



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 978 920**

⑫ Int. Cl.:

<b>A61K 31/198</b>	(2006.01)	<b>A61P 17/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 19/04</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/47</b>	(2006.01)	<b>A61P 19/08</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/04</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/16</b>	(2006.01)	<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 13/12</b>	(2006.01)		
<b>A61P 15/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)		

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2014 PCT/CA2014/000484**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14194407**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2014 E 14806967 (7)**

⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3003298**

④ Título: **Compuestos antifibrogénicos, métodos y usos de los mismos**

⑩ Prioridad:

**05.06.2013 US 201361831404 P**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.09.2024**

⑦ Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (100.0%)**  
**University - Industry Liaison Office 103 - 6190 Agronomy Road Vancouver, BC V6T 1Z3, CA**

⑦ Inventor/es:

**GHAHARY, AZIZ;**  
**LI, YUNYUAN;**  
**KILANI, RUHANGIZ, T. y**  
**HARTWELL, RYAN**

⑦ Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 978 920 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

Compuestos antifibrogénicos, métodos y usos de los mismos

## 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

**[0001]** La presente invención se refiere a métodos novedosos para el tratamiento de la fibrosis. Más específicamente, la descripción proporcionada en el presente documento se refiere al uso de quinurenina, ácido quinurético, ácido xanturénico y/o compuestos relacionados para el tratamiento de enfermedades fibróticas, en particular enfermedades o afecciones de la piel como queloides y cicatrices hipertróficas.

## 10 FONDO DE LA INVENCIÓN

**[0002]** La fibrosis, un trastorno perteneciente a un grupo de afecciones fibroproliferativas, se observa en diferentes órganos como la piel, el hígado, los pulmones, los riñones y las arterias. Se calcula que aproximadamente el 40% de 15 todas las muertes en Estados Unidos están causadas, en parte, por trastornos fibroproliferativos. La acumulación excesiva de matriz extracelular debida a una producción excesiva de matriz como la fibronectina y los colágenos de tipo I y III, a niveles bajos de enzimas degradantes de la matriz como las metaloproteinasas de la matriz (MMP), o a ambas cosas, son las características comunes de todas estas afecciones fibróticas.

**[0003]** Como en todos los demás órganos, la cicatrización de heridas en la piel es un proceso dinámico que implica la respuesta del tejido a diferentes tipos de agresiones. Este proceso implica una secuencia continua de señales y respuestas en la que plaquetas, fibroblastos, células epiteliales, endoteliales e inmunitarias se unen fuera de su dominio habitual para orquestar el complejísimo proceso de reparación tisular. Estas señales, que son principalmente factores de crecimiento (GF) y citocinas, orquestan el inicio, la continuación y la finalización de la cicatrización de heridas (Scott *et al.* 1994). Un desequilibrio en la síntesis y liberación de citocinas y GF en el lugar de la herida puede provocar un retraso 20 en la cicatrización (por ejemplo, en poblaciones diabéticas y de edad avanzada) o una cicatrización excesiva (por ejemplo, trastornos fibroproliferativos, complicaciones tras una incisión quirúrgica, heridas traumáticas y lesiones térmicas graves). Así pues, un componente importante de la cicatrización de heridas es su cese oportuno y, sin dicho cese oportuno, puede 25 producirse una acumulación de matriz en exceso, una condición fibrótica deletérea que se observa en millones de pacientes en todo el mundo.

**[0004]** Las metaloproteinasas de matriz (MMP) representan un grupo de diversas enzimas proteolíticas implicadas en el 30 recambio de la MEC y la remodelación del tejido conectivo durante condiciones fisiológicas como el crecimiento y desarrollo embrionario, la involución uterina, el crecimiento óseo, la resorción ósea y la cicatrización de heridas. El nivel de expresión de las MMP en las células normales es bajo y eso permite una remodelación sana del tejido conjuntivo. Sin embargo, un desequilibrio en la expresión de las MMP se ha visto implicado en una serie de condiciones patológicas como la fibrosis dérmica, la artritis reumatoide, la aterosclerosis y la invasión y metástasis tumoral.

**[0005]** Iannitti *et al.* (Am J Respir Crit Care Med vol. 187, nº 6, pp. 609-620, 15 de marzo de 2013) divulga el uso de L-quinurenina y 3-hidroxi-quinurenina en el tratamiento de la fibrosis quística pulmonar mediante la restauración de la 35 inmunidad protectora frente a la infección y la mejora de la inflamación pulmonar.

**[0006]** El documento EP 1,369,114 divulga compuestos farmacéuticos, por ejemplo quinurenina, para su uso como medicamento para el tratamiento inmunosupresor de enfermedades autoinmunes, enfermedades reumáticas, aborto 40 recurrente o rechazo en caso de trasplantes de células, tejidos u órganos.

**[0007]** El documento WO 2008/087461 divulga derivados del ácido cinurénico para el tratamiento de afecciones 45 caracterizadas por hipermotilidad e inflamación del tracto gastrointestinal o gota. El documento WO 2004/007461 divulga derivados de 8-hidroxi quinolina para el tratamiento de afecciones neurológicas, más concretamente afecciones neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

**[0008]** Sin embargo, en ninguno de estos documentos (Iannitti *et al.* EP 1,369,114; WO 2008/087461; o WO 2004/007461) 50 del tratamiento de una enfermedad fibrótica seleccionada de una o más de las siguientes: queloide; cicatrización hipertrófica; fibrosis pulmonar; fibrosis renal; cirrosis hepática; fibrosis endomiocárdica; fibrosis mediastínica; mielofibrosis; fibrosis retroperitoneal; fibrosis masiva progresiva; fibrosis sistémica nefrogénica; infarto de miocardio antiguo; esclerodermia; esclerosis sistémica; y fibromas uterinos.

**[0009]** Chavez-Munoz *et al.* (Journal of Investigative Dermatology vol. 132, pp. 1501-1505, 1 de mayo de 2012); así como Forouzandeh *et al.* (Wound Repair and Regeneration, vol. 18, nº 6, pp. 614-623, 18 de octubre de 2010) divultan el uso 55 de un sustituto cutáneo que expresa indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) para mejorar la formación de cicatrices en un modelo animal fibrótico.

**[0010]** Sin embargo, ni Chavez-Munoz *et al.* ni Forouzandeh *et al.* divultan el uso de quinurenina, ácido quinurénico o ácido xanturénico. Ninguno de los documentos aporta pruebas suficientes que apoyen la hipótesis de que las propiedades 60 antiescaras notificadas del sustituto cutáneo que expresa IDO se deban a la depleción de triptófano y/o al aumento de

metabolitos de IDO, y mucho menos enseñan qué metabolitos concretos de IDO (por ejemplo, derivados de la quinurenina, NAD, ácido quinolínico o ácido picolínico) podrían ser responsables de la actividad pertinente.

5 [0011] Poormasjedi-Meibod et al. (PLoS ONE, vol. 9, nº 3, pp. 1-13, 1 de enero de 2014) revela que el KynA (ácido cinurénico) es un prometedor agente antifibrogénico candidato para mejorar el resultado de la cicatrización en pacientes con riesgo de cicatrización hipertrófica. Yunyuan Li et al. (Journal of Investigative Dermatology, vol. 134, no. 3, pp. 643-650, 1 de marzo de 2014) divulga hallazgos que sugieren que la quinurenina puede utilizarse potencialmente como agente antifibrogénico para tratar las cicatrices hipertróficas. Los documentos de Poormasjedi-Meibod et al. y Yunyuan Li et al. son posteriores a la fecha de prioridad de la presente solicitud de patente.

10 [0012] Las modalidades de tratamiento actuales para cualquier afección fibrótica, incluidos los trastornos fibroproliferantes dérmicos como la cicatrización hipertrófica (HSc) y el queoloide, siguen siendo insatisfactorias. En consecuencia, sería deseable disponer de estrategias terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones fibróticas.

## 15 RESUMEN

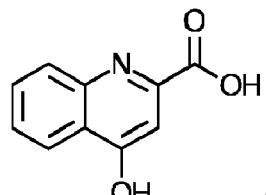
[0013] La presente invención se define por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes describen otras realizaciones de la invención.

20 [0014] Toda realización no comprendida en el ámbito de las reivindicaciones anexas no forma parte de la invención.

[0015] Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

25 [0016] La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que ciertos compuestos - quinurenina y sus análogos/isoformas, ácido quinurético y ácido xanturénico- son capaces de estimular la expresión de MMP1 y MMP3, a la vez que inhiben la expresión de colágeno y fibronectina. Además, como se describe en el presente documento, estos compuestos, cuando se aplican *in vivo*, son capaces de inhibir, prevenir o reducir la formación de la 30 cicatriz queoloide.

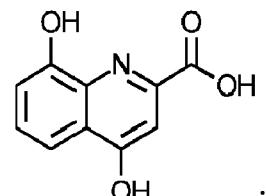
[0017] En una realización, se proporciona un compuesto que tiene la estructura del ácido cinurénico.



40

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la enfermedad fibrótica, en la que la enfermedad fibrótica se selecciona de una o más de las siguientes: queoloide; cicatrización hipertrófica; fibrosis pulmonar; fibrosis renal; cirrosis hepática; fibrosis endomiocárdica; fibrosis mediastínica; mielofibrosis; fibrosis retroperitoneal; fibrosis masiva progresiva; fibrosis sistémica nefrogénica; infarto de miocardio antiguo; esclerodermia; esclerosis sistémica; y fibromas uterinos.

45 [0018] En otra realización, se proporciona un compuesto que tiene la estructura del ácido xanturénico.

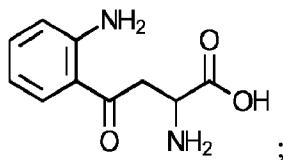


55

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la enfermedad fibrótica, en la que la enfermedad fibrótica se selecciona de una o más de las siguientes: queoloide; cicatrización hipertrófica; fibrosis pulmonar; fibrosis renal; cirrosis hepática; fibrosis endomiocárdica; fibrosis mediastínica; mielofibrosis; fibrosis retroperitoneal; fibrosis masiva progresiva; fibrosis sistémica nefrogénica; infarto de miocardio antiguo; esclerodermia; esclerosis sistémica; y fibromas uterinos.

[0019] En otra realización, se proporciona un compuesto que tiene la estructura de quinurenina

65



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la enfermedad fibrótica, en la que la enfermedad fibrótica se selecciona de una o más de las siguientes: queloide; cicatrización hipertrófica; fibrosis pulmonar; fibrosis renal; cirrosis hepática; fibrosis endomiocárdica; fibrosis mediastínica; mielofibrosis; fibrosis retroperitoneal; fibrosis masiva progresiva; fibrosis sistémica nefrogénica; infarto de miocardio antiguo; esclerodermia; esclerosis sistémica; y fibromas uterinos.

[0020] En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la enfermedad fibrótica, en la que la composición farmacéutica comprende un compuesto que tiene la estructura del ácido quinurético, ácido xanturénico o quinurenina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de la enfermedad fibrótica en la que la enfermedad fibrótica se selecciona de una o más de las siguientes: queloide; cicatrización hipertrófica; fibrosis pulmonar; fibrosis renal; cirrosis hepática; fibrosis endomiocárdica; fibrosis mediastínica; mielofibrosis; fibrosis retroperitoneal; fibrosis masiva progresiva; fibrosis sistémica nefrogénica; infarto de miocardio antiguo; esclerodermia; esclerosis sistémica; y fibromas uterinos.

[0021] En una realización preferida de la invención, la enfermedad fibrótica es la cicatrización queloide o hipertrófica. En otra realización preferida de la invención, la enfermedad fibrótica es la fibrosis pulmonar. En otra realización preferida de la invención, la enfermedad fibrótica es la cirrosis hepática. En otra realización preferida de la invención, la enfermedad fibrótica es la fibrosis renal. En otra realización preferida de la invención, la enfermedad fibrótica es la fibrosis endomiocárdica o la esclerodermia.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 [0022]

**Figura 1: Regulación positiva de Indoleamina 2, 3-Dioxigenasa (IDO) de la expresión de MMP-1 en fibroblastos dérmicos humanos.** El panel A muestra fibroblastos que fueron transducidos con nada (C), vector adenoviral (V) o un vector con el gen recombinante de la IDO (IDO) durante 48 h, donde se detectó la IDO y su actividad mediante transferencia de Western (panel izquierdo) y medición de los niveles de quinurenina (panel derecho), respectivamente (N.D indica que el nivel de quinurenina no era detectable). El panel B muestra fibroblastos no tratados, con vector adenoviral y transducidos con IDO, que se lisaron tras ser cultivados durante 48 horas, y la expresión de MMP-1 se detectó mediante transferencia de Western. El panel C muestra fibroblastos que se incubaron con el medio condicionado tomado de fibroblastos de control, con vector vacío o inducidos por el vector adenoviral IDO durante 48 horas, en los que se analizó la expresión de MMP-1 mediante transferencia de Western. La  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga en los paneles A, Banda C. \* indica  $p < 0,001$ .

**Figura 2: Efectos de la quinurenina y el triptófano en la expresión de MMP-1 en fibroblastos dérmicos humanos.** Los paneles A y B muestran fibroblastos dérmicos que fueron cultivados en presencia de varias concentraciones de quinurenina durante 48 horas, cuando las células fueron cosechadas y lisadas, antes de realizar transferencia de Western, mostrando la relación de MMP-1 a  $\beta$ -actina se presenta en el panel B. El panel C muestra fibroblastos dérmicos que fueron cultivados en presencia o ausencia de triptófano (25 mg / ml) durante 48 horas, cuando las células fueron cosechadas y lisadas, y la expresión de MMP-1 fue evaluada por transferencia de Western. El panel D muestra fibroblastos cultivados en presencia de diferentes concentraciones de triptófano durante 48 horas, cuando se evaluó la expresión de MMP-1 mediante transferencia de Western. En todos los paneles se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga.

**Figura 3: Efectos de la quinurenina en la expresión de MMP-2 y -3 en fibroblastos dérmicos humanos -** muestra fibroblastos dérmicos que fueron cultivados en presencia de varias concentraciones de quinurenina durante 48 horas, antes de que las células fueran cosechadas y lisadas, y se realizara transferencia de Western utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo anti-MMP-2 humana (Panel A) o un anticuerpo monoclonal de ratón anti-MMP-3 (Panel B). El Panel C muestra la relación entre la expresión de MMP-3 y  $\beta$ -actina en tres experimentos independientes; en todos los experimentos se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga.

**Figura 4: Detectar la actividad de las MMP en los medios condicionados de fibroblastos dérmicos humanos utilizando el kit fluorimétrico de ensayo genérico de MMP SensoLyte 520 -** muestra fibroblastos que se cultivaron en presencia (Kyn) o ausencia (CTL) de 50  $\mu$ g/ml de quinurenina durante 48 horas, cuando se recogieron los medios condicionados de las células, después de centrifugar a 1000  $\times$  g durante 10 minutos, se utilizó el sobrenadante para detectar la actividad de las MMP según las instrucciones del fabricante (los medios se incubaron a 1mM de APMA a 37°C durante 3 horas). (los medios se incubaron con 1mM de APMA a 37°C durante 3 horas. A continuación, se mezclaron 50  $\mu$ l/pocillo de la muestra que contenía MMP con 50  $\mu$ l de solución de sustrato de

MMP y el medio anterior al cultivo celular se mezcló con 50  $\mu$ l de solución de sustrato de MMP y se utilizó como control de sustrato y, tras incubar 1 hora, se midió la intensidad de fluorescencia a EX/EM=490 nm/520 nm). La actividad de las MMP se representa como unidad de fluorescencia relativa (RFU). Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n=3). \* indica P< 0,05.

5

**Figura 5: Efectos de la quinurenina en la expresión de MMP-1 en diferentes tipos de células mesenquimales** - muestra las células que fueron cultivadas y tratadas con quinurenina en concentraciones de 12,5 a 150  $\mu$ g/ml durante 48 horas y la expresión de MMP-1 se analizó mediante transferencia de Western y la  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga en todos los experimentos. **El Panel A** muestra la expresión de MMP-1 en sinoviocitos. **El Panel B** muestra la expresión de MMP-1 en la línea celular de fibroblastos pulmonares IMR-90.

10

**Figura 6: Efectos de la quinurenina en la expresión de MMP-1 en diferentes tipos de células epiteliales** - muestra células cultivadas y tratadas con quinurenina en concentraciones de 12,5 a 150  $\mu$ g/ml durante 48 horas y la expresión de MMP-1 se analizó mediante transferencia de Western y se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga en todos los experimentos, donde los paneles superior e inferior izquierdo, muestran lisados de fibroblastos no tratados o tratados con quinurenina que se utilizaron como controles negativo y positivo, respectivamente.

