

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 008 087**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/404** (2006.01)  
**A61K 31/407** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2022 PCT/EP2022/050657**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2022 WO22152800**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2022 E 22701338 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024 EP 4277620**

---

(54) Título: **Tetrahidro-espiroindolin-pirrolpirrol-trionas como inhibidores de la interacción NRF2-beta-TrCP para su uso en el tratamiento de esteatosis hepática**

(30) Prioridad:

**15.01.2021 EP 21382025**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.03.2025**

(73) Titular/es:

**FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA  
PRINCESA (5.00%)  
C/ Diego de León, 62.  
28006 Madrid , ES;  
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
(15.00%);  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (42.50%) y  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (37.50%)**

(72) Inventor/es:

**CUADRADO PASTOR, ANTONIO;  
FERNÁNDEZ GINÉS, RAQUEL;  
ENCINAR, JOSÉ ANTONIO;  
LEÓN MARTÍNEZ, RAFAEL;  
FRANCO GONZÁLEZ, JUAN FELIPE;  
GARCÍA LÓPEZ, MANUELA;  
RODRÍGUEZ FRANCO, MARÍA ISABEL y  
ROJO SANCHÍS, ANA ISABEL**

(74) Agente/Representante:

**MARTÍNEZ, Miguel Ángel**

**ES 3 008 087 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

Tetrahidro-espiroindolin-pirrolopirrol-trionas como inhibidores de la interacción NRF2-beta-TrCP para su uso en el tratamiento de esteatosis hepática

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, la presente invención se refiere a inhibidores de la interacción NRF2-βTrCP que conducen a un aumento moderado de los niveles de NRF2, dentro del intervalo fisiológico. Estos desestabilizadores moleculares se usan, según la presente invención, en el tratamiento de enfermedades relacionadas con NRF2 que se presentan con inflamación crónica y estrés oxidativo, que comprenden hepatopatía, preferiblemente esteatosis hepática.

10 **Estado de la técnica**

15 La respuesta inflamatoria desempeña un papel importante en la patología de la mayoría de las enfermedades, incluyendo el daño hepático, que conduce a un deterioro progresivo de las funciones metabólicas. En la práctica clínica, existe una gran cantidad de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) para aliviar el dolor y la inflamación. Sin embargo, los AINE tienen efectos secundarios adversos cuyo riesgo de aparición es mayor cuanto 20 mayor es la dosis y/o cuanto mayor es la duración en el tiempo. Entre los efectos secundarios no deseados que pueden producirse se incluyen irritación del tubo digestivo, hepatotoxicidad, hipertensión arterial, retención de líquidos, problemas renales, problemas cardíacos y/o exantemas.

25 Por tanto, existe una necesidad médica insatisfecha de encontrar otros compuestos que puedan realizar una función antiinflamatoria y citoprotectora sin mostrar los efectos secundarios descritos en el párrafo anterior, particularmente en el tratamiento de enfermedades relacionadas con NRF2 que se presentan con inflamación crónica y estrés oxidativo, que comprenden hepatopatía, preferiblemente esteatosis hepática.

30 Precisamente con el propósito de resolver este problema técnico, en la presente invención se han desarrollado compuestos con estas propiedades basándose en la activación del factor de transcripción NRF2 (factor nuclear derivado de eritroides 2) de tipo 2) por medio de una técnica completamente nueva que consiste en interrumpir su interacción con la proteína adaptadora de ligasa E3 denominada β-TrCP (ubiquitina proteína ligasa E3 que contiene repeticiones de beta-transducina). A diferencia de otras estrategias que activan NRF2, la desestabilización dirigida 35 de la interacción NRF2/βTrCP da como resultado una inducción moderada de sus funciones homeostáticas en el intervalo de actividad fisiológica.

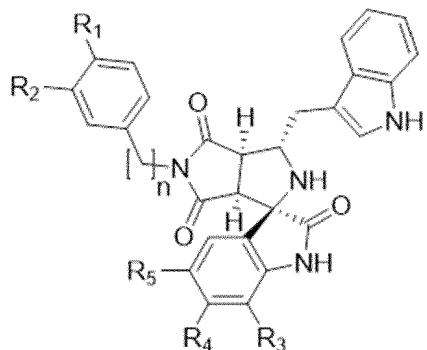
40 El documento WO 2020/160010 A1 (Flatley Discovery) divulga compuestos de 2',3',3a',6a'-tetrahidro-4'H-espiro[indolin-3,1'-pirrolo[3,4-c]pirrol]-2,4',6'-(5'H)-triona (SIPP) para su uso en el tratamiento de hepatopatía colestásica, entre otras, que difieren de los reivindicados en el presente documento en que carecen del resto CH2-3-indolilo. El documento WO 2016/201440 A1 (Universidad de California) divulga compuestos de SIPP para su uso en el tratamiento de hepatitis, entre otras. En la técnica se divulga un método *in vitro* para identificar compuestos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con NRF2 provocadas por lesión hepática inflamatoria, hepatitis y hepatopatías en general mediante la identificación de la modulación del eje de señalización GSK-3β/NRF2/β-TrCP (entre otros, en el dominio Neh6) (véanse Gunne *et al.*, Biomolecules, 2020, 10(12) 1688 (1-22) y Zhang *et al.*, Nat. Prod. Rep., 2020, 337(6), 797-826).

### **Descripción de la invención**

#### **Breve descripción de la invención**

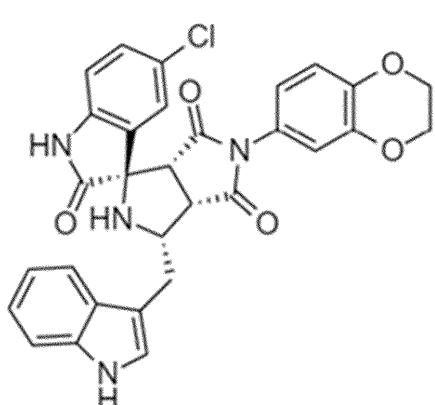
50 Tal como se indicó anteriormente, la presente invención se refiere a inhibidores de la interacción NRF2-βTrCP para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con NRF2 (véase la figura 1) que muestran inflamación crónica y estrés oxidativo, que comprenden hepatopatía, preferiblemente esteatosis hepática. La proteína βTrCP se une a NRF2 y la envía a degradación por la vía ubiquitina/proteasoma. Los compuestos de la presente invención impiden esta interacción y, por tanto, se impide la degradación de NRF2 a través de esta vía, dando lugar al mantenimiento de sus niveles funcionales y su actividad homeostática. Es importante destacar que esta invención no está relacionada con la alternativa ampliamente estudiada para la degradación de NRF2, basada en su unión con KEAP1. Esta invención es diferente en dos aspectos: a) esta invención se refiere a la desestabilización de NRF2/βTrCP que es un mecanismo diferente al de KEAP1/NRF2, y b) las moléculas objeto de esta invención inducen una activación más suave de NRF2 en comparación con los inhibidores de KEAP1/NRF2 ya descritos. Esto es de especial interés porque los inhibidores de KEAP1/NRF2 conducen a un exceso suprafisiológico de activación de NRF2 que puede desencadenar posibles efectos no deseados.

65 Por tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere a inhibidores de la interacción NRF2-βTrCP, en los que el inhibidor puede caracterizarse opcionalmente por la fórmula (I), o sus sales derivadas,

**I**

en la que:

- 5 • n puede ser 0 ó 1;
  - R<sub>1</sub> puede ser O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub> o un anillo de seis miembros para formar un sustituyente benzodioxano, benzometilendioxilo o naftaleno;
  - 10 • R<sub>2</sub> puede ser H o un anillo de seis miembros para formar un sustituyente benzodioxano, benzometilendioxilo o naftaleno;
  - R<sub>3</sub> puede ser H o CH<sub>3</sub>;
  - 15 • R<sub>4</sub> puede ser H o CH<sub>3</sub>; y
  - R<sub>5</sub> puede ser H, Cl o CH<sub>3</sub>,
- 20 para su uso en el tratamiento de esteatosis hepática. Por tanto, esta invención se centra particularmente en el tratamiento de hepatopatías asociadas con una inflamación crónica de bajo grado y su impacto en el desarrollo de esteatosis hepática y la progresión a fibrosis y cirrosis.
- 25 En un aspecto preferido de la invención, el inhibidor de la interacción NRF2-βTrCP se caracteriza por la fórmula (II) (a continuación en el presente documento, también denominado PHAR),

**II**

30 o sus sales derivadas.

- 30 El segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la interacción NRF2-βTrCP de fórmula I o II, o sales derivadas del mismo, y opcionalmente vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de esteatosis hepática. Alternativamente, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de esteatosis hepática que comprende la administración de una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el

inhibidor de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP de fórmula I o II, o sales derivadas del mismo.

El tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para identificar y producir compuestos para el tratamiento de esteatosis hepática, que comprende: a) determinar si ha tenido lugar la inhibición de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP por el compuesto candidato, y b) en el que si ha tenido lugar la inhibición de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP, es indicativo de que el compuesto seleccionado es eficaz en el tratamiento de esteatosis hepática.

Se han usado diferentes enfoques para determinar si el compuesto inhibe la interacción NRF2- $\beta$ TrCP:

10 1. Ensayo de cinasa *in vitro* y ubiquitinación *in vitro*. Para el reconocimiento y la degradación de NRF2 por  $\beta$ TrCP, es necesario que las serinas 335, 338, 342 y 347 ubicadas en el dominio Neh6 de NRF2 se fosforilen previamente por la cinasa GSK-3 $\beta$  (figura 1). Por tanto, para obtener el sustrato fosforilado, se usaron 20 ng de NRF2-DETGE recombinante junto con 0,5  $\mu$ g de GSK-3 $\beta$  recombinante incubados a 30 °C durante 60 min. El resultado se analizó mediante inmunotransferencia de tipo Western. Después de confirmar la existencia de fosforilación en los residuos de interés, se llevó a cabo un ensayo de ubiquitinación *in vitro* usando las proteínas recombinantes que constituyen el complejo de ubiquitina ligasa E3. La reacción de ubiquitinación se llevó a cabo usando: ATP (2 mM), ubiquitina (30 mM), E1 (1 mM), Cdc34b (5 mM), SCF- $\beta$ TrCP (450 nM) y NRF2 no fosforilado o fosforilado (20 ng), en un tampón de ubiquitinación específico (Tris 30 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ditioreitol 2 mM, NaCl 100 mM). Antes de las reacciones de ubiquitinación, los componentes E1, Cdc34b y ubiquitina se incubaron juntos durante 2 min para permitir que se formara el enlace tioéster E2. Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 25 °C en presencia o ausencia de PHAR (3  $\mu$ M) con el fin de determinar si PHAR inhibe o no la ubiquitinación por  $\beta$ TrCP. El resultado fue que, de hecho, PHAR impide la ubiquitinación de NRF2.

25 2. Se inhibe la vía de señalización PI3K/AKT y, por tanto, GSK-3 $\beta$  se activa con el inhibidor de PI3K, LY294002. Como resultado, NRF2 se fosforila por GSK-3 $\beta$  y se marca para su degradación por medio de la interacción con  $\beta$ -TrCP. Por tanto, si PHAR es capaz de inhibir la interacción  $\beta$ TrCP-NRF2, los niveles de NRF2 se mantendrán estables independientemente de la activación y fosforilación por GSK-3 $\beta$ . El resultado obtenido corrobora esto.

30 3. Usando silenciamiento lentiviral de las dos isoformas descritas para  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -TrCP1 y  $\beta$ -TrCP2) en MEF que se originan a partir de ratones con inactivación del gen Keap1 (Keap1<sup>-/-</sup>). Aunque el silenciamiento logrado no fue del 100 %, la inducción de NRF2 y HO-1 fue considerablemente menor en las células con  $\beta$ TrCP silenciada en comparación con las células shCTRL.

Para una mejor interpretación de la presente invención, se definen los siguientes términos:

35 • El término "esteatosis hepática" se refiere a una afección en la que se acumula un exceso de grasa hepática. Las complicaciones pueden incluir cirrosis, cáncer de hígado y várices esofágicas. Existen dos tipos principales de esteatosis hepática: esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatosis hepática alcohólica (ALD). La NAFLD está constituida por esteatosis hepática simple y esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Los principales riesgos incluyen el alcohol, la diabetes tipo 2 y la obesidad. Otros factores de riesgo incluyen determinados medicamentos tales como los glucocorticoides, y la hepatitis C. Algunas personas con NAFLD desarrollan esteatosis hepática simple y otras desarrollan NASH.

40 • El término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a, lo que sigue al término "que comprende". Por tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son obligatorios, pero que son opcionales otros elementos y pueden estar presentes o no.

45 • Se entiende que "consiste en" incluye y no se limita a todo lo que sigue a la expresión "consiste en". Por tanto, la expresión "consiste en" indica que los elementos enumerados son obligatorios, y que no puede haber otros elementos presentes.

50 • Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende la cantidad que, cuando se administra tal como se describe en este documento, produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que padece la enfermedad. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que esté tratándose, el modo de administración, y similares. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad "eficaz" adecuada en cada caso individual usando experimentación de rutina, basándose en la información proporcionada en el presente documento.

## 60 Descripción de las figuras

65 Figura 1. Estructura de NRF2. Se muestran los diferentes dominios de NRF2. Para proporcionar una visión general. Los motivos de baja afinidad y alta afinidad reconocidos por KEAP1 para interactuar con NRF2 se muestran en el dominio Neh2 pero no son el objeto de esta invención. Los restos para la interacción de GSK-3 $\beta$  y los sitios de fosforilación de una(s) cinasa(s) de sensibilización que se desconocen en la actualidad se muestran en el dominio Neh6, y esta es el área de actividad del presente desestabilizador de la interacción entre NRF2 y  $\beta$ TrCP.

Figura 2. Metodología computacional llevada a cabo en este estudio. Diagrama del experimento llevado a cabo para la identificación de nuevos candidatos a inhibidores de la interacción proteína-proteína de  $\beta$ -TrCP y NRF2.

