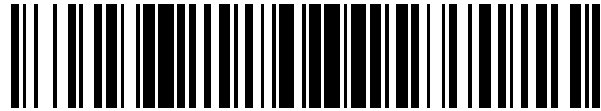


19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 481 990**

21 Número de solicitud: 201232075

51 Int. Cl.:

**C07C 49/597** (2006.01)

12

## PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**31.12.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**31.07.2014**

Fecha de la concesión:

**30.04.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**08.05.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070909**

73 Titular/es:

**CIBER DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
(CIBERES) (50.0%)****Recinto Hospital Joan March, Ctra. de Sóller, Km.  
12****07110 Bunyola - Mallorca (Illes Balears) ES;  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (16.7%);  
SERVICIO CANARIO DE SALUD (16.7%) y  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (16.7%)**

72 Inventor/es:

**CABRERA BENITEZ, Nuria Esther;  
RAMOS NUEZ, Angela María;  
VILLAR HERNANDEZ, Jesús;  
PADRON CARRILLO, José Manuel;  
GARCIA TELLADO, Fernando y  
TEJEDOR ARAGON, David**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**54 Título: **COMPUESTOS CICLOPENTENONAS, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SU USO EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS QUE CURSAN CON PROCESOS APOPTÓTICOS Y FIBRÓTICOS CELULARES.**

57 Resumen:

La invención describe unos compuestos ciclopentenonas, su procedimiento de obtención y su uso en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad que cursa con procesos inflamatorios, apoptóticos y fibróticos celulares.

ES 2 481 990 B1

**DESCRIPCIÓN**

**COMPUESTOS CICLOPENTENONAS, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SU  
USO EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL  
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS QUE CURSAN CON  
PROCESOS APOPTÓTICOS Y FIBRÓTICOS CELULARES**

5

**Campo de la Invención**

La presente invención refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades que sintetizan mediadores celulares pro-inflamatorios y que cursan con apoptosis y procesos fibróticos. Está comprendida en el campo de fármacos aptos para el tratamiento de dichas enfermedades, en medicina aplicada.

10

**Antecedentes de la Invención**

En la técnica existen diversos compuestos con capacidad para disminuir los efectos producidos por acción de los Lipopolisacáridos (LPS de la bacteria *E. coli*, agente causante y más frecuente del Síndrome de la Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) provocado por una infección o sepsis.

15

Estos compuestos reaccionan de forma principal por la Condensación de Knoevenagel y la síntesis de Feist-Bénary.

20

La Condensación de Knoevenagel es la adición nucleofílica de un compuesto con hidrógeno activo a un compuesto carbonílico, seguida de la pérdida de una molécula de agua para producir un producto del tipo enona alfa, beta insaturada. En este sentido, la 1,3-ciclopentadiona tiene un perfil de reactividad peculiar ya que está documentada la imposibilidad de detener su reacción con aldehidos alifáticos o aromáticos en la etapa de mono-adición (D. B. Ramachary, M. Kishor, "Direct amino acid-catalyzed cascade biomimetic reductive alkylations: application to the asymmetric synthesis of Hajos-Parrish ketone analogues". *Org Biomol Chem* 2008; 6: 4176-4187).

25

30

La síntesis de Feist-Bénary es la reacción de compuestos 1,3-dicarbonílicos y alfa-halocetonas para producir furanos sustituidos. La 1,3-ciclopentadiona ha sido utilizada para sintetizar dihidrofuranos mediante su reacción con alfa-halocetonas a través de la reacción conocida como Feist-Benary "interrumpida" (M. A. Calter, R. M.

35

Phillips, C. Flaschenriem, "Catalytic, asymmetric, "interrupted" Feist-Bénary reactions". J Am Chem Soc 2005; 127: 14566-14567).

Las Ciclopentenonas, entre ellas las Ciclopentenonas Prostanoides (CyP), son  
5 icosanoides naturales que muestran distintas actividades biológicas incluyendo efectos anti-virales, efectos anti-tumorales y modulación de la respuesta al shock, inducción al stress oxidativo y apoptosis.

La patente ES 2209139 T3 describe el uso de unos compuestos ciclopentenonas  
10 para la prevención y tratamiento de enfermedades cancerígenas tales como leucemia promielocítica humana, leucemia linfoblástica aguda humana, cáncer pulmonar, cáncer pulmonar transformadas por SV40, hepatoma, cáncer de colon humano, cáncer de estómago y mieloma. Sin embargo, estas enfermedades responden a un exceso de células malignas, entre otras causas, con tasas de  
15 crecimiento y división superiores a los límites normales y capacidad de evasión al proceso apoptótico, de forma que la publicación diverge de la presente solicitud respecto a la actividad anti-apoptótica que describe esta última.

De forma general ya se ha descrito la inhibición de procesos inflamatorios por unos  
20 compuestos concretos de ciclopentenonas (Musiek E.S. et al "Cyclopentenone isoprostanes inhibit the inflammatory response in macrophages". J Biol Chem 2005; 280(42):35562-35570). La actividad biológica de prevención a los mecanismos inflamatorios de las ciclopentenonas en modelos de inducción de LPS también ha sido descrita en otros modelos celulares y animales. Es el caso de los  
25 trabajos de Pirianov et al. ("The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J(2) delays lipopolysaccharide-induced preterm delivery and reduces mortality in the newborn mouse". Endocrinology 2009; 150(2):699-706) donde en un modelo de ratón de infección intrauterina, la administración de Cyclopentenone 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 fue capaz de inhibir NF- $\kappa$ B y sus mediadores inflamatorios  
30 como COX-2, fosfolipasa A citosólica y citoquinas in vivo. La presente invención se restringe a enfermedades que cursan con apoptosis y procesos fibróticos que provienen de una enfermedad inflamatoria.

La técnica relaciona más bien las ciclopentenonas con el efecto contrario: la  
35 inducción de apoptosis celular (Ciucci A et al. "Induction of apoptosis in estrogen

receptor-negative breast cancer cells by natural and synthetic cyclopentenones: role of the I $\kappa$ B kinase/nuclear factor- $\kappa$ B pathway". *Mol Pharmacol* 2006; 70(5):1812-1821). Las ciclopentenonas de la invención son capaces sin embargo de prevenir el proceso apoptótico inhibiendo el aumento de los niveles de expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y disminuyendo los de la proteína anti-apoptótica Bcl-2.

La patente ES 2228078 T3 describe el uso de unos compuestos ciclopentenonas para la prevención y tratamiento de enfermedades del tipo artritis reumatoide. La publicación describe un uso anti-inflamatorio mediante el modelo del edema pedal inducido por carragenano, que implica la inducción de macrófagos y neutrófilos por una inyección subcutánea de carragenano como agente inflamatorio en la parte inferior de la pata del animal. Los factores inflamatorios producidos por estas células aumentan la permeabilidad vascular, con resultado de edema. El uso anti-inflamatorio de las ciclopentenonas se acredita en este caso por la inhibición del edema producido, y no por la inhibición de ningún proceso fibrótico o apoptótico tal como describe la presente invención.

Recientes estudios han confirmado que un incremento del proceso apoptótico celular son pasos esenciales en el desarrollo de patologías como la Lesión Pulmonar Aguda (ALI) y Síndrome del Distrés Respiratorio Agudo (ARDS). Está documentado clínicamente el desarrollo patológico de ALI seguido de trauma, shock séptico y neumonía (Chopra M, Reuben J.S., Sharma A.C.; "Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms". *Exp Biol Med* (Maywood) 2009; 234(4):361-71). ALI es una complicación frecuente tras un proceso séptico en pacientes críticos pertenecientes a las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), asociada a elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. Los datos desde el estudio ALIVE demostraron que sobre el 7% de los pacientes UCI (Unidad de Cuidados Intensivos) desarrollan ALI, y que la sepsis es el factor predisponente más común. Esta sepsis está caracterizada por un estado inflamatorio sistémico en respuesta a microbios circulantes o sus toxinas como LPS o ADN bacteriano. La última causa de muerte en pacientes sépticos suele ser el desarrollo de un fallo multiorgánico que frecuentemente comienza con disfunción pulmonar.

El mecanismo de acción mediado por TLR4 es esencial en los procesos inflamatorios seguidos de procesos fibróticos y desarrollo de patologías como ALI/ARDS (Yang HZ et al. "TLR4 activity is required in the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis after acute and chronic lung injury". Am J Pathol 2012; 5 180(1):275-292). El mecanismo de mecanismo de acción Toll-like receptors (TLRs)/NF- $\kappa$ B detecta la invasión por los patógenos y constituye la unión entre la respuesta inmune adaptativa y la respuesta innata (Aderem A et al. Nature 2000; 406:782–787; Poltorak A Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97:2163–2167).

10 Las enfermedades sobre las que actúan las ciclopentenonas de la invención siguen el mecanismo de acción apoptótico Bax/Bcl-2, que está regulado por un aumento de los niveles de expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y una disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. El estímulo producido por el tratamiento con LPS de E. coli induce la apoptosis mediada por el mecanismo de acción Bax/Bcl-2. En el 15 caso del modelo in vivo donde se realizaron tratamientos intra-traqueales de LPS, éste aumenta los niveles de expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y disminuye la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Qiu X et al."Hydrogen inhalation ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice". Int Immunopharmacol 2011; 11:2130-2137). La apoptosis ha sido descrita como un fenómeno esencial en la 20 progresión patológica de ALI (Chopra M et al. "Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms" 2009; 234 (4): 361-371).

En este sentido, la solicitud internacional WO 2009111625 A3 describe otras composiciones farmacéuticas que se utilizan en métodos para inhibir la apoptosis de 25 las células epiteliales del pulmón lesionado o dañado para el tratamiento de la lesión pulmonar aguda y la fibrosis pulmonar consiguiente; y la solicitud JP2006292718 A describe un kit de marcadores de detección de la fibrosis pulmonar idiopática que incluye un anticuerpo anti-inhibidor Bax.

30 Dependiendo de la naturaleza de la lesión, los mecanismos de reparación pulmonar son iniciados inmediatamente después del daño producido. El proceso de reparación es complejo e involucra interacciones entre factores iniciadores de los procesos, elementos estructurales, ambientes mecánicos y mecanismos de acción.

El papel de la integración WNT- $\beta$ -Catenina es esencial en los mecanismos de reparación pulmonar en fibrosis. La unión WNT a los receptores Frizzled resulta en la acumulación citosólica de la  $\beta$ -Catenina, la cual se transloca al núcleo y participa en la transcripción génica. La fosforilación de  $\beta$ -Catenina por GSK-3 $\beta$  (“glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ”) en los residuos Ser33, Ser37 y Thr47 permite la ubiquitinación y la degradación proteosomal de la  $\beta$ -Catenina. La acumulación de la Beta-Catenina que es específicamente no fosforilada en los residuos GSK3 $\beta$  se sabe que es crítico para la transcripción mediada por la  $\beta$ -Catenina. La señal WNT/ $\beta$ -Catenina estimula la remodelación del tejido, la migración celular y otros procesos a través de las metalopeptidasas (MMPs) y otros genes. Esta activación directa o indirectamente estimula muchas citoquinas pro-inflamatorias que participan en la destrucción pulmonar mediada por la inflamación. WNT/ $\beta$ -Catenina contribuye a la fibrosis pulmonar en un modelo de lesión pulmonar aguda inducida por la bleomicina (Königshoff M et al. “Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis”. PLoS One 2008; 3(5): e2142). En la presente solicitud se detalla la relación de dicha activación del WNT/ $\beta$ -Catenina con la prevención del proceso fibrótico por los compuestos ciclopentenonas de la invención.

20 La solicitud US 2004223952 A1 describe un medicamento contra el enfisema pulmonar, el Síndrome Distrés Respiratorio y el cáncer pulmonar cuyo mecanismo comprende influir sobre la formación y/o reducción de células alveolares pulmonares por medio de la modulación del mecanismo de acción WNT.

