



Organización y
Digitalización
CSA Ltda



PCT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

10-98518

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO USO DE TRITERPENOIDES SINTÉTICOS EN EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 31/275

71. SOLICITANTE REATA PHARMACEUTICALS, INC. y
TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE

DOMICILIO Irving, Texas, Estados Unidos de Américas y
Hanover, New Hampshire, Estados Unidos de América.

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

Pedro, C
11-08-2010



No. 10-098518-00000-0000

Fecha: 2010-08-11 15:31:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 204

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: REATA PHARMACEUTICALS, INC.
y TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE

Dirección: 2801 Gateway Drive, Suite 150, Irving,
TX 75062, Estados Unidos de América y
11 Rope Ferry Road, Hanover, NH 03766, Estados
Unidos de América.

Nacionalidad o domicilio: Irving, Texas,
Estados Unidos de América y Hanover, New
Hampshire, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución:

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 **Fax:** 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER HOJA ANEXA

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/030771

Fecha 12 de enero de 2009

Publicación Internacional No. WO 2009/089545 A1

Fecha 16 de julio de 2009

6 TÍTULO (54) USO DE TRITERPENOIDES SINTÉTICOS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES.

7 Clasificación Internacional (51) A61K 31/275

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

(32) Fecha

11 de enero de 2008

28 de octubre de 2008

(31) Número de Solicitud

61/020,624

61/109,114

9 Comprobante de pago No. 10-63.048 // 10-63.049 // 10-63.050 // 10-63.051 // 10-63.052 // 10-63.013 // 10-63.221 //

10-52.616

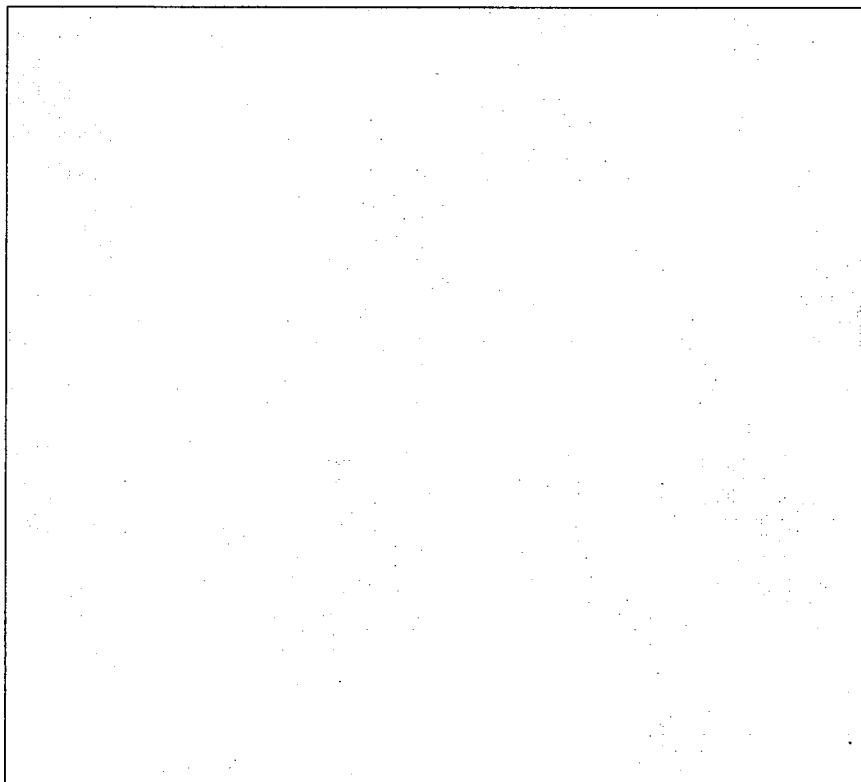
Fecha todas de 3 de junio de 2010 y una de 29 de junio de 2010

10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros pinión escrita.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXOS

INVENTORES

1.)

SPORN, Michael

(9 Sporn Drive, Tunbridge, Vermont 05077, Estados Unidos de América);

2.)

LIBY, Karen

(131 North Main Street, West Lebanon, New Hampshire 003784, Estados Unidos de América);

3.)

GRIBBLE, Gordon, W.

(15 Eldridge Street, Lebanon, New Hampshire 03766, Estados Unidos de América);

4.)

HONDA, Tadashi

(16 Macdonald Drive, Hanover, New Hampshire 03755, Estados Unidos de América);

5.)

KRAL, Robert, M.

(2405 Brittany Lane, Grapevine, Texas 76051, Estados Unidos de América);

6.)

MEYER, Colin, J.

(3884 Truman Drive, Frisco, Texas 75034, Estados Unidos de América).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,048
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-098518-00000-0000
Fecha: 2010-08-11 15:31:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 204

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	3 PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LENAS	706,000.00
TOTAL :			\$ 706,000.00

SON: SETECIENTOS SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE: _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P-2629
3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,049

FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-098518-00000-0000

Fecha: 2010-08-11 15:31:05

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 204

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	3 PRODC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS	706,000.00
	TOTAL :	\$ 706,000.00

SON: SETECIENTOS SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



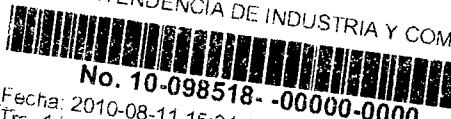
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,050

FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-098518-00000-0000

Fecha: 2010-08-11 15:31:05

Tra. 1: PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 204

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		3 PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS	706,000.00
		TOTAL :	\$ 706,000.00

SON: SETECIENTOS SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

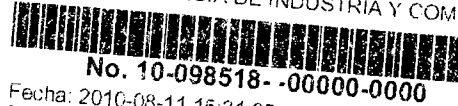


SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,051
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-098518- -00000-0000

Fecha: 2010-08-11 15:31:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 204

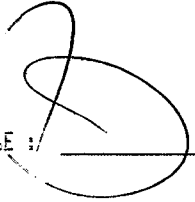
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
3		PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS	706,000.00
		TOTAL :	\$ 706,000.00

SON: SETECIENTOS SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,052

FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-098518- -00000-0000

Fecha: 2010-08-11 15:31:05

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 204

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	3 PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEAS	706,000.00
		TOTAL :	\$ 706,000.00

SON: SETECIENTOS SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

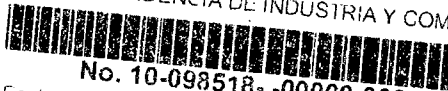
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,013

FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-098518- -00000-0000

Fecha: 2010-08-11 15:31:05

Tra 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR NUEVASOR

Eve: 378 I-ASENACIONALI

Folios: 204

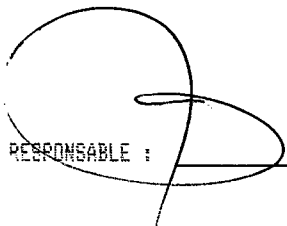
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	819,000.00
	TOTAL :	\$ 819,000.00

SON: OCHOCIENTOS DIEZ Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

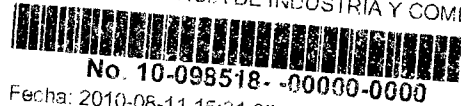
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 63,221
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-098518- -00000-0000

Fecha: 2010-08-11 15:31:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 204

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI	26,000.00
	TOTAL :	\$ 26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

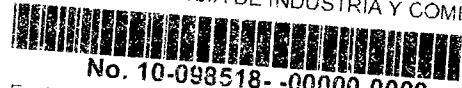
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 80017

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 52,616
FECHA : JUNIO 29 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-098518- -00000-0000

Fecha: 2010-08-11 15:31:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios. 204

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325811511	28/06/2010	85,900,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1,000.00
		TOTAL :	\$ 1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

RESUMEN

La presente invención se trata de métodos para tratar y prevenir la nefropatía, resistencia a la insulina/diabetes, esteatosis hepática, y/o disfunción endotelial/patología cardiovascular mediante el uso de triterpenoides sintéticos, opcionalmente combinados con un segundo tratamiento o una segunda profilaxis.

PATENTE
REAT:027US

SOLICITUD DE CÉDULA DE PATENTE DE ESTADOS UNIDOS
para
USO DE TRITERPENOIDES SINTÉTICOS EN EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES

Por
Michael Sporn
Karen Liby
Gordon W. Gribble
Tadashi Honda
Robert M. Kral

y
Colin J. Meyer

CERTIFICADO DE ENTREGA ELECTRÓNICA FECHA DE ENTREGA: _____

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad a las Solicitudes de Patente Provisionales de EE. UU. Número 61/020.624, presentada el 11 de enero, 2008, y Número 61/109.114, presentada el 28 de octubre, 2008, cuyo contenido completo se
5 incorpora por referencia a este documento.

I. Campo de la invención

La presente invención se relaciona en general al campo de la biología y de la medicina. Concretamente, tiene que ver con composiciones y métodos para el tratamiento y/o la prevención de la nefropatía, resistencia a la insulina, diabetes, disfunción
10 endotelial, esteatosis hepática y patología cardiovascular.

II. Descripción de materias relacionadas

La insuficiencia renal, que es el resultado de una depuración inadecuada de los desechos metabólicos de la sangre y de concentraciones anormales de electrolitos en la sangre, es un problema médico importante en todo el mundo, especialmente en los países
15 desarrollados. La diabetes y la hipertensión están entre las causas más importantes de la insuficiencia renal crónica, que también se denomina nefropatía crónica, pero también está asociada con otras afecciones tales como el lupus o la patología cardiovascular sistémica. La disfunción del endotelio vascular se produce comúnmente en tales afecciones y se cree que es un factor de suma importancia en el desarrollo de la
20 nefropatía crónica. La insuficiencia renal aguda puede surgir de la exposición a ciertos fármacos (por ejemplo, acetaminofeno) o a ciertas sustancias químicas tóxicas o debido a una lesión de isquemia-reperfusión asociada con el choque o con intervenciones quirúrgicas tales como el trasplante, y pueden eventualmente desencadenar una nefropatía crónica. En muchos pacientes, la nefropatía crónica evoluciona hacia una
25 nefropatía terminal que exige un trasplante renal o diálisis regular para que el paciente pueda seguir viviendo. Estos dos procedimientos son sumamente invasivos y están asociados con importantes efectos secundarios y problemas de calidad de vida. Aunque hay tratamientos eficaces para algunas de las complicaciones de la insuficiencia renal, tales como el hiperparatiroidismo y la hiperfosfatemia, no se dispone de ningún

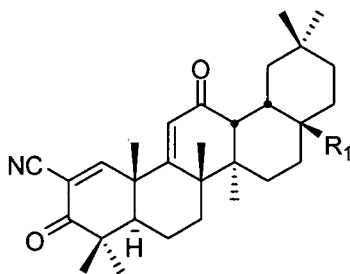
tratamiento para el cual se haya demostrado que detiene o revierte la evolución subyacente de la insuficiencia renal. Por lo tanto, los agentes que puedan mejorar una función renal comprometida representarían un avance importante en el tratamiento de la insuficiencia renal.

- 5 Los triterpenoides, que se sintetizan en las plantas por ciclación del escualeno, se usan con fines medicinales en muchos países asiáticos; se sabe que algunos de ellos, como el ácido ursólico y el ácido oleanólico, son antiinflamatorios y anti-carcinogénicos (Huang y col., 1994; Nishino y col., 1988). Sin embargo, la actividad biológica de estas moléculas naturales es relativamente débil; por lo tanto, se intentó la síntesis de nuevos
- 10 análogos para aumentar su potencia (Honda y col., 1997; Honda y col., 1998). Se está intentando mejorar la actividad antiinflamatoria y antiproliferativa de análogos del ácido oleanólico y del ácido ursólico, que ha llevado al descubrimiento del ácido 2-ciano-3,12-dioxo-oleano-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) y de compuestos relacionados (Honda y col., 1997, 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2002; Suh y col., 1998; 1999; 2003; Place y col., 2003;
- 15 Liby y col., 2005). Se han identificado varios derivados potentes del ácido oleanólico, que incluyen el ácido metil-2-ciano-3,12-dioxo-oleano-1,9-dien-28-oico (CDDO-Me; RTA 402). El RTA 402 inhibe la inducción de varios mediadores importantes de la inflamación, como iNOS, COX-2, TNF α e IFN γ , en macrófagos activados. También se ha informado que el RTA 402 activa la vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE, con producción
- 20 de varias proteínas antiinflamatorias y antioxidantes, tal como la hem oxigenasa-1 (HO-1). Debido a estas propiedades, el RTA 402 es un candidato para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y proliferativas, como el cáncer. Todavía no se ha probado la capacidad de este compuesto y de moléculas relacionadas para tratar y/o prevenir la nefropatía y la patología cardiovascular.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevos métodos para tratar y/o prevenir la nefropatía, resistencia a la insulina, diabetes, disfunción endotelial, esteatosis hepática, patología cardiovascular y trastornos relacionados. Los compuestos correspondientes a las fórmulas genéricas o específicas indicadas a continuación o que se nombren específicamente se denominan “compuestos de la invención,” “compuestos de la presente invención,” o “triterpenoides sintéticos” en esta solicitud.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para tratar o prevenir la nefropatía, resistencia a la insulina, diabetes, disfunción endotelial, esteatosis hepática o patología cardiovascular en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto con la estructura:



, Fórmula I

en donde R₁ es: -CN, o C₁-C₁₅-acilo o C₁-C₁₅-alquilo, en donde cualquiera de estos grupos está sustituido o no sustituido con un heteroátomo; o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato de dicho compuesto.

En algunas representaciones, se proporcionan métodos para tratar la nefropatía. En algunas variantes, la nefropatía es nefropatía diabética. En otras variantes, la nefropatía es el resultado de una agresión tóxica, por ejemplo, en donde la agresión tóxica se debe a un agente de contraste o un fármaco. Por ejemplo, el fármaco puede ser un agente de quimioterapia. En otra variante adicional, la nefropatía es el resultado de una lesión por isquemia/reperfusión. En aun otra variante, la nefropatía se debe a diabetes o hipertensión. En otras variantes adicionales, la nefropatía se debe a una enfermedad autoinmune. En otras variantes, la nefropatía es una nefropatía crónica. En aun otras variantes, la nefropatía es una nefropatía aguda.

En algunas representaciones, el sujeto se ha sometido a diálisis o se está sometiendo a diálisis. En algunas representaciones, el sujeto se ha sometido a un trasplante de riñón o es candidato para dicho trasplante. En algunas representaciones, el método trata la nefropatía y la resistencia a la insulina. En algunas variantes de las anteriores representaciones, el método trata la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial. En algunas representaciones, el método trata la nefropatía y diabetes. En algunas representaciones, el método trata la resistencia a la insulina.

En algunas representaciones, el método trata la diabetes. La cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto también puede tratar eficazmente una o más de las complicaciones asociadas con la diabetes. Por ejemplo, las complicaciones se pueden seleccionar del grupo integrado por la obesidad, hipertensión, aterosclerosis, cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular, vasculopatía periférica, hipertensión, nefropatía, neuropatía, mionecrosis, úlceras de los pies por diabetes y otras úlceras por diabetes, retinopatía y síndrome metabólico (síndrome X). Como ejemplo adicional, la complicación puede ser síndrome metabólico (síndrome X). En algunas variantes, la diabetes se debe a resistencia a la insulina.

En algunas representaciones, el método trata la nefropatía y disfunción endotelial. En otras representaciones, el método trata la nefropatía y patología cardiovascular. En algunas representaciones, el método trata la patología cardiovascular. En algunas variantes, la patología cardiovascular es el resultado de la disfunción endotelial.

En algunas representaciones, el método trata la disfunción endotelial y/o la resistencia a la insulina. En algunas representaciones, el método trata la esteatosis hepática. En algunas variantes, la esteatosis hepática es esteatosis hepática no alcohólica. En otras variantes, la esteatosis hepática es esteatosis hepática alcohólica. En algunas variantes, el método trata la esteatosis hepática y uno o más de los siguientes trastornos: nefropatía, resistencia a la insulina, diabetes, disfunción endotelial y patología cardiovascular.

En algunas representaciones, los métodos además comprenden la identificación de un sujeto que necesite tratamiento por cualquiera de las enfermedades, disfunciones, resistencias o trastornos indicados. En algunas representaciones, el sujeto tiene antecedentes familiares o personales de cualquiera de las enfermedades, disfunciones,

resistencias o trastornos indicados. En algunas representaciones, el sujeto tiene síntomas de cualquiera de las enfermedades, disfunciones, resistencias o trastornos indicados.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para mejorar el índice de filtración glomerular (IFG) o la depuración de creatinina en un sujeto que comprende
5 administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato de dicho compuesto.

En algunas representaciones, el compuesto se administra en forma local. En algunas representaciones, el compuesto se administra en forma sistémica. En algunas
10 representaciones, el compuesto se administra por vía oral, intra-adiposal, intraarterial, intraarticular, intracranial, intradérmica, intralesional, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapericardial, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrarrectal, intratecal, intratraqueal, intratumoral, intraumbilical, intravaginal, intravenosa, intravesicular, intravítrea, liposomal, local, mucosal, oral, parenteral, rectal,
15 subconjuntival, subcutánea, sublingual, tópica, transbucal, transdérmica, vaginal, en cremas, composiciones lipídicas, a través de un catéter, por lavado, por infusión continua, por infusión, por inhalación, por inyección, por colocación local, por perfusión local, por baño local de las células objetivo, o cualquier combinación de estos métodos. Por ejemplo, en algunas variantes, el compuesto se administra por vía intravenosa, intra-
20 arterial u oral. Por ejemplo, en algunas variantes, el compuesto se administra por vía oral.

En algunas representaciones, el compuesto se formula en forma de cápsula dura o blanda, una tableta, un jarabe, una suspensión, una dispersión de un sólido, una oblea o un elixir. En algunas variantes, la cápsula blanda es una cápsula de gelatina. En variantes, el compuesto se formula como una dispersión de un sólido. En algunas variantes, la
25 cápsula dura, cápsula blanda, tableta u oblea comprenden además un revestimiento protector. En algunas variantes, el compuesto formulado comprende un agente que retrasa la absorción. En algunas variantes, el compuesto formulado además comprende un agente que mejora la solubilidad o dispersibilidad. En algunas variantes, el compuesto se dispersa en un liposoma, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en
30 aceite.

En algunas representaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz es una dosis diaria de 25 mg a 500 mg del compuesto. En algunas representaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz es una dosis diaria de 0,1 – 1000 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variantes, la dosis diaria es 0,15 – 20 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variantes, la dosis diaria es 0,20 – 10 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variantes, la dosis diaria es 0,40 – 3 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variantes, la dosis diaria es 0,50 – 9 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variantes, la dosis diaria es 0,60 – 8 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variantes, la dosis diaria es 0,70 – 7 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variantes, la dosis diaria es 0,80 – 6 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variantes, la dosis diaria es 0,90 – 5 mg de compuesto por kg de peso corporal. En algunas variantes, la dosis diaria es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg de compuesto por kg de peso corporal.

En algunas representaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz se administra como una sola dosis por día. En algunas representaciones, la cantidad farmacéuticamente eficaz se administra en dos o más dosis por día.

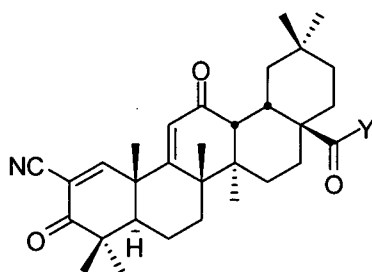
En algunas representaciones, el método de tratamiento comprende además una segunda terapia. En algunas variantes, la segunda terapia comprende administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un segundo fármaco. En algunas representaciones, el segundo fármaco es un medicamento para reducir el colesterol, un anti-hiperlipidémico, un bloqueador de los canales del calcio, un agente anti-hipertensivo o un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. Los ejemplos no limitantes de segundos fármacos son amlodipina, aspirina, ezetimibe, felodipina, lacidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina y nitrendipina. Otros ejemplos no limitantes de segundos fármacos son atenolol, bucindolol, carvedilol, clonidina, doxazosin, indoramina, labetalol, metildopa, metoprolol, nadolol, oxprenolol, fenoxibenzamina, fentolamina, pindolol, prazosina, propranolol, terazosina, timolol y tolazolina. En algunas variantes, el segundo fármaco es una estatina. Ejemplos no limitantes de las estatinas son atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina. En algunas variantes, el segundo fármaco es un inhibidor de la dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-4).

Ejemplos no limitantes de inhibidores de DPP-4 son sitagliptina, vildagliptina, SYR-322, BMS 477118 y GSK 823093. En algunas variantes, el segundo fármaco es una biguanida. Por ejemplo, la biguanida puede ser metformina. En algunas variantes, el segundo fármaco es una tiazolidindiona (TZD). Ejemplos no limitantes de tiazolidindionas son pioglitazona, rosiglitazona y troglitazona. En algunas variantes, el segundo fármaco es un derivado de sulfonilurea. Ejemplos no limitantes de derivados de sulfonilurea son tolbutamida, acetohexamida, tolazamida, clorpropamida, glipizida, gliburida, glimepirida y gliclazida. En algunas variantes, el segundo fármaco es una meglitinida. Los ejemplos no limitantes de meglitinidas incluyen la repaglinida, mitiglinida y nateglinida. En algunas variantes, el segundo fármaco es insulina. En algunas variantes, el segundo fármaco es un inhibidor de la alfa-glucosidasa. Ejemplos no limitantes de inhibidores de la alfa-glucosidasa son acarbosa, miglitol y voglibosa. En algunas variantes, el segundo fármaco es un análogo del péptido-1 semejante al glucagon. Ejemplos no limitantes de análogos del péptido-1 semejante al glucagon son exenatida y liraglutida. En algunas variantes, el segundo fármaco es un análogo del péptido gástrico inhibitorio. En algunas variantes, el segundo fármaco es un agonista de GPR40. En algunas variantes, el segundo fármaco es un agonista de GPR119. En algunas variantes el segundo fármaco es un agonista de GPR30. En algunas variantes, el segundo fármaco es un activador de la glucoquinasa. En algunas variantes, el segundo fármaco es un antagonista de receptores de glucagon. En algunas variantes, el segundo fármaco es un análogo de amilina. Un ejemplo no limitante de un análogo de amilina es pramlintida. En algunas variantes, el segundo fármaco es un antagonista de receptores IL-1 β . Un ejemplo no limitante de un antagonista de receptores de IL-1 β es anakinra. En algunas variantes, el segundo fármaco es un antagonista o un agonista inverso de receptores de endocannabinoides. Un ejemplo no limitante de un antagonista de receptores de endocannabinoides o un agonista inverso de éstos es rimonabant. En algunas variantes, el segundo fármaco es Orlistat. En algunas variantes, el segundo fármaco es Sibutramina. En algunas variantes, el segundo fármaco es un factor de crecimiento. Ejemplos no limitantes de factores de crecimiento son TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 1.2, VEGF, factor de crecimiento semejante a la insulina I o II, BMP2, BMP4, BMP7, un análogo de GLP-1, un análogo de GIP, un inhibidor de DPP-IV, un agonista de GPR119, un agonista de GPR40, gastrina, factor de crecimiento

epidérmico (EGF), betacelulina, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), insulina, hormona de crecimiento, HGF, un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), un homólogo de FGF, un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), leptina, prolactina, lactógeno placentario, PTHrP, activina, inhibina y proteína asociada a la neogénesis insular (INGAP). Ejemplos adicionales y no limitantes de factores de crecimiento son hormona paratiroidea, calcitonina, interleucina-6 e interleucina-11.

En algunas representaciones, el sujeto es un primate. En algunas variantes, el primate es un ser humano. En otras variantes, el sujeto es una vaca, caballo, perro, gato, cerdo, ratón, rata o cobayo.

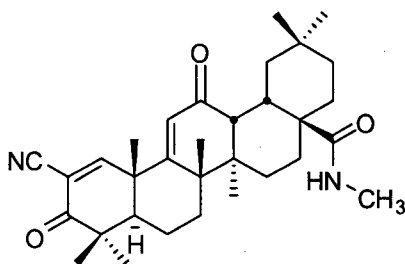
En algunas representaciones, el compuesto se define como:



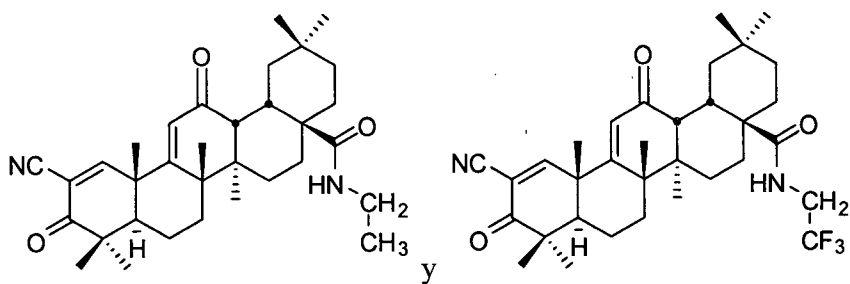
, Fórmula II

en donde Y es: -H, hidroxilo, amino, halógeno, o C₁-C₁₄-alcoxilo, C₂-C₁₄-alqueniloxilo, C₂-C₁₄-alquiniloxilo, C₁-C₁₄-ariloxilo, C₂-C₁₄-arilalcoxilo, C₁-C₁₄-alquilamino, C₂-C₁₄-alquenilamino, C₂-C₁₄-alquinilamino, C₁-C₁₄-arilamino, C₃-C₁₀-arilo, o C₂-C₁₄-arilalquilamino, en donde cualquiera de estos grupos está sustituido o no con un heteroátomo; o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato de dicho compuesto.

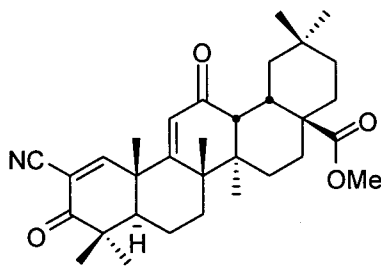
En algunas representaciones, Y es un C₁-C₄-alquilamino no sustituido con heteroátomo, tal que el compuesto de la invención es, por ejemplo:



En algunas representaciones, Y es un C₂-C₄-alquilamino sustituido o no con heteroátomo, tal que el compuesto de la invención es, por ejemplo:



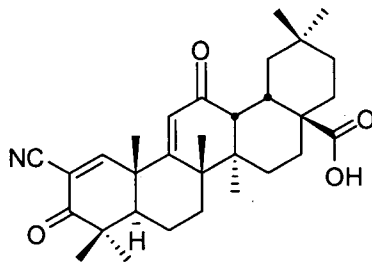
En algunas representaciones, Y es un C₁-C₄-alcoxilo sustituido o no con heteroátomo, tal como un C₁-C₂-alcoxilo no sustituido con heteroátomo. Por ejemplo, un ejemplo no limitante de tal compuesto es:



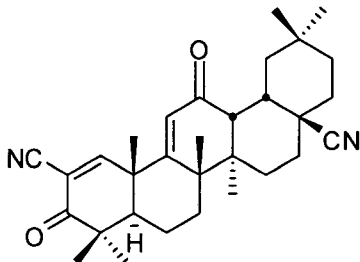
(CDDO-Me, RTA-402).

En algunas variantes, el compuesto es una forma amorfa. En algunas variantes, el compuesto es un forma sólida vidriosa de CDDO-Me que en polvo tiene un patrón de difracción de rayos X con un pico de halo a aproximadamente 13.5 °2θ, como se indica en la FIG. 12C, y una T_g. En algunas variantes, el valor de T_g está dentro de límites entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 135 °C. En algunas variantes, el valor de T_g es entre aproximadamente 125 °C y aproximadamente 130 °C.

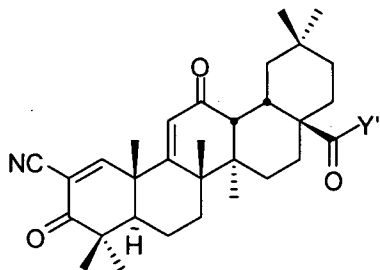
En algunas representaciones, Y es hidroxilo, tal que el compuesto de la invención es, por ejemplo:



En algunas representaciones, el compuesto es:



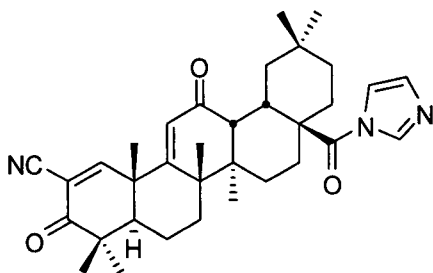
En algunas representaciones, el compuesto se define como:



, Fórmula III

- 5 en donde Y' es un C₁-C₁₄-arilo sustituido o no con heteroátomo; o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato de dicho compuesto.

En algunas representaciones, el compuesto es:



- 10 En algunas variantes de los métodos antedichos, el compuesto está mayormente exento de isómeros ópticos. En algunas variantes de los métodos antedichos, el compuesto está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otras variantes de los métodos antedichos, el compuesto no es una sal.

- 15 En algunas representaciones, el compuesto se formula como una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto y (ii) un excipiente seleccionado del grupo integrado por (A) un carbohidrato, un derivado de carbohidrato, o un polímero de carbohidrato, (B) un polímero orgánico sintético, (C) una sal de ácido orgánico, (D) una proteína, polipéptido o péptido, y (E) un polisacárido de elevado peso molecular. En algunas variantes, el excipiente es un polímero orgánico

sintético. En algunas variantes, el excipiente se selecciona del grupo integrado por una hdroxipropil-metil-celulosa, un poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno o uno de sus copolímeros, y un copolímero de ácido metacrílico – metacrilato de metilo. En algunas variantes, el excipiente es un éster ftalato de hidroxipropil-metil-celulosa. En algunas
5 variantes, el excipiente es PVP/VA. En algunas variantes, el excipiente es un copolímero de ácido metacrílico – acrilato de etilo (1:1). En algunas variantes, el excipiente es copovidona.

Cualquier representación que se analice en este documento con respecto a un aspecto de la invención se aplica también a otros aspectos de la invención, excepto
10 cuando se especifique algo diferente.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán aparentes de la siguiente descripción detallada y los dibujos incluidos. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos o dibujos suministrados, que indican representaciones específicas de la invención, se proporcionan
15 con fines ilustrativos solamente, ya que las personas peritas en la materia entenderán, a partir de esta descripción detallada, que se pueden hacer diversos cambios y modificaciones que están dentro del espíritu y alcance de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de esta especificación y se incluyen para demostrar más claramente ciertos aspectos de la presente invención. Se puede entender mejor la invención si se hace referencia a uno o más de estos dibujos junto con la descripción detallada de representaciones específicas que se presentan en este documento.

FIGS. 1a-d: El RTA 402 reduce el daño renal luego de la isquemia-reperfusión.

Se administró a ratones 2 mg/kg de RTA 402 o simplemente el vehículo (aceite de sésamo) diariamente por gavage oral, empezando en el día 2. En el día 0, se colocó una pinza en la arteria renal izquierda durante 17 minutos y luego se quitó, para inducir isquemia-reperfusión. (FIG. 1a) En el día 1, se obtuvo sangre de los animales en que se realizó el pinzado y en los animales control que se sometieron a cirugía sin pinzar la arteria renal. Se determinaron las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN) como marcador indirecto del daño renal. (FIGS. 1b-d) Se analizaron muestras histológicas de riñón de los ratones tratados con RTA 402 o tratados con vehículo y se les asignaron puntajes con respecto al daño histológico (FIGS. 1b & 1d) e inflamación (FIG. 1c). (FIG. 1d) Las flechas negras (grupo tratado con vehículo) indican dos (entre muchos) túbulos gravemente dañados en la médula externa. Las flechas rojas (grupo RTA 402) muestran dos (entre muchos) de los túbulos no dañados en la médula externa.

FIGS. 2a-c: El RTA 402 reduce la toxicidad renal inducida por cisplatino.

Se administró a ratas 10 mg/kg de RTA 402 o simplemente el vehículo (aceite de sésamo) diariamente por gavage oral, empezando en el día -1. En el día 0, se les colocó a las ratas una inyección intravenosa de cisplatino, 6 mg/kg. Se tomaron muestras de sangre en los días indicados y se determinaron las concentraciones de creatinina (FIG. 2a) y nitrógeno ureico en sangre (BUN) (FIG. 2b) como marcadores del daño renal. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las ratas tratadas con vehículo y las ratas tratadas con RTA 402, en el día 3 (creatinina) y el día 5 (creatinina y BUN). (FIG. 2c) Se observa menos daño en los túbulos proximales de los animales tratados con RTA 402 que en los animales tratados con vehículo.

FIGS. 3a-d: El RTA 402 reduce la concentración de creatinina sérica en monos, perros y ratas. (FIG. 3a) Se administró RTA 402 por vía oral a monos cangrejeros (*Cynomolgus*) en las dosis indicadas, una vez por día durante 28 días. Se muestra la reducción porcentual de creatinina sérica en el día 28 en los monos tratados con RTA 402 en comparación con los monos control tratados con vehículo. (FIG. 3b) Se administró RTA 402 por vía oral a perros “beagle” en las dosis indicadas, diariamente durante tres meses. Los animales del grupo control recibieron vehículo (aceite de sésamo). Se muestra el cambio porcentual en la creatinina sérica a los tres meses, en comparación con el nivel basal. (FIG. 3c) Se administró RTA 402 a ratas Sprague-Dawley por vía oral en las dosis indicadas, una vez por día durante un período de un mes. Se muestra la reducción porcentual en creatinina sérica al completarse el estudio en las ratas tratadas con RTA 402 en comparación con las ratas control tratadas con vehículo. (FIG. 3d) Se administró a ratas Sprague-Dawley la forma amorfa de RTA 402 por vía oral en las dosis indicadas, una vez por día durante un período de tres meses. Se muestra la reducción porcentual en creatinina sérica al completarse el estudio en las ratas tratadas con RTA 402 en comparación con las ratas control tratadas con vehículo. Nota: En las FIGS. 3A, 3C y 3D, “% reducción” en el eje vertical indica el cambio porcentual. Por ejemplo, un valor de -15 en este eje indica una reducción del 15% en la creatinina sérica.

FIGS. 4A-B: El RTA 402 reduce las concentraciones de creatinina sérica y aumenta el índice de filtración glomerular estimado (IFGe) en pacientes humanos con cáncer. FIG. 4A: Se determinó la creatinina sérica en pacientes tratados con RTA 402 que estaban inscritos en un ensayo clínico de Fase I para el tratamiento de cáncer. Los pacientes recibieron RTA 402 (por vía oral) una vez por día durante 21 días en dosis entre 5 mg/día y 1300 mg/día. Se muestra la reducción porcentual en la creatinina sérica con respecto a los niveles basales para los días de estudio indicados. Se observaron disminuciones significativas en las concentraciones de creatinina sérica en los días 15 y 21. FIG. 4B: Se calculó el índice de filtración glomerular estimado (IFGe) para los pacientes, en la FIG. 4A. Se observó un aumento significativo en el IFGe en ambos grupos. Todos los pacientes: $n = 24$; pacientes con valores basales $\geq 1,5$: $n = 5$. Para las FIGS. 4A y 4B, * indica $p \leq 0,04$; † indica $p = 0,01$, y ‡ indica $p \leq 0,01$. Nota: en la FIG. 4A, “% Reducción con respecto al valor basal” en el eje vertical indica el cambio

porcentual. Por ejemplo, una lectura de -15 en este eje indica una reducción del 15% en la creatinina sérica.

FIG. 5: El RTA 402 aumenta el IFG en pacientes humanos con cáncer. Se determinó el índice de filtración glomerular estimado (IFGe) en pacientes tratados con RTA 402 inscritos en un ensayo clínico de varios meses para el tratamiento del cáncer. En el análisis se incluyeron todos los pacientes (n = 11) dosificados durante seis meses. La información de dosificación para estos pacientes se indica en el Ejemplo 5, más abajo.

FIG. 6: La actividad del RTA 402 se correlaciona con la gravedad. Se presenta la reducción en la hemoglobina A1c como una fracción del valor basal inicial. En los grupos con valores basales más altos, por ejemplo, con un valor basal medio $\geq 7,0\%$ A1c o $\geq 7.6\%$ A1c, se encontró una mayor reducción. El grupo de intención de tratar (ITT) incluye a todos los pacientes (n = 53), inclusive a los pacientes que comienzan con un valor de A1c normal.

FIG. 7: La actividad de RTA 402 depende de la dosis. Se presenta la reducción de la hemoglobina A1c con respecto al valor basal inicial. En la gráfica de barras se muestran los resultados medios para todos los pacientes, todos los pacientes con valores basales de A1c $\geq 7,0\%$, cohortes de dosis individuales del grupo $\geq 7.0\%$, y pacientes con nefropatía de Estadio 4 (IFG 15-29 mL/min), en donde n es el número de pacientes por grupo.

FIG. 8: El RTA 402 reduce el número de células endoteliales circulantes (CEC) y CEC positivas para iNOS. Se muestra el número medio de CEC, en células/mL, para el grupo de intención de tratar (ITT) y el grupo con valores basales elevados, antes y después de 28 días de tratamiento con RTA. La reducción para el grupo ITT fue aproximadamente 20%, y la reducción para el grupo con valores basales elevados (>5 CEC/mL) fue aproximadamente 33%. La fracción de CEC positivas para iNOS se redujo en aproximadamente un 29%.

FIG. 9: Aumento en el IFG reversible y dependiente de la dosis, en 28 días. El tratamiento con RTA 402 aumenta el IFG en forma dependiente de la dosis. Se incluyeron todos los pacientes evaluables. Se observó un aumento de $> 30\%$ en los pacientes con nefropatía de Estadio 4.

FIGS. 10A-B: Reducción en los indicadores de gravedad de la nefropatía diabética y resultados. Mejoraron las concentraciones de adiponectina (FIG. 10A) y angiotensina II (FIG. 10B), que están elevadas en los pacientes con nefropatía diabética y se correlacionan con la gravedad de la patología renal. La adiponectina sirve para predecir la mortalidad por todas las causas y nefropatía de estadio final en pacientes con nefropatía diabética. Se incluyen todos los datos disponibles.

FIGS. 11A-C: El RTA 402 reduce los solutos urémicos significativamente. Las gráficas presentan los cambios medios en BUN (FIG. 11A), fosfatos (FIG. 11B) y ácido úrico (FIG. 11C) para todos los pacientes y para los pacientes con valores basales elevados para algún soluto específico.

FIGS. 12A-C: Espectros de difracción de rayos X de muestras en polvo (XRPD) de las formas A y B del RTA-402. La FIG. 12A muestra la forma no micronizada A; la FIG. 12B muestra la forma micronizada A; la FIG. 12C muestra la forma B.

FIG. 13: Curva modulada de calorimetría de escaneo diferencial (MDSC) para la forma A de RTA-402. La sección de curva que se muestra en la parte ampliada concuerda con una temperatura de transición a vidrio (T_g).

FIG. 14: Curva modulada de calorimetría de escaneo diferencial (MDSC) para la forma B de RTA-402. La sección de curva que se muestra en la parte ampliada concuerda con una temperatura de transición a vidrio (T_g).

FIG. 15: Mejor disponibilidad biológica de la forma B (amorfa) en monos cangrejeros. La figura muestra una gráfica representativa del área bajo la curva para la forma A y la forma B, luego de una administración oral de 4,1 mg/kg a monos cangrejeros. Cada punto representa la media de la concentración plasmática de éster metílico de CDDO en 8 animales. Las barras de error representan la desviación estándar dentro de la población estudiada.

DESCRIPCIÓN DE LAS REPRESENTACIONES ILUSTRATIVAS

I. La presente invención

La presente invención se refiere a nuevos métodos de tratamiento y prevención de la nefropatía y trastornos relacionados, incluyendo la diabetes y patología cardiovascular, que involucran el uso de triterpenoides.

II. Definiciones

Tal como se usa en este documento, el término “amino” significa $-\text{NH}_2$; el término “nitro” significa $-\text{NO}_2$; el término “halógeno” designa $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$ o $-\text{I}$; el término “mercapto” significa $-\text{SH}$; el término “ciano” significa $-\text{CN}$; el término “sililo” significa $-\text{SiH}_3$, y el término “hidroxilo o hidroxilo” significa $-\text{OH}$.

El término “sustituido con heteroátomo,” cuando se usa para modificar una clase de radicales orgánicos (por ejemplo, alquilo, arilo, acilo, etc.), significa que un átomo de hidrógeno, o más de uno, de ese radical ha sido reemplazado por un heteroátomo, o por un grupo que contiene un heteroátomo. Los ejemplos de heteroátomos y grupos que contienen heteroátomos incluyen: hidroxilo, ciano, alcoxilo, $=\text{O}$, $=\text{S}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, amino o $-\text{SH}$. Más adelante se definen específicamente y en mayor detalle algunos radicales orgánicos sustituidos con un heteroátomo.

El término “no sustituido con heteroátomo,” cuando se usa para modificar una clase de radicales orgánicos (por ejemplo, alquilo, arilo, acilo, etc.), significa que ningún átomo de hidrógeno de dicho radical ha sido reemplazado por un heteroátomo o por un grupo que contiene un heteroátomo. La sustitución de un átomo de hidrógeno por un átomo de carbono o por un grupo integrado solamente por átomos de carbono y átomos de hidrógeno, no es suficiente para que un grupo esté sustituido con heteroátomo. Por ejemplo, el grupo $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CH}$ es un ejemplo de un grupo arilo no sustituido con heteroátomo, y el grupo $-\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$ es un ejemplo de un grupo arilo sustituido con heteroátomo. Más adelante se definen específicamente y en mayor detalle algunos radicales orgánicos no sustituidos con heteroátomo.

El término “alquilo” incluye grupos alquilo de cadena recta, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con

un heteroátomo de alquilo y grupos alquilo sustituidos con un heteroátomo de cicloalquilo. El término “C_n-alquilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además no tiene enlaces carbono-carbono dobles o triples, que además tiene un total de n átomos de carbono, todos los cuales son no aromáticos, 3 o más átomos de hidrógeno y ningún heteroátomo. Por ejemplo, un C₁-C₁₀-alquilo no sustituido con heteroátomo tiene 1 a 10 átomos de carbono. Los grupos -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH(CH₂)₂ (ciclopropilo), -CH₂CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -CH₂CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CH₂C(CH₃)₃, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo son todos ejemplos de grupos alquilo no sustituidos con un heteroátomo. El término “C_n-alquilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de carbono saturado como punto de unión, ningún enlace carbono-carbono doble o triple, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene un total de n átomos de carbono, todos los cuales son no aromáticos, 0, 1, o más de un átomo de hidrógeno, por lo menos un heteroátomo, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, C₁-C₁₀-alquilo sustituido con heteroátomo tiene 1 a 10 átomos de carbono. Los siguientes grupos son todos ejemplos de grupos alquilo sustituidos con heteroátomo: trifluorometilo, -CH₂F, -CH₂Cl, -CH₂Br, -CH₂OH, -CH₂OCH₃, -CH₂OCH₂CH₃, -CH₂OCH₂CH₂CH₃, -CH₂OCH(CH₃)₂, -CH₂OCH(CH₂)₂, -CH₂OCH₂CF₃, -CH₂OCOCH₃, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -CH₂N(CH₃)₂, -CH₂NHCH₂CH₃, -CH₂N(CH₃)CH₂CH₃, -CH₂NHCH₂CH₂CH₃, -CH₂NHCH(CH₃)₂, -CH₂NHCH(CH₂)₂, -CH₂N(CH₂CH₃)₂, -CH₂CH₂F, -CH₂CH₂Cl, -CH₂CH₂Br, -CH₂CH₂I, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂OCOCH₃, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂N(CH₃)₂, -CH₂CH₂NHCH₂CH₃, -CH₂CH₂N(CH₃)CH₂CH₃, -CH₂CH₂NHCH₂CH₂CH₃, -CH₂CH₂NHCH(CH₃)₂, -CH₂CH₂NHCH(CH₂)₂, -CH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂, -CH₂CH₂NHCO₂C(CH₃)₃ y -CH₂Si(CH₃)₃.

El término “C_n-alquenilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene por lo menos un enlace carbono-carbono doble y no aromático, pero ningún enlace carbono-carbono triple, un total de n átomos de carbono, tres o más átomos de hidrógeno y ningún heteroátomo. Por ejemplo, un C₂-C₁₀-alquenilo no sustituido con heteroátomo tiene 2 a

10 átomos de carbono. Los grupos alquenilo no sustituidos con un heteroátomo incluyen:

$-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$,
 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$,

- 5 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2$ y $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$. El término “ C_n -alquenilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de carbono no aromático como punto de unión y por lo menos un enlace carbono-carbono doble y no aromático, pero ningún enlace carbono-carbono triple, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene un total de n átomos de carbono, 0, 1, o
- 10 más de un átomo de hidrógeno, y por lo menos un heteroátomo, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C_2 - C_{10} -alquenilo sustituido con heteroátomo tiene 2 a 10 átomos de carbono. Los grupos $-\text{CH}=\text{CHF}$, $-\text{CH}=\text{CHCl}$ y $-\text{CH}=\text{CHBr}$ son ejemplos de grupos alquenilo sustituidos con heteroátomo.

- 15 El término “ C_n -alquinilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene por lo menos un enlace carbono-carbono triple, un total de n átomos de carbono, por lo menos un átomo de hidrógeno y ningún heteroátomo. Por ejemplo, un C_2 - C_{10} -alquinilo no sustituido con heteroátomo tiene 2 a 10 átomos de carbono. Los grupos $-\text{C}\equiv\text{CH}$,
- 20 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$, y $-\text{C}\equiv\text{CC}_6\text{H}_5$ son ejemplos de grupos alquinilo no sustituidos con heteroátomo. El término “ C_n -alquinilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de carbono no aromático como punto de unión y por lo menos un enlace carbono-carbono triple, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, y con un total de n átomos de carbono, 0, 1, o más de un átomo de
- 25 hidrógeno y por lo menos un heteroátomo, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C_2 - C_{10} -alquinilo sustituido con heteroátomo tiene 2 a 10 átomos de carbono. El grupo $-\text{C}\equiv\text{CSi}(\text{CH}_3)_3$ es un ejemplo de un grupo alquinilo sustituido con heteroátomo.

- 30 El término “ C_n -arilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de carbono como punto de unión, en donde el átomo de carbono es parte de una estructura de anillo aromático que contiene solamente átomos de carbono,

que además tiene un total de n átomos de carbono, 5 o más átomos de hidrógeno y ningún heteroátomo. Por ejemplo, un C_6 - C_{10} -arilo no sustituido con heteroátomo tiene 6 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos arilo no sustituidos con heteroátomo incluyen fenilo, metilfenilo, (dimetil)fenilo, $-C_6H_4CH_2CH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_2CH_3$,
5 $-C_6H_4CH(CH_3)_2$, $-C_6H_4CH(CH_2)_2$, $-C_6H_3(CH_3)CH_2CH_3$, $-C_6H_4CH=CH_2$,
 $-C_6H_4CH=CHCH_3$, $-C_6H_4C\equiv CH$, $-C_6H_4C\equiv CCH_3$, naftilo y el radical derivado de bifenilo. El término “arilo no sustituido con heteroátomo” incluye los grupos arilo carbocíclicos, grupos biarilo y radicales derivados de hidrocarburos policíclicos fusionados (PAH). El término “ C_n -arilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un
10 radical que tiene un solo átomo de carbono aromático o un solo heteroátomo aromático como punto de unión, que además tiene un total de n átomos de carbono, por lo menos un átomo de hidrógeno, y por lo menos un heteroátomo, y además en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C_1 - C_{10} -heteroarilo no sustituido con heteroátomo tiene 1 a 10
15 átomos de carbono. El término “arilo sustituido con heteroátomo” incluye los grupos heteroarilo. También incluye aquellos grupos derivados de los compuestos: pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina, y semejantes. Otros ejemplos de grupos arilo sustituidos con heteroátomo incluyen los grupos: $-C_6H_4F$, $-C_6H_4Cl$, $-C_6H_4Br$, $-C_6H_4I$, $-C_6H_4OH$,
20 $-C_6H_4OCH_3$, $-C_6H_4OCH_2CH_3$, $-C_6H_4OCOCH_3$, $-C_6H_4OC_6H_5$, $-C_6H_4NH_2$,
 $-C_6H_4NHCH_3$, $-C_6H_4NHCH_2CH_3$, $-C_6H_4CH_2Cl$, $-C_6H_4CH_2Br$, $-C_6H_4CH_2OH$,
 $-C_6H_4CH_2OCOCH_3$, $-C_6H_4CH_2NH_2$, $-C_6H_4N(CH_3)_2$, $-C_6H_4CH_2CH_2Cl$,
 $-C_6H_4CH_2CH_2OH$, $-C_6H_4CH_2CH_2OCOCH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_2NH_2$, $-C_6H_4CH_2CH=CH_2$,
 $-C_6H_4CF_3$, $-C_6H_4CN$, $-C_6H_4C\equiv CSi(CH_3)_3$, $-C_6H_4COH$, $-C_6H_4COCH_3$,
25 $-C_6H_4COCH_2CH_3$, $-C_6H_4COCH_2CF_3$, $-C_6H_4COC_6H_5$, $-C_6H_4CO_2H$, $-C_6H_4CO_2CH_3$,
 $-C_6H_4CONH_2$, $-C_6H_4CONHCH_3$, $-C_6H_4CON(CH_3)_2$, furanilo, tienilo, piridilo, pirrolilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazoilo, quinolilo e indolilo.

El término “ C_n -arilalquilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de carbono saturado como punto de unión, que además tiene un
30 total de n átomos de carbono, en donde por lo menos 6 de los átomos de carbono forman una estructura de anillo aromático que contiene solamente átomos de carbono, 7 o más

átomos de hidrógeno y ningún heteroátomo. Por ejemplo, un C₇-C₁₀-arilalquilo no sustituido con heteroátomo tiene 7 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos de arilalquilos no sustituidos con heteroátomo incluyen fenilmetilo (bencilo) y feniletilo. El término “C_n-arilalquilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo

5 átomo de carbono saturado como punto de unión, que además tiene un total de n átomos de carbono, 0, 1, o más de un átomo de hidrógeno, y por lo menos un heteroátomo, en donde por lo menos uno de los átomos de carbono está incorporado en una estructura de anillo aromático, y además en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C₂-C₁₀-

10 heteroarilalquilo sustituido con heteroátomo tiene 2 a 10 átomos de carbono.

