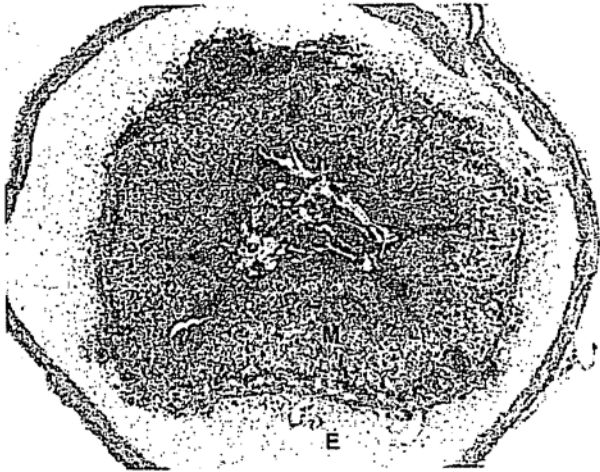
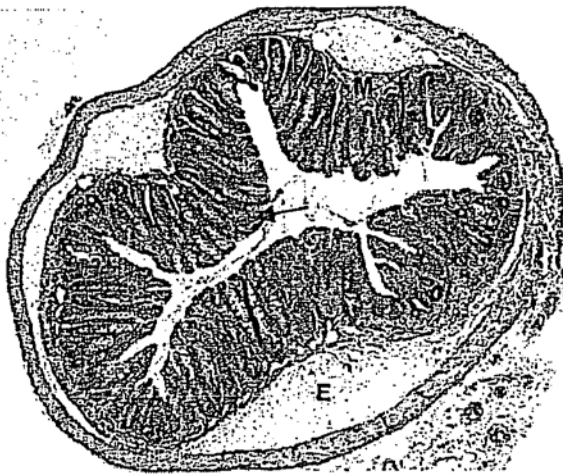