15

**Figura 7: La quinurenina estimula la fosforilación de ERK1/2 en fibroblastos dérmicos humanos** - muestra fibroblastos dérmicos que se cultivaron en ausencia o presencia de 100  $\mu$ g/ml de quinurenina durante 60 minutos, después se cosecharon las células y se lisaron con tampón de lisis celular, antes de realizar una matriz de anticuerpos utilizando un kit de matriz de fosfoquininas humanas (R & D System™), con el punto 1, control positivo; el punto 2, fosfo-P38 $\alpha$ ; el punto 3, fosfo-ERK1/2; el punto 4, fosfo-GSK-3 $\alpha/\beta$ ; el punto 5, fosfo-P53; el punto 6, control positivo.

20

**Figura 8: Estimulación por quinurenina de la fosforilación de MEK y ERK1/2 en fibroblastos dérmicos humanos** - muestra fibroblastos dérmicos que se cultivaron en presencia de 100  $\mu$ g/ml de quinurenina en los puntos temporales indicados, cuando las células se cosecharon y se lisaron, antes de realizar transferencia de Western utilizando anticuerpos contra MEK fosforilada o ERK1/2 **fosforilada** (se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga).

25

**Figura 9 - La adición de inhibidores de la fosforilación de MEK o ERK1/2 anula el efecto de la expresión de MMP-1 estimulada por la quinurenina en los fibroblastos dérmicos. Panel A:** se cultivaron fibroblastos dérmicos en ausencia o presencia de 100  $\mu$ g/ml de quinurenina con o sin diversas concentraciones de PD98059. **Panel B:** muestra fibroblastos dérmicos cultivados en ausencia o presencia de 100  $\mu$ g/ml de quinurenina con o sin 30  $\mu$ M de PD98059 (inhibidor de ERK1/2), 30  $\mu$ M de U0126 (inhibidor de MEK) o 10  $\mu$ M de U0126. La expresión de MMP-1 se detectó mediante transferencia de Western (se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga en todos los experimentos).

30

**Figura 10 - Efecto de la quinurenina, el ácido quinurético y el ácido xanturénico sobre la expresión de procolágeno tipo 1 en fibroblastos dérmicos** - muestra fibroblastos dérmicos humanos tratados con las concentraciones indicadas de quinurenina durante 48 horas (arriba), donde las células se recogieron y se lisaron con tampón de lisis celular y un total de 50  $\mu$ g de proteína se fraccionó por SDS-PAGE al 8%, antes de realizar transferencia de Western utilizando anticuerpos contra el procolágeno. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga, y también se analizaron el ácido quinurético (KA) y el ácido xanturénico (XA) (abajo).

45

**Figura 11 - Efecto de la quinurenina en la proliferación de fibroblastos** - muestra fibroblastos dérmicos humanos cultivados en presencia de las concentraciones indicadas de quinurenina durante 48 horas. El ensayo de proliferación celular MTT se realizó como se describe en el presente documento, indicándose la proliferación celular como índice celular (OD570nm) en el ensayo MTT.

50

**Figura 12 - Aspecto clínico e histología de la herida y cicatrices** - muestra heridas de oreja de conejo que fueron tratadas diariamente con nada (CTL), gel CMC solo (Gel), o 50  $\mu$ g de quinurenina (Kyn) en 0,1 ml de gel CMC a partir del día 8 durante un total de 3 semanas. **Panel A:** muestra la histología microscópica de las heridas que no recibieron nada (CTL), gel CMC (Gel) o quinurenina en gel CMC (Kyn) el día 28 a un aumento  $\times 25$ . **Panel B:** muestra el índice de elevación de la cicatriz (SEI) medido (Media  $\pm$  DE del SEI para heridas no tratadas, tratadas con gel CMC y tratadas con quinurenina en gel CMC) \* muestra una diferencia significativa entre los controles tratados con quinurenina y los no tratados (P<0,001); \*\* muestra una diferencia significativa entre los grupos de control con quinurenina y con gel CMC (P<0,01). **Panel C:** muestra secciones de piel de grosor completo teñidas con tricrómico de Massons de una herida cutánea no tratada (paneles de la izquierda), de una herida cutánea tratada con crema (paneles centrales) o de una herida tratada con quinurenina (paneles de la derecha) con aumentos de  $\times 25$  y  $\times 100$ . **Panel D:** muestra el contenido total de hidroxiprolina de las pieles procedentes de heridas no tratadas (total 4 heridas), heridas tratadas con crema (total 4 heridas) o heridas tratadas con quinurenina (total 8 heridas) - \* indica p<0,01.

55

**Figura 13 - La aplicación tópica de quinurenina disminuye el colágeno tipo-1 y aumenta la expresión de MMP-1 en la piel de la oreja de conejo** - muestra heridas en la oreja de conejo que fueron tratadas con nada

(CTL) o gel solo (Gel) o quinurenina más gel (Kyn) como se describe anteriormente, donde las heridas de la piel se utilizaron para extraer ARN total por Trizol™ y 1 µg de ARN se utilizó para sintetizar ADNc para RT-PCR cuantitativa para colágeno α1 tipo-1, MMP-1 y β-actina. **Panel A:** muestra el nivel de expresión relativa del colágeno α1 tipo-1 en el tejido cutáneo de la oreja de conejo. **Panel B:** muestra el nivel de expresión relativa de MMP-1 en el tejido cutáneo de la oreja de conejo - \* indica  $p < 0,05$ .

**Figura 14 - Efecto de la isoforma quinurenina sobre la expresión de MMP-1 en fibroblastos dérmicos humanos** - muestra fibroblastos dérmicos que se cultivaron en ausencia (CTL) o presencia de 50 µg/ml de DL-quinurenina (DL-Kyn) o D-quinurenina (D-Kyn) o L-quinurenina (L-Kyn) durante 48 horas. En ese momento, las células se cosecharon y se lisaron en tampón de lisis de proteínas (50 µg de proteína total se cargaron en un gel de acrilamida SDS al 10%) antes de realizar transferencia de Western con anticuerpos anti-MMP-1 humana, con β-actina como control de carga, lo que demuestra que todas las isoformas de quinurenina probadas aumentan la expresión de MMP-1 en fibroblastos dérmicos, sin embargo, la L-quinurenina parece tener más actividad en comparación con las otras dos isoformas.

**Figura 15 - Efectos de los análogos de la quinurenina (FS1) sobre la expresión de colágeno en fibroblastos dérmicos humanos** - muestra fibroblastos dérmicos que fueron tratados con diversas concentraciones de DL-quinurenina (FS1), L-quinurenina, D-quinurenina o ácido quinurético (FS2) y la correspondiente expresión de colágeno en niveles de ARNm detectados por PCR en tiempo real, con β-actina como control de carga.

**Figura 16 - Efectos de los análogos de la quinurenina (FS1) en la expresión de fibronectina en fibroblastos dérmicos humanos** - muestra fibroblastos dérmicos tratados con diversas concentraciones de DL-quinurenina (FS1), L-quinurenina, D-quinurenina o ácido quinurético (FS2) y la correspondiente expresión de fibronectina en niveles de ARNm detectados por PCR en tiempo real, con β-actina como control de carga.

**Figura 17 - Comparación del efecto supresor de 50, 100, 150 µg/mL de metabolitos de triptófano (FS1, LK, FS2, DK) sobre la proliferación de esplenocitos que simulan la ConA** - muestra que hubo una reducción de casi 5 veces en la proliferación de esplenocitos tras el tratamiento con 100 y 150 µg/ml de D-Kyn, L-Kyn, DL-Kyn (FS1) y ácido cinurénico (FS2) después de 96 horas ( $P < 0,05$ ), aunque la proliferación de esplenocitos se redujo significativamente unas 2 veces por D-Kyn, L-Kyn y DL-Kyn a 100 y 150 µg/ml después de 48 horas, pero FS2 mostró un efecto menor sobre la proliferación.

**Figura 18 - Micromatriz de proteínas de factores inmunitarios en esplenocitos de ratón tratados con FS1 (DL-quinurenina) y no tratados** - muestra que el FS1 tiene un efecto inmunosupresor sobre la producción de algunas citoquinas y quimoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-2, CXCL9 y CXCL10, y que el FS1 muestra una disminución significativa de la producción de IL-17, que se cree que desempeña un papel importante en la inflamación. **Panel A:** muestra esplenocitos activados que se dejaron sin tratar (ConA) o se trataron con 100 µg/mL de Kyn (ConA+Kyn) durante 48 horas, momento en el que se recogió el medio condicionado (CM) de las células sin tratar y tratadas y luego se expuso a una membrana Proteome Profiler Antibody Array™ con porcentajes de valor de densidad que se muestran tanto para las células sin tratar como para las tratadas para cada punto de referencia como se muestra en el Panel B. **Panel B:** muestra señales identificadas por la membrana Proteome Profiler Antibody Array. **Panel C:** muestra el número de mancha que aparece en el panel B representa la proteína de referencia.

**Figura 19 - Efecto duradero de FS1 y FS2 sobre la expresión de MMP1 en fibroblastos dérmicos humanos.** **Panel A:** muestra el efecto duradero de la quinurenina (FS1) y el ácido quinurético (FS2) sobre la expresión de MMP1, donde los fibroblastos se trataron con FS1 o FS2 (100 µg/ml) durante 48 horas y se sustituyó el medio y se cosecharon las células inmediatamente, y a las 12, 24 y 48 horas después de la retirada del tratamiento, seguida de la evaluación de la expresión de MMP1 en los fibroblastos dérmicos mediante transferencia de Western. **Panel B:** muestra la relación de expresión MMP1/β-actina calculada en los fibroblastos tratados. Los datos son la media ± SEM de 4 experimentos independientes (\*Valor  $P < 0,05$  y \*\*Valor  $P < 0,01$ ,  $n=4$ ).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0023]** Cualquier término no definido directamente en el presente documento se entenderá que tiene los significados comúnmente asociados a ellos según se entienden en el arte de la invención. Tal y como se emplean a lo largo de la especificación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados.

**[0024]** Tal y como se utiliza aquí, un "sujeto" se refiere a un animal, como un ave o un mamífero. Entre los animales específicos figuran la rata, el ratón, el perro, el gato, la vaca, la oveja, el caballo, el cerdo o el primate. Además, un sujeto puede ser un ser humano, también denominado paciente. Un sujeto puede ser además un animal transgénico. Un sujeto puede ser además un roedor, como un castor, un ratón o una rata.

**[0025]** Tal como se utiliza aquí, un "inhibidor" se refiere a un fármaco, compuesto o agente que restringe o retrasa una acción o función fisiológica, química o enzimática. Un inhibidor puede provocar una disminución de al menos el 5% de la

actividad enzimática. Un inhibidor también puede referirse a un fármaco, compuesto o agente que impide o reduce la expresión, transcripción o traducción de un gen o proteína.

5 **[0026]** La 'Indoleamina 2, 3-Dioxigenasa', o 'IDO', es una enzima limitante de la tasa de hemo que cataliza el triptófano a N-formilquinurenina y luego a quinurenina (Kyn), y se encuentra en células no hepáticas principalmente en macrófagos y trofoblastos. Recientes descubrimientos han implicado al catabolismo del triptófano, un aminoácido esencial, por la IDO en la tolerancia inmunitaria (Kahari y Saarialho-Kere 1997). Como se ha demostrado aquí, la quinurenina, así como sus productos de descomposición ácido kinurénico y ácido xanturénico, inducen MMP-1 y MMP-3, además de mostrar una reducción de la fibrosis *in vitro* e *in vivo*.

10 **[0027]** La familia de las "metaloproteasas de matriz" o "MMP" consta de 25 proteinasas dependientes del zinc y del calcio en el sistema de los mamíferos. Según su especificidad de sustrato, estructura primaria y localización celular, se han identificado 5 subfamilias diferentes de miembros estrechamente relacionados conocidos como colagenasas, gelatinasas, estromelisinas, matrilisinas y MMP de tipo membrana (Murphy *et al.* 2002). De todas estas MMP, la MMP1 es la principal enzima implicada en el proceso colagenolítico, descomponiendo los colágenos intersticiales como los tipos I, II y III, mientras que la MMP-3 (estromelisina-1) es una proteasa conocida por degradar principalmente la parte no colagenosa de la ECM como la fibronectina, los proteoglicanos y la laminina (Kahari y Saarialho-Kere 1997). El aumento de la expresión y liberación de MMP1 y MMP-3 por los fibroblastos puede iniciar la degradación de casi todos los componentes principales de la ECM (Saus *et al.* 1988). Actualmente se acepta que las MMP producidas por los queratinocitos facilitan la migración epitelial, mientras que las MMP expresadas por los fibroblastos promueven la remodelación tisular (Salo *et al.* 1991).

15 **[0028]** "Fibrosis" es un término general que implica la formación o el desarrollo de un exceso de tejido conjuntivo fibroso en un órgano o tejido como proceso reparador o reactivo, en contraposición a la formación de tejido fibroso como constituyente normal de un órgano o tejido. La cicatrización es una fibrosis confluente que anula la arquitectura del órgano o tejido subyacente. Existen muchas enfermedades y/o afecciones que se caracterizan por la fibrosis o están asociadas a ella, entre las que se incluyen: queloide, cicatriz hipertrófica, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, cirrosis hepática, inflamación crónica de la túnica albugínea (CITA), fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, infarto de miocardio antiguo, esclerodermia y esclerosis sistémica.

20 **[0029]** Se proporcionan en el presente documento varios compuestos para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones caracterizadas por fibrosis o relacionadas con ella. En el contexto de la presente descripción, el término "tratamiento" puede referirse al tratamiento de la fibrosis o enfermedad fibrótica existente, o alternativamente puede referirse al tratamiento que tiene lugar antes o durante el proceso fibrótico con el fin de prevenir el desarrollo o la progresión de la fibrosis. Los compuestos descritos en el presente documento pueden estar aislados, unidos o combinados con compuestos trazadores, liposomas, portadores de carbohidratos, portadores poliméricos u otros agentes o excipientes, como podrá comprobar un experto en la materia. En una realización alternativa, dichos compuestos pueden comprender un medicamento, en el que dichos compuestos pueden estar presentes en una cantidad farmacológicamente eficaz. Los compuestos pueden ser adecuados para su administración a un sujeto que los necesite, en virtud del hecho de que el sujeto puede beneficiarse de la profilaxis o el tratamiento de la fibrosis o la enfermedad fibrótica. Los compuestos también pueden incluir tautómeros o estereoisómeros.

25 **[0030]** Tal como se utiliza en el presente documento, "FS" se refiere a FibroStops (por ejemplo, FS1 se utiliza como abreviatura de quinurenina (o DL-quinurenina o DL-Kyn) y FS2 o KA puede utilizarse como abreviatura de ácido kinurénico). La L-quinurenina puede representarse en el presente documento como L-Kyn y la D-quinurenina puede representarse en el presente documento como D-Kyn. Del mismo modo, el ácido xanturénico puede representarse en el presente documento como XA.

30 **[0031]** El término "medicamento", tal como se utiliza aquí, se refiere a una composición que puede administrarse a un paciente o sujeto de ensayo y que es capaz de producir un efecto en el paciente o sujeto de ensayo. El efecto puede ser químico, biológico o físico, y el paciente o sujeto de ensayo puede ser humano, o un animal no humano, como un roedor o ratón transgénico, o un perro, gato, vaca, oveja, caballo, hámster, cobaya, conejo o cerdo. El medicamento puede estar compuesto por la entidad química eficaz sola o en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 **[0032]** El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" puede incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos, antimicrobianos o antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Un excipiente puede ser adecuado para la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intratecal, tópica u oral. Un excipiente puede incluir soluciones acuosas estériles o dispersiones para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. El uso de tales medios para la preparación de medicamentos es conocido en la técnica.