El término “C_n-acilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de carbono de un grupo carbonilo como punto de unión, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene un total de n átomos de carbono, 1 o más átomos de hidrógeno, un total de un átomo de oxígeno y

15 ningún heteroátomo adicional. Por ejemplo, un C₁-C₁₀-acilo no sustituido con heteroátomo tiene 1 a 10 átomos de carbono. Los grupos -COH, -COCH₃, -COCH₂CH₃, -COCH₂CH₂CH₃, -COCH(CH₃)₂, -COCH(CH₂)₂, -COC₆H₅, -COC₆H₄CH₃, -COC₆H₄CH₂CH₃, -COC₆H₄CH₂CH₂CH₃, -COC₆H₄CH(CH₃)₂, -COC₆H₄CH(CH₂)₂, y -COC₆H₃(CH₃)₂, son ejemplos de grupos acilo no sustituidos con heteroátomo. El

20 término “C_n-acilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de carbono como punto de unión, siendo el átomo de carbono parte de un grupo carbonilo, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene un total de n átomos de carbono, 0, 1, o más de un átomo de hidrógeno, por lo menos un heteroátomo adicional además del oxígeno del grupo carbonilo, en donde

25 cada heteroátomo adicional se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C₁-C₁₀-acilo sustituido con heteroátomo tiene 1 a 10 átomos de carbono. El término acilo sustituido con heteroátomo incluye los grupos carbamoilo, tiocarboxilato y ácido tiocarboxílico. Los grupos -COCH₂CF₃, -CO₂H, -CO₂CH₃, -CO₂CH₂CH₃, -CO₂CH₂CH₂CH₃, -CO₂CH(CH₃)₂, -CO₂CH(CH₂)₂,

30 -CONH₂, -CONHCH₃, -CONHCH₂CH₃, -CONHCH₂CH₂CH₃, -CONHCH(CH₃)₂,

$-\text{CONHCH}(\text{CH}_2)_2$, $-\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_3$, $-\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ y $-\text{CONHCH}_2\text{CF}_3$, son ejemplos de grupos acilo sustituidos con heteroátomo.

5 El término “ C_n -alcoxilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura $-\text{OR}$, en donde R es C_n -alquilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Los grupos alcoxilo no sustituidos con heteroátomo incluyen: $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{OCH}(\text{CH}_2)_2$. El término “ C_n -alcoxilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura $-\text{OR}$, en donde R es un C_n -alquilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Por ejemplo, $-\text{OCH}_2\text{CF}_3$ es un grupo
10 alcoxilo sustituido con heteroátomo.

El término “ C_n -alqueniloxilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura $-\text{OR}$, en donde R es un C_n -alquenilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. El término “ C_n -alqueniloxilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura
15 $-\text{OR}$, en donde R es un C_n -alquenilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente.

El término “ C_n -alquiniloxilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura $-\text{OR}$, en donde R es un C_n -alquinilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. El término “ C_n -alquiniloxilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura
20 $-\text{OR}$, en donde R es un C_n -alquinilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente.

El término “ C_n -ariloxilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura $-\text{OAr}$, en donde Ar es un C_n -arilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Un ejemplo de un grupo ariloxilo no sustituido con heteroátomo es $-\text{OC}_6\text{H}_5$. El término “ C_n -ariloxilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura $-\text{OAr}$, en donde Ar es un C_n -arilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente.
25

El término “ C_n -arilalquiloxilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura $-\text{OR}_{\text{Ar}}$, en donde R_{Ar} es un C_n -arilalquilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. El término
30

“C_n-arilalquiloxilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la estructura -OR_{Ar}, en donde R_{Ar} es un C_n-arilalquilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente.

El término “C_n-aciloxilo no sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que
5 tiene la estructura -OAc, en donde Ac es un C_n-acilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Un grupo aciloxilo no sustituido con heteroátomo incluye grupos alquilcarboniloxilo y arilcarboniloxilo. Por ejemplo, -OCOCH₃ es un ejemplo de un grupo aciloxilo no sustituido con heteroátomo. El término “C_n-aciloxilo sustituido con heteroátomo” se refiere a un grupo que tiene la
10 estructura -OAc, en donde Ac es un C_n-acilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Un grupo aciloxilo sustituido con heteroátomo incluye grupos alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo y alquiltiocarbonilo.

El término “C_n-alquilamino no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical
15 que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene uno o dos átomos de carbono saturados unidos al átomo de nitrógeno, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que contiene un total de n átomos de carbono, todos los cuales son no aromáticos, 4 o más átomos de hidrógeno, un total de 1 átomo de nitrógeno y ningún heteroátomo adicional. Por ejemplo, un C₁-C₁₀-alquilamino
20 no sustituido con heteroátomo tiene 1 a 10 átomos de carbono. El término “C_n-alquilamino no sustituido con heteroátomo” incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-alquilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Un grupo alquilamino no sustituido con heteroátomo incluiría -NHCH₃, -NHCH₂CH₃, -NHCH₂CH₂CH₃, -NHCH(CH₃)₂, -NHCH(CH₂)₂,
25 -NHCH₂CH₂CH₂CH₃, -NHCH(CH₃)CH₂CH₃, -NHCH₂CH(CH₃)₂, -NHC(CH₃)₃, -N(CH₃)₂, -N(CH₃)CH₂CH₃, -N(CH₂CH₃)₂, *N*-pirrolidinilo y *N*-piperidinilo. El término “C_n-alquilamino sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene uno o dos átomos de carbono saturados unidos al átomo de nitrógeno, ningún enlace carbono-carbono doble o triple,
30 que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene un total de n átomos de carbono, todos los cuales son no aromáticos, 0, 1, o más de un

átomo de hidrógeno, y por lo menos un heteroátomo adicional, es decir, además del átomo de nitrógeno en el punto de unión, en donde cada heteroátomo adicional se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C₁-C₁₀-alquilamino sustituido con heteroátomo tiene 1 a 10 átomos de carbono. El término "C_n-alquilamino sustituido con heteroátomo" incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-alquilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente.

El término "C_n-alquenilamino no sustituido con heteroátomo" se refiere a un radical que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene uno o dos átomos de carbono unidos al átomo de nitrógeno, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que contiene por lo menos un enlace carbono-carbono doble y no aromático, un total de n átomos de carbono, 4 o más átomos de hidrógeno, un total de un átomo de nitrógeno y ningún heteroátomo adicional. Por ejemplo, un C₂-C₁₀-alquenilamino no sustituido con heteroátomo tiene 2 a 10 átomos de carbono. El término "C_n-alquenilamino no sustituido con heteroátomo" incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-alqueno no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Los ejemplos de grupo C_n-alquenilamino no sustituidos con heteroátomo también incluyen grupos dialquenilamino y alquil(alquenil)amino. El término "C_n-alquenilamino sustituido con heteroátomo" se refiere a un radical que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión y por lo menos un enlace carbono-carbono doble y no aromático, sin ningún enlace carbono-carbono triple, que además tiene uno o dos átomos de carbono unidos al átomo de nitrógeno, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene un total de n átomos de carbono, 0, 1, o más de un átomo de hidrógeno, y por lo menos un heteroátomo adicional, es decir, además del átomo de nitrógeno en el punto de unión, en donde cada heteroátomo adicional se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C₂-C₁₀-alquenilamino sustituido con heteroátomo tiene 2 a 10 átomos de carbono. El término "C_n-alquenilamino sustituido con heteroátomo" incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-alqueno sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente.

El término “C_n-alquilamino no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene uno o dos átomos de carbono unidos al átomo de nitrógeno, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que contiene por lo menos un enlace carbono-carbono triple, un total de n átomos de carbono, por lo menos un átomo de hidrógeno, un total de un átomo de nitrógeno y sin ningún heteroátomo adicional. Por ejemplo, un C₂-C₁₀-alquilamino no sustituido con heteroátomo tiene 2 a 10 átomos de carbono. El término “C_n-alquilamino no sustituido con heteroátomo” incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-alquilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Un grupo alquilamino incluye grupos dialquilamino y alquil(alquil)amino. El término “C_n-alquilamino sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene uno o dos átomos de carbono unidos al átomo de nitrógeno, que además tiene por lo menos un enlace carbono-carbono triple y no aromático, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, y que además tiene un total de n átomos de carbono, 0, 1, o más de un átomo de hidrógeno, y por lo menos un heteroátomo adicional, es decir, además del átomo de nitrógeno en el punto de unión, en donde cada heteroátomo adicional se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C₂-C₁₀-alquilamino sustituido con heteroátomo tiene 2 a 10 átomos de carbono. El término “C_n-alquilamino sustituido con heteroátomo” incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-alquilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente.

El término “C_n-arilamino no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene por lo menos una estructura de anillo aromático unida al átomo de nitrógeno, en donde la estructura de anillo aromático contiene solamente átomos de carbono, que además tiene un total de n átomos de carbono, 6 o más átomos de hidrógeno, un total de un átomo de nitrógeno y ningún heteroátomo adicional. Por ejemplo, un C₆-C₁₀-arilamino no sustituido con heteroátomo tiene 6 a 10 átomos de carbono. El término “C_n-arilamino no sustituido con heteroátomo” incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-arilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término

anteriormente. Un grupo arilamino no sustituido con heteroátomo incluye grupos diarilamino y alquil(aril)amino. El término “C_n-arilamino sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene un total de n átomos de carbono, por lo menos un átomo de hidrógeno, por lo menos un heteroátomo adicional, es decir, además del átomo de nitrógeno en el punto de unión, en donde por lo menos uno de los átomos de carbono está incorporado en una o más estructuras de anillo aromático, y además en donde cada heteroátomo adicional se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C₆-C₁₀-arilamino sustituido con heteroátomo tiene 6 a 10 átomos de carbono.

El término “C_n-arilamino sustituido con heteroátomo” incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-arilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Un grupo arilamino sustituido con heteroátomo incluye los grupos heteroarilamino.

El término “C_n-arilalquilamino no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene uno o dos átomos de carbono saturados unidos al átomo de nitrógeno, que además tiene un total de n átomos de carbono, en donde por lo menos 6 de los átomos de carbono forman una estructura de anillo aromático que contiene solamente átomos de carbono, 8 o más átomos de hidrógeno, un total de un átomo de nitrógeno y ningún heteroátomo adicional.

Por ejemplo, un C₇-C₁₀-arilalquilamino no sustituido con heteroátomo tiene 7 a 10 átomos de carbono. El término “C_n-arilalquilamino no sustituido con heteroátomo” incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-arilalquilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. Un grupo arilalquilamino incluye grupos diarilalquilamino. El término “C_n-arilalquilamino sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene por lo menos uno o dos átomos de carbono saturados unidos al átomo de nitrógeno, que además tiene un total de n átomos de carbono, 0, 1, o más de un átomo de hidrógeno, por lo menos un heteroátomo adicional, es decir, además del átomo de nitrógeno en el punto de unión, en donde por lo menos uno de los átomos de carbono está incorporado en un anillo aromático, y además, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl,

Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C₇-C₁₀-arilalquilamino sustituido con heteroátomo tiene 7 a 10 átomos de carbono. El término “un C_n-arilalquilamino sustituido con heteroátomo” incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-arilalquilo sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. El término

5 “arilalquilamino sustituido con heteroátomo” incluye el término “heteroarilalquilamino”.

El término amido incluye grupos *N*-alquil-amido, *N*-aril-amido, *N*-arilalquil-amido, acilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino y ureído. El grupo -NHCOCH₃ es un ejemplo de un grupo amido no sustituido con heteroátomo. El término “C_n-amido no sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo átomo

10 de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene un grupo carbonilo unido a través de su átomo de carbono al átomo de nitrógeno, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene un total de n átomos de carbono, 1 o más átomos de hidrógeno, un total de un átomo de oxígeno, un total de un átomo de nitrógeno y ningún heteroátomo adicional. Por ejemplo, un C₁-C₁₀-amido no sustituido con

15 heteroátomo tiene 1 a 10 átomos de carbono. El término “C_n-amido no sustituido con heteroátomo” incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-acilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. El término “C_n-amido sustituido con heteroátomo” se refiere a un radical que tiene un solo

20 átomo de nitrógeno en el punto de unión, que además tiene un grupo carbonilo unido a través de su átomo de carbono al átomo de nitrógeno, que además tiene una estructura lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que además tiene un total de n átomos de carbono aromáticos o no aromáticos, 0, 1, o más de un átomo de hidrógeno, por lo menos un heteroátomo adicional además del oxígeno del grupo carbonilo y el átomo de nitrógeno en el punto de unión, en donde cada heteroátomo adicional se selecciona

25 independientemente del grupo integrado por N, O, F, Cl, Br, I, Si, P y S. Por ejemplo, un C₁-C₁₀-amido sustituido con heteroátomo tiene 1 a 10 átomos de carbono. El término “C_n-amido sustituido con heteroátomo” incluye grupos que tienen la estructura -NHR, en donde R es un C_n-acilo no sustituido con heteroátomo, según se ha definido ese término anteriormente. El grupo -NHCO₂CH₃, es un ejemplo de un grupo amido sustituido con

30 heteroátomo.

Asimismo, la intención es que los átomos que integran los compuestos de la presente invención incluyan todas las formas isotópicas de dichos átomos. Los isótopos, conforme a este documento, incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero distinto número de masa. Como ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen el tritio y el deuterio, y los isótopos del carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C . En forma semejante, se contempla que uno o más carbonos de un compuesto de la presente invención podrían reemplazarse por átomos de silicio. En forma semejante, se contempla que uno o más átomos de oxígeno de un compuesto de la presente invención podrían reemplazarse por átomos de azufre o de selenio.

Cualquier valencia no definida en un átomo de una estructura indicada en esta solicitud implícitamente representa un átomo de hidrógeno unido al átomo.

Conforme a este documento, un “auxiliar quirál” se refiere a un grupo quirál separable que es capaz de influenciar la selectividad estérica de una reacción. Las personas peritas en la materia conocen dichos compuestos, y muchos de éstos están disponibles en el comercio.

El uso de la palabra “un” o “una” junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o las especificaciones puede tener el significado “uno” pero también concuerda con el significado “uno o más”, “por lo menos un” y “uno o más de un”.

En toda esta solicitud, el término “aproximadamente” indica que un valor incluye la variación debida al error inherente para el dispositivo, el método usado para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

Los términos “comprenden,” “tienen” e “incluyen” son verbos indefinidos. Cualquier forma o conjugación de uno o más de estos verbos, tales como “comprende,” “que comprenden,” “tiene,” “con,” “incluye” y “que incluyen,” son también formas indefinidas. Por ejemplo, cualquier método que “comprende,” “tiene” o “incluye” uno o más pasos no está limitado a tener solamente dichos pasos, sean uno o más, y también se refiere a otros pasos no listados.

El término “eficaz,” cuando se usa en la especificación y/o las reivindicaciones, significa adecuado para lograr un resultado deseado, anticipado o previsto.

El término “hidrato” o “hidratado” cuando se usa como modificador de un compuesto significa que el compuesto tiene agua asociada a cada una de sus moléculas,

que puede ser menos de una molécula de agua (por ejemplo, semihidrato), una molécula (por ejemplo, monohidrato), o más de una (por ejemplo, dihidrato), como por ejemplo en las formas sólidas del compuesto.

5 Según se usa en este documento, el término “CI₅₀” se refiere a una dosis inhibidora que consigue el 50% de la máxima respuesta obtenida.

Un “isómero” de un primer compuesto es un compuesto independiente en donde cada molécula contiene los mismo átomos que el primer compuesto, pero en el cual difiere la configuración tridimensional de esos átomos.

10 Según se usa en este documento, el término “paciente” o “sujeto” se refiere a un organismo de mamífero vivo, tal como un ser humano, mono, vaca, oveja, cabra, perro, gato, ratón, rata, cobayo o especies transgénicas de éstos. En ciertas representaciones, el paciente o el sujeto son un primate. Los ejemplos no limitantes de sujetos humanos son adultos, jóvenes, niños, lactantes y fetos.

15 “Farmacéuticamente aceptable” significa algo que es útil para preparar una composición farmacéutica que por lo general es inocuo, no tóxico, no tiene cualidades biológicamente indeseables ni indeseables por otros motivos e incluye lo que es aceptable para uso veterinario, además del uso farmacéutico para seres humanos.

20 “Sales farmacéuticamente aceptables” significa sales de compuestos de la presente invención que son farmacéuticamente aceptables, como se ha definido más arriba, y que tienen la actividad farmacológica deseada. Dichas sales incluyen sales de adición formadas con ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y semejantes; o con ácidos orgánicos como el ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido 4,4'-metilen-bis(3-hidroxi-2-en-1-carboxílico), ácido 25 4-metil-biciclo[2.2.2]oct-2-en-1-carboxílico, ácido acético, ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alifáticos sulfúricos, ácidos aromáticos sulfúricos, ácido bencensulfónico, ácido benzoico, ácido alcanforsulfónico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido etanosulfónico, ácido fumárico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido 30 heptanoico, ácido hexanoico, ácido hidroxinaftoico, ácido láctico, ácido laurilsulfúrico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico,

ácido mucónico, ácido *o*-(4-hidroxibenzoíl)benzoico, ácido oxálico, ácido *p*-clorobencensulfónico, ácidos alcanoicos fenil-sustituídos, ácido propiónico, ácido *p*-toluensulfónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido terc-butilacético, ácido trimetilacético, y semejantes. Las sales

5 farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición básica que se pueden formar cuando los protones ácidos presentes son capaces de reaccionar con bases orgánicas o inorgánicas. Las bases inorgánicas aceptables incluyen el hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de aluminio e hidróxido de calcio. Las bases orgánicas aceptables incluyen la etanolamina, dietanolamina, trietanolamina,

10 trometamina, *N*-metilglucamina y semejantes. Se debe reconocer que el anión o catión que forman parte de alguna sal de esta invención no tienen importancia crítica siempre que la sal total sea farmacológicamente aceptable. Se presentan ejemplos adicionales de sales farmacéuticamente aceptables y sus métodos de preparación y uso en *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use* (P. H. Stahl & C. G. Wermuth editores,

15 Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002),

Según se usa en este documento, “predominantemente un enantiómero” significa que un compuesto tiene por lo menos aproximadamente 85% de un enantiómero, o de mayor preferencia, por lo menos aproximadamente 90% de un enantiómero, o de aún mayor preferencia, por lo menos aproximadamente 95% de un enantiómero, o de máxima

20 preferencia por lo menos aproximadamente 99% de un enantiómero. En forma semejante, la frase “esencialmente exento de otros isómeros ópticos” significa que la composición contiene como máximo aproximadamente 15% de otro enantiómero o diastereoisómero, de mayor preferencia, como máximo aproximadamente 10% de otro enantiómero o diastereoisómero, de aún mayor preferencia, como máximo aproximadamente 5% de otro

25 enantiómero o diastereoisómero, y de máxima preferencia como máximo aproximadamente 1% de otro enantiómero o diastereoisómero.

“Prevención” o “prevenir” incluyen: (1) inhibir el inicio de una enfermedad en un sujeto o paciente que podrían estar en riesgo y/o predispuestos a la enfermedad pero que aún no experimenten ni muestren la patología o sintomatología totales o parciales de la

30 enfermedad, y/o (2) retrasar el inicio de la patología o sintomatología de una enfermedad en un sujeto o paciente que podrían estar en riesgo y/o predispuestos a la enfermedad

pero que aún no experimenten ni muestren la patología o sintomatología totales o parciales de la enfermedad.

El término “saturado” cuando se refiere a un átomo significa que el átomo está conectado a otros átomos solamente a través de enlaces simples.

5 Un “estereoisómero” o “un isómero óptico” es un isómero de cierto compuesto en donde los mismos átomos están unidos a los mismos otros átomos, pero con diferente configuración tridimensional de dichos átomos. Los “enantiómeros” son estereoisómeros de cierto compuesto en que uno es la imagen especular del otro, como una mano izquierda y una mano derecha. Los “diastereoisómeros” son estereoisómeros de cierto
10 compuesto que no son enantiómeros.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” significan una cantidad que cuando se administra a un sujeto o paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad.

“Tratamiento” o “tratar” incluyen (1) inhibir una enfermedad en un sujeto o
15 paciente que experimentan o muestran la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, detener el desarrollo de la patología y/o sintomatología), (2) mejorar la enfermedad en un sujeto o paciente que experimentan o muestran la patología o sintomatología de la enfermedad (por ejemplo, revertir la patología y/o sintomatología), y/o (3) efectuar cualquier disminución cuantificable de la enfermedad en un sujeto o
20 paciente que experimentan o muestran la patología o sintomatología de la enfermedad.

Según se usa en este documento, el término “hidrosoluble” o “soluble en agua” significan que el compuesto se disuelve en agua por lo menos hasta 0,010 mol/litro o que se clasifica como soluble en la literatura precedente.

Otras abreviaturas usadas en este documento son las siguientes: DMSO,
25 dimetilsulfóxido; NO, óxido nítrico; iNOS, óxido nítrico sintetasa inducible; COX-2, ciclooxigenasa-2; NGF, factor de crecimiento nervioso; IBMX, isobutylmetilxantina; FBS, suero bovino fetal; GPDH, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa; RXR, receptor de retinoide X; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; IFN γ o IFN- γ , interferón- γ ; LPS, lipopolisacárido endotóxico bacteriano; TNF α o TNF- α , factor de necrosis tumoral
30 α ; IL-1 β , interleucina 1 β ; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; MTBE,

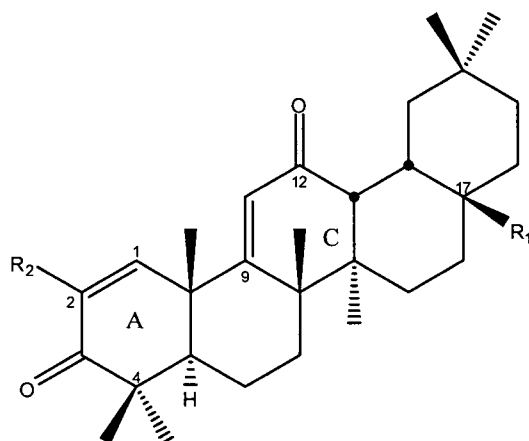
metil-*terc*-butil-éter; MTT, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio; TCA, ácido tricloroacético; HO-1, hem oxigenasa inducible.

Las definiciones anteriores sobreseen cualquier definición diferente que aparezca en cualquier referencia que esté incorporada en este documento por referencia.

5 **III. Triterpenoides sintéticos**

Los triterpenoides, que se sintetizan en las plantas por ciclación del escualeno, se usan con fines medicinales en muchos países asiáticos; se sabe que algunos de ellos, como el ácido ursólico y el ácido oleanólico, son antiinflamatorios y anti-carcinogénicos (Huang y col., 1994; Nishino y col., 1988). Sin embargo, la actividad biológica de estas
10 moléculas naturales es relativamente débil; por lo tanto, se intentó la síntesis de nuevos análogos para aumentar su potencia (Honda y col., 1997; Honda y col., 1998). Las investigaciones posteriores han identificado varios compuestos sintéticos con mejor actividad que los triterpenoides naturales.

El trabajo continuo en el mejoramiento de la actividad antiinflamatoria y anti-proliferativa de los análogos del ácido oleanólico y del ácido ursólico llevó al
15 descubrimiento del ácido 2-ciano-3,12-dioxoolean-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO, RTA-402) y compuestos relacionados (por ejemplo, CDDO-Me, TP-225, CDDO-Im) (Honda y col., 1997, 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2002; Suh y col., 1998; 1999; 2003; Place y col., 2003; Liby y col., 2005). En la inducción de genes citoprotectores a través de la
20 señalización Keap1-Nrf2-elemento de respuesta antioxidante (ARE), una evaluación reciente de la actividad de estructuras de 15 triterpenoides notó la importancia de los grupos aceptores de Michael en los anillos A y C, un grupo nitrilo en C-2 del anillo A, y que los sustituyentes en C-17 afectaban la acción farmacodinámica *in vivo* (Yates y col., 2007).



En general, el CDDO es el prototipo de un gran número de compuestos en una familia de agentes que han demostrado ser útiles en diversos contextos. Por ejemplo, se informa que el CDDO-Me y CDDO-Im tienen la habilidad de modular el factor de crecimiento transformante β (TGF- β)/señalización Smad en varios tipos de células (Suh y col., 2003; Minns y col., 2004; Mix y col., 2004). Se sabe que ambos son potentes inductores de la señalización de hem-oxigenasa-1 y la señalización Nrf2/ARE (Liby y col., 2005), y se ha demostrado que una serie de análogos sintéticos de triterpenoides (TP) también son potentes inductores de la respuesta de fase 2, es decir, el aumento de la oxidoreductasa NAD(P)H-quinona y hem oxigenasa 1 (HO-1), que es un importante protector contra el estrés oxidativo y electrofílico en las células (Dinkova-Kostova y col., 2005). Así como los inductores de fase 2 previamente identificados, se ha demostrado que los análogos de TP usan la vía de señalización Nrf2-Keap1-ARE.

El RTA 402 (metil bardoxolona), uno de los compuestos para usar con los métodos de esta invención, es un Antioxidante Modulador de la Inflamación (AMI) que está en desarrollo clínico para indicaciones de inflamación y relacionadas al cáncer; inhibe la inflamación mediada por la respuesta inmune al restaurar la homeostasis oxidoreductiva in los tejidos inflamados. Induce el factor de transcripción citoprotector Nrf2 e inhibe las actividades de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3, que son pro-oxidantes y pro-inflamatorios. *In vivo*, el RTA 402 ha demostrado una importante actividad antiinflamatoria como agente único, en varios modelos animales de inflamación tal como el daño renal en el modelo del cisplatino y la lesión renal aguda en el modelo de

isquemia-reperfusión. Asimismo, se han observado disminuciones significativas en la creatinina sérica en pacientes tratados con RTA 402.

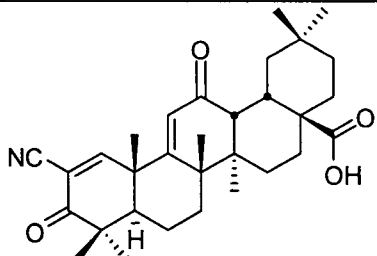
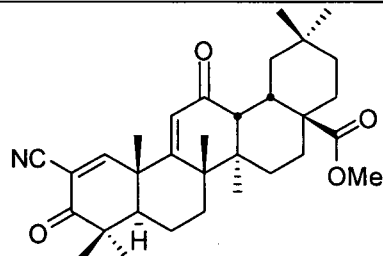
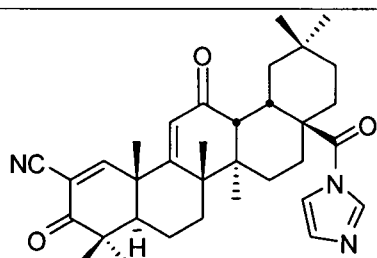
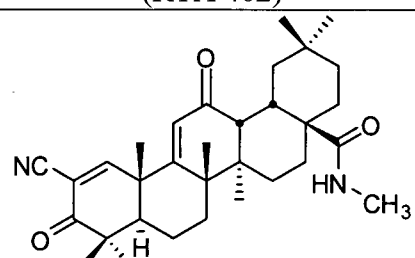
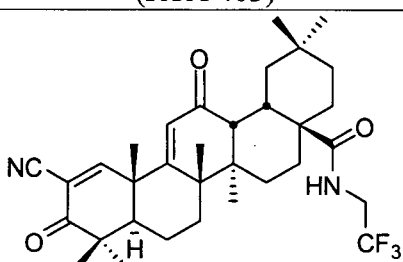
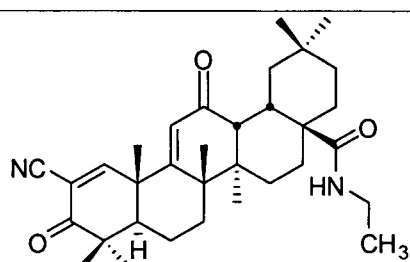
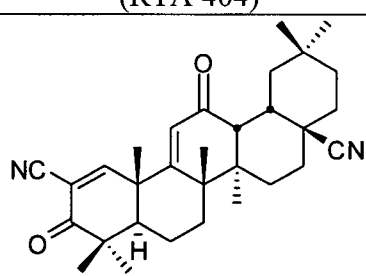
En un aspecto de la invención, los compuestos de la presente invención se pueden usar para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad renal o afección renal causada por niveles elevados de estrés oxidativo en uno o más tejidos. El estrés oxidativo puede estar acompañado de inflamación aguda o inflamación crónica. El estrés oxidativo puede estar causado por una exposición aguda a un agente externo como radiación ionizante o un agente de quimioterapia citotóxico (por ejemplo, doxorubicina), por traumatismo o alguna otra lesión aguda al tejido, por lesión debida a isquemia/reperfusión, por mala circulación o anemia, por hipoxia o hiperoxia localizadas o sistémicas, o por algún otro estado fisiológico anormal como la hiperglicemia o hipoglicemia.

Por lo tanto, en las patologías que involucran el estrés oxidativo en forma aislada o el estrés oxidativo exacerbado por la inflamación, el tratamiento puede comprender la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de esta invención, tales como los que se han descrito anteriormente o en toda esta especificación. El tratamiento se puede administrar en forma preventiva antes de un estado previsible de estrés oxidativo (por ejemplo, trasplante de un órgano o administración de terapia a un paciente con cáncer), o se puede administrar en forma terapéutica en situaciones que establecidamente conllevan el estrés oxidativo e inflamación.

Se han encontrado nuevos derivados amida de CDDO que son agentes prometedores, por ejemplo por su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Además de la metilamida de CDDO (CDDO-MA), según han informado Honda y col., (2002), la invención permite el uso de otros derivados amida de CDDO, tal como la etilamida (CDDO-EA), además de derivados amida fluorados del CDDO, tal como el derivado 2,2,2-trifluoroetilamida del CDDO (CDDO-TFEA).

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar según los métodos enseñados por Honda y col. (1998), Honda y col. (2000b), Honda y col. (2002), Yates y col. (2007), y las Patentes de EE. UU. No. 6.326.507 y No. 6.974.801, todos los cuales se incorporan por referencia a este documento.

Aquí se muestran ejemplos no limitantes de triterpenoides que se pueden usar de acuerdo con los métodos de esta invención.

 CDDO (TP-151) (RTA 401)	 CDDO-Me metil bardoxolona (TP-155) (RTA 402)
 CDDO-Im (TP-235) (RTA 403)	 CDDO-MA (TP-224)
 CDDP-TFEA (TP-500) (RTA 404)	 CDDO-EA (TP-319) (RTA 405)
 TP-225	

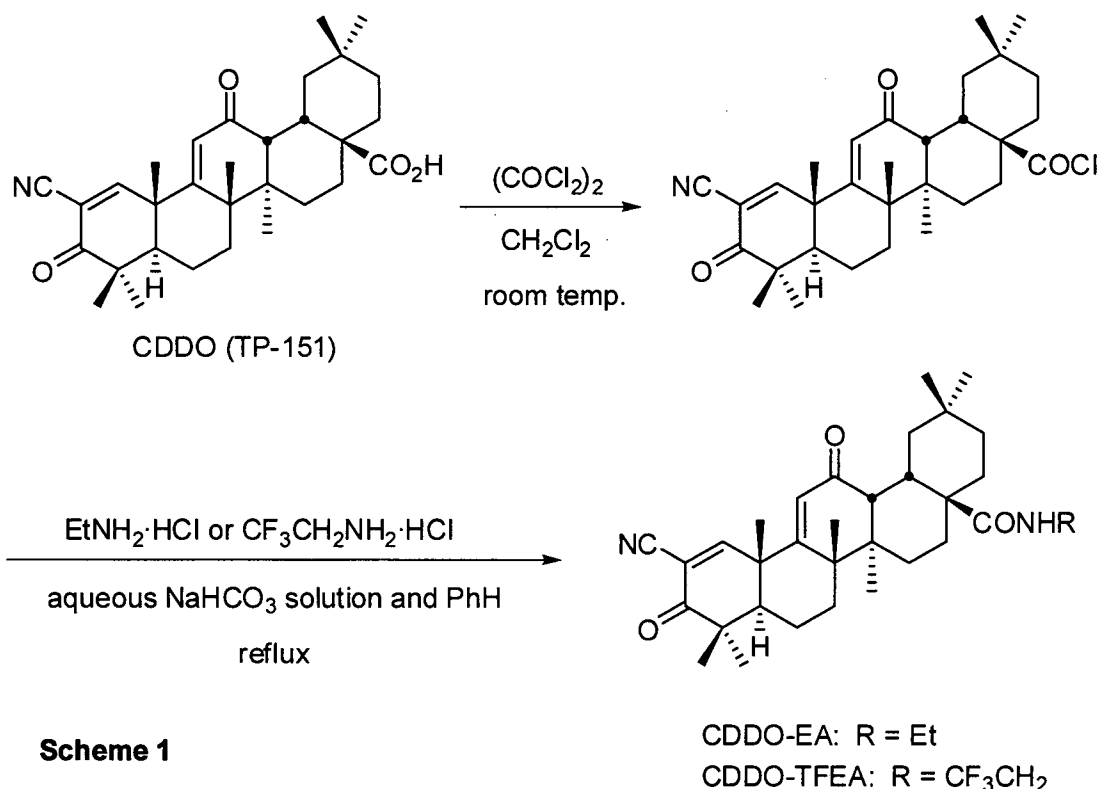
Los compuestos a usar con la presente invención, como los indicados en la tabla anterior, son estructuralmente semejantes al RTA-402 y en muchos casos tienen

propiedades biológicas semejantes, como se ha notado más arriba. Como ejemplo adicional, en la Tabla 1 se resumen los resultados *in vitro* de varios de estos compuestos, en donde se aplicó a macrófagos RAW264.7 un tratamiento previo con DMSO o fármacos en diversas concentraciones (nM) durante 2 horas, y luego se trataron con 20 ng/mL de IFN γ durante 24 horas. La concentración de NO en los medios se determinó mediante un sistema de reactivos Griess y la viabilidad de las células se determinó con el reactivo WST-1. Todos estos resultados demuestran una actividad que excede en órdenes de magnitud la actividad, por ejemplo, de la molécula madre de ácido oleanólico.

Tabla 1. Inhibición de la producción de NO inducida por IFN γ .

ID de trabajo	RAW264.7 (20 ng/mL IFN γ)	
	CI ₅₀ para NO	CI ₅₀ para WST-1
RTA-401	~10 nM	> 200 nM
RTA-402	2,2 nM	80 nM
RTA-403	~0,6 nM	100 nM
RTA-404	5,8 nM	100 nM
RTA-405	6 nM	~200 nM
TP-225	~0,4 nM	75 nM

La síntesis de CDDO-MA se presenta en Honda y col. (2002), que se incorpora por referencia a este documento. La síntesis de CDDO-EA y CDDO-TFEA se presenta en Yates y col. (2007), que se incorpora por referencia a este documento y se muestra en el Esquema I, a continuación.



IV. Formas polimórficas de CDDO-Me

Se pueden usar formas polimórficas de los compuestos de la presente invención, por ejemplo, la Forma A y la Forma B de CDDO-Me, de acuerdo con los métodos de esta invención. La Forma B muestra una disponibilidad biológica que es sorprendentemente mejor que la de la Forma A (FIG. 15). Concretamente, la disponibilidad biológica de la Forma B de CDDO-Me fue mayor que la de la Forma A de CDDO-Me en monos, cuando lo monos recibieron dosis equivalentes de las dos formas por vía oral, en cápsulas de gelatina (Solicitud de Patente de EE. UU. No. 12/191.176, presentada el 13 de agosto de 2008).

La "Forma A" de CDDO-Me (RTA-402) no está solvatada (no hidratada) y se caracteriza por una estructura cristalina única, con un grupo espacial de P4₃ 2₁ 2 (no. 96), dimensiones de celda unidad de a = 14,2 Å; b = 14,2 Å y c = 81,6 Å, y por una estructura de empaque en la cual tres moléculas están colocadas en forma helicoidal a lo largo del eje cristalográfico b.

A diferencia de la Forma A, la “Forma B” de CDDO-Me está en una sola fase pero carece de dicha estructura cristalina definida. Las muestras de la Forma B no muestran una correlación molecular extendida, es decir, por encima de aproximadamente 20 Å. Además, el análisis térmico de las muestras de la Forma B divulgan una

5 temperatura de transición al vidrio (T_g) dentro de límites desde aproximadamente 120 °C a aproximadamente 130 °C (FIG. 14). A diferencia de esto, un material nanocristalino desordenado no muestra una T_g sino una temperatura de fusión (T_m), por encima de la cual la estructura cristalina se transforma en un líquido. La Forma B está caracterizada por un espectro de difracción de rayos X de muestras en polvo (XRPD) (FIG 12c)

10 diferente al espectro de la Forma A. Como no tiene una estructura cristalina definida, la Forma B carece también de picos XRPD nítidos, tales como los picos característicos de la Forma A; la Forma B está caracterizada por un patrón XRPD general de tipo “halo”. Concretamente, la Forma B no cristalina está en la categoría de sólidos “amorfos por rayos X” porque su patrón XRPD tiene tres o menos halos de difracción primaria. Dentro

15 de esta categoría, la Forma B es un material “vidrioso”.

La Forma A y la Forma B de CDDO-Me se preparan fácilmente a partir de diversas soluciones del compuesto. Por ejemplo, la Forma B se puede preparar por evaporación rápida o evaporación lenta en MTBE, THF, tolueno o acetato de etilo. La Forma A se puede preparar de varias maneras, incluyendo la evaporación rápida, la

20 evaporación lenta o el enfriamiento lento de una solución de CDDO-Me en etanol o metanol. Las preparaciones de CDDO-Me en acetona pueden producir la Forma A si se usa la evaporación rápida o la Forma B si se usa la evaporación lenta.

Se pueden usar diversas formas de caracterización para diferenciar la Forma A de CDDO-Me de la Forma B de CDDO-Me, y para diferenciarlas de otras formas de

25 CDDO-Me. Algunas técnicas ilustrativas y adecuadas para este fin son: la resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido, la difracción de rayos X de muestras en polvo (comparar las FIGS. 12A y B con la FIG. 12C), cristalografía de rayos X, calorimetría de barrido diferencial (comparar la FIG. 13 con la FIG. 14), absorción y desorción dinámica de vapor (DVS), análisis por método de Karl Fischer (KF),

30 microscopía de punto de niebla, calorimetría de barrido diferencial modulada, análisis de infrarrojo por transformada de Fourier, y espectroscopía Raman. Concretamente, el

análisis de los datos de difracción de rayos X de muestras en polvo (XRPD) y de calorimetría de barrido diferencial (DSC) puede diferenciar entre la Forma A, Forma B y las formas de semibencenato del éster metílico de CDDO (Solicitud de Patente de EE. UU. No. 12/191.176, presentada el 13 de agosto, 2008.)

5 Se describen detalles adicionales sobre las formas polimórficas de CDDO-Me en la Solicitud de Patente de EE. UU. Provisional No. 60/955.939, presentada el 15 de agosto, 2007, y la correspondiente Solicitud de Patente de EE. UU. No. 12/191.176 (no provisional), presentada el 13 de agosto, 2008, ambas incorporadas en su totalidad por referencia a este documento.

10 **V. El uso de triterpenoides para el tratamiento de la nefropatía crónica, resistencia a la insulina o diabetes y disfunción endotelial o patología cardiovascular**

Los compuestos y métodos de esta invención se pueden usar para tratar diversos aspectos de la nefropatía, incluyendo indicaciones para estados agudos y estados
15 crónicos. En general, el método comprende administrar a los sujetos cantidades farmacéuticamente eficaces de un compuesto de esta invención.

La inflamación participa significativamente en la patología de la nefropatía crónica. Hay también un fuerte vínculo entre los mecanismos del estrés oxidativo y la disfunción renal. La vía de señalización NF- κ B tiene un papel importante en la evolución
20 de la nefropatía crónica, ya que el NF- κ B regula la transcripción de MCP-1, una quimiocina responsable del reclutamiento de monocitos y macrófagos que produce una respuesta inflamatoria que a la larga lesiona el riñón (Wardle, 2001). La vía Keap1/Nrf2/ARE controla la transcripción de varios genes codificadores de enzimas antioxidantes, incluyendo la hem oxigenasa-1 (HO-1). La ablación del gen para Nrf2 en
25 ratones hembra lleva al desarrollo de una glomerulonefritis semejante al lupus (Yoh y col., 2001; Ma y col., 2006). Además, varios estudios han demostrado que la expresión de HO-1 se induce como respuesta al daño renal y la inflamación renal, y que esta enzima y sus productos (bilirrubina y monóxido de carbono) tienen un papel protector en el riñón (Nath y col., 2006).

30 El glomérulo y la cápsula de Bowman que lo rodea son la unidad funcional básica del riñón. La velocidad o índice de filtración glomerular (IFG) es la medida estándar de la

función renal. La depuración de creatinina (“clearance”) se usa comúnmente para medir el IFG. Sin embargo, la concentración sérica de creatinina se usa comúnmente como indicador indirecto de la depuración de creatinina. Por ejemplo, se acepta generalmente que las concentraciones excesivas de creatinina en suero indican una función renal

5 inadecuada y la disminución de la creatinina sérica a lo largo del tiempo se acepta como una indicación del mejoramiento de la función renal. Las concentraciones normales de creatinina en sangre son aproximadamente 0,6 a 1,2 miligramos (mg) por decilitro (dL) en varones adultos y 0,5 a 1,1 miligramos por decilitro en mujeres adultas.

Se puede producir una lesión renal aguda luego de isquemia-reperfusión, tratamiento con ciertos agentes farmacológicos como el cisplatino y la rapamicina, y por inyección intravenosa de medio de contraste radiológico usado para obtener imágenes médicas. Igual que en la nefropatía crónica, la inflamación y el estrés oxidativo contribuyen a la patología de la lesión renal aguda. Los mecanismos moleculares de la nefropatía inducida por material de radiocontraste no se comprenden totalmente; sin embargo, es probable que contribuyan a la insuficiencia renal una combinación de acontecimientos que incluyen una vasoconstricción prolongada, autorregulación renal alterada y la toxicidad directa de los medios de contraste (Tumlin y col., 2006). La vasoconstricción reduce el flujo sanguíneo en los riñones y causa isquemia-reperfusión, con producción de especies de oxígeno reactivo. En estas condiciones se produce una fuerte inducción de HO-1 y se ha demostrado que previene la lesión por isquemia-reperfusión en varios órganos diferentes, inclusive el riñón (Nath y col., 2006). Concretamente, se ha demostrado que la inducción de HO-1 es protectora en un modelo de nefropatía por medio de radiocontraste en rata (Goodman y col., 2007). La reperfusión también induce una respuesta inflamatoria, parcialmente a través de la activación de la señalización NF- κ B (Nichols, 2004). Se ha propuesto actuar sobre la señalización NF- κ B como estrategia terapéutica para prevenir el daño a los órganos (Zingarelli y col., 2003).

Sin limitaciones impuestas por la teoría, la potencia de los compuestos de la presente invención, por ejemplo, RTA 402, deriva principalmente de la incorporación de grupos carbonilo α,β insaturados. En ensayos *in vitro*, la mayoría de la actividad de los compuestos se puede eliminar con la introducción de grupos que contienen ditioneitol (DTT), N-acetil-cisteína (NAC), o glutatión (GSH); grupos que contienen tiol que puede

interactuar con grupos carbonilo α,β -insaturados (Wang y col., 2000; Ikeda y col., 2003; 2004; Shishodia y col., 2006). Se ha establecido mediante ensayos bioquímicos que el RTA 402 interactúa directamente con un residuo cisteína críticamente importante (C179) en IKK β (ver más adelante) e inhibe su actividad (Shishodia y col., 2006; Ahmad y col., 5 2006). El IKK β controla la activación de NF- κ B a través de la vía “clásica” que involucra una degradación inducida por fosforilación del I κ B, con lo cual se liberan dímeros de NF- κ B hacia el núcleo. En macrófagos, esta vía es responsable de la producción de muchas moléculas proinflamatorias en respuesta al TNF α y otros estímulos proinflamatorios.

El RTA 402 también inhibe la vía de señalización JAK/STAT en múltiples 10 niveles. Las proteínas JAK se reclutan hacia receptores transmembrana (por ejemplo, IL-6R) cuando son activadas por ligandos tales como interferones e interleucinas. Luego las proteínas JAK fosforilan la porción intracelular del receptor, con lo cual se reclutan factores de transcripción STAT. Luego los JAK fosforilan los STAT, forman dímeros y son translocados hacia el núcleo donde activan la transcripción de varios genes que 15 participan en la inflamación. El RTA 402 inhibe la fosforilación y formación de dímeros de STAT3 nativos e inducidos por IL-6 y se une directamente a los residuos cisteína en STAT3 (C259) y al dominio cinasa de JAK1 (C1077). Los ensayos bioquímicos también han establecido que los triterpenoides interactúan directamente con residuos cisteína críticos en Keap1 (Dinkova-Kostova y col., 2005). El Keap1 es una proteína vinculada a 20 la actina que en condiciones normales mantiene secuestrado al factor de transcripción Nrf2 en el citoplasma (Kobayashi y Yamamoto, 2005). El estrés oxidativo produce la oxidación de los residuos cisteína regulatorios en Keap1 y causa la liberación de Nrf2. Luego el Nrf2 se transloca hacia el núcleo y se une a elementos de respuesta antioxidante (ARE), lo cual activa la transcripción de muchos genes antioxidantes y antiinflamatorios. 25 Otro sustrato de la vía Keap1/Nrf2/ARE es la hem oxigenasa 1 (HO-1). La enzima HO-1 descompone el hem con formación de bilirrubina y monóxido de carbono, y tiene muchos papeles antioxidantes y antiinflamatorios (Maines y Gibbs, 2005). Recientemente se ha demostrado que los triterpenoides, incluyendo el RTA 402, producen una potente inducción de HO-1 (Liby y col., 2005). Se ha demostrado que el RTA 402 y muchos 30 análogos estructurales son potentes inductores de la expresión de otras proteínas de Fase 2 (Yates y col., 2007).

El RTA 402 es un potente inhibidor de la activación de NF- κ B. Además, el RTA 402 activa la vía Keap1/Nrf2/ARE e induce la expresión de HO-1. Como se describe a continuación, se ha demostrado que el RTA 402 tiene actividad en dos modelos animales de lesión renal aguda. Asimismo, se ha observado una reducción de la creatinina sérica y una mejor filtración glomerular en la mayoría de los pacientes humanos tratados con RTA 402 (ver los Ejemplos a continuación). Actualmente se ha observado en un estudio de Fase II una mejoría significativa en pacientes con nefropatía diabética. Los hallazgos indican que el RTA 402 podría usarse para mejorar la función renal en pacientes con nefropatía diabética, mediante la inhibición de la inflamación renal y el mejoramiento de la filtración glomerular.

Como ya se ha observado, la diabetes y la hipertensión esencial son importantes factores de riesgo para el desarrollo de la nefropatía crónica y, eventualmente, la insuficiencia renal. Ambas afecciones, junto con indicadores de patología cardiovascular sistémica tales como la hiperlipidemia, suelen estar presentes en un mismo paciente, especialmente si ese paciente padece de obesidad clínica. Aunque no hay una comprensión cabal de los factores unificantes, se ha identificado la disfunción del endotelio vascular como el factor patológico importante en la patología cardiovascular sistémica, nefropatía crónica y diabetes (ver, por ejemplo, Zoccali, 2006). Se ha involucrado el estrés oxidativo agudo o crónico sobre las células del endotelio vascular en el desarrollo de la disfunción endotelial, y está fuertemente asociado con los procesos de inflamación crónica. Por lo tanto, un agente capaz de aliviar el estrés oxidativo junto con la inflamación en el endotelio vascular podría aliviar la disfunción y restaurar la homeostasis del endotelio. Sin limitaciones impuestas por la teoría, se ha demostrado que los compuestos de la invención, al estimular los mecanismos antioxidantes endógenos regulados por Nrf2, tienen la singular capacidad de mejorar los parámetros relacionados con la función renal (por ejemplo, la creatinina sérica y el índice de filtración glomerular estimada), control de la glicemia y resistencia a la insulina (por ejemplo, hemoglobina A1c) y la patología cardiovascular sistémica (por ejemplo, células endoteliales circulantes) en pacientes que tienen valores anormales de estos parámetros. Actualmente, se exige típicamente una terapia combinada en dichos pacientes para poder mejorar las determinaciones de control de la glicemia y patología cardiovascular, incluyendo el uso

de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina o bloqueadores de los receptores de la angiotensina II para aliviar la hipertensión y reducir el avance de la nefropatía crónica. Si con los compuestos de la invención simultáneamente se pueden lograr mejorías clínicamente significativas en todos estos parámetros, especialmente en las determinaciones de la función renal, representarían una mejoría significativa con respecto a las terapias actualmente disponibles. En algunos aspectos, los compuestos de la presente invención se pueden usar para tratar una combinación de las afecciones antedichas en forma de una sola terapia, o en combinación con un menor número de terapias adicionales que lo actualmente se usaría.

Estos hallazgos también indican que la administración de RTA 402 se puede usar para proteger a los pacientes contra el daño renal, como por ejemplo, el daño debido a la exposición a los agentes de radiocontraste, como es el caso de la nefropatía inducida por radiocontraste, además de otros contextos. En un aspecto, los compuestos de esta invención se pueden usar para tratar la lesión renal aguda debida a isquemia-reperfusión y/o quimioterapia. Por ejemplo, los resultados indicados en los Ejemplos 2 y 3 que siguen demuestran que el RTA 402 en modelos animales protege contra la lesión renal aguda debida a isquemia-reperfusión y quimioterapia.

Se ha determinado la creatinina sérica en varios modelos animales tratados con RTA 402. Se han observados disminuciones significativas en la creatinina sérica con respecto a los niveles basales o los niveles en animales control, en monos cangrejeros, perros de raza "beagle" y ratas Sprague-Dawley (FIGS. 3A-D). Se ha observado este efecto en ratas tratadas con ambas formas de RTA 402 (cristalino y amorfo).

El RTA 402 reduce la creatinina sérica en pacientes. Por ejemplo, se ha observado que los niveles mejoran en pacientes con cáncer que reciben RTA 402. En los seres humanos, la nefrotoxicidad es un efecto secundario, limitante de la dosis, del tratamiento con cisplatino. Se piensa que el daño que produce el cisplatino en los túbulos proximales está mediado por un aumento en la inflamación, estrés oxidativo y apoptosis (Yao y col., 2007). También se ha medido la creatinina sérica en pacientes con nefropatía crónica inscritos en un ensayo de RTA 402 de Fase II, con rótulo al descubierto (Ejemplo 6). Este estudio se diseñó con múltiples criterios de valoración, dentro de las categorías de resistencia a la insulina, disfunción endotelial/patología cardiovascular y nefropatía

crónica, incluyendo la determinación de la hemoglobina A1c (A1c), que es un criterio de valoración de fase 3 ampliamente utilizado para el control de la glicemia.