Figura 3. PHAR se une específicamente a  $\beta$ -TrCP pero no a KEAP1. A) y B), estructura del complejo de  $\beta$ -TrCP (PDB:1P22) con la conformación de PHAR de energía libre más baja. Las figuras ilustran los restos de  $\beta$ -TrCP que participan en interacciones intermoleculares hidrófobas o electrostáticas, respectivamente, con pNRF2, en comparación con los restos para la interacción con PHAR.  $\beta$ -TrCP se muestra en una representación denominada diagrama en color. Código de color: amarillo: restos específicos para la interacción pNRF2/ $\beta$ -TrCP; magenta: restos específicos para la interacción PHAR/ $\beta$ -TrCP; azul: restos compartidos entre PHAR/pNRF2 y  $\beta$ -TrCP. C) y D), simulaciones de dinámica molecular de PHAR con respecto a las proteínas  $\beta$ -TrCP y KEAP1, respectivamente, en un tiempo de estudio de 100 ns.  $\beta$ -TrCP y KEAP1 se muestran en representación de superficie. E), mapa que muestra la interacción de los restos de  $\beta$ -TrCP que interactúan con pNRF2 y/o PHAR a lo largo de los 100 ns de la simulación de dinámica molecular. La distancia de interacción se representa mediante un código de color en el que el negro corresponde a los restos más cercanos y el amarillo a los más lejanos. F), propiedades de absorción química, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) de PHAR. PM: peso molecular; aceptores de H: aceptores de enlaces de hidrógeno; donadores de H: donadores de enlaces de hidrógeno; cLogS: logaritmo estimado (base 10) de solubilidad medida en mol/l; cLogP: logaritmo estimado (base 10) del coeficiente de reparto en n-octanol/agua; violaciones Ro5: violaciones de la regla de cinco de Lipinski; BHE: capacidad de penetración en la barrera hematoencefálica; permeab. de Caco-2: permeabilidad de Caco-2; e HIA: absorción intestinal humana se calcularon usando la aplicación web DataWarrior y la herramienta en línea ADMETsar.

Figura 4. PHAR activa la vía NRF2. Los MEF en condiciones de agotamiento de suero se sometieron a (A-C) 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M o 10  $\mu$ M de PHAR y 10  $\mu$ M de SFN como control positivo durante 16 h; o (D-F) 10  $\mu$ M de PHAR durante los tiempos indicados. En ambos experimentos se usó DMSO al 0,1 % como vehículo. A), inmunotransferencias representativas de NRF2, HO1, KEAP1, LAMINB y GAPDH como controles de carga. B) y C), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 y HO1 de las inmunotransferencias representativas en (A), expresados como razón de NRF2/LAMINB o HO1/GAPDH. Los datos se representan como medias  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). El análisis estadístico se realizó con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  frente a 0. D), inmunotransferencias representativas de NRF2, HO1, KEAP1, LAMINB y GAPDH como controles de carga. E) y F), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 y HO1 de las inmunotransferencias representativas de (D), expresados como razón de NRF2/LAMINB o HO1/GAPDH. Los datos se representan como medias  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). El análisis estadístico se realizó con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  frente a 0. G), las células indicadoras MCF-7 c32 ARE-luc se sometieron a 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M o 9  $\mu$ M de PHAR y 10  $\mu$ M de SFN como control positivo. Se usó DMSO al 0,1 % como vehículo. La actividad luciferasa se midió después de 16 h de tratamiento. Los datos se representan como medias  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). El análisis estadístico se realizó con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  frente a 0. H), ensayo MTT para evaluar la viabilidad/toxicidad celular después de los tratamientos. I) Los MEF privados de suero se sometieron a 10  $\mu$ M de PHAR. Los niveles de ARNm de *Hmox1*, *Nqo1*, *Aox1*, *Gclc* y *Gclm* después de 8 h de tratamiento se determinaron por medio de pRT-PCR y se normalizaron por medio del promedio de *LaminB*, *Gapdh* y  $\beta$ -actina. Los datos se representan como medias  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). El análisis estadístico se realizó con la prueba de la T de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  frente a 0.

Figura 5. La activación de NRF2 mediada por PHAR es independiente de KEAP1 y es responsable del aumento de la expresión de sus dianas. (A-D) Los MEF privados de suero que se originan a partir de ratones de tipo natural (WT) o nulos para KEAP1 (*Keap1*<sup>-/-</sup>) se trataron con 10  $\mu$ M de PHAR durante los tiempos indicados. Se usó DMSO al 0,1 % como vehículo. A), inmunotransferencias representativas de NRF2, HO1, KEAP1, LAMINB y GAPDH como controles de carga. B) y C), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 y HO1 de las inmunotransferencias representativas de (A), expresados como razón de NRF2/LAMINB o HO1/GAPDH. Los datos se representan como medias  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. D), los niveles de ARNm de *Hmox-1*, *Nqo1*, *Aox1*, *Gclc* y *Gclm* se determinaron después de 8 h de 10  $\mu$ M de PHAR por medio de qRT-PCR y se normalizaron por medio del promedio de *Gapdh*, *Tbp* y  $\beta$ -actina. Los datos se representan como medias  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  frente a 0 de MEF-WT. (E-H), los MEF privados de suero de ratones de tipo natural (WT) o nulos para NRF2 (*Nrf2*<sup>-/-</sup>) se sometieron a 10  $\mu$ M de PHAR durante los tiempos indicados. Se usó DMSO al 0,1 % como vehículo. E), inmunotransferencias representativas de NRF2, HO1, KEAP1, LAMINB y GAPDH como controles de carga. F) y G), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 y HO1 de las inmunotransferencias representativas de (E), expresados como razón de NRF2/LAMINB o HO1/GAPDH. Los datos se representan como medias  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  frente a MET WT. H), los niveles de ARNm de *Hmox-1*, *Nqo1*, *Aox1*, *Gclc* y *Gclm* se determinaron después de 8 h de 10  $\mu$ M de PHAR por medio de qRT-PCR y se normalizaron por medio del promedio de *Gapdh*, *Tbp* y  $\beta$ -actina. Los datos se

representan como medias ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 frente a MEF WT.

Figura 6. PHAR aumenta los niveles de proteína NRF2 de una manera dependiente de  $\beta$ -TrCP. A), fosforilación *in vitro* de NRF2-DETGE recombinante por GSK-3 $\beta$  recombinante. La fosforilación en los residuos 335, 338, 342 y 347 se analizó mediante Inmunotransferencia de tipo Western. B), ubiquitinación *in vitro* de NRF2 o pNRF2 por el complejo de  $\beta$ TrCP. NRF2 y pNRF2 (20 ng) se incubaron a 25 °C durante 1 h con ubiquitina purificada, E1/cdc34b,  $\beta$ TrCP/Skp1 y Cul1/Rbx1 tal como se indica en presencia o ausencia de PHAR (3 mM) o vehículo (DMSO). NRF2 sometido a poliubiquitinación se detectó mediante inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo anti-ubiquitina. C), en las mismas condiciones detalladas en B), se llevó a cabo una curva de dosis PHAR de (3-3000 nM) para fijar la dosis mínima a la que PHAR impide la poliubiquitinación de NRF2. Como control negativo se usó NRF2-DETGE-6S6A recombinante, en el que las 6 serinas que pueden fosforilarse para el dominio Neh6 se han mutado a alaninas. (D) y (E), los MEF privados de suero de ratones nulos para KEAP1 (*Keap1*<sup>-/-</sup>) se trajeron con 10  $\mu$ M de PHAR durante 60 min. Se usó DMSO al 0,1 % como vehículo. Luego se trajeron las células con 20  $\mu$ M de LY294002 durante los tiempos indicados. D), inmunotransferencias representativas de NRF2, pSer473-AKT, AKT, pS9-GSK3, GSK3, KEAP1 y GAPDH como controles de carga. E), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 de la inmunotransferencia representativa de (D), expresado como razón de NRF2/GAPDH. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparar las diferencias entre grupos. \*p < 0,05 frente a LY294002. Los MEF que se originan a partir de ratones *Keap1*<sup>-/-</sup> se transdijeron con un lentivirus que codifica para sh anti- $\beta$ -TrCP1/2 o shCTRL de ratón. Los MEF privados de suero se sometieron a 10  $\mu$ M de PHAR durante los tiempos indicados. Se usó DMSO al 0,1 % como vehículo. F), inmunotransferencias representativas de NRF2,  $\beta$ -CATENINA, HO1, KEAP1 y GAPDH como controles de carga. G), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 y HO1 de las inmunotransferencias representativas de (F), expresados como razón de NRF2 y HO1/GAPDH. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 frente a shCTRL. H) e I), los niveles de ARNm de  $\beta$ -TrCP1,  $\beta$ -TrCP2, *Hmox-1* y *Nqo1* se determinaron por medio de qRT-PCR y se normalizaron por medio del promedio de *Gapdh*, *Tbp* y  $\beta$ -actina. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \*\*\*p < 0,001 frente a shCTRL.

Figura 7. PHAR reduce la respuesta inflamatoria en células Raw264.7 estimuladas con LPS. Las células Raw264.7 privadas de suero se pretrataron con 10  $\mu$ M de PHAR durante 8 h. Se usó DMSO al 0,1 % como vehículo. Después de ese periodo de tiempo, las células se trajeron con 100 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados. A), inmunotransferencias representativas de NRF2, HO1, p65, pre-IL1 $\beta$ , COX2, NOS2 y GAPDH como control de carga. La punta de la flecha negra marca la banda específica de p65 y NOS2. B), análisis densitométrico de los niveles de proteína HO1 y NRF2 de las inmunotransferencias representativas de (A), expresados como razón de niveles de proteína/GAPDH. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparar las diferencias entre grupos. \*\*\*p < 0,001 frente a LPS. C), análisis densitométrico de los niveles de proteína pre-IL1 $\beta$ , COX2 y NOS2 de las inmunotransferencias representativas de (A), expresados como razón de niveles de proteína/GAPDH. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparar las diferencias entre grupos. \*\*\*p < 0,001 frente a LPS. D) y E), los niveles de ARNm de *Il1 $\beta$* , *Cox2*, *Nos2*, *Il6* y *Tnfa* se determinaron por medio de qRT-PCR y se normalizaron por medio del promedio de *Gapdh*, *Tbp* y  $\beta$ -actina. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \*\*\*p < 0,001 frente a LPS.

Figura 8. PHAR reduce la respuesta inflamatoria en macrófagos peritoneales que se originan a partir de ratones *Nrf2*<sup>+/+</sup>, pero no en macrófagos peritoneales que se originan a partir de ratones *Nrf2*-4K1 estimulados con LPS. Los macrófagos peritoneales que se originan a partir de ratones de tipo natural (WT) y con inserción génica de NRF2 privados de suero (*Nrf2*-4K1) se pretrataron con 10  $\mu$ M de PHAR durante 8 h. Se usó DMSO al 0,1 % como vehículo. Después de ese periodo de tiempo, las células se trajeron con 100 ng/ml de LPS durante 4 h. A), inmunotransferencias representativas, que se originan a partir de ambos tipos de células, de NRF2, HO1, pre-IL1 $\beta$ , COX2, NOS2 y GAPDH como control de carga. B), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 y HO1 de las inmunotransferencias representativas de (A), expresados como razón de niveles de proteína/GAPDH. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparar las diferencias entre grupos. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 frente a LPS. C), análisis densitométrico de los niveles de proteína pre-IL1 $\beta$ , COX2 y NOS2 de las inmunotransferencias representativas de (A), expresados como razón de niveles de proteína/GAPDH. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparar las diferencias entre grupos. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 frente a LPS. D), los niveles de ARNm de *Hmox1*, *Il1 $\beta$* , *Cox2*, *Nos2*, *Il6* y *Tnfa* se determinaron por medio de qRT-PCR y se normalizaron por medio del promedio de *Gapdh*, *Tbp* y  $\beta$ -actina. Los datos se representan como medias ± EEM

(n = 3). El análisis estadístico se realizó con ANOVA bidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 frente a LPS.

Figura 9. PHAR activa NRF2 y HO-1 en el hígado. A), espectro UV y EM derivado del análisis por HPLC-EM de PHAR disuelto en metanol para la identificación de picos asociados con el compuesto. Un rectángulo azul rodea la masa asociada con PHAR. (B-D), los ratones se trataron con el vehículo (Tween-80 + PBS, 1:13), 50 mg/kg de PHAR, o 50 mg/kg de SFN (solución salina) como control positivo por medio de inyección intraperitoneal (i.p.) durante 2 horas. B), espectros de UV y EM del análisis por HPLC-EM derivados de muestras de hígado representativas de ambos grupos experimentales usados para determinar los niveles de PHAR en el hígado 10 120 minutos después de una única inyección i.p. de 50 mg/kg. Un rectángulo azul rodea la masa asociada con PHAR. C), inmunotransferencias representativas que muestran los niveles de proteína NRF2, HO1 y LAMINB como control de carga de extracto de hígado. D), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 de las inmunotransferencias representativas mostradas en (C), expresados como razón de NRF2/LAMINB. El análisis estadístico se realizó con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparar las diferencias entre grupos. \*\*\*p < 0,001 frente al vehículo. E) y F), los ratones se trataron diariamente con vehículo (Tween-80 + PBS, 1:13) o 50 mg/kg de PHAR por medio de inyección intraperitoneal durante 5 días. E), inmunotransferencias representativas que muestran los niveles de proteína NRF2, HO1 y LAMINB como control de carga en cerebro, hígado y riñón. F), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 y HO1 en el tejido hepático de las inmunotransferencias representativas mostradas en (E), expresados como razón de niveles de NRF2/LAMINB o HO1/LAMINB. El análisis estadístico se realizó con una prueba de la t de Student para comparar las diferencias entre grupos. \*\*p < 0,01 frente al vehículo.

Figura 10. El tratamiento prolongado con PHAR en ratones no produce toxicidad. Se evaluó un perfil de seguridad preliminar del tratamiento con PHAR en ratones de control de 7 a 10 meses de edad y tratados con estreptozotocina (STZ). Estos ratones se sometieron a una dosis i.p. diaria de 40 mg/kg de vehículo (VEH; Tween-80:PBS, 1:13), o PHAR durante 5 días a la semana durante 4 semanas. A), evolución del peso durante las semanas de tratamiento. (B-E), análisis sérico de los niveles de albúmina (B), proteína total (C) y transaminasas hepáticas, aspartato transaminasa, AST (D), y alanina transaminasa, ALT (E). Los intervalos de valores normales se resaltan con una línea discontinua verde. El número de individuos por grupo se refleja en los gráficos.