40 **[0033]** Las composiciones o compuestos según algunas realizaciones pueden administrarse por cualquiera de las diversas vías conocidas. Ejemplos de métodos que pueden ser adecuados para la administración de un compuesto incluyen por vía oral, intravenosa, inhalación, intramuscular, subcutánea, tópica, intraperitoneal, suppositorio intra-rectal o intra-vaginal, sublingual, y similares. Los compuestos aquí descritos pueden administrarse como solución acuosa estéril,

o pueden administrarse en un excipiente liposoluble, o en otro formato de solución, suspensión, parche, comprimido o pasta, según proceda. Una composición que comprenda los compuestos aquí descritos puede formularse para su administración por inhalación. Por ejemplo, un compuesto puede combinarse con un excipiente para permitir la dispersión en un aerosol. Los expertos en la materia conocerán ejemplos de formulaciones para inhalación. Pueden incluirse otros agentes en combinación con los compuestos aquí descritos para facilitar la absorción o el metabolismo, o retrasar la dispersión en el huésped, como en una formulación de liberación controlada. Ejemplos de formulaciones de liberación controlada serán conocidos por los expertos en la materia, y pueden incluir microencapsulación, embolización dentro de una matriz de carbohidratos o polímeros, y similares. Otros métodos conocidos en la técnica para hacer formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", (19.<sup>a</sup> edición), ed. A. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa. A. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

**[0034]** La dosificación de las composiciones o compuestos de algunas realizaciones aquí descritas puede variar en función de la vía de administración (oral, intravenosa, inhalación o similar) y de la forma en que se administra la composición o compuesto (solución, liberación controlada o similar). La determinación de las dosis adecuadas está al alcance de cualquier experto en la materia. Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad eficaz", una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad farmacológicamente eficaz" de un medicamento se refiere a una cantidad de un medicamento presente en una concentración tal que dé lugar a un nivel terapéutico de fármaco administrado durante el plazo en que se utiliza el fármaco. Esto puede depender del modo de administración, el periodo de tiempo de la dosis, la edad, el peso, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto que recibe el medicamento. Los métodos para determinar las cantidades efectivas son conocidos en la técnica.

**[0035]** En una realización, se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad fibrótica, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene una estructura correspondiente a la Fórmula I, II o III. La enfermedad fibrótica puede ser una de las siguientes: queloide, cicatriz hipertrófica, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, cirrosis hepática, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, infarto de miocardio antiguo, esclerodermia, esclerosis sistémica, fibromas uterinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos celulares

**[0036]** El prepucio neonatal y las articulaciones se utilizan como fuentes de fibroblastos, queratinocitos y sinoviocitos. Los procedimientos se realizaron con la aprobación del Comité de Ética Humana de la Universidad de Columbia Británica. Los cultivos de fibroblastos de prepucio humano se establecieron como se ha descrito previamente (Li *et al.*, 2006). Brevemente, se recogió el prepucio y se lavó tres veces con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; GIBCO™, Grand Island, NY) suplementado con un preparado antibiótico-antimicótico (100 u/ml de penicilina, 100 µg /ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B) (Invitrogen Life Technologies™, Gaithersburg, MD). Los especímenes se diseccionaron libres de grasa y se picaron en trozos pequeños de menos de 2,0 mm de diámetro, se lavaron seis veces con DMEM, se distribuyeron en placas Petri de 60 × 15 mm y se incubaron a 37 °C en un incubador humidificado con agua en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se sustituyó dos veces por semana. Al alcanzar la confluencia, las células se liberaron mediante tripsinización (tripsina al 0,1%, Invitrogen Life Technologies™) y (EDTA al 0,02%, Sigma™, St. Louis, MO), se dividieron para el subcultivo en una proporción de 1:6 y se resembraron en matraces de 75 cm<sup>2</sup>. Para este estudio se utilizaron fibroblastos de los pasajes 3-7.

**[0037]** Los queratinocitos de prepucio humano se establecieron como se ha descrito previamente (Ghahary *et al.*, 1998). Las células se cultivaron en medio de queratinocitos sin suero (KSFM; Invitrogen Life Technologies™) suplementado con extracto de hipófisis bovina (50 µg/ml) y EGF (0,2 ng/ml). Estas células se utilizaron en los pasajes 2-5.

**[0038]** Los sinoviocitos se obtuvieron mediante digestión enzimática de la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide durante el reemplazo articular con 1 mg/ml de colagenasa (Sigma™) en

**[0039]** RPMI1640 (Invitrogen Life Technologies™) durante 4 horas a 37 °C. Las células disociadas se sembraron en medio de crecimiento de sinoviocitos (Cell Applications Inc™, San Diego, CA) suplementado con penicilina G sódica (100 U/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) y anfotericina B (0,25 µg/mL). Los sinoviocitos resultaron ser células morfológicamente homogéneas similares a los fibroblastos y se utilizaron en los pasajes 2-5.

**[0040]** La línea celular de carcinoma de células escamosas (UMSCC) derivada de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (ATCC™, Manassas, VA) se mantuvo en medio RPMI-1640 con un 10% de FBS. La línea celular de queratinocitos humanos HACAT (ATCC) y la línea celular de epitelio basal alveolar humano carcinómico A549 (ATCC™) se cultivaron en DMEM con un 10% de FBS. Los fibroblastos de pulmón diploides IMR-90 (ATCC™) se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM, Invitrogen™) con un 10% de FBS.

### Transfección génica mediante vector adenoviral

**[0041]** La construcción del vector adenoviral que expresa la Indoleamina 2, 3-Dioxigenasa (IDO) ha sido descrita

previamente (Li *et al.*, 2004). Se utilizaron adenovirus recombinantes para infectar fibroblastos de piel humana con una multiplicidad de infección (MOI) de 100. Las partículas virales libres se eliminaron del medio de cultivo 30 horas después de la infección. El éxito de la infección se determinó mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio invertido Motic™ equipado con un filtro de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Motic Instruments™, Richmond, BC, Canadá) para visualizar el gen informador GFP. La expresión de IDO se evaluó mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo anti-IDO humano como se ha descrito previamente (Li *et al.*, 2004). La actividad biológica de la IDO se evaluó midiendo los niveles del producto degradante del triptófano, la quinurenina, presente en el medio condicionado.

#### 10 Medición de la quinurenina en medios acondicionados

[0042] Los niveles de quinurenina se midieron mediante un método descrito previamente (Tokikawa *et al.*, 1988). En resumen, se recogieron unos 2 ml de medio condicionado del cultivo iniciado con el mismo número de células 3 días después de la transfección. Las proteínas de los medios acondicionados se precipitaron con ácido tricloroacético. Tras centrifugar para eliminar las proteínas precipitadas, se transfirieron unos 0,5 ml de sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml y se incubaron con un volumen igual de reactivo de Ehrich (Sigma™) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La absorción de la solución resultante se midió a 490 nm mediante espectrofotómetro en 2 horas. Los valores de quinurenina en los medios acondicionados se calcularon mediante una curva estándar con una concentración definida de quinurenina (0-20 µg/ml).

#### 20 Tratamientos celulares

[0043] Para la recogida de medios condicionados, los fibroblastos fueron transducidos por ningún vector o vector simulado de control o adenovirus IDO durante 30 horas. Los virus se eliminaron mediante lavado con PBS. Se añadió DMEM fresco con un 10% de FBS y antibióticos y se continuó cultivando las células durante otras 48 horas. A continuación, se recogieron los medios condicionados de fibroblastos no tratados, con vector simulado o transducidos con adenovirus IDO. Los fibroblastos al 80% de confluencia se trataron con medios que contenían un 90% de medio condicionado más un 10% de medio fresco en presencia de un 10% de FBS. A continuación, se cosecharon las células al cabo de 48 horas y se realizó el análisis de transferencia de Western

[0044] En otra serie de experimentos, los fibroblastos al 80% de confluencia se trataron con quinurenina o triptófano a las concentraciones indicadas como se menciona en la sección de resultados en DMEM conteniendo 2% FBS y antibióticos durante 48 horas. A continuación, se cosecharon las células por tripsinización y se realizó el análisis de transferencia de Western

[0045] De forma similar, otras células como sinoviocitos, IMR-90, queratinocitos, UMSSC y A549 se trataron con quinurenina en concentraciones de 12,5 a 150 µg/ml en medios apropiados para cada tipo celular como se ha descrito anteriormente durante 48 horas. A continuación, se cosecharon las células para el análisis de transferencia de Western.

#### 40 Análisis de transferencia de Western

[0046] Las células se cosecharon mediante tripsina/EDTA y se lisaron con tampón de lisis celular que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7,40), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% TritonX-100™, 0,5% Igepal CA-630, 0,025% NaN3 y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma™). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 20.000 × g durante 10 minutos. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó mediante el método MicroBCA™ (Pierce™, Rockford, IL). Las proteínas del sobrenadante se mezclaron con tampón de carga de muestras de proteínas (concentración final: 60 mM Tris-HCl (pH 6,80), 2% SDS, 10% glicerol, 1,5% β-mercaptoetanol, 0,002% azul de bromofenol) y fraccionado por tamaño mediante un 10% de gel de SDS-poliacrilamida. Tras transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante iBlot™ (Invitrogen Life Technologies™), se bloquearon las uniones no específicas con tampón fosfato salino veinte20 (PBS-T) con un 5% de leche desnata durante 1 hora. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche. Tras la incubación con un anticuerpo secundario durante 1 hora, las bandas de proteínas se visualizaron mediante un sistema de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL™) (Santa Cruz Biotechnology™, Santa Cruz, CA). Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio fueron: monoclonal de ratón anti-MMP-1 humana (R&D Systems™, Minneapolis, MN), monoclonal de ratón anti-MMP-3 humana (R&D System™), monoclonal de conejo anti-MMP-2 humana (Epitomics™, Burlingame, CA), policlonal de conejo anti-fosfo-MEK1/2 (Ser217/221™) (Cell Signaling Technology™, Danvers, MA), policlonal de conejo anti-fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology™), monoclonal anti-β-actina (Sigma™), y anti-procolágeno tipo I de ratón (Developmental Studies Hybridoma Bank™, Iowa City, IA). Los anticuerpos secundarios fueron IgG antiratón de cabra (H+L) conjugado HPR o IgG anti-conejo de cabra (H+L) conjugado HPR (Bio-rad Laboratory™ (Mississauga, ON, Canadá). Los anticuerpos secundarios se utilizaron a una concentración de 1:3000.

#### Ensayo de actividad MMP

[0047] La actividad de las MMP se evaluó utilizando un péptido de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) F-FAM/QXL™ 520 como sustrato de MMP (kit de ensayo genérico de MMP SensoLyte 520™, AnaSpec, Inc™, Fremont, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, las células se trataron con o sin

50 µg/ml de quinurenina durante 48 horas. Se recogieron los medios condicionados y se incubaron con 1mM de APMA (acetato 4-aminofenil-mercúrico, en el componente C, AnaSpect™) a 37 °C durante 3 h. Tras la activación de las MMP con APMA, se mezclaron 50 µl/pocillo en placa de 96 pocillos de medio condicionado con 50 µl de solución de sustrato de MMP. Tras incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos, se midió la intensidad de fluorescencia a EX/EM=490 nm/520 nm en cada muestra, incluido el control de sustrato, utilizando el lector de microplacas de fluorescencia Infinite F500™ (Tecan Group Ltd™, Morrisville, NC).

### Fosforilación de proteínas

10 [0048] Los fibroblastos humanos al 90% de confluencia se dejaron en ayunas en DMEM sin FBS durante la noche, seguido de un tratamiento con o sin 100 µg/ml de quinurenina durante 2 horas. La fosforilación de proteínas se evaluó utilizando el Human Phospho-Kinase Array™ (R&D System™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los anticuerpos de captura y de control se mancharon por duplicado en membranas de nitrocelulosa (un total de 46 sitios de fosforilación de cinasas). Los lisados celulares (300 µg de proteína total por matriz) se incubaron con la matriz durante la noche. Se 15 lavó la matriz para eliminar las proteínas no unidas, y a continuación se incubó con el cóctel de anticuerpos de detección biotinilados. Tras la incubación con estreptavidina-HPR durante 30 minutos, las señales se visualizaron mediante el sistema de detección ECL (Santa Cruz™). Las transferencias se analizaron por densitometría, y la fosforilación de proteínas se normalizó con respecto a un control positivo que se representó en cada membrana.

20 **Modelo de cicatriz hipertrófica de oreja de conejo y aplicación tópica de quinurenina**

25 [0049] Para este estudio se utilizaron conejos hembra (blancos de Nueva Zelanda) de 4,5-5 kg de peso. El protocolo fue revisado y aprobado por los comités de cuidado animal de la Universidad de British Columbia. El modelo de oreja de conejo de cicatriz hipertrófica se creó como se ha descrito previamente (Rahmani-Neishaboor, *et al.*, 2010). Brevemente, 2 conejos fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de ketamina (22,5 mg/kg) y xilacina (2,5 mg/kg) seguida de gas isoflurano mediante intubación traqueal. Se crearon cuatro heridas hasta el cartílago desnudo en la cara ventral de cada oreja utilizando un punzón de biopsia dérmica de 8 mm para extirpar secciones de piel de grosor completo. Se aplicaron antibióticos en las heridas diariamente hasta que se inició el tratamiento con quinurenina.

30 [0050] Se aplicó cinureína en gel CMC (Rahmani-Neishaboor *et al.*, 2010) con una concentración de 500 µg/ml por vía tópica a las heridas del grupo experimental (0,1 ml por herida) diariamente durante 3 semanas a partir de 1 semana después de la herida. Las heridas del grupo de control recibieron el tratamiento con una cantidad igual de crema sola al día.

35 [0051] Los animales fueron sacrificados en la semana 3 después de los tratamientos. Se recogieron cicatrices (biopsias en sacabocados de 10 mm). Cada cicatriz se seccionó en dos a lo largo de su eje longitudinal y la mitad de ellas se procesó para el análisis histológico rutinario y la otra mitad se conservó a -80°C para su uso futuro.

40 [0052] La elevación de la cicatriz se cuantificó midiendo el índice de elevación de la cicatriz (SEI) a partir de la sección de tejido teñida con H & E. El SEI es una relación entre la altura total del tejido de la herida y el tejido normal situado por debajo de la cicatriz hipertrófica. Un SEI de 1 indica que la altura de la cicatriz es igual a la de la dermis circundante no lesionada; un SEI > 1 indica una cicatriz hipertrófica elevada.

### Ensayo MTT

45 [0053] El efecto de la quinurenina en la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos se detectó mediante el ensayo MTT [3-(4, 5-Dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio bromuro]. En resumen, se sembraron 10.000 células en una placa de 24 pocillos y se incubaron con diferentes concentraciones de quinurenina durante 48 horas. Se retiraron los medios y se añadieron 0,2 ml de MTT (5 mg/ml en DMEM con un 2% de FBS). Las células se incubaron con MTT durante 4 horas. 50 Tras lavar 3 veces con PBS, se añadieron 0,2 ml de DMSO para disolver los cristales. La absorbancia se midió a 570 nm.

55 [0054] **Medición del contenido de hidroxiprolina de la muestra de piel:** Según un método descrito anteriormente (Gawronska-Kozak B. *et al.* 2006), se pesaron la mitad de los punzones de piel de 8 mm de diámetro y se congelaron a -80°C. Las pieles se homogeneizaron en 2 ml de PBS y se almacenaron a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, se añadió 1 ml de HCl 6N y la mezcla se calentó a 120 °C durante 5 horas. Se añadieron 20 µl de muestras enfriadas y 50 µl de solución de cloramina T a la placa de 96 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 50 µl de solución de Ehrlich y la mezcla se incubó a 65 °C durante 15 minutos. La absorbancia se leyó a 570 nm. La concentración de hidroxiprolina se calculó mediante una curva estándar.

60 **Extracción de ARN, síntesis de ADNc y RT-PCR cuantitativa**

65 [0055] El ARN se extrajo con Trizol™ (Invitrogen Life Technologies™). Brevemente, se añadió 1 ml de Trizol™ al tejido cutáneo homogeneizado. Se añadieron 250 µl de cloroformo después de dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo eppendorf tras centrifugación durante 10 minutos a 20.000 × g. Se añadió a la fase acuosa un volumen igual de isopropanol y se mezcló suavemente. El pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75% después de centrifugarlo durante 20 minutos. El ARN se disolvió en H<sub>2</sub>O tratada con DEPC y su

concentración se midió con Nanodrop2000™. El ADNc se sintetizó con el kit de síntesis de ADNc de Roche según la introducción del fabricante utilizando 1 µg de ARN total en cada muestra. La PCR cuantitativa en tiempo real para colágeno α1 tipo-1 de conejo, MMP-1 y gen housekeeper β-actina se realizó en ViiA7 (Invitrogen™). Las muestras de ADNc se añadieron a una mezcla maestra de reacción de PCR que contenía STBR Green Master Mix™ (Rox) (Roche™, Indianápolis, IN). Todas las reacciones se realizaron por duplicado utilizando las siguientes condiciones de ciclo: 1 ciclo de 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. El nivel de expresión de colágeno α1 tipo-1 y MMP-1 en cada muestra se normalizó con respecto a β-actina. Iniciadores RT-PCR: colágeno α1 tipo-1 de conejo: 5'-ACAAGGGTGAGACAGGCGAAC-3' (Directo), 5'-GCCGTTGAGTCCATCTTCCC-3' (Inverso); MMP-1, 5'-TCTGGCCACATCTGCCATGG-3' (Directo), 5'-AGGGAAGCCAAAGGAGCTGTG-3' (Inverso); β-actina, 5'-AACGAGCGCTCCGTTGCC-3' (Directo), 5'-CTTCTGCATGCGGTCCCGA-3' (Inverso).