La hemoglobina A1c (A1c) es un pequeño componente de la hemoglobina, a la cual está unida la glucosa. También el A1c se denomina hemoglobina glicosidada o glucosilada. La hemoglobina A1c se puede separar de los demás componentes de la hemoglobina A en sangre según su carga y tamaño, usando para ello cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La hemoglobina A1c no está afectada por fluctuaciones a corto plazo de la glucosa en sangre, como por ejemplo las variaciones debidas a las comidas. Por lo tanto, se puede extraer sangre para el análisis de A1c sin tomar en cuenta en qué momento se consumió la comida. En pacientes sanos, no diabéticos, el nivel de A1c es menos del 7% de la hemoglobina total. Los límites normales son de 4% a 5,9%. En la diabetes mal controlada, puede ser 8,0% o más. Se ha demostrado que se pueden retrasar o prevenir las complicaciones de la diabetes si el nivel de A1c se puede mantener cerca del 7%.

Los agentes recientemente aprobados típicamente reducen los niveles de A1c en 0,4 a 0,80 con más de seis meses de tratamiento, siendo las disminuciones en 28 días típicamente menores. La tabla siguiente muestra las reducciones en la hemoglobina A1c luego de seis meses de tratamiento con uno de dos agentes aprobados, la sitagliptina o el acetato de pramlintida (Aschner y col., 2006; Goldstein y col., 2007; Pullman y col., 2006).

Fármaco	Duración de la diabetes mellitus (años)	Diseño del estudio	A1c media	Cambio
Sitagliptina	4,3	+/- placebo, con A1c $\geq 7,0$	8,0	-0,8
	4,4	+/- metformina, con A1c $\geq 7,5$	8,9	-0,7
	6,1	pioglitazona +/- sitagliptina; A1c $\geq 7,0$	8,1	-0,7
Acetato de pramlintida	13	+/- insulina	9,1	-0,4

Si se compara el tratamiento de referencia con o sin RTA 402, se observa que el RTA 402 reduce la hemoglobina A1c en 28 días en diabéticos resistentes al tratamiento, más allá del efecto de tratamiento de referencia. El tratamiento demostró una reducción de intención de tratar de 0,34 (n = 21) y una reducción del nivel basal elevado (≥ 7.0 en la muestra basal) de 0,50 (n = 16). Estos resultados se presentan en más detalle en la sección Ejemplos, más adelante. Ver también las FIGS. 6 y 7.

En otro aspecto, los compuestos de esta invención también se pueden usar para mejorar la sensibilidad a la insulina y/o el control de la glucemia. Por ejemplo, los resultados de pruebas de “clamp” hiperinsulinémico euglicémico en el estudio detallado en el Ejemplo 6 muestran que el tratamiento con RTA 402 mejoró el control de la glucemia. La prueba de “clamp” hiperinsulinémico euglicémico es el método estándar para investigar y cuantificar la sensibilidad a la insulina. Se mide la cantidad de glucosa que se necesita para compensar una mayor concentración de insulina sin causar hipoglicemia (DeFronzo y col., 1979).

El procedimiento típico es el siguiente: se perfunde insulina a través de una vena periférica, a 10-120 mU por m² por minuto. Para compensar la infusión de insulina, se perfunde una solución de glucosa al 20% para mantener la concentración sanguínea de glucosa entre 5 y 5,5 mmol/litro. La velocidad de infusión de glucosa se fija de acuerdo con la determinación de la glucosa sanguínea cada 5 a 10 minutos.

Típicamente, las perfusiones de insulina en dosis bajas son más útiles para evaluar la respuesta hepática, mientras que las perfusiones de insulina en dosis altas son útiles para evaluar la acción periférica de la insulina (por ejemplo, en el tejido graso y muscular).

Los resultados típicamente se evalúan de la siguiente forma: La velocidad de perfusión de glucosa durante los últimos 30 minutos de la prueba determina la sensibilidad a la insulina. Si se exigen velocidades elevadas (7,5 mg/min o más), el paciente es sensible a la insulina. Las velocidades muy bajas, de 4,0 mg/min o menos, indican que el organismo es resistente a la acción de la insulina. Las velocidades entre 4,0 y 7,5 mg/min podrían no ser definitivas y podrían sugerir un trastorno de la tolerancia a la glucosa, que es un signo precoz de resistencia a la insulina.

Los métodos de esta invención se pueden usar para mejorar la función renal. Como se muestra en el Ejemplo 6, se ha demostrado que el tratamiento con RTA 402 mejora seis determinaciones de la función renal y estado renal, incluyendo IFGe basado en creatinina sérica, depuración de la creatinina, BUN, cistatina C, adiponectina y angiotensina II. Se ha demostrado que el RTA 402 aumenta el IFG en forma dependiente de la dosis y con una alta tasa de respuesta (86%; n = 22). Como también se muestra en la FIG. 9, los aumentos en el IFG observados a los 28 días desaparecieron después de retirar el fármaco.

En algunas representaciones, los métodos de tratamiento de esta invención llevan a un mejoramiento en los niveles de adiponectina y/o angiotensina II. La adiponectina y angiotensina II típicamente están aumentadas en pacientes con nefropatía diabética y se correlacionan con la gravedad de la patología renal. La adiponectina (también denominada Acrp30, apM1) es una hormona que modula varios procesos metabólicos, incluyendo la regulación de la glucosa y el catabolismo de los ácidos grasos. La adiponectina se secreta por el tejido adiposo y pasa al torrente sanguíneo, donde se encuentra en cantidad abundante en comparación con muchas otras hormonas. Los niveles de la hormona están inversamente correlacionados con el porcentaje de grasa corporal en los adultos, pero la asociación en lactantes y niños pequeños es menos clara. La hormona tiene un papel en la inhibición de los trastornos metabólicos que pueden producirse en la diabetes de tipo 2, obesidad, aterosclerosis y esteatosis hepática no alcohólica. Se puede usar la adiponectina para predecir la mortalidad por todas las causas y la patología renal terminal en los pacientes con nefropatía diabética.

Los compuestos y métodos de esta invención se pueden usar para tratar diversos aspectos de la patología cardiovascular. Se ha encontrado que los métodos de tratamiento de esta invención reducen las células endoteliales circulantes (CEC) en pacientes humanos. Las células endoteliales circulantes son marcadores de la disfunción endotelial y lesión vascular. La disfunción endotelial es un proceso inflamatorio sistémico que está vinculado con el daño cardiovascular y de órgano destino. El mayor número de CEC típicamente se correlaciona con el desarrollo, avance y muerte por patología cardiovascular. El número de CEC también se correlaciona con la nefropatía crónica y un menor IFG. Los niveles normales históricamente son ≤ 5 células/mL.

Las características típicas de la disfunción endotelial incluyen la incapacidad de las arterias y arteriolas de dilatarse completamente en respuesta a un estímulo apropiado. Esto genera una diferencia detectable entre los sujetos con disfunción endotelial y los que tienen un endotelio normal y sano. Dicha diferencia se puede probar mediante diversos métodos que incluyen la iontoforesis con acetilcolina, la administración intra-arterial de diversos agentes vasoactivos, el calentamiento local de la piel o la oclusión arterial temporaria mediante el inflado de un manguito de presión arterial hasta presiones elevadas. Las pruebas también se pueden realizar en las mismas arterias coronarias. Se piensa que estas técnicas estimulan al endotelio para que libere óxido nítrico (NO) y posiblemente algunos agentes más, que difunden hacia el músculo liso vascular circundante y causan la vasodilatación.

Por ejemplo, según los resultados del estudio de Fase II (Ejemplo 6), los pacientes tratados con RTA 402 durante 28 días mostraron una disminución en los marcadores de inflamación cardiovascular, a través de una reducción en el número de células endoteliales circulantes. La disminución en las CEC en el grupo de intención de tratar (n=20) fue 27%; la reducción en el grupo con niveles basales elevados (n=14) fue 40% (p=0,02) y nueve de esos pacientes después del tratamiento tuvieron un nivel normal de células endoteliales circulantes. Estos resultados concuerdan con una reversión de la disfunción endotelial.

Se ha encontrado que los métodos de tratamiento de esta invención reducen la metalopeptidasa de matriz 9 (MMP-9), las moléculas de adhesión solubles y factor de necrosis tumoral (TNF α) en la mayoría de los pacientes. Los niveles elevados de estas moléculas típicamente se correlacionan con malos desenlaces cardiovasculares.

VI. Formulaciones farmacéuticas y vías de administración

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por una variedad de métodos, por ejemplo, por vía oral o por inyección (por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, etc.). Según la vía de administración, los compuestos activos pueden estar recubiertos con un material que protege el compuesto contra la acción de ácidos y de otras condiciones naturales que podrían inactivar el compuesto. También se pueden administrar por perfusión/infusión continua en un sitio de

enfermedad o herida. Se proporcionan ejemplos de formulaciones, incluyendo una dispersión de CDDO-Me basada en polímero que mostró una mejor biodisponibilidad por vía oral, en la Solicitud de Patente de EE. UU. No. 12/191.176, presentada el 13 de agosto, 2008, y que se incorpora en su totalidad por referencia a este documento. Las personas versadas en el tema reconocerán que se pueden usar otros métodos de fabricación para producir las dispersiones de la presente invención con propiedades y eficacia equivalentes (ver Repka y col., 2002 y las referencias citadas en dicha publicación). Tales métodos alternativos incluyen los siguientes, sin limitarse a éstos: evaporación de disolventes, extrusión, como la extrusión caliente de material fundido, y otras técnicas.

Si se desea administrar el compuesto terapéutico por vías que no sean la administración parenteral, podría ser necesario revestir el compuesto con un material que prevenga su inactivación o coadministrar el compuesto con un material que evite la inactivación. Por ejemplo, el compuesto terapéutico podría administrarse a un paciente dentro de un vehículo apropiado, por ejemplo, en liposomas, o en un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen la solución salina y las soluciones amortiguadoras acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua además de liposomas convencionales (Strejan y col., 1984).

El compuesto terapéutico también se puede administrar por vía parenteral, intraperitoneal, intraespinal o intracerebral. Las dispersiones se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de éstos, y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden tener un conservante para prevenir el desarrollo de microorganismos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyectables incluyen las soluciones acuosas estériles (cuando la composición es hidrosoluble) o dispersiones y polvos estériles para preparar las soluciones o dispersiones estériles inyectables en el mismo lugar de su administración. En todos los casos, la composición debe estar estéril y contar con una fluidez suficiente para permitir la fácil administración por jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe protegerse de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua,

etanol, polioles (como el glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y semejantes),
mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales. Se puede mantener una fluidez
apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento como la lecitina, la
matención de un tamaño de partícula apropiado cuando se trata de una dispersión, y por
5 el uso de agentes tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede
lograr con diversos agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos,
clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y semejantes. En muchos casos, es
preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de
sodio, o polialcoholes tales como el manitol y sorbitol. Se puede producir una absorción
10 prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de
un agente que retrase la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio o la
gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación
de la cantidad requerida del compuesto terapéutico dentro de un disolvente apropiado,
15 con uno de los ingredientes indicados más arriba o una combinación de éstos, según sea
necesario, seguido de una esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se
preparan por incorporación del compuesto terapéutico en un vehículo estéril que contiene
un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos seleccionados de la
lista anterior. Cuando se trata de polvos estériles para preparar soluciones inyectables
20 estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización
que generan el principio activo en polvo (es decir, el compuesto terapéutico) además de
otros ingredientes deseados provenientes de una solución de dichos ingredientes
previamente esterilizada por filtración.

El compuesto terapéutico se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un
25 diluyente inerte o en un vehículo comestible y asimilable. El compuesto terapéutico y
otros ingredientes también se pueden encapsular en una cápsula de gelatina dura o
blanda, se pueden comprimir para formar tabletas, o se pueden incorporar directamente a
la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica por vía oral, el compuesto
terapéutico se puede incorporar con excipientes y utilizado en forma de tabletas
30 ingeribles, tabletas bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y
semejantes. Evidentemente, el porcentaje del compuesto terapéutico en las

composiciones y preparaciones se puede variar. La cantidad del compuesto terapéutico en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtiene una dosis apropiada.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de
5 dosis unitaria, tal como se usa en este documento, se refiere a las unidades físicamente discretas que son dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéutico calculada para producir el efecto terapéutico deseado, junto con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosis unitaria de la invención están determinadas y dependen
10 directamente de (a) las características singulares del compuesto terapéutico y el efecto terapéutico específico que se desea lograr, y (b) las limitaciones inherentes del arte de formulación farmacopeica de dicho compuesto terapéutico para el tratamiento de una afección seleccionada en un paciente.

El compuesto terapéutico también se puede administrar en forma tópica sobre la
15 piel, ojos o mucosas. Alternativamente, si se desea una administración local a los pulmones, el compuesto terapéutico se puede administrar por inhalación en una formulación de polvo seco o de aerosol.

La dosis real de un compuesto de la presente invención o de una composición que comprende un compuesto de la presente invención administrada a un sujeto se puede
20 determinar a partir de factores físicos y fisiológicos tales como la edad, sexo, peso corporal, gravedad de la afección, tipo de enfermedad tratada, intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, factores idiopáticos del sujeto y la vía de administración. Una persona perita en la materia puede determinar estos factores. El profesional responsable de la administración típicamente determina la concentración de los principios activos en
25 una composición y las dosis apropiadas para cada sujeto individual. El médico individual puede ajustar la dosis en caso de alguna complicación.

Una cantidad eficaz típicamente varía desde aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, desde
30 aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, desde aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg, desde aproximadamente 0,3 mg/kg a

aproximadamente 100 mg/kg, desde aproximadamente 0,4 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 0,8 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, desde aproximadamente 0,9 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, desde aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, desde aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, o desde aproximadamente 10,0 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg, en una o más administraciones de dosis por día, durante un día o varios días (dependiendo, evidentemente, del modo de administración y de los factores analizados más arriba). Otras gamas de dosis adecuadas incluyen 1 mg a 10.000 mg por día, 100 mg a 10.000 mg por día, 500 mg a 10.000 mg por día, y 500 mg a 1000 mg por día. En algunas representaciones específicas, la cantidad es menos que 10.000 mg por día dentro de límites, por ejemplo, de 750 mg a 9.000 mg por día.

La cantidad eficaz puede ser menos de 1 mg/kg/día, menos de 500 mg/kg/día, menos de 250 mg/kg/día, menos de 100 mg/kg/día, menos de 50 mg/kg/día, menos de 25 mg/kg/día, menos de 10 mg/kg/día, o menos de 5 mg/kg/día. Alternativamente, puede estar entre 1 mg/kg/día y 200 mg/kg/día. Por ejemplo, con respecto al tratamiento de pacientes diabéticos, la unidad de dosis puede corresponder a una cantidad que reduce la glucosa sanguínea en por lo menos un 40% en comparación con un sujeto no tratado. En otra representación, la unidad de dosis es una cantidad que reduce la glucosa sanguínea a un nivel igual a la concentración de glucosa sanguínea $\pm$ 10% de un sujeto no diabético.

En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal,

aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier gama comprendida dentro de estos límites. En ejemplos no limitantes de una gama proveniente de las cifras listadas en este documento, se puede administrar una gama de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, una gama de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., de acuerdo con las cifras descritas anteriormente.

En ciertas representaciones, una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0,1% de un compuesto de la presente invención. En otras representaciones, el compuesto de la presente invención puede comprender entre aproximadamente 2% y aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% a aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier gama dentro de dichos límites.

Se contemplan dosis únicas o dosis múltiples de los agentes. Las personas con habilidades normales en el tema pueden determinar los intervalos de tiempo deseados para administrar dosis múltiples, basándose solamente en la experimentación de rutina. Por ejemplo, se puede administrar a los sujetos dos dosis por día en intervalos de aproximadamente 12 horas. En algunas representaciones, el agente se administra una vez al día.

Los agentes se pueden administrar según un horario o programa de rutina. De acuerdo con este documento, un programa de rutina significa un período de tiempo designado y predeterminado. El programa de rutina puede abarcar períodos de tiempo que son idénticos o que tienen distinta duración, siempre que el programa esté predeterminado. Por ejemplo, el programa de rutina puede involucrar una administración dos veces por día, cada día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanal, mensual o cada cierto número intermedio prefijado de días o semanas. Alternativamente, el programa de rutina predeterminado puede involucrar una administración dos veces al día durante la primera semana, seguida de una administración

diaria durante varios meses, etc. En otras representaciones, la invención indica que los agentes se pueden tomar por vía oral y que el horario depende o no de la ingestión de alimentos. Así, por ejemplo, el agente se puede tomar cada mañana y/o cada noche, sin importar que el sujeto haya comido o que vaya a comer.

5 Los resultados de Fase 3 muestran que cada formulación de CDDO-Me basada en una dispersión polimérica tiene una disponibilidad biológica mucho mayor que las formulaciones de Forma A micronizada o Forma A nanocrystalina. Además, las formulaciones basadas en una dispersión polimérica han demostrado un aumento sorprendente en la biodisponibilidad por vía oral con respecto a las formulaciones de

10 Forma B micronizada. Las formulaciones con copolímero de ácido metacrílico, Tipo C y HPMC-P demostraron la mejor disponibilidad biológica en monos tratados.

VII. Terapia combinada

Además de usarse como monoterapia, los compuestos de la presente invención también podrían ser útiles en terapias combinadas. La terapia combinada eficaz se puede

15 lograr con una sola composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o con dos composiciones o formulaciones diferentes administradas al mismo tiempo, en donde una composición incluye un compuesto de esta invención y la otra incluye el segundo agente. Alternativamente, la terapia puede administrarse antes o después del tratamiento con el otro agente, a intervalos que varían entre minutos y meses.

20 Se pueden usar diversas combinaciones, como por ejemplo cuando un compuesto de la presente invención es “A,” y “B” representa un agente secundario, cuyos ejemplos no limitantes se describen a continuación:

25 A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de los compuestos de la presente invención a un paciente se ajusta a protocolos generales para administrar productos farmacéuticos, tomando en

cuenta la toxicidad del fármaco, si hay toxicidad presente. Se prevé que los ciclos de tratamiento se repetirían si fuera necesario.

Se contempla que se pueden usar otros agentes antiinflamatorios junto con los tratamientos de la actual invención. Se pueden usar otros inhibidores de la COX, incluyendo ácidos arilcarboxílicos (ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, diflunisal, trisalicilato de colina y magnesio, salicilato, benorilato, ácido flufenámico, ácido mefenámico, ácido meclofenámico y ácido triflúmico), ácidos arilalcanoicos (diclofenac, fenclofenac, alclofenac, fentiazac, ibuprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, naproxen, fenoprofeno, fenbufeno, suprofen, indoprofeno, ácido tiaprofénico, benoxaprofeno, 10 pirprofeno, tolmetin, zomepirac, clopinac, indometacina y sulindac) y ácidos enólicos (fenilbutazona, oxifenbutazona, azapropazona, feprazona, piroxicam e isoxicam). Ver también la Patente de EE. UU. No. 6.025.395, que se incorpora por referencia a este documento.

Los suplementos dietéticos y nutricionales supuestamente beneficiosos para el 15 tratamiento o la prevención de la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, artritis reumatoide, enteropatía inflamatoria y todas las demás enfermedades cuya patogenia se cree que involucra una producción excesiva de óxido nítrico (NO) o de prostaglandinas, tales como la acetil-L-carnitina, octacosanol, aceite de primula, vitamina B6, tirosina, fenilalanina, vitamina C, 20 L-dopa, o una combinación de varios antioxidantes, se pueden usar junto con los compuestos de la presente invención.

Otras terapias secundarias específicas incluyen los inmunosupresores (para trasplantes y la nefropatía autoinmune), fármacos contra la hipertensión (para la nefropatía relacionada con la presión arterial elevada, por ejemplo, inhibidores de la 25 enzima convertidora de la angiotensina y bloqueadores de los receptores de angiotensina), insulina (para la nefropatía diabética), agentes para reducir lípidos y colesterol (por ejemplo, inhibidores de la HMG-CoA reductasa tales como la atorvastatina o simvastatina), tratamientos para la hiperfosfatemia o hiperparatiroidismo asociados con la nefropatía crónica (por ejemplo, acetato de sevelamer, cinacalcet), 30 diálisis y restricciones de la dieta (proteínas, sal, líquidos, potasio, fosfatos).

VIII. Ejemplos

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar las representaciones preferidas de la invención. Las personas peritas en la materia apreciarán que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas que según el inventor funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que son los modos preferidos para practicar la invención. Sin embargo, las personas peritas en el tema apreciarán, en vista de esta divulgación, que se pueden hacer muchos cambios en las representaciones específicas que se divulgan e igualmente obtener un resultado equivalente o semejante sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

10

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Sustancias químicas. Se sintetizaron los triterpenoides como se ha descrito previamente en Honda y col. (1998), Honda y col. (2000b), Honda y col. (2002) y Yates y col. (2007), todos los cuales se incorporan por referencia a este documento.

Ejemplo 2: Resultados de isquemia-reperfusión en ratón

15

En un modelo de insuficiencia renal aguda isquémica en ratón, se pinza la arteria renal durante aproximadamente 20 minutos. Después de este plazo, se quita la pinza y el riñón se vuelve a perfundir con sangre. La isquemia-reperfusión produce daño renal y una disminución de la función renal que se puede evaluar mediante las concentraciones de nitrógeno ureico en la sangre (BUN), que aumentan después del daño renal. Como se muestra en las FIGS. 1a-d, la isquemia-reperfusión inducida por cirugía aumenta la concentración de BUN aproximadamente dos veces. Sin embargo, en animales tratados con 2 mg/kg de RTA 402 por vía oral, una vez al día, empezando dos días antes de la cirugía, las concentraciones de BUN se redujeron significativamente ($p < 0,01$) en comparación con los animales tratados con vehículo, y fueron semejantes a las concentraciones en los animales sometidos a una cirugía falsa (FIGS. 1a-c). Las determinaciones histológicas de daño renal e inflamación también mejoraron significativamente con el tratamiento con RTA 402 (FIG. 1d). Estos datos indican que el RTA 402 protege contra el daño tisular producido por isquemia-reperfusión.

20

25

Ejemplo 3: Resultados de lesión renal aguda producida por quimioterapia en ratas

En otro modelo de lesión renal aguda, se inyectaron ratas por vía intravenosa con el agente antineoplásico cisplatino. En los seres humanos, la nefrotoxicidad es un efecto secundario limitante de la dosis cuando se trata con cisplatino. Se piensa que el daño que produce el cisplatino a los túbulos proximales está mediado por un aumento en la inflamación, estrés oxidativo y apoptosis (Yao y col., 2007). Las ratas tratadas con una sola dosis de 6 mg/kg de cisplatino desarrollaron una insuficiencia renal, determinada por aumentos en las concentraciones sanguíneas de creatinina y BUN. El tratamiento con 10 mg/kg de RTA 402 por gavage oral, empezando un día antes del tratamiento con cisplatino y siguiendo cada día, redujo significativamente las concentraciones sanguíneas de creatinina y BUN (FIGS. 2a-b). La evaluación histológica de los riñones demostró que en los animales tratados con RTA 402, era menor la extensión del daño a los túbulos proximales, en comparación con los animales tratados con vehículo (FIG. 2c).

Ejemplo 4: Reducción de la creatinina sérica en varias especies

La creatinina sérica se ha determinado en varias especies de animales tratados con RTA 402 en el transcurso de estudios de toxicología. Se han observado disminuciones significativas en la creatinina sérica con respecto a concentraciones basales o concentraciones en animales control, en monos cangrejeros, perros de raza "beagle" y ratas Sprague-Dawley (FIGS. 3a-d). Este efecto se ha observado en ratas tratadas con formas cristalinas y amorfas de RTA 402.

Ejemplo 5: Reducción de la creatinina sérica y aumento del IFGe en pacientes con cáncer

La creatinina sérica también se ha determinado en pacientes con cáncer inscritos en un ensayo clínico de fase I de RTA 402. Estos pacientes recibieron RTA 402 una vez por día en dosis entre 5 y 1.300 mg/día durante un total de 21 días cada 28 días. Se observó una disminución de la creatinina sérica de más del 15% ya a los ocho días después de iniciar el tratamiento, que se mantuvo hasta el final del ciclo (FIG. 4A). Esta reducción se mantuvo en aquellos pacientes que recibieron seis o más ciclos de tratamiento con RTA 402. Un subconjunto de pacientes con daño renal preexistente (niveles basales de creatinina sérica de por lo menos 1,5 mg/dL) también experimentó

una disminución significativa en la creatinina sérica después del tratamiento con RTA 402. En estos pacientes, la creatinina sérica disminuyó progresivamente a lo largo del ciclo, de manera que las concentraciones del día 21 eran aproximadamente 25% menores que las concentraciones basales (FIG. 4A). Estos resultados se pueden resumir en la tabla siguiente.

	Todos los pacientes	Subconjunto con creatinina sérica basal elevada
Número de pacientes tratados con el fármaco durante por lo menos 3 semanas	45	8
% de pacientes con reducción en el día 21	87%	100%
% disminución de la creatinina sérica con respecto al valor basal	-18,3%	-24,5%
Valor de p (valor basal comparado con el valor del día 21)	0,001	0,0007

El índice de filtración glomerular estimado (IFGe) mejoró significativamente en los pacientes tratados con RTA 402 (FIG. 4B).

La FIG. 5 muestra los resultados después de por lo menos seis meses de tratamiento con RTA 402 en 11 pacientes con cáncer, que muestra un mejoramiento aproximadamente continuo en el IFGe. Algunos de estos pacientes se inscribieron en el estudio de fase I y otros se inscribieron en un estudio de RTA 402 (combinado con gemcitabina) para pacientes con cáncer pancreático. Los resultados se pueden resumir como se indica a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: IFGe en pacientes tratados con RTA 402 durante 6 ciclos.

	Estudio de tumores sólidos								Estudio pancreático			
	ID del paciente:	402	406	408	409	410	421	427	1001	1104	1105	1106
	Dosis (mg):	5	80	150	150/300	300/600	1300/900	1300	150	300/150	300	300
Ciclo (cada ciclo es de 28 días)	Basal	109,7	94,2	73,2	48,4	49,9	52,5	70,1	68,8	67,3	82,4	89,0
	1	109,7	125,9	82,1	62,6	69,6	58,6	101,3	78,9	95,7	106,6	106,3
	2	109,7	107,9	77,4	62,6	63,4	66,2	78,3	109,9	71,6	89,3	106,3
	3	95,7	107,9	69,4	62,6	63,4	75,8	88,4	135,7	141,2	106,6	106,3
	4	95,7	125,9	77,4	57,0	69,6	N/A	101,3	175,5	95,7	106,6	131,2
	5	109,7	107,9	77,4	69,2	63,4	88,4	101,3	175,5	114,4	131,6	131,2
	6	95,7	125,9	87,4	69,2	69,6	75,8	101,3	135,7	114,4	170,3	131,2

Ejemplo 6: Estudio de fase 2 en pacientes con nefropatía diabética

También se ha medido la creatinina sérica en pacientes con nefropatía crónica inscritos en un ensayo clínico de RTA 402 de fase II, con rótulo al descubierto. Estos pacientes recibieron RTA 402 una vez al día en una de tres dosis (25 mg, 75 mg y 150 mg) durante un total de 28 días.

El estudio se diseñó con múltiples criterios de valoración, en categorías de resistencia a la insulina, disfunción endotelial/patología cardiovascular y nefropatía crónica. Los criterios de valoración se pueden resumir como sigue:

Resistencia a la insulina / Diabetes	Disfunción endotelial / Cardiovascular	Nefropatía crónica
Hgb A1c	CEC	IFG
Velocidad de utilización de la glucosa / “clamp” euglicémico	Proteína C-reactiva (CRP)	Creatinina sérica
Glucosa	E-Selectina	Depuración de creatinina
	Moléculas de adhesión endotelial (VCAM)	Cistatina C
	Citocinas	Adiponectina
		Angiotensina II

Un desenlace primario para este estudio es la determinación de los efectos de la administración oral de RTA 402 en tres dosis sobre el índice de filtración glomerular (estimado según la fórmula MDRD) en pacientes con nefropatía diabética.

Los desenlaces secundarios incluyen: (1) una evaluación de la seguridad y tolerabilidad de la administración oral de RTA 402 en tres dosis diferentes, en esta población de pacientes; (2) una evaluación de los efectos de la administración oral de RTA 402 en tres dosis sobre la creatinina sérica, la depuración de creatinina y la relación albúmina/creatinina urinaria en pacientes con nefropatía diabética; (3) una evaluación de los efectos de la administración oral de RTA 402 en tres dosis sobre la hemoglobina A1c en todos los pacientes inscritos y sobre la respuesta a la insulina mediante la prueba de

“clamp” hiperinsulinémico euglicémico en los pacientes inscritos en solamente uno de los centros del estudio; (4) una evaluación de los efectos de la administración oral de RTA 402 en tres dosis sobre un panel de marcadores de inflamación, lesión renal, estrés oxidativo y disfunción de células endoteliales.

5 La población de pacientes seleccionada para este estudio tenía diabetes de tipo 2 con nefropatía crónica. La mayoría llevaba 20 años con un diagnóstico de control deficiente de la glicemia. La nefropatía crónica se estableció de acuerdo con la concentración elevada de creatinina sérica. La mayoría de los pacientes tenía un diagnóstico de patología cardiovascular y la mayoría estaba recibiendo tratamiento que se
10 ajustaba a las normas de tratamiento para la diabetes, nefropatía crónica y patología cardiovascular (por ejemplo, insulina, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina/bloqueador de receptores de la angiotensina II [ACEI/ARB], bloqueador β , diurético y estatina). Las características demográficas basales se resumen a continuación:

Edad	59
Duración de la diabetes (años)	15,4
Nefropatía diabética	100%
Complicaciones no renales de la diabetes ¹	100%
Hipertensión	100%
Hgb A1c (%)	7,9%
Ineficacia de agentes orales contra la hiperglicemia	90%
Uso de ACEI/ARB	80%
Uso de estatinas	50%

15 ¹Incluye la neuropatía y retinopatía
Todos los valores representan la media; n = 10; los primeros 10 pacientes que completaron el estudio.

Los criterios de inclusión de los pacientes fueron los siguientes: (1) diagnóstico de diabetes de tipo 2; (2) creatinina sérica en mujeres 1,3 – 3,0 mg/dL (115-265 μ mol/L), inclusive, y en hombres 1,5 – 3,0 mg/dL (133-265 μ mol/L), inclusive; (3) los pacientes
20 tenían que estar dispuestos a usar métodos anticonceptivos eficaces; (4) las pacientes

tenían que tener un resultado negativo en la prueba de embarazo en orina dentro de las 72 horas anteriores a la primera dosis del medicamento de estudio; (5) los pacientes tenían que ser capaces de cooperar y estar dispuestos a cooperar con todos los aspectos del protocolo y ser capaces de comunicarse bien; (6) los pacientes tenían que estar dispuestos a proporcionar su consentimiento escrito a la participación en este estudio clínico.

Los criterios de exclusión de los pacientes fueron los siguientes: (1) pacientes con diabetes de tipo 1 (insulino dependiente, diabetes de inicio juvenil); (2) pacientes con nefropatía no diabética diagnosticada (se consideró aceptable la nefroesclerosis simultánea con la nefropatía diabética), o con aloinjerto renal; (3) pacientes con la siguiente patología cardiovascular: angina de pecho inestable dentro de los 3 meses anteriores al inicio del estudio; infarto de miocardio; cirugía de revascularización coronaria (bypass) o angioplastia o stent coronarios por vía transluminal percutánea dentro de los 3 meses antes de iniciar el estudio; ataque isquémico transitorio dentro de los 3 meses antes de iniciar el estudio; accidente cerebrovascular dentro de los 3 meses antes de iniciar el estudio; valvulopatía cardíaca obstructiva o cardiomiopatía hipertrófica; bloqueo auriculoventricular de segundo o tercer grado no mejorado con marcapasos; (4) pacientes con necesidad de terapia de inmunosupresión crónica (> 2 semanas), incluyendo los corticoesteroides (con excepción de los corticoesteroides inhalados o nasales) dentro de los 3 meses antes de iniciar el estudio; (5) pacientes con evidencia de disfunción hepática que incluye una bilirrubina total > 1,5 mg/dL (> 26 micromol/L) o valores de transaminasas hepáticas (aspartato aminotransferasa [AST] o alanina transferasa [ALT]) > 1,5 veces el límite superior normal; (6) para mujeres, si la paciente está embarazada, dando pecho o tiene intenciones de quedar embarazada; (7) pacientes con cualquier afección clínica concomitante que a criterio del investigador podría significar un riesgo para la salud del paciente durante su participación en el estudio o podría influenciar el desenlace del estudio; (8) pacientes con hipersensibilidad conocida a cualquier componente del fármaco de estudio; (9) pacientes con alergia conocida al yodo; (10) pacientes que dentro de los últimos 30 días antes de iniciar el estudio se han sometido a procedimientos de diagnóstico o de intervención que exigieron un agente de contraste; (11) pacientes con un cambio o un ajuste de la dosis de cualquiera de los medicamentos siguientes: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina,

bloqueadores de los receptores de la angiotensina II, drogas antiinflamatorias no esteroideas (DAINE), o inhibidores de la COX-2, dentro de los últimos 3 meses; otros medicamentos contra la hipertensión y otros medicamentos contra la diabetes dentro de las 6 semanas anteriores al inicio del estudio; (12) pacientes con antecedentes de abuso de drogas o alcohol o que tengan exámenes positivos para cualquier droga de abuso (examen de orina positivo para drogas y/o prueba positiva en aire espirado determinada con alcoholímetro “breathalyser”); (13) pacientes que han participado en otro estudio clínico con productos de investigación o productos comerciales dentro de los 30 días antes de iniciar el estudio o que participarían en tal estudio simultáneamente; (14) pacientes incapaces de comunicarse o de cooperar con el investigador debido a problemas del idioma, problemas de desarrollo mental o función cerebral alterada.

Hacia fines de septiembre de 2008, había 32 de 60 pacientes inscritos en este estudio. Todos los pacientes, excepto uno solo, recibían insulina y agentes antihiperglicemiantes conforme al tratamiento de referencia.

Se observó que el tratamiento con RTA 402 redujo el porcentaje de hemoglobina A1c en 28 días en diabéticos refractarios, cuando se administró el fármaco junto con el tratamiento de referencia. El tratamiento produjo una reducción de intención de tratar de aproximadamente 0,25 (n = 56) y en los pacientes con niveles basales elevados ($\geq 7,0$ basal) produjo una disminución de 0,50 (n = 35). Se muestra la reducción en el porcentaje de hemoglobina A1c en función de la gravedad de los valores basales en la FIG. 6, y en la FIG. 7 se muestra la reducción en función de la dosis. En los pacientes con nefropatía avanzada (Estadio 4) (IFG de 15-29 mL/min) hubo una reducción media en el porcentaje de A1c de aproximadamente 0,77. Todas las disminuciones fueron estadísticamente significativas.

La prueba de “clamp” hiperinsulinémico euglicémico mostró que el tratamiento de 28 días también mejoró el control de la glicemia y la sensibilidad a la insulina en los pacientes, determinada en función de la velocidad de utilización de la glucosa (GDR). Los pacientes mostraron una mejor velocidad de utilización de glucosa después de los 28 días de tratamiento; en los pacientes más afectados (velocidad de utilización de la glucosa < 4) la mejoría fue estadísticamente significativa ($p \leq 0,02$). La prueba de “clamp” hiperinsulinémico euglicémico se realizó en el día basal (día -1) y al final del estudio en

el día 28. La prueba mide la velocidad de infusión de glucosa necesaria para compensar una creciente concentración de insulina, sin causar hipoglicemia. Este valor se usa para calcular la velocidad de utilización de glucosa.

En resumen, la prueba de “clamp” hiperinsulinémico euglicémico demora unas 2
5 horas. A través de una vena periférica, se introduce insulina a 10-120 mU por m² por minuto. Para compensar la infusión de insulina, se introduce una solución de glucosa al 20% para mantener la glicemia entre 5 y 5,5 mmol/L. La velocidad de infusión de la glucosa se calcula a partir de la determinación de la glicemia cada 5 a 10 minutos. La
10 velocidad de infusión de la glucosa durante los últimos 30 minutos de la prueba se usa para calcular la sensibilidad a la insulina, determinada a partir de la velocidad de metabolización de la glucosa (M) en mg/kg/min.

Se realiza el siguiente protocolo para la prueba de “clamp” hiperinsulinémico euglicémico:

- 1) El paciente ayuna durante 8-10 horas antes del procedimiento.
- 15 2) En la mañana del clamp, se toman los signos vitales y se pesa al paciente.
- 3) Colocar un catéter en sentido retrógrado en una mano, usando un catéter de 1¼ pulgada, calibre 18-20 G, para la extracción de muestras.
- 4) Preparar la tubería intravenosa con dos válvulas de tres pasos y tubería de
20 extensión con lazo “J”. Conectar la tubería con una clavija a una bolsa de un litro de NaCl al 0,9% que fluye a una velocidad suficiente para mantener la permeabilidad de la vena, a aproximadamente 10 mL/hora, hasta el momento de iniciar el procedimiento.
- 5) Aplicar un manto calefactor forrado en una funda de almohada y separado de la
25 mano del paciente mediante una almohadilla. Esto permite extraer sangre arterializada del catéter venoso, por flujo arterial que se desvía por cortocircuito hacia la vena canulada.
- 6) Controlar la temperatura (aproximadamente 65 °C o 150°F) generada por el manto calefactor antes y durante el clamp, para mantener la arterialización.
- 7) Colocar otro catéter en el antebrazo distal contralateral, con un catéter de 1¼
30 pulgadas, calibre 18-20 G, para la línea de infusión. Preparar la tubería intravenosa con dos válvulas de tres pasos.

- 8) Colgar una bolsa de 500 mL de dextrosa al 20% y conectarla al puerto en el lado de la infusión.
- 9) Preparar la solución de infusión de insulina:
- a. Extraer 53 cc (50 cc de llenado excesivo) de solución salina de una bolsa de 500 cc de NaCl al 0,9% y desechar ese volumen.
 - b. Extraer del sujeto 8 cc de sangre, con técnica aséptica, e inyectarla en un tubo separador de suero (tapa gris y roja).
 - c. Centrifugar el tubo separador de suero. Retirar 2 cc de suero e inyectarlo en la bolsa de 500 cc de NaCl al 0,9%.
 - d. Agregar 100 unidades de insulina a la bolsa que contiene el suero y mezclar bien (0,2 U insulina/mL).
 - e. Conectar la tubería intravenosa con una clavija de dos agujeros en la bolsa de NaCl al 0,9%.
 - f. Colocar en una bomba Baxter.
- 10) Extraer las muestras basales de sangre y anotar la hora de cada muestra. Los valores de glicemia basal en ayunas se obtienen antes de iniciar el bolo de cebado de insulina.
- 11) Calcular la velocidad de infusión de insulina para la dosis de cebado y una infusión de 60 mU/m^2 . Esta insulina inicial sirve para inhibir la producción hepática de glucosa endógena. En sujetos delgados, esta inhibición se logra con 40 mU/m^2 . En sujetos obesos y resistentes a la insulina se necesitan 80 mU/m^2 . En la población potencial de estudio, con un índice de masa corporal (IMC) de $27\text{-}40 \text{ kg/m}^2$, una infusión de 60 mU/m^2 debería ser suficiente para la inhibición. Podría ser necesario ajustar la infusión de insulina de 60 mU/m^2 que se sugiere si cambia el IMC.
- 12) Extraer muestras de 0,5 mL cada 5 minutos y usar los resultados del analizador de glucosa YSI Blood Glucose Analyzer para determinar y ajustar la velocidad de infusión de glucosa (mg/kg/min). Ajustar el volumen de sangre extraído según los exámenes de laboratorio adicionales que exija el protocolo. El clamp dura 120 minutos, que es una duración que se estima suficiente para determinar la sensibilidad a la insulina.

13) Rotular y guardar todos los resultados impresos del YSI, por ser documentos de origen.

14) Las velocidades de infusión de glucosa en los últimos 30 minutos del clamp euglicémico se ajustarán según el espacio de glucosa. Esto se usa para determinar la velocidad de metabolización de glucosa (M, en mg/kg/min), que representa la sensibilidad a la insulina del sujeto.

Como se muestra en la FIG. 8, el RTA 402 reduce el número de células endoteliales circulantes (CEC). La media del número de CEC, en células/mL, se muestra para el grupo de intención de tratar (ITT) y el grupo con valores basales elevados, antes y después del tratamiento con RTA durante 28 días. La reducción en el grupo de intención de tratar fue aproximadamente 20% y la reducción en el grupo con valores basales altos (>5 CEC/mL) fue aproximadamente 33%. La fracción de CEC positivas para iNOS se redujo en aproximadamente 29%. Se observó una normalización de los valores de CEC (≤ 5 células/mL) en 11 de los 19 pacientes con valores basales elevados.

Se aislaron CEC de sangre entera mediante el anticuerpo contra CD146, que es un anticuerpo contra el antígeno CD146 que se expresa en las células endoteliales y los leucocitos. Después de aislar las CEC, se usa un anticuerpo especial contra células endoteliales (CD105 Ab) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para identificar las CEC, usando el sistema CellSearch™. Se agrega un anticuerpo contra CD45 conjugado con una sustancia fluorescente para teñir los leucocitos y luego se elimina dicha señal mediante un ajuste de ventana. Aparece una revisión general de este método en Blann y col. (2005), que se incorpora por referencia en su totalidad a este documento. Las muestras de CEC también se evaluaron por inmunotinción para determinar la presencia de iNOS. El tratamiento con RTA 402 redujo el número de CEC positivas para iNOS en aproximadamente un 29%, lo cual es otra indicación de que el RTA 402 reduce la inflamación en células endoteliales.

Se demostró que el RTA 402 produce una mejoría significativa en ocho indicadores de función renal y estado renal, incluyendo el IFGe basado en creatinina sérica (FIG. 9), depuración de creatinina, BUN (FIG. 11A), fosfato sérico (FIG. 11B), uricemia (FIG. 11C), cistatina C, adiponectina (FIG. 10A), y angiotensina II (FIG. 10B). La adiponectina sirve para predecir la mortalidad por todas las causas y la nefropatía

terminal en pacientes con nefropatía diabética. La adiponectina y angiotensina II, que están elevadas en los pacientes con nefropatía diabética, se correlacionan con la gravedad de la patología renal (FIGS. 10A-B). Se muestran los efectos sobre BUN, fosfatos y ácido úrico en las FIGS. 11A-C.

5 En los pacientes tratados con dosis más elevadas (75 o 150 mg) de RTA 402, se observaron leves aumentos en la proteinuria (aproximadamente 20 a 25%). Esto concuerda con estudios que indican que un mejor IFG se correlaciona con un aumento en la proteinuria. Por ejemplo, en un estudio clínico a largo plazo con más de 25.000
10 pacientes, el tratamiento con ramipril (un inhibidor de la ECA) disminuyó la velocidad con la cual disminuía el IFGe, en forma más eficaz que el telmisartan (un bloqueador de los receptores de angiotensina) o la combinación de ramipril y telmisartan (Mann y col., 2008). Al mismo tiempo, aumentó más la proteinuria en el grupo ramipril que en los otros dos grupos. Los principales desenlaces renales también mejoraron más con cada fármaco individual que con la terapia combinada, aunque el aumento de la proteinuria fue
15 menor en el grupo que recibió terapia combinada. En otros estudios se ha demostrado que los fármacos que reducen el IFG, como los inhibidores de la ECA, también reducen la proteinuria (Lozano y col., 2001; Sengul y col., 2006). Otros estudios han demostrado que los fármacos que producen un aumento agudo del IFG, como ciertos bloqueadores de los canales de calcio, aumentan la proteinuria en hasta un 60% durante la dosificación a
20 corto plazo (Agodoa y col., 2001; Viberti y col., 2002).

* * * * *

25 Todas las composiciones y/o métodos divulgados y reivindicados en este documento se pueden fabricar y realizar sin experimentación indebida, en vista de la actual divulgación. Si bien las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en función de sus representaciones preferidas, las personas peritas en el tema entenderán que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o métodos y en los pasos o en la secuencia de los pasos del método descrito en este documento sin alejarse del concepto,
30 espíritu y alcance de la invención. En forma más específica, quedará aparente que ciertos agentes químicamente y fisiológicamente relacionados podrían sustituirse por los agentes

descritos en este documento y se obtendrían resultados idénticos o semejantes. Se considera que todas esas sustituciones y modificaciones semejantes que son evidentes para las personas versadas en el tema están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

IX. Referencias

Las siguientes referencias se incorporan a este documento específicamente por referencia, en la medida que proporcionan detalles ejemplares sobre los procedimientos u otros detalles que sirven para suplementar los que se enuncian en este documento.

Patente de EE. UU. No. 6.025.395.

Patente de EE. UU. No. 6.326.507.

Patente de EE. UU. No. 6.974.801.

Patente Prov. de EE. UU. No. 60/955.939.

Solicitud de Patente de EE. UU. No. 12/191.176.

Agodoa y col., *JAMA*, 285:2719-2728, 2001.

Ahmad y col., *J. Biol. Chem.*, 281:3576-3579, 2006.

Aschner y col., *Diabetes Care*, 29(12):2632-2637, 2006.

Blann y col., *Thromb. Haemost.* 93: 228-35 (2005).

DeFronzo y col., *Am. J. Physiol.*, 237(3):E214-223, 1979.

Dinkova-Kostova y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(12):4584-4589, 2005.

Goldstein y col., *Diabetes Care*, 30(8):1979-1987, 2007.

Goodman y col., *Kidney Int.*, 72:945-953, 2007.

Honda y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12:1027-1030, 2002.

Honda y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19:2711-2714, 1998.

Honda y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9:3429-3434, 1999.

Honda y col., *J. Med. Chem.*, 43:1866-1877, 2000a.

Honda y col., *J. Med. Chem.*, 43:4233-4246, 2000b.

Honda y col., *Med. Chem. Lett.*, 7:1623-1628, 1997.

Honda y col., *Org. Biomol. Chem.*, 1:4384-4391, 2003.

Huang y col., *Cancer Res.*, 54:701-708, 1994.

Ikeda y col., *Cancer Res.*, 63: 5551-5558, 2003.

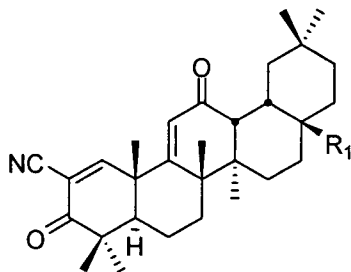
Ikeda y col., *Mol. Cancer Ther.*, 3:39-45, 2004.

Kobayashi y Yamamoto, *Antioxid. Redox. Signal.*, 7:385-394, 2005.

- Lozano y col., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16[Suppl 1]:85-89, 2001.
- Ma y col., *Am. J. Pathol.*, 168:1960-1974, 2006.
- Mann y col., *The Lancet* 372: 547-553, 2008.
- Maines y Gibbs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338:568-577, 2005.
- Minns y col., *Gastroenterology*, 127:119-26, 2004.
- Mix y col., *Mol. Pharmacol.*, 65:309-318, 2004.
- Nath, *Kidney Int.*, 70, 432-443, 2006.
- Nichols, *Drug News Perspect.*, 17:99-104, 2004.
- Nishino y col., *Cancer Res.*, 48:5210-5215, 1988.
- Place y col., *Clin. Cancer Res.*, 9:2798-2806, 2003.
- Pullman y col., *Vasc. Health Risk Manag.*, 2(3):203-212, 2006.
- Repka, MA, McGinity, JW, Zhang, F, Koleng, JJ, Hot-melt extrusion technology.
En : Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 2ª edición, New York,
 NY : Marcel Dekker, 2002 : 203-206.
- Sengul y col., *Diab. Res. Clin. Pract.*, 71:210-219, 2006.
- Shishodia y col., *Clin. Cancer Res.*, 12(6):1828-1838, 2006.
- Suh y col., *Cancer Res.*, 63:1371-1376, 2003.
- Suh y col., *Cancer Res.*, 58:717-723, 1998.
- Suh y col., *Cancer Res.*, 59(2):336-341, 1999.
- Tumlin y col., *Am. J. Cardiol.*, 98:14K-20K, 2006.
- Viberti y col., *Circulation*, 106:672-678, 2002.
- Wang y col., *Mol. Endocrinol.*, 14:1550-1556, 2000.
- Wardle, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16,1764-1768 2001.
- Wermuth y Stahl, en: *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use — A Handbook*, Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002.
- Yao y col., *Am. J. Med. Sci.*, 334(2):115-24, 2007.
- Yates y col., *Mol. Cancer Ther.*, 6(1):154-162, 2007.
- Yoh y col., *Kidney Int.*, 60, 1343-1353, 2001.
- Zingarelli y col., *Crit Care Med.*, 31, S105-S111, 2003.
- Zoccali, *J. Amer. Soc. Nephrol.*, 17:S61-S-63, 2006.

SE REIVINDICA LO SIGUIENTE:

1. Un método para tratar la nefropatía, resistencia a la insulina, diabetes, disfunción endotelial, esteatosis hepática o patología cardiovascular en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la estructura:



en donde R_1 es:

$-\text{CN}$, o

$\text{C}_1\text{-C}_{15}$ -acilo o $\text{C}_1\text{-C}_{15}$ -alquilo, en donde cualquiera de estos grupos puede estar sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo; o

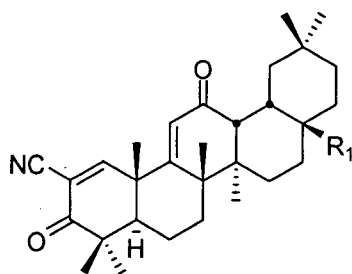
una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato de dicho compuesto.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el método trata la nefropatía.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la nefropatía es nefropatía diabética.
4. El método de la reivindicación 2, en donde la nefropatía es resultado de una agresión tóxica.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la agresión tóxica es resultado de un agente de contraste o un fármaco.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el fármaco es una sustancia quimioterapéutica.
7. El método de la reivindicación 2, en donde la nefropatía es resultado de una lesión por isquemia/reperfusión.

8. El método de la reivindicación 2, en donde la nefropatía es resultado de diabetes o hipertensión.
9. El método de la reivindicación 2, en donde la nefropatía es resultado de una enfermedad autoinmune.
10. El método de la reivindicación 2, en donde la nefropatía es nefropatía crónica.
11. El método de la reivindicación 2, en donde la nefropatía es nefropatía aguda.
12. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto se ha sometido a diálisis o se está sometiendo a diálisis.
13. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto se ha sometido a un transplante de riñón o es candidato para dicho transplante.
14. El método de la reivindicación 1, en donde el método trata la nefropatía y la resistencia a la insulina.
15. El método de la reivindicación 14, en donde el método trata la nefropatía, resistencia a la insulina y disfunción endotelial.
16. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene nefropatía y diabetes.
17. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene resistencia a la insulina.
18. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene diabetes.
19. El método de la reivindicación 18, en donde la cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto también trata eficazmente una o más complicaciones asociadas con la diabetes.
20. El método de la reivindicación 19, en donde las complicaciones se seleccionan del grupo integrado por obesidad, hipertensión, aterosclerosis, cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular, vasculopatía periférica, hipertensión, nefropatía, neuropatía, mionecrosis, retinopatía y síndrome metabólico (síndrome X).