Fig. 13



DSS + vehiculo



DSS + GL1001, 100 mg/kg/dia

Fig. 14

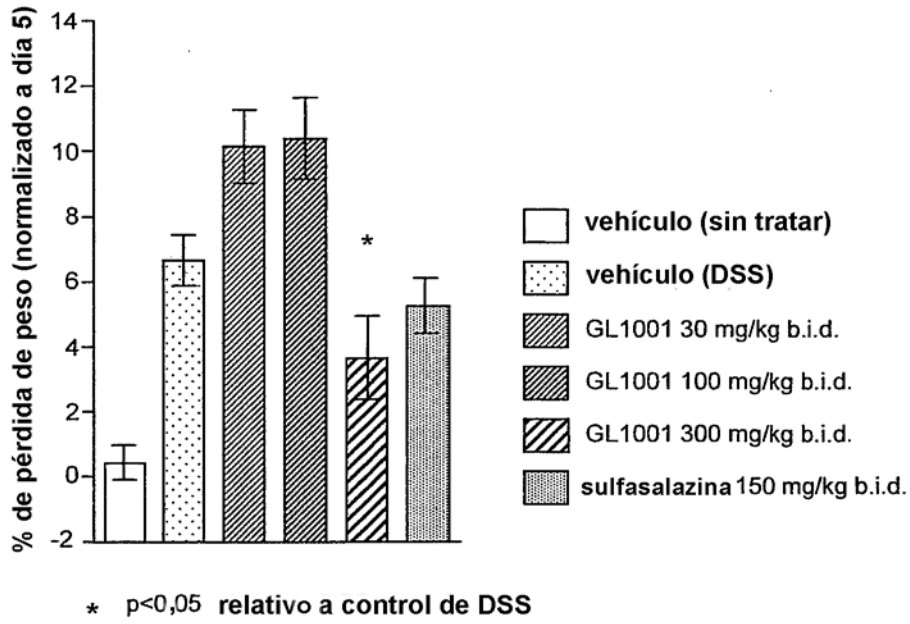


Fig. 15