25 A pesar de que la técnica avanza en los conocimientos adquiridos sobre los procesos patofisiológicos involucrados, sigue sin existir tratamiento farmacológico para ALI (Matthay M.A. et al. “Randomized, placebo-controlled clinical trial of an aerosolized beta-agonist for treatment of acute lung injury”. Am J Respir Crit Care Med 2011; 184:561-568) o para el paciente séptico (Tsushima K. et al. “Acute lung injury review”. Inter Med 2009; 48(9):621-630). Actualmente la terapéutica del paciente séptico que desarrolla un proceso fibrótico se restringe a pautas como la administración de oxígeno suplementario, intubación orotraqueal y ventilación mecánica.

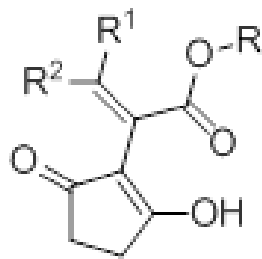
30

El problema que se plantea entonces en la técnica es encontrar una terapia farmacológica efectiva para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que cursan con procesos apoptóticos y fibróticos celulares. La solución que plantea la presente invención es el uso de unos compuestos ciclopentenonas en el tratamiento de este tipo de patologías.

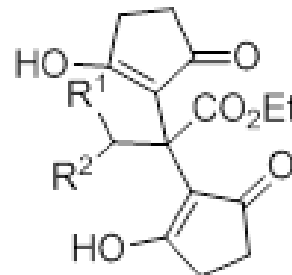
**Descripción de la Invención**

La presente invención se refiere a la síntesis de compuestos ciclopentenonas que han mostrado actividad anti-inflamatoria, anti-apoptótica y/o de prevención al mecanismo de inducción al proceso fibrótico.

La invención, por tanto, son los compuestos ciclopentenonas de fórmulas (I) o (II)



(I)



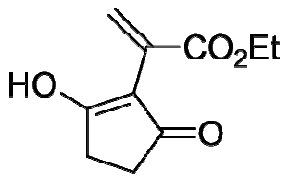
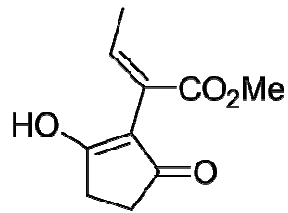
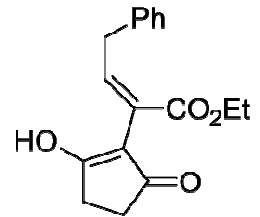
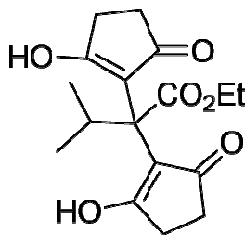
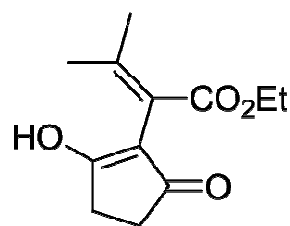
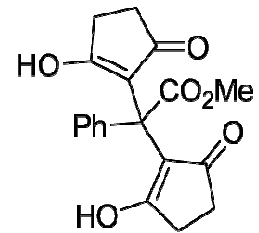
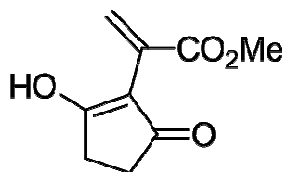
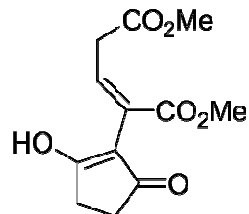
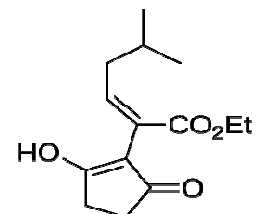
(II)

15

donde R, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son independientemente H o una cadena alquílica sustituida o no sustituida. En una realización preferible, R es metilo o etilo. En otra realización preferible R<sup>1</sup> es H, metilo, bencilo, tolilo o dimetiléster. En otra realización preferible más de la invención R<sup>2</sup> es H, metilo o bencilo.

20

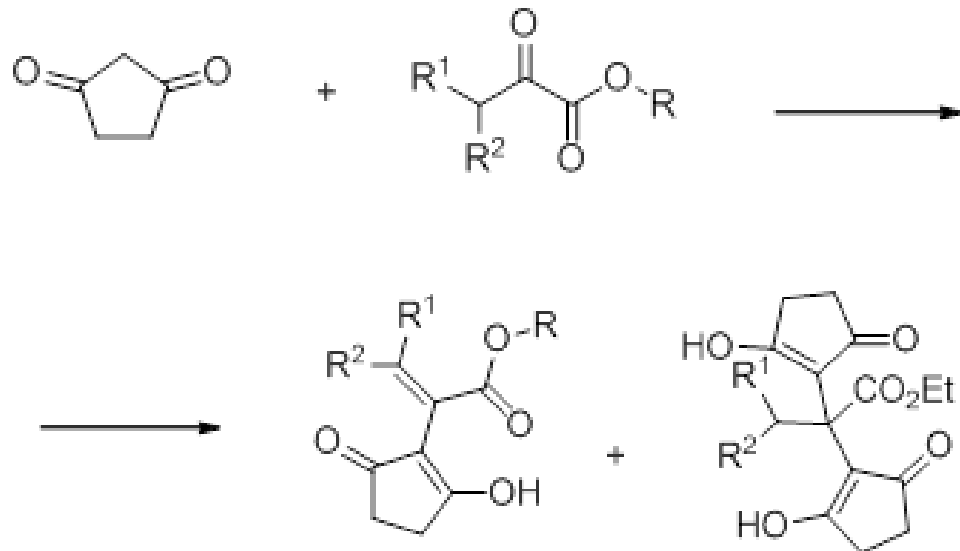
Los nueve compuestos más preferibles de la invención son los siguientes:

**DTA0043****DTA0255****DTA0256****DTA0260****DTA0261****DTA0265****DTA0267****DTA0268****DTA0269**

- 5 **DTA0043** o Etil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil) acrilato; **DTA0255** o (Z)-Metil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)but-2-enoato; **DTA0256** o (Z)-Etil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-4-fenilbut-2-enoato; **DTA0261** o Etil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-3-metilbut-2-enoato; **DTA0267** o Metil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)acrilato; **DTA0268** o (Z)-Dimetil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)pent-2-enedioato; **DTA0269** o (Z)-Etil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-5-metilhex-2-enoato; **DTA0260** o Etil 2,2-bis(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-3-metilbutanoato; **DTA0265** o Metil 2,2-bis(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-2-fenilacetatol.

Una realización preferible es un procedimiento de obtención de los compuestos  
 15 ciclopentenonas de la invención, que comprende hacer reaccionar 1,3-ciclopentanodiona con piruvato de metilo en presencia de trialkilamina como catalizador en un disolvente orgánico, según la reacción:





5

Esta reacción se realiza preferiblemente durante al menos 24 h a temperatura ambiente. En una realización preferible dicha trialkilamina es trietilamina. En otra  
 10 realización preferible más dicho disolvente orgánico es diclorometano, tolueno o metanol, o sus mezclas.

Los compuestos ciclopentenonas de la presente invención poseen actividad anti-inflamatoria, anti-apoptótica y de prevención al proceso fibrótico, y son capaces de  
 15 disminuir los efectos anti-proliferativos, apoptóticos y fibróticos inducidos por LPS de bacterias Gram-negativas sobre la línea celular A549. Así, la acción anti-apoptótica se ha descrito mediante inhibición del aumento de expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y una inhibición de la disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. La acción de prevención al mecanismo de inducción al proceso fibrótico se  
 20 acompañó de una inhibición al mecanismo de acción WNT/ $\beta$ -Catenina.

De forma que una realización muy preferible es el uso de una ciclopentenona de la invención en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares,  
 25 preferiblemente de forma simultánea a una sepsis. Dicha sepsis comprende siempre *E. coli* en patologías como ALI y ARDS, de forma que una realización más de la

invención es que dicha sepsis comprenda bacterias Gram negativas y en particular *E. coli*.

5 Otra forma de expresión de la realización anterior de la invención es un compuesto ciclopentenona para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares, preferiblemente de forma simultánea a una sepsis, siendo que dicha sepsis comprende preferiblemente bacterias Gram-negativas y en particular *E. coli*.

10 Otra realización de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto ciclopentenona de la invención, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares, preferiblemente una sepsis, una enfermedad pulmonar aguda inducida por sepsis,  
15 síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico o endotoxemia, o peritonitis séptica.

En el ámbito de la presente invención, se entiende por enfermedades inflamatorias “que cursan con procesos apoptóticos y fibróticos celulares” a aquellas  
20 enfermedades que en las que dichos procesos apoptóticos y fibróticos son factores determinantes y causa preferente de la patogénesis de la enfermedad. Por “apoptosis” se entiende “muerte celular programada”.

En el alcance de la presente invención se define una enfermedad “inducida por sepsis” como la que se produce como consecuencia de los procesos patológicos  
25 presentes en una sepsis.

Todas ellas son patologías con un proceso inflamatorio severo pudiéndose originar daño alveolar difuso, perjuicio en la perfusión ventilatoria, severa hipoxemia y  
30 disminución de la capacidad pulmonar.

En el ámbito de la presente invención se entiende por “hipoxemia” a la disminución anormal de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial.

En otra realización más de la invención, dicha enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares es un trauma o un daño tisular, típicamente derivado de una acción mecánica y en particular de ventilación mecánica con o sin una sepsis previa. La ventilación mecánica se aplica a un paciente como  
5 primera medida contra la lesión pulmonar y forma parte de las medida de soporte vital, aunque a veces se revela inductora de una enfermedad fibrótica. Dependiendo de la naturaleza de la lesión sobre el paciente, los mecanismos de reparación del pulmón se inician inmediatamente después de la agresión. La reparación, la remodelación y la regeneración del sistema respiratorio para la restauración del  
10 normal funcionamiento del pulmón después de una lesión, son pasos esenciales. El proceso de la reparación del pulmón es complejo e implica interacciones entre factores iniciadores, elementos estructurales, el ambiente mecánico y rutas metabólicas de señalización. El papel de la ruta WNT mediada por  $\beta$ -catenina está relacionado con los procesos de reparación tisular e inducción a la fibrosis pulmonar.. Son claras las evidencias que han mostrado que la inhibición al  
15 mecanismo de acción WNT/ $\beta$ -catenina puede influir terapéuticamente en la regeneración y la reparación endógena pulmonar después de una lesión previa.

Una realización más es una composición farmacéutica que comprende al menos un  
20 compuesto ciclopentenona de la invención junto con excipientes farmacéuticamente aceptables y al menos otro agente terapéutico, para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares.

En otra realización muy preferible, la composición de la invención se administra por  
25 vía intravenosa. En otra realización preferible se administra por vía oral, muscular y/o intramuscular. En otra realización más se presenta en una unidad de dosificación.

La realización más preferible es una composición farmacéutica por vía intravenosa que comprende al menos uno de los nueve compuestos más preferibles de la  
30 invención, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares en un humano.

Otra posible realización de la invención es un método de tratamiento de una  
35 enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares en

un sujeto, preferiblemente humano, que comprende administrar a dicho sujeto afectado por la enfermedad una cantidad efectiva de un compuesto ciclopentenona de la invención. O dicho de otro modo, un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares, que  
 5 comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprenda un compuesto ciclopentenona de la invención a un sujeto, preferiblemente humano, en necesidad de ella.

**Breve descripción de las Figuras**

10 **Figura 1:** Cambios morfológicos de la línea celular A549 tratada o no con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* sólo o en combinación con 100 µM del compuesto DTA0043 como representativo. Los paneles superiores corresponden al objetivo 40X. C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* durante 18 horas; DTA0043 = Línea celular A549 tratada con 300 µgr/ml de LPS de  
 15 *E. coli* más 100µM de DTA0043 durante 18 horas.

**Figura 2:** Electroforesis representativas **(2a)** y los valores densitométricos de las proteínasTLR4 y Iκβ normalizados en función del control de carga β-actina **(2b)** cuando las células A549 fueron tratadas durante 18 horas con 300 µg/ml de LPS de  
 20 *E. coli* sólo o en combinación con 100 µM de los nueve compuestos ciclopentenonas más preferibles de la presente invención. Análisis densitométrico de las proteínas TLR4/Iκβ normalizadas en función de β-actina en todas las condiciones experimentales objeto de estudio. C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* durante 18 horas; Compuestos 1-9=  
 25 Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* más 100 µM de los nueve compuestos ciclopentenonas preferibles durante 18 horas. DTA0043= Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* más 100 µM del compuesto DTA0043 durante 18 horas.\* p<0,05 vs. C; \*\*\* p<0,001 vs. C; ¶ p<0,001 vs. LPS de *E. coli*.