21. El método de la reivindicación 20, en donde la complicación es el síndrome metabólico (síndrome X).
22. El método de la reivindicación 18, en donde la diabetes es resultado de la resistencia a la insulina.
23. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene nefropatía y disfunción endotelial.
24. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene nefropatía y patología cardiovascular.
25. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene la patología cardiovascular.
26. El método de la reivindicación 25, en donde la patología cardiovascular es resultado de la disfunción endotelial.
27. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene disfunción endotelial.
28. El método de la reivindicación 27, en donde el método trata la disfunción endotelial y resistencia a la insulina.
29. El método de la reivindicación 1, en donde el método trata la esteatosis hepática.
30. El método de la reivindicación 29, en donde la esteatosis hepática es esteatosis hepática no alcohólica.
31. El método de la reivindicación 29, en donde la esteatosis hepática es esteatosis hepática alcohólica.
32. El método de la reivindicación 29, en donde el método trata la esteatosis hepática y uno o más de los siguientes trastornos: nefropatía, resistencia a la insulina, diabetes, disfunción endotelial y patología cardiovascular.

33. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que además comprende identificar a un sujeto que necesite tratamiento para cualquiera de las enfermedades, disfunciones, resistencias o trastornos listados.
34. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde el sujeto tiene antecedentes familiares o clínicos de cualquiera de las enfermedades, disfunciones, resistencias o trastornos listados.
35. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde el sujeto tiene síntomas de cualquiera de las enfermedades, disfunciones, resistencias o trastornos listados.
36. Un método para mejorar la velocidad de filtración glomerular o la depuración de creatinina en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la estructura:



en donde R₁ es:

—CN, o

C₁-C₁₅-acilo o C₁-C₁₅-alquilo, en donde cualquiera de estos grupos puede estar sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo; o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato de dicho compuesto.

37. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde el compuesto se administra en forma local.
38. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde el compuesto se administra en forma sistémica.

39. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde el compuesto se administra por vía oral, intra-adiposal, intra-arterial, intra-articular, intracraneal, intradérmica, intralesional, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrarrectal, intratecal, intratraqueal, intratumoral, intraumbilical, intravaginal, intravenosa, intravesicular, intravítrea, liposomal, local, mucosal, oral, parenteral, rectal, subconjuntival, subcutánea, sublingual, tópica, transbucal, transdérmica, vaginal, en cremas, en composiciones lipídicas, a través de catéter, por lavado, por infusión continua, por infusión, por inhalación, por inyección, por colocación local, por perfusión local, por baño directo de las células objetivo, o cualquier combinación de estos métodos.
40. El método de la reivindicación 39, en donde el compuesto se administra por vía intravenosa, intra-arterial u oral.
41. El método de la reivindicación 40, en donde el compuesto se administra por vía oral.
42. El método de la reivindicación 41, en donde el compuesto se formula como una cápsula dura o blanda, una tableta, un jarabe, una suspensión, una dispersión en un sólido, una oblea o un elixir.
43. El método de la reivindicación 42, en donde el compuesto se formula como una dispersión en un sólido.
44. El método de la reivindicación 42, en donde la cápsula blanda es una cápsula de gelatina.
45. El método de la reivindicación 44, que además comprende un revestimiento protector.
46. El método de la reivindicación 44, que además comprende un agente que retrasa la absorción.
47. El método de la reivindicación 42, que además comprende un agente que aumenta la solubilidad o dispersibilidad.
48. El método de la reivindicación 39, en donde el compuesto está disperso en un liposoma, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.

49. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde la cantidad farmacéuticamente eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 0.1 mg a 500 mg del compuesto.
50. El método de la reivindicación 49, en donde la dosis diaria es aproximadamente 1 mg a aproximadamente 300 mg de compuesto.
51. El método de la reivindicación 50, en donde la dosis diaria es aproximadamente 10 mg a aproximadamente 200 mg de compuesto.
52. El método de la reivindicación 51, en donde la dosis diaria es aproximadamente 25 mg de compuesto.
53. El método de la reivindicación 51, en donde la dosis diaria es aproximadamente 75 mg de compuesto.
54. El método de la reivindicación 51, en donde la dosis diaria es aproximadamente 150 mg de compuesto.
55. El método de la reivindicación 49, en donde la dosis diaria es aproximadamente desde 0.1 mg a aproximadamente 30 mg de compuesto.
56. El método de la reivindicación 55, en donde la dosis diaria es aproximadamente desde 0.5 mg a aproximadamente 20 mg de compuesto.
57. El método de la reivindicación 56, en donde la dosis diaria es aproximadamente desde 1mg a aproximadamente 15 mg de compuesto.
58. El método de la reivindicación 57, en donde la dosis diaria es aproximadamente desde 1 mg a aproximadamente 10 mg de compuesto.
59. El método de la reivindicación 58, en donde la dosis diaria es aproximadamente desde 1 mg a aproximadamente 5 mg de compuesto.

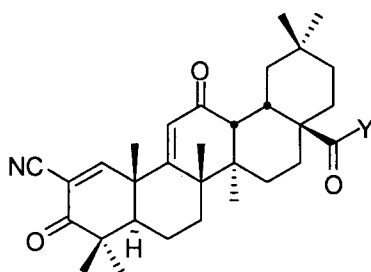
60. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde la cantidad farmacéuticamente eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 0,01 – 25 mg de compuesto por kg de peso corporal.
61. El método de la reivindicación 60, en donde la dosis diaria es 0,05 – 20 mg de compuesto por kg de peso corporal.
62. El método de la reivindicación 61, en donde la dosis diaria es 0,1 – 10 mg de compuesto por kg de peso corporal.
63. El método de la reivindicación 62, en donde la dosis diaria es 0,1 – 5 mg de compuesto por kg de peso corporal.
64. El método de la reivindicación 63, en donde la dosis diaria es 0,1 – 2.5 mg de compuesto por kg de peso corporal.
65. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde la cantidad farmacéuticamente eficaz se administra en una sola dosis por día.
66. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde la cantidad farmacéuticamente eficaz se administra en dos o más dosis por día.
67. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, que además comprende una segunda terapia.
68. El método de la reivindicación 67, en donde la segunda terapia comprende administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un segundo fármaco.
69. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un fármaco para reducir el colesterol, un fármaco contra la hiperlipidemia, un bloqueador de los canales de calcio, un fármaco contra la hipertensión, o un inhibidor de la HMG-CoA reductasa.
70. El método de la reivindicación 69, en donde el segundo fármaco es amlodipina, aspirina, ezetimibe, felodipina, lacidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina o nitrendipina.

71. El método de la reivindicación 69, en donde el segundo fármaco es atenolol, bucindolol, carvedilol, clonidina, doxazosina, indoramina, labetalol, metildopa, metoprolol, nadolol, oxprenolol, fenoxibenzamina, fentolamina, pindolol, prazosina, propranolol, terazosina, timolol o tolazolina.
72. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es una estatina.
73. El método de la reivindicación 72, en donde la estatina es atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina o simvastatina.
74. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un inhibidor de la dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-4).
75. El método de la reivindicación 74, en donde el inhibidor de la DPP-4 es sitagliptina, vildagliptina, SYR-322, BMS 477118 o GSK 823093.
76. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es una biguanida.
77. El método de la reivindicación 76, en donde la biguanida es metformina.
78. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es una tiazolidindiona (TZD).
79. El método de la reivindicación 78, en donde la TZD es pioglitazona, rosiglitazona o troglitazona.
80. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un derivado de sulfonilurea.
81. El método de la reivindicación 80, en donde el derivado de sulfonilurea se selecciona del grupo integrado por tolbutamida, acetohexamida, tolazamida, clorpropamida, glipizida, gliburida, glimepirida y gliclazida.
82. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es una meglitinida.

83. El método de la reivindicación 82, en donde la meglitinida se selecciona del grupo integrado por repaglinida, mitiglinida y nateglinida.
84. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es insulina.
85. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un inhibidor de alfa-glucosidasa.
86. El método de la reivindicación 85, en donde el inhibidor de alfa-glucosidasa se selecciona del grupo integrado por acarbosa, miglitol y voglibosa.
87. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un análogo del péptido-1 semejante al glucagon.
88. El método de la reivindicación 87, en donde el análogo del péptido-1 semejante al glucagon se selecciona del grupo integrado por exenatida y liraglutida.
89. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un análogo del péptido gástrico inhibitorio.
90. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un agonista de GPR40.
91. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un agonista de GPR119.
92. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un agonista de GPR30.
93. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un activador de la glucoquinasa.
94. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un antagonista de los receptores de glucagon.

95. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un análogo de amilina.
96. El método de la reivindicación 95, en donde el análogo de amilina es pramlintida.
97. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un antagonista de receptores de IL-1 β .
98. El método de la reivindicación 97, en donde el antagonista de receptores de IL-1 β es anakinra.
99. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un antagonista o un agonista inverso de receptores de endocannabinoides.
100. El método de la reivindicación 99, en donde el antagonista o el agonista inverso de receptores de endocannabinoides es rimonabant.
101. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es Orlistat.
102. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es Sibutramina.
103. El método de la reivindicación 68, en donde el segundo fármaco es un factor de crecimiento.
104. El método de la reivindicación 103, en donde el factor de crecimiento es TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 1.2, VEGF, factor de crecimiento semejante a la insulina I o II, BMP2, BMP4, BMP7, análogo de GLP-1, un análogo de GIP, un inhibidor de DPP-IV, un agonista de GPR119, un agonista de GPR40, gastrina, EGF, betacelulina, KGF, NGF, insulina, hormona de crecimiento, HGF, un FGF, un homólogo de FGF, PDGF, leptina, prolactina, lactógeno placentario, PTHrP, activina, inhibina o INGAP.
105. El método de la reivindicación 103, en donde el factor de crecimiento es hormona paratiroidea, calcitonina, interleucina-6 o interleucina-11.
106. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde el sujeto es un primate.

107. El método de la reivindicación 106, en donde el primate es un ser humano.
108. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde el sujeto es una vaca, caballo, perro, gato, cerdo, ratón, rata o cobayo.
109. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-108, en donde el compuesto se define adicionalmente como



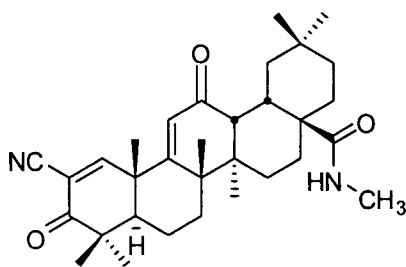
en donde Y es:

-H, hidroxilo, amino, halógeno, o

C₁-C₁₄-alcoxilo, C₂-C₁₄-alqueniloxilo, C₂-C₁₄-alquiniloxilo, C₁-C₁₄-ariloxilo, C₂-C₁₄-arilalquiloxilo, C₁-C₁₄-alquilamino, C₂-C₁₄-alquenilamino, C₂-C₁₄-alquinilamino, C₁-C₁₄-arilamino, C₃-C₁₀-arilo, o C₂-C₁₄-arilalquilamino, en donde cualquiera de estos grupos puede estar sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo; o

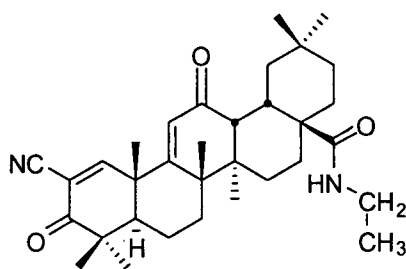
una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato de dicho compuesto.

110. El método de la reivindicación 109, en donde Y es un C₁-C₄-alquilamino no sustituido con heteroátomo.
111. El método de la reivindicación 110, en donde el compuesto se define adicionalmente como:

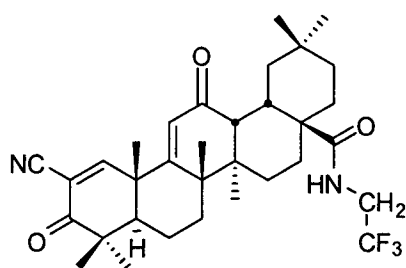


112. El método de la reivindicación 110, en donde Y es un C₂-C₄-alquilamino sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo.

113. El método de la reivindicación 112, en donde el compuesto se define adicionalmente como:



114. El método de la reivindicación 112, en donde el compuesto se define adicionalmente como:

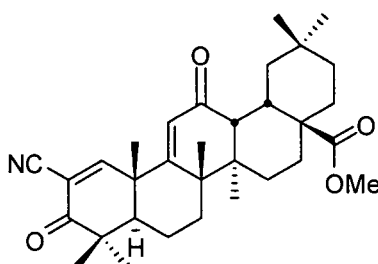


115. El método de la reivindicación 109, en donde Y es un C₁-C₄-alcoxilo sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo.

116. El método de la reivindicación 115, en donde Y es un C₁-C₄-alcoxilo no sustituido con un heteroátomo.

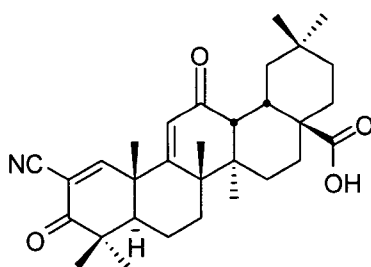
117. El método de la reivindicación 116, en donde Y es un C₁-C₂-alcoxilo no sustituido con un heteroátomo.

118. El método de la reivindicación 115, en donde el compuesto se define adicionalmente como:

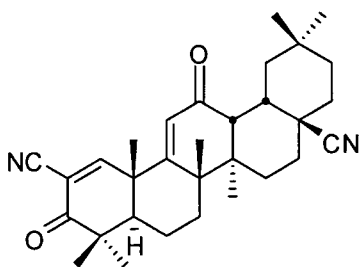


119. El método de la reivindicación 118, en donde al menos una porción del compuesto de la reivindicación 118 está presente como una forma polimórfica, en donde la forma polimórfica es una forma cristalina que tiene un patrón de difracción de rayos X ($\text{CuK}\alpha$) que comprende los picos de difracción significativos a aproximadamente 8.8, 12.9, 13.4, 14.2 y 17.4 $^{\circ}2\theta$.
120. El método de la reivindicación 119, en donde el patrón de difracción de rayos X ($\text{CuK}\alpha$) es sustancialmente como se muestra en la Figura 12^a ó en la figura 12B.
121. El método de la reivindicación 118, en donde al menos una porción del compuesto de la reivindicación 118 está presente como una forma polimórfica, en donde la forma polimórfica es una forma amorfa que tiene un patrón de difracción de rayos X ($\text{CuK}\alpha$) con un pico de halógeno en aproximadamente 13.5 $^{\circ}2\theta$, sustancialmente como se muestra en la Figura 12C y un T_g .
122. El método de la reivindicación 121, en donde el valor de T_g está dentro de los límites de aproximadamente 120 $^{\circ}\text{C}$ a aproximadamente 135 $^{\circ}\text{C}$.
123. El método de la reivindicación 122, en donde el valor de T_g está dentro de los límites de aproximadamente 125 $^{\circ}\text{C}$ a aproximadamente 130 $^{\circ}\text{C}$.
124. El método de la reivindicación 109, en donde Y es hidroxilo.

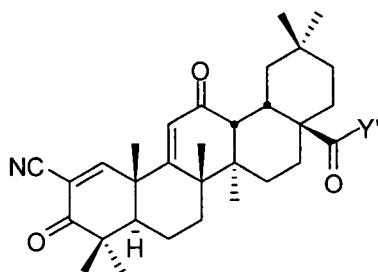
125. El método de la reivindicación 124, en donde el compuesto se define adicionalmente como:



126. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-108, en donde el compuesto se define adicionalmente como:



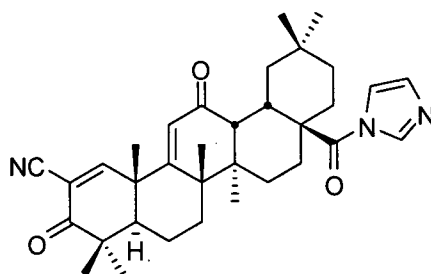
127. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-108, en donde el compuesto se define adicionalmente como



en donde Y' es un C₁-C₁₄-arilo sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo; o

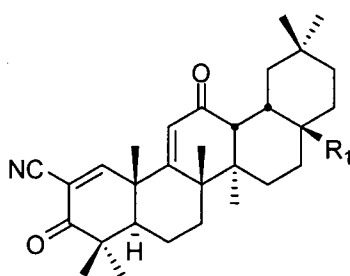
una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato de dicho compuesto.

128. El método de la reivindicación 127, en donde el compuesto se define adicionalmente como:



129. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 36, 109-128, en donde el compuesto está mayormente exento de isómeros ópticos del compuesto.
130. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 36, 109, 110, 112, 115, y 127, en donde el compuesto está en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.
131. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 36, 109, 110, 112, 115, y 127, en donde el compuesto no es una sal.
132. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 36, 109, 110, 112, 115, y 127, en donde el compuesto se formula como una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto y (ii) un excipiente que se selecciona del grupo integrado por (A) un carbohidrato, un derivado de carbohidrato, o un polímero de carbohidrato, (B) un polímero orgánico sintético, (C) una sal de ácido orgánico, (D) una proteína, polipéptido o péptido, y (E) un polisacárido de elevado peso molecular.
133. El método de la reivindicación 132, en donde el excipiente es un polímero orgánico sintético.
134. El método de la reivindicación 133, en donde el excipiente se selecciona del grupo integrado por una hidroxipropil-metil-celulosa, un poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno] o uno de sus copolímeros, y un copolímero de ácido metacrílico – metacrilato de metilo.
135. El método de la reivindicación 134, en donde el excipiente es un éster ftalato de hidroxipropil-metil-celulosa.

136. El método de la reivindicación 134, en donde el excipiente es PVP/VA.
137. El método de la reivindicación 134, en donde el excipiente es un copolímero de ácido metacrílico – acrilato de etilo (1:1).
138. El método de la reivindicación 133, en donde el excipiente es copovidona.
139. Un compuesto que tiene la estructura:



en donde R_1 es:

$-\text{CN}$, o

$\text{C}_1\text{-C}_{15}$ -acilo o $\text{C}_1\text{-C}_{15}$ -alquilo, en donde cualquiera de estos grupos puede estar sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo; o

una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato de dicho compuesto para usar en un método destinado a mejorar la velocidad de filtración glomerular o la depuración de creatinina en un sujeto.

140. El compuesto para el uso de la reivindicación 139, en donde el sujeto necesita tratamiento de la nefropatía, resistencia a la insulina, diabetes, una complicación asociada con la diabetes, disfunción endotelial, esteatosis hepática o patología cardiovascular.
141. El compuesto para el uso de la reivindicación 129, en donde la nefropatía
- (a) es nefropatía diabética,
 - (b) es nefropatía crónica,
 - (c) es nefropatía aguda,
 - (d) es resultado de lesión por isquemia/reperfusión,
 - (e) es resultado de diabetes o hipertensión,
 - (f) es resultado de una enfermedad autoinmune, o

- (g) es resultado de una agresión tóxica, especialmente una agresión tóxica que es el resultado de un agente de contraste o de un fármaco tal como un agente de quimioterapia.
142. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-141, en donde el sujeto se ha sometido a diálisis o se está sometiendo a diálisis, o en donde el sujeto ha tenido un trasplante de riñón o es candidato para un trasplante.
143. El compuesto para el uso de la reivindicación 140, en donde la complicación es obesidad, hipertensión, aterosclerosis, cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular, vasculopatía periférica, hipertensión, nefropatía, neuropatía, mionecrosis, retinopatía o síndrome metabólico (síndrome X).
144. El compuesto para el uso de la reivindicación 140, en donde la diabetes es resultado de resistencia a la insulina, en donde la patología cardiovascular es resultado de la disfunción endotelial, y/o en donde la esteatosis hepática es una esteatosis hepática alcohólica o no alcohólica.
145. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-144, en donde el compuesto se administra en forma local o sistémica, especialmente en donde el compuesto se administra por vía oral, intra-adiposal, intra-arterial, intra-articular, intracraneal, intradérmica, intralesional, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrarrectal, intratecal, intratraqueal, intratumoral, intraumbilical, intravaginal, intravenosa, intravesicular, intravítrea, liposomal, local, mucosal, oral, parenteral, rectal, subconjuntival, subcutánea, sublingual, tópica, transbucal, transdérmica, vaginal, en cremas, en composiciones lipídicas, a través de catéter, por lavado, por infusión continua, por infusión, por inhalación, por inyección, por colocación local, por perfusión local, por baño directo de las células objetivo, o cualquier combinación de estos métodos.
146. El compuesto para el uso de la reivindicación 145, en donde el compuesto se administra en forma oral y se formula como una cápsula dura o blanda, tal como una cápsula de gelatina, en que dicha cápsula de gelatina opcionalmente comprende además un

revestimiento protector o un agente que retrase la absorción; se formula como una tableta, un jarabe, una suspensión, una dispersión en un sólido, una oblea o un elixir.

147. El compuesto para el uso de la reivindicación 146, cuya formulación además comprende un agente que aumenta la solubilidad o dispersibilidad.
148. El compuesto para el uso de la reivindicación 145, en donde el compuesto está dispersado en un liposoma, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.
149. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-148, en donde la dosis diaria es 25 mg a 500 mg del compuesto, 0,01 – 25 mg del compuesto por kg de peso corporal, especialmente 0,5 – 20 mg, 0,10 – 10 mg, ó 0.1 – 5 mg del compuesto por kg de peso corporal.
150. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-149, en donde el compuesto se administra en una sola dosis por día o en dos o más dosis por día.
151. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-150, en donde el tratamiento con el compuesto se combina con una segunda terapia, especialmente en donde la segunda terapia comprende un tratamiento con un segundo fármaco tal como un fármaco que reduce el colesterol, un fármaco anti-hiperlipidémico, un bloqueador de los canales de calcio, un agente contra la hipertensión o un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, especialmente la amlodipina, aspirina, ezetimibe, felodipina, lacidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, atenolol, bucindolol, carvedilol, clonidina, doxazosina, indoramina, labetalol, metildopa, metoprolol, nadolol, oxprenolol, fenoxibenzamina, fentolamina, pindolol, prazosina, propranolol, terazosina, timolol, tolazolina, o un estatina, incluyendo la atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina.
152. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-150, en donde el tratamiento con el compuesto se combina con una segunda terapia que comprende el tratamiento con un inhibidor de la dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-4) tal como la sitagliptina, vildagliptina, SYR-322, BMS 477118, o GSK 823093; con una biguanida tal como el

metformina, o con una tiazolidindiona (TZD) tal como la pioglitazona, rosiglitazona y troglitazona; con un derivado de sulfonilurea tal como la tolbutamida, acetohexamida, tolazamida, clorpropamida, glipizida, gliburida, glimepirida, y gliclazida; con una meglitinida tal como la repaglinida, mitiglinida y nateglinida; con insulina; con un inhibidor de alfa-glucosidasa tal como la acarbosa, miglitol y voglibosa; con un análogo de péptido 1 semejante al glucagon tal como la exenatida y liraglutida; con un análogo del péptido gástrico inhibitorio; con un agonista de GPR40; con un agonista de GPR119; con un agonista de GPR30; con un activador de la glucoquinasa; con un antagonista de receptores de glucagon; con un análogo de amilina tal como la pramlintida; con un antagonista de receptores de IL-1 β tal como anakinra; con un antagonista o agonista inverso de los receptores de endocannabinoides tal como el rimonabant; con Orlistat; con Sibutramina; con un factor de crecimiento tal como TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 1.2, VEGF, factor de crecimiento semejante a la insulina I o II, BMP2, BMP4, BMP7, análogo de GLP-1, un análogo de GIP, un inhibidor de DPP-IV, un agonista de GPR119, un agonista de GPR40, gastrina, EGF, betacelulina, KGF, NGF, insulina, hormona de crecimiento, HGF, un FGF, un homólogo de FGF, PDGF, leptina, prolactina, lactógeno placentario, PTHrP, activina, inhibina, INGAP, hormona paratiroidea, calcitonina, interleucina-6 o interleucina-11.

153. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-152, en donde el sujeto es un primate, especialmente un ser humano, o una vaca, un caballo, un perro, un gato, un cerdo, un ratón, una rata o un cobayo.
154. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-153, en donde R₁ es -C(=O)-Y e Y es:

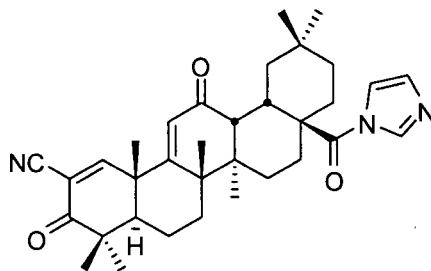
-H, hidroxilo, amino, halógeno, o

C₁-C₁₄-alcoxilo, C₂-C₁₄-alqueniloxilo, C₂-C₁₄-alquiniloxilo, C₁-C₁₄-ariloxilo, C₂-C₁₄-arilalcoxilo, C₁-C₁₄-alquilamino, C₂-C₁₄-alquenilamino, C₂-C₁₄-alquinilamino, C₁-C₁₄-arilamino, C₃-C₁₀-arilo, o C₂-C₁₄-arilalquilamino, en donde cualquiera de estos grupos puede estar sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo, especialmente en donde Y es

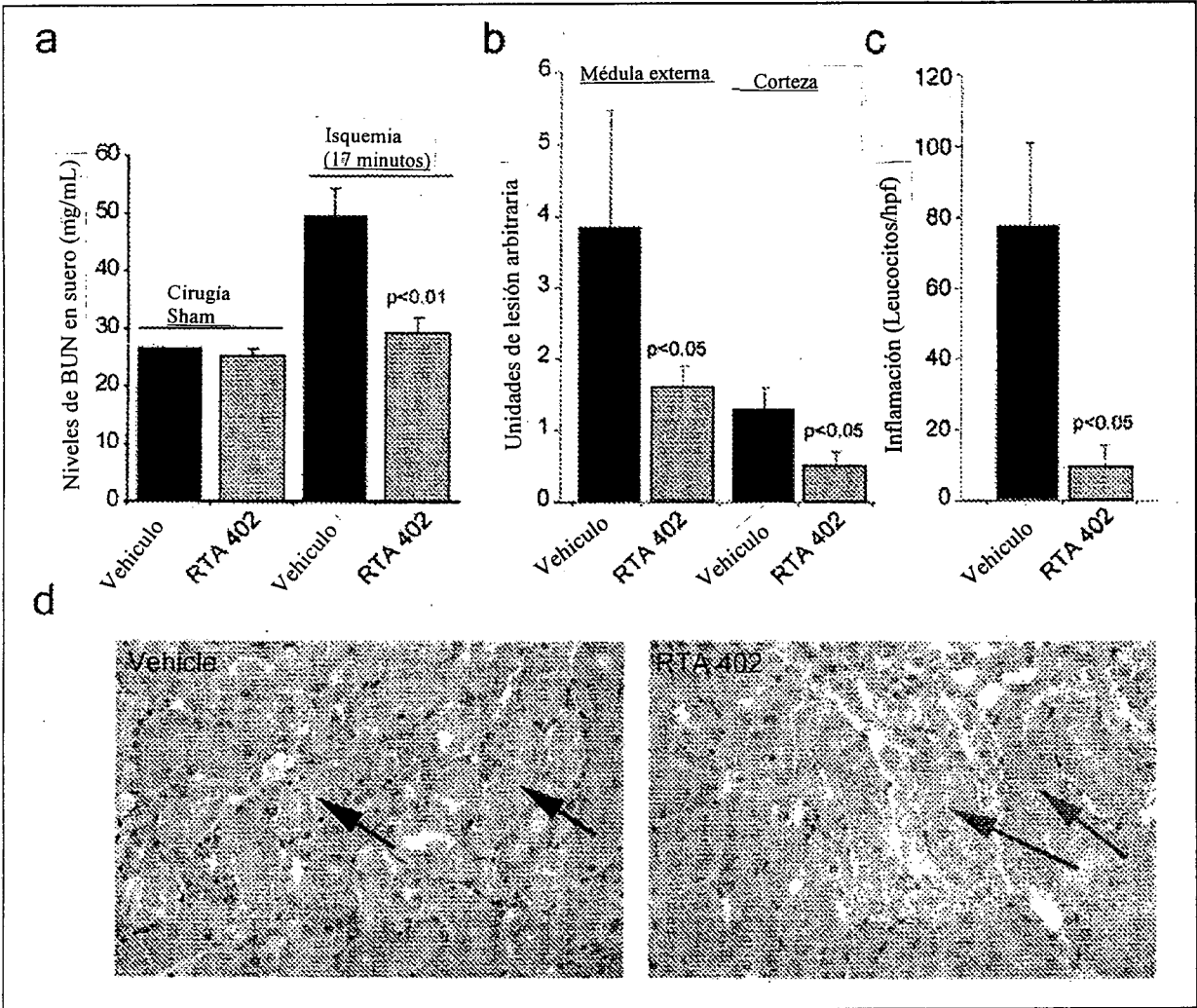
- (a) un C₁-C₄-alquilamino no sustituido con un heteroátomo, tal como -NHCH₃,
- (b) un C₂-C₄-alquilamino sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo tal como -NHCH₂CH₃ o -NHCH₂CF₃,
- (c) un C₁-C₄-alcoxilo no sustituido con un heteroátomo tal como -OCH₃, o
- (d) hidroxilo.

155. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-153, en donde R₁ es -CN.

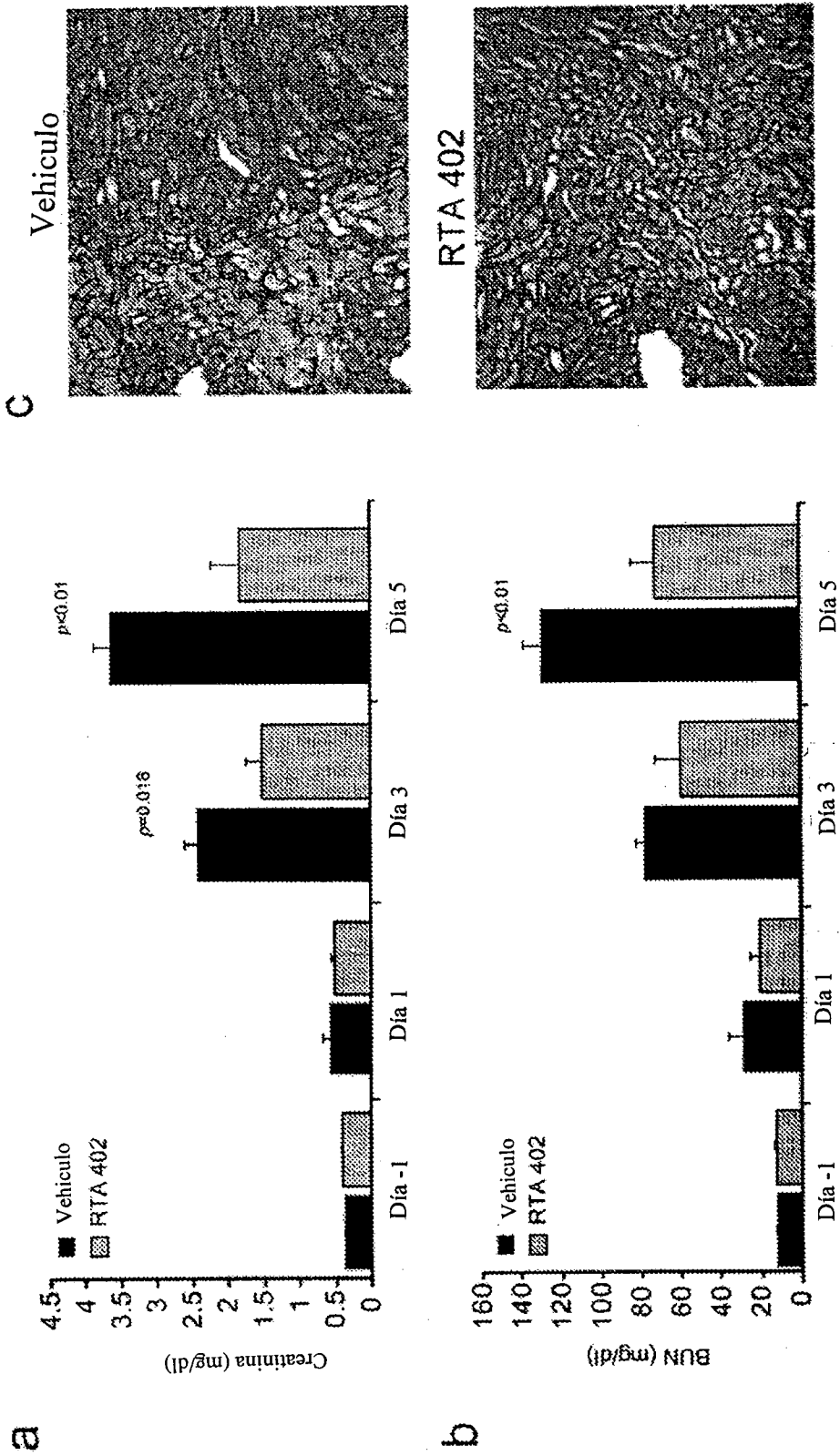
156. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-153, en donde R₁ es -C(=O)-Y' e Y' es un C₁-C₁₄-arilo sustituido con un heteroátomo o no sustituido con un heteroátomo, especialmente en donde el compuesto es:



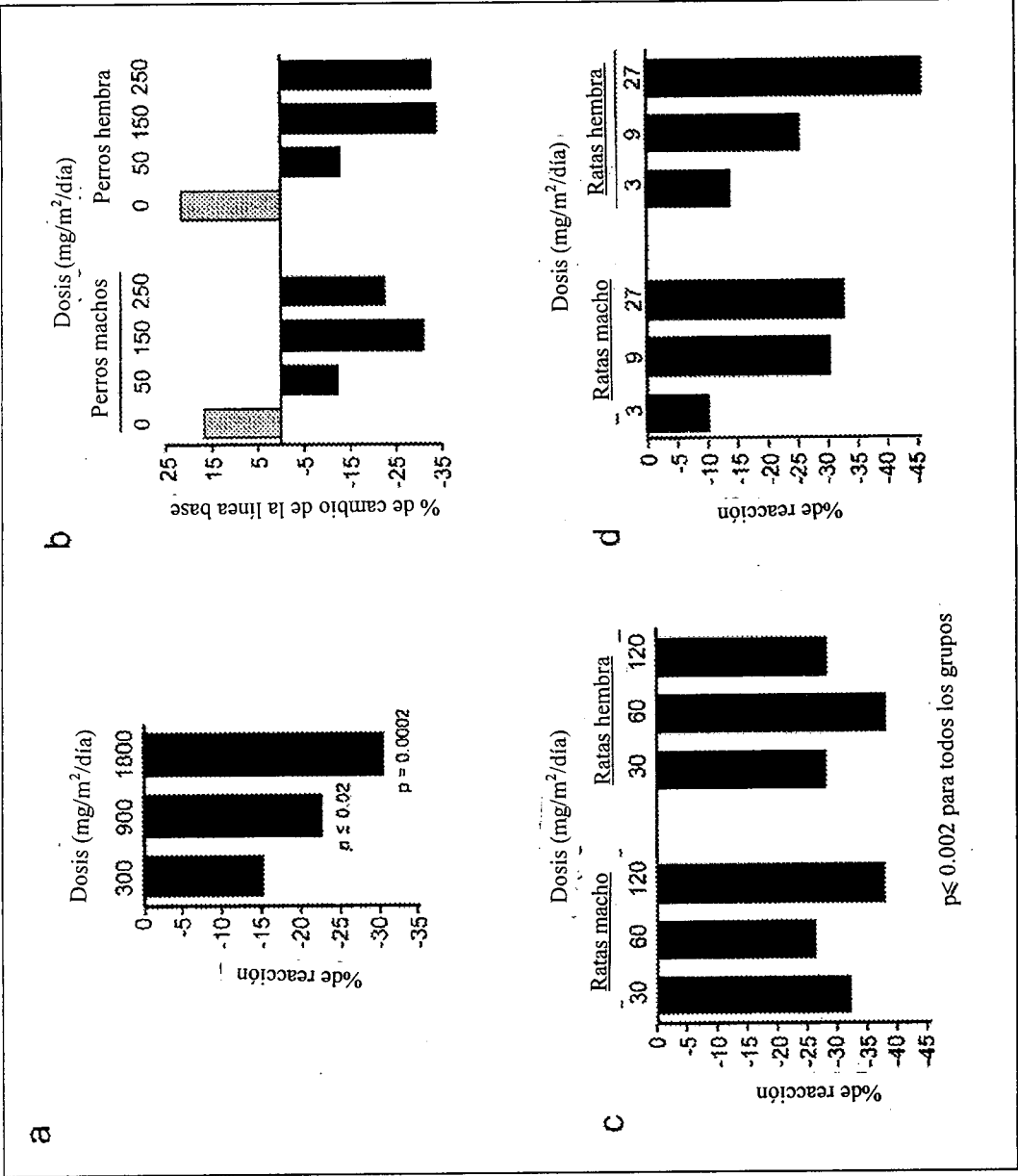
157. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 139-156, en donde el compuesto es un isómero óptico esencialmente puro.