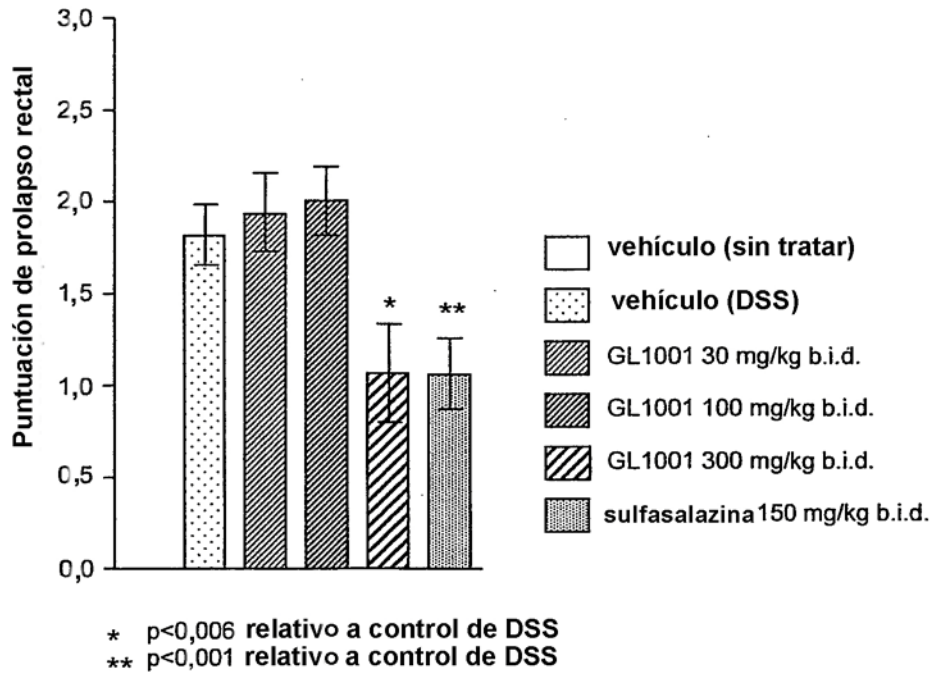


Fig. 16

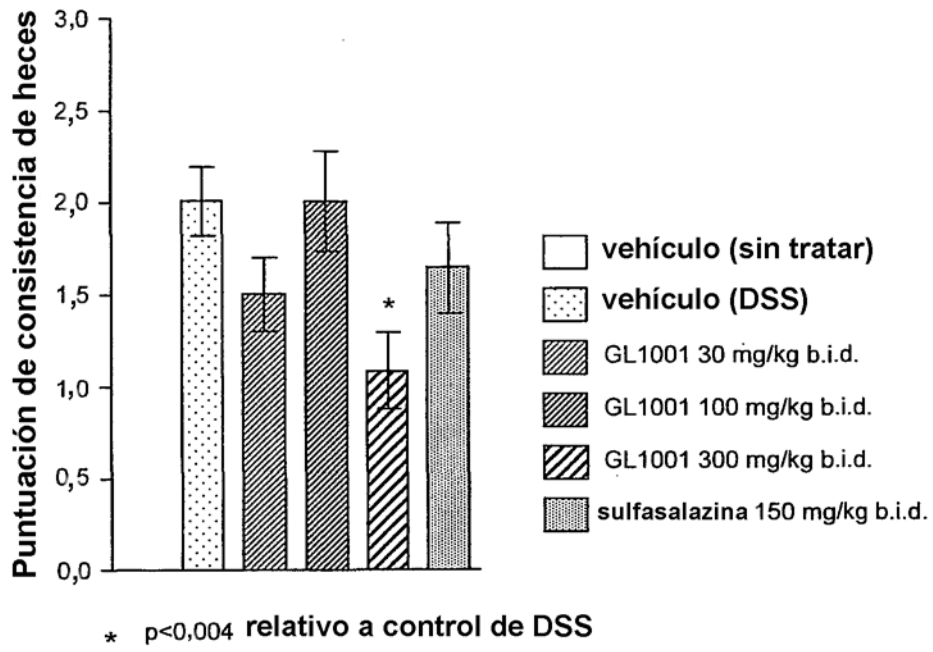


Fig. 17

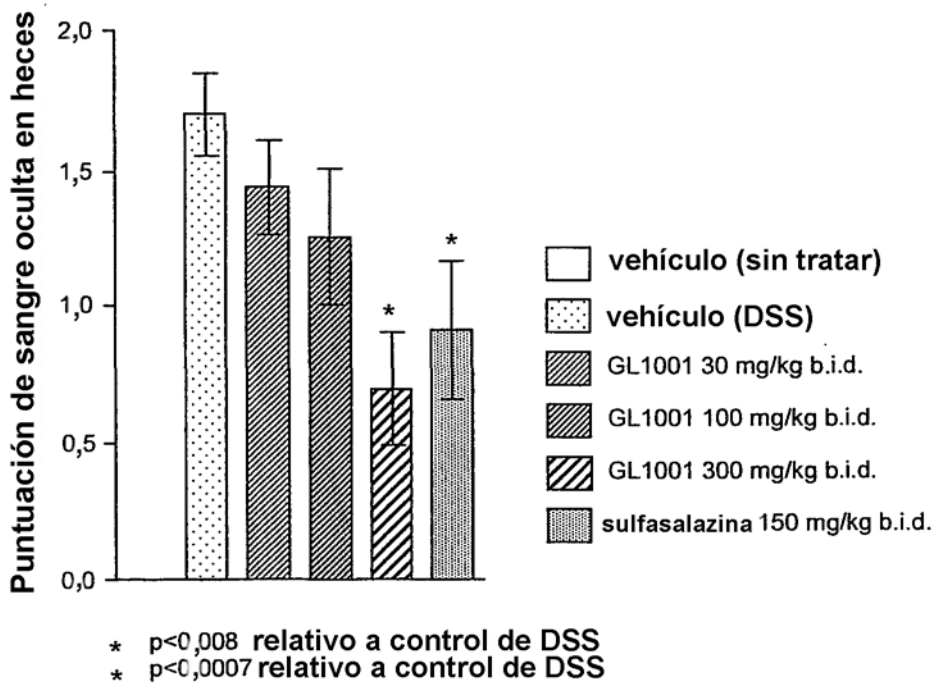