30 **Figura 3:** Prevención en el proceso apoptótico de los nueve compuestos ciclopentenonas más preferibles de la invención, inducida por 300 µg/ml de LPS de *E. coli*. **(2a)** Diagramas representativos usando el compuesto DTA0043 mostrando poblaciones celulares apoptóticas y bajo muerte celular detectadas por tinción  
 35 AnexinaV-FITC (Anexina V) e Ioduro de Propidio (IP). **(2b)** Porcentajes de apoptosis

temprana y muerte de las células A549 bajo todas las condiciones experimentales. **(2c)** Análisis de microscopía fluorescente de células apoptóticas teñidas con Hoechst 33258. Las células A549 tratadas con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* durante 18 horas mostraron una condensación de la cromatina nuclear y fragmentación nuclear que  
 5 fue prevenida por el cotratamiento con los compuestos ciclopentenonas. Las imágenes fueron captadas mediante objetivo 40x. **(2d)** Cuantificación de apoptosis que muestra el porcentaje de células apoptóticas en cada condición experimental. C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* durante 18 horas; Compuestos 1-9= Línea celular A549 tratada con 300  
 10 µg/ml de LPS de *E. coli* más 100 µM de los compuestos ciclopentenonas objeto de la presente invención durante 18 horas. DTA0043= Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* más 100 µM del compuesto DTA0043 durante 18 horas. \*\*\* p<0,001 vs. C; ¶p<0,001 vs. LPS de *E. coli*.

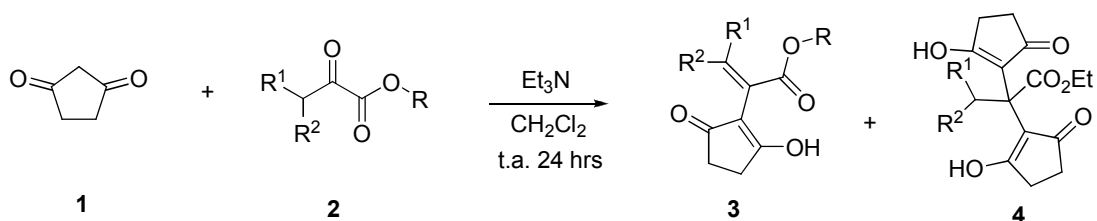
15 **Figura 4:** Electroforesis representativas **(3a)** y los valores densitométricos de las proteínas Bax y Bcl-2 normalizados en función del control de carga β-actina **(3b)** cuando las células A549 fueron tratadas durante 18 horas con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* sólo o en combinación con 100 µM de los nueve compuestos ciclopentenonas más preferibles de la presente invención. **(3c)** Alteraciones en el rango de las  
 20 proteínas Bax/Bcl-2 normalizadas en función de β-actina en todas las condiciones experimentales objeto de estudio. No hay diferencias estadísticas entre los grupos experimentales. C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* durante 18 horas; Compuestos 1-9= Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* más 100 µM de los nueve compuestos  
 25 ciclopentenonas preferibles durante 18 horas. DTA0043= Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* más 100 µM del compuesto DTA0043 durante 18 horas.\* p<0,05 vs. C; \*\*\* p<0,001 vs. C; ¶p<0,01 vs. LPS de *E. coli*.

**Figura 5:** Efecto de LPS de *E. coli* sólo o en combinación con los nueve compuestos  
 30 ciclopentenonas más preferibles de la invención en los niveles de expresión de las proteínas WNT5A, no-p-β-Catenina (Ser33/37/Thr41), metaloproteínasa-7 (MMP-7) de células A549 tratadas con las condiciones experimentales mencionadas durante 18 horas. En el panel **(4a)** se muestran geles representativos correspondientes a las proteínas de estudio [WNT5A, no-p-β-Catenina (Ser33/37/Thr41), metaloproteínasa-  
 35 7 (MMP-7)]. En el panel **(4b)** se muestran los histogramas donde se cuantificaron los

cambios en los niveles de expresión de las proteínas WNT5A, no-p-β-Catenina (Ser33/37/Thr41), MMP-7 normalizados en función del control de carga β-actina. En el caso de la no-p-β-Catenina (Ser33/37/Thr41), ésta se ha normalizado también en función de la β-Catenina total. En el caso del análisis de la MMP-7, se analizó la forma activa (20 kDa) en función de la forma inactiva (30 kDa) de la proteína. Los datos se expresan como media ± S.E.M. de determinaciones triplicadas y se expresan en función de las células control (sin tratamiento y sin estimulación con LPS de *E. coli*). C=Control línea celular A549; C+=Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* durante 18 horas; Compuestos 1-9= Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* más 100 µM de los nueve compuestos ciclopentenonas preferibles durante 18 horas. DTA0043= Línea celular A549 tratada con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* más 100 µM del compuesto DTA0043 durante 18 horas. \*\* p<0,01 vs. C; \*\*\* p<0,001 vs. C; † p<0,05 vs. LPS; ¶ p<0,001 vs. LPS.

#### 15 Modos de realización preferible

La síntesis de los compuestos ciclopentenonas de la invención se realizó siempre según el esquema siguiente:



20

según la relación de compuestos de la siguiente tabla:

**Tabla I**

2	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	3	%	Z:E	4	%
2a	Me	H	H	3a	87	-	-	-
2b	Et	H	H	3b	75	-	-	-
2c	Me	Me	H	3c	73	>19:1	-	-
2d	Et	Me	Me	3d	45	-	4d	38 (80) <sup>a</sup>
2e	Et	CH <sub>2</sub> Ph	H	3e	79	>19:1	-	-
2f	Me	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Me	H	3f	54	9:1	-	-
2g	Et	<i>i</i> -Bu	H	3g	65	>19:1	-	-
2h	Me	Ph	-	-	-	-	4h	(70) <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> Reacción en Metanol (5 ml) a partir de **1** (2,0 mmol), **2** (2,5 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0,5 mmol)

<sup>b</sup> 48 h a temperatura ambiente

5 donde,

**(2b)** Piruvato de etilo (Ethyl pyruvate, IUPAC: ethyl 2-oxopropanoate. CAS 617-35-6. Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

10 **(2c)** Metil 2-oxobutanoato (Methyl 2-oxobutanoate CAS 3952-66-7. Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

**(2d)** Etil 3-metil-2-oxobutanoato (Ethyl 3-methyl-2-oxobutyrate, IUPAC: ethyl 3-methyl-2-oxobutanoate. CAS 20201-24-5. Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

**(2e)** etil 2-oxo-4-fenilbutanoato (Ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate, IUPAC: ethyl 2-oxo-4-phenylbutanoate), CAS 64920-29-2. Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

15 **(2f)** Dimetil 2-oxopentanodioato (Dimethyl 2-oxoglutarate, IUPAC: dimethyl 2-oxopentanedioate. CAS 13192-04-6. Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

**(2g)** Etil 5-metil-2-oxohexanoato (Ethyl 5-methyl-2-oxohexanoate. CAS 26395-03-9. Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

20 **(2h)** metil 2-oxo-2-fenilacetato (Methyl benzoylformate, methyl 2-oxo-2-phenylacetate. CAS 15206-55-0. Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

Se realizaron espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) en disolución de CDCl<sub>3</sub> calculando los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) con respecto al desplazamiento del CHCl<sub>3</sub>. Para ello, tanto en los de <sup>1</sup>H como de <sup>13</sup>C, se utilizó un espectrómetro  
25 BRUKER modelo AMX 400 (400,13 MHz para <sup>1</sup>H y 100,62 MHz para <sup>13</sup>C) con consola AVANCE 400 a temperatura ambiente (25°C).

Se realizaron espectros de infrarrojo (IR) en disolución de CHCl<sub>3</sub> seco en células de cloruro sódico de 0,1 mm de espesor a temperatura ambiente. Para ello se utilizó un  
30 espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 1600/FTIR. Los valores de frecuencia ( $\nu$ ) se expresan en cm<sup>-1</sup>.

Se realizaron espectros de masas, tanto de baja (EM) como de alta resolución (EMAR), empleando la técnica de ionización por impacto electrónico (IE) operando a  
35 70 eV en el espectrofotómetro modelo AutoSpec (Micromass). Las señales se describen en unidades de relación masa/carga ( $m/z$ ) y entre paréntesis se indican las intensidades relativas de cada señal respecto al pico base, que se considera del 100%.

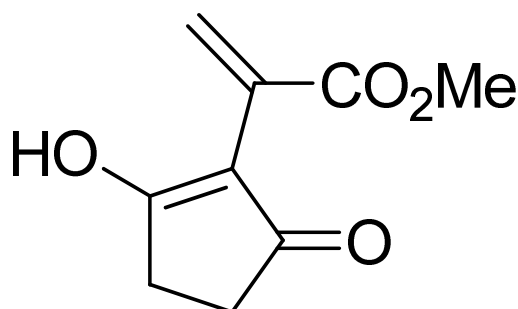
Se realizaron análisis elementales en un analizador Fisons modelo EA 1108 CHNS. La cantidad de muestra utilizada fue de 1 mg aproximadamente en cada determinación.

5

**Ejemplo 1: Obtención de Metil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)acrilato; compuesto (Tabla I compuesto 3a, DTA0267).**

Se hicieron reaccionar 2,0 mmol de 1,3-Ciclopentanodiona (CAS 3859-41-4. Sigma-Aldrich®) y 1,0 mmol de piruvato de metilo (CAS 600-22-6. Sigma-Aldrich®) en 5 ml de diclorometano. A continuación, se añadieron 0,50 mmol de trietilamina y se dejó reaccionar a temperatura ambiente bajo agitación durante 24 horas. El disolvente fue eliminado mediante destilación bajo presión reducida. El compuesto obtenido fue aislado por cromatografía en columna tipo flash usando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de AcOEt/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOH en proporciones 10/89/1 al comenzar hasta 20/79/1 al terminar como eluyente o fase móvil.

15



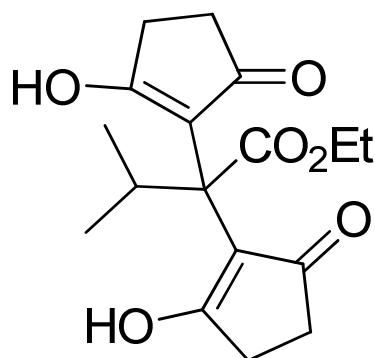
- Fórmula molecular: **C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>**.
- 20 - <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,53 (s, 4H), 3,87 (s, 3H), 6,48 (d, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 1,3 Hz), 7,00 (d, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 1,3 Hz), 12,6 (bs, 1H).
- <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 29,6, 53,5, 109,6, 129,4, 130,2, 171,8.
- IR (cm<sup>-1</sup>): 1671,5, 1617,3, 1572,9, 1443,8, 1389,4, 1323,4, 1291,9.
- EM, *m/z* (intensidades relativas): 182 (M+, 64), 152 (100), 122 (68), 94 (22), 67
- 25 (21), 66 (23).
- Análisis elemental:
  - Calculado: C, 59,34; H, 5,53.
  - Observado: C, 59,49; H, 5,66.

30 **Ejemplo 2: Obtención de Etil 2,2-bis(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-3-metilbutanoato (Tabla I compuesto 4d, DTA0260).**



Se hicieron reaccionar 2,0 mmol de 1,3-Ciclopentanodiona y 2,5 mmol del compuesto cetoéster 2d (etil 3-metil-2-oxobutanoato) en 5 ml de metanol. A continuación, se añadieron 0,50 mmol de trietilamina y se dejó reaccionar a temperatura ambiente bajo agitación durante 24 horas. El disolvente fue eliminado mediante destilación bajo presión reducida. El producto obtenido fue aislado por cromatografía en columna tipo flash usando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de AcOEt/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOH en proporciones 10/89/1 al comenzar hasta 20/79/1 al terminar como eluyente o fase móvil.