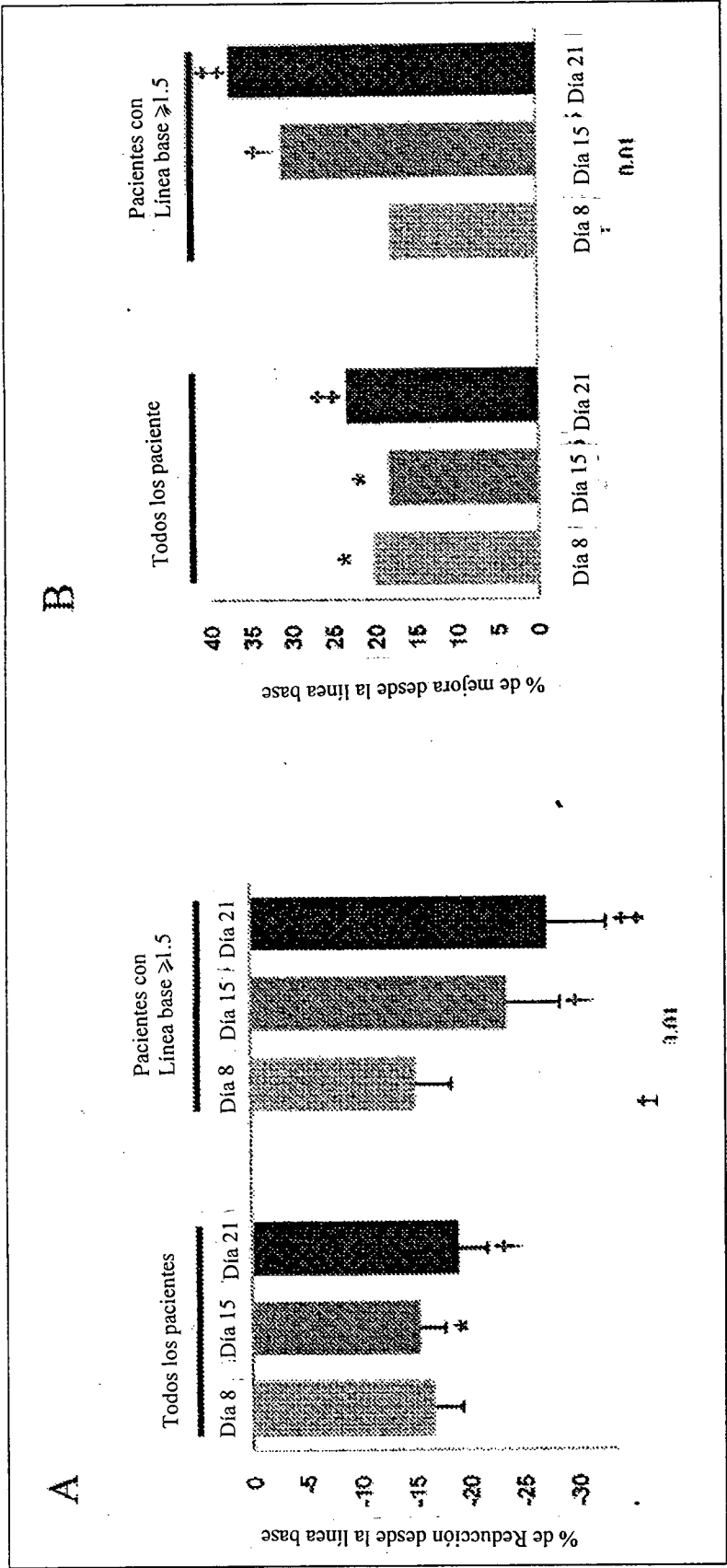
FIGURAS 1A-D



FIGURAS 2A-C



FIGURAS 3A-D



FIGURAS 4A-D

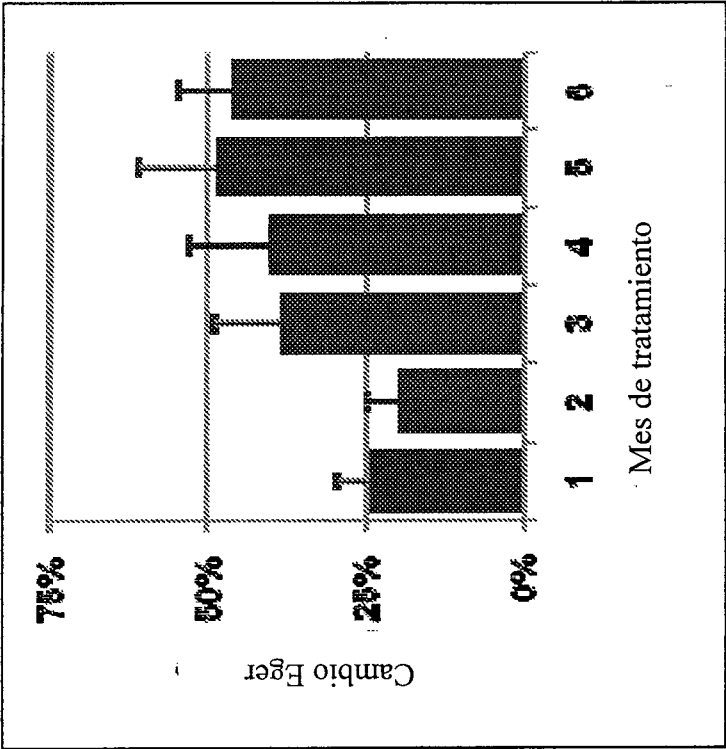


FIGURA 5

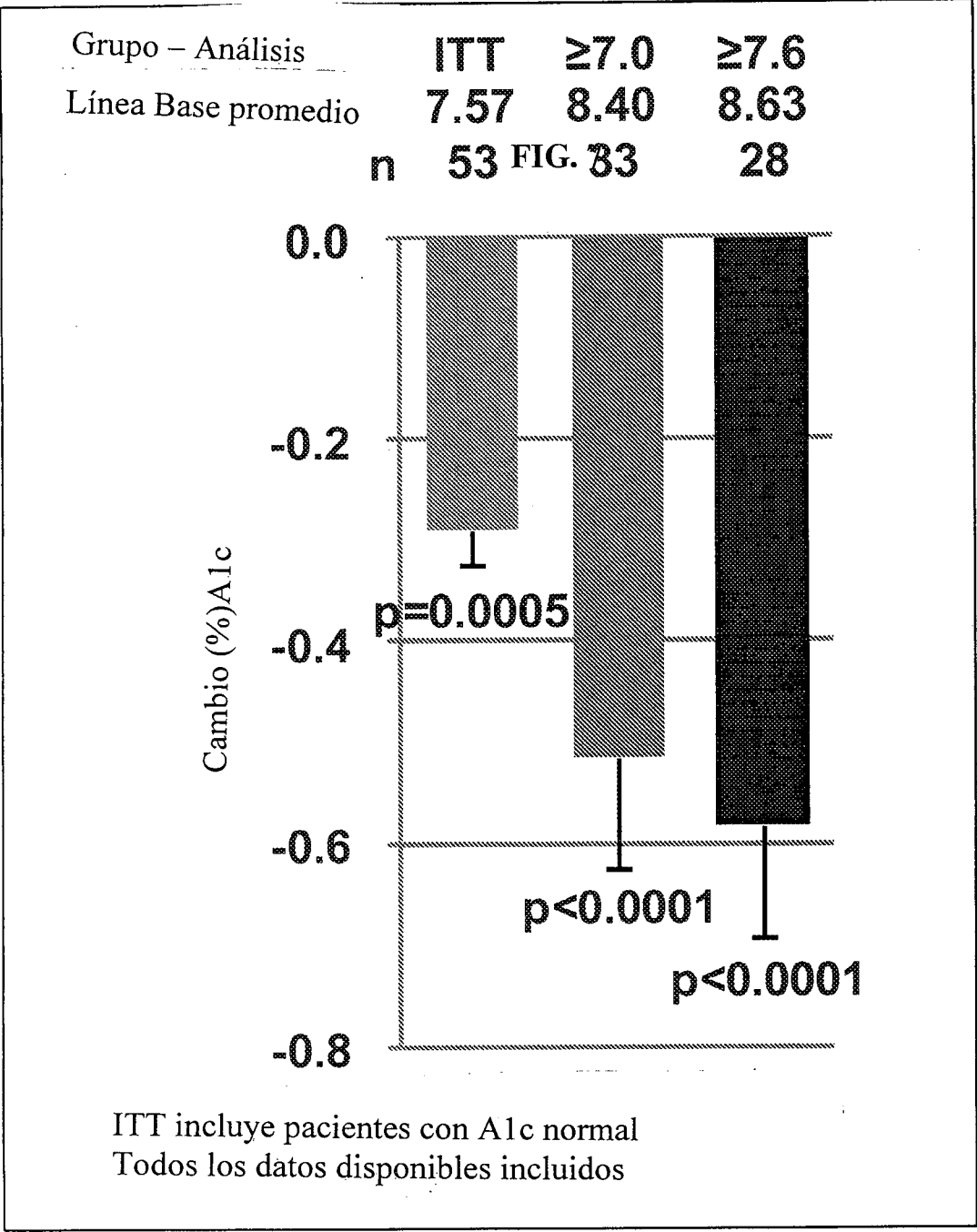


FIGURA 6

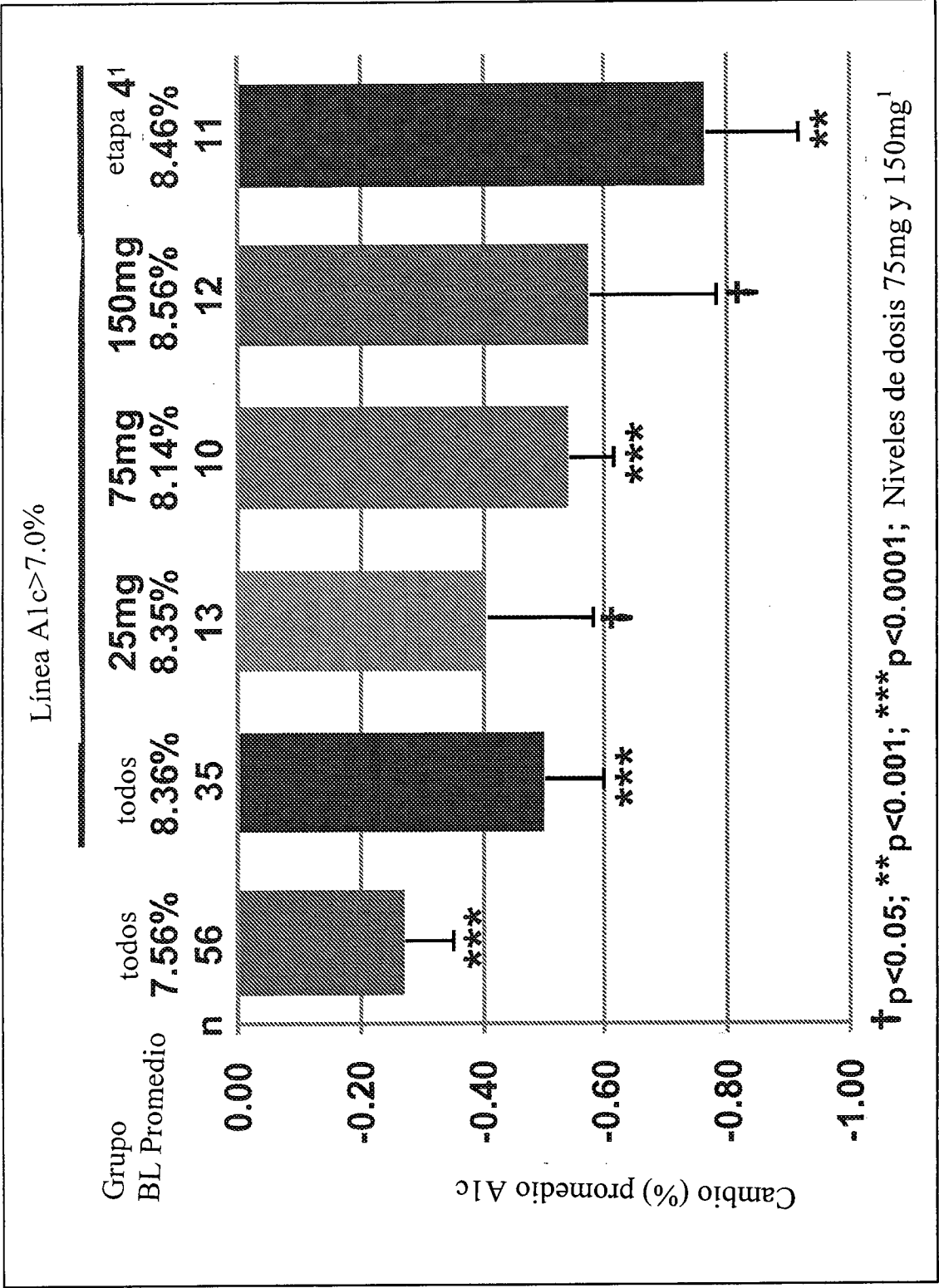


FIGURA 7

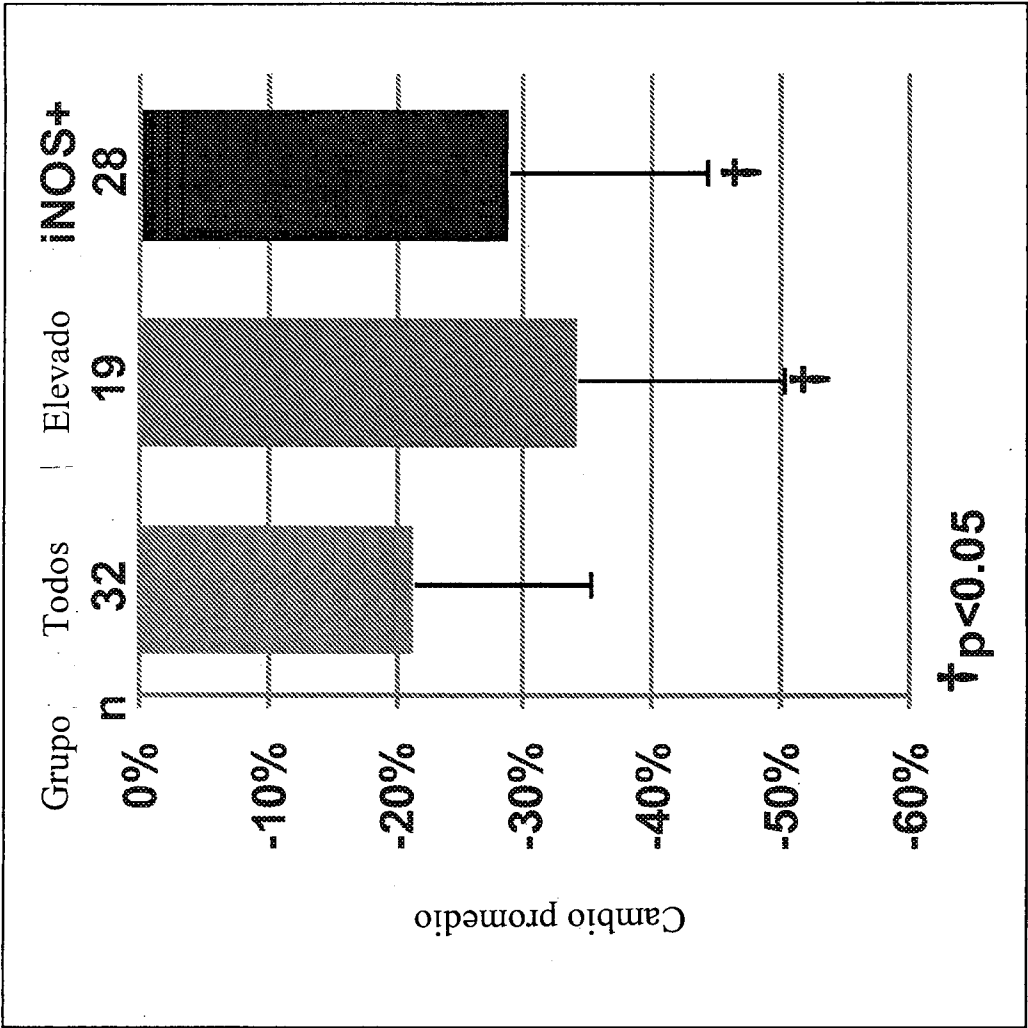


FIGURA 8

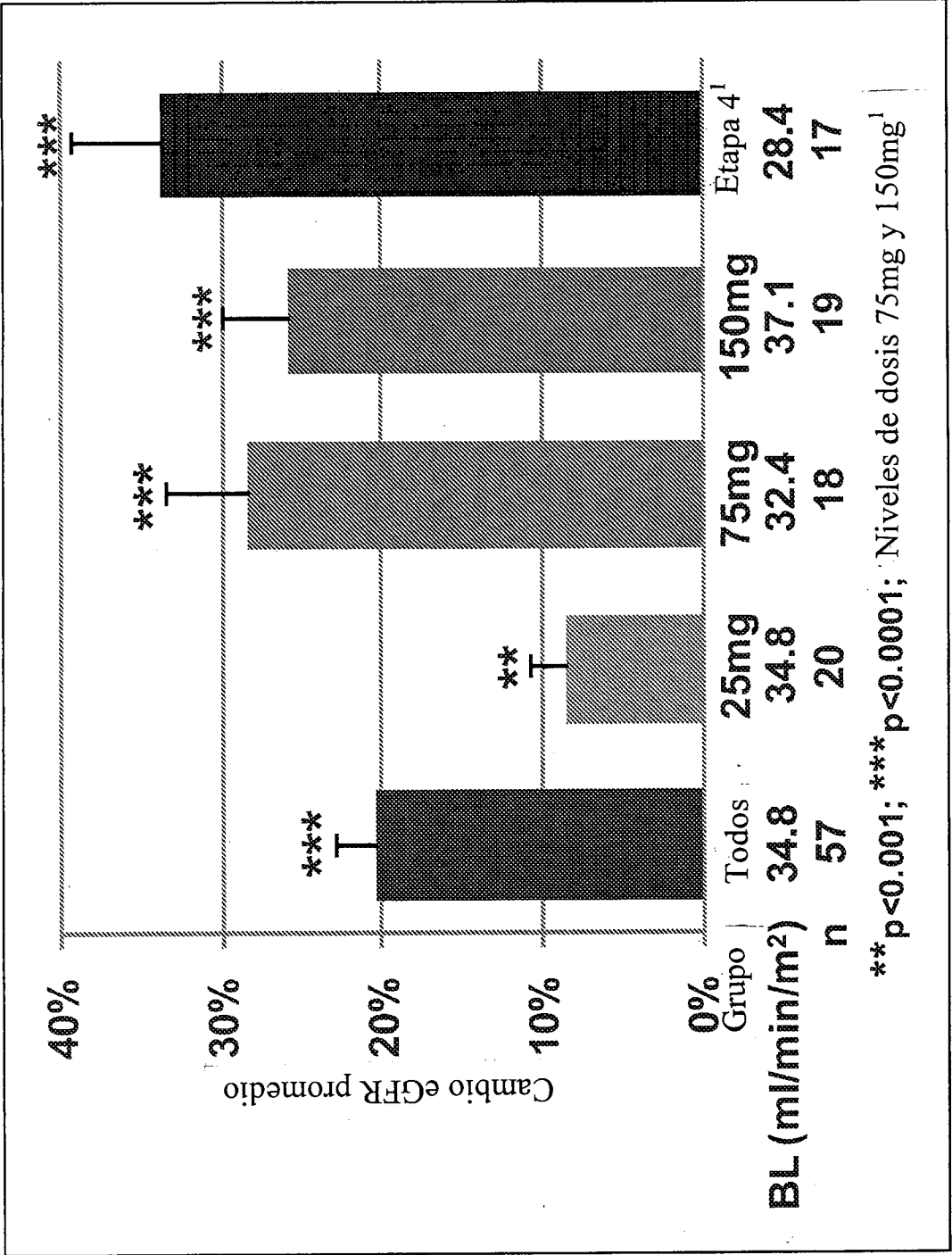


FIGURA 9

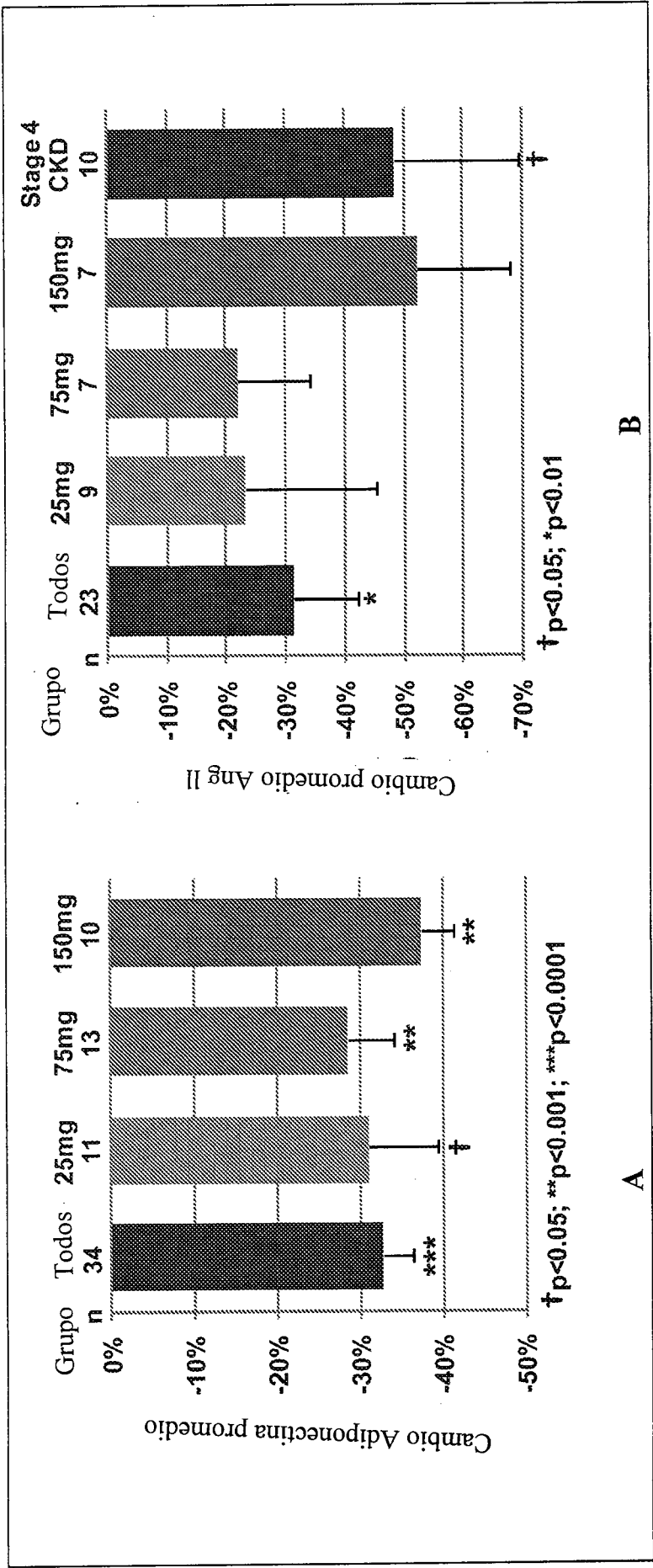


FIGURA 10A-B

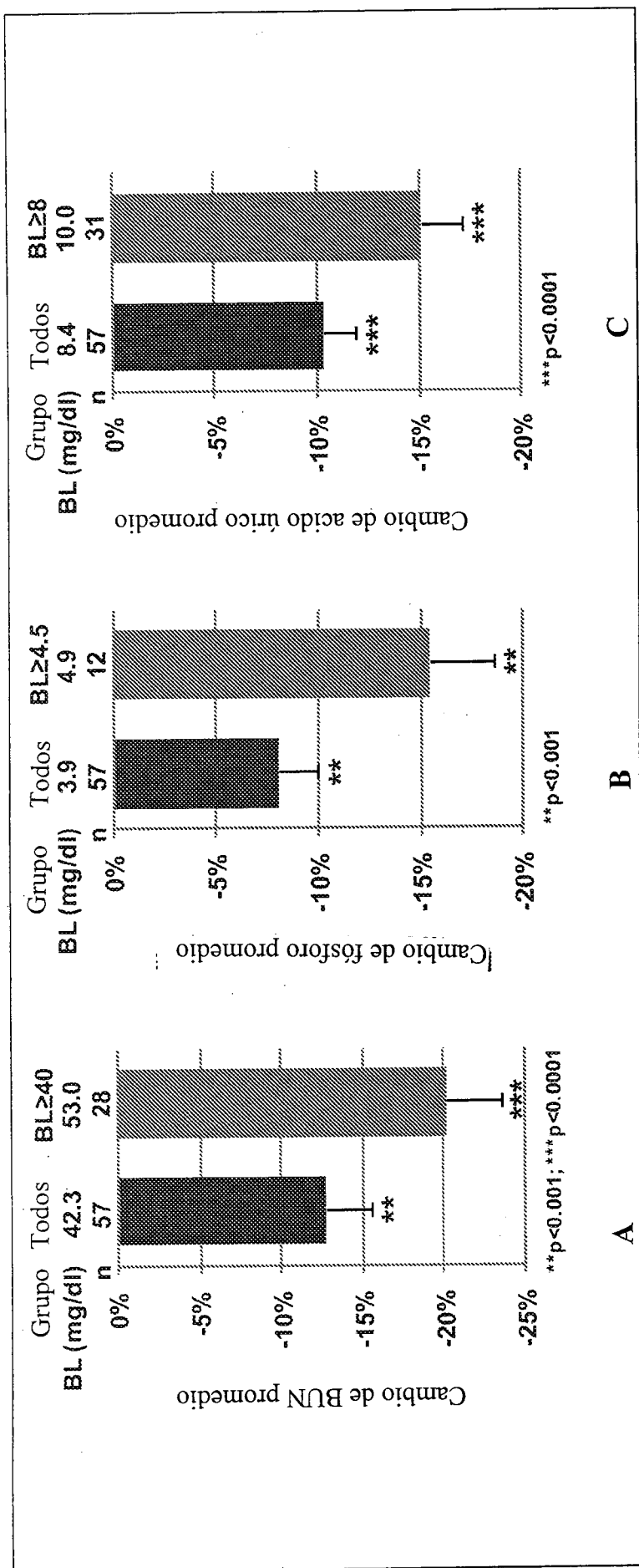


FIGURA 11A-C

12/15

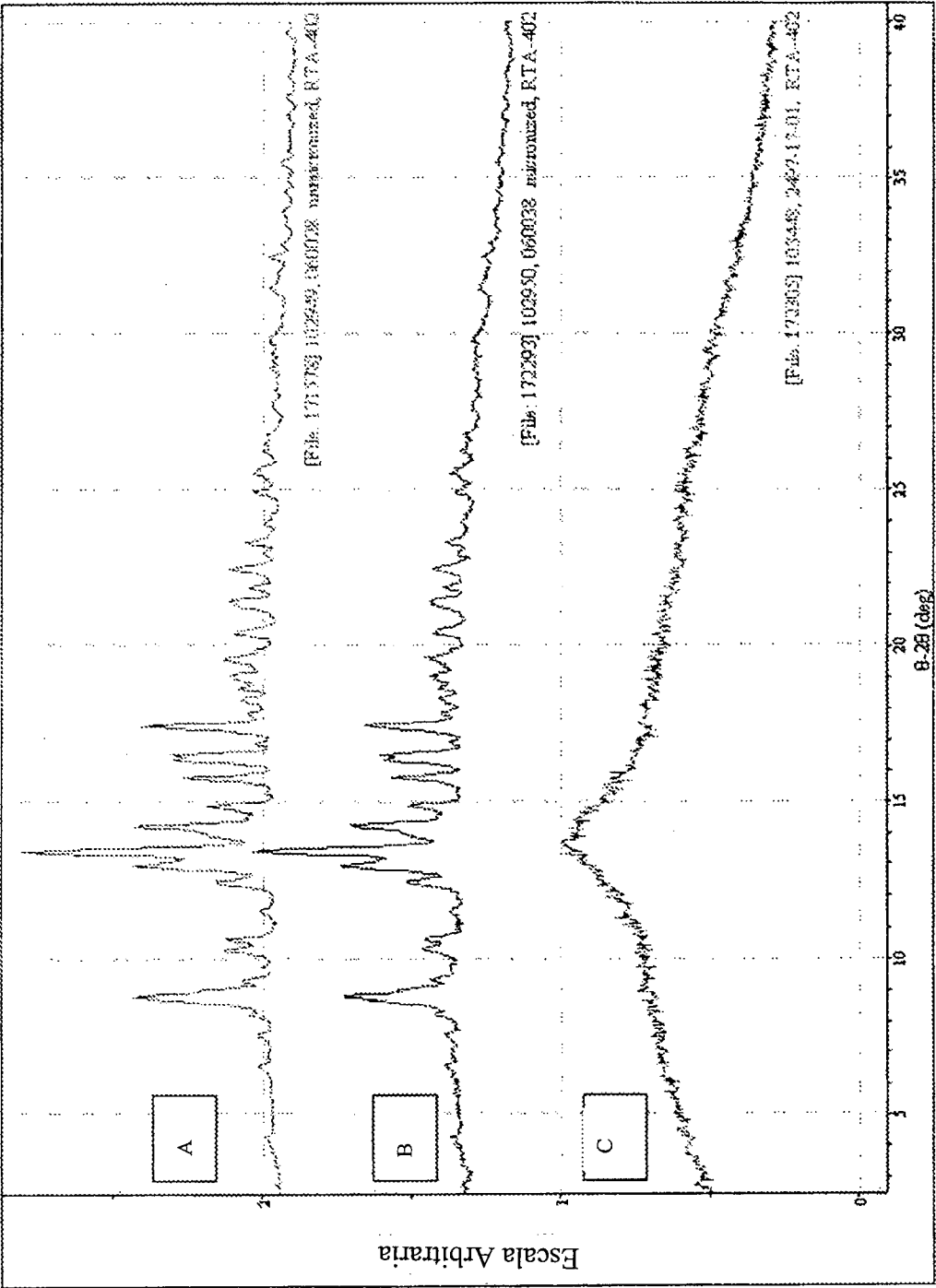


FIGURA 12A-C

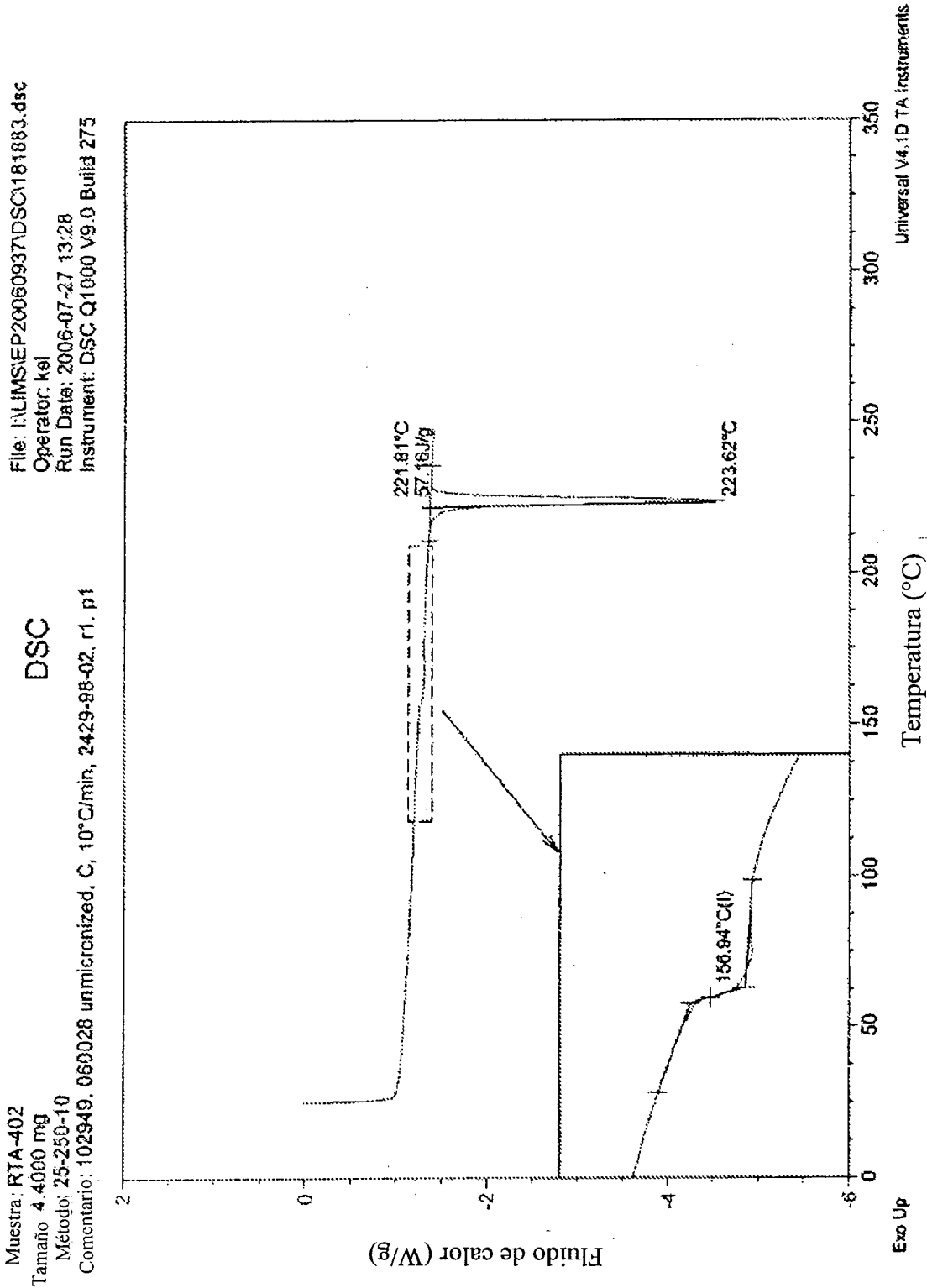


FIGURA 13

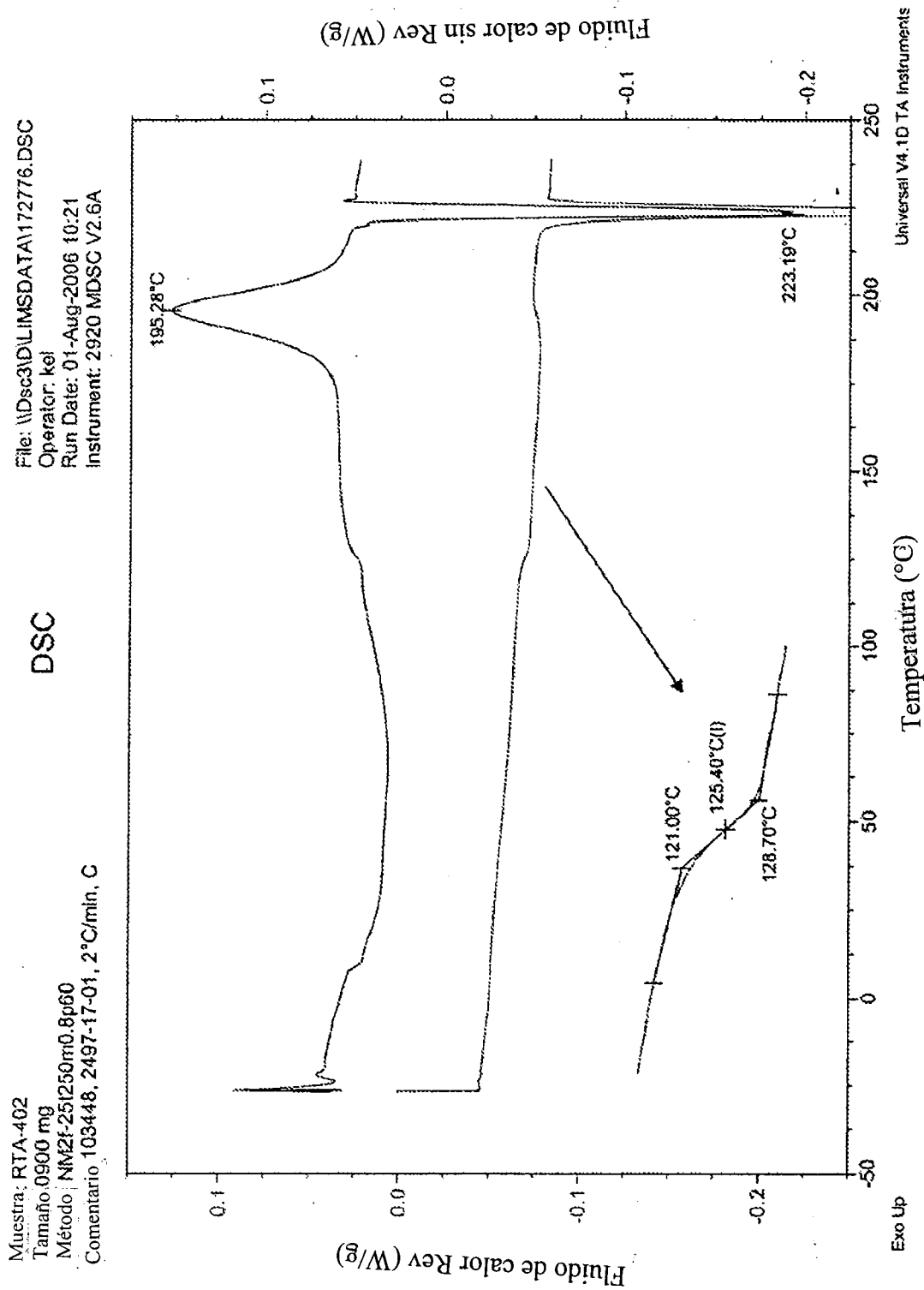


FIGURA 14

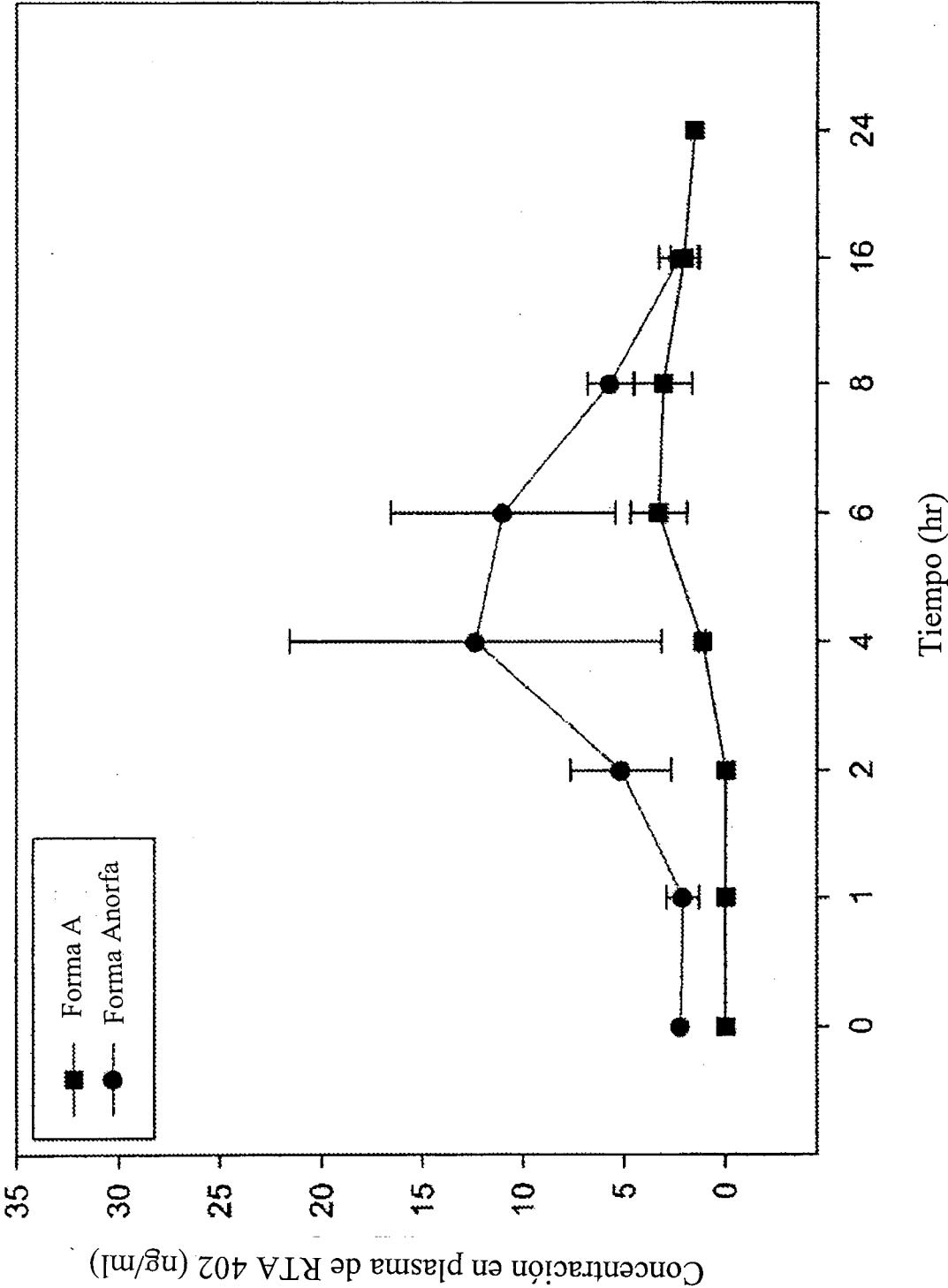


FIGURA 15

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

PCT/US09/30771

International Application No.

12 JANUARY 2009 (12.01.09)

International Filing Date

PCT INTERNATIONAL
APPLICATION RO/US

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) REAT:027WO

Box No. I TITLE OF INVENTION	
Synthetic Triterpenoids and Methods of Use in the Treatment of Disease	
Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) Reata Pharmaceuticals, Inc. 2801 Gateway Drive, Suite 150 Irving, TX 75062 US	
Telephone No.	
Facsimile No.	
Applicant's registration No. with the Office	
☐ E-mail authorization: Marking this check-box authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, if the Office or Authority so wishes, advance copies of notifications in respect of this international application. (See also the Notes to Boxes Nos. II and III.)	
E-mail address	
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) VOGES, Mark H. Fulbright & Jaworski L.L.P. 600 Congress Ave., Suite 2400 Austin, TX 78701 US	
Telephone No. 512-474-5201	
Facsimile No. 512-536-4598	
Agent's registration No. with the Office 58,112	
☒ E-mail authorization: Marking this check-box authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, if the Office or Authority so wishes, advance copies of notifications in respect of this international application. (See also the Notes to Boxes Nos. II and III.)	
E-mail address aopatents@fulbright.com	
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE
11 Rope Ferry Road
Hanover, NH 03766
US

This person is:

- ☒ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SPORN, Michael
9 Sporn Drive
Tunbridge, VT 05077
US

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LIBY, Karen
131 North Main Street
West Lebanon, NH 03784
US

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

GRIBBLE, Gordon W.
15 Eldridge Street
Lebanon, NH 03766
US

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

HONDA, Tadashi
16 MacDonald Drive
Hanover, NH 03755
US

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

JP

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KRAL, Robert M.
2405 Brittany Lane
Grapevine, TX 76051
US

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MEYER, Colin J.
3884 Truman Drive
Frisco, TX 75034
US

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☐ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a) the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
- ☐ JP Japan is not designated for any kind of national protection
- ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
- ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may only be used to exclude (irrevocably) the designations concerned if, at the time of filing or subsequently under Rule 26bis.1, the international application contains in Box No. VI a priority claim to an earlier national application filed in the particular State concerned, in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of this earlier national application.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 11 January 2008 (11.01.08)	61/020.624	US		
item (2) 28 October 2008 (28.10.08)	61/109.114	US		
item (3)				
item (4)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Transmit certified copy: the receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ item (4) ☐ other, see Supplemental Box

Restore the right of priority: the receiving Office is requested to restore the right of priority for the earlier application(s) identified above or in the Supplemental Box as item(s) (_____). *(See also the Notes to Box No. VI; further information must be provided to support a request to restore the right of priority.)*

Incorporation by reference: where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if more than one International Searching Authority is competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):*

ISA/ EP.....

Continuation of Box No. VII USE OF RESULTS OF EARLIER SEARCH, REFERENCE TO THAT SEARCH

☐ The ISA indicated in Box No. VII is requested to take into account the results of the earlier search(es) indicated below (*see also Notes to Box VII; use of results of more than two earlier searches*).

Filing date (day/month/year) Application Number Country (or regional Office)

☐ **Statement (Rule 4.12(ii)):** this international application is the same, or substantially the same, as the application in respect of which the earlier search was carried out except, where applicable, that it is filed in a different language.

☐ **Availability of documents:** the following documents are available to the ISA in a form and manner acceptable to it and therefore do not need to be submitted by the applicant to the ISA (Rule 12bis.1(f)):

- ☐ a copy of the results of the earlier search,*
- ☐ a copy of the earlier application,
- ☐ a translation of the earlier application into a language which is accepted by the ISA,
- ☐ a translation of the results of the earlier search into a language which is accepted by the ISA,
- ☐ a copy of any document cited in the results of the earlier search. (*If known, please indicate below the document(s) available to the ISA*):

☐ **Transmit copy of results of earlier search and other documents** (*where the earlier search was not carried out by the ISA indicated above but by the same Office as that which is acting as the receiving Office*): the **receiving Office** is requested to prepare and transmit to the ISA (Rule 12bis.1(c)):

- ☐ a copy of the results of the earlier search,*
- ☐ a copy of the earlier application,
- ☐ a copy of any document cited in the results of the earlier search.

* Where the results of the earlier search are neither available from a digital library nor transmitted by the receiving Office, the applicant is required to submit them to the receiving Office (Rule 12bis.1(a)) (*See item 11. in the check-list and also Notes to Box No. VII*).

Filing date (day/month/year) Application Number Country (or regional Office)

☐ **Statement (Rule 4.12(ii)):** this international application is the same, or substantially the same, as the application in respect of which the earlier search was carried out except, where applicable, that it is filed in a different language.

☐ **Availability of documents:** the following documents are available to the ISA in a form and manner acceptable to it and therefore do not need to be submitted by the applicant to the ISA (Rule 12bis.1(f)):

- ☐ a copy of the results of the earlier search,*
- ☐ a copy of the earlier application,
- ☐ a translation of the earlier application into a language which is accepted by the ISA,
- ☐ a translation of the results of the earlier search into a language which is accepted by the ISA,
- ☐ a copy of any document cited in the results of the earlier search. (*If known, please indicate below the document(s) available to the ISA*):

☐ **Transmit copy of results of earlier search and other documents** (*where the earlier search was not carried out by the ISA indicated above but by the same Office as that which is acting as the receiving Office*): the **receiving Office** is requested to prepare and transmit to the ISA (Rule 12bis.1(c)):

- ☐ a copy of the results of the earlier search,*
- ☐ a copy of the earlier application,
- ☐ a copy of any document cited in the results of the earlier search.

* Where the results of the earlier search are neither available from a digital library nor transmitted by the receiving Office, the applicant is required to submit them to the receiving Office (Rule 12bis.1(a)) (*See item 11. in the check-list and also Notes to Box No. VII*).

☐ Further earlier searches are indicated on a continuation sheet.

Box No. VIII DECLARATIONS

The following **declarations** are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (*mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration*):

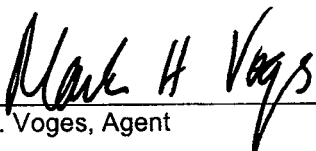
		Number of declarations
☐	Box No. VIII (i) Declaration as to the identity of the inventor	:
☐	Box No. VIII (ii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐	Box No. VIII (iii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐	Box No. VIII (iv) Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐	Box No. VIII (v) Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):	Number of items
(a) on paper , the following number of sheets:	1. ☐ fee calculation sheet	:
request (including declaration and supplemental sheets) :	2. ☐ original separate power of attorney	:
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) :	3. ☐ original general power of attorney	:
claims :	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:
abstract :	5. ☐ statement explaining lack of signature	:
drawings :	6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:
Sub-total number of sheets :	7. ☐ translation of international application into (language):	:
sequence listing :	8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:
tables related thereto :	9. ☐ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers)	:
(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :	:
Total number of sheets :	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter :	:
(b) ☐ only in electronic form (Section 801(a)(i))	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column :	:
(i) ☐ sequence listing	10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)	:
(ii) ☐ tables related thereto	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) :	:
(c) ☐ also in electronic form (Section 801(a)(ii))	(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) :	:
(i) ☐ sequence listing	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :	:
(ii) ☐ tables related thereto	11. ☐ copy of results of earlier search(es) (Rule 12bis.1(a)) :	:
Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the	12. ☐ other (specify):	:
☐ sequence listing: : TXT File		
☐ tables related thereto:		
(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)		
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application:	English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).


 Mark H. Voges, Agent

For receiving Office use only		2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
1. Date of actual receipt of the purported international application:	12 JANUARY 2009 (12.01.09)	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / EP	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 July 2009 (16.07.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/089545 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 31/275 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)

2405 Brittany Lane, Grapevine, TX 76051 (US). MEYER,
Colin, J. [US/US]; 3884 Truman Drive, Frisco, TX 75034
(US).

(21) International Application Number:

PCT/US2009/030771

(74) Agent: VOGES, Mark, H.; Fulbright & Jaworski L.L.P.,
600 Congress Ave., Suite 2400, Austin, TX 78701 (US).

(22) International Filing Date: 12 January 2009 (12.01.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/020,624 11 January 2008 (11.01.2008) US
61/109,114 28 October 2008 (28.10.2008) US

(71) Applicants (for all designated States except US): REATA
PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 2801 Gateway
Drive, Suite 150, Irving, TX 75062 (US). TRUSTEES
OF DARTMOUTH COLLEGE [US/US]; 11 Rope Ferry
Road, Hanover, NH 03766 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SPORN, Michael
[US/US]; 9 Sporn Drive, Tunbridge, VT 05077 (US).
LIBY, Karen [US/US]; 131 North Main Street, West
Lebanon, NH 03784 (US). GRIBBLE, Gordon, W.
[US/US]; 15 Eldridge Street, Lebanon, NH 03766
(US). HONDA, Tadashi [JP/US]; 16 Macdonald Drive,
Hanover, NH 03755 (US). KRAL, Robert, M. [US/US];

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Published:

— with international search report

(54) Title: SYNTHETIC TRITERPENOIDS AND METHODS OF USE IN THE TREATMENT OF DISEASE

(57) Abstract: The present invention concerns methods for treating and preventing renal/kidney disease, insulin resistance/diabetes, fatty liver disease, and/or endothelial dysfunction/cardiovascular disease using synthetic triterpenoids, optionally in combination with a second treatment or prophylaxis.



WO 2009/089545 A1

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference REAT: 027W0	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2009/030771	International filing date (day/month/year) 12/01/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 11/01/2008
Applicant REATA PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/030771

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/275 A61K31/4164 A61P3/00 A61P9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/005879 A (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; BISWAL SHYAM [US]; DORE SYLVAIN [US]; THIMMUL) 11 January 2007 (2007-01-11) abstract page 33, line 12 - line 16 claims 1-4	1, 24-26, 32-35, 37-141, 144-157
X	WO 2005/042002 A (ENTELOS INC [US]; HUREZ VINCENT JACQUES [US]; RAMANUJAN SAROJA [US]; S) 12 May 2005 (2005-05-12) abstract page 4, line 3 - line 6 page 5, line 1 - line 3 ----- -/--	1, 14-22, 25, 26, 28, 32-35, 37-141, 143-157

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 March 2009

Date of mailing of the international search report

09/04/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Garabatos-Perera, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/030771

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YATES S M ET AL: "Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes" MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, AMERICAN ASSOCIATION OF CANCER RESEARCH, US, vol. 6, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 154-162, XP002456640 ISSN: 1535-7163 abstract page 155, left-hand column, line 44 - line 50 page 157; table 1 page 160, right-hand column, line 44 - line 59 page 159; table 2	1-157
X	LIBY K ET AL: "The Synthetic Triterpenoids, CDDO and CDDO-Imidazolide, Are Potent Inducers of Heme Oxygenase-1 and Nrf2/ARE Signaling" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD.; US, vol. 65, no. 11, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 4789-4798, XP003020927 ISSN: 0008-5472 abstract page 4797, right-hand column, line 7 - line 14	1-157
X	SHIN SOONA ET AL: "NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: Influence on adipogenesis" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 27, no. 20, October 2007 (2007-10), pages 7188-7197, XP002517697 ISSN: 0270-7306 abstract page 7189, left-hand column, line 6 - line 10 page 7189, left-hand column, line 22 - line 23 page 7195, right-hand column, line 10 - line 27	1,14-22, 25,26, 28-35, 37-141, 144-157
Y	WO 2006/029221 A (PACIFIC ARROW LTD [CN]; CHAN PUI-KWONG [US]; MAK MAY SUNG [CN]; WANG Y) 16 March 2006 (2006-03-16) abstract claim 56	1-157
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/030771

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/03996 A (RAJ KUMAR SUJATHA [IN]; ARGAET VICTOR PETER [AU]; RAJ KUMAR CHINNI KRI) 17 January 2002 (2002-01-17) abstract page 27, line 24 - page 28, line 25 -----	1-157
P,X	WO 2008/136838 A (DARTMOUTH COLLEGE [US]; SPORN MICHAEL [US]; LIBY KAREN; GRIBBLE GORDON) 13 November 2008 (2008-11-13) the whole document -----	1-157
P,X	WO 2008/111497 A (SANTEN PHARMA CO LTD [JP]; HIRAI SHINICHIRO [JP]; YOSHIDA ATSUSHI [JP]) 18 September 2008 (2008-09-18) the whole document -----	1,14-22, 28, 32-35, 37-141, 143-157
E	WO 2009/023232 A (REATA PHARMACEUTICALS INC [US]; WALLING JOHN [US]; PARENT STEPHAN D [U]) 19 February 2009 (2009-02-19) the whole document -----	1-157

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/030771

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 23, 24, 32 - 35, 37 - 141, 145 - 157 (partially); 2 - 13, 36, 142 (complete)

Use of triterpenoid derivatives in the treatment of renal/kidney diseases (RKD).

2. claims: 1, 28, 32 - 35, 37 - 141, 144 - 157 (partially); 14 - 22, 143 (complete)

Use of triterpenoid derivatives in the treatment of insuline resistance and diabetes.

3. claims: 1, 23, 28, 32 - 35, 37 - 141, 144 - 157 (partially); 27 (complete)

Use of triterpenoid derivatives in the treatment of endothelial dysfunctions.

4. claims: 1, 32 - 35, 37 - 141, 144 - 157 (partially); 29 - 31 (complete)

Use of triterpenoid derivatives in the treatment of fatty liver diseases.

5. claims: 1, 24, 32 - 35, 37 - 141, 144 - 157 (partially); 25, 26 (complete)

Use of triterpenoid derivatives in the treatment of cardiovascular diseases.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/030771

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 2007005879	A	11-01-2007	AU	2006265113 A1	11-01-2007
			CA	2614110 A1	11-01-2007
			EP	1959969 A2	27-08-2008
WO 2005042002	A	12-05-2005	NONE		
WO 2006029221	A	16-03-2006	AU	2005282437 A1	16-03-2006
			CA	2579231 A1	16-03-2006
WO 0203996	A	17-01-2002	NONE		
WO 2008136838	A	13-11-2008	US	2009060873 A1	05-03-2009
WO 2008111497	A	18-09-2008	JP	2008247898 A	16-10-2008
WO 2009023232	A	19-02-2009	US	2009048204 A1	19-02-2009

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below	
International application No. PCT/US2009/030771	International filing date (day/month/year) 12.01.2009	Priority date (day/month/year) 11.01.2008	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. A61K31/275 A61K31/4164 A61P3/00 A61P9/00			
Applicant REATA PHARMACEUTICALS, INC.			

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Garabatos-Perera, J Telephone No. +49 89 2399-5872
---	--	---



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2009/030771

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2009/030771

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>3 - 16, 23, 24, 27 - 35, 49 - 108, 119 - 123, 132 - 137, 142, 149 - 152</u>
	No: Claims	<u>1, 2, 17 - 22, 25, 26, 36 - 48, 109 - 118, 124 - 131, 139 - 141, 143 - 148, 153 - 157</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	-
	No: Claims	<u>1 - 157</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1 - 157</u>
	No: Claims	-

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2009/030771

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)
and /or
2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)
see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item II

Priority

The validity of the priority has not been considered because the ISA does not have in its possession a copy of the priority application. This opinion, has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rule 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.

Re Item IV

Lack of unity of invention

The present application lacks of unity of invention according to Rule 13.1 PCT, since different separate inventions or group of inventions are claimed which are not linked by a single general inventive concept. Hence, the separate inventions or group of inventions are,

1. Use of triterpenoid derivatives in the treatment of renal/kidney diseases (RKD).
claims: 1, 23, 24, 32 - 35, 37 - 141, 145 - 157 (partially)
2 - 13, 36, 142 (complete)
2. Use of triterpenoid derivatives in the treatment of insulin resistance and diabetes.
claims: 1, 28, 32 - 35, 37 - 141, 144 - 157 (partially)
14 - 22, 143 (complete)
3. Use of triterpenoid derivatives in the treatment of endothelial dysfunctions.
claims: 1, 23, 28, 32 - 35, 37 - 141, 144 - 157 (partially)
27 (complete)
4. Use of triterpenoid derivatives in the treatment of fatty liver diseases.
claims: 1, 32 - 35, 37 - 141, 144 - 157 (partially)
29 - 31 (complete)
5. Use of triterpenoid derivatives in the treatment of cardiovascular diseases.
claims: 1, 24, 32 - 35, 37 - 141, 144 - 157 (partially)
25, 26 (complete)

- 1.1 The present application relates to the use triterpenoid derivatives in the prevention / treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD).
- 1.2 In the same technical field as the present application documents WO2007005879 (D1), WO2005042002 (D2), XP002456640 (D3), XP003020927 (D4) and XP002517697 (D5) are regarded to represent relevant prior art to the claimed subject-matter. These documents disclose the use of triterpenoids derivatives in the treatment of cardiovascular disorders (e.g. heart ischemia), insulin resistance / diabetes (e.g. metabolic syndrome/adipogenesis), and renal disorders (e.g. glomerulonephritis) (see **D1**: abstract; page 33, lines 12 - 16; claims 1 - 4; **D2**: abstract; page 4, lines 3 - 6; page 5, lines 1 - 3; **D3**: abstract; page 155, left-hand column, lines 44 - 50; page 157, table 1; page 160, right-hand column, lines 44 - 59; page 159, table 2; **D4**: abstract; page 4797, right-hand column, lines 7 - 14; **D5**: abstract; page 7189, left-hand column, lines 6 - 10; page 7189, left-hand column, lines 22 - 23; page 7195, right-hand column, lines 10 - 27).
- 1.3 The problem to be solved by the present application may therefore be seen as the provision of further uses of triterpenoid derivatives of general formula (1).
- 1.4 The proposed solution to the present problem is the use of triterpenoid derivatives of general formula (1) in the prevention / treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD). Accordingly, the **use of said triterpenoid derivatives in therapy** (namely in the prevention / treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD)) represents the technical feature which may, a priori, unify the subject-matter of the present application.

This common concept is neither novel nor inventive (see D1 - D5 which already disclose the use of said triterpenoid derivatives in therapy) so that the required technical relationship between the subject-matter of the present application is lacking and the requirement for unity is not fulfilled.

- 1.5 The possible contribution over the prior art concerning invention 1 resides in the use of some triterpenoid derivatives of general formula (1) in the treatment of renal/kidney

diseases (RKD).

The possible contribution over the prior art concerning invention 2 resides in the use of some triterpenoid derivatives of general formula (1) in the treatment of insulin resistance and diabetes.

The possible contribution over the prior art concerning invention 3 resides in the use of some triterpenoid derivatives of general formula (1) in the treatment of endothelial dysfunctions.

The possible contribution over the prior art concerning invention 4 resides in the use of some triterpenoid derivatives of general formula (1) in the treatment of fatty liver diseases.

The possible contribution over the prior art concerning invention 5 resides in the use of some triterpenoid derivatives of general formula (1) in the treatment of cardiovascular diseases.

Accordingly having regard to their possible contribution over the prior art, these five inventions have nothing more in common with each other than what they have in common with the prior art, and therefore, the technical relationship between their subject-matter is lacking.

The search report and the written opinion have nevertheless been drawn up over the whole claimed subject-matter.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The present application relates to the use triterpenoid derivatives in the prevention / treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD).

1. Reference is made to the following documents; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2009/030771

- D1: WO 2007/005879 A (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; BISWAL SHYAM [US]; DORE SYLVAIN [US]; THIMMUL) 11 January 2007 (2007-01-11)
- D2: WO 2005/042002 A (ENTELOS INC [US]; HUREZ VINCENT JACQUES [US]; RAMANUJAN SAROJA [US]; S) 12 May 2005 (2005-05-12)
- D3: YATES S M ET AL: "Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes" MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, AMERICAN ASSOCIATION OF CANCER RESEARCH, US, vol. 6, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 154-162, XP002456640 ISSN: 1535-7163
- D4: LIBY K ET AL: "The Synthetic Triterpenoids, CDDO and CDDO-Imidazolidine, Are Potent Inducers of Heme Oxygenase-1 and Nrf2/ARE Signaling" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD.; US, vol. 65, no. 11, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 4789-4798, XP003020927 ISSN: 0008-5472
- D5: SHIN SOONA ET AL: "NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: Influence on adipogenesis" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 27, no. 20, October 2007 (2007-10), pages 7188-7197, XP002517697 ISSN: 0270-7306
- D6: WO 2006/029221 A (PACIFIC ARROW LTD [CN]; CHAN PUI-KWONG [US]; MAK MAY SUNG [CN]; WANG Y) 16 March 2006 (2006-03-16)
- D7: WO 02/03996 A (RAJ KUMAR SUJATHA [IN]; ARGAET VICTOR PETER [AU]; RAJ KUMAR CHINNI KRI) 17 January 2002 (2002-01-17)

Documents D3 - D4 have been cited by the applicant in the description.

2. Subject-matter under Rule 39 PCT.

Claims 1 - 139 relate to a subject-matter which is considered by this Authority to be covered by the provision of Rule 39.1(iv)/67(iv) PCT. The patentability of such matter in the regional/national phase may be dependent upon the formulation of the claims.

3. Novelty

The present application does not meet the requirements of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1, 2, 17 - 22, 25, 26, 36 - 48, 109 - 118, 124 - 131, 139 - 141, 143 - 148, 153 - 157 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

- 3.1 Documents D1 - D5 relate to the use of triterpenoids derivatives in the treatment of cardiovascular disorders (e.g. heart ischemia), insulin resistance / diabetes (e.g. metabolic syndrome/adipogenesis), and renal disorders (e.g. glomerulonephritis) (see **D1**: abstract; page 33, lines 12 - 16; claims 1 - 4; **D2**: abstract; page 4, lines 3 - 6; page 5, lines 1 - 3; **D3**: abstract; page 155, left-hand column, lines 44 - 50; page 157, table 1; page 160, right-hand column, lines 44 - 59; page 159, table 2; **D4**: abstract; page 4797, right-hand column, lines 7 - 14; **D5**: abstract; page 7189, left-hand column, lines 6 - 10; page 7189, left-hand column, lines 22 - 23; page 7195, right-hand column, lines 10 - 27). The triterpenoid derivatives described in D1 - D5 fall under the scope of the compounds definitions of present claims 1, 2, 17 - 22, 25, 26, 36 - 48, 109 - 118, 124 - 131, 139 - 141, 143 - 148, 153 - 157; as a consequence the subject-matter of said claims is not new.
- 3.2 Documents D6 - D7 describe the use of triterpenoid derivatives in the treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD) (see **D6**: abstract; claim 56; **D7**: abstract; page 27, line 24 - page 28, line 25). The triterpenoid derivatives described in the present application are not specifically disclosed in D6 - D7; as a consequence the subject-matter of the present application is new over these documents.