Figura 11. PHAR reduce la respuesta inflamatoria en ratones tratados con LPS. Los ratones se dividieron en 4 grupos experimentales (n = 4). Los grupos experimentales 1 y 3 se trataron por vía i.p. con vehículo (Tween-80 + PBS, 1:13) y los grupos experimentales 2 y 4 con 50 mg/kg de PHAR durante 5 días. Después de la penúltima administración del compuesto, los grupos 3 y 4 se trataron por vía i.p. con 1 mg/kg de LPS durante 24 h. Dos horas 30 después de la última dosis de PHAR y veinticuatro horas después de la administración de LPS, todos los ratones fueron sacrificados extrayendo la proteína hepática y el ARN total. A), inmunotransferencias representativas que muestran los niveles de proteína NRF2, HO1 y GAPDH como control de carga de extracto de hígado. B), análisis densitométrico de los niveles de proteína NRF2 y HO1 de las inmunotransferencias representativas mostradas en (A), expresados como razón de NRF2/GAPDH o HO1/GAPDH. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 4). El análisis estadístico se realizó con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparar las diferencias entre grupos. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 frente al vehículo. C), los niveles de ARNm de *I1β*, *I16* y *Tnfa* se determinaron por medio de qRT-PCR y se normalizaron por medio del promedio de *Gapdh*, *Tbp* y *β-actina*. Los datos se representan como medias ± EEM (n = 4). El análisis estadístico se realizó con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para verificar las diferencias entre grupos. \*\*\*p < 0,001 frente a LPS. D), imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de hígado de ratón y tinción inmunohistoquímica con F4/80 de macrófagos hepáticos inflamatorios (células de Kupffer). Obsérvese la reducción en la tinción con F4/80 en los ratones tratados con LPS+PHAR en comparación con los ratones tratados con LPS.

Figura 12. PHAR disminuye la respuesta inflamatoria en ratones sometidos a esteatosis hepática en el modelo STAM. El modelo STAM se basa en la inducción de esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) generada por la inyección subcutánea de estreptozotocina (STZ) en ratones C57BL/6J neonatos (de 2-5 días de edad) seguida de una dieta de alto contenido en grasas administrada a partir de las 4 semanas de edad. En este caso, los ratones se trataron en el estadio de esteatosis (semana 6), 5 días a la semana con una administración i.p. de 50 mg/kg con el fin de analizar si PHAR impide la progresión al siguiente estadio (NASH). A), tinción con H&E del hígado de ratones STAM tratados con PHAR y sin tratar. Se usó tinción histoquímica de lípidos con rojo de aceite para visualizar la cantidad de grasa hepática. B), cuantificación normalizada de la cantidad de grasa hepática por ratón, medida mediante resonancia magnética, el último día de tratamiento. C), perfiles de IRM representativos de un hígado de ratón de cada grupo. El pico que aparece con una frecuencia aproximada de 4,7 ppm corresponde a la molécula de agua (la mayor parte), mientras que el resto de picos dan información sobre la cantidad de grasa hepática. La razón de la suma de los picos de grasa con respecto al agua indica el contenido total de grasa hepática. D), niveles de ARNm de varios genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos (*Cpt1a*, *Scd1*, *Cd36* y *Fasn*). E), los niveles de ARNm de las citocinas proinflamatorias (*Tnf*, *I16* e *Infg*) y antiinflamatorias (*I110* e *I14*) se determinaron mediante qRT-PCR y se normalizaron por el promedio de *Gapdh*, *Tbp* y *β-actina*. El análisis estadístico se realizó usando una prueba de la t de Student para comparar las diferencias entre ratones tratados con PHAR frente a ratones tratados con vehículo. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Figura 13. PHAR ralentiza la progresión de la esteatosis hepática. El daño progresivo de las células hepáticas como consecuencia de su alteración metabólica y de la inflamación crónica de bajo grado conduce a su progresión hacia la fibrosis y la consecuente pérdida de función hepática. La presente invención permite tratar a pacientes diagnosticados con esteatosis hepática para impedir su progresión hacia formas más graves de hepatopatía tales como fibrosis y cirrosis. A), esquema del modelo de progresión de daño hepático. B), espectros representativos derivados de estudios de IRM. En el punto de partida (semana 8; S8, inflamación por NASH), los ratones sometidos al protocolo STAM tenían esteatosis hepática que imitaba el estado de los pacientes recién diagnosticados. En este punto, se inició el tratamiento con PHAR (50 mg/kg i.p.; 5 días por semana) hasta la semana 10 (S10, fibrosis). C), cuantificación normalizada de la cantidad de grasa hepática por ratón medida mediante IRM. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA bidireccional seguido de una prueba de Bonferroni para comparar las diferencias entre los tratamientos en los grupos de control y STAM. \*\* p < 0,01. D), perfiles de evolución de la cantidad de grasa hepática por ratón medida mediante IRM en la semana 8 (NASH) y semana 10 (fibrosis). E), análisis histoquímico con H&E de ratones tratados con PHAR frente a vehículo en ratones de control y en ratones STAM junto con tinción con rojo de aceite para la determinación de los niveles de grasa hepática. F), niveles de transcritos correspondientes al metabolismo de ácidos grasos (*Cpt1a*, *Scd1*, *Cd36* y *Fasn*). G), niveles de transcritos correspondientes a citocinas proinflamatorias (*Tnf*, *Il6* e *Infg*) y antiinflamatorias (*Il10* e *Il4*). Para F y G, los niveles de ARNm relativos se determinaron mediante qRT-PCR y se normalizaron promediando *Gapdh*, *Tbp* y  $\beta$ -actina. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA bidireccional seguido de una prueba de Bonferroni para comparar las diferencias entre los ratones tratados con PHAR frente a los ratones tratados con vehículo en los modelos de control y STAM. \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se ilustra por medio de los siguientes ejemplos sin intención de limitar el alcance de protección de la invención.

##### Ejemplo 1. Resultado

###### Ejemplo 1.1. Búsqueda computacional de inhibidores de la interacción $\beta$ -TrCP/NRF2

Con el fin de encontrar moléculas capaces de interrumpir específicamente la interacción  $\beta$ -TrCP-NRF2, se llevó a cabo un análisis virtual por medio de herramientas de modelado molecular y dinámica molecular basándose en la similitud estructural de 388.503 compuestos naturales obtenidos de las bibliotecas de compuestos "ZINC natural products" y "National Center for Biotechnology Information (NCBI) PubChem database" (figura 2).

Para este estudio *in silico*, se usó la estructura cristalográfica PDB:1P22 de  $\beta$ -TrCP que está publicada en la base de datos Protein Data Bank y complejada con Skp1- $\beta$ -catenina. La preparación y edición 3D específica de  $\beta$ -TrCP se realizó usando la herramienta Pymol software v 2.3.3, obteniendo así la molécula de  $\beta$ -TrCP libre de Skp1 y  $\beta$ -catenina. El presente grupo ha caracterizado previamente los restos más relevantes en el sitio de interacción entre el dominio WD40 de  $\beta$ -TrCP y el fosfodegrón generado por GSK-3 $\beta$  en el dominio Neh6 de NRF2. Este sitio de interacción de NRF2 se usó para identificar los compuestos que tenían la mayor afinidad teórica por  $\beta$ -TrCP. En este estudio, se ha usado la herramienta AutoDock Vina que incorpora métodos de algoritmos genéticos evolutivos y lamarckianos, entre otros, permitiendo modelar la flexibilidad del ligando, mientras se mantiene la rigidez del receptor. Adicionalmente, además de su eficacia teórica para inhibir la interacción  $\beta$ -TrCP-NRF2, se analizaron las propiedades ADMET (absorción, biodistribución, velocidad de metabolización, excreción y toxicidad) usando el software DataWarrior y la herramienta en línea ADMETsar.

Basándose en los datos obtenidos a partir del modelado molecular, se seleccionaron 215 compuestos basándose en su energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), cumpliendo el criterio de  $\leq -9,5$  kcal/mol. Luego se eliminaron aquellos compuestos con propiedades ADMET fuera de los intervalos óptimos establecidos. Por último, debido a la alta homología estructural entre los 86 candidatos seleccionados, se agruparon en 39 grupos que tenían al menos un 70 % de homología.

Dado que el modelado molecular mediante AutoDock Vina sólo proporciona una idea estática de la interacción, para afinar la selección de los mejores candidatos teóricos, se llevan a cabo modelos teóricos de dinámica molecular usando el software YASARA. El propósito es verificar si las interacciones establecidas por los compuestos seleccionados en la primera parte del procedimiento con  $\beta$ -TrCP son estables durante el tiempo de estudio específico (100 ns). Basándose en estos resultados, se obtuvieron 4 candidatos (que representan 4 grupos con una homología diferente) con capacidad teórica para establecer interacciones estables con  $\beta$ -TrCP a lo largo del tiempo de estudio.

Al analizar los parámetros computacionales obtenidos para PHAR (figura 3), los resultados del modelado molecular mostraron que el compuesto se une a  $\beta$ -TrCP con un valor teórico de  $\Delta G = -10,35$  kcal/mol. Usando la orientación de PHAR con la energía libre más baja derivada del modelado molecular, se estudiaron con detalle las interacciones que establece el compuesto con restos de  $\beta$ -TrCP, estableciendo como criterio de selección una distancia inferior o

igual a 3,5 Å (figuras 3A y 3B). El propósito fue permitir la evaluación de la capacidad del compuesto para interrumpir las interacciones  $\beta$ -TrCP-fosfo-NRF2 (pNRF2). Los restos de  $\beta$ -TrCP de interés implicados en las interacciones hidrófobas con pNRF2 son: Arg521, Phe523, Tyr271, Arg474, Ala434, Asn394 y Leu351. Mientras tanto, las interacciones electrostáticas implican a los siguientes restos de  $\beta$ -TrCP: Arg285, Ser325, Lys365, Tyr438, Arg431, 5 Asn394 y Gly408. Tal como se muestra en la figura 3A, PHAR establece interacción con la mayoría de los restos implicados en la interacción hidrófoba pNRF2- $\beta$ -TrCP, con la excepción de Tyr271. Por el contrario, PHAR sólo pudo inhibir la interacción con Ser448, implicada en interacciones electrostáticas. Cabe señalar que PHAR es capaz de establecer interacción con más restos de  $\beta$ -TrCP distintos de los enumerados anteriormente (magenta, figuras 3A y 3B). Esto puede suponer la ventaja de ocupar más espacio en el sitio donde interactúa con pNRF2, complicando su 10 capacidad de unión.

A su vez, tal como se muestra en la figura 3C, el análisis de dinámica molecular mostró que la interacción con  $\beta$ -TrCP, establecida por PHAR, es estable durante al menos 100 ns. Por el contrario, la figura 3D muestra cómo la interacción que establece con KEAP1 es inestable dado que el compuesto abandona el sitio de unión durante este 15 tiempo. Nuevamente, el análisis a largo plazo de los restos interactantes corroboró, por medio de dinámica molecular, que PHAR interactúa con muchos de los restos implicados en la interacción pNRF2/ $\beta$ -TrCP, tales como: Asn394, Gly408, Arg431, Gly432, Ser448, Leu472, Arg474, Phe523 (figura 3E). Con respecto a las predicciones de ADMET (figura 3F), PHAR está dentro de los intervalos óptimos correspondientes a la regla de Lipinski.

20 Por tanto, el análisis computacional muestra que, de hecho, PHAR puede interactuar con  $\beta$ -TrCP, pero no con KEAP1, en los restos clave del sitio de unión de NRF2, y puede así competir con la unión de NRF2 a  $\beta$ -TrCP.

#### Ejemplo 1.2. PHAR activa la vía de señalización mediada por NRF2

25 Con el fin de determinar empíricamente si PHAR activa NRF2, se trataron fibroblastos de embrión de ratón (MEF) con varias dosis del compuesto (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M y 9  $\mu$ M) durante 16 h y con 10  $\mu$ M de sulforafano (SFN), uno de los principales activadores electrófilos de NRF2, usado como control positivo. PHAR indujo la acumulación de NRF2, aunque en una medida ligeramente menor que la acumulación inducida por SFN. Esta acumulación de NRF2 se reflejó en un aumento, principalmente con la dosis de 9  $\mu$ M, de los niveles de una de sus dianas mejor 30 caracterizadas: hemooxigenasa-1 (HO-1) (figuras 4A, 4B y 4C).

Además, se realizó un estudio temporal de la activación de NRF2 con PHAR (10  $\mu$ M durante 2, 4 y 8 h) o con SFN (10  $\mu$ M, 8 h) como control positivo. PHAR indujo la acumulación de NRF2 2 h después del tratamiento, que fue 35 similar a la inducción generada por SFN. Dicha acumulación se correlacionó con el aumento de los niveles de HO-1 después de 8 h (figuras 4D, 4E y 4F).

Finalmente, se corroboró la actividad transcripcional de NRF2 por medio de ensayos de luciferasa usando la línea 40 celular indicadora MCF-7 c32 ARE-LUC. Se observa que PHAR (9  $\mu$ M, 16 h) produce un aumento de ~4 veces de la actividad luciferasa, similar al obtenido con el control positivo (SFN, 9  $\mu$ M, 16 h) (figura 4G). La viabilidad celular asociada al tratamiento, evaluada por medio de un ensayo MTT, demostró que el compuesto no presenta toxicidad 45 en ninguna de las dosis usadas (figura 4H). Finalmente, se corroboró dicha actividad transcripcional en MEF por medio de la evaluación de los niveles de expresión de varios genes regulados por NRF2 después del tratamiento con PHAR (10  $\mu$ M, 8 h). Las dianas analizadas fueron *Hmox1*, *Nqo1*, *Aox1*, *Gclc* y *Gclmy*, observándose un aumento en los transcriptos correspondientes en todos los casos (figura 4I).

45 En conjunto, estos resultados indican que PHAR estabiliza los niveles de NRF2 y, como resultado, aumenta la expresión de sus genes diana.