10



DTA0260:

15

- Fórmula molecular: **C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>**.
- <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,91 (bs, 6H), 1,23 (t, 3H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,1 Hz), 2,45 (bs, 8H), 3,41-3,49 (m, 1H), 4,18-4,22 (m, 2H), 10,5 (bs, 2H).
- <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 13,9, 18,5, 28,3, 55,8, 62,6, 177,4.
- IR (cm<sup>-1</sup>): 3006,0, 1718,1, 1679,9, 1649,5, 1443,7, 1375,7, 1351,6, 1318,0, 1287,2.
- EM, *m/z* (intensidades relativas): 322 (M+, 14), 261 (26), 249 (53), 234 (50), 233 (100), 231 (50), 205 (47), 178 (55), 150 (50).
- Análisis elemental:

25

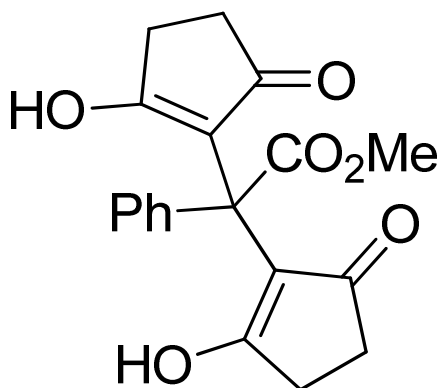
Calculado: C, 63,34; H, 6,88.  
 Observado: C, 63,12; H, 6,89.

**Ejemplo 3: Obtención de Metil 2,2-bis(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-2-fenilacetato (Tabla I compuesto 4h, DTA0265).**

30

Se hicieron reaccionar 2,0 mmol de 1,3-Ciclopentanodiona y 2,5 mmol del compuesto cetoéster 2h (metil 2-oxo-2-fenilacetato) en 5 ml de metanol. A continuación, se añadieron 0,50 mmol de trietilamina y se dejó reaccionar a

temperatura ambiente bajo agitación durante 48 horas. El disolvente fue eliminado mediante destilación bajo presión reducida. El producto obtenido fue aislado por cromatografía en columna tipo flash usando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de AcOEt/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOH en proporciones 10/89/1 al comenzar hasta 20/79/1 al terminar como eluyente o fase móvil.



10

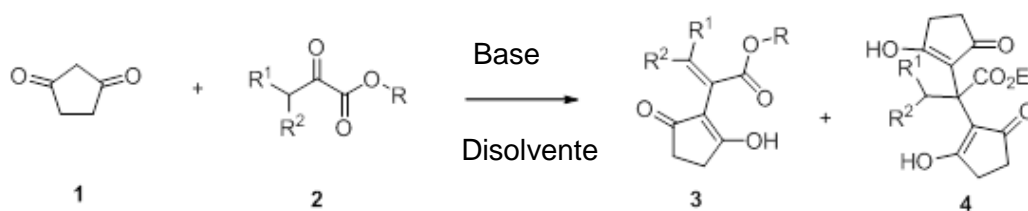
DTA0265:

- Fórmula molecular: **C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>**.
- <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,56 (bs, 8H), 3,56 (s, 3H), 7,25-7,33 (m, 5H), 11,75 (bs, 2H).
- <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 30,4, 53,7, 54,8, 117,8, 127,9, 128,1, 128,3, 135,4, 178,1.
- IR (cm<sup>-1</sup>): 3026,3, 1695,7, 1659,5, 1607,7, 1440,1, 1342,6, 1267,9.
- EM, *m/z* (intensidades relativas): 342 (M<sup>+</sup>, 51), 310 (65), 283 (47), 265 (100), 212 (39), 201 (35), 184 (36), 129 (65).
- Análisis elemental:
  - Calculado: C, 66,66; H, 5,30.
  - Observado: C, 61,34; H, 5,18.

20

#### **Ejemplo 4: Bases y disolventes empleados.**

25 Para completar el protocolo de síntesis se probaron las siguientes bases catalizadoras de la reacción y disolventes en las mismas condiciones de reacción que el Ejemplo 1:



Bases probadas: Et<sub>3</sub>N, DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano), DMAP (4-Dimetilaminopiridina), piperidina.

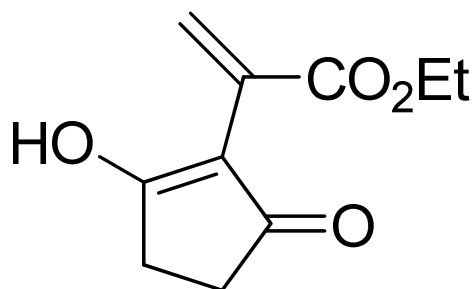
5 Disolventes probados: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, THF, Tolueno, MeOH.

La reacción según las condiciones del Ejemplo 1 y los reactivos de la tabla I tiene lugar con cualquiera de las bases utilizadas y en cualquiera de los disolventes. La mejor realización del procedimiento para la formación de (3) es utilizando Et<sub>3</sub>N en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La mejor realización para la formación de (4), en su caso, es con Et<sub>3</sub>N en  
10 MeOH.

#### Ejemplo 5: Obtención de ciclopentenonas.

Las condiciones de reacción del Ejemplo 1 se repitieron según los reactivos de la tabla I para obtener las estructuras químicas de los compuestos DTA0043,  
15 DTA0255, DTA0256, DTA061, DTA0268, DTA0269.

- Etil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)acrilato (Tabla I compuesto 3b, DTA0043).



- Fórmula molecular: C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>.
- 20 - <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,33 (t, 3H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,1 Hz), 2,51 (s, 4H), 4,30 (q, 2H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,1 Hz), 6,46 (s, 1H), 6,94 (s, 1H), 12,8 (bs, 1H).
- <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 13,8, 62,8, 109,7, 129,8, 171,3.
- IR (cm<sup>-1</sup>): 3019,9, 1738,6, 1667,4, 1614,7, 1573,3, 1444,8, 1394,7, 1322,0, 1289,4.

- EM,  $m/z$  (intensidades relativas): 196 (M+, 57), 150 (100), 122 (78), 94 (18), 67 (17), 66 (18).

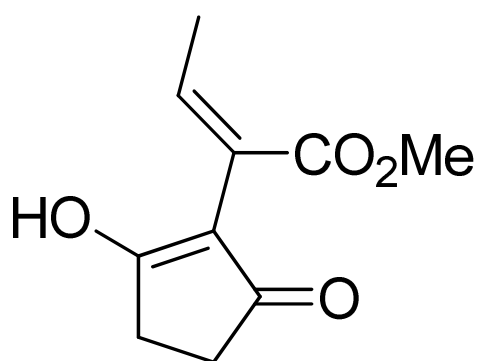
- Análisis elemental:

Calculado: C, 61,22; H, 6,16.

5 Observado: C, 61,06; H, 6,29.

- (Z)-Metil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)but-2-enoato (Tabla I compuesto 3c, DTA0255).

10



- Fórmula molecular: **C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>**.

- <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  2,01 (d, 3H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,6 Hz), 2,51 (s, 4H), 3,86 (s, 3H), 6,78 (q, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,6 Hz), 11,75 (bs, 1H).

- <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  16,3, 52,6, 112,6, 122,6, 141,6, 171,9.

15 - IR (cm<sup>-1</sup>): 1671,8, 1633,5, 1594,8, 1441,6, 1348,1, 1278,4.

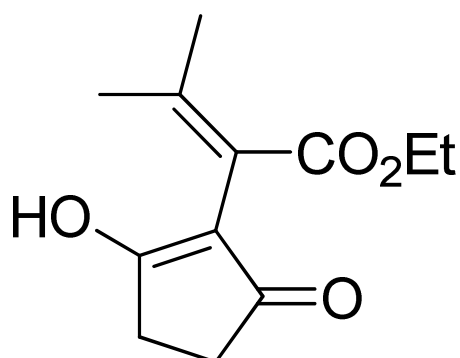
- EM,  $m/z$  (intensidades relativas): 196 (M+, 39), 164 (89), 136 (100), 135 (29), 108 (23), 94 (23).

- Análisis elemental:

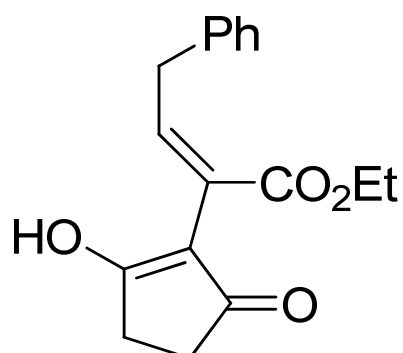
Calculado: C, 61,22; H, 6,16.

20 Observado: C, 61,41; H, 6,19.

- Etil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-3-metilbut-2-enoato (Tabla I compuesto 3d, DTA0261).



- 5
- Fórmula molecular: **C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>**.
  - <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,25 (t, 3H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,1 Hz), 1,67 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,54 (s, 4H), 4,17 (q, 2H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,1 Hz), 10,5 (bs, 1H).
  - <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,00, 22,4, 23,9, 30,4, 61,3, 115,4, 117,7, 148,9, 170,8, 195,2.
  - IR (cm<sup>-1</sup>): 2932,4, 1717,0, 1683,1, 1648,1, 1606,6, 1574,9, 1446,8, 1340,3, 1303,3.
  - EM, *m/z* (intensidades relativas): 224 (M+, 29), 179 (27), 178 (84), 151 (25), 150 (100), 149 (22), 122(52). HRMS calculado para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>, 224,1049, observado 224,1038.
- 10
- (Z)-Etil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-4-fenilbut-2-enoato (Tabla I compuesto 3e, DTA0256).



- 15
- Fórmula molecular: **C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>**.
  - <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,35 (t, 3H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,1 Hz), 2,50 (s, 4H), 3,79 (d, 2H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,8 Hz), 4,35 (q, 2H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,1 Hz), 6,81 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,6 Hz), 7,18-7,30 (m, 5H), 11,75 (bs, 1H).
  - <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,0, 36,3, 62,6, 112,2, 122,2, 126,4, 128,5, 128,6, 139,2, 143,8, 171,6.
  - IR (cm<sup>-1</sup>): 1717,0, 1670,5, 1629,4, 1593,0, 1349,6, 1289,9.
- 20

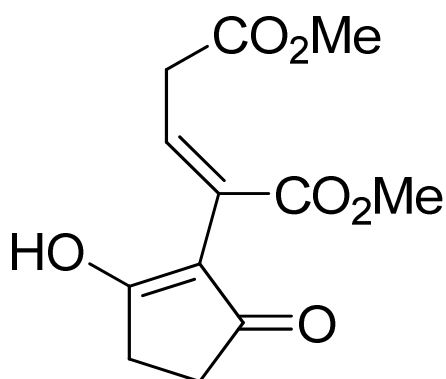
- EM,  $m/z$  (intensidades relativas): 286 ( $M^+$ , 42), 240 (100), 212 (37), 157 (81), 128 (32), 91 (35).

- Análisis elemental:

Calculado: C, 71,31; H, 6,34.

5 Observado: C, 71,08; H, 6,33.

- (Z)-Dimetil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)pent-2-enedioato (Tabla I compuesto 3f, DTA0268).



10

- Fórmula molecular:  $C_{12}H_{14}O_6$ .

-  $^1H$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  2,44 (s, 4H), 2,98 (d, 2H,  $^3J(H,H) = 7,1$  Hz), 3,53 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 7,00 (t, 1H,  $^3J(H,H) = 7,1$  Hz), 11,75 (bs, 1H).

15

-  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  30,4, 34,8, 51,7, 51,8, 112,0, 125,1, 138,2, 166,6, 171,1, 195,6.

- IR ( $cm^{-1}$ ): 3026,3, 3007,2, 2955,9, 1735,8, 1676,2, 1641,2, 1592,2, 1440,0, 1396,4, 1322,9, 1289,8.

- EM,  $m/z$  (intensidades relativas): 254 ( $M^+$ , 6.1), 222 (42), 194 (22), 190 (57), 163 (26), 162 (100), 135 (36).