## EJEMPLOS

15 **Ejemplo 1 - La expresión de la indolamina 2,3-dióxigenasa (IDO) regula positivamente la expresión de MMP-1 en fibroblastos dérmicos humanos.**

20 [0056] Para evaluar el efecto de IDO en la expresión de MMP-1, se utilizó un vector adenoviral recombinante de IDO humana para la transducción génica en fibroblastos dérmicos humanos mediante un procedimiento previamente descrito (Li *et al.*, 2004). La eficacia de la transfección se evaluó detectando la expresión de la proteína IDO y su actividad mediante el análisis de transferencia de Western y la medición de la quinurenina en los medios condicionados, respectivamente. Como se muestra en el panel izquierdo de la **Figura 1A**, la proteína IDO se expresaba en los fibroblastos transducidos por el adenovirus IDO, pero era indetectable en los fibroblastos de control y en los transducidos por el adenovirus mock. El nivel de quinurenina, un índice de la actividad de la IDO, fue significativamente superior en los fibroblastos transducidos por el adenovirus IDO ( $14,3 \pm 0,46$  µg/ml, n=3) en comparación con los de los controles no transducidos o transducidos de forma simulada (**Figura 1A**, panel derecho).

25 [0057] La expresión de MMP-1 en fibroblastos de control, transducción simulada y expresión de IDO se examinó mediante análisis de transferencia de Western. Como se muestra en la **Figura 1B**, se produjo un aumento de más de nueve veces en la expresión de MMP-1 en los fibroblastos que expresaban IDO ( $12,56 \pm 2,37$ , n=3) en comparación con los fibroblastos transducidos por imitación ( $1,37 \pm 0,59$ , n=3) y los fibroblastos de control no tratados ( $1 \pm 0$ , n=3). Este hallazgo sugiere que la regulación positiva de la expresión de MMP-1 en los fibroblastos que expresan IDO no se debe a la infección por adenovirus, ya que los fibroblastos transducidos en simulacro no mostraron diferencias significativas en la expresión de MMP-1 con respecto a los fibroblastos no tratados.

30 35 [0058] La IDO es una enzima intracelular que convierte el triptófano en quinurenina. Por lo tanto, debe aclararse si el efecto de la estimulación de MMP-1 en fibroblastos que expresan IDO se debe a la propia proteína IDO o a metabolitos de triptófano. Para ello, se recogieron los medios condicionados de los fibroblastos que expresaban IDO y de los controles después de 48 horas. A continuación, se utilizó una combinación de 90% de medios acondicionados recogidos y 10% de medios frescos para tratar los fibroblastos dérmicos. Las células se cosecharon 48 horas después del tratamiento. Como 40 se muestra en la **Figura 1C**, se observó un aumento significativo de la expresión de MMP-1 en las células tratadas con medio condicionado de fibroblastos transducidos por IDO ( $2,06 \pm 0,62$ , n=3) en comparación con las de fibroblastos transducidos por mock ( $1,16 \pm 0,31$ , n=3) o fibroblastos de control no tratados ( $1 \pm 0$ , n=3). Este resultado sugiere que un factor o factores en los medios condicionados de fibroblastos infectados por adenovirus IDO, en lugar de la proteína IDO intracelular, son responsables de un mayor nivel de expresión de MMP-1 en los fibroblastos.

45 **Ejemplo 2 - La quinurenina, pero no la depleción de triptófano, induce la expresión de MMP-1 en fibroblastos dérmicos humanos**

50 [0059] La IDO es una enzima que convierte el triptófano en quinurenina. Examinar qué factor (ya sea la depleción de triptófano o el aumento de quinurenina) es responsable de la regulación positiva por IDO de la expresión de MMP-1. Para examinar qué factor es responsable de la regulación positiva de la expresión de MMP-1 por IDO, se cultivaron fibroblastos en medios de cultivo pobres en triptófano o en medios normales con diversas concentraciones de quinurenina. A continuación, se evaluó la expresión de MMP-1 en las células mediante transferencia de Western. Como se muestra en la **Figura 2C**, no hubo diferencias significativas en la expresión de MMP-1 entre los fibroblastos cultivados en presencia de 25 µg/ml de triptófano o en los medios de cultivo sin triptófano. Sin embargo, la expresión de MMP-1 aumentó significativamente en respuesta a diferentes dosis (25-150 µg/ml) de quinurenina (**Figura 2A** y **Figura 2B**). Estos hallazgos sugieren que la presencia de quinurenina, pero no la depleción de triptófano, contribuye a la regulación positiva de MMP-1 en las células que expresan IDO. Además, descubrimos que tan sólo 12,5 µg/ml de quinurenina podían estimular la expresión de MMP-1 en fibroblastos dérmicos (datos no mostrados). Esta concentración de quinurenina es similar a la detectada en los medios condicionados de fibroblastos que expresan IDO (**Figura 1A**, panel derecho). Así pues, la estimulación de la MMP-1 en los fibroblastos es claramente específica de la quinurenina, ya que la adición de diversas concentraciones de triptófano con una estructura similar no consiguió aumentar la expresión de la MMP-1 en los fibroblastos dérmicos (**Figura 2D**).

**Ejemplo 3 - Efectos de la quinurenina sobre la expresión de MMP-2 y -3 en fibroblastos dérmicos**

[0060] Para investigar si la quinurenina también afecta a la expresión de otras MMP, tratamos fibroblastos dérmicos con quinurenina a concentraciones similares a las utilizadas en la **Figura 2**. Se utilizó transferencia de Western para detectar la expresión de MMP-2 y -3 utilizando células no tratadas como controles. Como se muestra en la **Figura 3A**, no hubo diferencias significativas en la expresión de MMP-2 entre los fibroblastos tratados con quinurenina y los no tratados. Sin embargo, en condiciones similares, el tratamiento con quinurenina aumentó significativamente la expresión de MMP-3 en los fibroblastos dérmicos de forma dependiente de la dosis (**Figura 3B/3C**). Además, para comprobar si el aumento de los niveles de MMP en los fibroblastos tratados con quinurenina iba seguido de un aumento de la actividad de las MMP, se recogieron medios condicionados de fibroblastos en presencia o ausencia de 50 µg/ml de quinurenina 48 horas después del tratamiento. La actividad de MMP en los medios acondicionados se detectó mediante un kit de ensayo genérico de MMP SensoLyte 520™ utilizando un péptido de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) 5-FAM/QXL™520 como sustrato de MMP. Como se muestra en la **Figura 4**, la actividad media de las MMP en los medios condicionados de los fibroblastos tratados con quinurenina fue significativamente mayor que en los medios de control. Esto indica que el aumento de MMPS en los fibroblastos tratados con quinurenina tiene actividad enzimática.

**Ejemplo 4 - Las células mesenquimales y epiteliales responden de forma diferente al tratamiento con quinurenina**

[0061] Para determinar qué tipos de células son sensibles a la expresión de MMP-1 inducida por quinurenina, se utilizaron tanto células mesenquimales (como una línea celular de fibroblastos de pulmón inmovilizados IMR-90 y sinoviocitos similares a fibroblastos) como células epiteliales (como la línea celular de carcinoma epitelial de pulmón A549, queratinocitos dérmicos primarios, la línea celular de queratinocitos inmovilizados humanos HACAT y la línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello UMSSC). Al igual que en el caso de los fibroblastos dérmicos, la expresión de MMP-1 en sinoviocitos e IMR-90 se vio regulada positivamente por los tratamientos con quinurenina en concentraciones de 12,5 µg/ml a 150 µg/ml, como se muestra en la **Figura 5**. Sin embargo, la expresión de MMP-1 en todas las células epiteliales analizadas, incluidos los queratinocitos dérmicos, HACAT, A549 y UMSSC, no difirió significativamente de los controles no tratados en respuesta a las distintas concentraciones de quinurenina (**Figura 6**). Estos resultados sugieren que existe una diferencia entre las células mesenquimales y epiteliales en respuesta a la expresión de MMP-1 estimulada por la quinurenina.

**Ejemplo 5 - Identificación de las moléculas señal fosforiladas mediante matriz de fosfo-quinasas en células tratadas con quinurenina**

[0062] Para determinar el posible mecanismo de la expresión de MMP-1 regulada positivamente por la quinurenina en fibroblastos dérmicos, analizamos la activación de múltiples serina, treonina o tirosina quinasas, utilizando una matriz de fosforo-quinasas. Esta matriz ofrece la posibilidad de detectar simultáneamente el estado de activación de 46 proteínas cinasas diferentes y sus factores de transcripción descendentes. Como se muestra en la **Figura 7**, tras 1 hora de tratamiento en fibroblastos dérmicos con quinurenina, se activó la quinasa regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2).

[0063] Para confirmar estos resultados de la matriz fosfo-quinasa, se trataron fibroblastos dérmicos con 100 µg/ml de quinurenina a diferentes tiempos. A continuación, se utilizó un análisis de inmunotransferencia, con un anticuerpo diferente de los colocados en la matriz, para detectar la fosforilación de ERK1/2 y su molécula ascendente proteína activada por mitógenos/quinasa regulada por señal extracelular (MEK). Como se muestra en la **Figura 8**, ERK1/2 se fosforiló en las células tratadas con quinurenina. El resultado se confirmó además mediante la detección de la fosforilación de MEK, la molécula de señal ascendente de ERK1/2, en células tratadas con quinurenina (**Figura 8**). Tanto ERK1/2 como MEK mostraron patrones similares de activación, con un pico a las 8 horas tras los tratamientos con quinurenina (**Figura 8**).

**Ejemplo 6 - La adición de inhibidores de la fosforilación MEK-ERK1/2 anula los efectos de la expresión de MMP-1 estimulada por la quinurenina en fibroblastos dérmicos.**

[0064] En otra serie de experimentos, probamos si la activación de la vía MEK-ERK1/2 MAPK por la quinurenina está asociada con la expresión de MMP-1 estimulante de la quinurenina en fibroblastos dérmicos. Para ello, examinamos los efectos de los inhibidores de la fosforilación de MEK o ERK1/2 sobre la expresión de MMP-1 estimulante de la quinurenina. Como se muestra en la **Figura 9A**, la adición de PD98059, un inhibidor específico de la activación de ERK1/2, impidió eficazmente el efecto estimulador de la quinurenina sobre la expresión de MMP-1, de forma dependiente de la dosis. Del mismo modo, el tratamiento de las células con 10 µM y 30 µM de U0126, un inhibidor específico de la activación de MEK, también redujo significativamente la regulación positiva de la expresión de MMP-1 por la quinurenina (**Figura 9B**). Estos resultados demuestran que la activación de la vía de señalización MEK-ERK1/2 contribuye a la regulación positiva de la expresión de MMP-1 inducida por la quinurenina en fibroblastos dérmicos.

**Ejemplo 7 - Efectos de la quinurenina sobre la expresión de colágeno en fibroblastos dérmicos y la proliferación de fibroblastos**

[0065] Antes de estudiar su papel antifibrótico *in vivo*, se probó el efecto de la quinurenina sobre la expresión del colágeno y la proliferación celular. Como se muestra en la **Figura 10** (arriba), la adición de quinurenina 25-150 µg/ml disminuye notablemente la expresión de procolágeno de tipo 1. Sin embargo, no tuvo ningún efecto significativo sobre la proliferación de fibroblastos, ni siquiera cuando las células se cultivaron a concentraciones de hasta 150 µg/ml de quinurenina (**Figura 11**). Asimismo, las pruebas realizadas con los análogos/metabolitos de la quinurenina, el ácido quinurético y el ácido

xanturénico, demuestran que estos compuestos también son eficaces para inhibir la expresión del procolágeno de tipo 1 (**Figura 10** (abajo)).

**Ejemplo 8 - La aplicación tópica de quinurenina en heridas de oreja de conejo reduce la cicatrización**

[0066] Dado que el tratamiento de fibroblastos dérmicos con quinurenina mostró un aumento en la expresión de MMP-1 y -3, así como una disminución en la expresión de procolágeno tipo-1, estábamos interesados en saber si la quinurenina puede ser utilizada como un agente antifibrótico para el tratamiento o prevención de cicatrices hipertróficas. Para ello, como se ha descrito anteriormente (Rahmani-Neishaboor *et al.*, 2010; Kloeters *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2008), se utilizó un modelo de cicatriz hipertrófica de oreja de conejo. Las heridas se trataron diariamente con 0,1 ml de gel de carboximetilcelulosa (CMC) que contenía 50 µg de quinurenina durante tres semanas a partir del octavo día tras la herida. La dosis de 50 mg de quinurenina por herida se ajustó a la utilizada en un sistema *in vitro* con un resultado óptimo. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el cierre de las heridas tratadas con quinurenina en comparación con los controles no tratados o tratados con gel CMC (datos no mostrados). Sin embargo, como se muestra en la **Figura 12A**, se observó una cicatrización significativamente menor en las heridas tratadas con quinurenina que en las heridas no tratadas o en las heridas de control sólo con vehículo después de tres semanas. El índice medio de elevación de la cicatriz (SEI) se redujo significativamente en el grupo tratado con quinurenina ( $1,172 \pm 0,156$ , n=8) en comparación con el grupo de control con sólo vehículo ( $1,978 \pm 0,442$ , n=4,  $p<0,01$ ) y el grupo no tratado ( $2,098 \pm 0,324$ , n=4,  $p<0,001$ ) (**Figura 12B**). La tinción con tricrómico de Massons para el colágeno reveló una reducción significativa del contenido de colágeno en las heridas tratadas con quinurenina, en comparación con las heridas que no recibieron tratamiento o que sólo recibieron gel (**Figura 12C**). En consonancia con este hallazgo, el contenido de hidroxiprolina (utilizado como índice del contenido de colágeno tisular) fue significativamente inferior en las heridas tratadas con quinurenina en comparación con las heridas que no recibieron tratamiento o que sólo recibieron gel (**Figura 12D**).

[0067] Por último, demostramos que la aplicación tópica de quinurenina en un modelo fibrótico de oreja de conejo disminuía la expresión de colágeno  $\alpha 1$  tipo-1 y aumentaba la expresión de MMP-1, en comparación con los de las heridas que no recibieron ningún tratamiento o sólo gel (**Figura 13**). Estos resultados apoyan aún más la suposición de que la quinurenina podría utilizarse potencialmente como factor antifibrótico para el tratamiento de cicatrices hipertróficas e incluso queloides, como las que se observan con frecuencia en pacientes con quemaduras o incisiones quirúrgicas.

**Ejemplo 9 - Efecto de las isoformas de quinurenina sobre la expresión de MMP-1 en fibroblastos dérmicos humanos**

[0068] Se probaron diferentes isoformas de quinurenina para determinar su capacidad de afectar la expresión de MMP-1. Las isoformas analizadas fueron la DL-quinurenina (DL-Kyn) o la D-quinurenina (D-Kyn) y la L-quinurenina (L-Kyn). El resultado mostró que todas las isoformas aumentan la expresión de MMP-1 en los fibroblastos dérmicos, sin embargo, la L-quinurenina parece tener más actividad en comparación con las otras dos isoformas - véase la **Figura 14**.

**Ejemplo 10 - Efectos de diferentes isoformas/análogos de quinurenina sobre la expresión de colágeno en fibroblastos dérmicos humanos**

[0069] Los fibroblastos dérmicos se trataron con FS-1 (DL-quinurenina) o D-quinurenina o L-quinurenina o FS-2 (ácido quinurético) como se muestra en la **Figura 15**. La expresión de colágeno  $\alpha 1$ , tipo-1, se detectó mediante PCR en tiempo real. Los resultados indican que estas isoformas/análogos tienen una eficacia similar en la reducción de la expresión de colágeno.

**Ejemplo 11 - La quinurenina y sus metabolitos regulan a la baja la expresión de fibronectina en fibroblastos cultivados**

[0070] Los fibroblastos dérmicos se trataron con diversas concentraciones de DL-quinurenina (FS1), L-quinurenina, D-quinurenina o ácido quinurético (FS2) como se muestra en la **Figura 16**. La expresión de fibronectina se detectó mediante PCR en tiempo real. Los resultados demuestran que la quinurenina, la DL-quinurenina y la L-quinurenina son capaces de regular a la baja la expresión de fibronectina, lo que indica que los metabolitos de la quinurenina también pueden ser adecuados para la prevención o el tratamiento de trastornos fibroproliferativos.