#### Ejemplo 1.3. PHAR activa el eje NRF2/HO-1 independientemente de KEAP1

50 Desde un punto de vista de utilidad biofarmacéutica, es importante determinar si PHAR actúa sobre la interacción KEAP1/NRF2 o si, por el contrario, representa un nuevo enfoque dirigido específicamente a la interacción  $\beta$ -TrCP/NRF2. Para este propósito, se usaron MEF que se originaron a partir de ratones con inactivación del gen 55 *Keap1* (*Keap1<sup>-/-</sup>*) y de tipo natural (*Keap1<sup>+/+</sup>*) de la misma camada (figuras 5A, 5B, 5C y 5D). La inducción de NRF2 y HO-1 fue similar en ambas líneas celulares tratadas con PHAR (10  $\mu$ M, 2, 4 y 8 h) (figuras 5A, 5B y 5C). Se obtuvo el mismo resultado al analizar los niveles de ARNm de otras dianas de NRF2 (figura 5D). Como control adicional, se analizaron mediante inmunotransferencia los niveles de HO-1 en MEF que se originaron a partir de ratones con inactivación del gen *Nrf2* (*Nrf2<sup>-/-</sup>*) y de tipo natural (*Nrf2<sup>+/+</sup>*) de la misma camada. Ambos tipos de células se incubaron con PHAR (10  $\mu$ M, 2, 4 y 8 h). Los MEF que se originaron a partir de ratones *Nrf2<sup>+/+</sup>* mostraron un aumento 60 significativo de HO-1 que no se observó en los MEF que se originaron a partir de ratones *Nrf2<sup>-/-</sup>* (figuras 5E y 5G), lo que indica que NRF2 es esencial para la inducción de HO-1 por PHAR. Se obtuvo el mismo resultado al analizar los niveles de ARNm de varias dianas de NRF2 en ambos tipos de células (figura 5H). Por tanto, PHAR induce NRF2 independientemente de KEAP1 y dicha activación es responsable del aumento de la expresión de sus genes diana.

#### Ejemplo 1.4. PHAR bloquea la interacción $\beta$ -TrCP/NRF2

Estudios *in silico* sugirieron que PHAR aumenta los niveles de NRF2 por medio de la inhibición de la interacción NRF2- $\beta$ -TrCP. Para confirmarlo, en primer lugar se realizó un ensayo de ubiquitinación *in vitro* para ver si PHAR impide la ubiquitinación de NRF2 por  $\beta$ -TrCP. Para que  $\beta$ -TrCP pueda reconocer y degradar NRF2, NRF2 debe marcarse en primer lugar mediante fosforilación en las serinas 335, 337, 342 y 347, ubicadas en el dominio Neh6, que se llevan a cabo, al menos en parte, por GSK-3 $\beta$ . Con el fin de obtener NRF2 fosforilado, se realizó un ensayo de cinasa GSK-3 $\beta$  *in vitro* con NRF2-DETGE recombinante, durante 1 h a 25 °C. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western reveló que las serinas descritas estaban adecuadamente fosforiladas (figura 6A). A continuación, los sustratos tanto fosforilados como no fosforilados se sometieron a un ensayo de ubiquitinación *in vitro* en presencia y ausencia de PHAR. Tal como se muestra en la figura 6B, el sustrato se sometió a poliubiquitinación en mayor medida cuando estaba fosforilado previamente. Curiosamente, esta poliubiquitinación fue considerablemente menor cuando estaba presente PH. A continuación, se realizó una curva de dosis con el mismo procedimiento (figura 6C) y PHAR comienza a reducir la poliubiquitinación del sustrato a partir de la concentración de 100 nM.

El siguiente enfoque fue inhibir la vía de señalización PI3K/AKT, que conduce a la activación de GSK-3 $\beta$ , con el inhibidor de PI3K, LY294002. Como resultado, NRF2 se fosforila en su dominio Neh6 y se marca para su degradación por medio de la interacción con  $\beta$ -TrCP. Por tanto, si PHAR inhibe la interacción  $\beta$ -TrCP-NRF2, según predicciones *in silico*, los niveles de NRF2 se mantendrán estables independientemente de la activación y fosforilación por GSK-3 $\beta$ . Además, para descartar una vez más un posible mecanismo alternativo mediado por KEAP1, se usaron MEF que se originaron a partir de ratones *Keap1<sup>-/-</sup>*. Estas células se pretrataron con 10  $\mu$ M de PHAR o DMSO como vehículo durante 1 h y luego se llevó a cabo tratamiento con LY294002 (20  $\mu$ M, 15, 30, 60, 120 y 240 min). LY294002 provocó una reducción de pSer473-AKT (inactivándolo) y pS9-GSK3 (activándolo) (figura 6D), y además provocó una disminución de los niveles de NRF2 que puede observarse principalmente después de 120 y 240 min de tratamiento. Por el contrario, el pretratamiento con PHAR no sólo impidió la degradación de NRF2 inducida por LY294002, sino que además favoreció la acumulación de NRF2 independientemente de la activación de GSK3 $\beta$ / $\beta$ -TrCP (figuras 6D y 6E). Por tanto, estos resultados sugieren que PHAR fomenta la acumulación de NRF2 por medio de la inhibición de la interacción con  $\beta$ -TrCP.

En otros experimentos, se realizó el silenciamiento de las dos isoformas descritas para  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -TrCP1 y  $\beta$ -TrCP2) en MEF que se originaron a partir de ratones *Keap1<sup>-/-</sup>*. El silenciamiento se realizó por medio de infección con vectores lentivirales que codifican para control de shARN (shCTRL) o  $\beta$ -TrCP1 y  $\beta$ -TrCP2 (sh  $\beta$ -TrCP1/2) durante 5 días seguido de selección de las células infectadas con puromicina. Una vez realizado el silenciamiento, las células se trataron con PHAR (10  $\mu$ M, 2, 4 y 8 h). Aunque el silenciamiento logrado fue de aproximadamente el 50 % para ambas isoformas (figura 6F), esto fue suficiente para observar un aumento significativo de los niveles de la proteína  $\beta$ -catenina, usada como control de silenciamiento de  $\beta$ -TrCP ya que es una de sus principales dianas (figura 6F). En estas condiciones, puede observarse en las células shCTRL que PHAR provoca un aumento de los niveles de NRF2 desde 2 h hasta 8 h después del tratamiento sostenido. Por el contrario, el silenciamiento parcial de  $\beta$ -TrCP1/2 provocó un ligero aumento de los niveles de NRF2 iniciales en comparación con shCTRL. Sin embargo, aunque la acumulación de NRF2 se produjo como resultado del tratamiento (probablemente debido a que el silenciamiento logrado no fue del 100 %), esta acumulación fue significativamente menor en comparación con las células shCTRL (figuras 6F y 6G). Asimismo, la acumulación de HO-1 fue menor en las células que carecían de  $\beta$ -TrCP1/2 (figuras 6F y 6G). Los niveles de ARNm correspondientes a las dianas convencionales de NRF2, *Hmox1* y *Nqo1*, confirmaron el resultado obtenido en proteína, observando que la inducción generada por PHAR se pierde con el silenciamiento de ambas isoformas de  $\beta$ -TrCP (figura 6I). Por tanto, puede concluirse que el mecanismo de acción del compuesto PHAR está mediado por su capacidad para inhibir la interacción  $\beta$ -TrCP-NRF2.

#### Ejemplo 1.5. PHAR reduce la respuesta inflamatoria en células estimuladas con LPS

Una vez descifrado el mecanismo de acción de PHAR, se evaluó su capacidad para ejercer protección contra la inflamación general inducida por lipopolisacáridos (LPS). El eje NRF2/HO-1 contribuye a la resolución de la inflamación a través de mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos incluyen la inducción transcripcional de genes antiinflamatorios (MARCO, CD36), así como la represión transcripcional de genes proinflamatorios (IL6, IL1 $\beta$ ). Los mecanismos indirectos implican la inhibición de especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno (ROS/RNS) o de la migración/infiltración de células inmunitarias. Además, la vía NRF2-ARE está en equilibrio con la vía proinflamatoria NF- $\kappa$ B.

En primer lugar, se usa una línea celular de macrófagos de ratón establecida (Raw264.7) y se somete a un pretratamiento con un vehículo (DMSO) o PHAR (10  $\mu$ M, 8 h) para obtener niveles aumentados de NRF2 y HO-1. Luego se estimularon las células con LPS (100 ng/ml, 1, 2 ó 4 h) para desencadenar una respuesta inflamatoria. Despues de 4 h de tratamiento, el LPS provocó, de hecho, un aumento de varios marcadores inflamatorios: p65, pre-IL1 $\beta$ , NOS2 y COX2 (figuras 7A y 7C). Por el contrario, el pretratamiento con PHAR aumentó los niveles de NRF2 y HO-1 (figuras 7A y 7B) pero, además, mitigó el aumento de los parámetros inflamatorios determinados por inmunotransferencia (figuras 7A y 7C) o por los niveles de ARNm (*Il1 $\beta$ , Cox2, Nos2*) (figura 7D). Además, otras citocinas proinflamatorias (*Il6* y *Tnfa*) también experimentaron una inducción significativamente más leve en las

células pretratadas con PHAR (figura 7E). Por tanto, PHAR reduce la respuesta inflamatoria en respuesta a LPS en células Raw264.7.

Como enfoque complementario, se usaron macrófagos peritoneales extraídos de ratones *Nrf2<sup>+/+</sup>* y ratones con inactivación génica generados en el laboratorio que tenían 4 serinas sustituidas por alaninas en posiciones críticas para la fosforilación por cinasa de sensibilización/cinasa de sensibilización y por GSK-3β (serinas 335, 338, 342 y 347). Ambos tipos de células se pretrataron con DMSO o PHAR (10 µM, 8 h) y luego se estimularon con LPS (100 ng/ml, 4 h). En estos modelos celulares, el LPS provocó un aumento de los marcadores inflamatorios en los macrófagos peritoneales que se originaron a partir de ratones *Nrf2<sup>+/+</sup>* (panel izquierdo de figura 8A, y figura 8C). El pretratamiento con PHAR provocó un aumento significativo de los niveles de proteína NRF2 y HO-1 (panel izquierdo de figura 8A, y figura 8B), pero la producción de marcadores inflamatorios fue significativamente menor en los analizados a nivel de proteína (pre-IL1β, COX2 y NOS2) (panel izquierdo de figura 8A, y figura 8C) y a nivel de ARNm (*Il1β*, *Cox2*, *Nos2*, *Il6* y *Tnfa*) (figura 8D). En macrófagos peritoneales derivados de ratones 4KI (*Nrf2-4KI*), la inducción de NRF2 en respuesta a PHAR fue considerablemente menor. Por el contrario, se obtuvo la misma inducción de HO-1 en respuesta al tratamiento (panel derecho de figura 8A, y figura 8B). Curiosamente, el efecto protector contra la respuesta inflamatoria mediada por PHAR se perdió en casi todos los marcadores inflamatorios analizados tanto en proteína (panel derecho de figura 8A, y figura 8C) como en ARNm (figura 8D). Por tanto, considerando todos los resultados en su conjunto, puede concluirse que PHAR es un compuesto antiinflamatorio cuyo mecanismo de acción es la activación de NRF2 mediante la interrupción de su interacción con β-TrCP.

#### Ejemplo 1.6. PHAR aumenta los niveles de proteína NRF2 en el hígado

Una vez descifrado el mecanismo de acción de PHAR, se evaluó su capacidad para inducir niveles de NRF2 en un modelo murino. Los ratones C57BL/6 recibieron una única inyección intraperitoneal (i.p.) de 50 mg/kg de PHAR (Tween-80 + PBS, 1:13) o 50 mg/kg de SFN (solución salina) como control positivo. El espectro UV derivado del estudio por HPLC-EM del compuesto PHAR disuelto en metanol solo ayudó a la identificación del pico asociado con el compuesto para su posterior identificación en el análisis tisular. Tal como se muestra en la figura 9A, el espectro de UV de PHAR dio como resultado un pico a los 6 minutos de elución con una masa asociada de 555 g/mol, tal como se esperaba. Tomando esto como punto de referencia, se realizó un análisis del tejido hepático para verificar la presencia de PHAR en el mismo. En la figura 9B, los ratones sin tratar mostraron dos picos inespecíficos aproximadamente a los 7 y 9 minutos de elución (a los que se hace referencia en la figura 9B con las letras A y B) identificados por medio de absorbancia UV. Sin embargo, los ratones tratados con PHAR mostraron además un nuevo pico a ~4 minutos de elución (letra C). Este nuevo pico en los ratones tratados se correspondía con la presencia del compuesto dado que el análisis de masas mostró la existencia de una masa con un valor de 555 g/mol idéntica a la masa obtenida en la figura 9A. Asimismo, el análisis de los niveles de NRF2 en el hígado mostró una acumulación significativa de NRF2 120 min después de la administración de PHAR que fue muy similar a la acumulación provocada por SFN (figuras 9C y 9D). Sin embargo, esta acumulación no dio como resultado ningún aumento de los niveles de HO-1, presumiblemente porque la duración del tratamiento fue demasiado corta para generar su acumulación.

Por este motivo, los ratones C57BL/6 se trajeron diariamente por vía i.p. durante 5 días con 50 mg/kg de vehículo o 50 mg/kg de PHAR. Se observó un aumento significativo de NRF2 y HO-1 en el hígado (figuras 9E y 9F) 120 minutos después de la última administración del compuesto. Por el contrario, los niveles de NRF2 y HO1 en el cerebro no se modificaron. En el riñón, los niveles de HO1 iniciales fueron más altos que en el hígado, pero no aumentaron adicionalmente con PHAR. Estos resultados indican que la invención reivindicada con la fórmula II es activa en el hígado, pero no descarta que moléculas específicas incluidas en la fórmula I también puedan tener un valor terapéutico en otros órganos en caso de una farmacodinámica diferente.

#### Ejemplo 1.7. La administración prolongada de PHAR en ratones es segura

Se han realizado estudios preliminares de seguridad en ratones de control y tratados con estreptozotocina (STZ) de 7 semanas de edad. Estos ratones se sometieron a un tratamiento i.p. de 50 mg/kg de vehículo (Tween-80:PBS, 1:13) o PHAR durante 4 semanas con 5 dosis semanales. Tal como se observa en la figura 10A, los ratones no perdieron peso durante el tratamiento, a pesar de que la pérdida de peso es un indicador muy sensible de enfermedad en ratones. Por otro lado, se analizaron los niveles séricos de albúmina, proteína total y dos transaminasas (AST y ALT). Tal como se muestra en las figuras 10B-E, estos parámetros mostraron valores dentro de intervalos normales después de 4 semanas. Por tanto, los datos de toxicidad obtenidos previamente en cultivo celular (figura 4H) junto con estos datos toxicológicos preliminares obtenidos en ratones sugieren que la administración prolongada de PHAR es segura.