20

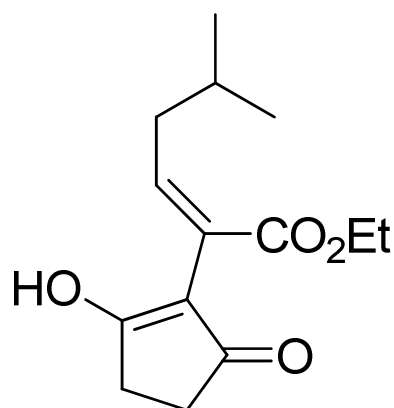
- Análisis elemental:

Calculado: C, 56,69; H, 5,55.

Observado: C, 56,67; H, 5,73.

25

- (Z)-Etil 2-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)-5-metilhex-2-enoato (tabla I compuesto 3g, DTA0269).



- Fórmula molecular: **C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>**.
- <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,92 (d, 6H, <sup>3</sup>J(H,H) = 6,6 Hz), 1,34 (t, 3H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,1 Hz), 1,70-1,80 (m, 1H), 2,29-2,32 (m, 2H), 2,50 (s, 4H), 4,30 (q, 2H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,1 Hz), 6,63 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7,6 Hz), 11,7 (bs, 1H).
- <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,0, 22,0, 28,7, 39,2, 62,2, 112,5, 122,1, 145,6, 171,9.
- IR (cm<sup>-1</sup>): 2961,1, 2929,0, 1667,6, 1630,7, 1592,6, 1351,8, 1287,0, 1252,3, 1224,4.
- EM, m/z (intensidades relativas): 252 (M+, 39), 206 (100), 191 (66), 188 (27), 163 (49), 136 (33), 135 (49).
- Análisis elemental:
  - Calculado: C, 66,65; H, 7,99.
  - Observado: C, 66,52; H, 8,31.

### 15 **Ejemplo 6: Actividad antimicrobiana de los compuestos ciclopentenonas.**

Se determinó la actividad anti-microbiana en bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y bacterias Gram-negativas *Escherichia Coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Se crecieron las especies bacterianas en placas de agar a 37°C. Después de 24 horas de incubación, fueron resuspendidas en solución salina a una concentración de 5 x 10<sup>5</sup> cfu/ml. La actividad antimicrobiana de los compuestos ciclopentenonas de la invención fue determinada en placas de 96 pocillos usando el medio Mueller Hinton broth según el método descrito en Dalhoff A et al. ("Comparative in vitro activities of the novel antibacterial flinafloxacin against selected Gram-positive and Gram-negative bacteria tested in Mueller-Hinton broth and synthetic urine". Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(4):1814-1818). Se incluyeron controles estériles y con crecimiento

adecuado. Cada compuesto ciclopentenona fue testado por duplicado a ocho diferentes soluciones seriadas desde 0,05 a 100  $\mu\text{M}$ : (0 - 0,05 - 0,1 - 0,5 – 1 – 5 – 10 - 100  $\mu\text{M}$ ). Las placas de 96 pocillos fueron incubadas a 37°C en una cámara oscura y húmeda. Después de la incubación, las especies fueron precipitadas en 25  $\mu\text{l}$  de TCA (Ácido tricloroacético) al 50% w/v y fijadas durante 60 minutos a 4°C. Después, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan P. et al. (“New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening”, J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1107-1112). Después del ensayo se agitaron las placas y mediante espectrofotometría (BioTek’s PowerWave XS Absorbance Microplate Reader) se obtuvieron valores de densidad óptica a 630 nanómetros después de 24 horas de incubación. Con los resultados obtenidos de la espectrofotometría se obtuvo el valor de Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) establecido como la concentración del compuesto que inhibió el crecimiento total cuando se comparó con las especies no tratadas. Todos los compuestos ciclopentenonas resultaron inactivos, con valores MCI superiores a 100  $\mu\text{M}$ .

#### **Ejemplo 7: Actividad antifúngica de los compuestos ciclopentenonas.**

Se determinó la actividad anti-fúngica en las especies fúngicas *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida nivariensis* (5937-63) y *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Se crecieron las especies fúngicas en placas de agar a 37°C. Después de 24 horas de incubación fueron resuspendidas en solución salina a una concentración de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$ . La actividad antifúngica de los compuestos fue determinada en placas de 96 pocillos usando el medio RPMI-1640 tamponado con solución MOPS (Sigma-Aldrich®) para las especies fúngicas. Se incluyeron controles estériles y con crecimiento adecuado. Cada compuesto fue testado por duplicado a ocho diferentes soluciones seriadas desde 0,05 a 100  $\mu\text{M}$  (0 - 0,05 - 0,1 - 0,5 – 1 – 5 – 10 - 100  $\mu\text{M}$ ). Las placas de 96 pocillos fueron incubadas a 37°C en una cámara oscura y húmeda. Después de la incubación, las especies fueron precipitadas en 25  $\mu\text{l}$  de TCA al 50% w/v y fijadas durante 60 minutos a 4°C. Después, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan et al según el Ejemplo 6. Después del ensayo se agitaron las placas y mediante espectrofotometría (BioTek’s PowerWave XS Absorbance Microplate Reader) se obtuvieron valores de densidad óptica a 490 nanómetros después de 48 horas de incubación. Con los resultados obtenidos de la espectrofotometría se



obtuvo el valor MCI. Todos los compuestos ciclopentenonas resultaron inactivos, con valores MCI superiores a 100  $\mu$ M.

**Ejemplo 8: Actividad citotóxica de los compuestos ciclopentenonas.**

5 Se determinó la actividad citotóxica en las líneas celulares HeLa (línea celular humana de cáncer de cérvix), Ishikawa (línea celular humana de cáncer de endometrio uterino), SW1573 (línea celular humana de cáncer epitelial pulmonar), T-47D (línea celular humana de cáncer de pecho), WiDr (Línea celular humana de cáncer de colon) y A549 (línea celular humana procedente del epitelio alveolar pulmonar). Las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con el 5% de suero fetal bovino (Gibco) y 2 milim de glutamina en un incubador a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire húmedo. Las células en crecimiento exponencial fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo que contiene 100 unidades de penicilina y 0,1 miligramos de estreptomina por mililitro. Se contó la suspensión celular con un porcentaje superior al 97% de viabilidad por la técnica de exclusión y de tinción Azul Tripán. Después del conteo, se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una concentración de 1x10<sup>4</sup> (para la línea celular SW1573), 1,5x10<sup>4</sup> (para las líneas celulares HeLa, Ishikawa y T-47D) y 2x10<sup>4</sup> (para la línea celular WiDr) células por pocillo. Los nueve compuestos DTA0043, DTA0255, DTA0256, DTA0260, DTA0261, DTA0265, DTA0267, DTA0268 y DTA0269 fueron testados por triplicado a diluciones de 1-10-100  $\mu$ M. El tratamiento de los compuestos en los cultivos celulares comenzó un día después de la siembra. El tiempo de incubación de los compuestos fue de 48 horas, tras el cual las células fueron precipitadas en 25  $\mu$ l de TCA al 50% w/v y fijadas durante 60 minutos a 4°C. Después se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan según el Ejemplo 6. La densidad óptica de cada pocillo se leyó a 492 nanómetros empleando el espectrofotómetro BioTek's PowerWave XS Absorbance Microplate Reader. El porcentaje de crecimiento (PG) fue calculado con respecto a las células control no tratadas (C) en cada una de las concentraciones de los compuestos basándose en la diferencia de la densidad óptica al comienzo (To) y al final (T) de la exposición de los compuestos, según las fórmulas descritas en A. Monks et al. ("Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines", J. Natl. Cancer Inst; 1991 (83): 757-766). Se empleó la fórmula  $PG = 100 \times [(T-To)/(C-To)]$  cuando T es mayor o igual a To, y la fórmula  $PG = 100 \times [(T-To)/(To)]$  cuando T es menor que To. La concentración a la

cual PG es +50, 0 y -50 representa, respectivamente, un 50% de inhibición del crecimiento (GI50), inhibición total del crecimiento (TGI) y 50% de muerte celular (LC50). Por tanto, un valor PG de 0 corresponde a la cantidad de células presente en el comienzo de la exposición al compuesto y valores negativos de PG denotan muerte celular neta. Todos los compuestos ciclopentenonas resultaron inactivos, con valores MCI superiores a 100  $\mu$ M.

**Ejemplo 9. Los compuestos ciclopentenonas disminuyen los efectos de LPS producidos en la línea celular A549.**

Se estimuló la línea celular A549 con 300  $\mu$ g/ml de LPS de *E. coli* en combinación con cada uno de los nueve compuestos preferibles de la invención a una dosis simple de 100  $\mu$ M. El tiempo de incubación de los compuestos fue de 18 horas, tras el cual las células fueron precipitadas en 25  $\mu$ l de TCA al 50% w/v y fijadas durante 60 minutos a 4°C. Después se llevó a cabo el ensayo colorimétrico descrito en Skehan et al citado en el Ejemplo 6. La densidad óptica de cada pocillo se leyó a 492 nanómetros empleando el espectrofotómetro BioTek's PowerWave XS Absorbance Microplate Reader y se determinó el porcentaje de supervivencia (PS) con respecto a las células no tratadas (control negativo) y las células tratadas con 300  $\mu$ g/ml de LPS de *E. coli* (control positivo,  $T_{LPS}$ ) de cada concentración de compuesto (T). Por tanto, el cálculo se desarrolló de la siguiente manera:  $PS = 100 \times [(T - T_{LPS}) / (C - T_{LPS})]$ . Con este cálculo, un valor de PS de 0 corresponde a células tratadas solamente con LPS de *E. coli* presente al final de la exposición, mientras valores positivos de PS denotan supervivencia celular neta. Los mejores resultados se alcanzaron con el compuesto DTA0043, que mostró valores de PS de 70%.

**Ejemplo 10: Cambios morfológicos celulares inducidos por las ciclopentenonas.**

Se realizaron nuevos ensayos para comprobar cambios morfológicos inducidos por todos los tratamientos. Para ello, se cultivó la línea celular A549 con 300  $\mu$ g/ml de LPS de *E. coli* sólo o en combinación con los nueve compuestos ciclopentenonas preferibles de la invención durante 18 horas y se visualizaron los cambios morfológicos inducidos con microscopio de contraste de fase (Olympus CK40, Tokyo, Japan). Todos los compuestos ensayados demostraron capacidad de disminuir los efectos de LPS producidos en la línea celular A549 (Figura 1). En la Figura 1 se muestra cómo el cotratamiento con el compuesto DTA0043 previno los

cambios morfológicos sufridos por las células A549 tras la incubación con 300 µg/ml de LPS de *E. coli*.

**Ejemplo 11: Determinación de los niveles de expresión de las proteínas TLR4, Iκβα, Bax, Bcl-2, WNT5A, no-p-β-Catenina (Ser33/37/Thr41) y MMP-7.**

Los niveles de expresión de la proteína TLR4, Iκβα, Bax, Bcl-2, WNT5A, no-p-β-Catenina (Ser33/37/Thr41), metaloproteinasa-7 (MMP-7) se midieron mediante Western Blot. Para ello, se realizó electroforesis de cada una de las muestras obtenidas de la extracción proteica de células A549 cultivadas o no en presencia de LPS *E. coli* sólo o en combinación con cada uno de los compuestos descritos en el Ejemplo 5 en geles de SDS-PAGE al 10% durante 2 horas. Después de ello, se realizó la transferencia de los geles SDS-PAGE en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón TBST (*Tris-buffered saline Tween-20*; Sigma-Aldrich®) más 10% de leche carente de contenido graso. Los anticuerpos anti-TLR4, anti-Iκβα, anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-WNT5A, anti-no-p-β-Catenina (Ser33/37/Thr41), anti-MMP-7 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) se incubaron durante 2 horas en TBST más 5% de leche carente de contenido graso. Después de la incubación durante 2 horas con el anticuerpo primario, se realizó la incubación durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (*Goat Anti-rabbit IgG-HRP*; Santa Cruz Biotechnology Inc.) Se llevó a cabo la detección de las bandas por sistema quimioluminiscente con el kit de GE Healthcare “Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent”. Posteriormente, se densitómetro cada banda proteica mediante el software público Scion Image. Cada Western Blot se realizó tres veces con las mismas condiciones experimentales. Para comprobar la homogeneidad de la carga proteica en cada uno de los pocillos, las mismas membranas PVDF se re-incubaron con el anticuerpo primario Beta-actina (Cell Signalling Technology) durante 2 horas y con el mismo anticuerpo secundario y las mismas condiciones experimentales de los anticuerpos anti-TLR4, anti-Iκβα, anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-WNT5A, anti-no-p-β-Catenina (Ser33/37/Thr41), anti-MMP-7. Todos los datos relacionados con la actividad anti-inflamatoria, anti-apoptótica y de prevención a la inducción de la fibrosis de los compuestos objeto de la presente invención son expresados como media de los resultados obtenidos para cada compuesto ± S.E.M. (“*Standard error of the mean*”) y los análisis estadísticos fueron llevados a cabo empleando análisis de la varianza (one-way ANOVA) corregido mediante Test de Bonferroni y empleando el software

SPSS (versión 15.0 para Windows). Para los análisis estadísticos de los ensayos Western Blot se empleó la misma metodología pero los datos fueron normalizados en función del control de carga proteica Beta-actina. Los efectos se consideraron significantes cuando  $p < 0,05$ .