**Ejemplo 12 - La quinurenina y sus metabolitos/análogos tienen efectos significativos sobre los esplenocitos**

[0071] Los hallazgos en la **Figura 17** mostraron que, hubo una reducción de casi 5 veces en la proliferación de esplenocitos inducida por conA después del tratamiento con 100 y 150 µg/ml de D-quinurenina, L-quinurenina o DL-quinurenina después de 96 horas ( $P<0,05$ ), aunque la proliferación de esplenocitos se redujo significativamente alrededor de 2 veces por D-quinurenina, L-quinurenina y DL-quinurenina a 100 y 150 µg/ml después de 48 horas. El FS2 tiene menos efecto sobre la proliferación que otros metabolitos. Los resultados de la **Figura 18** mostraron que el FS1 tiene un efecto inmunosupresor sobre la producción de algunas citocinas y quimiocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-2, CXCL9 y CXCL10. Además, puede disminuir significativamente la producción de IL-17, que se cree que desempeña un papel importante en la inflamación.

**Ejemplo 13 - Efecto duradero del ácido quinurético y la quinurenina sobre la expresión de MMP1 en fibroblastos**

**[0072]** Para determinar el efecto duradero del ácido quinurético (KynA) y la quinurenina (Kyn) sobre la expresión de MMP1 en fibroblastos, se trataron las células con 100 µg/ml del fármaco. Tras 48 horas de tratamiento, el medio se cambió por medio fresco y las células se cosecharon a las 0, 12, 24 o 48 horas tras la retirada del tratamiento. Se produjo un marcado aumento de la expresión de MMP1 en los fibroblastos en respuesta al tratamiento con KynA o Kyn a las 48 horas del tratamiento. Tras la eliminación de Kyn y KynA, la expresión de MMP1 siguió siendo significativamente superior a la de las células no tratadas durante otras 24 horas (**Figura 19A**). Curiosamente, mientras que la expresión de la proteína MMP1 se redujo gradualmente a niveles normales en las 48 horas siguientes a la eliminación de Kyn, la expresión de MMP1 en respuesta a KynA siguió siendo superior a la de los controles (**Figura 19A**). La **Figura 19B** representa el análisis cuantitativo de los datos de la **Figura 19A** (\* Valor P<0,05, \*\* Valor P<0,01, n=4). De estos resultados se desprende que KynA tiene un efecto más duradero sobre la expresión de MMP-1 en relación con Kyn en los fibroblastos tratados.

**[0073]** Aunque en el presente documento se describen varias realizaciones, pueden hacerse muchas adaptaciones y modificaciones dentro del alcance de la invención de acuerdo con el conocimiento general común de los expertos en este arte. Dichas modificaciones incluyen la sustitución de equivalentes conocidos por cualquier aspecto de la invención con el fin de lograr el mismo resultado de manera sustancialmente idéntica. **[0029]** Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. La palabra "que comprende" se utiliza aquí como un término abierto, sustancialmente equivalente a la frase "incluyendo, pero sin limitarse a", y la palabra "comprende" tiene un significado correspondiente. Tal como se utilizan aquí, las formas singulares "un/una", y "el/la" incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una cosa" incluye más de una cosa. La cita de referencias en el presente documento no significa que dichas referencias sean anteriores a una realización de la presente invención. La invención incluye todas las realizaciones y variaciones sustancialmente como se ha descrito anteriormente y con referencia a los ejemplos y dibujos.

**REFERENCIAS:****[0074]**

30 Gawronska-Kozak B, et al. Wound Repair Regeneration (2006) Scarless skin repair in immunodeficient mice 14:265-276.

Ghahary A, Tredget EE, Chang LJ, et al. (1998) Genetically modified dermal keratinocytes express high levels of transforming growth factor- $\beta$ 1. J Invest Dermatol 110:800-805.

35 Kahari, V. M. and U. Saarialho-Kere (1997). "Matrix metalloproteinases in skin." Exp Dermatol 6(5): 199-213.

Kloeters O, Tandara A, Mustoe T (2007) Hypertrophic scar model in the rabbit ear: a reproducible model for studying scar tissue behavior with new observation on silicone gel sheeting for scar reduction. Wound Repair Regen 15:S40-S45.

Li Y, Tredget EE, Ghaffari A, et al. (2006) Local expression of.

Li Y, Tredget EE, Kilani RT, et al. (2004) Expression of.

40 Rahmani-Neishaboor E, Yau FM, Jalili R, et al. (2010) Improvement of hypertrophic scarring by using topical anti-fibrogenic/anti-inflammatory factors in a rabbit ear model. Wound Repair Regen 18:401-408.

Salo, T., J. G. Lyons, et al. (1991). "Transforming growth factor-.

Saus, J., S. Quinones, et al. (1988). "The complete primary structure of human matrix metalloproteinase-3. Identity with stromelysin." J Biol Chem 263(14): 6742-5.

45 Scott, P. G., A. Ghahary, et al. (1994). In: Advances in Structural Biology 3: 157-201.

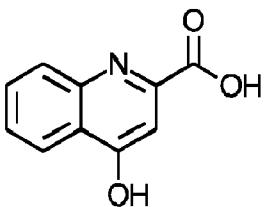
Tokikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, et al. (1988) Mecanismo de acción del interferón- $\gamma$ : caracterización de.

Xie JL, Bian HN, Qi SH, et al. (2008) Basic fibroblast growth factor (bFGF) alleviates the scar of the rabbit ear model in wound healing. Wound Repair Regen 16:576-581.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura del ácido cinurénico

5

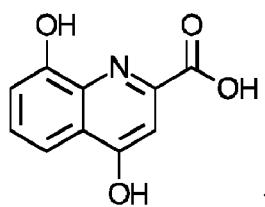


10

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la enfermedad fibrótica, en la que la enfermedad fibrótica se selecciona de una o más de las siguientes: queloide; cicatrización hipertrófica; fibrosis pulmonar; fibrosis renal; cirrosis hepática; fibrosis endomiocárdica; fibrosis mediastínica; mielofibrosis; fibrosis retroperitoneal; fibrosis masiva progresiva; fibrosis sistémica nefrogénica; infarto de miocardio antiguo; esclerodermia; esclerosis sistémica; y fibromas uterinos.

20 2. Un compuesto que tiene la estructura del ácido xanturénico

25

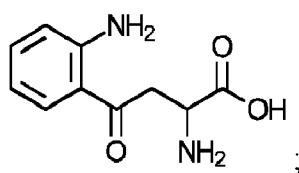


30

35 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la enfermedad fibrótica, en la que la enfermedad fibrótica se selecciona de una o más de las siguientes: queloide; cicatrización hipertrófica; fibrosis pulmonar; fibrosis renal; cirrosis hepática; fibrosis endomiocárdica; fibrosis mediastínica; mielofibrosis; fibrosis retroperitoneal; fibrosis masiva progresiva; fibrosis sistémica nefrogénica; infarto de miocardio antiguo; esclerodermia; esclerosis sistémica; y fibromas uterinos.

3. Un compuesto que tiene la estructura de la quinurenina

40



45

50 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la enfermedad fibrótica, en la que la enfermedad fibrótica se selecciona de una o más de las siguientes: queloide; cicatrización hipertrófica; fibrosis pulmonar; fibrosis renal; cirrosis hepática; fibrosis endomiocárdica; fibrosis mediastínica; mielofibrosis; fibrosis retroperitoneal; fibrosis masiva progresiva; fibrosis sistémica nefrogénica; infarto de miocardio antiguo; esclerodermia; esclerosis sistémica; y fibromas uterinos.

4. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad fibrótica es la cicatrización queloide o hipertrófica.

55

5. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad fibrótica es fibrosis pulmonar.

6. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad fibrótica es cirrosis hepática.

60

7. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad fibrótica es fibrosis renal.

65

8. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad fibrótica es fibrosis endomiocárdica o esclerodermia.

9. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica, en la que la composición farmacéutica comprende un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la enfermedad fibrótica se selecciona de una o más de las siguientes: queloide; cicatrización hipertrófica; fibrosis pulmonar; fibrosis renal; cirrosis hepática; fibrosis endomiocárdica; fibrosis mediastínica; mielofibrosis; fibrosis retroperitoneal; fibrosis masiva progresiva; fibrosis sistémica nefrogénica; infarto de miocardio antiguo; esclerodermia; esclerosis sistémica; y fibromas uterinos.

5

10. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 9, en la que la enfermedad fibrótica es la cicatrización queloide o hipertrófica.

10

11. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 9, en la que la enfermedad fibrótica es fibrosis pulmonar.

15

12. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 9, en la que la enfermedad fibrótica es cirrosis hepática.

13. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 9, en la que la enfermedad fibrótica es fibrosis renal.

20

14. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 9, en la que la enfermedad fibrótica es fibrosis endomiocárdica o esclerodermia.

FIGURA 1

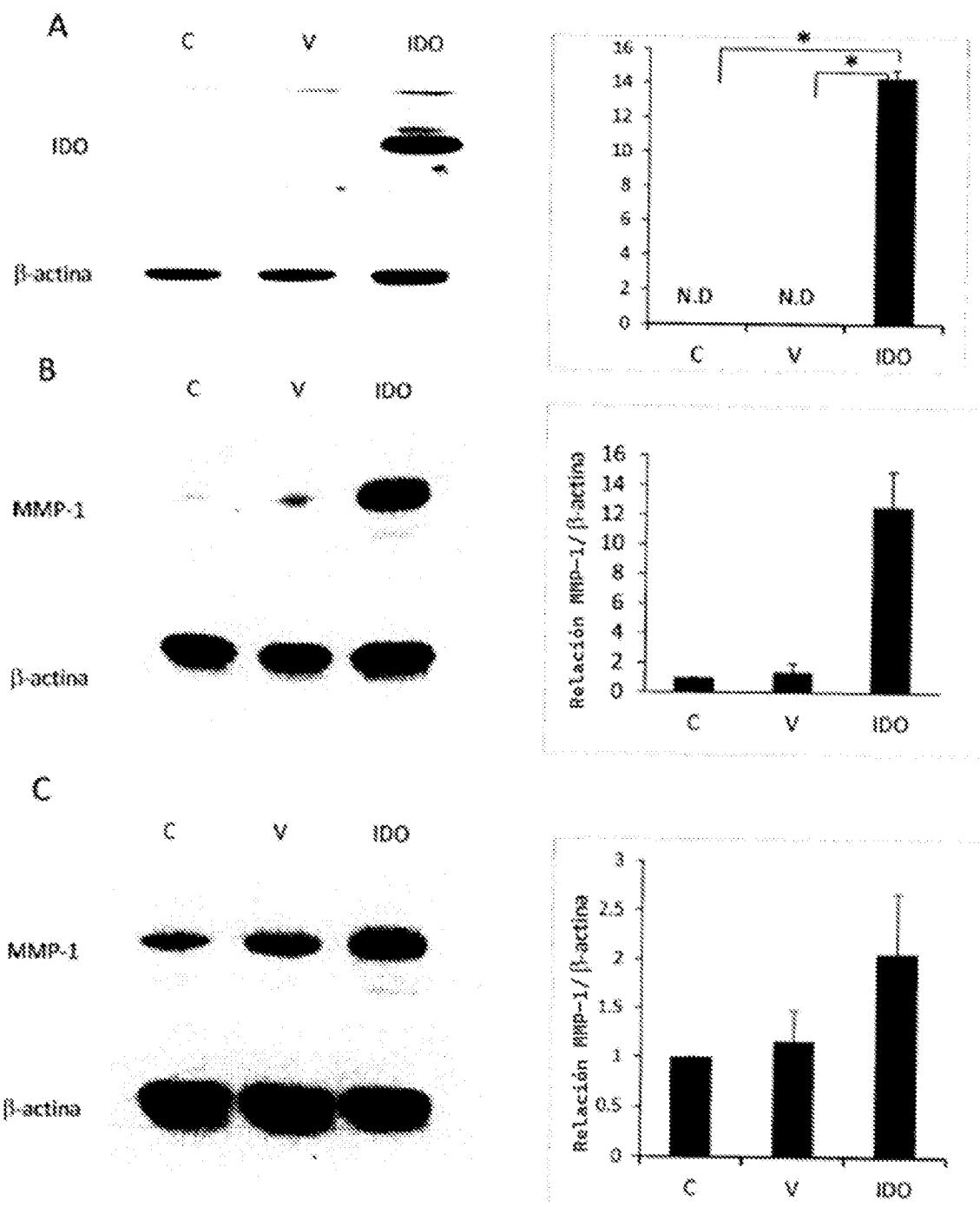


FIGURA 2

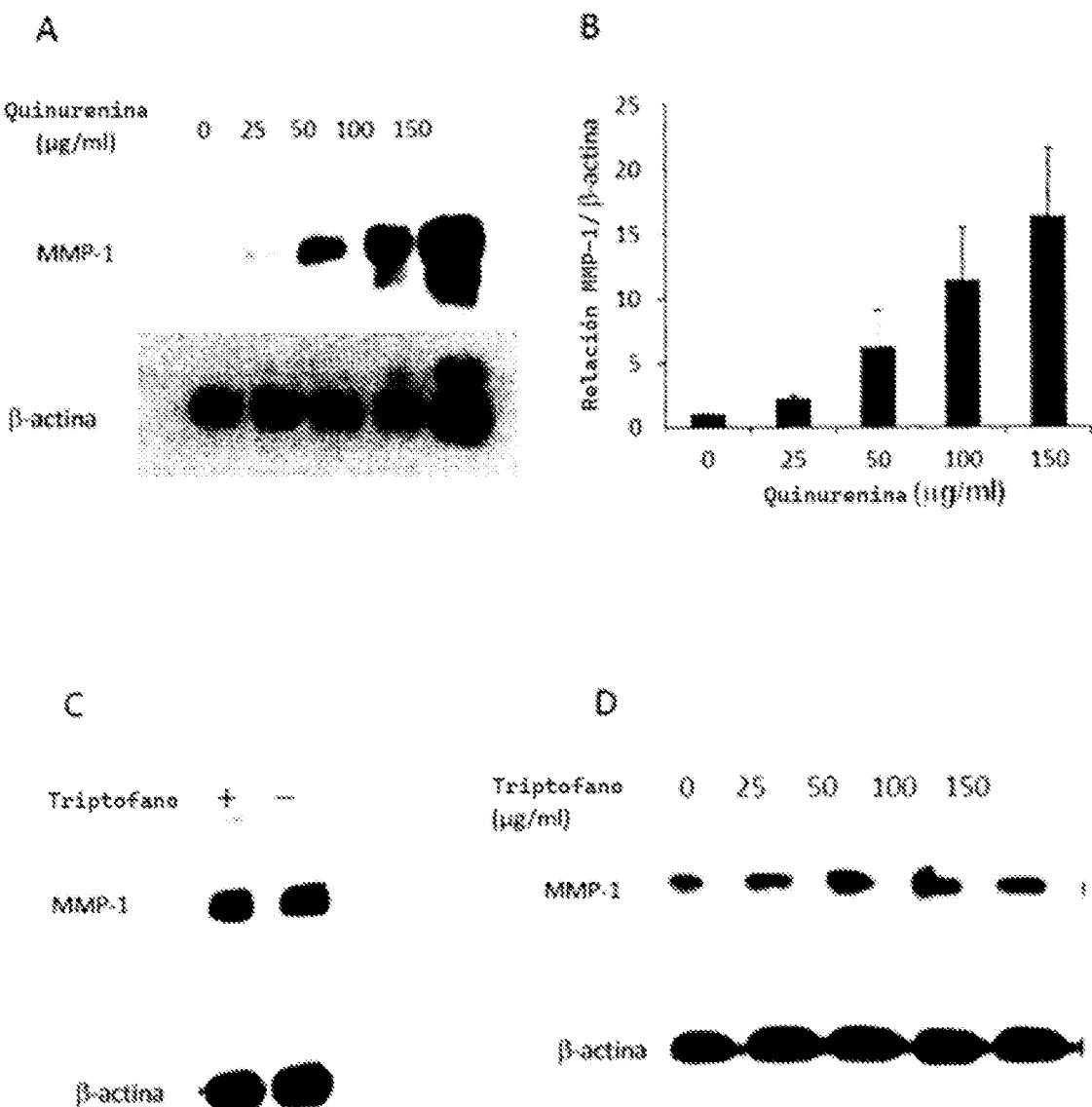
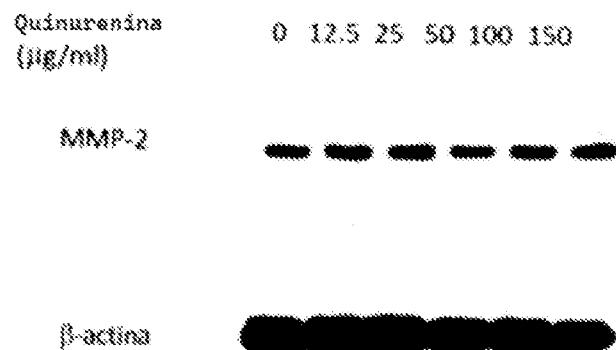
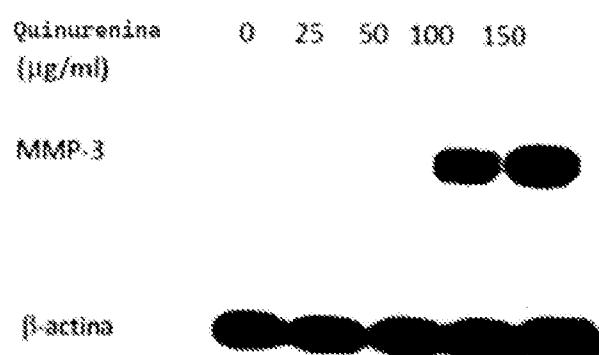