Fig. 18

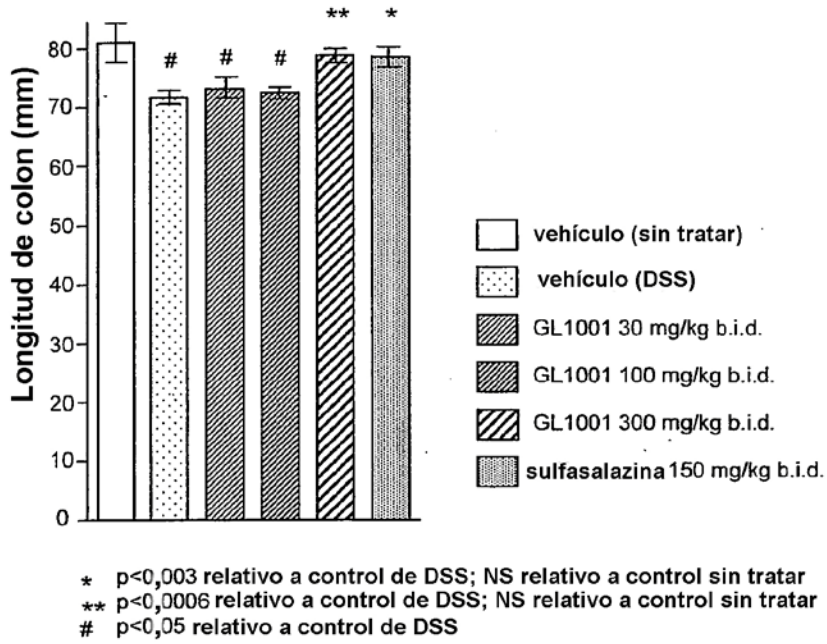


Fig. 19

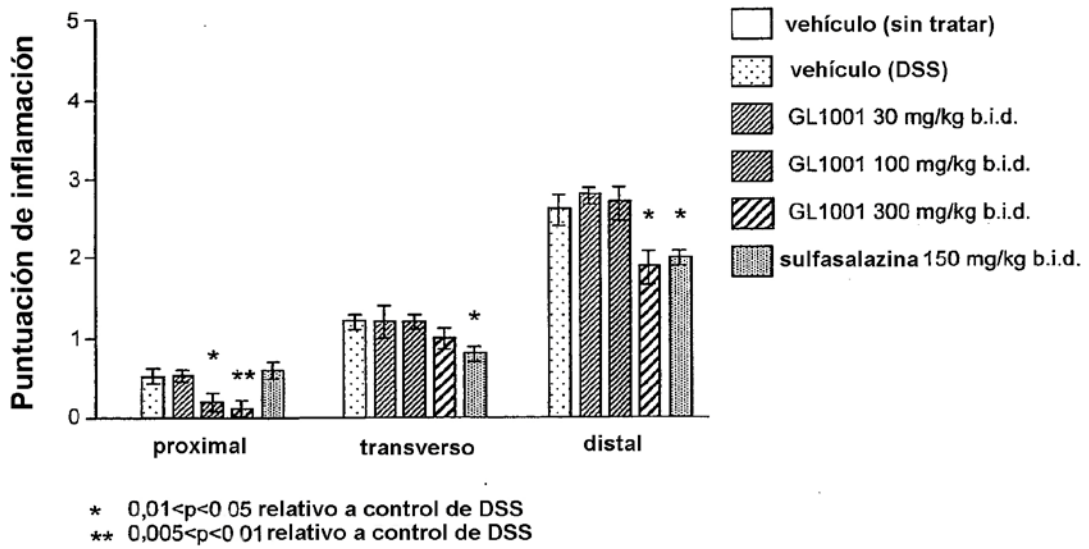


Fig. 20

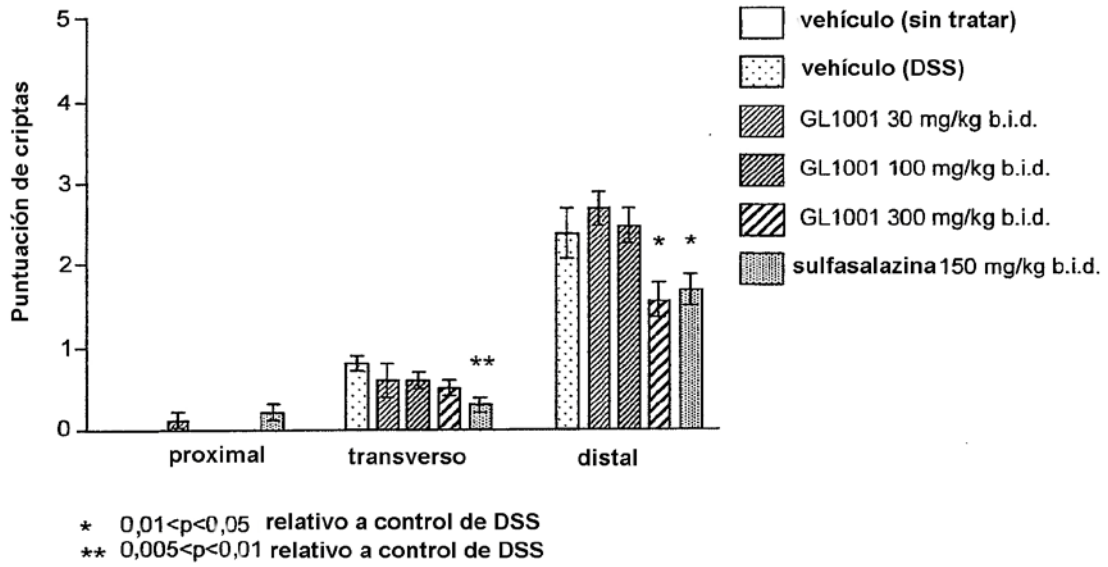