#### Ejemplo 1.8. PHAR reduce la respuesta inflamatoria en ratones tratados con LPS

Una vez demostrados los efectos antiinflamatorios *in vitro* de PHAR y su capacidad para aumentar los niveles de NRF2 y HO-1 en un modelo *in vivo*, se evaluó si el compuesto era capaz de inhibir la señalización mediada por LPS en un modelo murino. Para ese fin, 16 ratones C57BL/6 de tipo natural se dividieron en 4 grupos experimentales:

vehículo (grupo experimental 1), PHAR (grupo experimental 2), LPS (3) y LPS+PHAR (4). Después de obtener resultados tan prometedores como los descritos con detalle en el ejemplo 1.6, los inventores decidieron llevar a cabo el mismo protocolo experimental. Brevemente, los ratones se trataron diariamente por vía i.p. con 50 mg/kg de PHAR (grupos experimentales 2 y 4) o vehículo (grupos 1 y 3). Dos horas después de la penúltima administración, los grupos experimentales 3 y 4 se trataron por vía i.p. con 1 m/kg de LPS. Por último, la última dosis de PHAR se administró el último día y, 24 h después de la administración de LPS, todos los ratones fueron sacrificados extrayendo la proteína hepática y el ARN total. El análisis de proteínas del tejido hepático mostró un aumento de los niveles de NRF2 derivado del tratamiento con PHAR con un efecto sinérgico cuando el tratamiento se realizó con PHAR+LPS (figuras 11A y 11B). El resultado más claro se obtuvo al analizar su diana HO-1, donde pudo observarse claramente la inducción mediada por el compuesto, y el mismo efecto sinérgico se observó nuevamente con el tratamiento combinado (figuras 11A y 11B). El análisis de los niveles de ARNm de diferentes citocinas proinflamatorias (*Il1β*, *Il6* y *Tnfa*) mostró un aumento significativo como resultado del tratamiento con LPS, tal como se esperaba. En este contexto, el tratamiento previo con PHAR favoreció una reducción significativa de la producción de dichas citoquinas (figura 11C). El análisis histoquímico, usando H&E, reveló que la estructura del hígado permanece inalterada con el tratamiento con PHAR, lo que respalda adicionalmente el perfil de seguridad. Además, la tinción inmunohistoquímica de la activación inflamatoria de los macrófagos hepáticos (células de Kupffer) mediante inmunotinción con anticuerpo anti-F4/80 reveló que el LPS activa significativamente estos macrófagos, tal como se esperaba, y que esta activación se atenúa en gran medida con el tratamiento con PHAR. Por tanto, estos resultados obtenidos confirman que el tratamiento con PHAR favorece un entorno que protege contra la inflamación en ratones en respuesta a LPS.

Ejemplo 1.9. PHAR disminuye la respuesta inflamatoria y la lipogénesis en ratones STAM que experimentan la enfermedad esteatosis hepática

Tal como se describió anteriormente, el modelo STAM es un modelo murino usado para el estudio de la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD), así como para la búsqueda de nuevos tratamientos eficaces. Este modelo se genera mediante la inyección subcutánea de estreptozotocina (STZ) en ratones C57BL/6J neonatos de 2-5 días de edad seguida de una dieta de alto contenido en grasas, administrada después de las 4 semanas de edad. La STZ produce una lesión pancreática que conduce a la aparición de hiperglucemia que, junto con la dieta de alto contenido en grasas, conduce gradualmente a diferentes estadios de daño hepático progresivo: esteatosis (semana 6 después de la inyección de STZ); NASH inflamatoria (semana 8); fibrosis por NASH (semana 10) y, finalmente, hepatocarcinoma (semana 16). La patogenia de NAFLD está estrechamente relacionada con la aparición de especies reactivas del oxígeno, inflamación crónica de bajo grado y cambios en el metabolismo lipídico. Por este motivo, se determinó si PHAR, como inductor de NRF2, puede atenuar la respuesta inflamatoria. Específicamente, se trataron ratones en el estadio de esteatosis (semana 6), 5 días a la semana con una administración i.p. de 50 mg/kg con el fin de analizar si se impide la progresión al siguiente estadio (NASH). Tal como se muestra en la figura 12A, la tinción con H&E evidenció que la estructura del hígado era similar en ratones STAM tratados con PHAR y sin tratar. Por otro lado, la histoquímica lipídica usando rojo de aceite mostró acumulación de grasa hepática, corroborando el buen funcionamiento del modelo. En este caso, PHAR redujo significativamente la cantidad de grasa hepática acumulada. El análisis de la cantidad de grasa hepática, medida mediante IRM al final del tratamiento, reveló que PHAR ralentiza la acumulación de grasa hepática en el modelo STAM (figuras 12B-C). Se analizaron los niveles de ARNm de diversos genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos y se encontró que PHAR produce un cambio metabólico consistente con el aumento del catabolismo lipídico, evidente en la expresión de *Cpt1a* (carnitina palmitoil transferasa I) que facilita la degradación mitocondrial de los ácidos grasos, y en la disminución de su síntesis, mediante la disminución de la expresión de *Fasn* (sintasa de ácidos grasos) (figura 12D). Finalmente, PHAR mostró en el hígado una tendencia a disminuir la expresión de las citocinas proinflamatorias *Tnf*, *Il6* e *Infy* y a aumentar las citocinas antiinflamatorias *Il10* e *Il4* (figura 12E). En conjunto, se concluyó que PHAR ralentiza la acumulación de grasa y, por tanto, previene la aparición de NASH.

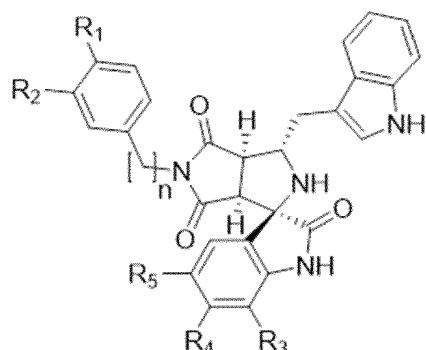
Ejemplo 1.10. PHAR atenúa el daño hepático en ratones con esteatosis hepática

Después de observar el papel beneficioso de PHAR en la prevención de NASH, se analizó su papel en la progresión del daño hepático. El daño progresivo de los hepatocitos es una consecuencia de su alteración metabólica y de la inflamación crónica de bajo grado y el estrés oxidativo (figura 13A). Se trataron ratones en el estadio de NASH (semana 8), 5 días a la semana con una dosis i.p. de 50 mg/kg de PHAR hasta la semana 10. El análisis de la acumulación de grasa se midió mediante IRM tanto en el punto de tratamiento inicial como en el punto final (figura 13B). Los ratones STAM tratados con vehículo experimentaron una acumulación progresiva de lípidos. Sin embargo, los ratones tratados con PHAR mostraron una protección significativa contra la acumulación de lípidos. Tal como se esperaba, los ratones de control no sufrieron tal acumulación de grasa, lo que confirma el correcto desarrollo del modelo STAM (figuras 13B-D). El análisis histoquímico con H&E del hígado de ratones tratados con PHAR frente a vehículo, en ratones tanto de control como STAM, confirmó nuevamente una histología hepática normal con el tratamiento. Además, la tinción con rojo de aceite confirmó los resultados de IRM con respecto a la protección contra la acumulación de grasa hepática en ratones STAM tratados con PHAR (figura 13E). En consonancia con el resultado obtenido en el ejemplo 1.9, PHAR produjo un aumento del catabolismo lipídico, aumentando la expresión de *Cpt1a* (carnitina palmitoil transferasa) y una disminución de su síntesis, medida por una disminución de la expresión de *Fasn* (sintasa de ácidos grasos) (figura 16F). El análisis de los niveles de ARNm indica además que

PHAR atenúa la expresión de citocinas proinflamatorias y fomenta un aumento de las citocinas antiinflamatorias (figura 16G). Por tanto, PHAR reduce la inflamación crónica de bajo grado y la acumulación de grasa hepática.

## REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP, caracterizado por la fórmula (I) o sus sales derivadas,

**I**

5

en la que:

- n puede ser 0 ó 1,

10

- R<sub>1</sub> puede ser O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub> o un anillo de seis miembros para formar un sustituyente benzodioxano, benzometilendioxilo o naftaleno;

15

- R<sub>2</sub> puede ser H o un anillo de seis miembros para formar un sustituyente benzodioxano, benzometilendioxilo o naftaleno;

20

- R<sub>3</sub> puede ser H o CH<sub>3</sub>;

- R<sub>4</sub> puede ser H o CH<sub>3</sub>; y

- R<sub>5</sub> puede ser H, Cl o CH<sub>3</sub>,

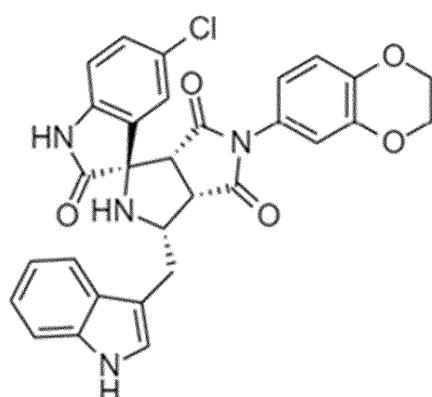
para su uso en el tratamiento de esteatosis hepática.

25

2. Inhibidor de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP caracterizado por la fórmula (I), o sus sales derivadas, para su uso, según la reivindicación 1, en el tratamiento de NAFLD, NASH, fibrosis hepática o cirrosis.

30

3. Inhibidor de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP para su uso según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el inhibidor se caracteriza por la fórmula (II),