FIGURA 3

A



B



C

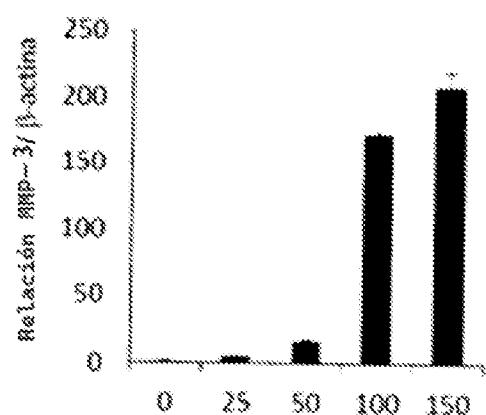


FIGURA 4

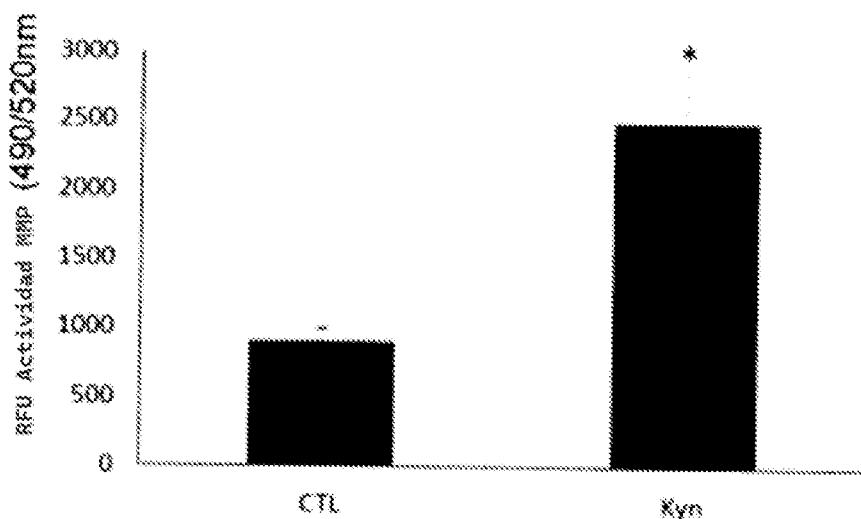
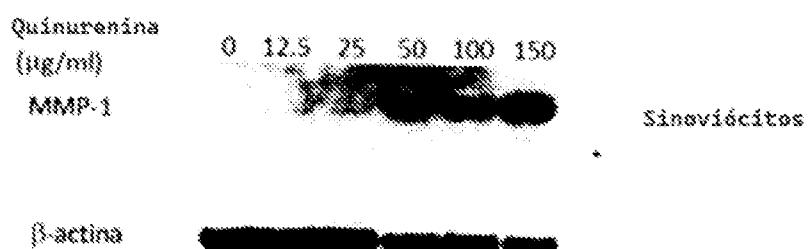


FIGURA 5

A



B

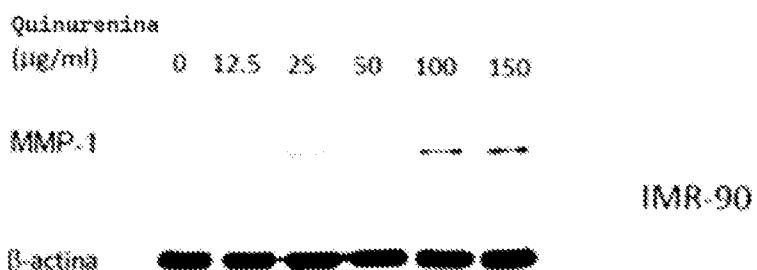


FIGURA 6

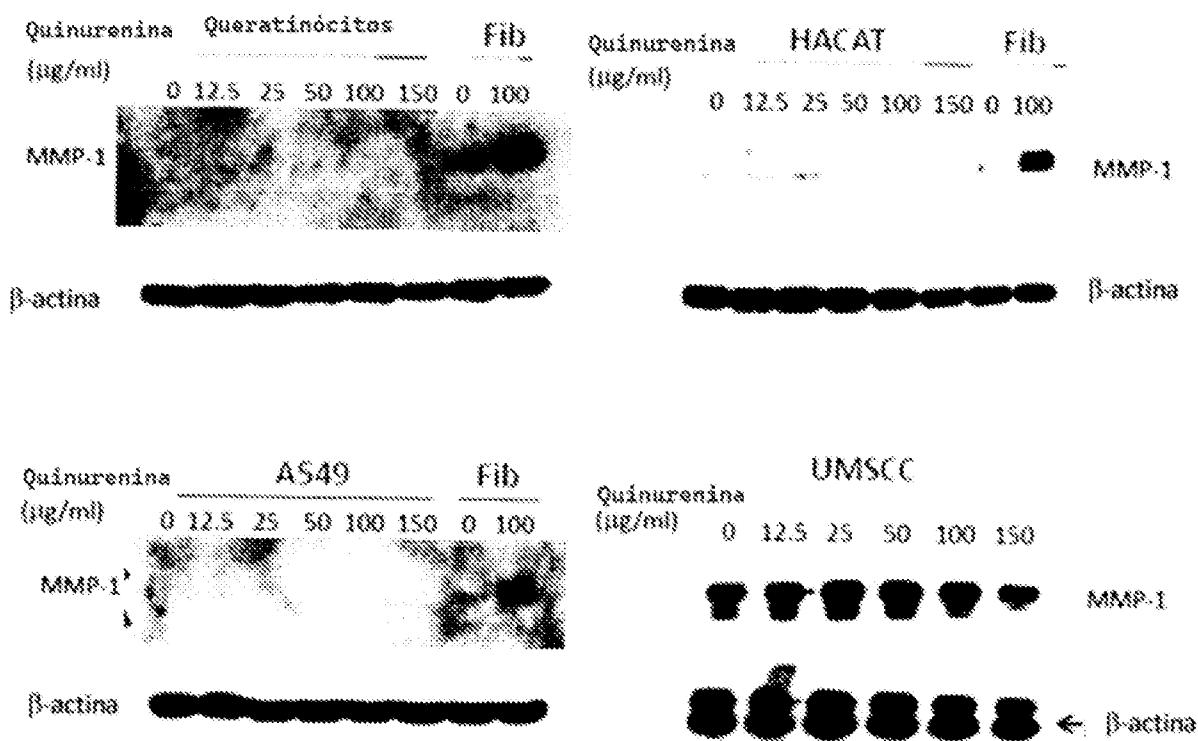


FIGURA 7

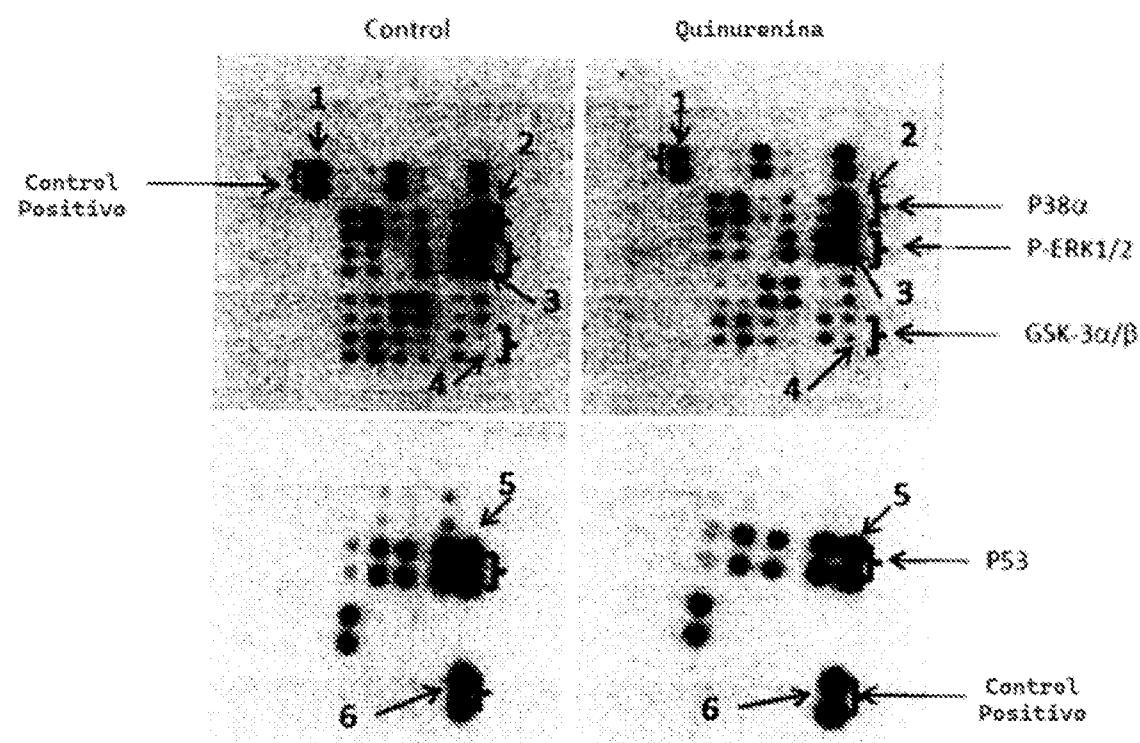


FIGURA 8

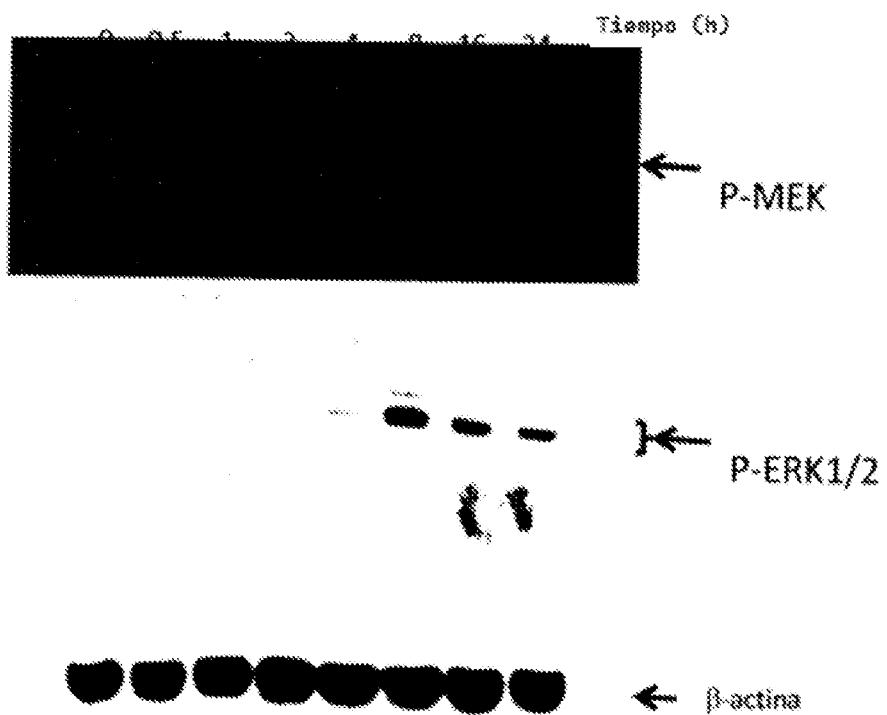
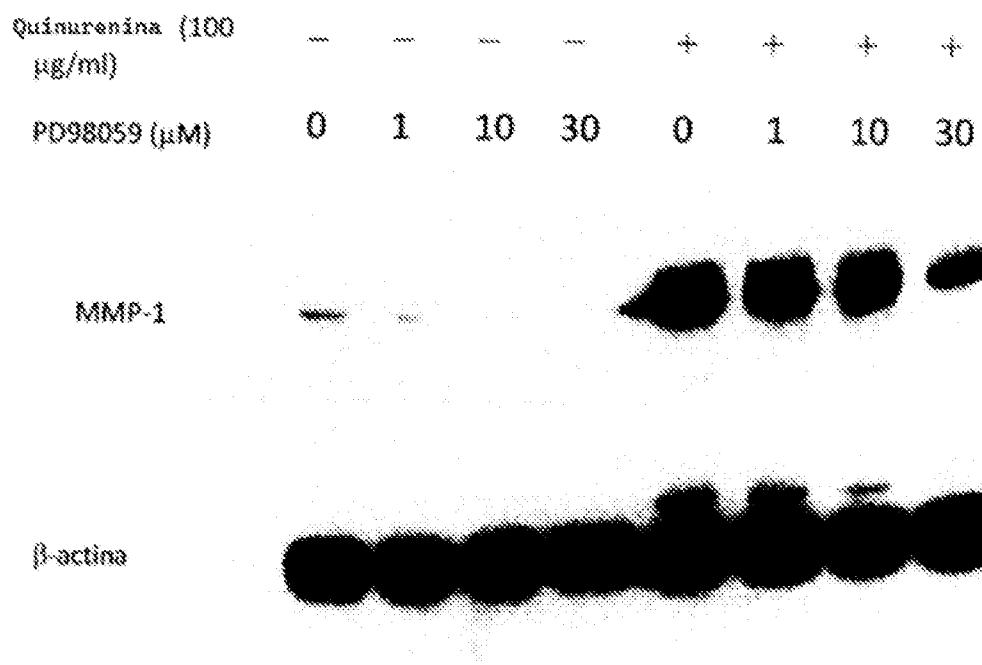