5

La Figura 2 muestra según los ensayos de Western Blot que la expresión de la proteína TLR4 se incrementó de manera significativa bajo el tratamiento con LPS de *E. coli* ( $p < 0,001$ ), incremento que fue reducido bajo el cotratamiento de los compuestos derivados de ciclopentenonas de la invención comparado con el  
 10 tratamiento único de 300  $\mu\text{g/ml}$  de LPS de *E. Coli* durante 18 horas ( $p < 0,001$ ). También muestra que la expresión de la proteína I $\kappa$ B se redujo bajo el tratamiento con LPS de *E. coli* de manera significativa ( $p < 0,001$ ) y que estos compuestos produjeron un aumento en los niveles de expresión de la proteína I $\kappa$ B cuando se comparó este resultado con el tratamiento de LPS de *E. coli* ( $p < 0,001$ ), mostrando  
 15 que los compuestos derivados de ciclopentenonas podrían inhibir los efectos producidos por LPS de *E. coli* en la vía de señalización TLR4/ I $\kappa$ B.

La Figura 4 muestra según los ensayos de Western Blot que la expresión de la proteína Bax se incrementó de manera significativa bajo el tratamiento con LPS de  
 20 *E. coli* ( $p < 0,001$ ), incremento que fue reducido bajo el cotratamiento de los nueve compuestos ciclopentenonas preferibles comparado con el tratamiento único de 300  $\mu\text{g/ml}$  de LPS de *E. coli* durante 18 horas ( $p < 0,001$ ). También muestra que la expresión de la proteína Bcl-2 se redujo bajo el tratamiento con LPS de *E. coli* de manera significativa ( $p < 0,001$ ) y que estos compuestos produjeron un aumento en  
 25 los niveles de expresión de la proteína Bcl-2 cuando se comparó este resultado con el tratamiento de LPS de *E. coli* ( $p < 0,001$ ), mostrando que los compuestos ciclopentenonas podrían inhibir los efectos producidos por LPS de *E. coli* en la vía de señalización Bax-Bcl-2.

30 De forma similar, la Figura 5 muestra que el tratamiento con LPS de *E. coli* durante 18 horas incrementó de manera significativa los niveles proteicos de WNT5A ( $p < 0,001$ ) y no-p- $\beta$ -Catenina (Ser33/37/Thr41) ( $p < 0,01$ ). En cambio el cotratamiento de LPS de *E. coli* con los compuestos ciclopentenonas inhibieron los efectos producidos por LPS en los niveles proteicos de WNT5A ( $p < 0,001$ ), no-p- $\beta$ -Catenina  
 35 (Ser33/37/Thr41) ( $p < 0,05$ ), MMP-7 ( $p < 0,05$ ).

**Ejemplo 12: Los compuestos ciclopentenonas inhiben la apoptosis producida por LPS.**

Se empleó el kit de detección de la apoptosis basado en Anexina V-FITC (Beckton Dickinson Pharmingen™) y el citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson Pharmingen™) para medir la apoptosis temprana y la muerte celular acorde con las instrucciones del fabricante. Para estos ensayos, células A549 se cultivaron a una densidad de  $2 \times 10^6$  en medio DMEN suplementado con 2% FBS y 1% de antibióticos durante 24 horas. Seguidamente, las células se trataron durante 18 horas con o sin 300  $\mu\text{g/ml}$  LPS de *E. coli* sólo o en combinación de 100  $\mu\text{M}$  de los compuestos ciclopentenonas. Seguidamente a estos tratamientos, las células A549 fueron resuspendidas para incubación con 100  $\mu\text{l}$  de solución 1X compuesta de 0,1 M HEPES/NaOH (0,1 M, pH 7, 4), NaCl (1,4 M),  $\text{CaCl}_2$  (25 mM) vinculante donde se añadió 5  $\mu\text{l}$  de Anexina V-FITC y 5  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de la solución vinculante y la mezcla se analizó en el citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson Pharmingen™) usando un detector de señal FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) denominado FL1 y un fluorocromo de yoduro de propidio a 488 nanómetros denominado FL3, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los experimentos fueron repetidos por triplicado. Los datos fueron analizados acorde con 100.000 células como un porcentaje de apoptosis temprana acorde con esta fórmula:  $(\%) = \frac{\text{Anexina V-FITC}^+ \text{IP}^-}{\text{IP}^-}$  donde  $\text{IP}^- = \text{Anexina V-FITC}^- \text{IP}^- + \text{Anexina V-FITC}^+ \text{IP}^-$ . La tinción  $\text{Anexina V-FITC}^+ \text{IP}^+$  fue considerado como el porcentaje de apoptosis tardía y necrosis o muerte celular. Los datos se analizaron usando el software WinDI 2.8 (Scripps Institute). De la misma manera, para estudiar los cambios morfológicos inducidos por LPS se llevó a cabo la tinción del ADN nuclear mediante tinción denominada trihidro bis-Benzimida-cloruro (Hoechst 33258). Para ello se cultivó la línea celular A549 a una densidad de  $1 \times 10^6$  en medio de cultivo DMEN suplementado con el 2% FBS y el 1% de antibióticos durante 24 horas, para posteriormente tratarse durante 18 horas con o sin 300  $\mu\text{g/ml}$  LPS de *E. coli* sólo o en combinación con 100  $\mu\text{M}$  de los compuestos ciclopentenonas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron con solución salina PBS y se fijaron con el 4% de paraformaldehído disuelto en PBS a temperatura ambiente y durante 10 minutos. Después del proceso de fijación, las células se lavaron con solución salina PBS y se tiñeron con 80  $\mu\text{g/ml}$  de Hoechst en PBS a temperatura

ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Finalmente, los núcleos teñidos fueron visualizados bajo microscopio de fluorescencia (Leica DM2000) para la detección de los cambios morfológicos y para la realización del conteo del porcentaje de los núcleos apoptóticos en cada condición experimental. Se consideró célula apoptótica aquella que presentaba tres o más cuerpos apoptóticos y/o presentaba cromatina condensada en la periferia del núcleo. Basados en los ensayos de estudio de apoptosis empleando citometría de flujo y la tinción Anexina V-Ioduro de propidio, se cuantificaron los porcentajes de apoptosis en el total de las poblaciones celulares.

5

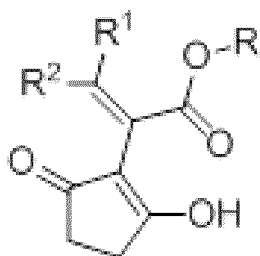
10 La Figura 3 muestra cómo, después de la incubación con 300 µg/ml de LPS de *E. coli* durante 18 horas, el porcentaje de apoptosis temprana y muerte celular (Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup> y Anexina V-FITC<sup>+</sup> IP<sup>+</sup>, respectivamente) estaban incrementados comparados con células control ( $p < 0,001$  en ambos casos, Figura 3b). Estos porcentajes de apoptosis fueron prevenidos mediante el co-tratamiento con los compuestos

15 ciclopentenonas descritos en la presente invención ( $p < 0,001$  en todos los casos). Estos hallazgos fueron completados mediante la tinción nuclear empleando la Bis-Benzimida mostrando núcleos fragmentados o “cuerpos apoptóticos” y cromatina condensada, características clásicas de células apoptóticas. Esta presencia de cuerpos apoptóticos y condensación de la cromatina nuclear fue prevenido mediante

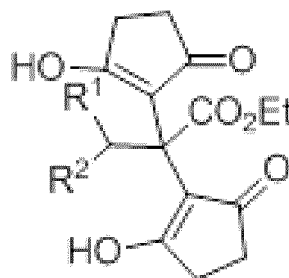
20 los cotratamientos de los compuestos ciclopentenonas objeto de la presente invención (Figura 3c y 3d). En las Figuras 3a y 3c se muestra el compuesto DTA0043 como representativo de la prevención del proceso apoptótico.

**Reivindicaciones**

1. Compuestos ciclopentenonas de fórmulas (I) o (II)



(I)



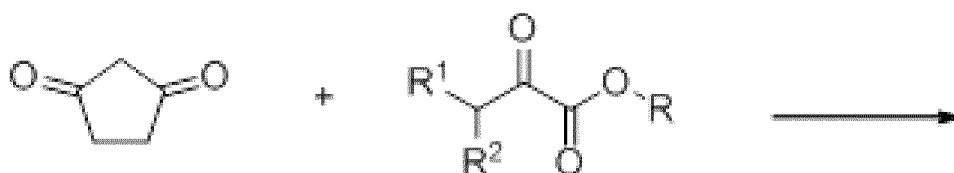
(II)

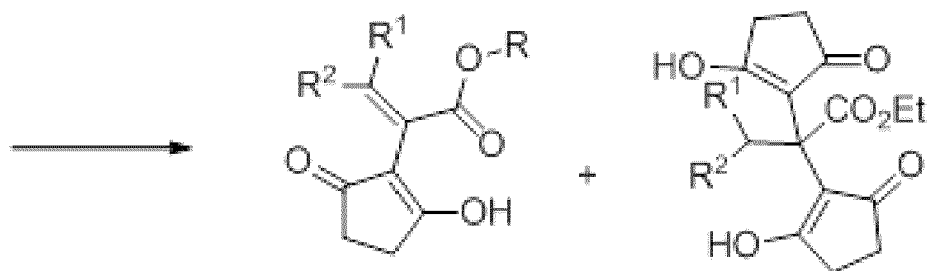
5

donde R, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son independientemente H o una cadena alquílica sustituida o no sustituida.