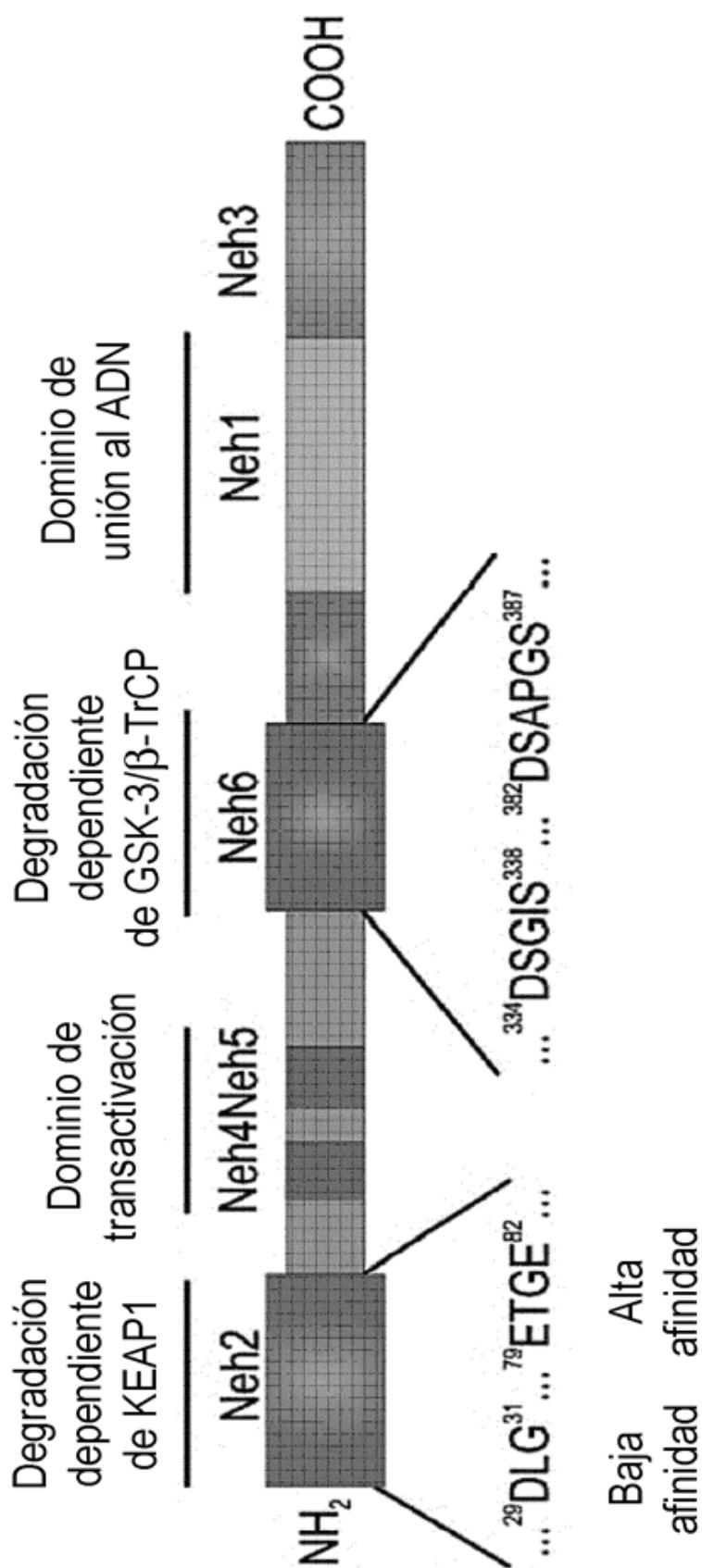
**II**

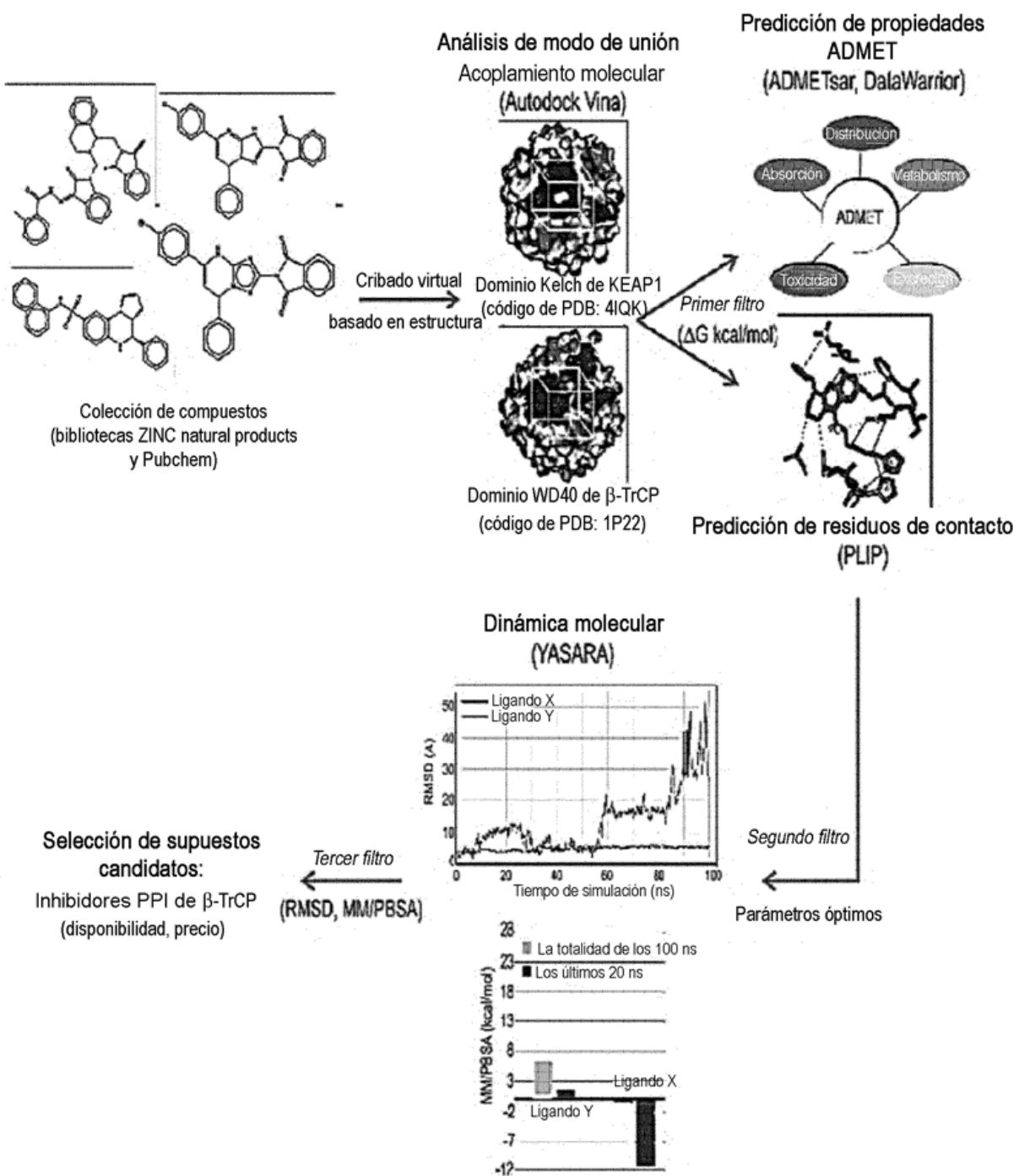
o sus sales derivadas.

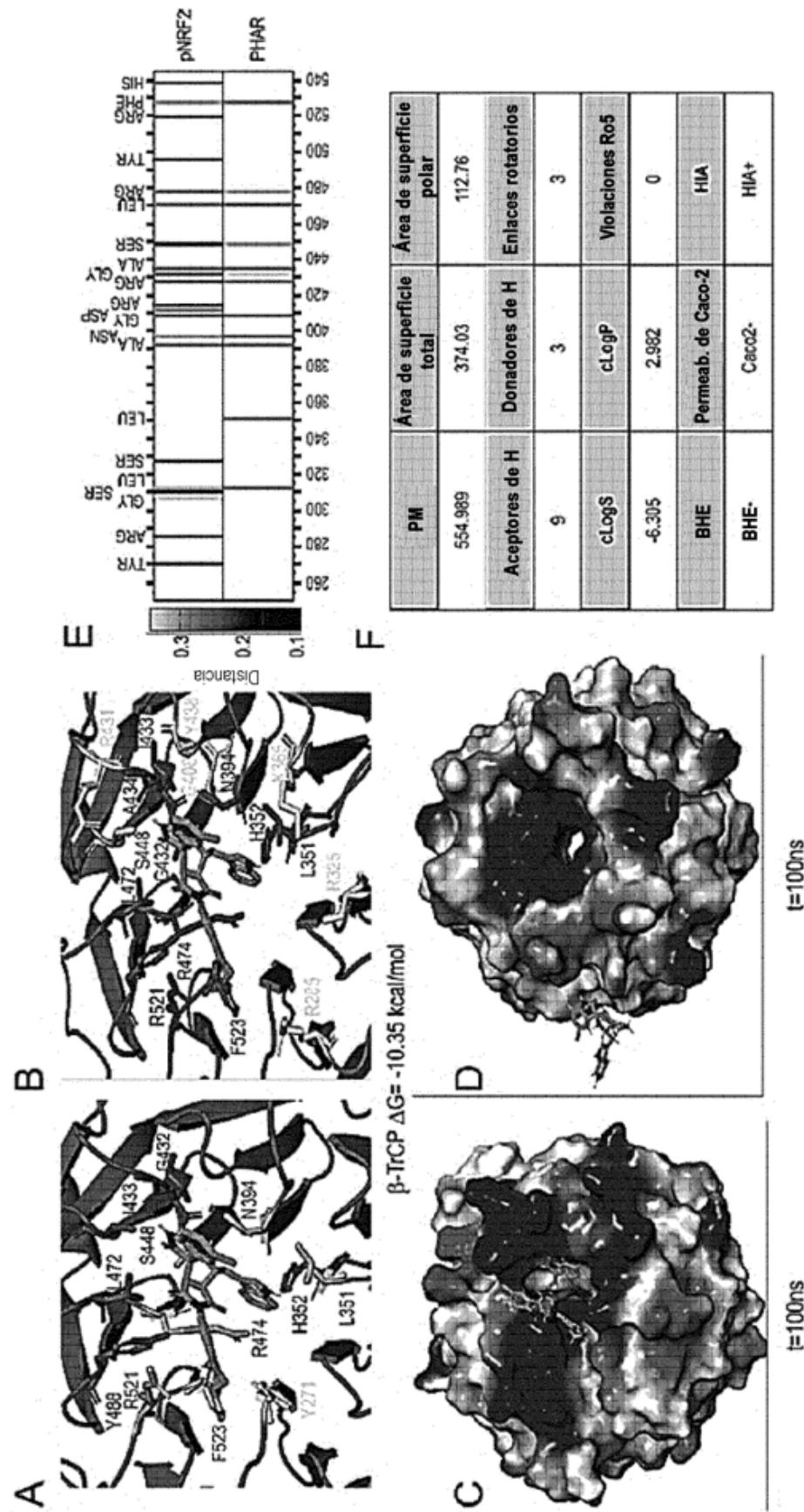
- 35 4. Composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP de fórmula I o II, o

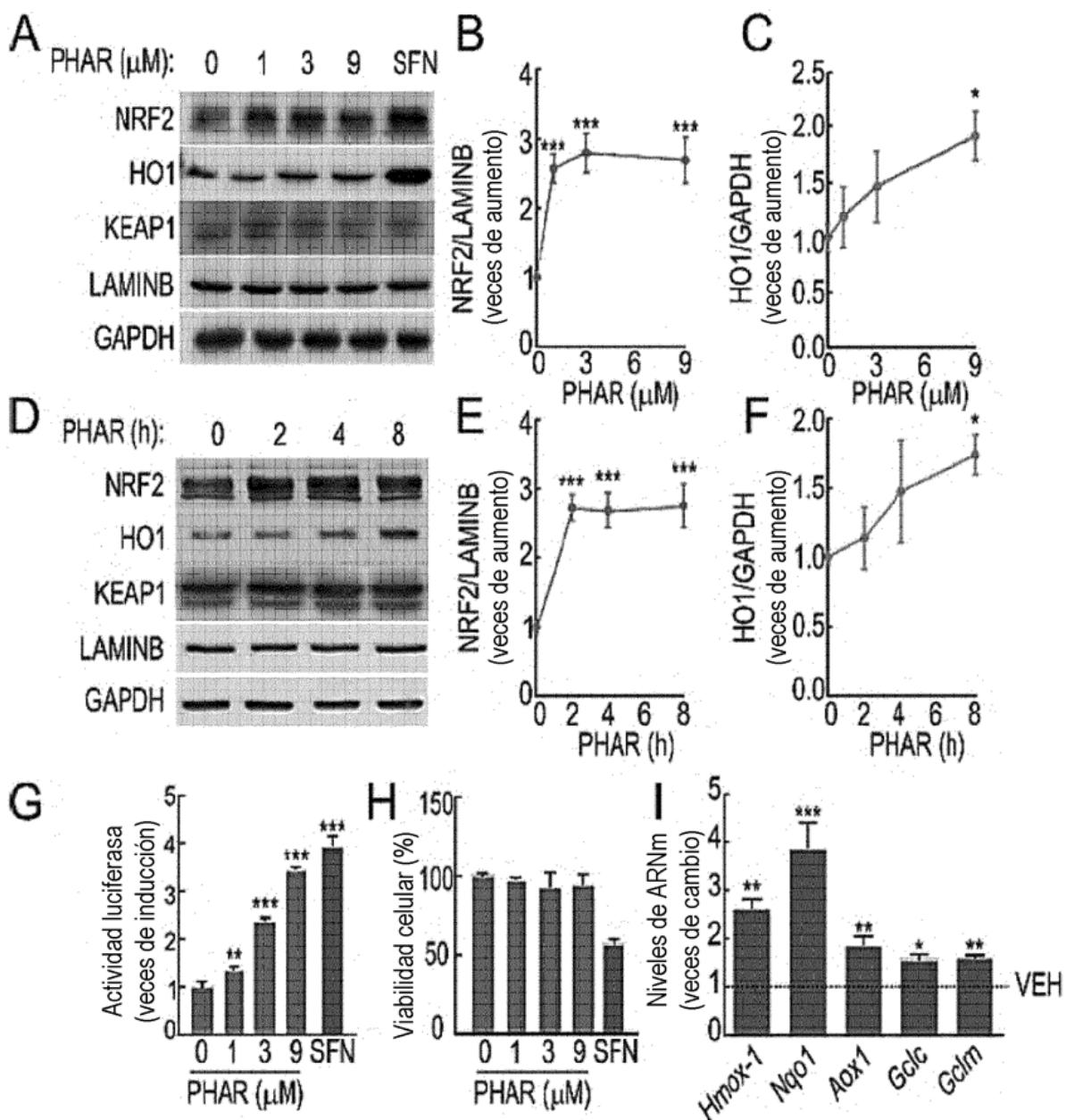
sales derivadas del mismo, y opcionalmente vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de esteatosis hepática.

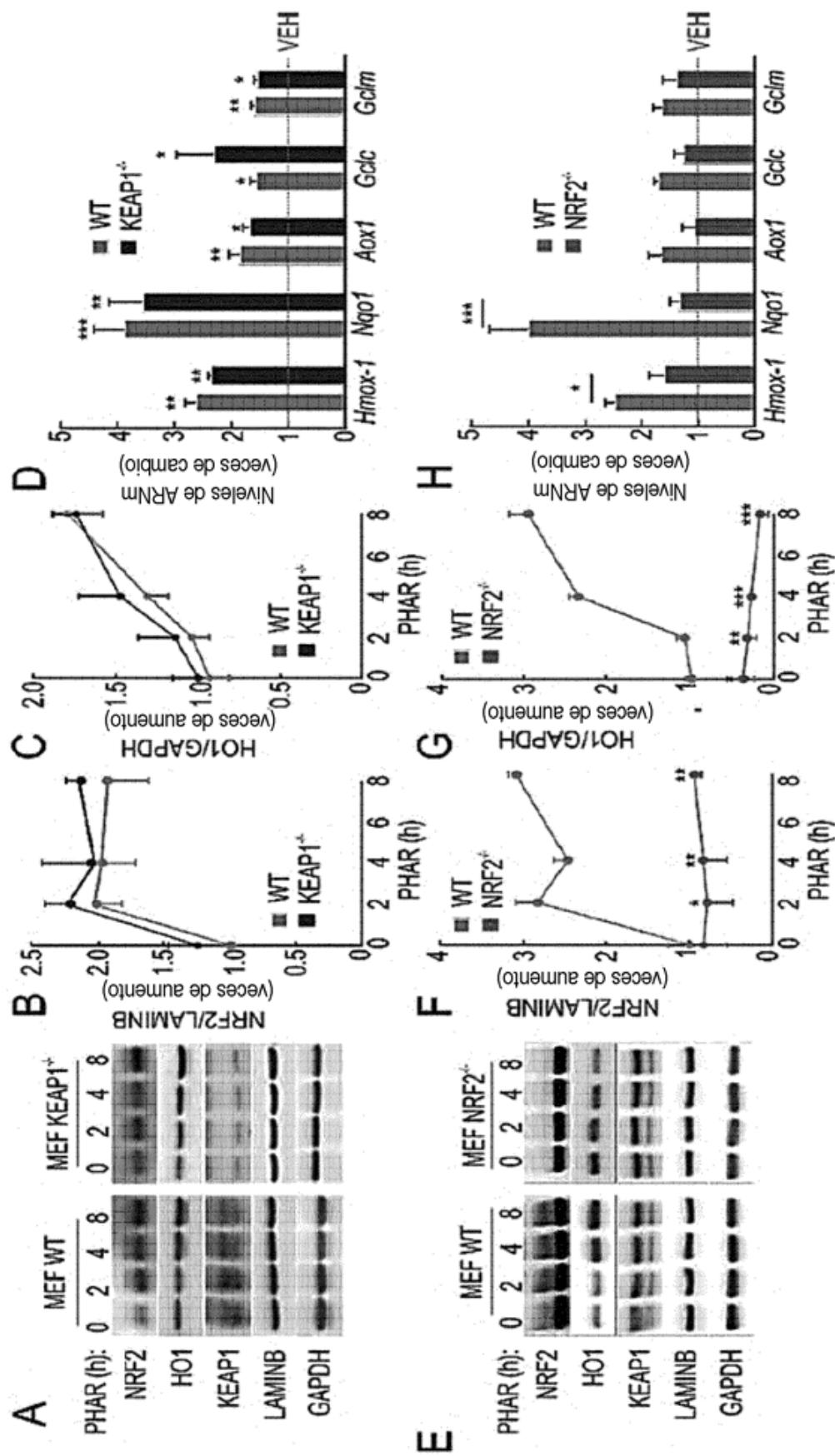
5. Composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP de fórmula I o II, o sales derivadas del mismo, y opcionalmente vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso, según la reivindicación 4, en el tratamiento de NAFLD, NASH, fibrosis hepática o cirrosis.
6. Método *in vitro* para identificar y producir compuestos para el tratamiento de esteatosis hepática, que comprende: a) determinar si ha tenido lugar la inhibición de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP por el compuesto candidato, y b) en el que si ha tenido lugar dicha inhibición, es indicativo de que el compuesto seleccionado es eficaz en el tratamiento de esteatosis hepática.
7. Método *in vitro*, según la reivindicación 6, para identificar y producir compuestos para el tratamiento de NAFLD, NASH, fibrosis hepática o cirrosis, que comprende: a) determinar si ha tenido lugar la inhibición de la interacción NRF2- $\beta$ TrCP por el compuesto candidato, y b) en el que si ha tenido lugar dicha inhibición, es indicativo de que el compuesto seleccionado es eficaz en el tratamiento de NAFLD, NASH, fibrosis hepática o cirrosis.