FIGURA 9

A



B

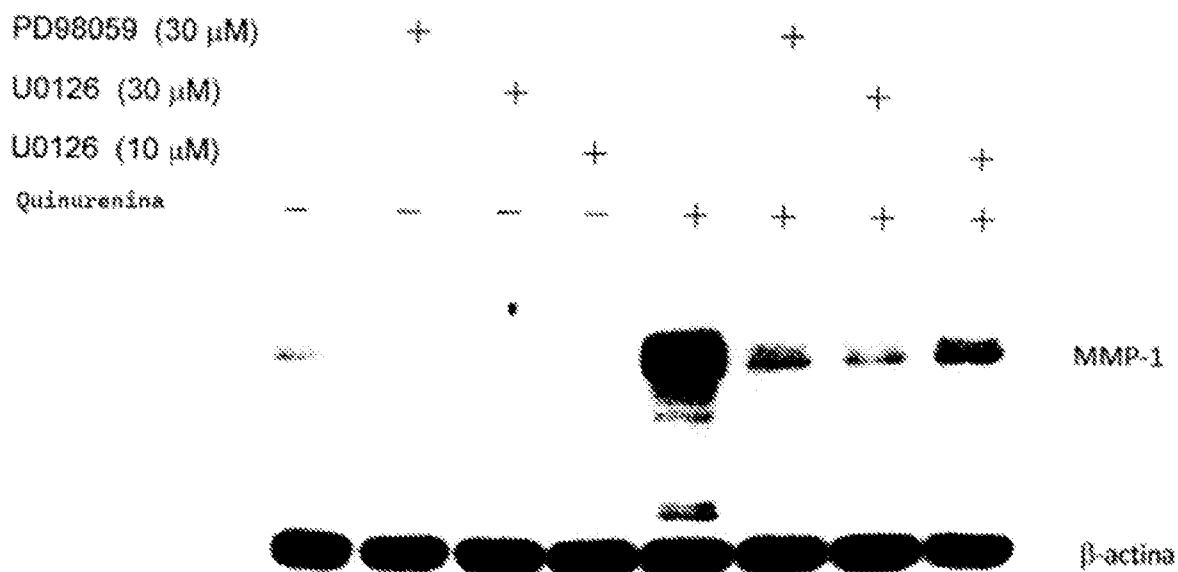


FIGURA 10

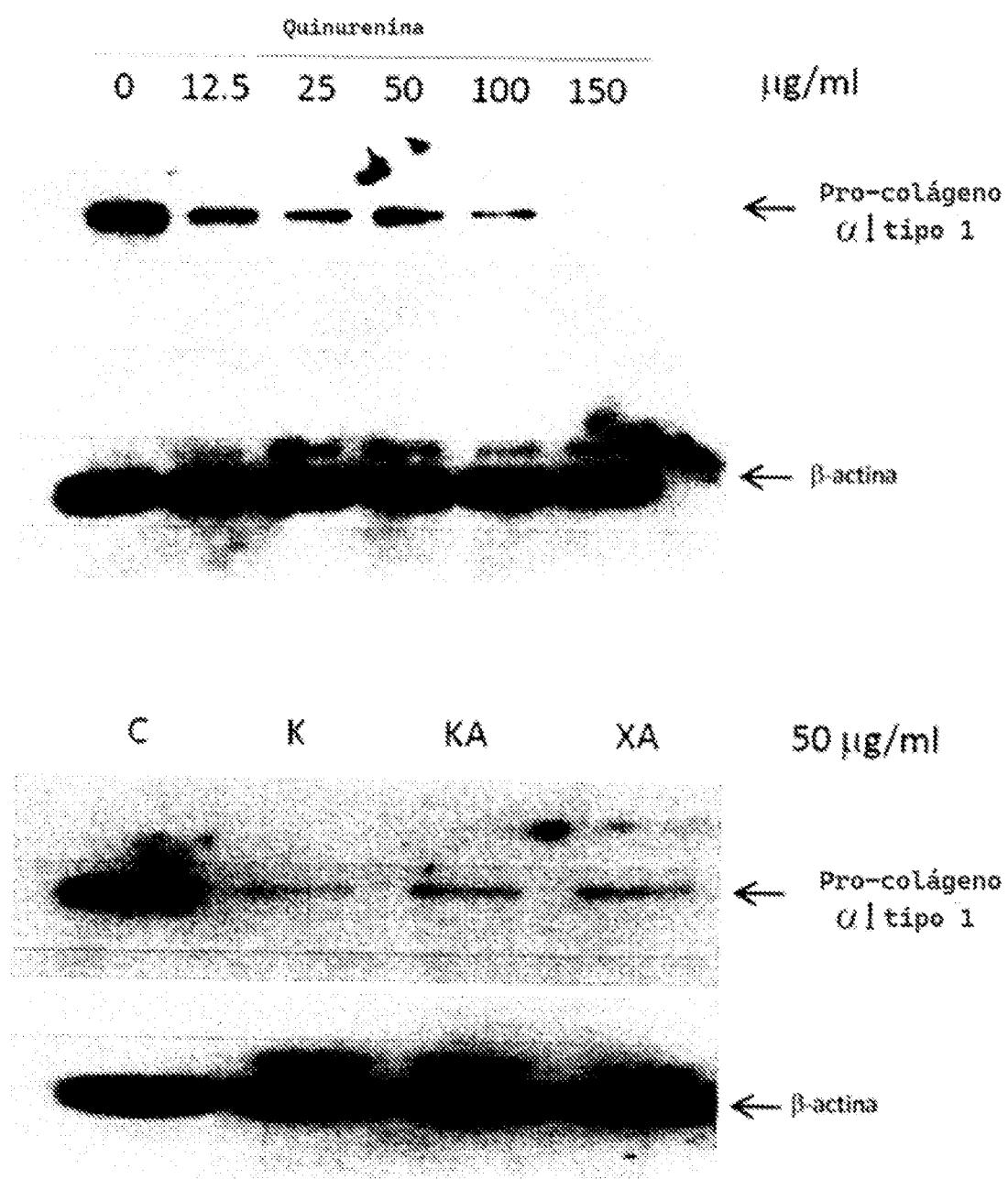


FIGURA 11

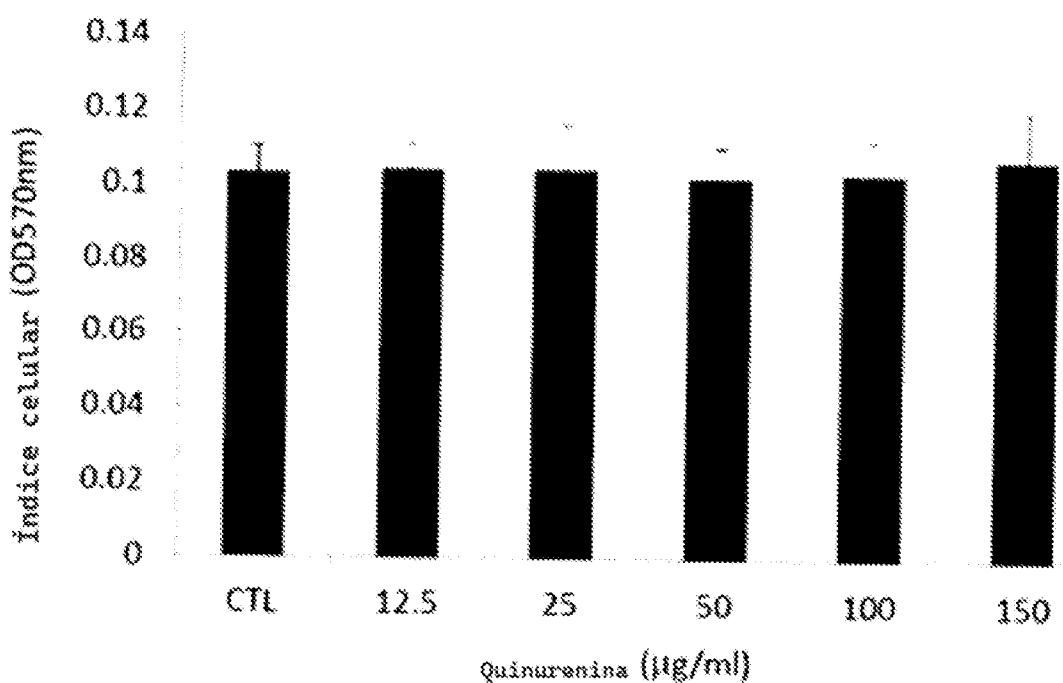


FIGURA 12

A



B

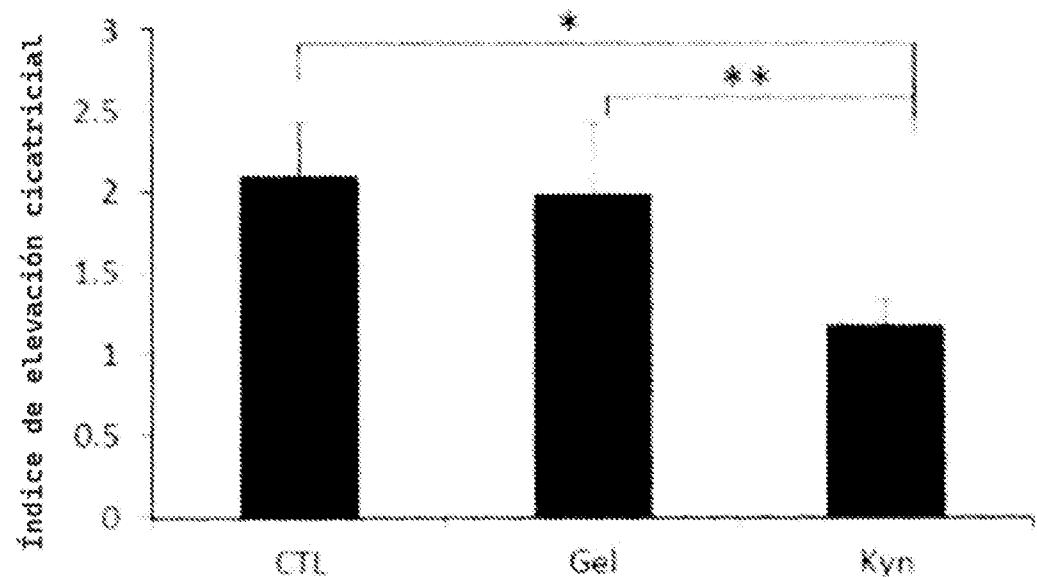
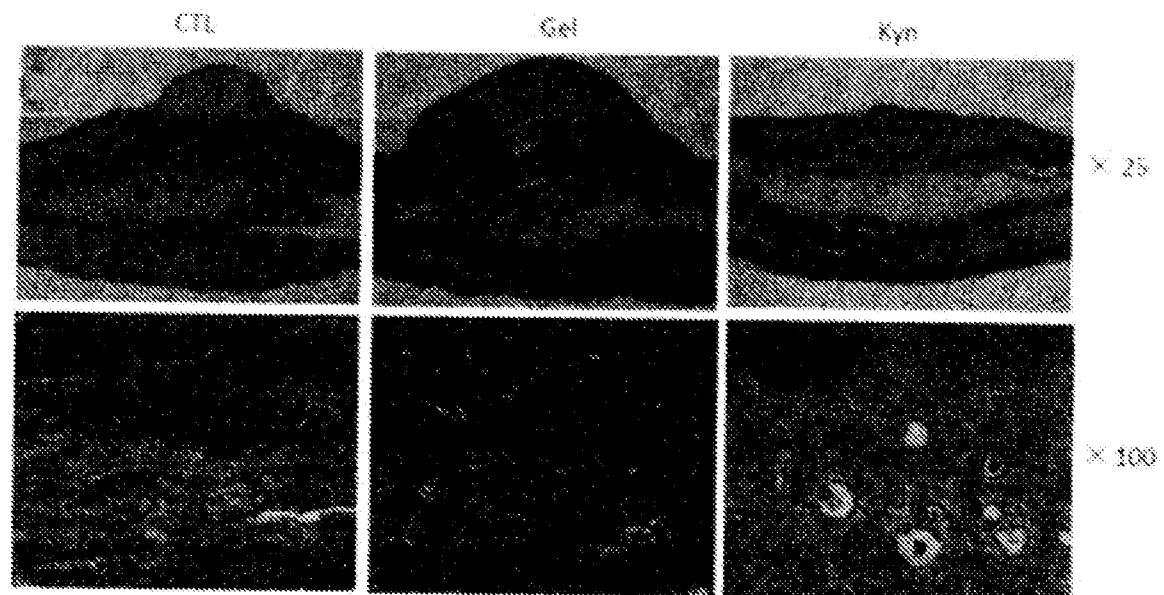


FIGURA 12 (continuación)