4. Inventive Step

In as far as the claimed subject-matter is new over the prior art, the following observations to the requirement of inventive step apply.

- 4.1 In the same technical field as the present application documents D6 - D7 are regarded to represent the closest prior art to the claimed subject-matter. These documents refer to the use of triterpenoids in the treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD).

The difference in technical features between D6 - D7 and present application is that the latter claims the use of triterpenoid derivatives not specifically disclosed in said documents.

- 4.2 The problem to be solved by the present application is therefore to provide alternative agents for the prevention / treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD).
- 4.3 Documents D1 - D5 already indicate in a general manner that triterpenoid derivatives as the ones described in the present application are suitable for the treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD). Accordingly, the use of such triterpenoid derivatives to solve the present problem would seem obvious to the person skilled in the art; as a consequence the subject-matter of the present application is not inventive.
- 4.4 Alternatively, in the same technical field as the present application document D3 (or D4) may be regarded to represent the closest prior art to the claimed subject-matter. This document refers to the chemoprotective activity of triterpenoid derivatives falling under the scope of the presently claimed general formula (1) in the liver, kidney and heart.
- The difference in technical features between D3 - D4 and present application is that the latter specifically claims the use of triterpenoids derivatives of general formula (1) in the treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD).
- 4.5 The problem to be solved may therefore be seen as the provision of further therapeutical uses of triterpenoids of general formula (1).
- 4.6 Documents D1 - D5 already indicate in a general manner that triterpenoid derivatives as the ones described in the present application are suitable for the chemoprotection of the liver, kidney, heart and therefore for the treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD). Accordingly, the use of such triterpenoid derivatives to solve the present problem would seem obvious to the person skilled in the art; as a consequence the subject-matter of the present application is not inventive.
- 4.7 The applicant's attention is drawn to the fact that in order to fulfill the requirements

of Article 33(3) PCT, according to the problem solution approach, all alternatives of a claim should solve the technical problem underlying the claimed invention.

In the present case, claims 1 - 157 relate to an extremely large number of possible triterpenoid derivatives, wherein said compounds stimulate Nrf2-regulated endogenous antioxidant mechanism and are therefore used in the prevention / treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD). However, compounds falling under the scope of the presently Markush formula (1) do not shown the required biological activity (see **D3**: page 160, right-hand column, lines 3 - 5). Accordingly, it is considered that not all the claimed compounds are suitable for solving the present problem; as a consequence the subject-matter of the present application is not inventive.

5. Industrial Applicability

The present claims 1 - 153 relate to the use triterpenoid derivatives in the prevention / treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD). The subject-matter of these claims is therefore considered to be industrially applicable.

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO2008136838	13.11.2008	22.06.2007	04.05.2007
WO2008111497	18.09.2008	07.03.2008	08.03.2007
WO2009023232	19.02.2009	14.08.2008	15.08.2007

Re Item VIII

Certain observations on the international application

The present application does not meet the requirements of Article 6 PCT, because the present claims are not clear.

- 1.1 The term "about" used in a range (see claims 49 - 51, 55 - 59, 122, 123) is vague, unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear.
- 1.2 The present claims encompass a large number of compounds which are defined only by reference to a desired functional activity, viz. *pharmaceutically acceptable salt, hydrate or solvate*. Such definitions do not allow to unambiguously define the scope of the claimed subject-matter as it is not evident which compounds may be comprised. In particular, such definitions without any guidance as to what compounds are intended would leave the skilled person with the undue burden of determining whether any salt, hydrate or solvate of presently described compounds might fall within the claimed subject-matter.
- 1.3 The terms "pharmaceutically effective amount", "agent that delays absorption", "agent that enhances solubility or dispersability" used in the present claims are an attempt to define the subject-matter in terms of a result to be achieved. Such formulations are not allowable because it appears possible to define the subject-matter in more concrete terms, viz. in terms of how the effects are to be achieved.
- 1.4 Medical use claims 36 - 138 are not acceptable under Article 6 PCT. The therapeutic application is functionally defined by a mechanism of action (i.e. improving glomerular filtration rate or creatine clearance), which does not allow any practical application in the form of a defined, real treatment of a pathological condition (disease), see Guidelines C-IV, 4.8, G 1/83 and T 0241/95, OJ 2/2001, 103. Namely, the aforementioned functional definitions do not allow to unambiguously define the scope of the claimed subject-matter as it is not evident which disorders may be comprised. In particular, such definitions without any guidance as to what disorders are intended would leave the skilled person with the undue burden of determining whether any condition might fall within the claimed subject-matter.
- 1.5 Claims 1 - 153 are not supported by the description as required by Article 6 PCT, as their scope is boarder than justified by the description.

Present claims 1 - 153 are directed to an extremely large number of possible triterpenoid derivatives, wherein said compounds stimulate Nrf2-regulated

endogenous antioxidant mechanism and are therefore used in the prevention / treatment of renal / kidney disease (RKD), insulin resistance, diabetes, endothelial dysfunction, fatty liver disease, and cardiovascular disease (CVD). Support and disclosure in the sense of Article 5 and 6 PCT is to be found however, for only a very small proportion of the claimed compounds, namely RT-402 (see present examples 1 - 6), whereas no basis is evident for the generalizations in the present invention.

In fact, contrary to the present application document D3 discloses that compounds falling under the scope of the present claims do not shown the required biological activity (see **D3**: page 160, right-hand column, lines 3 - 5).

- 1.6 The statement "within the spirit, scope and concept of" on page 54 implies that the subject-matter for which protection is sought may be different to that defined by the claims, thereby resulting in lack of clarity.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information

For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.

Amending claims under Art. 19 PCT

Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.

Filing a demand for international preliminary examination

In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT).

If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).

Filing informal comments

After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.

End of the international phase

At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).

Relevant PCT Rules and more information

Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes

Melinda S. Yates,¹ Masafumi Tauchi,²
Fumiki Katsuoka,³ Kathleen C. Flanders,⁴
Karen T. Liby,⁵ Tadashi Honda,⁶
Gordon W. Gribble,⁶ Delinda A. Johnson,⁷
Jeffrey A. Johnson,⁷ Neal C. Burton,¹
Tomás R. Guilarte,¹ Masayuki Yamamoto,^{2,3}
Michael B. Sporn,⁵ and Thomas W. Kensler¹

¹Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland; ²ERATO Environmental Response Project and ³Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan; ⁴National Cancer Institute, Bethesda, Maryland; ⁵Dartmouth Medical School; ⁶Dartmouth College, Hanover, New Hampshire; and ⁷University of Wisconsin, Madison, Wisconsin

Abstract

Synthetic triterpenoids have been developed, which are potent inducers of cytoprotective enzymes and inhibitors of inflammation, greatly improving on the weak activity of naturally occurring triterpenoids. An imidazole triterpenoid derivative, 1-[2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole (CDDO-Im or TP235), has been previously shown to potently protect against hepatic tumorigenesis, acting in part by inducing cytoprotective genes through Keap1-Nrf2-antioxidant response element (ARE) signaling. In these studies, the pharmacodynamic activity of CDDO-Im is characterized in two distinct lines of ARE reporter mice and by measuring increases in *Nqo1* transcript levels as a marker of cytoprotective gene induction. Oral administration of CDDO-Im induces ARE-regulated cytoprotective genes in many tissues in the mouse, including liver, lung, kidney, intestines, brain, heart, thymus, and salivary gland. CDDO-Im induces *Nqo1* RNA transcripts in some organs at doses as low as 0.3 $\mu\text{mol/kg}$ body weight (orally). A structure activity evaluation of 15 additional triterpenoids (a) confirmed the

importance of Michael acceptor groups on both the A and C rings, (b) showed the requirement for a nitrile group at C-2 of the A ring, and (c) indicated that substituents at C-17 dramatically affected pharmacodynamic action *in vivo*. In addition to CDDO-Im, other triterpenoids, particularly the methyl ester CDDO-Me (TP155) and the dinitrile TP225, are extremely potent inducers of cytoprotective genes in mouse liver, lung, small intestine mucosa, and cerebral cortex. This pharmacodynamic characterization highlights the chemopreventive promise of several synthetic triterpenoids in multiple target organs. [Mol Cancer Ther 2007;6(1):154–62]

Introduction

Synthetic triterpenoids have been developed, which greatly improve on the weak anti-inflammatory and antitumorogenic activities of naturally occurring triterpenoids. Although originally developed as anti-inflammatory agents, these synthetic triterpenoids have additional activities that make them promising candidates for cancer chemoprevention and cancer therapy. For example, one of the earlier agents in this class of analogues, 2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oic acid (CDDO or TP151; see Table 2 for all structures), has been shown to inhibit growth and induce cell cycle arrest in breast cancer cell lines (1). In addition, CDDO induces apoptosis in breast cancer and leukemia cell lines (1–3) and induces differentiation of human myeloid leukemia cells (4). It is a potent anti-inflammatory agent that blocks the ability of many inflammatory cytokines to induce *de novo* formation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 (4, 5). The C28 methyl ester derivative, CDDO-Me (TP155), induces apoptosis in human lung cancer cells (6). Mechanistic studies have shown that CDDO-Me inhibits nuclear factor- κ B by suppressing I κ B α kinase activation in tumor cell lines and primary blast cells from leukemia patients and inhibits antiapoptotic, proliferative, and angiogenic gene expression (7). The imidazole derivative 1-[2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole (CDDO-Im or TP235) is one of the most potent triterpenoids. CDDO-Im inhibits proliferation of human cancer cell lines, induces differentiation in leukemia cell lines, and decreases tumor burden in murine models of melanoma and leukemia (8). In addition, it induces apoptosis in pancreatic cancer cells (9). CDDO-Im is more potent than CDDO and CDDO-Me at inhibiting the proinflammatory production of nitric oxide induced by IFN- γ in mouse macrophages (10). Furthermore, CDDO-Im and other triterpenoids act in part through Nrf2 signaling to induce cytoprotective conjugating and antioxidative genes (11, 12).

The transcription factor Nrf2 binds and activates the antioxidant response element (ARE; ref. 13), a *cis*-acting

Received 8/24/06; revised 10/20/06; accepted 11/27/06.

Grant support: NIH grants CA94076 (T.W. Kensler) and CA78814 (M.B. Sporn), National Foundation for Cancer Research (M.B. Sporn), Reata Pharmaceuticals (M.B. Sporn), and ERATO-JST (M. Yamamoto). M.S. Yates was supported by T32 GM08763.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Thomas W. Kensler, Department of Environmental Health Sciences, Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health, Room E7541, 615 North Wolfe Street, Baltimore, MD 21205. Phone: 410-955-4712; Fax: 410-955-0116. E-mail: tkensler@jhsp.edu

Copyright © 2007 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0516

sequence found in the 5' flanking region of genes encoding many cytoprotective enzymes, including NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1; refs. 14–16). Induction of these protective enzymes blocks carcinogenesis, mutagenesis, and other forms of toxicity mediated by carcinogens. These enzymes are involved in metabolism of xenobiotics and facilitate their elimination. The pronounced activity of triterpenoids as cytoprotective enzyme inducers and anti-inflammatory agents prompted studies of CDDO-Im as a potential chemopreventive agent. It was shown to be an extremely potent chemopreventive agent against aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis in rats, with pronounced protection at doses as low as 1 $\mu\text{mol/kg}$ body weight and complete inhibition of tumorigenesis at 100 $\mu\text{mol/kg}$ body weight (17). Treatment with CDDO-Im induced hepatic detoxification and cytoprotective genes, especially those regulated through Nrf2 signaling (17). Induction of detoxification and cytoprotective genes, such as *Nqo1*, *glutamate cysteine ligase, catalytic subunit (Gclc)*, *glutathione S-transferases*, and *Hmox1*, combined with potent anti-inflammatory activity, suggests that triterpenoids may be effective chemopreventive agents in a variety of other settings as well.

Although these triterpenoids have been evaluated in many cancer cell lines and murine models of cancer therapy, their evaluation as chemopreventive agents is just beginning. More than 300 triterpenoid analogues have been synthesized, many with potent activities *in vitro*, suggesting that CDDO-Im may not be the only agent with chemopreventive potential. In this study, the pharmacodynamic activities of CDDO-Im along with 15 other triterpenoid analogues are examined as inducers of cytoprotective genes in murine tissues. To investigate the potency and localization of response in the mouse following treatment with triterpenoids, two complementary strategies were used. First, increases in *Nqo1* RNA transcripts measured by real-time quantitative PCR are used as a marker for induction of a prototypic Nrf2-regulated gene. Second, transgenic mice in which the ARE of *Nqo1* has been linked to either *luciferase* or *human placental alkaline phosphatase (hPlap)* genes are used for *in vivo* bioluminescence and immunohistochemical evaluation of response, respectively. These triterpenoids were selected based on data from previous *in vitro* and *in vivo* studies to identify additional triterpenoids with sufficient potency and distribution for potential use as chemopreventive agents. These studies suggest additional target tissues where triterpenoids may exert profound chemopreventive activity. Furthermore, these studies indicate that several triterpenoids activate the cytoprotective response at exceedingly low oral doses. Collectively, these studies provide insight into how triterpenoids can be used most effectively for future chemoprevention studies.

Materials and Methods

Chemicals

Triterpenoids were synthesized as previously described (10, 18, 19). The various amide and imidazolidine derivatives

were synthesized by the condensation of CDDO acid chloride with the respective amines or imidazoles using previously published methods (10).

Animals

Male ICR mice (25–34 g) were purchased from Harlan (Indianapolis, IN) for use in gene expression analysis. Animals were fed AIN-76A purified diet without ethoxyquin. Gavage doses were given in a volume of 200 μL . Triterpenoid doses used in these studies did not result in any apparent toxicity. All experiments were approved by The Johns Hopkins University Animal Care and Use Committee.

Nqo1-ARE-*Luc* Transgenic Mice

An oligonucleotide containing the mouse *Nqo1* ARE site (5'-TAGAGTCACAGTGAGTCGGCAAAATTTG-3'; ref. 14) was triplicated and inserted in the *MluI*-*NheI* sites of the multiple cloning sites of the pGL3-Basic vector. TATA promoter derived from rabbit β globin was inserted in the *BglII*-*HindIII* sites of this vector. Two copies of the chick β globin insulator (generous gift from Dr. Gary Felsenfeld, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH, Bethesda, MD) were inserted downstream of the *luciferase* gene at the *Bam*HI site. The plasmid was cut at *KpnI* and *SalI* sites and purified for microinjection (Fig. 1A). Genomic DNA was purified from tail, and integration of the transgene was verified by PCR using primers 5'-GGGCATTTCGACGCTACCGTGGTGTT-3' and 5'-GGGAGCGCCACCAGAAGCAATTCGTGTA-3'.

Nqo1-ARE-*hPlap* Transgenic Reporter Mice

Transgenic reporter mice were generated that carried the core ARE from rat *Nqo1* promoter coupled to *hPlap* as previously described (20).

Nqo1-ARE-*Luc* Reporter Mouse Assay

In vivo bioluminescent imaging was done using an IVIS imaging system (Xenogen, Alameda, CA). At selected time points following treatment with 100 μmol triterpenoid/kg body weight or vehicle (10% DMSO, 10% Cremophor-EL, and PBS), 10-week-old mice were anesthetized with isoflurane and injected i.p. with 150 mg/kg body weight of D-luciferin. Ten minutes after D-luciferin injection, the animals were placed on the imaging stage, and ventral, lateral, and dorsal images were collected for 3 to 10 s. Photons emitted from specific regions were quantified using Living Image software (Xenogen). The photographic image was overlaid with bioluminescence signal. A pseudocolor scale indicates the intensity of the bioluminescence, with red as the most intense and blue as the least intense light emission.

Nqo1-ARE-*hPlap* Reporter Mouse Assay

Nqo1-ARE-*hPlap* reporter mice were gavaged daily with 30 μmol CDDO-Im/kg body weight for 3 consecutive days in a vehicle of 10% DMSO, 10% Cremophor-EL, and PBS. Mice were sacrificed 6 h after the final dose and tissues were collected. Tissue was fixed in 10% neutral buffered formalin (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) and embedded in paraffin. Staining to visualize hPLAP activity was done using a BioGenex i6000 automated staining system (BioGenex, San Ramon, CA). Following deparaffinization with EZ-DeWax (BioGenex) and blocking of endogenous peroxidase and nonspecific protein binding,

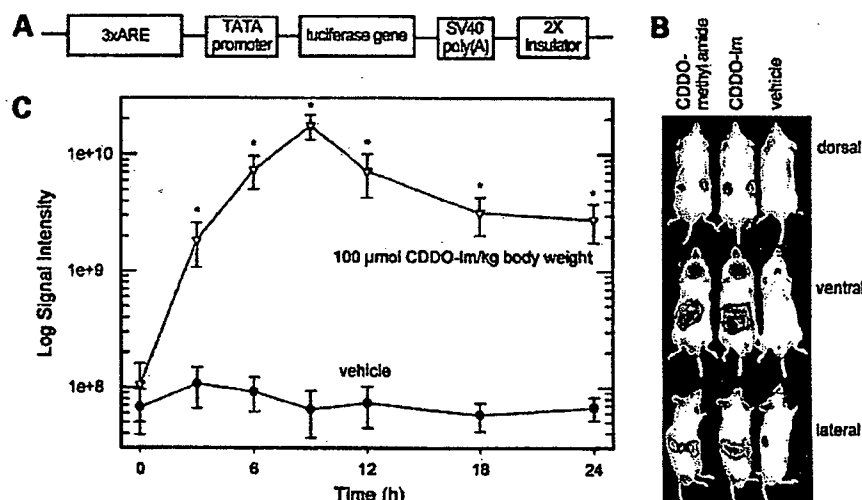


Figure 1. Induction of *Nqo1*-ARE-*Luc* reporter gene expression in mice following treatment with triterpenoids. **A**, structure of the *Nqo1*-ARE-*Luc* reporter gene. **B**, location of signal resulting from luciferase reporter gene expression at 9 h after treatment with triterpenoids (100 μmol/kg body weight) by gavage. **C**, signal intensity resulting from luciferase reporter gene expression in the abdomen was determined between 0 and 24 h after treatment by gavage. Points, mean ($n = 6$); bars, SE. *, $P < 0.05$.

sections were incubated for 2 h with rabbit anti-human PLAP (Lab Vision, Fremont, CA) at a 1:300 dilution. Antigen-antibody complexes were detected by means of the Vectastain Elite avidin-biotin complex method peroxidase kit from Vector Laboratories (Burlingame, CA) according to the manufacturer's instructions and visualized with 3,3'-diaminobenzidine (BioGenex). Sections were counterstained with Carazzi hematoxylin.

Tissue Distribution Analysis

Mice were gavaged with 100 μmol CDDO-Im/kg body weight or vehicle (10% DMSO, 10% Cremophor-EL, and PBS). Mice were sacrificed 6 h after treatment, and tissue samples were harvested. Tissues were immediately placed in RNeasy lysis buffer (Qiagen, Crawfordsville, IN). Total RNA was isolated from tissues stored in RNeasy lysis buffer using RNeasy spin purification kit (Qiagen, Crawfordsville, IN), and cDNA was synthesized using iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Gene expression measurements for each sample ($n = 4$ for CDDO-Im-treated group and $n = 4$ for vehicle group) were done in triplicate using Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) and iQ Supermix (Bio-Rad). Gene expression measurements were normalized to the endogenous reference gene *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, which was not changed by triterpenoid treatment. Fold change values for gene expression data from real-time quantitative PCR was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relative quantification method as published (21).

Nqo1 Gene Expression Dose Response

Mice were gavaged with 0.3, 1, 3, 10, 30, or 100 μmol CDDO-Im/kg body weight or vehicle (10% DMSO, 10% Cremophor-EL, and PBS). Mice ($n = 4$ for vehicle group and $n = 3$ for other groups) were sacrificed 6 h after treatment, and liver, lung, small intestine mucosa, and cerebral cortex were removed. Tissues were immediately placed in RNeasy lysis buffer for future RNA purification and gene expression measurements as described above.

Triterpenoid Structure-Activity Relationship Analysis

Mice were gavaged with either a single dose of 2 μmol triterpenoid/kg body weight, a daily dose of 2 μmol triterpenoid/kg body weight for 3 consecutive days, or vehicle (DMSO). Mice ($n = 4$ for vehicle group and $n = 3$ for other groups) were sacrificed 6 h after the final treatment, and liver, lung, small intestine mucosa, and cerebral cortex were removed. Tissues were immediately placed in RNeasy lysis buffer for future RNA purification and gene expression measurements as described above.

Measurement of NQO1 Enzyme Activity

Mice ($n = 4$ for vehicle group and $n = 3$ for all other groups) were gavaged with 2 or 10 μmol triterpenoid/kg body weight or vehicle (DMSO) and sacrificed 24 h after treatment. Livers were immediately frozen in liquid nitrogen using a freeze clamp and stored at -80°C . NQO1 enzyme activity was measured in hepatic cytosolic fractions ($105,000 \times g$) using menadione as a substrate as previously described (22).

Statistical Analysis

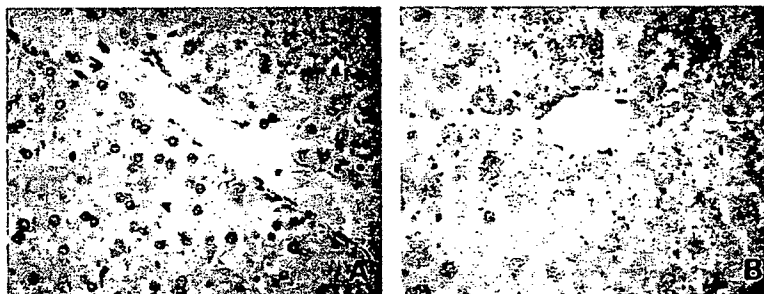
Gene expression changes were compared among groups by ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. Pairwise comparisons of gene expression or NQO1 enzyme activity changes to the corresponding vehicle control were done using t test.

Results

Treatment with Triterpenoids Enhances Expression of ARE Reporter and ARE Target Genes in Multiple Tissues

Nqo1-ARE-*Luc* reporter gene expression is induced following a single oral administration of CDDO-methyl amide (TP224) or CDDO-Im to mice at a dose of 100 μmol/kg. Although the reporter signal is more intense following CDDO-Im treatment compared with CDDO-methyl amide, the distribution profile of induction is similar. Treatment

Figure 2. Induction of *Nqo1*-ARE-*hPlap* reporter gene expression in mouse liver following treatment with CDDO-Im (TP235). **A**, histochemical detection of hPLAP expression in liver of vehicle-treated mouse. **B**, histochemical detection showing induction of hPLAP in liver of CDDO-Im-treated mouse.



with these triterpenoids results in increased expression of the *Nqo1*-ARE-*Luc* reporter gene in the kidneys, liver, intestines, and salivary gland (Fig. 1B). As shown in Fig. 1C, *Nqo1*-ARE-*Luc* reporter expression is significantly increased in the abdomen by 3 h following treatment with 100 μ mol CDDO-Im/kg and reaches maximum intensity at 9 h. Approximately 15% of the signal intensity remains at 24 h following treatment.

However, this type of *in vivo* bioluminescent measurement does not have the resolution to precisely define the anatomic location of reporter gene induction or to identify the specific cell types within a responsive organ. More detailed information about the localization of the pharmacodynamic action of triterpenoids can be obtained using *Nqo1*-ARE-*hPlap* reporter mice coupled to immunohistochemical analysis. In accord with the bioluminescence results, Fig. 2 shows that *Nqo1*-ARE-*hPlap* reporter expression is increased in hepatocytes, especially in the centrilobular regions around vessels and ducts after treatment with CDDO-Im.

To provide a more quantitative assessment of the effects of CDDO-Im on gene expression, quantitative real-time reverse transcription-PCR was used to measure transcript levels of two ARE-regulated genes: *Nqo1* and *Gclc*. A single dose of CDDO-Im at 100 μ mol/kg increases RNA transcript levels of *Nqo1* and *Gclc* in most tissues surveyed (Table 1). The salivary gland and small intestine mucosa have the highest level of *Nqo1* induction (23.6- and 19.8-fold, respectively), confirming the induction patterns seen in *Nqo1*-ARE-*Luc* reporter mice. *Nqo1* RNA transcripts are also increased in the liver, lung, colon, kidney, thymus, and heart. *Gclc* is also induced in these tissues, with the greatest induction occurring in the small intestine (48-fold). In addition, *Gclc* is induced 9.3-fold in the stomach. *Nqo1*, but not *Gclc*, is significantly induced in several regions of the brain as well, including the brainstem (2.2-fold), cerebral cortex (3-fold), cerebellum (1.4-fold), and hippocampus (3.2-fold). As many of these tissues were not responsive in the *Nqo1*-ARE-*Luc* reporter system, these results also reveal limitations of this reporter mouse. The lack of response in these tissues in the *Nqo1*-ARE-*Luc* mouse may be due to poor expression of the transgene and will require further analysis of the *Nqo1*-ARE-*Luc* transgenic mouse to clarify.

Very Low Doses of CDDO-Im Result in Significant Increases in *Nqo1* RNA Transcript Levels

A single dose of 0.3 μ mol/kg of CDDO-Im results in ~20-fold elevation of *Nqo1* transcripts in the small intestine mucosa (Fig. 3). Smaller responses are seen in internal organs and require higher doses. *Nqo1* RNA transcripts are induced ~3-fold in the lung after a single dose of 1 μ mol CDDO-Im/kg. Significant induction (12.5-fold) occurs in the liver following a dose of 3 μ mol CDDO-Im/kg. A statistically significant induction of 1.6-fold occurs in the cerebral cortex following a dose of 10 μ mol/kg. Although the thresholds for significant induction vary among tissues, the level of induction in the liver, lung, and small intestine mucosa plateaus at doses of ≥ 10 μ mol/kg.

Nqo1 Transcripts Are Increased in Multiple Tissues following Low-Dose Oral Administration of Several Triterpenoid Derivatives

Sixteen triterpenoids were selected for further characterization of *Nqo1* transcript induction. A dose of 2 μ mol/kg was chosen based on the dose response study to identify triterpenoids with both higher and lower inducer potency

Table 1. Induction of RNA transcript levels in mice 6 h after gavage with 100 μ mol CDDO-Im/kg body weight

Organ	Fold induction	
	<i>Gclc</i>	<i>Nqo1</i>
Liver	3.4*	11.4*
Lung	13.2*	12.6*
Salivary gland	12.4*	23.6*
Stomach	9.3*	0.7
Small intestine	48.0*	19.8*
Colon	9.7*	5.6*
Kidney	2.0*	5.0*
Thymus	2.2*	4.2*
Heart	3.7*	2.4*
Brainstem	0.9	2.2*
Cerebral cortex	1.2	3.0*
Striatum	1.0	1.5
Cerebellum	0.7	1.4*
Hippocampus	1.1	3.2*

* $P \leq 0.05$, $n = 4$ per group.

than CDDO-Im. Previous structure-activity relationship studies have narrowed the focus to compounds that vary primarily at the R^2 group at C-17. For example, it is known that a 9-en-12-one functionality combined with a nitrile or carboxyl group at C-2 greatly increases potency (23). Later studies showed that the nitrile group at C-2 provides the greatest enhancement of potency for suppression of the induction of inducible nitric oxide synthase (10). Modifications to improve anti-inflammatory activity have shown that the triterpenoid nucleus containing an activated Michael acceptor group in ring A as well as a second Michael acceptor group in ring C creates very potent suppression of inflammatory response (10, 19, 24). These functional groups have also been shown to be critical for induction of Nrf2-regulated cytoprotective genes *in vitro*, suggesting a functional link between these processes as well as defining an essential pharmacophore for these activities (12, 25, 26). The parent compound, oleanolic acid, does not have these functionalities and is inactive (Table 2). Similarly, the parent amide (TP222), which lacks a nitrile group at the R^1 position, does not increase *Nqo1* transcripts in any of the tissues assayed, confirming that the nitrile group at the R^1 position is critical for inducer potency (10). CDDO-Me potently induces *Nqo1* expression in the small intestine mucosa (7.5-fold), liver (5.6-fold), lung (4.7-fold), and cerebral cortex (1.5-fold) following a single dose. Three consecutive daily doses of CDDO-Me maintain or increase the level of *Nqo1* induction in these tissues, suggesting favorable pharmacokinetics for sustained pharmacodynamic action. CDDO, the nonesterified parent carboxylic acid of CDDO-Me, increases RNA transcripts of *Nqo1* in only the small intestine mucosa (8.4-fold) and liver (2.7-fold). This indicates that, although the intrinsic potency of CDDO and CDDO-Me is similar in the easily accessible small intestine mucosa, CDDO-Me has improved distribution, allowing it to act on more distal tissues, such as lung and

cerebral cortex. The amides used in this study also induce *Nqo1* in the small intestine mucosa, with the exception of CDDO-trifluoroethyl amide (TP500), which does not induce *Nqo1* transcripts in any of the measured tissues after a single dose. However, after three doses of the trifluoroethyl amide, *Nqo1* transcripts are induced in the liver (3.1-fold), lung (1.8-fold), and cerebral cortex (2-fold). CDDO-ethyl amide (TP319) is another promising amide as shown by *Nqo1* induction in the liver (2.2-fold), lung (2.5-fold), and cerebral cortex (2-fold) following three doses. The dinitrile compound, TP225, has been shown in previous *in vitro* studies (10, 12) to be particularly potent, with effects observed at picomolar concentrations; however, its *in vivo* effects were unknown. This study shows that TP225 induces *Nqo1* in the small intestine mucosa after a single dose as well as in the liver, lung, and cerebral cortex following a single dose and three consecutive daily doses. The imidazole and pyrazole derivatives are also potent inducers of *Nqo1* in the small intestine mucosa, with the exception of the fluorophenyl imidazolidine (TP299), which does not induce *Nqo1* in any of the tissues examined; this may be due to unfavorable effects of the bulky group at the R^2 position. Consistent with observations from previous studies (17), CDDO-Im is a potent inducer of *Nqo1* *in vivo*. *Nqo1* is induced in the small intestine mucosa (9.5-fold), liver (8.6-fold), and lung (3.5-fold) following a single dose of CDDO-Im. In addition, CDDO-Im induces *Nqo1* in the cerebral cortex following three daily doses.

Treatment with Triterpenoids Increases Hepatic NQO1 Enzyme Activity

Figure 4 shows that NQO1 enzyme activity is increased in mouse liver 24 h following a single 2 $\mu\text{mol/kg}$ gavage of CDDO-Me (2.2-fold), the dinitrile TP225 (1.6-fold), or CDDO-Im (1.7-fold). As suggested by the lack of RNA transcript induction, oleanolic acid and TP222 do not induce NQO1 enzyme activity following treatment with 2 or 10 $\mu\text{mol/kg}$. Although a single 2 $\mu\text{mol/kg}$ dose of CDDO-ethyl amide increases RNA transcripts in the liver by 2.9-fold, it does not cause an increase in NQO1 enzyme activity at this dose, although a higher single dose (10 $\mu\text{mol/kg}$) did cause a 1.9-fold increase in NQO1 enzyme activity. NQO1 enzyme activity is also induced following a single 10 $\mu\text{mol/kg}$ dose of CDDO-Me (3.6-fold), the dinitrile TP225 (1.8-fold), and CDDO-Im (1.8-fold).

Discussion

In these studies, *Nqo1* transcript changes are used as a marker of pharmacodynamic action and presumptive chemopreventive potential for several reasons. First, several classes of chemopreventive agents, such as substituted dithiolethiones and Michael reaction acceptors, were first identified as potential anticarcinogens through induction of NQO1 (27). Second, *Nqo1* as well as many conjugating and antioxidative genes are ARE-driven genes, which are regulated through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. Nrf2 is an essential transcription factor for the basal and especially the inducible expression of *Nqo1* (13, 28, 29). Nrf2 is essential for the chemopreventive

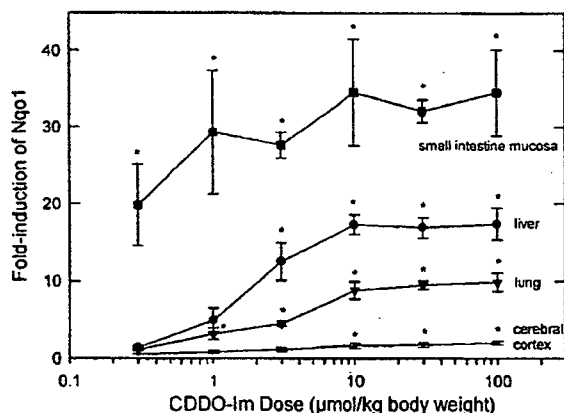
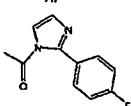
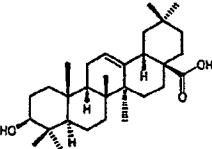


Figure 3. Dose response for induction of *Nqo1* RNA transcripts in tissues of male ICR mice 6 h following treatment with CDDO-Im (TP235) by gavage. Points, mean ($n = 4$ for vehicle group and $n = 3$ for all other groups); bars, SE. *, $P < 0.05$.

Table 2. Induction of Nqo1 RNA transcripts in mouse tissues 6 h following gavage with triterpenoids (2 µmol/kg body weight)

					Fold change of Nqo1 RNA transcripts							
					Small intestine mucosa	Liver		Lung		Cerebral cortex		
					1 dose	1 dose	3 doses	1 dose	3 doses	1 dose	3 doses	
Carboxylic acid	151	CDDO	NC	CO ₂ H	8.4*	2.7*	ne [†]	1.5	ne	1.3	ne	
	155	CDDO-Me	NC	CO ₂ Me	7.5*	5.6*	12.4*	4.7*	5.1*	1.5*	1.9*	
Esters	230		NC	CO ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	5.0*	2.6	ne	1.7	ne	1.8*	ne	
	222		HO ₂ C	CO ₂ Et	1.8	0.9	ne	1.4	ne	1.3	ne	
Amides	223		NC	CONH ₂	2.9*	2.0	ne	2.1*	ne	1.7*	ne	
	224		NC	CONHMe	6.7*	4.0*	3.2	2.4*	2.2*	1.2	1.3	
	319		NC	CONHEt	4.9*	2.9*	2.2*	1.9*	2.5*	0.8	2.0*	
	226		NC	CONMe ₂	2.5*	1.7	ne	1.6	ne	1.2	ne	
	500		NC	CONH-CH ₂ -CF ₃	2.6	1.7	3.1*	1.0	1.8*	0.8	2.0*	
Imidazoles/ pyrazole	235	CDDO-Im	NC		9.5*	8.6*	3.4*	3.5*	2.0*	1.4	2.0*	
	254		NC		11.3*	4.0*	ne	2.7*	ne	1.2	ne	
	261		NC		5.0*	3.0*	ne	2.5*	ne	0.8	ne	
	299		NC		2.6	1.2	ne	2.0	ne	0.6	ne	
	242		NC		5.5*	1.5	ne	2.2*	ne	0.6*	ne	
	225		NC	CN	5.3*	4.9*	4.3*	3.6*	4.0*	1.5*	2.0*	
Oleanolic acid	OA				0.8	1.0	ne	1.2	ne	1.3	ne	

*P < 0.05, n = 4 for vehicle group and n = 3 for all other groups.

†Not evaluated (indicates that this dose and schedule was not tested).

actions of sulforaphane and oltipraz, known inducers of *Nqo1* (14, 30). The induction of *Nqo1* indicates activation of Nrf2 signaling, implying that a host of other Nrf2-regulated cytoprotective genes are also activated. In addition to *Nqo1*, Nrf2 regulates the expression of conjugating and antioxidative genes, the ubiquitin/proteasome system, the molecular chaperones/stress response system, and anti-inflammatory responses (31). Third, several reporter mice containing the AREs of *Nqo1* have been developed, which allow for additional characterization of Nrf2 activation and pharmacodynamic action. Fourth, in addition to its use as a sentinel of Nrf2 activation and cytoprotective enzyme

induction, NQO1 itself provides multiple protective mechanisms. NQO1 functions as an antioxidant to maintain endogenous antioxidants in their reduced and active forms (32, 33). NQO1 not only functions to reduce quinones for detoxification but also acts on other substrates, including quinone imines, naphthoquinones, as well as azo and nitro compounds (34). An additional mechanism for protection against carcinogenesis has been suggested where NQO1 acts to stabilize the tumor-suppressing p53 protein (35–38). Fifth, *Nqo1* is widely distributed throughout the body, meaning that this marker can be used consistently to investigate multiple target organs. Sixth, *Nqo1* has a large

dynamic response to inducers, facilitating identification of inducers with a wide range of potencies. These qualities clearly link increases in *Nqo1* transcripts and enzyme activity with chemopreventive activity and establish *Nqo1* as a practical marker for assessment of a broader pharmacodynamic action.

Chemoprevention resulting from induction of cytoprotective enzymes has been established using other classes of agents in many models. For example, oltipraz and 3H-1,2-dithiole-3-thione (D3T) have been extensively studied as chemopreventive agents and cytoprotective enzyme inducers. Oltipraz is an effective chemopreventive agent in animal models of chemical-induced carcinogenesis targeting liver, lung, colon, small intestine, forestomach, bladder, mammary glands, and skin (39). As a point of reference, NQO1 enzyme activity is increased 4-fold in the liver of female mice treated with ~2,200 μmol oltipraz/kg (40). D3T is a known chemopreventive agent that protects against tumorigenesis in the liver (41). Treatment by gavage with 300 μmol D3T/kg results in 3-fold induction of NQO1 activity in mouse liver (29). Remarkably, a single 10 μmol /kg dose of CDDO-Me, CDDO-ethyl amide, the dinitrile (TP225), or CDDO-Im increases NQO1 enzyme activity by 3.6-, 2.9-, 1.8-, or 1.8-fold, respectively. These results are consistent with rat studies using CDDO-Im that show 30- and 100-fold improvements in chemopreventive potencies in inhibiting tumorigenesis compared with D3T and oltipraz, respectively (17). These enzyme inducer and antitumorigenesis comparisons highlight the exceptional potency of these triterpenoids.

Levels of induction of *Nqo1* RNA transcripts reflect changes in pharmacodynamic action as a result of modifying the R^1 or R^2 groups on the triterpenoid nucleus. The nitrile group at R^1 is confirmed to be critical for induction of cytoprotective enzymes *in vivo*. Modification of the carboxylic acid at R^2 to a methyl ester, an ethyl ester, a nitrile, or an imidazolidine improves distribution. An amide at R^2 (methyl

amide or ethyl amide) improves activity in the liver. Bulky groups in the R^2 position negatively influence pharmacodynamic action *in vivo*. Furthermore, adding a carbonyl pyrazole at R^2 instead of a carbonyl imidazole eliminates *Nqo1* RNA transcript induction in the liver. The combined effects of these modifications make CDDO-Me, the dinitrile (TP225), and CDDO-Im particularly promising because of exceptional potency and broad tissue distribution. This analysis measures changes in pharmacodynamic action, which may be influenced by both changes in inducer potency and pharmacokinetic properties as a result of structural modifications. For example, pharmacokinetic studies (42) show that, after oral administration, CDDO achieves a higher maximum plasma concentration (C_{max}) than CDDO-Im but the terminal half-life of both compounds is very similar (over 8 h). Changes in bioavailability may also contribute to the differences observed in this study. Although the oral bioavailability of CDDO-Im given at a dose of 30 μmol /kg body weight was reported to be 16% (42), CDDO-Im is an extremely potent activator of Nrf2 *in vivo* due to the cumulative effects of its other pharmacologic properties.

The diversity of the sites of triterpenoid action, as well as the wide variety of protective effects initiated by potent activation of the Keap1-Nrf2-ARE pathway, suggests that these compounds can protect against many disease states. Given the proven efficacy of cytoprotective enzyme induction as a cancer chemoprevention mechanism, protection against tumorigenesis at many sites is an obvious beneficial implication. Even induction of protective enzymes in the salivary gland, an unusual location for chemoprevention focus, can be exploited. Assuming that salivary measurements reflect tissue levels of these enzymes, induction of protective enzymes in saliva can be used as a noninvasive assessment of chemopreventive potential in clinical trials. This method has already been proven feasible in humans where Sladek et al. (43) measured induction of NQO1 and glutathione S-transferases in the saliva of subjects ingesting broccoli or coffee, known inducers of cytoprotective enzymes. The protective effects elicited by triterpenoids are not limited to cancer chemoprevention. Triterpenoid action in the brain could provide protection against neurodegenerative disease (44, 45) and cerebral ischemia (46). Triterpenoid treatment resulting in induction of cytoprotective enzymes in the heart could also provide protection against several cardiac disorders (47). In addition, induction of Nrf2 signaling in the lung can provide protection against hyperoxic lung injury (48), emphysema (49), and asthma (50).

Whether triterpenoids are used as tools to combat disease or molecular probes to learn more about the signaling pathways they invoke, a systematic approach is critical to developing a better understanding of the global pharmacodynamic actions of these promising compounds. A greater understanding of the signaling networks influenced by triterpenoids will inform both the development of new triterpenoid derivatives as well as potential clinical applications.

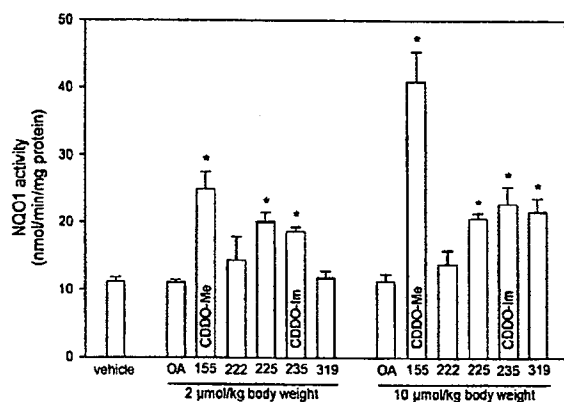


Figure 4. Induction of hepatic NQO1 enzyme activity in male ICR mice 24 h following treatment with triterpenoids by gavage. See Table 2 for triterpenoid structures. Columns, mean ($n = 4$ for vehicle group and $n = 3$ for all other groups); bars, SE. *, $P < 0.05$.

Acknowledgments

We thank Judy Choi for assistance with RNA isolations and Albena Dinkova-Kostova and Tania O'Connor for assistance with the development of the *Nqo1*-ARE-Luc reporter mouse.

References

- Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:5926–39.
- Konopleva M, Tsao T, Estrov Z, et al. The synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces caspase-dependent and -independent apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004;64:7927–35.
- Ito Y, Pendey P, Place A, et al. The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces apoptosis of human myeloid leukemia cells by a caspase-8-dependent mechanism. *Cell Growth Differ* 2000;11:261–7.
- Suh N, Wang Y, Honda T, et al. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Res* 1999;59:336–41.
- Suh N, Honda T, Finlay HJ, et al. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res* 1998;58:717–23.
- Zou W, Liu X, Yue P, et al. c-Jun NH₂-terminal kinase-mediated up-regulation of death receptor 5 contributes to induction of apoptosis by the novel synthetic triterpenoid methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oate in human lung cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:7570–8.
- Shishodia S, Sethi G, Konopleva M, et al. A synthetic triterpenoid, CDDO-Me, inhibits I κ B α kinase and enhances apoptosis induced by TNF and chemotherapeutic agents through down-regulation of expression of nuclear factor κ B-regulated gene products in human leukemic cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:1828–38.
- Place AE, Suh N, Williams CR, et al. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazole, inhibits inflammatory response and tumor growth *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2003;9:2798–806.
- Samudio I, Konopleva M, Hail N, Jr., et al. 2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-imidazole (CDDO-Im) directly targets mitochondrial glutathione to induce apoptosis in pancreatic cancer. *J Biol Chem* 2005;280:36273–82.
- Honda T, Honda Y, Favaloro FG, Jr., et al. A novel dicyanotriterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-onitrile, active at picomolar concentrations for inhibition of nitric oxide production. *Bioorg Med Chem Lett* 2002;12:1027–30.
- Liby K, Hock T, Yore MM, et al. The synthetic triterpenoids, CDDO and CDDO-imidazole, are potent inducers of heme oxygenase-1 and Nrf2/ARE signaling. *Cancer Res* 2005;65:4789–98.
- Dinkova-Kostova AT, Liby KT, Stephenson KK, et al. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:4584–9.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:313–22.
- Nioi P, McMahon M, Itoh K, et al. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* 2003;374:337–48.
- Jaiswal AK. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry* 1991;30:10647–53.
- Favreau LV, Pickett CB. Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 1991;266:4556–61.
- Yates MS, Kwak MK, Egner PA, et al. Potent protection against aflatoxin-induced tumorigenesis through induction of Nrf2-regulated pathways by the triterpenoid 1-(2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl)imidazole. *Cancer Res* 2006;66:2488–94.
- Honda T, Rounds BV, Gribble GW, et al. Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8:2711–4.
- Honda T, Rounds BV, Bore L, et al. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *J Med Chem* 2000;43:4233–46.
- Johnson DA, Andrews GK, Xu W, et al. Activation of the antioxidant response element in primary cortical neuronal cultures derived from transgenic reporter mice. *J Neurochem* 2002;81:1233–41.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C_T)$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Prochaska HJ, Santamaria AB, Talalay P. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2394–8.
- Honda T, Rounds BV, Bore L, et al. Novel synthetic oleanane triterpenoids: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg Med Chem Lett* 1999;9:3429–34.
- Honda T, Gribble GW, Suh N, et al. Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *J Med Chem* 2000;43:1866–77.
- Talay P, De Long MJ, Prochaska HJ. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8261–5.
- Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, et al. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3404–9.
- Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Talalay P. Chemical structures of inducers of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1). *Methods Enzymol* 2004;382:423–48.
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, et al. The Cap 'n' Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res* 2001;61:3299–307.
- Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, et al. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes *in vivo* by the cancer chemoprotective agent, 3H-1,2-dithiole-3-thione. *Mol Med* 2001;7:135–45.
- Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3410–5.
- Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, et al. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 2003;278:8135–45.
- Siegel D, Boettner EM, Burr JA, et al. The reduction of α -tocopherolquinone by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase: the role of α -tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol Pharmacol* 1997;52:300–5.
- Chan TS, Wilson JX, O'Brien PJ. Coenzyme Q cytoprotective mechanisms. *Methods Enzymol* 2004;382:89–104.
- Nioi P, Hayes JD. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat Res* 2004;555:149–71.
- Asher G, Lotem J, Sachs L, et al. p53-dependent apoptosis and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Methods Enzymol* 2004;382:278–93.
- Asher G, Lotem J, Sachs L, et al. Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13125–30.
- Asher G, Lotem J, Kama R, et al. NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3099–104.
- Asher G, Lotem J, Cohen B, et al. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1188–93.

39. Kensler TW, Helzlsouer KJ. Oltipraz: clinical opportunities for cancer chemoprevention. p. J Cell Biochem Suppl 1995;22:101-7.
40. Kwak MK, Ramos-Gomez M, Wakabayashi N, et al. Chemoprevention by 1,2-dithiole-3-thiones through induction of NQO1 and other phase 2 enzymes. Methods Enzymol 2004;382:414-23.
41. Maxuitenko YY, Libby AH, Joyner HH, et al. Identification of dithiolethiones with better chemopreventive properties than oltipraz. Carcinogenesis 1998;19:1609-15.
42. Place A. Pre-clinical evaluation of the novel synthetic triterpenoid CDDOimidazole [dissertation]. Hanover (NH): Dartmouth College; 2004.
43. Sreerama L, Hedge MW, Sladek NE. Identification of a class 3 aldehyde dehydrogenase in human saliva and increased levels of this enzyme, glutathione S-transferases, and DT-diaphorase in the saliva of subjects who continually ingest large quantities of coffee or broccoli. Clin Cancer Res 1995;1:1153-63.
44. Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson DA, et al. Protection from mitochondrial complex II inhibition *in vitro* and *in vivo* by Nrf2-mediated transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:244-9.
45. Burton NC, Kensler TW, Guilarte TR. *In vivo* modulation of the Parkinsonian phenotype by Nrf2. Neurotoxicology 2006;27:1094-100.
46. Shih AY, Li P, Murphy TH. A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia *in vivo*. J Neurosci 2005;25:10321-35.
47. Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, et al. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. FEBS Lett 2005;579:3029-36.
48. Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, et al. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. Am J Respir Cell Mol Biol 2002;26:175-82.
49. Ishii Y, Itoh K, Morishima Y, et al. Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. J Immunol 2005;175:6968-75.
50. Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, et al. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. J Exp Med 2005;202:47-59.

The Synthetic Triterpenoids, CDDO and CDDO-Imidazolidine, Are Potent Inducers of Heme Oxygenase-1 and Nrf2/ARE Signaling

Karen Liby,¹ Thomas Hock,³ Mark M. Yore,¹ Nanjoo Suh,¹ Andrew E. Place,¹ Renee Risingsong,¹ Charlotte R. Williams,¹ Darlene B. Royce,¹ Tadashi Honda,² Yukiko Honda,² Gordon W. Gribble,² Nathalie Hill-Kapturczak,³ Anupam Agarwal,³ and Michael B. Sporn¹

¹Dartmouth Medical School and ²Dartmouth College, Hanover, New Hampshire and ³University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama

Abstract

The synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oic acid (CDDO) and its derivative 1-[2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole (CDDO-Im) are multifunctional molecules with potent antiproliferative, differentiating, and anti-inflammatory activities. At nanomolar concentrations, these agents rapidly increase the expression of the cytoprotective heme oxygenase-1 (HO-1) enzyme *in vitro* and *in vivo*. Transfection studies using a series of reporter constructs show that activation of the human HO-1 promoter by the triterpenoids requires an antioxidant response element (ARE), a cyclic AMP response element, and an E Box sequence. Inactivation of one of these response elements alone partially reduces HO-1 induction, but mutations in all three sequences entirely eliminate promoter activity in response to the triterpenoids. Treatment with CDDO-Im also elevates protein levels of Nrf2, a transcription factor previously shown to bind ARE sequences, and increases expression of a number of antioxidant and detoxification genes regulated by Nrf2. The triterpenoids also reduce the formation of reactive oxygen species in cells challenged with *tert*-butyl hydroperoxide, but this cytoprotective activity is absent in Nrf2 deficient cells. These studies are the first to investigate the induction of the HO-1 and Nrf2/ARE pathways by CDDO and CDDO-Im, and our results suggest that further *in vivo* studies are needed to explore the chemopreventive and chemotherapeutic potential of the triterpenoids. (Cancer Res 2005; 65(11): 4789-98)

Introduction

Triterpenoids are natural products that resemble steroids in their biogenesis by cyclization of squalene and their pleiotropic actions. Triterpenoids such as oleanolic acid and ursolic acid have been used for medicinal purposes in many Asian countries and have weak antitumorigenic and anti-inflammatory properties (1-4). To improve the potency of these compounds, we have synthesized and tested over 270 derivatives of oleanolic acid and ursolic acid for potential use as chemopreventive and chemotherapeutic agents (5-8). Two of the most potent synthetic triterpenoids, 2-cyano-3,12-

dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oic acid (CDDO) and its derivative 1-[2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole (CDDO-Im), inhibit cell proliferation and induce apoptosis in leukemia, myeloma, and carcinoma cell lines (9-12). Moreover, CDDO and CDDO-Im block the production of nitric oxide (NO) and suppress *de novo* synthesis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase 2 (COX-2) in mouse macrophages treated with IFN- γ (5, 7-9, 13). These synthetic triterpenoids also induce differentiation of human leukemia cells and 3T3-L1 fibroblasts and suppress tumor growth *in vivo* in B16 melanoma and L1210 leukemia mouse models (13, 14).