- 10 2. Compuestos ciclopentenonas según la reivindicación 1, caracterizados por que R es metilo o etilo.
3. Compuestos ciclopentenonas según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizados por que R<sup>1</sup> es H, metilo, bencilo, toliilo o dimetiléster.
- 15 4. Compuestos ciclopentenonas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados por que R<sup>2</sup> es H, metilo o bencilo.
5. Procedimiento de obtención de los compuestos ciclopentenonas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende hacer reaccionar 1,3-ciclopentanodiona con piruvato de metilo en presencia de trialquilamina como catalizador en un disolvente orgánico, según la reacción:

20





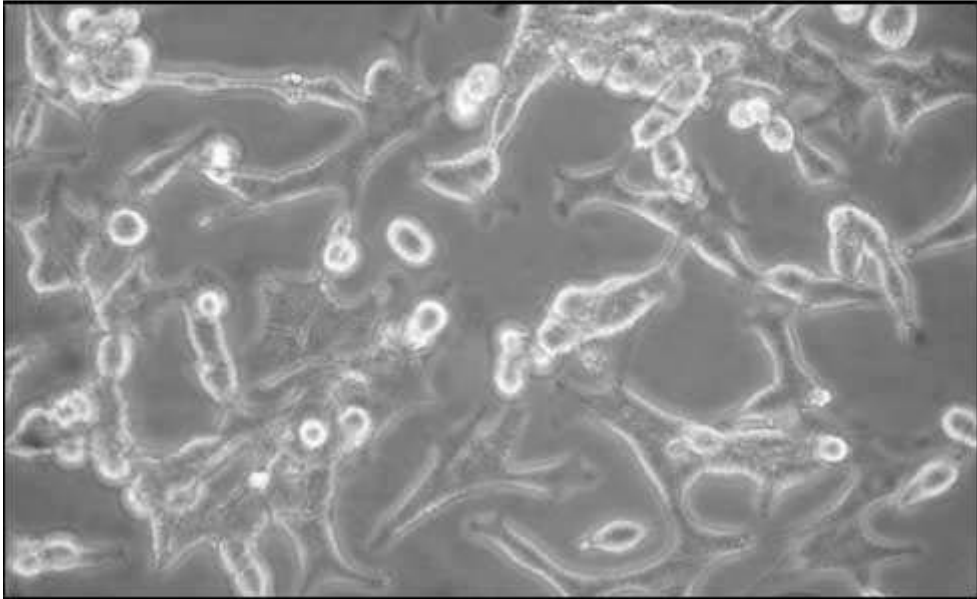
- 5
6. Un procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que dicha trialquilamina es trietilamina.
7. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizado por que dicho disolvente orgánico es diclorometano, tolueno o metanol, o sus mezclas.
- 10
8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que dicha reacción se realiza durante al menos 24 h a temperatura ambiente.
9. Uso de un compuesto ciclopentenona según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares.
- 15
10. Uso según la reivindicación 9, caracterizado por que dichos procesos apoptóticos y fibróticos se producen de forma simultánea a una sepsis.
11. Uso según una de las reivindicaciones 9 ó 10, caracterizado por que dicha sepsis comprende bacterias *E. coli*.
- 20
12. Compuesto ciclopentenona según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares.
13. Un compuesto para uso según la reivindicación 12, en que dichos procesos inflamatorios, apoptóticos y fibróticos se producen en presencia de una sepsis.
- 25
14. Un compuesto para uso según la reivindicación 13, en que dicha sepsis comprende bacterias *E. coli*.
15. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto ciclopentenona según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares.
- 30



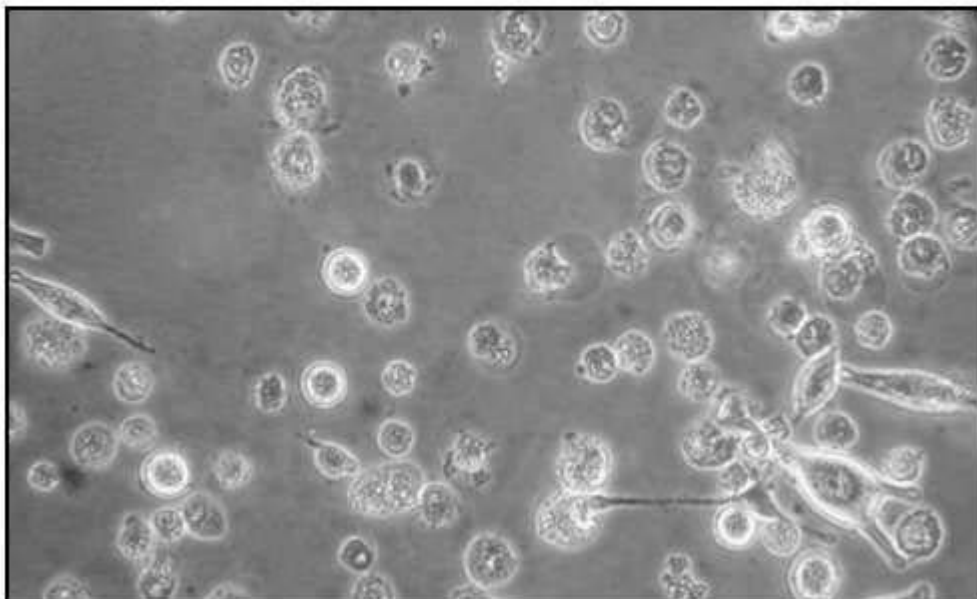
16. Una composición farmacéutica según la reivindicación 15, donde dicha enfermedad está seleccionada entre el grupo compuesto por una sepsis, una enfermedad pulmonar aguda inducida por sepsis, el síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis, shock endotóxico y peritonitis séptica.
- 5 17. Una composición farmacéutica según la reivindicación 15, donde dicha enfermedad está seleccionada entre el grupo compuesto por una sepsis, una enfermedad pulmonar aguda inducida por sepsis y el síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis.
- 10 18. Una composición farmacéutica según la reivindicación 15, donde dicha enfermedad es un trauma o un daño tisular.
- 15 19. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables y al menos otro agente terapéutico, para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que cursa con procesos apoptóticos y fibróticos celulares.
20. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, caracterizada por que se administra por vía intravenosa.
- 20 21. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, caracterizada por que se administra por vía oral, muscular y/o intramuscular.
22. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, caracterizada porque se presenta en una unidad de dosificación.

Figura 1

**C**



**C+**



# DTA0043

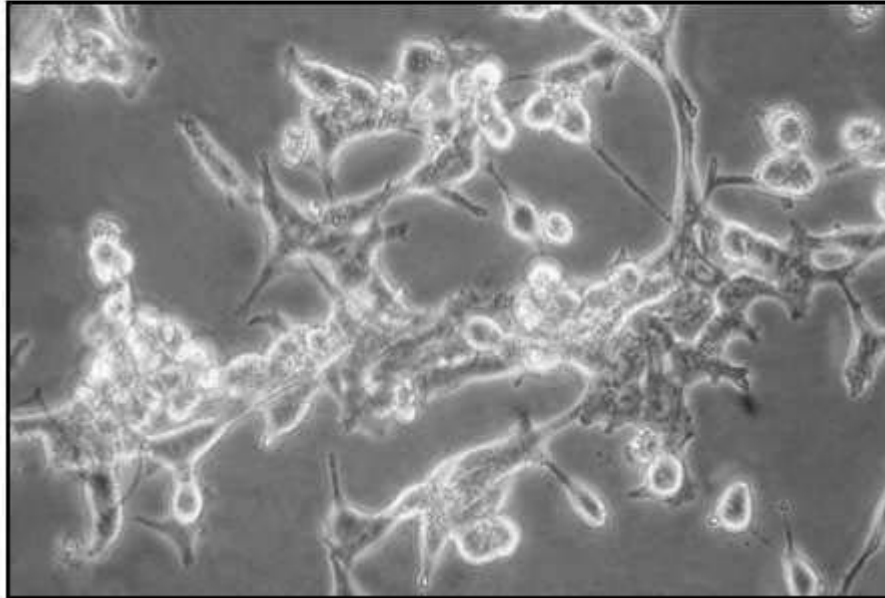
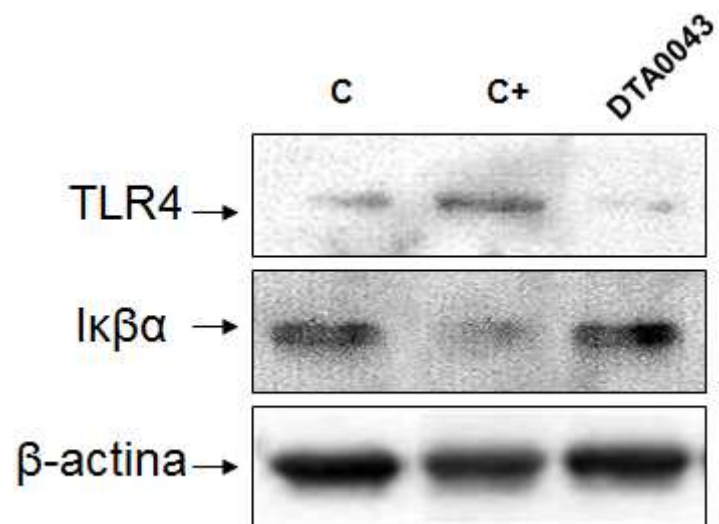


Figura 2

A



**B**

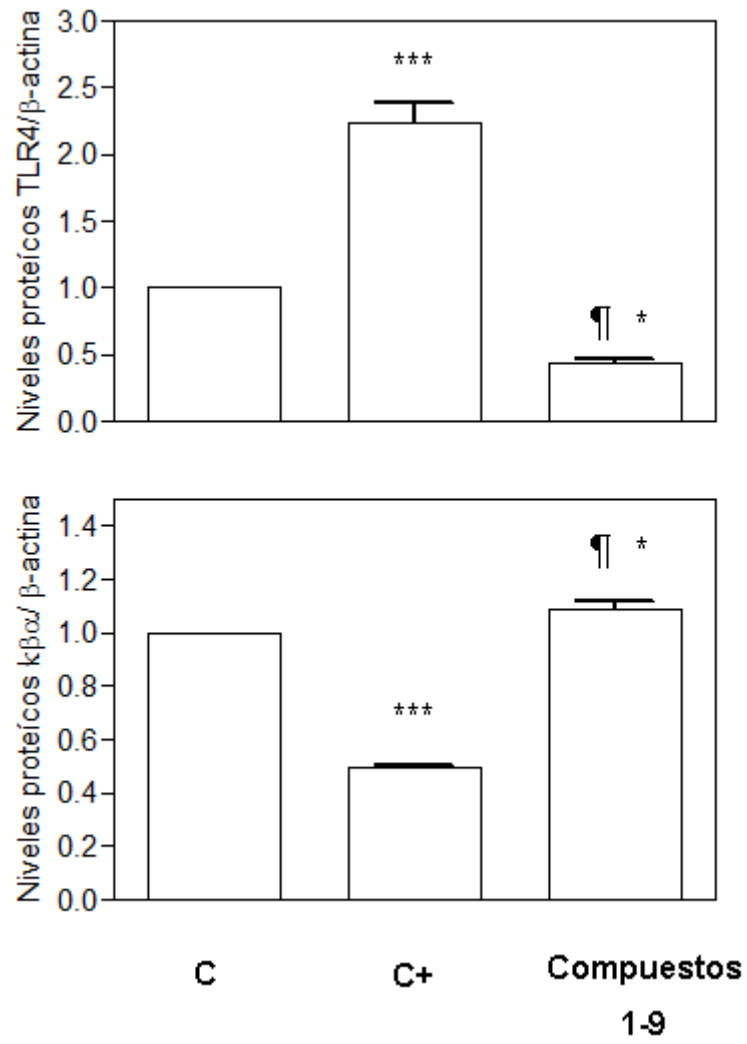
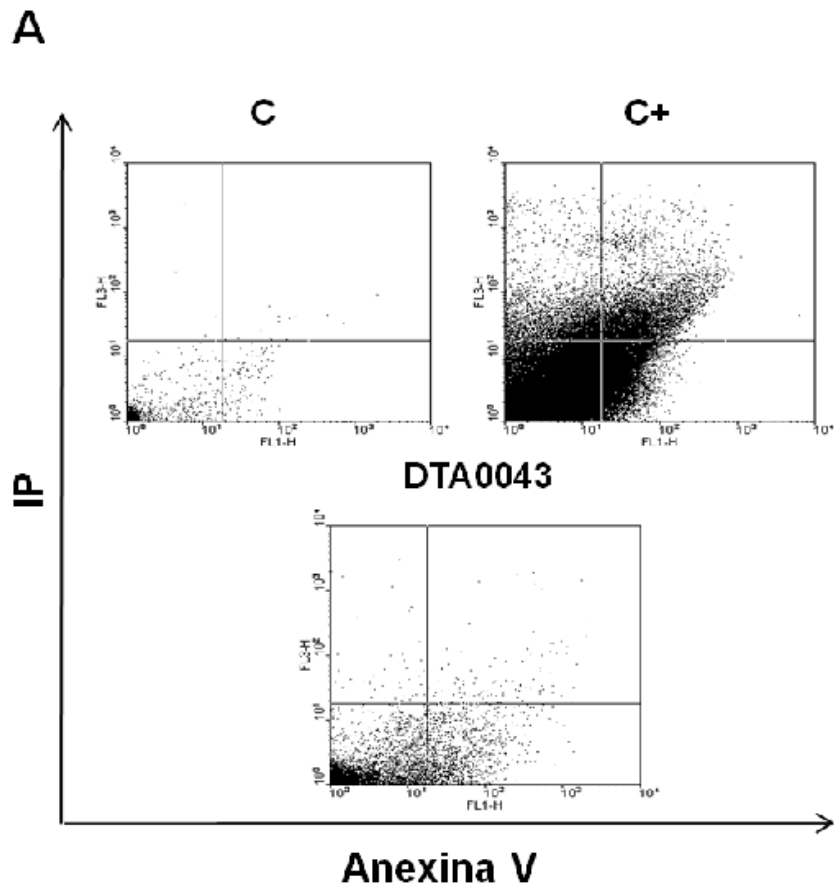
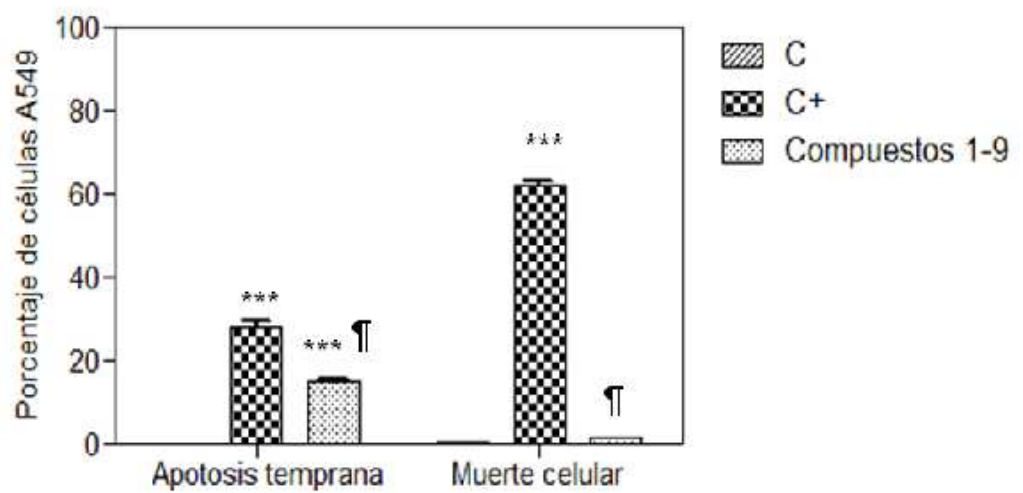
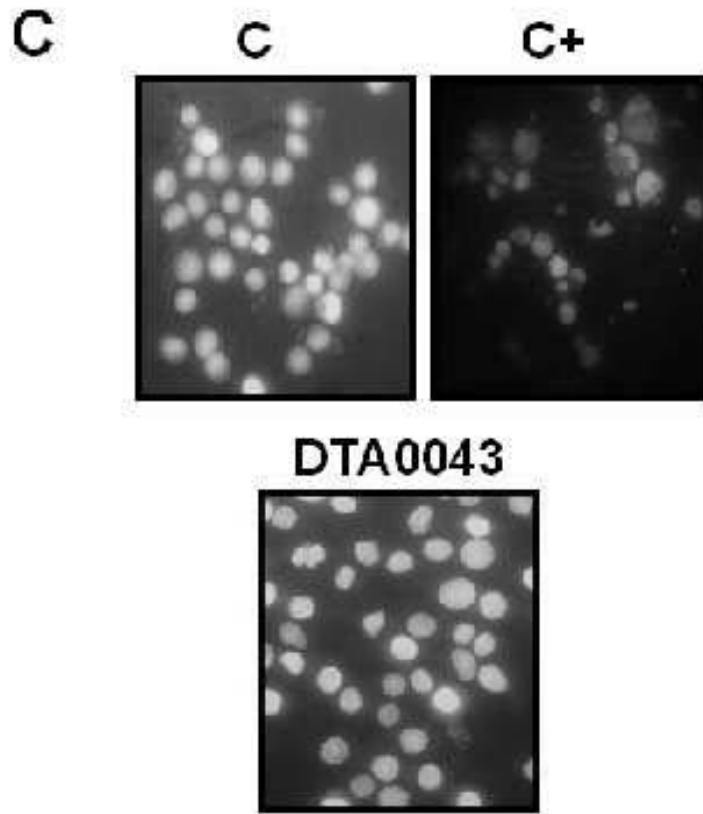