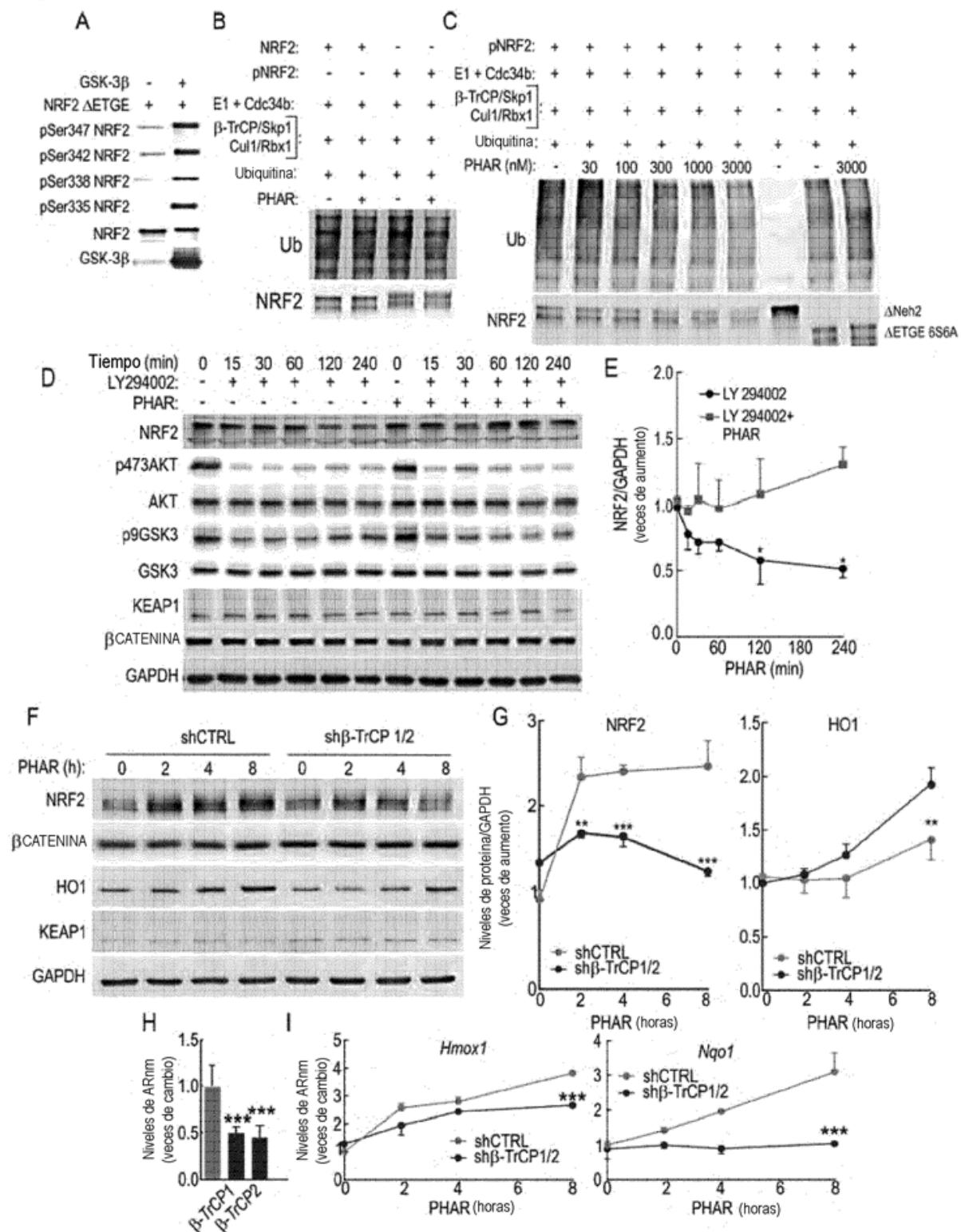
**Figura 1**

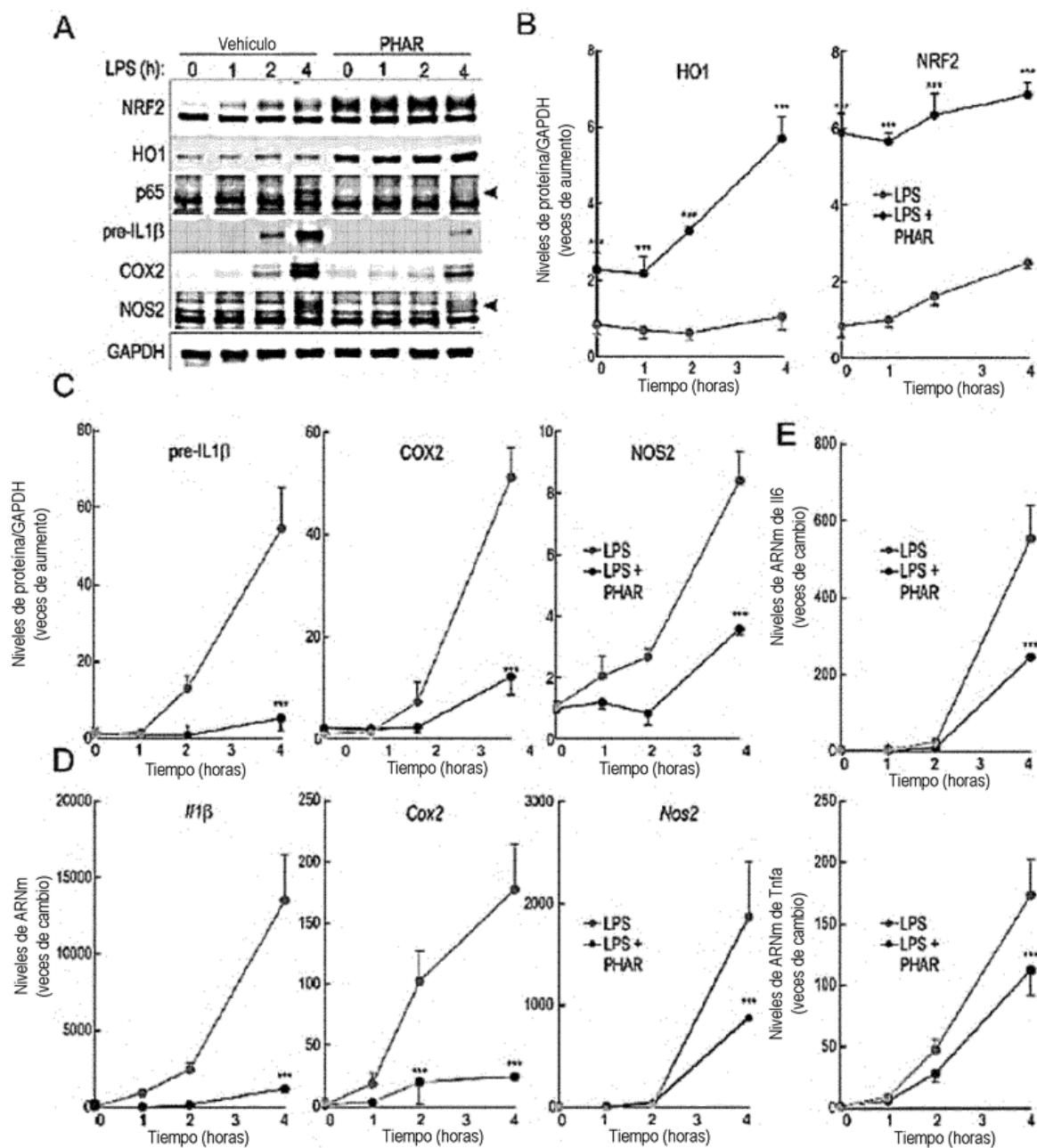
**Figura 2**

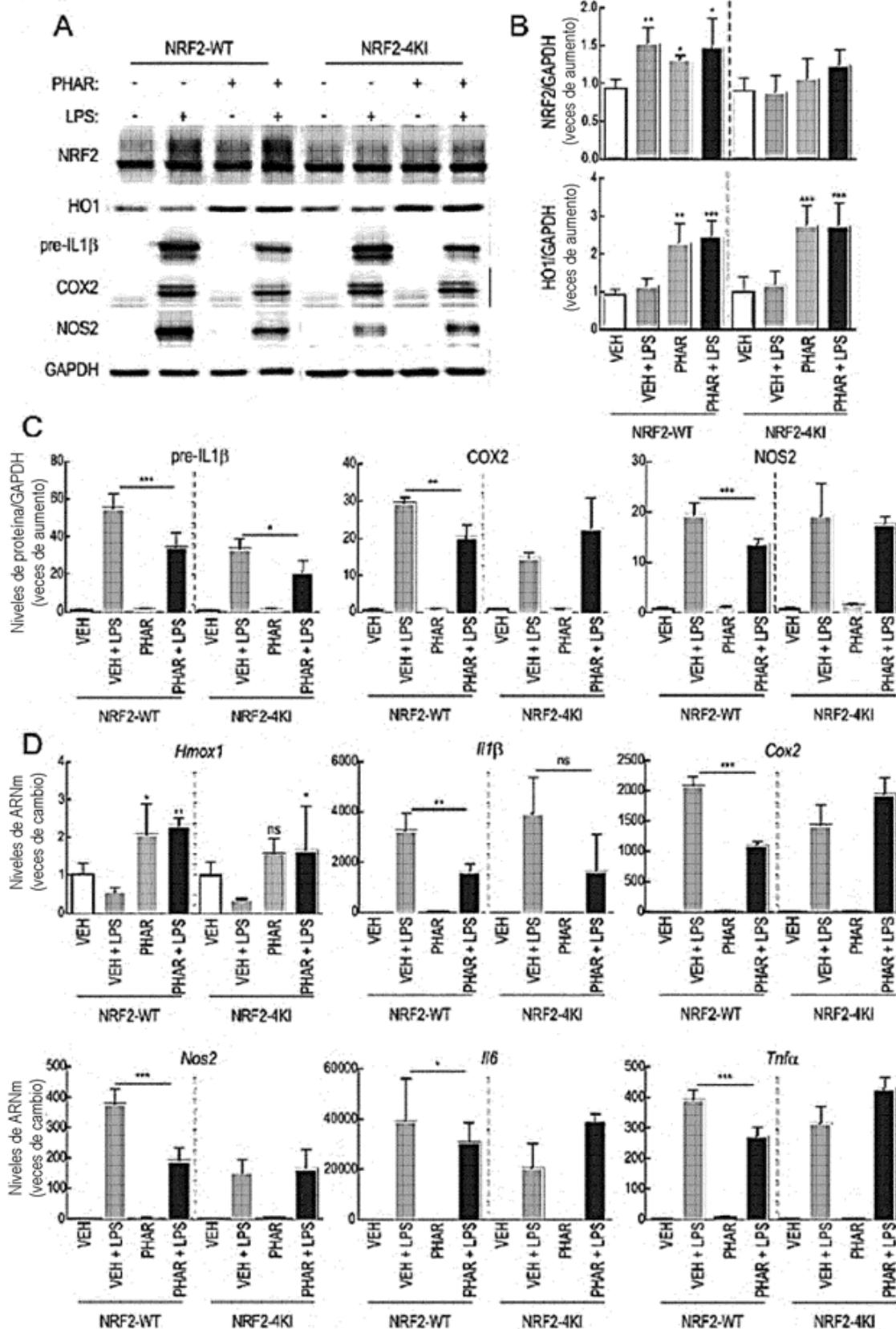
**Figura 3**

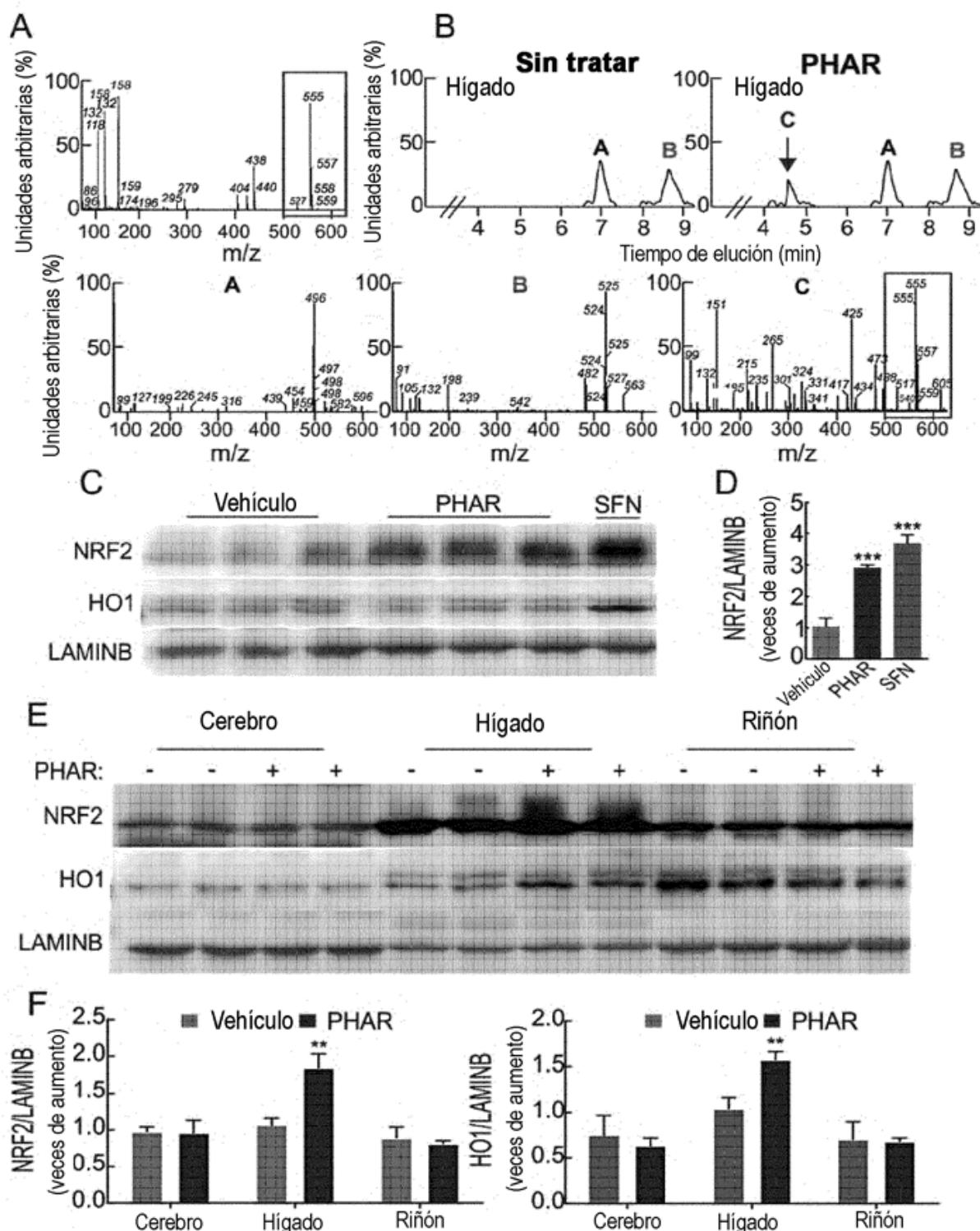
**Figura 4**

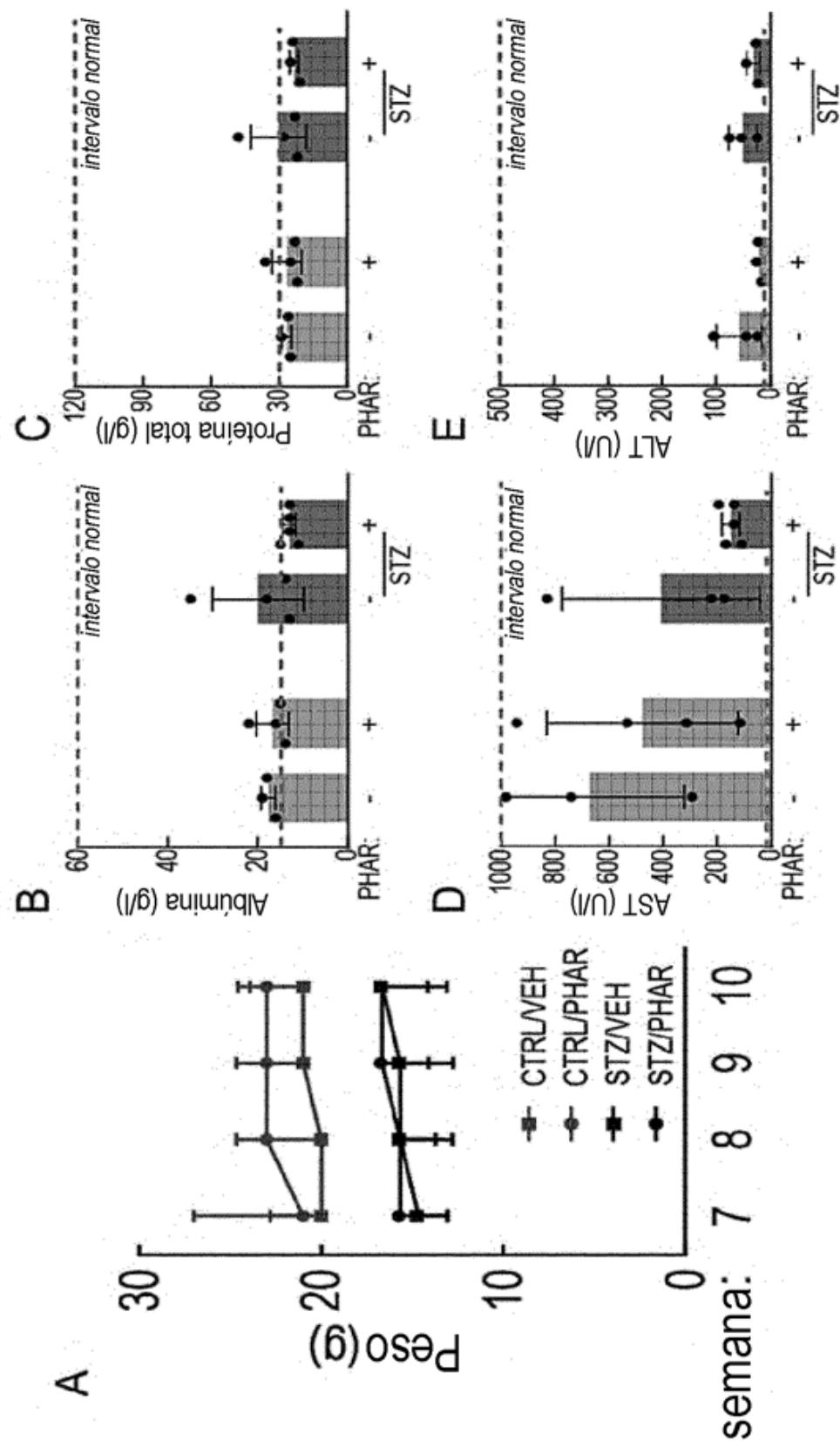