C



D

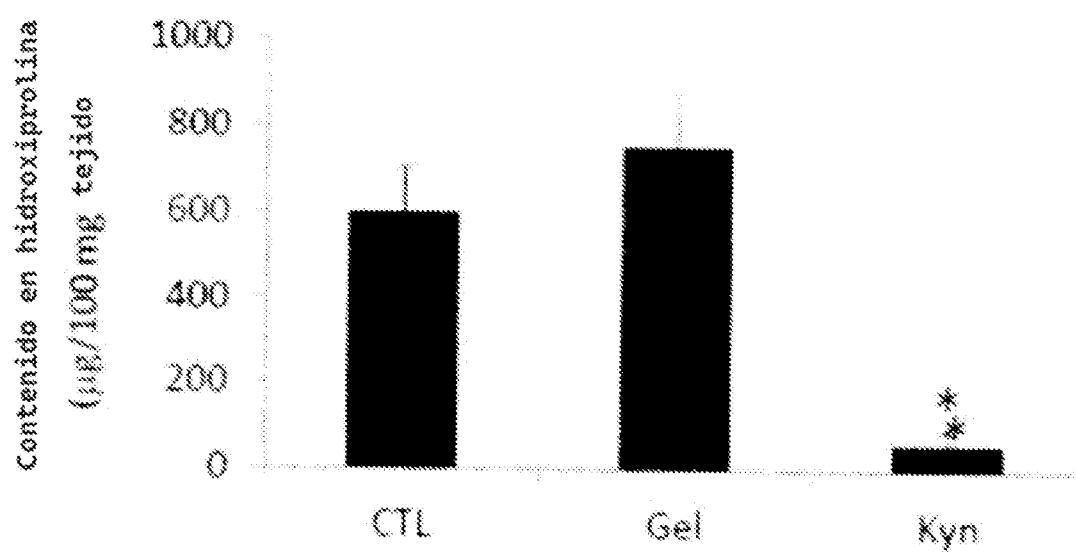


FIGURA 13

A

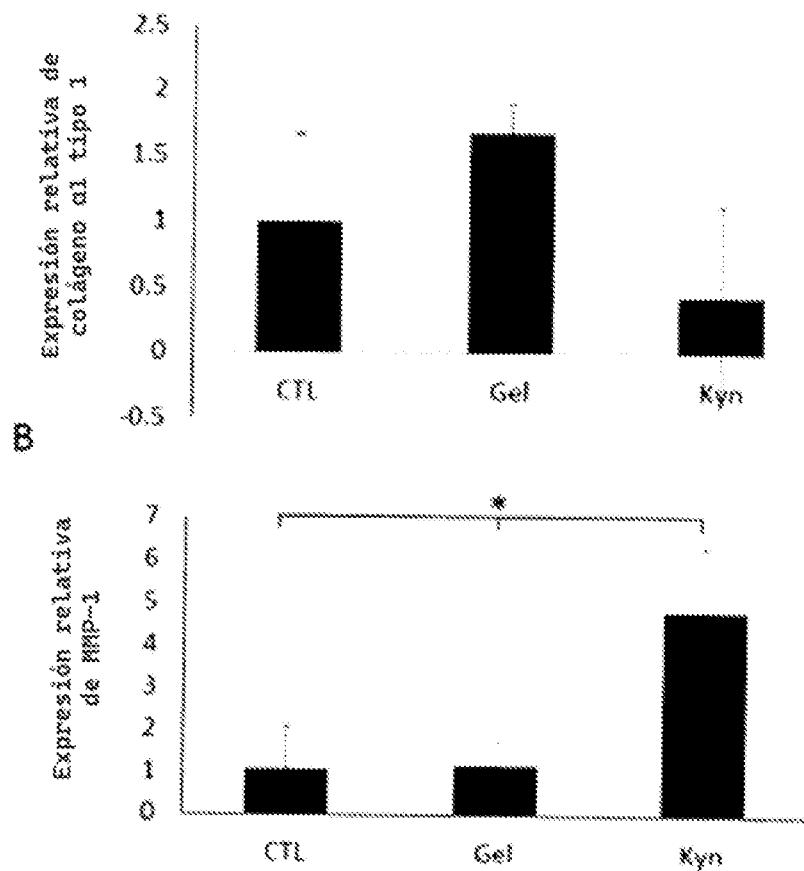


FIGURA 14

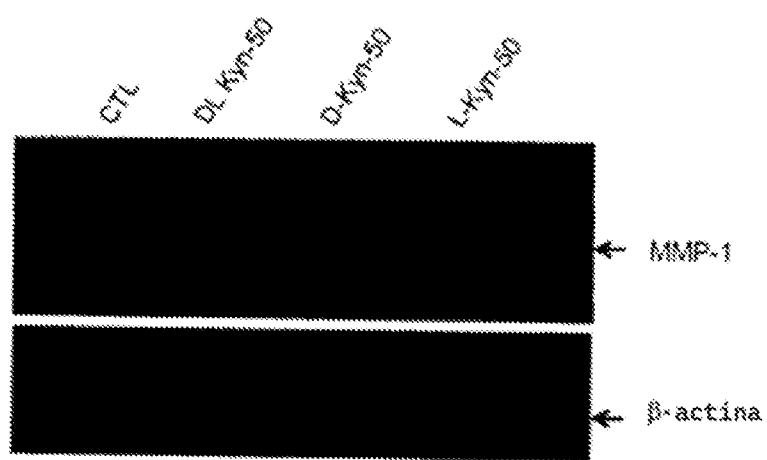


FIGURA 15

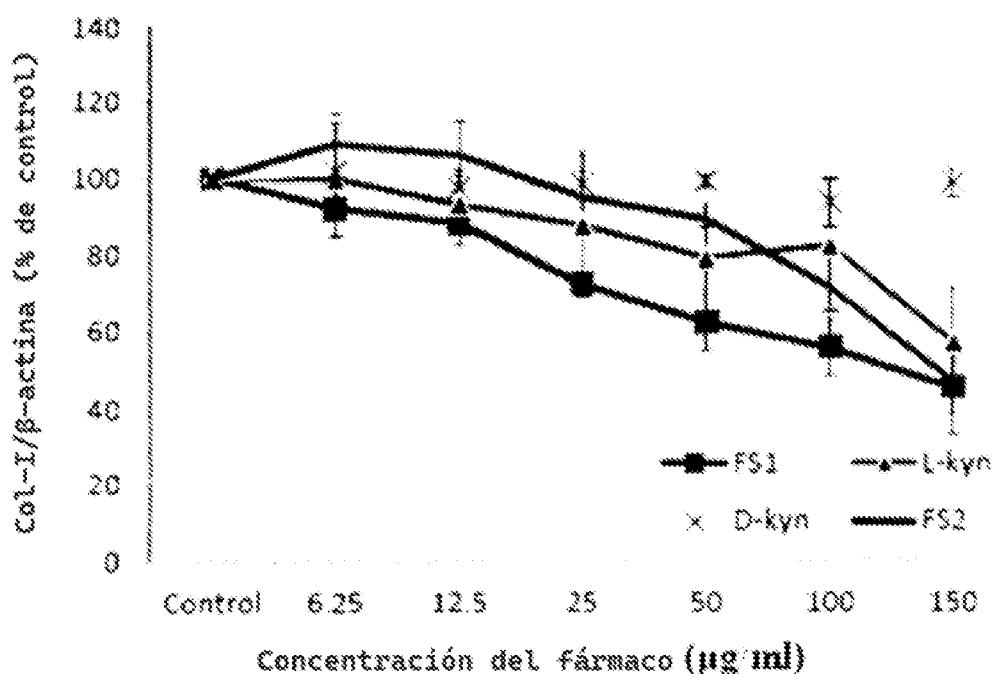


FIGURE 16

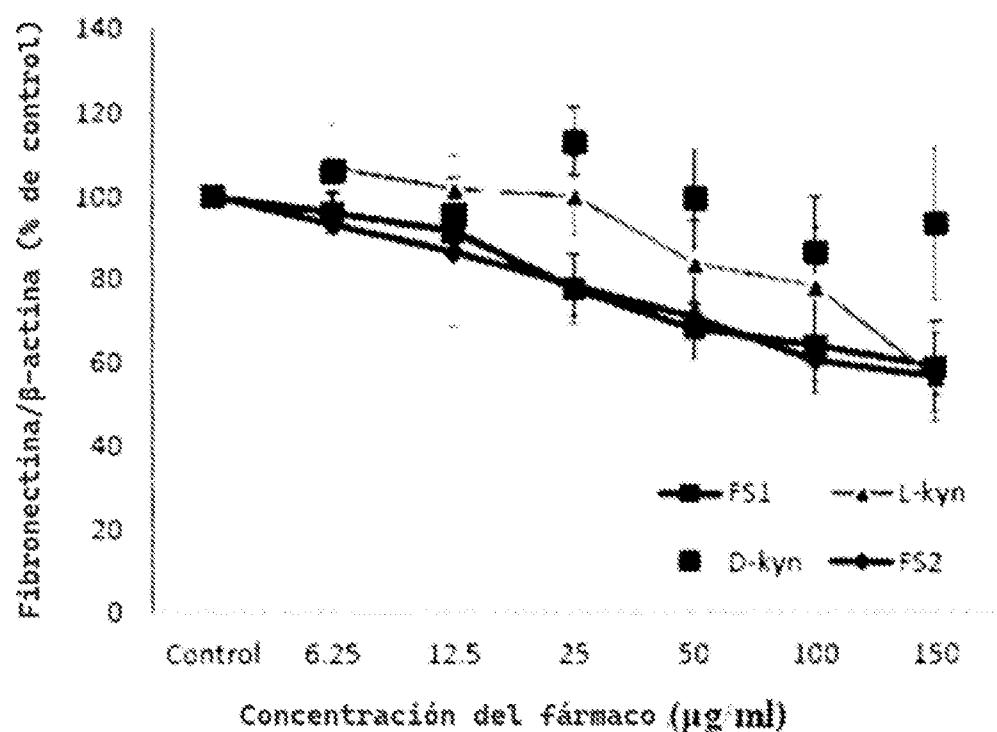


FIGURA 17

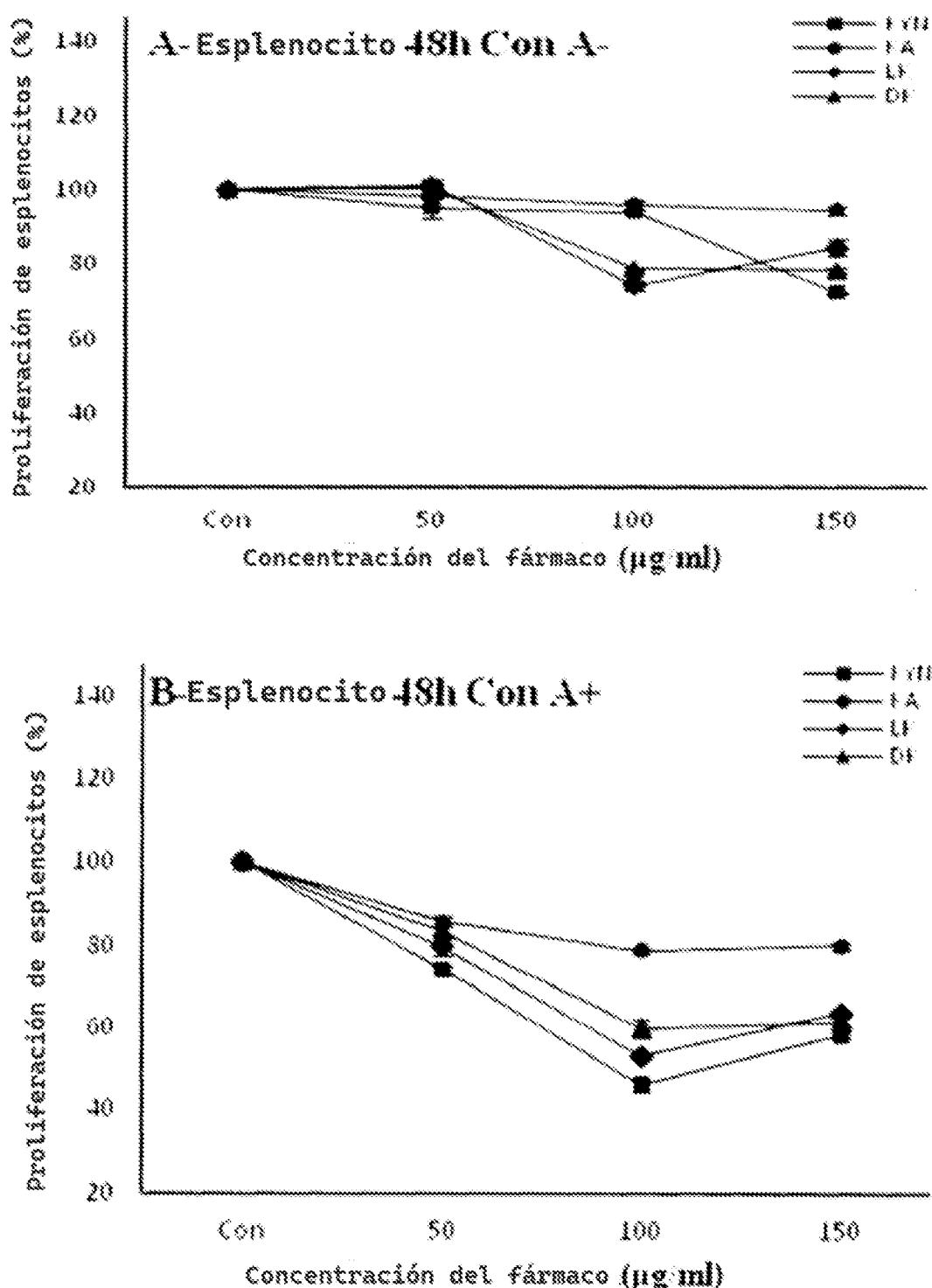


FIGURA 17 (continuación)

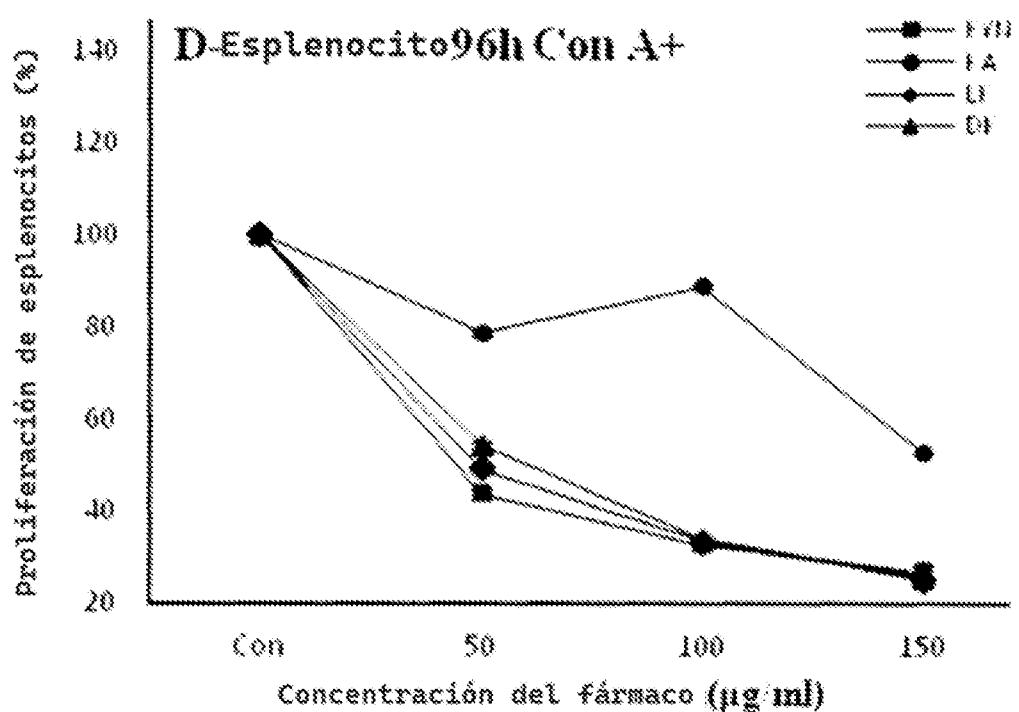
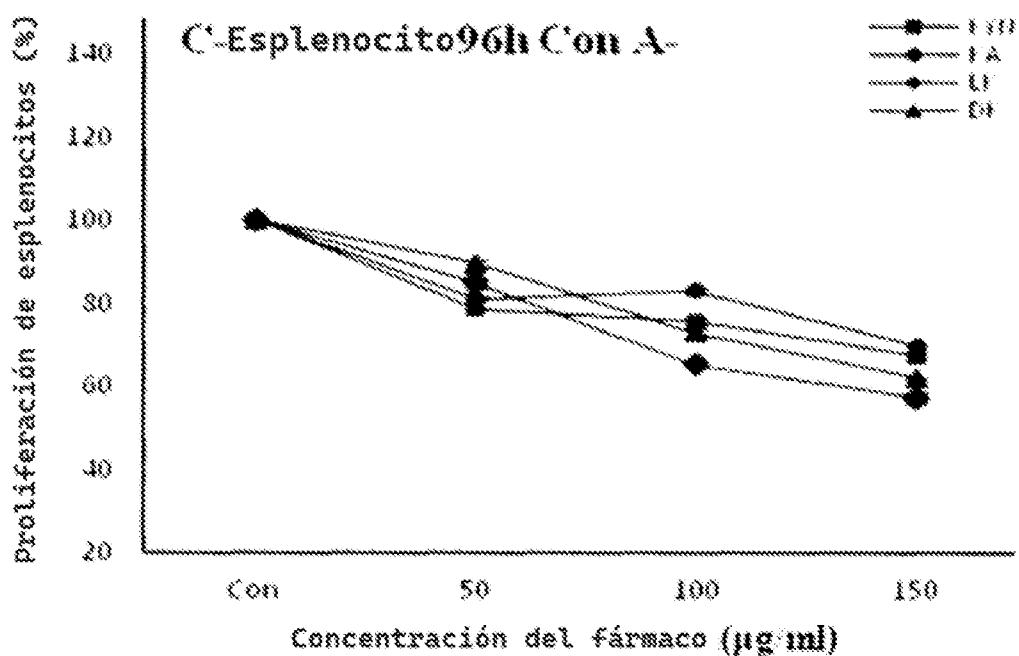


FIGURA 18

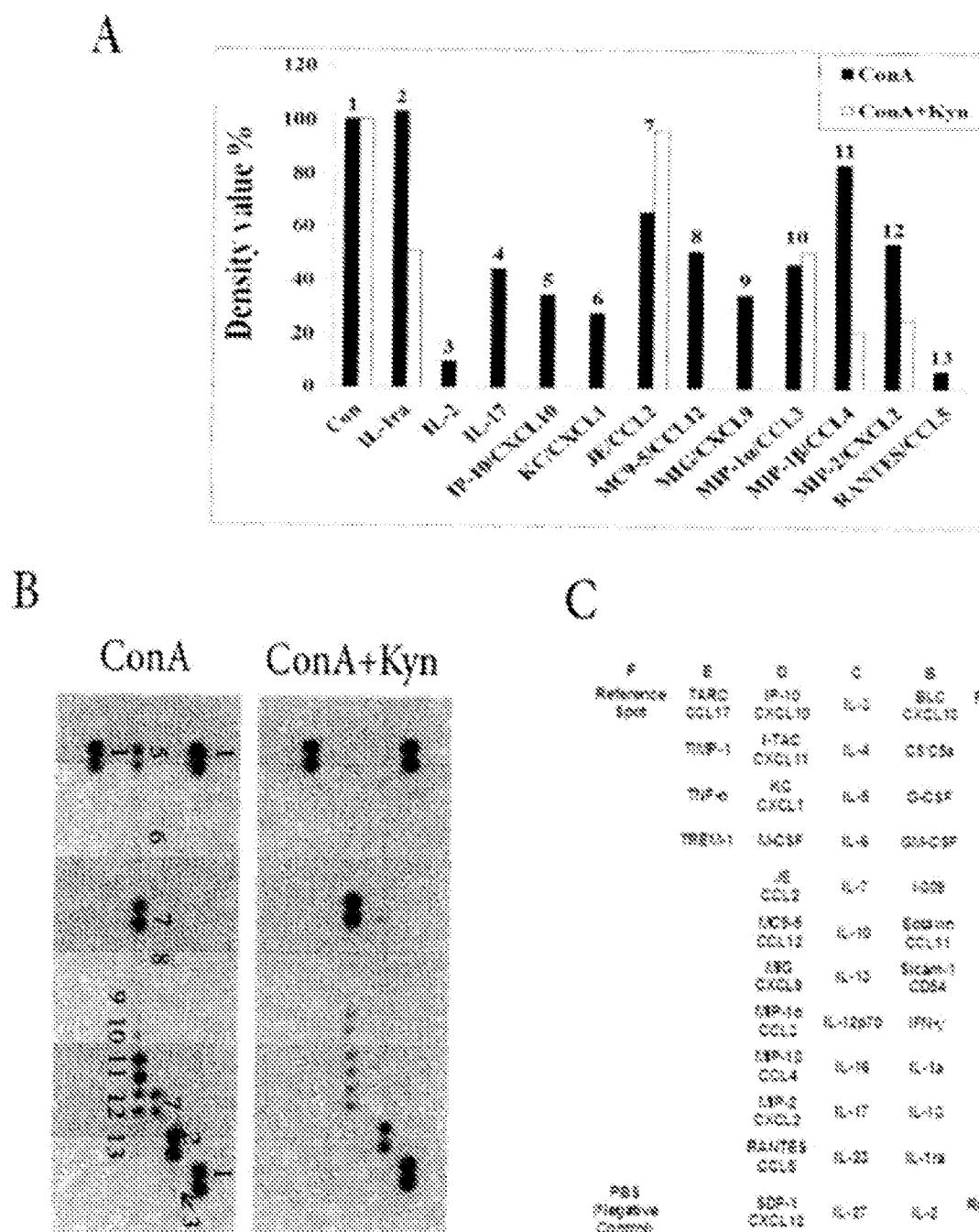
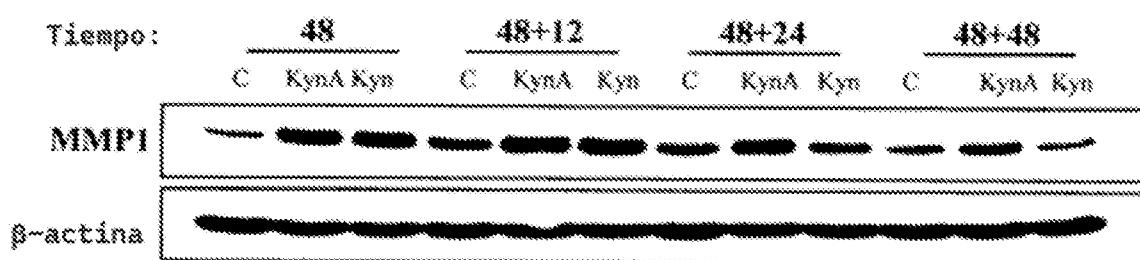


FIGURA 19

A



B