Figura 3



**B**





**D**

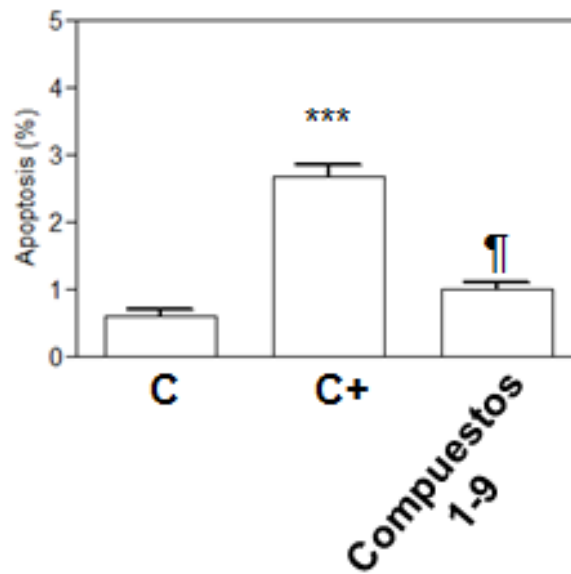
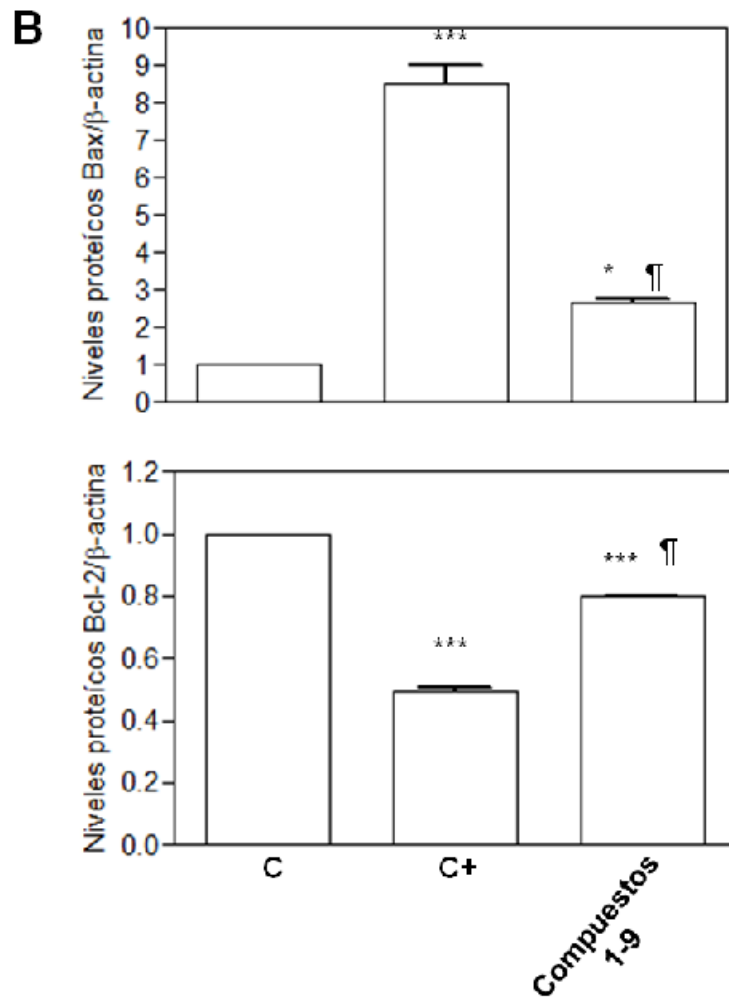
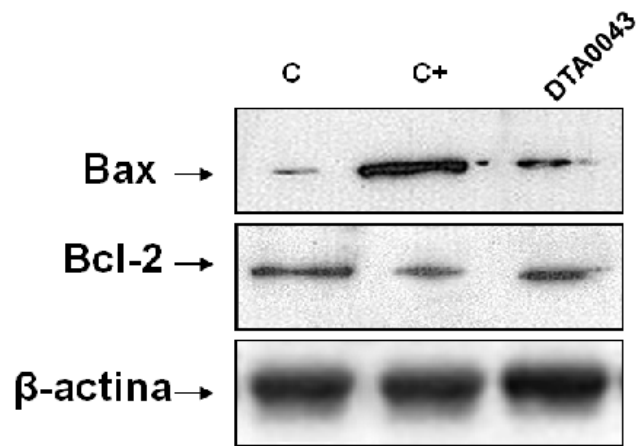


Figura 4

A



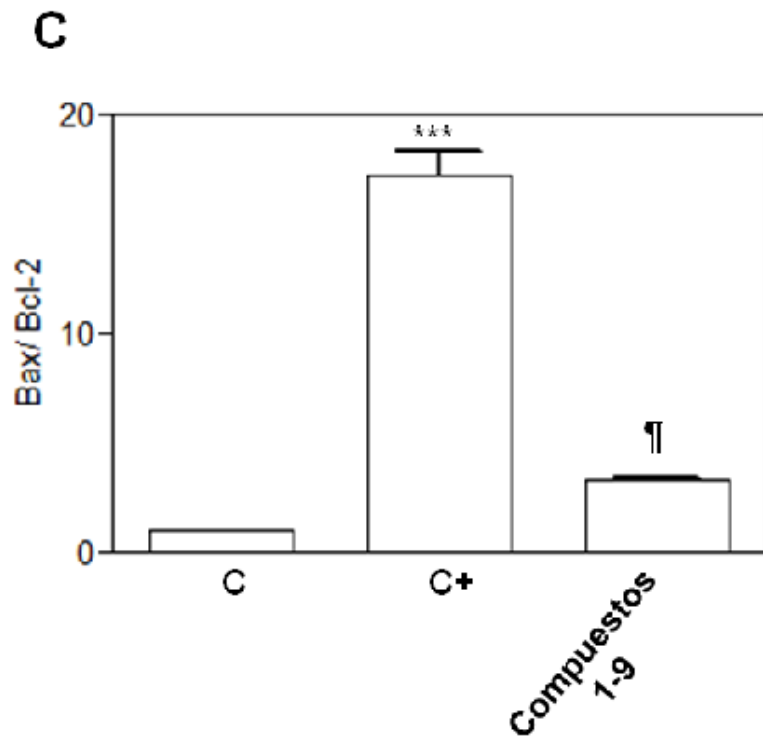
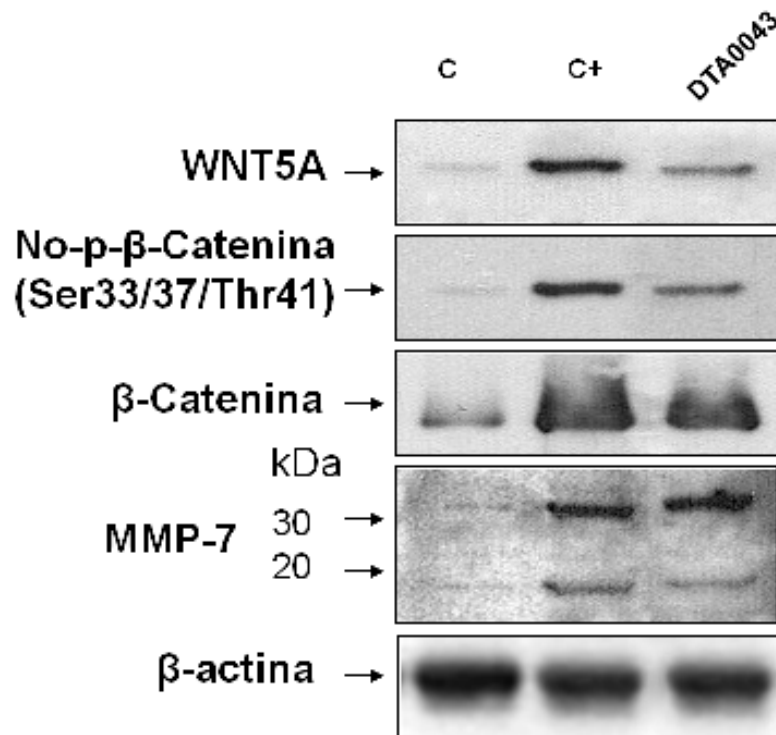


Figura 5

**A**





**B**