**Figura 5**

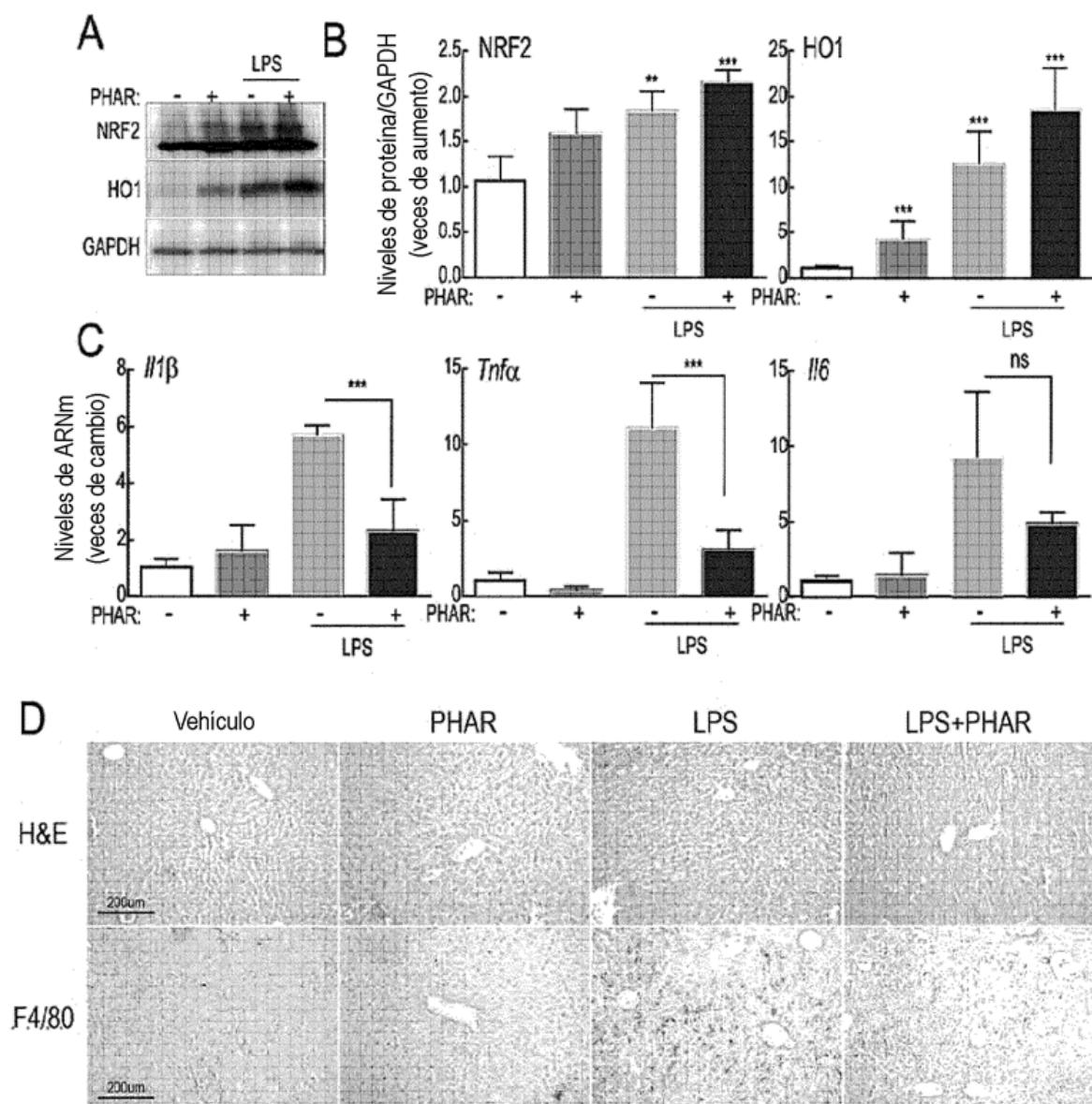
**Figura 6**

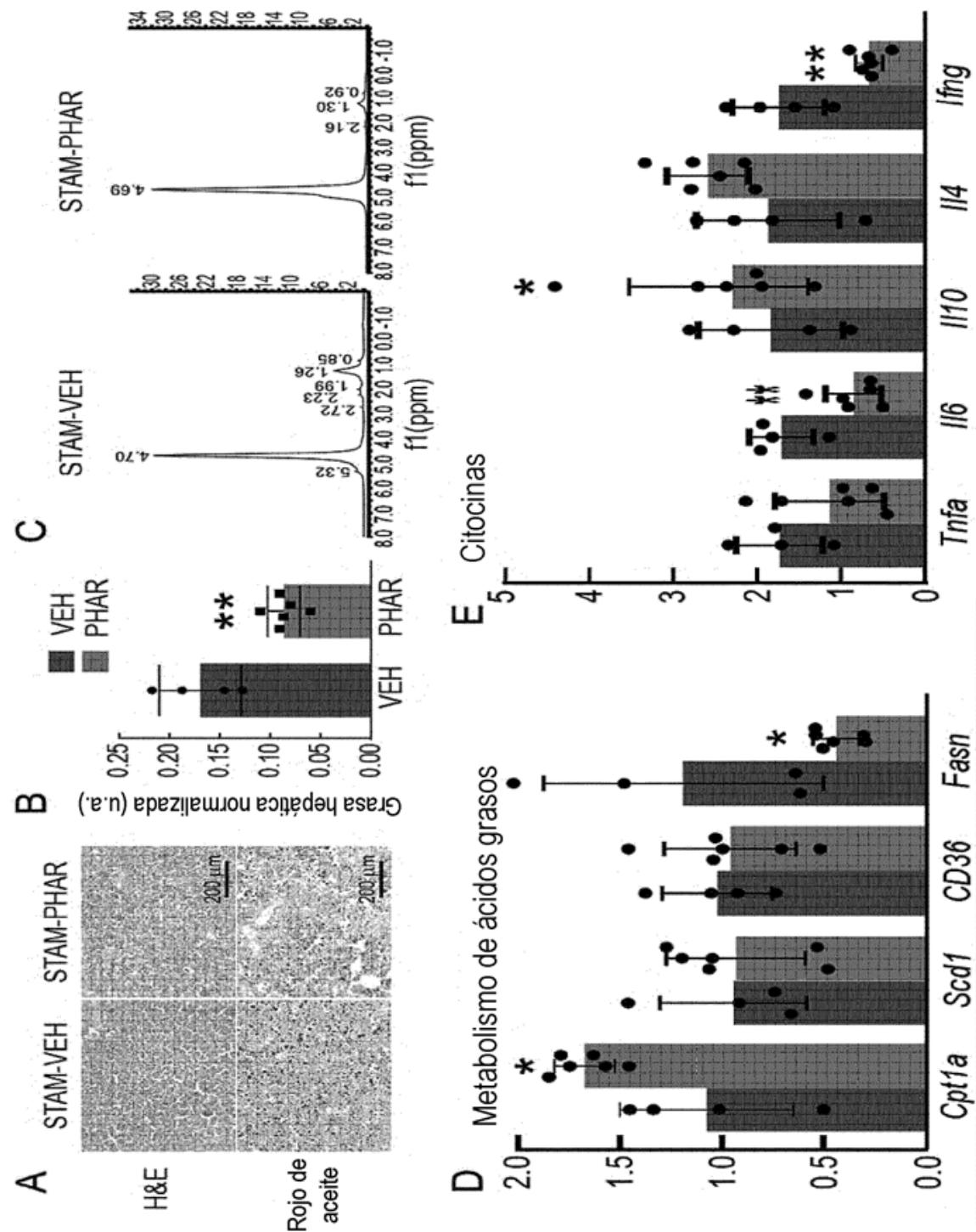
**Figura 7**

**Figura 8**

**Figura 9**

**Figura 10**

**Figura 11**

**Figura 12**

**Figura 13**