Despite the potent activities of CDDO and CDDO-Im, the molecular mechanisms that mediate these biological effects are not known. However, microarray analysis of breast cancer cells treated with synthetic triterpenoids revealed a dramatic up-regulation of heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA (15). Heme oxygenase is the rate-limiting enzyme in the catabolism of heme, producing biliverdin, iron, and carbon monoxide. Three heme oxygenase isoforms have been described (16-18); HO-2 and HO-3 [the latter recently described as a pseudogene (19) are constitutively expressed]. HO-1 is induced by a variety of stimuli, including growth factors, cytokines, NO, and oxidants such as heme, hydrogen peroxide, oxidized lipids, and heavy metals (20). HO-1 and its breakdown products possess potent anti-inflammatory and cytoprotective properties (reviewed in refs. 21-23).

The diversity of stimuli that induce HO-1 suggests that the molecular mechanisms that regulate HO-1 are complex. Several studies have described the regulatory sites and transcription factors required for activation of the mouse HO-1 promoter (24-26) and have begun to explore the human HO-1 promoter (27-30), but there are significant differences between the two species (reviewed in ref. 31). In the mouse, phytochemicals such as curcumin (32) and carnosol (26) induce HO-1 by regulating the expression and location of the Nrf2 transcription factor, but the role of Nrf2 in the activation of human HO-1 is still in question. Nrf2 normally is sequestered in the cytoplasm by its inhibitor Keap1. Once activated, Nrf2 translocates to the nucleus and dimerizes with another member of the Cap'n/Collar/basic leucine zipper family of transcription factors (33, 34). Nrf2 then activates transcription by binding to a stress response element (SRE) found in the promoters of a number of antioxidative and anti-inflammatory genes, including HO-1 (35). SREs are regulatory DNA sequences also referred to as antioxidant response elements (ARE) or Maf recognition elements (MARE). Because of the structural and functional similarity among SRE, ARE, and MARE sequences (reviewed in ref. 36), these terms are often used interchangeably but hereafter will be referred to as AREs.

Note: Preliminary results from this investigation were presented at the 95th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research in Orlando, FL, 2004.

K. Liby and T. Hock contributed equally to this work.

Requests for reprints: Michael B. Sporn, Department of Pharmacology, Dartmouth Medical School, Hanover, NH 03755. Phone: 603-650-6557; Fax: 603-650-1129; E-mail: michael.sporn@dartmouth.edu.

©2005 American Association for Cancer Research.

Activation of the Nrf2/ARE pathway can suppress oxidative stress and inflammation and thus has important implications for carcinogenesis (37, 38).

In this study, we established that the synthetic triterpenoids CDDO and CDDO-lm dramatically increase HO-1 expression *in vitro* and *in vivo* and explored the molecular mechanisms that mediate this induction. When mutations were simultaneously introduced into the cyclic AMP response element (CRE), ARE, and E Box regulatory sequences in the human HO-1 promoter, activation of HO-1 by the triterpenoids was completely blocked. The triterpenoids also increased expression of a number of genes regulated by the Nrf2 transcription factor, and Nrf2 is required for the triterpenoids to reduce oxidative stress. The potent induction of HO-1 and the Nrf2/ARE cytoprotective pathways by low nanomolar concentrations of CDDO and CDDO-lm suggests that these triterpenoids could be used therapeutically for cancer prevention.

Materials and Methods

Reagents. Details of the synthesis of CDDO and CDDO-lm have been published (5, 7, 8). Triterpenoids were dissolved in DMSO, and controls containing equal concentrations of DMSO ($\leq 0.1\%$) were included in all experiments. Sources of other reagents were as follows: zinc protoporphyrin IX from Frontier Scientific (Logan, UT); SB203580, H89, and G66976 from Calbiochem (San Diego, CA); H₂DCFDA from Molecular Probes (Eugene, OR); rabbit polyclonal antibodies against HO-1 and Nrf2 from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); AKT, phospho-AKT, CRE binding protein (CREB), and phospho-CREB polyclonal antibodies from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); LY294002 and all other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Cell culture. U937 and THP-1 human leukemia cells (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) were maintained in RPMI containing 5% fetal bovine serum (FBS), but for the HO-1 induction experiments, the U937 cells were plated and treated in RPMI + 1% horse serum. CV-1 cells (ATCC), monkey kidney cells routinely used in transfection experiments, were maintained in MEM + 10% FBS. Nrf2^{-/-} and Nrf2^{+/+} mouse embryo fibroblasts (ref. 39; kindly provided by Jeff Chan, University of California, Irvine) were grown in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS, nonessential amino acids, and 2-mercaptoethanol. HK-2 cells (ATCC), an immortalized human proximal tubule epithelial cell line from normal adult kidney, were grown in collagen-coated tissue culture plates in keratinocyte-serum free medium supplemented with 5 ng/mL recombinant epidermal growth factor and 40 μ g/mL bovine pituitary extract. All tissue culture media, sera, and supplements were from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Northern blot analysis. Total RNA was isolated from cells with Trizol (Invitrogen) and prepared for blotting as previously described (40). Probes for human HO-1 or growth hormone (hGH; ref. 28) were radiolabeled with [α -³²P]dCTP using random primers. Membranes were stripped and reprobed with a cDNA probe for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Heme oxygenase enzyme assay. U937 cells were treated with CDDO-lm for 12 hours, and the generation of bilirubin was used to assess heme oxygenase activity as previously described (41, 42). Heme oxygenase activity was expressed as pmol of bilirubin per mg protein per hour.

Induction of heme oxygenase-1 *in vivo*. Male C57BL/6 mice were gavaged with 2 μ mol CDDO-lm (three mice per group) dissolved in DMSO or with vehicle alone (two mice per group). After 6 hours, various organs were removed and homogenized in lysis buffer [50 mmol/L Tris (pH 8), 100 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ mol/L leupeptin, and 5 μ g/mL aprotinin]. Lysates (100 μ g per organ, except 20 μ g for spleen) were analyzed by Western blotting (40). A representative sample from each organ is shown for both treated and control animals.

Adenoviral expression of dominant-negative AKT. The recombinant adenoviral construct encoding HA-tagged dominant-negative AKT (43) was provided by Kenneth Walsh (Boston University School of Medicine, Boston, MA). MCF10 cells (Fred Miller, Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, Detroit, MI) were infected with adenoviral supernatant (1:10 to 1:50 dilutions) in DMEM/F12 + 5% horse serum for 2 days. During the last 6 hours of infection, cells were treated with 100 nmol/L CDDO-lm, and HO-1 and AKT levels were analyzed by Western blotting.

Plasmids and site-directed mutagenesis. The following human HO-1 reporter plasmids have been described: -11.6 kb (pHOGL3/11.6; ref. 27), enhancer (pHOGL3/4.5/+12.5), -9.1 kb (pHOGL3/9.1), -4.5 kb (pHOGL3/4.5), and -4.0 kb (pHOGL3/4.0; ref. 28). The Nrf2 antisense (pEF/nrf2-AS) plasmid (44) was a gift from Kohsuke Kataoka (Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan). The dominant-negative expression vectors for CREB (A-CREB; ref. 45) and USF (A-USF; ref. 46) were generously provided by Charles Vinson (National Cancer Institute, Bethesda, MD). For all other HO-1 promoter constructs, the pHOGL3/4.5 or the pHOGL3/4.5 plasmid was used as the parental clone, and mutations or deletions were made using the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) with the following oligonucleotides: (a) pHOGL3/ARE1 forward 5'-CCTTGGGAATCTGAGTCGTGATTTCTCATCCCTCG-3' and reverse 5'-CGAGGGGATGAGGAAATCAGACTCAGCATTCCTCAAGGC-3'; (b) pHOGL3/ARE2 forward 5'-GCCTTGGGAATGCTGAGTCGGATTTCTCATCCCTCG-3' and reverse 5'-CGAGGGGATGAGGAAATCAGACTCAGCATTCCTCAAGGC-3'; (c) pHOGL3/ARE3 forward 5'-GCCTTGGGAATGCTGAGTCGGATTTCTCATCCCTCG-3' and reverse 5'-GCACGAGGGGATAGGAAATCAGACTCAGCATTCCTCAAGGC-3'; (d) pHOGL3/ARE4 forward 5'-GTGCAGCTGCATTCTGCTGTGTCATGTTTGGG-3' and reverse 5'-CCCAACATGACACAGCAGAAATGCAGCTGCAC-3'; (e) pHOGL3/ARE5 and pHOGL3/4.5/ARE5 M forward 5'-GCTAGATTTTGTGAGTACCAGTGCCTCTCAGC-3' and reverse 5'-GCTGAGGAGGCACTGGTAACCTCAGCAAAATCTAGC-3'; and (f) pHOGL3/4.5/ACRB forward 5'-GTGCAGCTGCATTCTGCTGTTTGGGAGGGGGG-3' and reverse 5'-CCCCCTCCCAACAGCAGAAATGCAGCTGCAC-3'. For the double- and triple-mutant constructs, each mutation was made sequentially. The accuracy of all new HO-1 promoter-reporter constructs was confirmed by sequencing.

Transfection assays. For experiments with the various HO-1 promoter luciferase constructs, CV-1 cells in 24-well plates were transiently transfected with FuGene 6 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), equimolar concentrations of luciferase reporter plasmids, and the CMX- β -gal expression vector. The pG5CAT plasmid (Clontech, Palo Alto, CA) was used to equalize the total amount of plasmid per well. In separate experiments, increasing concentrations of the Nrf2 antisense expression construct were cotransfected with pHOGL3/11.6 and CMX- β -gal, and pHOGL3/4.5 was cotransfected with increasing concentrations of DN-CREB or DN-USF expression vectors and CMX- β -gal. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with triterpenoids for an additional 18 to 24 hours. Cells were lysed in 100 μ L reporter lysis buffer (Promega, Madison, WI), and luciferase activity was measured and normalized to β -galactosidase (β -gal) activity. All transfection experiments were repeated at least thrice. For transfections with the ARE1-5 growth hormone reporter constructs, HK-2 cells were transiently transfected with LipofectAMINE (Invitrogen) and equimolar concentrations of ARE1-5 pHOGL3 reporter plasmids using a batch transfection protocol (28, 47). Cells were allowed to recover for 4 to 6 hours after transfection and split into two 10-cm plates. The next day, cells were treated with DMSO or 10 nmol/L CDDO-lm and analyzed by Northern blotting.

Microarray analysis. THP-1 human leukemia cells were treated with vehicle alone (control), with 300 nmol/L CDDO, or with 100 nmol/L CDDO-lm for 4 and 12 hours. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), and cDNA was synthesized with the Superscript Choice kit (Invitrogen). Biotin-labeled cRNA was synthesized by *in vitro* transcription. The cDNA was then fragmented and hybridized to a human HG-133A chip (Affymetrix, Santa Clara, CA) that contains ~22,000 genes and expressed sequence tags. The chips were washed, stained and scanned using an Affymetrix scanner. Scanned output files analyzed with the

Affymetrix Gene Chip Operating Software (ver 1.1.1.052 GCOS). Signal values were determined by a one-step Tukey's biweight algorithm and normalized to a mean value of 500. To determine significant changes between treatment and control groups, ratios were calculated by GCOS, and genes with a signal level of at least 200 and that were 2-fold higher than the control ($P < 0.003$) were selected.

Detection of reactive oxygen species. Cells were treated with CDDO-lm for 18 to 24 hours and incubated with 10 $\mu\text{mol/L}$ nonfluorescent indicator H_2DCFDA for 30 minutes. Cells were challenged with 250 $\mu\text{mol/L}$ *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP) for 15 minutes, and mean fluorescence intensity of 10,000 cells was analyzed by flow cytometry using a 480-nm excitation wavelength and a 525-nm emission wavelength. All reactive oxygen species (ROS) experiments were repeated at least thrice, and representative experiments are shown.

Results

CDDO and CDDO-lm induce heme oxygenase-1 expression and activity *in vitro* and *in vivo*. Preliminary microarray analysis revealed that HO-1 mRNA was significantly up-regulated in cells treated with the synthetic triterpenoids CDDO and CDDO-lm (15). In U937 human leukemia cells treated with 100 nmol/L CDDO-lm, HO-1 mRNA increased in a time-dependent manner (Fig. 1A), as determined by Northern blotting. The HO-1 message was evident after 1 hour of incubation with CDDO-lm, with maximal induction occurring at 4 hours. By 8 hours, HO-1 levels had noticeably declined, and after 24 hours, mRNA levels had decreased to basal levels. Similarly, 30 to

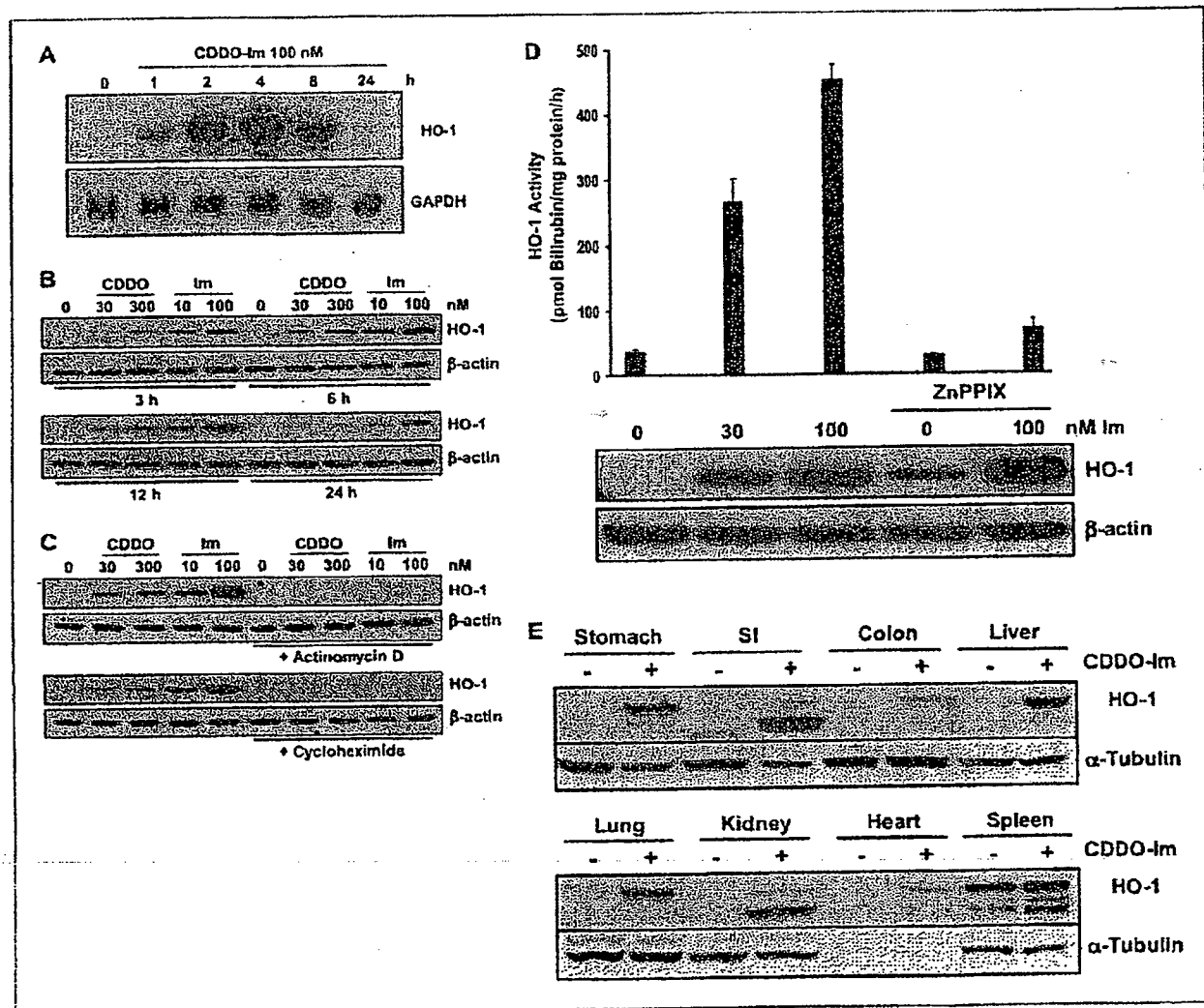


Figure 1. CDDO and CDDO-lm induce HO-1 expression and activity *in vitro* and *in vivo*. **A**, U937 cells were treated with 100 nmol/L CDDO-lm for 0 to 24 hours, and total RNA was isolated and analyzed by Northern blotting. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **B**, cells were incubated with CDDO or CDDO-lm (lm) for 3 to 24 hours. Cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane, and probed with antibodies against HO-1 and β -actin. **C**, Actinomycin D (5 $\mu\text{g/mL}$) or cycloheximide (10 $\mu\text{g/mL}$) was added to U937 cells for 1 hour and cells were treated with CDDO or CDDO-lm for an additional 6 hours. HO-1 levels were determined by Western blot analysis. **D**, U937 cells were incubated with 0 to 100 nmol/L CDDO-lm for 12 hours, and bilirubin production was measured to determine HO-1 enzyme activity. The same proteins were also examined by Western blot. ZnPIX, zinc protoporphyrin IX. **E**, CD1 mice were gavaged with 2 μmol CDDO-lm. After 6 hours, various organs were harvested and HO-1 induction was analyzed by Western blotting. Equal protein concentrations were observed in the heart samples when reprobed with a β -tubulin antibody.

300 nmol/L CDDO and 10 to 100 nmol/L CDDO-lm induced HO-1 protein in a time- and dose-dependent manner (Fig. 1B). By 24 hours, HO-1 protein levels had declined, and HO-1 protein was undetectable 48 hours after treatment (data not shown). CDDO-lm was a significantly more potent inducer of HO-1 than CDDO, (Fig. 1B, lane 3 versus 5 or lane 8 versus 10). CDDO-lm also markedly elevated HO-1 protein in T-47D and MCF10 breast epithelial cells, THP-1 leukemia cells, and A549 lung carcinoma cells (data not shown).

To explore whether the induction of HO-1 by the triterpenoids requires *de novo* transcription, we pretreated U937 cells with the transcriptional inhibitor Actinomycin D and then exposed the cells to varying concentrations of CDDO or CDDO-lm for 6 hours. Under these conditions no induction of HO-1 protein was observed (Fig. 1C, top), suggesting that *de novo* transcription is required for HO-1 induction. Similarly, the requirement for *de novo* protein synthesis was confirmed by the ability of cycloheximide to block HO-1 protein induction (Fig. 1C, bottom).

The HO-1 protein induced by the triterpenoids was enzymatically active. Bilirubin, a breakdown product of heme catabolism, increased 7- to 12-fold in U937 cells treated for 12 hours with 30 to 100 nmol/L CDDO-lm (Fig. 1D, top). This induced enzyme activity was blocked by the competitive HO-1 inhibitor zinc protoporphyrin IX (1 μ mol/L). The same samples used in the enzyme assay were also analyzed by Western blot. Although the enzyme activity induced by CDDO-lm correlated with induction of HO-1 protein, the zinc protoporphyrin IX inhibitor increased HO-1 protein levels both individually and in combination with CDDO-lm (Fig. 1D, bottom).

CDDO-lm also induced HO-1 *in vivo*. As shown in Fig. 1E, HO-1 protein levels increased in the stomach, small intestine, colon, liver, lung, kidney, and heart of CD-1 mice gavaged with 2 μ mol CDDO-lm; highest induction of HO-1 was observed in the stomach, liver, and small intestine. No endogenous HO-1 expression was detected in any of these tissues. Although HO-1 is constitutively expressed in the spleen of mice, even in this organ, HO-1 levels were further increased in response to CDDO-lm. Originally, organs from three mice per group were analyzed, and the upper HO-1 band was dominant (data not shown). However, when the same samples were used for a final representative blot, additional lower bands were observed in the small intestine, kidney, and spleen.

Kinase inhibitors block heme oxygenase-1 induction in U937 cells treated with CDDO-lm. The signaling pathways that regulate HO-1 induction vary depending on the stimulus. To identify potential pathways activated by the triterpenoids, U937 cells were exposed to various kinase inhibitors and subsequently to CDDO-lm. Although the PKA inhibitor H89 (10 μ mol/L) and the p38 inhibitor SB203580 (10 μ mol/L) only slightly reduced the induction of HO-1 by CDDO-lm, both the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 (15 μ mol/L) and G66976 (0.5 μ mol/L), an inhibitor of the classic Ca^{2+} -dependent PKC isoforms, markedly blocked the expression of HO-1 protein (Fig. 2). We next tested the effects of CDDO-lm on AKT, a known downstream target of PI3K. As shown in Fig. 2B, phospho-AKT was significantly but transiently increased in U937 cells treated with CDDO-lm for 1 hour. The importance of the PI3K pathway in HO-1 induction in response to CDDO-lm was further verified by the use of a dominant-negative AKT (AAA) adenoviral construct. For this experiment, we used MCF10 breast epithelial cells because of the low transduction efficiency of U937 cells. Infection with dominant-negative AKT blocked induction of HO-1 in response to CDDO-lm treatment by ~70% to 80% (Fig. 2C).

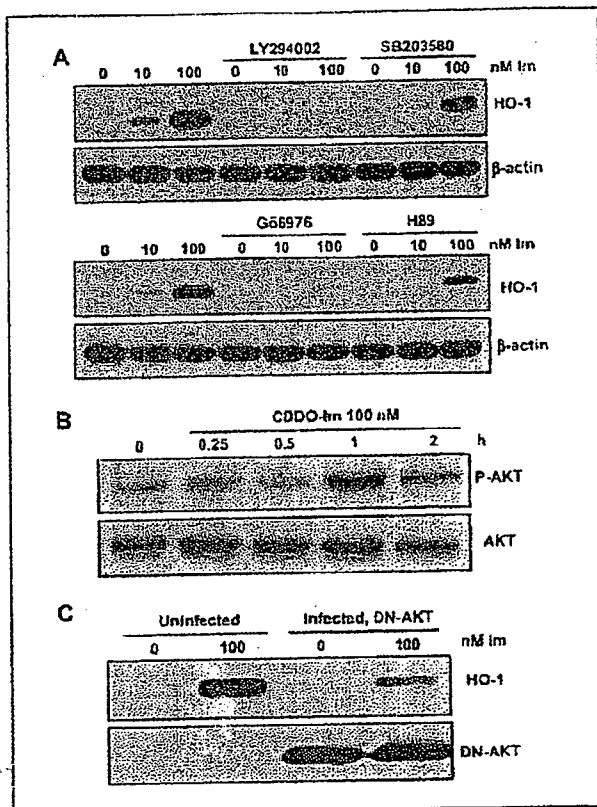


Figure 2. Inhibition of the PI3K and PKC signaling pathways blocks induction of HO-1. **A**, U937 cells were incubated with various protein kinase inhibitors for 1 hour and treated with 0 or 100 nmol/L CDDO-lm for 8 hours. Total proteins were analyzed by Western blotting for HO-1 and β -actin. **B**, CDDO-lm increases phosphorylation of AKT. U937 cells were incubated with 100 nmol/L CDDO-lm for 0 to 2 hours, and Western blots were probed for phospho-AKT followed by total AKT. **C**, a dominant-negative (DN) AKT construct partially blocks induction of HO-1. MCF10 cells were infected with a DN-AKT adenoviral construct for 2 days. During the last 6 hours of infection, 0 or 100 nmol/L CDDO-lm was added to the infected cells and to uninfected controls. Cell lysates were analyzed by Western blotting for HO-1 and DN-AKT.

Region between -4.0 and -4.5 kb of the human heme oxygenase-1 promoter is required for the induction of heme oxygenase-1 by the triterpenoids. The data from the kinase inhibitor experiments (Fig. 2) suggested that several different signaling pathways control the induction of HO-1 in our system; thus, we next sought to identify the specific regulatory elements that mediate the induction of HO-1 in response to the triterpenoids. A series of human HO-1 promoter-reporter constructs, described by Hill-Kapitczak et al. (27, 28), were transiently transfected into CV-1 cells. Luciferase activity for the full-length HO-1 promoter (-11.6 kb) and an internal enhancer were 3- to 5-fold higher in cells treated with 10 and 100 nmol/L CDDO-lm than in cells treated with vehicle alone (Fig. 3A). The -9.1 and -4.5 kb HO-1 promoter constructs also were activated by CDDO-lm. However, transfection of a -4.0 kb HO-1 promoter construct was minimally responsive to 100 nmol/L CDDO-lm. A similar pattern of promoter activation was observed in cells treated with 30 and 300 nmol/L CDDO (data not shown). These data suggest that a region between -4.0 and -4.5 kb of the human HO-1 promoter contains the regulatory element(s) responsible for triterpenoid-mediated induction of HO-1.

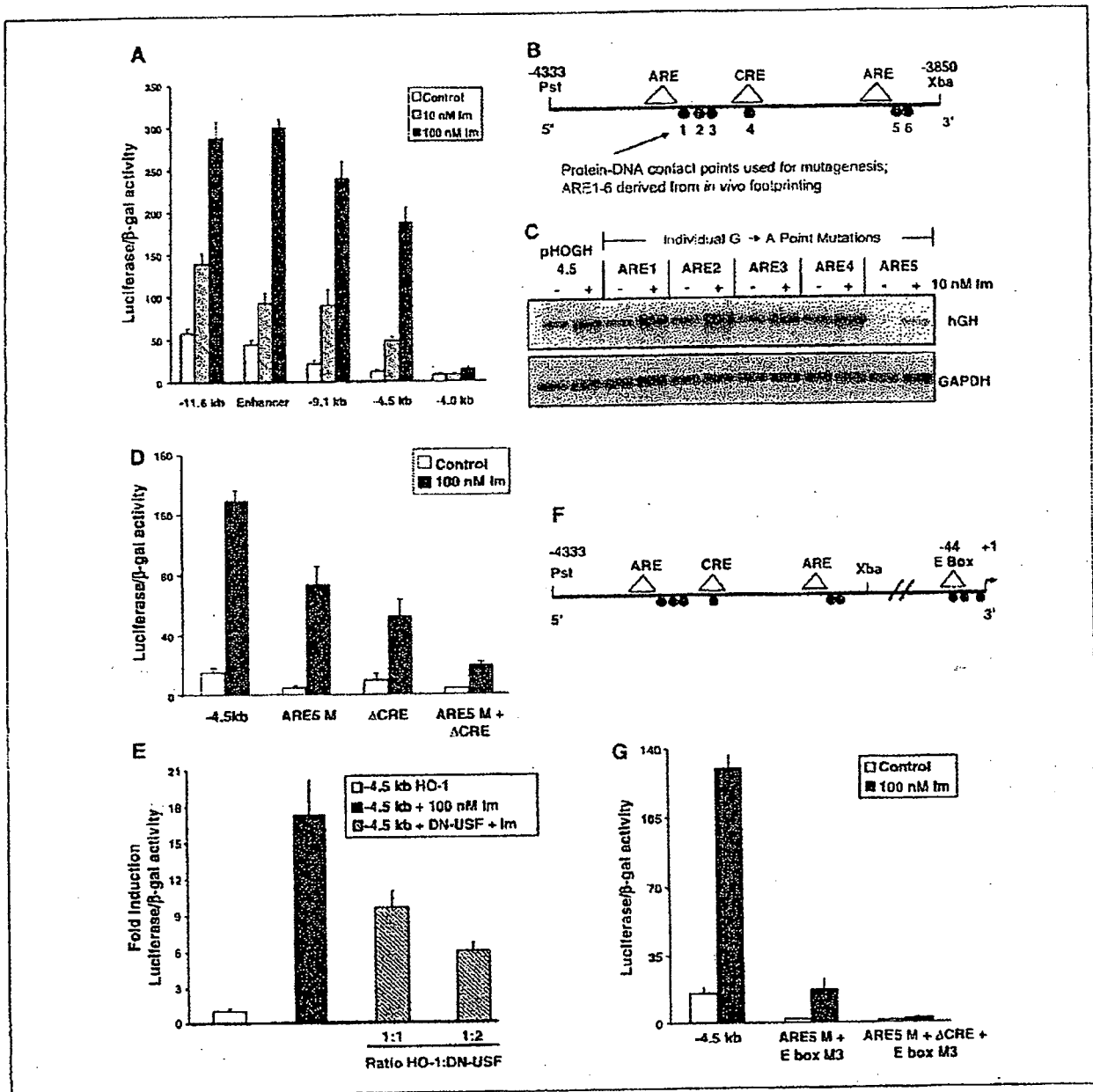


Figure 3. Activation of the human HO-1 promoter by CDDO-Im requires functional CRE, ARE, and E Box sites. **A**, CV-1 cells were transiently transfected with equimolar concentrations of various human HO-1 promoter reporter plasmids and 40 ng pCMX- β -gal for a total of 350 ng plasmid per well. Twenty-four hours later, cells were treated with control media or media containing 10 to 100 nM CDDO-Im. After an additional 24 hours, cells were lysed and luciferase activity was normalized to β -gal activity for each well. Columns, means from four replicate wells; bars, SD. **B**, known regulatory regions in the proximal HO-1 promoter include two AREs and a CRE. Six protected guanine residues also have been identified (ARE1-6), and their locations are indicated. **C**, HK-2 cells were transfected with pHOGH/4.5 or with plasmids containing point mutations (G to A) within the AREs. Cells were treated with 0 to 10 nM CDDO-Im, and total RNA was extracted and hybridized with 32 P-labeled growth hormone (GH), HO-1 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) probes. **D**, luciferase reporter constructs with a deletion of the CRE site (Δ CRE) or a point mutation within the ARE5 sequence (ARE5 M) were transfected into CV-1 cells. **E**, CV-1 cells were cotransfected with pHOGL3/4.5 (40 ng per well), increasing concentrations of a DN-USF expression vector (40–80 ng per well), and pCMX- β -gal (40 ng per well) and treated and harvested as described above. **F**, point mutations in the E box and proximal ARE5 and deletion of the CRE site were introduced into the pHOGL3/4.5 reporter plasmid. **G**, CV-1 cells were transfected with reporter constructs (200 ng per well) containing mutations in the E box and ARE 5 (E Box M3 + ARE5 M) and with the additional CRE deletion (ARE5 M + Δ CRE + E Box M3).

Cyclic AMP response element and antioxidant response element 5 contribute to activation of the human heme oxygenase-1 promoter by CDDO-imidazole. The promoter region required for HO-1 induction, which is flanked by *Pst*I and

*Xba*I restriction enzyme sites (31), contains two putative AREs and a putative binding site for the CREB, as illustrated in Fig. 3B. Using dimethylsulfate *in vivo* footprinting, six protected guanine residues were identified within the -4.0 to -4.5 kb region of the

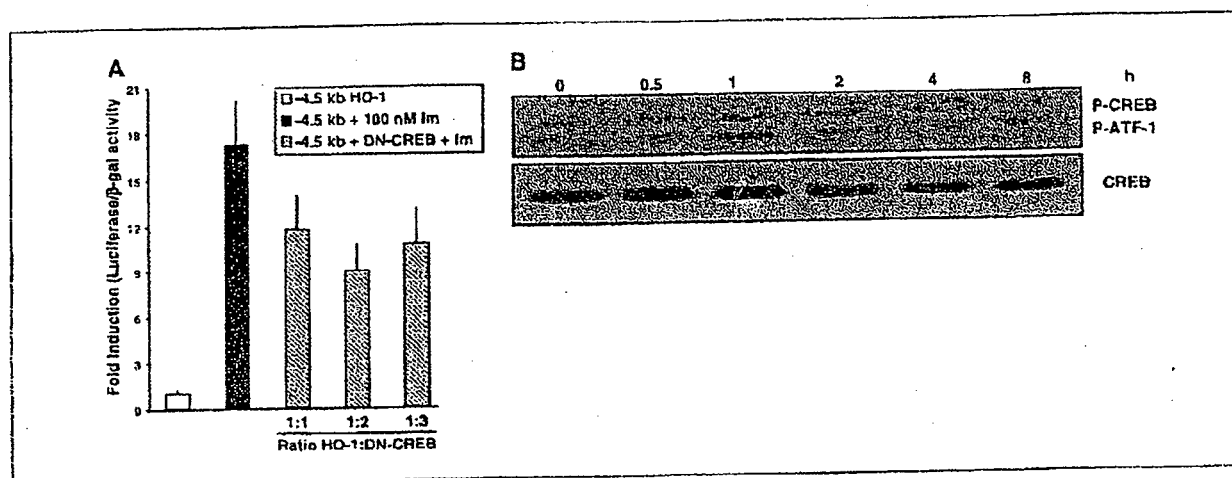


Figure 4. CDDO-Im activates the CRE and increases phosphorylation of CREB. **A**, CV-1 cells were cotransfected with pHOGL3/4.5 (40 ng per well), increasing concentrations of a DN-CREB expression vector (40-120 ng per well), and pCMX- β -gal (40 ng per well). Cells were treated and harvested as described in Fig. 3A. **B**, U937 cells were incubated with 100 nM CDDO-Im for 0 to 8 hours. Cell lysates were analyzed by Western blotting, using a phospho-CREB antibody (P-CREB) and stripped and reprobed with a CREB antibody. The polyclonal phospho-CREB antibody also binds to phospho-ATF-1.

human HO-1 promoter in human renal proximal tubular cells.⁴ These footprints are called ARE1-6, and their relative locations in the human HO-1 promoter are shown in Fig. 3B. ARE1-3 are located within 8 bp of each other, ARE4 resides within a previously reported CRE site (30), and ARE5 and ARE6 are located immediately downstream of the proximal ARE sequence. Reporter constructs containing point mutations within these AREs were generated, in which the protected G residue was changed to an A. In HK-2 cells transiently transfected with the mutated 4.5-kb HO-1 promoter constructs (pHOGH/4.5), the point mutation in ARE5 markedly reduced expression of the hGH transcript in the cells treated with CDDO-Im (Fig. 3C). No significant changes were detected in the expression of hGH mRNA with the mutations in the other AREs (Fig. 3C) including ARE6 (data not shown).

To confirm the findings observed in HK-2 cells, site-directed mutagenesis in the -4.5 kb HO-1 promoter-reporter construct was used to delete the CRE or to introduce a point mutation (G to A) in the ARE5 sequence. When transiently transfected into CV-1 cells, the single nucleotide mutation in the ARE5 site (ARE5 M) reduced luciferase activity by 44% in cells treated with CDDO-Im (Fig. 3D). Although a point mutation within the CRE (ARE4) did not alter induction of the hGH reporter plasmid shown in Fig. 3D, deletion of the entire CRE site (Δ CRE) reduced reporter activity by 60%. Interestingly, the double mutation construct, including the ARE5 point mutation and the CRE deletion, decreased HO-1 promoter activity by 85% but did not completely abolish reporter activity (Fig. 3D).

Inactivation of the cyclic AMP response element, antioxidant response element 5, and E box sequences totally abolishes induction of the heme oxygenase-1 promoter by CDDO-imidazole. Most of the induction of the HO-1 promoter by the triterpenoids was eliminated with the -4.0-kb reporter construct (Fig. 3A) or with mutations in the CRE and ARE5 sites (Fig. 3D). However, treatment with CDDO-Im induced a small but reproducible increase in luciferase activity with these constructs, which suggested the presence of an additional regulatory site

within the HO-1 promoter. Recently, Hock et al. reported that upstream stimulatory factors (USF), members of the basic helix-loop-helix family of transcription factors, bind to an E Box in the proximal human HO-1 promoter and regulate HO-1 induction (47). When a DN-USF construct was transfected into CV-1 cells treated with CDDO-Im, activation of the -4.5-kb HO-1 promoter-luciferase construct was reduced by 44% to 65% (Fig. 3E). The importance of the E box site was further verified by a point mutation (G to A) at -44 bp from the transcriptional start site of HO-1 (Fig. 3F). Luciferase activity declined by 86% in CV-1 cells transfected with a reporter plasmid containing a double mutation in the E box (E box M3) and the ARE5 site (ARE5 M) of the HO-1 promoter (Fig. 3G), results similar to those with the double mutation of the CRE and ARE5 sites (Fig. 3D). To examine if the E Box was responsible for mediating the induction of the HO-1 promoter observed in the constructs containing the ARE5 and CRE point mutations, cells were transfected with a reporter construct containing a triple mutation (CRE site deletion, ARE5 M, and E box M3 mutation). Luciferase activity decreased by 98%, demonstrating that full induction of the human HO-1 promoter by CDDO-Im requires functional CRE, ARE5, and E Box sites (Fig. 3G).

CDDO-imidazole increases phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein. Although maximum induction of the HO-1 promoter by the triterpenoids requires three unique sites, deletion of the entire CRE site or the point mutation in the ARE5 reduced reporter activity by 44% and 60%, respectively (Fig. 3D); thus, additional experiments focused on these sites. Cotransfection of a DN-CREB construct with the -4.5-kb HO-1 promoter construct decreased luciferase activity by 47% in CV-1 cells treated with CDDO-Im (Fig. 4A). Moreover, 100 nmol/L CDDO-Im increased the phosphorylation of CREB after 1 to 2 hours of treatment in U937 cells (Fig. 4B). At 4 hours after treatment, CREB phosphorylation had declined and by 8 hours, the levels of phosphorylated CREB were the same as the untreated cells. The polyclonal antibody used in these experiments also recognizes the CREB family member activating transcription factor-1 (ATF-1), and CDDO-Im increased ATF-1 phosphorylation in a time-dependent manner.

⁴ Hock and Agarwal, in preparation.

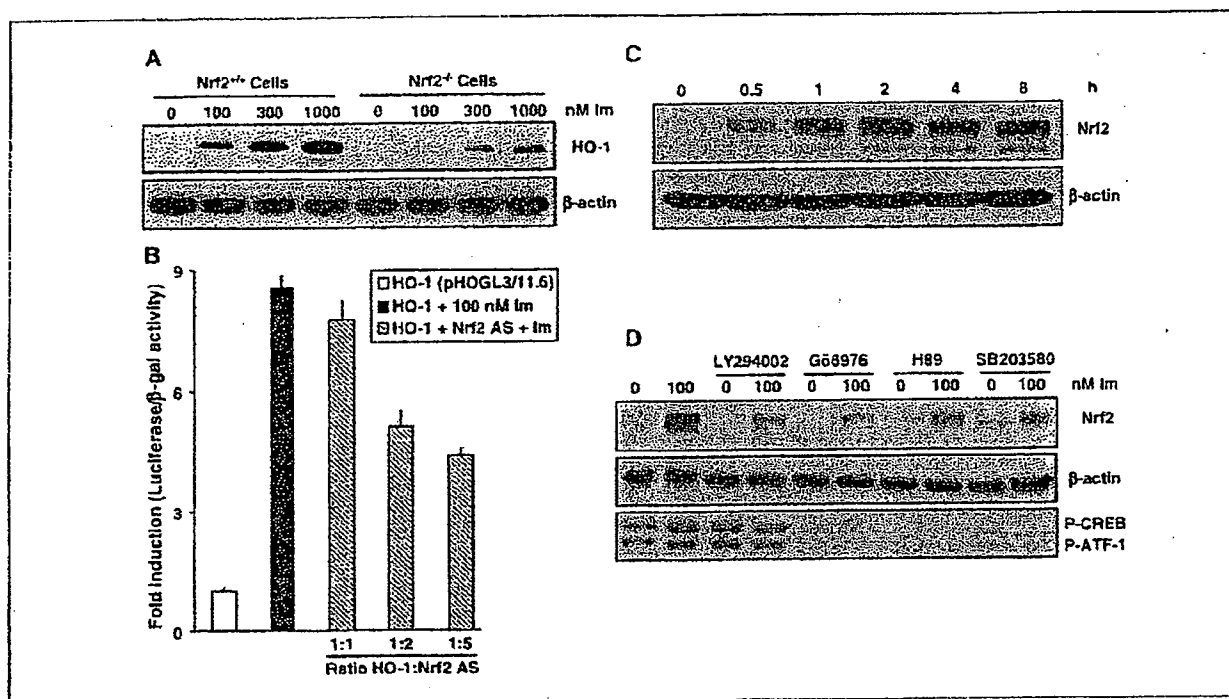


Figure 5. HO-1 induction is reduced in Nrf2 knockout cells and CDDO-lm increases Nrf2 protein levels. **A**, Nrf2^{+/+} or Nrf2^{-/-} fibroblasts were incubated with 0 to 1,000 nmol/L CDDO-lm for 6 hours. Cell lysates were analyzed for HO-1 by Western blotting. **B**, CV-1 cells were cotransfected with 50 ng of the full-length HO-1 promoter construct (pHOGL3/11.6) and increasing concentrations of an Nrf2 antisense (AS) expression vector (50–250 ng per well). Twenty-four hours later, cells were treated with control media or media containing 100 nmol/L CDDO-lm and analyzed for luciferase activity. **C**, U937 cells were treated with 100 nmol/L CDDO-lm for 0 to 8 hours, and Nrf2 protein levels were determined by Western blot analysis. **D**, U937 cells were incubated with kinase inhibitors for 45 minutes and treated with 0 to 100 nmol/L CDDO-lm for an additional 90 minutes. Total proteins were analyzed by Western blotting for Nrf2, phospho-CREB, and β-actin.

Role of Nrf2 in the induction of heme oxygenase-1 by the triterpenoids. Previous studies with the mouse HO-1 promoter have shown that the Nrf2 transcription factor binds to an ARE and activates transcription of HO-1 in response to various stimuli (31).

High concentrations of CDDO-lm (300 and 1,000 nmol/L) caused partial induction of HO-1 in Nrf2 knockout (Nrf2^{-/-}) mouse embryonic fibroblasts, but this was markedly lower than the induction of HO-1 by 100 to 300 nmol/L CDDO-lm in the wild-type

Table 1. CDDO-lm increases expression of genes regulated by Nrf2

Accession no.	Gene	Fold increase			
		CDDO		CDDO-lm	
		4 h	12 h	4 h	12 h
Z82244	Heme oxygenase (decycling) 1	19.70	17.15	90.51	111.43
AA083483	Ferritin, heavy polypeptide 1	2.64	6.06	2.64	6.96
J03934	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	2.00	4.59	1.87	4.59
L35546	gamma-glutamylcysteine synthetase, regulatory	2.83	4.00	2.30	4.29
BC003567	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	1.41	2.64	1.87	4.00
J02888	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	1.15	1.41	1.52	4.00
D88687	thioredoxin reductase 1	2.46	3.48	2.30	3.48
AF061016	UDP-glucose dehydrogenase	1.23	1.62	1.41	2.30
NM_000637	glutathione reductase	1.41	2.30	1.52	2.14
L13278	crystallin, zeta (quinone reductase)	1.00	1.15	1.32	2.14
M90656	gamma-glutamylcysteine synthetase, catalytic	1.32	1.32	1.52	2.00
BC015523	glutathione S-transferase A4	1.15	1.23	1.62	2.00

NOTE: See Materials and Methods for experimental details. A complete description of the microarray results will be described elsewhere.

(Nrf2^{-/-}) cells (Fig. 5A). Furthermore, activation of the HO-1 promoter was reduced by 49% in CV-1 cells cotransfected with increasing concentrations of an Nrf2 antisense construct and the full-length human HO-1 promoter (Fig. 5B), whereas an Nrf2 sense construct did not reduce HO-1 luciferase activity (data not shown). In U937 cells treated with 100 nmol/L CDDO-Im, total Nrf2 protein levels were elevated within 30 minutes and remained elevated for 8 hours (Fig. 5C). Notably, the same protein kinase inhibitors (LY294002, G66976, H89, and SB203580) that partially blocked the induction of HO-1 (Fig. 2) also significantly reduced the increased Nrf2 levels observed when U937 cells were treated with CDDO-Im (Fig. 5D). These kinase inhibitors also significantly inhibited CREB and ATF-1 phosphorylation induced by CDDO-Im, although the PI3K inhibitor LY294002 alone increased CREB and ATF-1 phosphorylation.

Although the contribution of Nrf2 to the activation of the human *HO-1* gene requires further study, microarray studies show that the triterpenoids significantly increase expression of a number of other genes regulated by the Nrf2/ARE pathway (Table 1). In our studies, THP-1 human leukemia cells were treated with 300 nmol/L CDDO, 100 nmol/L CDDO-Im, or vehicle alone for 4 and 12 hours, and total RNA from these cells was hybridized to Affymetrix HG-U133A chips. The expression of a number of genes that mediate antioxidative and cytoprotective activities including HO-1, ferritin, thioredoxin reductase, and glutathione reductase (GSR) was significantly increased by both triterpenoids in a time-dependent manner (Table 1). Notably, HO-1 mRNA levels increased 19 fold above control levels in cells treated with CDDO and 90-fold in cells treated with CDDO-Im for 4 hours, which correlates with the dramatic increases in HO-1 mRNA and protein levels shown in Fig. 1. Detoxification genes such as NAD(P)H quinone oxidoreductase (*NQO1*) and the two subunits of glutamylcysteine synthetase were highly induced by the triterpenoids. All of the genes listed in Table 1 have been shown to be regulated by the Nrf2/ARE pathway (48–50). Moreover, a number of the cytoprotective genes activated by Nrf2 also are regulated by the PI3K pathway. In IMR-32 human neuroblastoma cells treated with *tert*-butylhydroquinone, the PI3K inhibitor LY294002 blocked the induction of *NQO1*, HO-1, GSR, and glutathione transferase mRNA (51).

CDDO-imidazole attenuates oxidative stress through the Nrf2 pathway. A number of the cytoprotective genes regulated by Nrf2, including HO-1, have antioxidative activities (38, 48). To study the effects of CDDO-Im on oxidative stress, U937 cells were incubated with varying concentrations of CDDO-Im for 18 hours. Cells were then loaded with 2,7-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) for 30 minutes and finally challenged with tBHP for 15 minutes. The H_2DCFDA probe passively diffuses into cells, where it is deacetylated and oxidized to the fluorescent compound 2,7-dichlorofluorescein (52), which can be analyzed by flow cytometry. As shown in Fig. 6A, CDDO-Im reduced the oxidation of H_2DCFDA induced by tBHP in a dose-dependent manner, with a maximum inhibition of 53% with 100 nmol/L CDDO-Im. Increases in the concentration of CDDO-Im above 100 nmol/L did not provide additional protection against oxidative stress and indeed, as shown in Fig. 6B, at concentrations between 300 and 500 nmol/L, CDDO-Im markedly increased the formation of ROS. Notably, no reduction in ROS was observed when cells were treated with 10 to 100 nmol/L CDDO-Im for <6 hours before the addition of the tBHP (data not shown). However, incubation of U937 cells with 10 to

100 nmol/L CDDO-Im for times ranging from 12 to 48 hours reduced the oxidation of H_2DCFDA by ~50% (data not shown). When U937 cells were incubated with CDDO-Im and the HO-1 enzyme inhibitor zinc protoporphyrin IX (Fig. 1D), ROS levels did not change (Fig. 6C), suggesting that induction of HO-1 alone does not protect against oxidative stress. Indeed, the reduction in ROS formation following treatment with low concentrations of CDDO-Im requires the Nrf2 pathway, because no alterations in ROS levels were observed in Nrf2 knockout cells treated with CDDO-Im (Fig. 6D). In contrast, treatment with CDDO-Im (0.1–100 nmol/L) reduced the formation of ROS in the Nrf2 wild-type cells by 62%. Taken together, these experiments suggest that the antioxidative activity of CDDO-Im requires activation of the Nrf2/ARE system and not just the induction of HO-1.

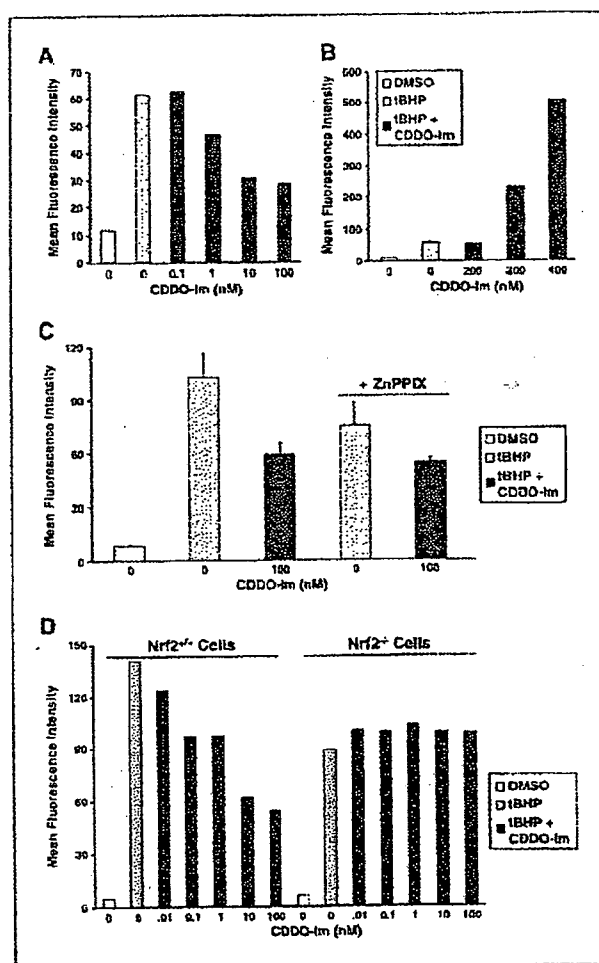


Figure 6. Low concentrations of CDDO-Im reduce the formation of ROS but high concentrations enhance ROS formation. The reduction in oxidative stress by CDDO-Im requires Nrf2. U937 cells (A–C) or Nrf2 wild-type and knockout cells (D) were treated with CDDO-Im for 18 hours. H_2DCFDA was added for 30 minutes, and the cells were challenged with 250 μ M tBHP for 15 minutes to induce ROS. Mean fluorescence intensity of 10,000 cells was detected by flow cytometry for each bar in all four figures. C, U937 cells were preincubated with zinc protoporphyrin IX (ZnPPiX) for 15 minutes before CDDO-Im was added. Representative experiment from three independent experiments (A, B, and D). Columns, means from three replicate wells; bars, SD (C).