Fig. 21

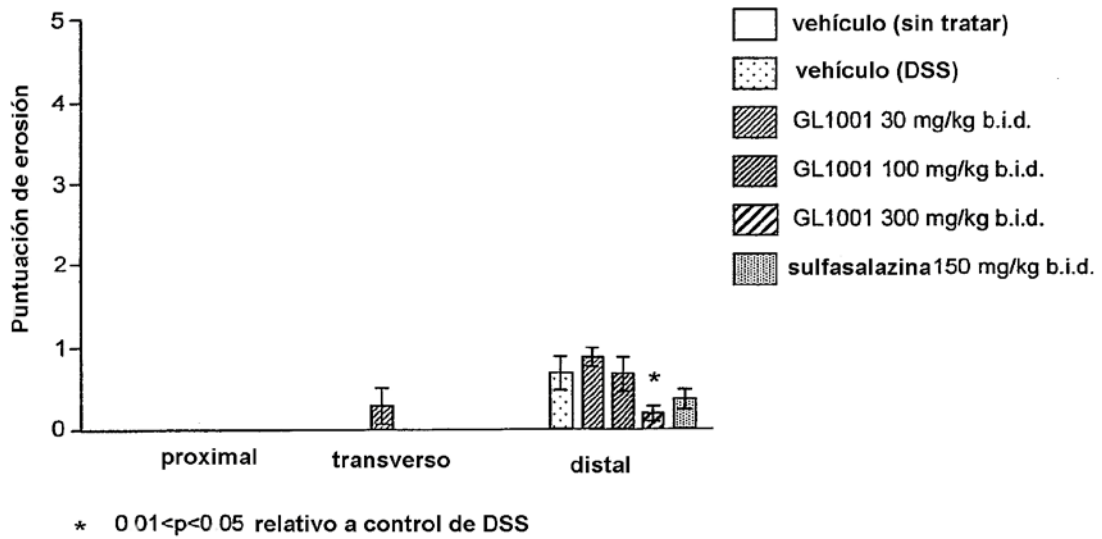


Fig. 22

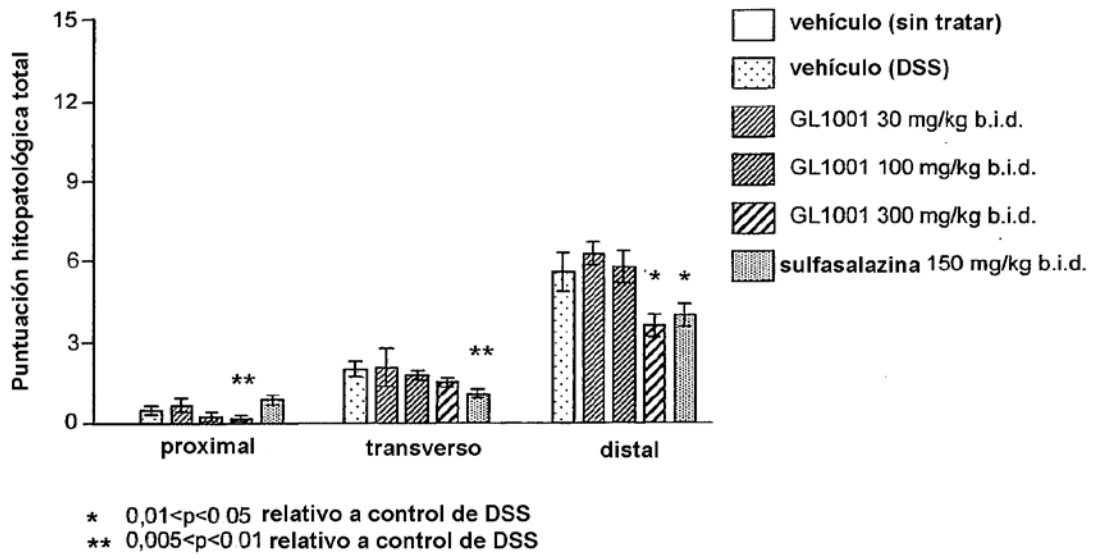


Fig. 23