Discussion

We have previously shown that the synthetic triterpenoids CDDO and CDDO-Im significantly inhibit the growth of cancer cells and block the expression of proinflammatory molecules such as iNOS and COX-2 (7-9). The results of the present study show that nanomolar concentrations of CDDO and CDDO-Im are potent inducers of HO-1 and the Nrf2/ARE system. Thus, synthetic triterpenoids should be added to the growing number of compounds that induce these cytoprotective molecules; other potentially promising chemopreventive agents on this list include sulforaphane (53), curcumin (32, 54), avicins (55), carnosol (26), resveratrol (56), retinoic acid (57), and aspirin (58). In contrast to these other inducers which are only active at micromolar concentrations, 10 nmol/L CDDO-Im or 30 nmol/L CDDO activates HO-1 *in vitro* and a 2 μ mol dose of CDDO-Im induces HO-1 *in vivo*. Regardless of the stimulus, the induction of HO-1 is usually considered a beneficial and adaptive response that offers protection against oxidative damage and inflammation (22).

Although the metabolic products of the HO-1 reaction are cytoprotective at low levels, excessive HO-1 activity is cytotoxic because of the accumulation of reactive iron (59). We have shown here that the effects of CDDO-Im on oxidative stress are dose dependent; concentrations of CDDO-Im between 0.1 and 100 nmol/L reduced ROS levels (Fig. 6A) whereas higher concentrations (300-400 nmol/L) increased ROS (Fig. 6B). Notably, high concentrations of CDDO-Im (2 μ mol/L) induce apoptosis by increasing ROS levels and disrupting the redox status in cells (60). In our experiments, the antioxidative activity of CDDO-Im required activation of the Nrf2/ARE system, not just HO-1 induction, as no inhibition in the formation of ROS was observed in Nrf2-deficient cells and the HO-1 inhibitor zinc protoporphyrin IX did not alter ROS levels. Although HO-1 induction might also affect cell proliferation (59), no differences in growth inhibition were observed in the Nrf2 wild-type or knockout fibroblasts treated with CDDO or CDDO-Im,⁵ suggesting that the potent growth inhibitory properties of these triterpenoids are not mediated by

the Nrf2/ARE pathway. Instead, CDDO inhibits proliferation of breast cancer cells by regulating expression of cyclin D1, p21, and Bcl-2 (16). Future experiments will examine the molecular mechanisms for the disparate, dose-dependent effects of the triterpenoids on the generation of ROS and the role of HO-1 and the Nrf2/ARE pathway in apoptosis.

Because of the pathogenetic importance of oxidative stress and inflammation in carcinogenesis and other disease processes, the induction of the HO-1 and Nrf2/ARE pathways is being explored as a potential therapeutic strategy (21-23, 37, 38, 48). Our present results indicate that CDDO and CDDO-Im are potent inducers of these cytoprotective molecules, with clinical implications for prevention of diseases as diverse as cancer, diabetes, asthma, acute renal failure, atherosclerosis, and Alzheimer's (21). In a recent study, we have shown that the anti-inflammatory and antioxidative actions, not only of CDDO but also of an entire set of synthetic triterpenoids, are closely correlated and that the Nrf2/ARE system seems to provide a common mechanism for these activities of the triterpenoids (61). Beyond these cytoprotective actions, which are associated with relatively low doses of the triterpenoids, there are known proapoptotic activities of these agents, which seem to require higher concentrations of triterpenoids that enhance formation of ROS (60, 62). Thus, an immediate problem is to understand this bifunctionality of the triterpenoids and to define the specific mechanisms that control either their antioxidative or pro-oxidative functions, to allow optimal application for either prevention or treatment of disease.

Acknowledgments

Received 12/22/2004; revised 3/2/2005; accepted 3/24/2005.

Grant supports National Foundation for Cancer Research and NIH grants R01 CA78214 (M.B. Sporn), K23 CA99990-03 (N. Suh), R01 DK59600, and R01 HL068157 (A. Agarwal); Oscar M. Cohn professorship (M.B. Sporn); and the members of the Dartmouth College Class of 1934 and Reata Discovery, Inc.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Gadisetti V.R. Chandramouli (NIH) for assistance with the microarray analysis, Jeff Chan for the Nrf2^{-/-} and Nrf2^{+/+} fibroblasts, Charles Vinson for the A-USF and A-CREB expression vectors, Kohsaku Katsuka for the Nrf2 antisense construct, and Kathy Martin and Kenneth Walsh for the dominant-negative AKT constructs.

⁵ Unpublished data.

References

- Huang MT, Ho CT, Wang ZY, et al. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res* 1994;54:701-8.
- Nishino H, Nishino A, Takayasu J, et al. Inhibition of the tumor-promoting action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate by some oleanane-type triterpenoid compounds. *Cancer Res* 1988;48:5210-5.
- Hirota M, Mori T, Yoshida M, Ichiya R. Suppression of tumor promoter-induced inflammation of mouse ear by ursolic acid and 4,4-dimethylcholestan-3-one derivatives. *Agric Biol Chem* 1993;57:1073-5.
- Singh GB, Singh S, Bani S, Gupta BD, Banerjee SK. Antiinflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 1992;44:456-8.
- Honda T, Rounds BV, Grisham GW, Suh N, Wang Y, Sporn MB. Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-ol, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8:2711-4.
- Honda T, Grisham GW, Suh N, et al. Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *J Med Chem* 2000;43:1666-77.
- Honda T, Rounds BV, Bore L, et al. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *J Med Chem* 2000;43:4233-46.
- Honda T, Honda Y, Ravaleo FG Jr, et al. A novel dicyanotriterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-ol, active at picomolar concentrations for inhibition of nitric oxide production. *Bioorg Med Chem Lett* 2002;12:1027-30.
- Suh N, Wang Y, Honda T, et al. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-ol, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Res* 1998;58:336-41.
- Ho Y, Pandey P, Place A, et al. The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-ol induces apoptosis of human myeloid leukemia cells by a caspase-8-dependent mechanism. *Cell Growth Differ* 2000;11:261-7.
- Suh WS, Kim YS, Schimmer AD, et al. Synthetic triterpenoids activate a pathway for apoptosis in AML cells involving downregulation of FLIP and sensitization to TRAIL. *Leukemia* 2003;17:1122-9.
- Chauhan D, Li G, Podar K, et al. The bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 and triterpenoid CDDO-Im induce synergistic anti-multiple myeloma (MM) activity and overcome bortezomib resistance. *Blood* 2004;103:3158-66.
- Place AE, Suh N, Williams CR, et al. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazole, inhibits inflammatory response and tumor growth *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2003;9:2798-806.
- Wang Y, Porter WW, Suh N, et al. A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-ol, is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Mol Endocrinol* 2000;14:1660-6.
- Lapillonne B, Konopleva M, Tsao T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,

- 12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:5925-32.
16. Cruss I, Maines MD. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J Biol Chem* 1988;263:3349-53.
17. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986;261:411-9.
18. McCoubrey WK Jr, Hsing TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997;247:725-32.
19. Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, et al. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004;335:241-50.
20. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 2002;234:5249-63.
21. Morse D, Choi AM. Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:8-16.
22. Takahashi T, Morita K, Akagi R, Sassa S. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. *Curr Med Chem* 2004;11:1545-61.
23. Akaras MJ, Fernandez P, Guillen MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des* 2003;9:2541-51.
24. Gong P, Stewart D, Hu B, et al. Activation of the mouse heme oxygenase-1 gene by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 is mediated by the stress response elements and transcription factor Nr1. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:249-57.
25. Alam J, Cai J, Smith A. Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J Biol Chem* 1994;269:1001-9.
26. Martin D, Rojo AI, Salinas M, et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nr2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical curcumin. *J Biol Chem* 2004;279:8919-29.
27. Hill-Kapturczak N, Voakes C, Garcia J, Visner G, Nick HS, Agarwal A. A cis-acting region regulates oxidized lipid-mediated induction of the human heme oxygenase-1 gene in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1416-22.
28. Hill-Kapturczak N, Sikorski E, Voakes C, Garcia J, Nick HS, Agarwal A. An internal enhancer regulates heme and cadmium-mediated induction of human heme oxygenase-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F515-23.
29. Alvarez-Maqueda M, El Bekay R, Alba G, et al. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes. *J Biol Chem* 2004;279:1929-37.
30. Kronke G, Bochkov VN, Huber J, et al. Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 2003;278:51006-14.
31. Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F425-41.
32. Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nr2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 2003;371:887-95.
33. Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK. Functional characterization and role of Nr2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Oncogene* 2001;20:3906-17.
34. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nr2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999;13:76-86.
35. Alam J, Stewart D, Tousehard C, Boinsapally S, Choi AM, Cook JL. Nr2, a Cap'nCollar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 1999;274:26071-8.
36. Alam J, Cook JL. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr Pharm Des* 2003;9:2499-511.
37. Zhang Y, Gordon GB. A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nr2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 2004;3:885-93.
38. Motohashi H, Yamamoto M. Nr2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 2004;10:549-57.
39. Luong L, Kwong M, Hoo S, Lee C, Chan JY. Deficiency of the Nr1 and Nr2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress. *J Biol Chem* 2003;278:48021-9.
40. Suh N, Honda T, Finley HJ, et al. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res* 1998;58:717-23.
41. Balla G, Jacob HS, Balla J, et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant stratagem of endothelium. *J Biol Chem* 1992;267:18148-53.
42. Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int* 1995;48:1298-307.
43. Shiojima I, Yufemashvili M, Luo Z, et al. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem* 2002;277:37670-7.
44. Kataoka K, Honda H, Nishizawa M. Induction of cellular antioxidant stress genes through heterodimeric transcription factor Nr2/small Maf by anti-rheumatic gold(I) compounds. *J Biol Chem* 2001;276:34074-81.
45. Ahn S, Olive M, Agarwal S, Krylov D, Gosty DD, Vinson C. A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of *c-fos*. *Mol Cell Biol* 1998;18:967-77.
46. Qiang Y, Luo X, Lu T, et al. Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1999;19:1508-17.
47. Hock TD, Nick HS, Agarwal A. Upstream stimulatory factors, USF1 and USF2, bind to the human heme oxygenase-1 proximal promoter *in vivo* and regulate its transcription. *Biochem J* 2004;383:209-18.
48. Chen XL, Kunsch C. Induction of cytoprotective genes through Nr2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 2004;10:879-91.
49. Thimmappa RK, Mai KB, Erisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nr2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2002;62:5196-203.
50. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolthiones through the Keap1-Nr2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 2003;278:8135-45.
51. Li J, Lee JM, Johnson JA. Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells. *J Biol Chem* 2002;277:588-94.
52. LeBel CB, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992;5:277-31.
53. Prestera T, Tulaley P, Alam J, Ahn YL, Lee FJ, Choi AMK. Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase-2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). *Mol Med* 1995;1:227-37.
54. Hill-Kapturczak N, Thamilselvan V, Liu F, Nick HS, Agarwal A. Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by curcumin in human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F851-9.
55. Haridas V, Hananusek M, Nishimura G, et al. Triterpenoid electrophiles (avicularins) activate the innate stress response by redox regulation of a gene battery. *J Clin Invest* 2004;113:66-73.
56. Zhuang H, Kim YS, Koehler RC, Dore S. Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann N Y Acad Sci* 2003;993:276-86.
57. Ma Y, Kozar-Taylor PH, Dikatis DA, et al. Microarray analysis uncovers retinoid targets in human bronchial epithelial cells. *Oncogene* 2003;22:4924-32.
58. Grosser N, Abate A, Obarile S, et al. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:955-60.
59. Suttner DM, Denney RA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J* 1999;13:1800-9.
60. Ikeda T, Sporn MB, Honda T, Oelble GW, Kniz D. The novel triterpenoid CDDO and its derivatives induce apoptosis by disruption of intracellular redox balance. *Cancer Res* 2003;63:5651-8.
61. Dinkova-Kostova AT, Liby KT, Stephenson KK, et al. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:4584-9.
62. Ikeda T, Nakata Y, Kimura R, et al. Induction of redox imbalance and apoptosis in multiple myeloma cells by the novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid. *Mol Cancer Ther* 2004;3:39-45.

NRF2 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling: Influence on Adipogenesis[†]

Soona Shin,¹ Nobunao Wakabayashi,² Vikas Misra,² Shyam Biswal,² Gum Hwa Lee,²
 Elin S. Agoston,¹ Masayuki Yamamoto,³ and Thomas W. Kensler^{1,2*}

Department of Pharmacology and Molecular Sciences, School of Medicine,¹ and Department of Environmental Health Sciences,
 Bloomberg School of Public Health,² The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21205, and Institute of
 Basic Medical Sciences and Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of
 Tsukuba, Tennoudai, Tsukuba 305-8577, Japan³

Received 23 May 2007/Returned for modification 29 June 2007/Accepted 8 August 2007

The NF-E2 p45-related factor 2 (NRF2) and the aryl hydrocarbon receptor (AHR) are transcription factors controlling pathways modulating xenobiotic metabolism. AHR has recently been shown to affect *Nrf2* expression. Conversely, this study demonstrates that NRF2 regulates expression of *Ahr* and subsequently modulates several downstream events of the AHR signaling cascade, including (i) transcriptional control of the xenobiotic metabolism genes *Cyp1a1* and *Cyp1b1* and (ii) inhibition of adipogenesis in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Constitutive expression of AHR was affected by *Nrf2* genotype. Moreover, a pharmacological activator of NRF2 signaling, CDDO-IM {1-[2-cyano-3,12-dioxoooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole}, induced *Ahr*, *Cyp1a1*, and *Cyp1b1* transcription in *Nrf2*^{+/+} MEFs but not in *Nrf2*^{-/-} MEFs. Reporter analysis and chromatin immunoprecipitation assay revealed that NRF2 directly binds to one antioxidant response element (ARE) found in the -230-bp region of the promoter of *Ahr*. Since AHR negatively controls adipocyte differentiation, we postulated that NRF2 would inhibit adipogenesis through the interaction with the AHR pathway. *Nrf2*^{-/-} MEFs showed markedly accelerated adipogenesis upon stimulation, while *Keap1*^{-/-} MEFs (which exhibit higher NRF2 signaling) differentiated slowly compared to their congenic wild-type MEFs. Ectopic expression of *Ahr* and dominant-positive *Nrf2* in *Nrf2*^{-/-} MEFs also substantially delayed differentiation. Thus, NRF2 directly modulates AHR signaling, highlighting bidirectional interactions of these pathways.

NRF2 is a cap'n'collar (CNC) basic leucine zipper (bZIP) transcription factor and an important regulator of the transcription of cytoprotective enzymes and antioxidant genes, such as glutathione S-transferases (GSTs) and NAD(P)H (quinone acceptor) oxidoreductase 1 (NQO1), through binding to antioxidant response elements (AREs) found in their promoters (20, 28). The NRF2 pathway can be modulated in a dynamic way by multiple pharmacological agents {NRF2 activators, including 1-[2-cyano-3,12-dioxoooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole (CDDO-Im)} through interactions with KEAP1, a cytoplasmic binding partner of NRF2 (12, 50, 51). Studies using *Nrf2* and *Keap1* knockout mice have provided key insights into the importance of this pathway in protecting cells from exposure to environmental toxins, inflammatory stresses, neurodegeneration, and carcinogenesis (18). Although more resistant to toxins (32), *Keap1* null mice, which have higher constitutive levels of NRF2, showed hyperkeratosis, which implies that the pathway may also be involved in keratinocyte differentiation (46).

Information generated from analyses of genetic networks and large-scale two-hybrid screens has indicated that to understand the complexity of a phenotype or disease, one needs to

investigate the interplay of signals and transcription factors that leads to the expression of downstream genes (3, 24). Although much is known about the role of the NRF2 pathway itself, little is known about its interaction with other signaling pathways. Recent evidence suggests that cross talk may exist between aryl hydrocarbon receptor (AHR) and NRF2 pathways. AHR is a ligand-activated transcription factor that belongs to the basic helix-loop-helix/PER-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-SIM family. When activated by a ligand, AHR translocates to the nucleus and dimerizes with ARNT, another basic helix-loop-helix protein. AHR is activated when bound with ligand, usually a planar polyaromatic chemical. Activated AHR then binds to xenobiotic response elements (XREs) in the promoters of various cytochrome P450s (CYPs) (1, 15), resulting in increased expression of these enzymes. Because several AHR ligands are suspected carcinogens, such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and benzo[a]pyrene, the majority of studies on AHR have focused on its role in mediating the toxicity of these chemicals. However, studies utilizing *Ahr* knockout mice and cell lines revealed that AHR signaling may be involved also in physiological processes, such as growth and differentiation, in a manner that is independent of exogenous ligand (2, 34). Moreover, it has been reported that the AHR pathway is involved in maintaining a balance between promoting and preventing oxidative stress as well as in preventing toxic redox cycles of catechol estrogens (21, 29). AHR also regulates gene expression involved in cytoskeletal organization, bioenergetics, and cell proliferation (9). Several studies suggest that one of the physiological roles of the AHR is the negative regulation of

* Corresponding author. Mailing address: Department of Environmental Health Sciences, Bloomberg School of Public Health, Room E7541, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21205. Phone: (410) 955-4712. Fax: (410) 955-0116. E-mail: tkensler@jhsphe.edu.

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 20 August 2007.

adipocyte differentiation. Shimba et al. (41) have demonstrated that TCDD treatment suppresses the conversion of 3T3-L1 cells into adipocytes. Using MEF cell lines derived from *Ahr* knockout mice, Alexander et al. (2) reported that the AHR is a constitutive inhibitor of triglyceride synthesis and an early regulator of adipocyte differentiation. In addition, one of the phenotypes of *Ahr* null mice is transient fatty liver (39), implying an in vivo regulatory role of AHR in the adipogenic process.

Studies on cross talk between AHR and NRF2 have focused on their roles in controlling expression of xenobiotic-metabolizing enzymes. For example, it has been reported that the inducible expression of NQO1 by TCDD depends on both AHR and NRF2 (25). Miao et al. (27) demonstrated that *Nrf2* gene transcription is directly modulated by AHR activation. The present study demonstrates that signaling in the opposite direction also occurs, namely, that transcription of the *Ahr* gene is directly affected by NRF2. Our data clearly demonstrate that expression of *Ahr*, *Cyp1a1*, and *Cyp1b1* is partially dependent on NRF2, implying that NRF2 modulates both transcription of *Ahr* and its downstream targets. In addition, our results indicate that the NRF2 pathway inhibits adipogenesis via activation of the AHR signaling cascade. Thus, the NRF2 pathway has a broader reach than heretofore described, i.e., indirect regulation of the expression of CYPs, inhibition of adipogenesis, and possibly other AHR-dependent processes.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. Immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were established from the embryos of C57BL/6J *Nrf2*^{-/-} or *Nrf2*^{+/+} littermates. Primary MEFs were established from the embryos of *Keap1*^{-/-} or *Keap1*^{+/+} littermates. The cells were cultured in Iscove's minimal essential medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Plasmids. The mouse *Ahr* gene regulatory region was isolated from C57BL/6J mouse liver genomic DNA by PCR. The region was directly cloned between KpnI and NcoI sites in pGL3-Basic (Promega) and confirmed by sequencing analysis. In this construct, ATG of AHR was fused to that of luciferase. Serial promoter deletion fragments were prepared by the S1 exonuclease III nuclease reaction method followed by NcoI digestion. Then, the fragments were ligated to the site between KpnI and NcoI sites of pGL3 basic. The mutant ARE reporter was produced by ligating oligonucleotide containing the mutated ARE (GGTACCACTACGTCCTCCGTCACACCGTGCTGCGAAGAGGGTGGGGCC) to the site between KpnI and Apal of p-967 construct. All constructs were confirmed by sequencing. Because pRLTK (Promega) bears an ARE in the thymidine kinase (TK) promoter region, this ARE was deleted in order to use this vector for normalizing transfection efficiency. This improved normalizing vector, pRLTK-ΔARE, was constructed by deleting the SmaI and PvuII fragment from pRLTK. Constructs used in transfection experiments were purified with QIAGEN plasmid kits. For establishment of stable transfectants, cDNAs for murine *Ahr* and *Nrf2*ΔNeh2 were inserted into pTracer-EF/Bsd (Invitrogen). *Ahr* cDNA was isolated from pSportAHR (ATCC 63125). *Nrf2*ΔNeh2 cDNA (17) was isolated from pcDNA3-*Nrf2*ΔNeh2 (generously provided by Ken Itoh, Hirotsaki University).

Transient transfection and measurement of luciferase activity. Cells were transfected at 60 to 70% confluence with GeneJuice transfection reagent (Movagen). Briefly, cells were seeded in 24-well plates at a density of 1 × 10⁴ cells/well. Cells were grown overnight; the transfection complex containing 0.45 μg of plasmid DNA, 0.05 μg of the pRLTK-ΔARE plasmid, and transfection reagent was added to each well, and cells were incubated for 15 h. Cells were then incubated for another 24 h with or without drug treatment. *Renilla* and firefly luciferase activities in cell lysates were measured with the Dual Luciferase assay kit (Promega) with a luminometer (Turner Designs). For forced expression studies, pcDNA3-*Nrf2*ΔNeh2 was cotransfected with promoter plasmids.

Isolation and purification of total RNA and RT-PCR. Cells were seeded at 60% confluence the day before treatment with vehicle or CDDO-Im. Total RNA

was purified using the Versagene RNA purification system (Gentra Systems). Genes were analyzed by SYBR green real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR). cDNA was synthesized using the iScript system (Bio-Rad). Real-time PCR was performed on a Bio-Rad My-IQ real-time PCR instrument using Applied Biosystems SYBR green PCR master mix in 20-μl reaction mixture volumes. The PCR efficiency was determined from a standard curve and used in the Pfaffl method for calculation of relative quantification (33). Tata-binding protein (*Tbp*) was used as a normalizing control. Primers are shown in Table S1 in the supplemental material.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. Formaldehyde cross-linking and chromatin fragmentation were carried out as described previously (22). Diluted chromatin solution was incubated with an anti-NRF2 antibody or non-specific immunoglobulin G (Santa Cruz Biotechnology) for 18 h at 4°C with rotation. After the DNA was washed and eluted, precipitated DNA was resuspended with 60 μl of water, and 2 μl of DNA was used for PCR amplification with the following primers for *Ahr* ARE, 5'-TTTGTAGGCTGGAAACAGG TACT-3' and 5'-ACGTGATGACGACGACGTA-3'. The primer sequences for promoters of *β-actin* and *Gsta1* ARE have been described previously (22).

Design and transfection of *Ahr*-targeted specific siRNA. Small interfering RNA (siRNA) duplexes were prepared by Ambion. Targeted coding regions of the *Ahr* oligonucleotide sequences were as follows: iAhr (5'-AAGACTGGAG AAAGTGGCATG-3') (13) and iAhr2 (5'-AACGAGGAGTCTTCAGAACT-3') (pre-designed by Ambion). A National Center for Biotechnology Information standard nucleotide-nucleotide BLAST program was used to verify that this sequence did not match that of any other mouse gene. Quantitative RT-PCR results confirmed that transfection with iAhr reduced mRNA levels of *Ahr* more efficiently than transfection with iAhr2 did; therefore, iAhr was used for subsequent experiments. The negative-control siRNA (AM4611) used in this study was a nonsilencing siRNA designed by Ambion. MEFs were seeded in a six-well plate and transfected in the presence of 30 nM of either siRNA or negative-control RNA in a final volume of 1 ml OPTI-MEM (Invitrogen) with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 24 h, cells were replenished with fresh culture medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were incubated for an additional 40 h, and extracted RNA and proteins were analyzed by RT-PCR and immunoblotting.

Protein isolation and immunoblots. MEFs were lysed in the Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.5), 1% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 150 mM sodium chloride, and 1 mM EDTA for 30 min at 4°C. The samples were centrifuged at 10,000 × g for 10 min to pellet debris. Cell lysates were loaded and run on a 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel before being transferred electrophoretically onto a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was blocked with 5% fat-free milk solution and then sequentially incubated with primary antibody and enzyme-conjugated secondary antibody. The results were documented on X-ray film by using an ECL detection kit (Amersham Biosciences). Immunoblot analysis confirmed the expression of AHR and NRF2ΔNeh2 in the stable clones (data not shown) using anti-AHR antibody (Biomol) and anti-NRF2 antibody (generously provided by Ken Itoh, Hirotsaki University). Polyclonal anti-β-actin antibody and anti-lamin B antibody were obtained from Santa Cruz Biotechnology.

Induction of differentiation. A protocol for adipocyte differentiation of MEFs was used as described previously (2). Briefly, MEFs were plated at a 100% confluence in a 12-well plate 24 to 48 h before stimulation of differentiation. For the first 3 days, cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 10 μg/ml insulin (Sigma), 5 μM dexamethasone (Sigma), 0.2 mM isobutylmethylxanthine (Sigma), and 1 μM rosiglitazone (Cayman Chemical) for the first 3 days. Subsequently, cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 10 μg/ml insulin, and 1 μM rosiglitazone. Oil Red O staining was done per the manufacturer's instructions (Chemicon).

RESULTS

AHR expression and signaling are regulated by NRF2 in murine embryonic fibroblasts. Microarray analyses of MEFs derived from *Nrf2*^{+/+} and *Nrf2*^{-/-} mice have been conducted to compare the influence of the transcription factor genotype on global gene expression patterns (data not shown). These studies suggested that NRF2 may affect expression levels of *Ahr* and some of its downstream target genes. To follow up on this observation, a more direct analysis was undertaken in the

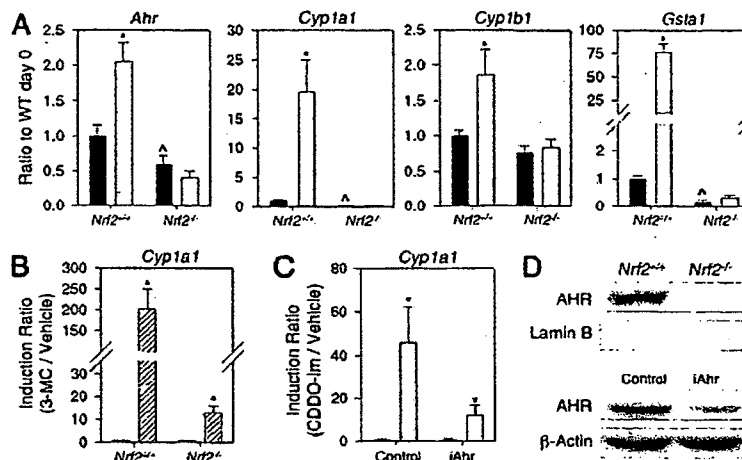


FIG. 1. Differential expression analysis of *Ahr* and downstream genes in *Nrf2*^{+/+} and *Nrf2*^{-/-} MEFs. (A) Transcript levels were measured following treatment with vehicle (black bars) and 25 nM CDDO-Im (gray bars) for 24 h. Ratios to *Nrf2*^{+/+} vehicle-treated controls on day 0 (Ratio to WT day 0) are shown on the y axes. Values are means plus standard errors (SEs) (error bars) ($n = 4$). Values that are significantly different ($P < 0.05$) from that of the respective vehicle (*) or that of the wild-type vehicle (WT) (Δ) are indicated. (B) Transcript levels were measured following treatment with vehicle (black bar) and 2 μM 3-MC (hatched bar) for 24 h. Ratios to the respective vehicle-treated control (Induction Ratio) are shown. Values are means plus SEs (error bars) ($n = 3$). Values that are significantly different ($P < 0.05$) from that of the respective vehicle (*) are indicated. (C) MEF cells were transfected with 30 nM siRNA (iAhr) or control RNA. Cells were treated with 25 nM CDDO-Im for 24 h or vehicle. Ratios to the respective vehicle-treated control (Induction Ratio) are shown. Values are means plus SEs (error bars) ($n = 4$). Values that are significantly different ($P < 0.05$) from that of the respective vehicle (*) are indicated. (D) Protein levels of AHR were detected by immunoblotting. (Top blots) AHR protein levels in *Nrf2*^{+/+} and *Nrf2*^{-/-} MEFs. (Bottom blots) AHR protein levels in control and iAhr-treated *Nrf2*^{+/+} MEFs.

present study. Both mRNA and protein levels of AHR were higher in *Nrf2*^{+/+} MEFs than in *Nrf2*^{-/-} MEFs (Fig. 1A and D). Quantitative RT-PCR indicated that constitutive expression of AHR target gene *Cyp1a1*, but not *Cyp1b1*, was significantly lower in *Nrf2*^{-/-} MEFs (Fig. 1A). The mRNA levels of *Ahr* were elevated 2.1-fold by CDDO-Im, a potent activator of NRF2 signaling, in *Nrf2*^{+/+} MEFs but not in *Nrf2*^{-/-} MEFs. The mRNA levels of *Amu*, which encodes a heterodimeric binding partner of AHR, were not affected by *Nrf2* genotype or CDDO-Im (data not shown). CDDO-Im induced transcription of AHR target genes *Cyp1a1* and *Cyp1b1* in *Nrf2*^{+/+} MEFs but not in *Nrf2*^{-/-} MEFs, implying that the NRF2 pathway influences the transcriptional function of AHR. *Gsta1*, a well-characterized NRF2-regulated gene, was induced over 75-fold in *Nrf2*^{+/+} MEFs but not at all in *Nrf2*^{-/-} MEFs.

Cells were treated with siRNA for *Ahr* (iAhr) to determine whether CDDO-Im induces *Cyp1a1* transcription through the AHR pathway. Treatment with iAhr resulted in a 70 to 80% knockdown of AHR protein (Fig. 1D). After transfection with iAhr, induction of *Cyp1a1* transcripts by CDDO-Im was only 25% of that observed in AHR-intact control cells (Fig. 1C). To test whether there is any off-target effect, mRNA levels of β -actin and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) were measured using quantitative RT-PCR. Transfection of iAhr had no effect on these genes (data not shown), confirming the specificity of the siRNA construct.

The fact that mRNA levels of *Ahr* are lower in *Nrf2*^{-/-} MEFs than in *Nrf2*^{+/+} MEFs suggests that the response to AHR ligands may be impaired in *Nrf2*^{-/-} MEFs. To determine whether the AHR-XRE pathway is intact in *Nrf2*^{-/-} MEFs, 3-methylcholanthrene (3-MC), a prototypical ligand that di-

rectly binds to AHR, was used. In *Nrf2*^{+/+} MEFs, the mRNA levels of *Cyp1a1* were increased by 200-fold by 2 μM 3-MC (Fig. 1B). In *Nrf2*^{-/-} MEFs, the drug treatment resulted in 13-fold induction of *Cyp1a1*, suggesting that enhancement of AHR signaling by AHR agonists is suppressed in *Nrf2*^{-/-} MEFs.

Transcription of the *Ahr* gene is regulated by an ARE located in its proximal promoter. To analyze the regulation of *Ahr* by NRF2, the promoter region (-967 bp upstream of the transcription start site) was isolated from mouse liver genomic DNA by PCR amplification and ligated into the luciferase reporter pGL3 basic vector. Three potential AREs were identified by consensus sequence: one upstream of the transcription start site (-230 bp) and two downstream (185 bp and 396 bp) of the putative poly(A) addition signal (Fig. 2A).

The reporter construct with the promoter of the *Ahr* gene (p-967) showed higher basal luciferase activity (data not shown) and inducible luciferase activity than the construct with both promoter and downstream enhancer sequences (p-967/560) (Fig. 2B). These data suggest that the two AREs in the downstream region are not involved in NRF2-AHR cross regulation. To determine the location of the cis element(s) involved in this cross regulation, two truncated promoter constructs were made (p-242 and p-193). Wild-type MEFs were transfected with these constructs, and luciferase activities from transfected cells following CDDO-Im treatment or forced expression of *Nrf2* Δ Neh2 were measured. Neh2 is the negative regulatory domain of NRF2 that is involved with the interaction with KEAP1 (17, 19). The plasmid *Nrf2* Δ Neh2 expresses a dominant-positive form of NRF2 protein that is more resistant to proteosomal degradation than the wild-type protein is. The

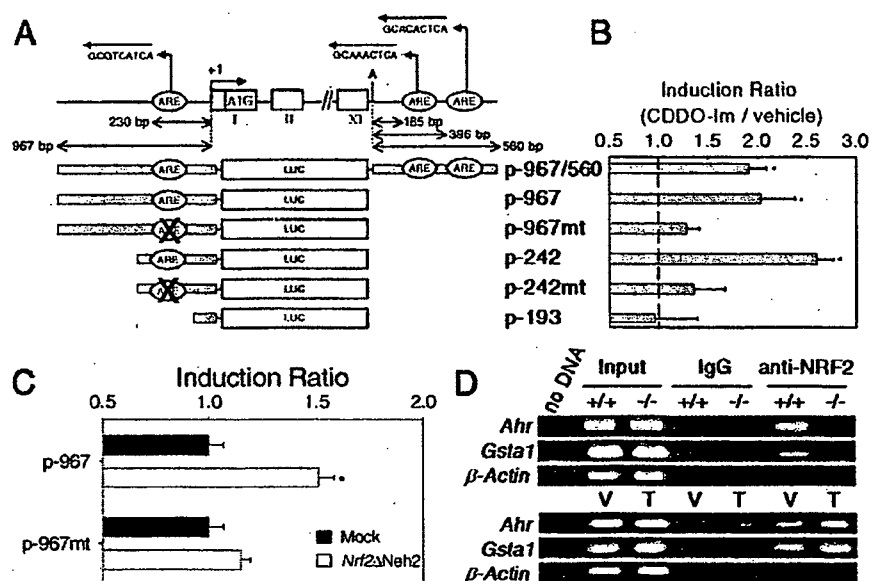


FIG. 2. Analysis of murine *Ahr* promoter. (A) Murine *Ahr* promoter constructs are shown. Three AREs in an inverted direction were identified, one upstream of the transcription start site (labeled "+1") and two downstream of the putative poly(A) addition signal (labeled "A") of the *Ahr* gene. Arrows indicate the orientations of these putative AREs. Boxes marked with roman numerals indicate exons of the murine *Ahr* promoter. LUC, luciferase. (B) Luciferase activities derived from full-length, truncated, or mutated promoters following treatment with 25 nM CDDO-Im are shown. Values that are significantly different ($P < 0.05$) from that of the respective vehicle-treated controls (*) are indicated. Values are means plus standard errors (SEs) (error bars) ($n = 4$). (C) Response of wild-type and mutated *Ahr* promoter to ectopic expression of *Nrf2*ΔNeh2 (white bar) and mock plasmid (black bar). Values that are significantly different ($P < 0.05$) from that of the mock plasmid-transfected control (*) are indicated. Values are means plus SEs (error bars) ($n = 3$). (D) Binding of NRF2 to *Ahr* promoter in intact cells. Water (no DNA), inputs, chromatin immunoprecipitants with immunoglobulin G (IgG), and anti-NRF2 antibody (anti-NRF2) were used for PCR amplification of each promoter. (Top gel) ARE-containing promoter regions from the *Ahr* promoter were detected in NRF2 immunoprecipitants obtained from *Nrf2*^{+/+} MEFs (+/+) but not from *Nrf2*^{-/-} MEFs (-/-). (Bottom gel) Enhanced binding of NRF2 to the *Ahr* promoter following CDDO-Im (T) treatment compared to that in vehicle (V)-treated *Nrf2*^{+/+} MEFs.

full-length promoter (p-967) was activated by CDDO-Im treatment (2.0-fold), as well as by forced expression of *Nrf2*ΔNeh2 (1.5-fold). This magnitude of response is consistent with the 2.1-fold increase in *Ahr* transcripts seen following treatment of wild-type MEFs with CDDO-Im (Fig. 1A). Responses to CDDO-Im were higher (2.6-fold) in proximal promoter constructs (p-242) than in the full-length promoter (Fig. 2B). These results suggest that a promoter containing 242 bp upstream of the transcription start site contains *cis* elements that can be activated by the NRF2-ARE. Further, when the upstream region containing the consensus ARE was deleted from the full-length promoter, the resulting construct (p-193) was not activated by CDDO-Im treatment (Fig. 2B). These results suggest that the -230 ARE may be necessary for the activation of the *Ahr* promoter by NRF2-ARE signaling. To confirm the results from promoter truncation, the -230 ARE was mutated in the p-967 and p-242 constructs (p-967mt and p-242mt (Fig. 2A)). This mutation in the ARE largely abolished promoter activation upon either CDDO-Im treatment (Fig. 2B) or *Nrf2*ΔNeh2 cotransfection in *Nrf2*^{+/+} MEFs (Fig. 2C). These results indicate that the ARE is required for the activation of the promoter by NRF2. ChIP assays were performed to confirm that NRF2 binds to the *Ahr* promoter in intact cells. The promoter region containing an ARE at -230 bp was detected by PCR amplification with NRF2-immunoprecipitated chro-

matin from *Nrf2*^{+/+} MEFs (Fig. 2D, top gel). As positive and negative controls, the ARE of the *Gsta1* promoter (10) was detected in NRF2-immunoprecipitated samples, whereas the β -actin promoter was not amplified. Levels of binding of NRF2 to the *Ahr* promoter were higher in CDDO-Im-treated cells than in vehicle-treated cells (Fig. 2D, bottom gel). A similar pattern of binding was observed with the *Gsta1* ARE. The *Gsta1* ARE and *Ahr* promoters were not amplified from *Nrf2*^{-/-} MEFs. Collectively, these data suggest that NRF2 regulates transcription of *Ahr* through direct binding to the ARE in the *Ahr* promoter in both uninduced and induced states.

Adipocyte differentiation was accelerated in *Nrf2*^{-/-} MEFs. As described above in the introduction, AHR inhibits conversion of 3T3-L1 preadipocytes and MEFs to mature lipid-containing adipocytes. Our findings show that immortalized *Nrf2*^{-/-} MEFs have lower levels of AHR protein and mRNA, suggesting that NRF2 may influence adipogenesis via activation of AHR signaling. Therefore, the rate of adipogenesis of *Nrf2*^{-/-} MEFs was compared to that of *Nrf2*^{+/+} MEFs.

According to Alexander et al. (2), basal differentiation medium (containing insulin, dexamethasone, and isobutylmethylxanthine) used for preadipocyte differentiation was not sufficient to induce differentiation in immortalized MEF cell lines. Therefore, peroxisome proliferator-activated receptor gamma

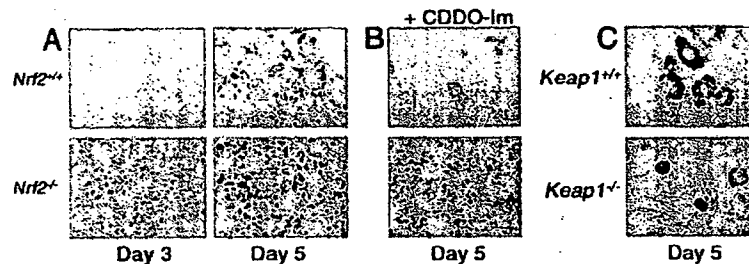


FIG. 3. Effects of *Nrf2* and *Keap1* genotypes on adipogenesis of MEFs. Cells were incubated with DMEM containing adipogenic reagents described in Materials and Methods. Representative photographs of the cells stained with Oil Red O are shown (400-fold magnified). (A) *Nrf2*^{+/+} and *Nrf2*^{-/-} MEFs 3 days and 5 days after stimulation of differentiation. (B) Effects of CDDO-Im (25 nM) on differentiation of *Nrf2*^{+/+} and *Nrf2*^{-/-} MEFs 5 days after stimulation of differentiation. (C) *Keap1*^{+/+} and *Keap1*^{-/-} MEFs 5 days after stimulation of differentiation.

(PPAR γ) agonist rosiglitazone was added to the basal medium. Neither *Nrf2*^{+/+} MEFs nor *Nrf2*^{-/-} MEFs differentiate spontaneously to adipocytes (data not shown). However, lipid droplets were clearly detectable in immortalized *Nrf2*^{-/-} MEFs 3 days after stimulation, whereas droplets were not visible until 5 days poststimulation in *Nrf2*^{+/+} MEFs (Fig. 3A). CDDO-Im treatment substantially inhibited adipogenesis only in *Nrf2*^{+/+} MEFs (Fig. 3B), further implying a negative role of NRF2 in adipogenesis.

Adipocyte differentiation is a process marked by a set of gene expression changes. CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBP α) and PPAR γ are transcription factors that regulate adipocyte-specific genes, such as fatty acid-binding proteins (FABPs) (14, 37, 47). Transcript levels of CEBP α and PPAR γ are increased during differentiation, leading to up-regulation of their downstream genes. Therefore, expression levels of CEBP α , PPAR γ , and FABP4 serve as markers of adipocyte differentiation. Transcript levels of *Cebpa*, *Fabp4*, and *Ppar γ 2* were induced by stimulation with differentiation medium in both *Nrf2*^{+/+} and *Nrf2*^{-/-} MEFs (Fig. 4). Basal transcript levels of *Cebpa* and *Fabp4* were higher in *Nrf2*^{-/-} MEFs than in *Nrf2*^{+/+} MEFs (3.3-fold and 2.4-fold, respectively), and these higher levels were sustained throughout the differentiation process. No differences in the mRNA levels of *Ppar γ 2* between the two genotypes were detected. An increase in CEBP β , which regulates transcription of PPAR γ and CEBP α by binding to the CEBP response elements present in the promoter regions, is considered an early marker of adipogenesis (36). The basal transcript levels of this gene were lower in *Nrf2*^{-/-} MEFs than in *Nrf2*^{+/+} MEFs at day 0 and day 1, but not at later time points. Our data suggest that during differentiation, *Nrf2*^{-/-} MEFs accumulate larger amounts of the terminal effectors, such as CEBP α and FABP4, that play important roles in both differentiation and lipid accumulation (14).

To determine whether the transcript levels and the actions (i.e., transactivation of downstream genes) of NRF2 and AHR are consistent with the adipogenesis pattern observed in Fig. 3, the mRNA levels of *Ahr*, *Nrf2* and downstream genes were monitored throughout the differentiation process (Fig. 4). The mRNA levels of *Nrf2* were not affected by differentiation (data not shown), but the mRNA levels of *Gsta1*, a marker of the action of NRF2, were lower in *Nrf2*^{+/+} MEFs throughout differentiation, indicating that the transcriptional action of

NRF2 is diminished during differentiation. Shimba et al. (40) reported that AHR was undetectable following adipogenesis in preadipocytes, and Alexander et al. (2) have shown that AHR was downregulated following adipogenesis in MEFs. Our data also confirmed that *Ahr* mRNA levels decrease during differentiation. A ChIP assay confirmed that NRF2 binding to the ARE at the -230 bp of *Ahr* promoter was suppressed 24 h after stimulation of differentiation (see Fig. S1 in the supplemental material). The basal levels of *Ahr* were lower in *Nrf2*^{-/-}

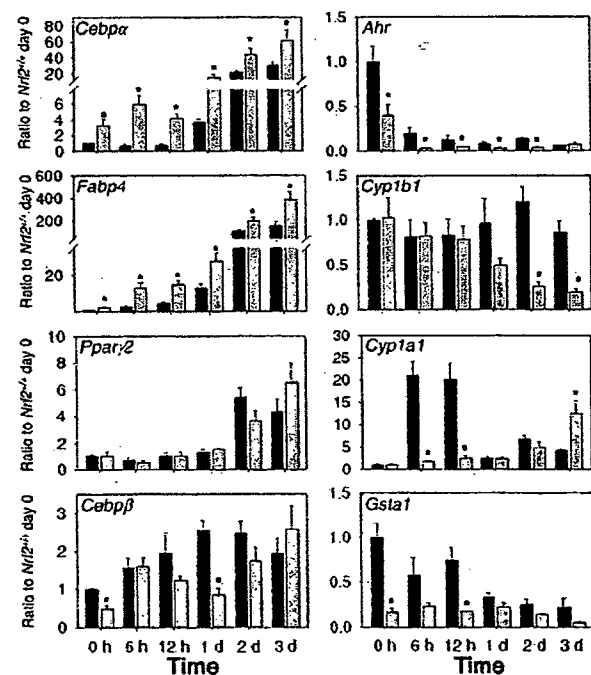


FIG. 4. Time-dependent changes of transcript levels throughout adipogenesis in *Nrf2*^{+/+} MEFs (black bars) and *Nrf2*^{-/-} MEFs (gray bars). Ratios to *Nrf2*^{+/+} MEFs on day 0 (Ratio to *Nrf2*^{+/+} day 0) are shown on the y axes. Time (in hours [h] and days [d]) is shown on the x axes. Values are means plus standard errors (error bars) ($n = 3$). Values that are significantly different ($P < 0.05$) from that of the respective *Nrf2*^{+/+} MEFs (*) are indicated.

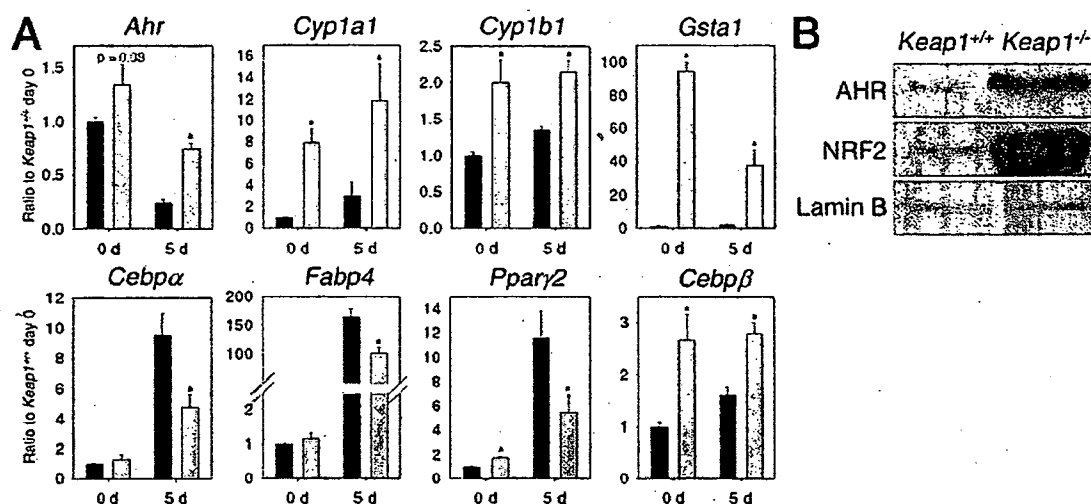


FIG. 5. Effects of *Keap1* genotype on transcript and protein levels in MEFs. (A) Transcript levels of *Ahr* and downstream genes and markers at day 0 and day 5 after stimulation of adipogenesis in *Keap1*^{+/+} MEFs (black bars) and *Keap1*^{-/-} MEFs (gray bars). Ratios to *Keap1*^{+/+} MEFs on day 0 (Ratio to *Keap1*^{+/+} day 0) are shown on the y axes. Time after stimulation of adipogenesis (in days [d]) is shown on the x axes. Values are means plus standard errors (error bars) ($n = 3$). Values that are significantly different ($P < 0.05$) from that of the respective *Keap1*^{+/+} MEFs (*) are indicated. (B) Protein levels of AHR and NRF2 were detected by immunoblotting.

MEFs than in *Nrf2*^{+/+} MEFs not only before stimulation (day 0) but also throughout the differentiation process. *Cyp1a1* and *Cyp1b1* mRNA levels were used as markers of AHR function. In *Nrf2*^{+/+} MEFs, *Cyp1b1* mRNA levels were not affected by the treatment, whereas in *Nrf2*^{-/-} MEFs, the levels started decreasing from day 1. *Cyp1a1* levels were markedly induced in *Nrf2*^{+/+} MEFs at early time points but were relatively stable in *Nrf2*^{-/-} MEFs. In summary, AHR expression and its downstream actions were decreased following adipogenesis and lower in *Nrf2*^{-/-} MEFs than in *Nrf2*^{+/+} MEFs. These data support our hypothesis that NRF2 acts as a negative regulator of adipogenesis through the regulation of *Ahr* transcription and signaling.

Adipocyte differentiation was delayed in *Keap1*^{-/-} MEFs. To determine whether enhanced accumulation of NRF2 influences the rate of adipocyte differentiation, primary MEFs were established from a *Keap1*-disrupted mouse and a congenic wild-type mouse (*Keap1*^{-/-} MEFs and *Keap1*^{+/+} MEFs, respectively). After 5 days of adipocyte differentiation, lipid droplets were detectable both in primary *Keap1*^{+/+} MEFs and *Keap1*^{-/-} MEFs (Fig. 3C). However, the number of differentiated cells and size of the lipid droplets were substantially larger in *Keap1*^{+/+} MEFs than in *Keap1*^{-/-} MEFs. These results suggest that the enhanced NRF2 accumulation in *Keap1*^{-/-} MEFs inhibits adipogenesis (after spontaneous immortalization, MEFs became smaller compared to primary cells; therefore, cells in Fig. 3C look bigger than cells in Fig. 3A).

The transcript levels of differentiation markers, *Ahr* and its downstream genes were detected at day 0 and day 5 after stimulation of adipogenesis in these cells (Fig. 5A). The mRNA levels of *Cebpa*, *Fabp4*, and *Pparγ2* were induced by stimulation with differentiation medium. The basal transcript levels of *Cebpa* and *Fabp4* were not affected by genotype at day

0 but were higher in *Keap1*^{+/+} MEFs at day 5. The mRNA levels of *Pparγ2* were higher in *Keap1*^{-/-} MEFs at day 0 but lower at day 5 compared to *Keap1*^{+/+} MEFs. The mRNA levels of *Cebpβ* were lower in *Keap1*^{+/+} MEFs than in *Keap1*^{-/-} MEFs, both at day 0 and day 5. These results suggest that increased NRF2 accumulation affects steps between inductions of *Cebpβ* and *Cebpa*. These data are consistent with the pattern observed in Fig. 4. However, unlike the situation in immortalized *Nrf2*^{+/+} and *Nrf2*^{-/-} MEFs, *Pparγ2* may also play a role in primary MEFs.

Both transcript and protein levels of *Ahr* were increased by disruption of *Keap1* at day 0 (Fig. 5A and B), and transcript levels of *Ahr* were 3.1-fold higher in *Keap1*^{-/-} MEFs than in *Keap1*^{+/+} MEFs at day 5, suggesting that NRF2 regulates *Ahr* expression both before and during differentiation. The mRNA levels of *Cyp1a1* and *Cyp1b1* were not affected by adipogenesis but were higher in *Keap1*^{+/+} MEFs at day 0 and day 5. These data suggest that NRF2 may affect not only *Ahr* transcription but also its function. *Gsta1* mRNA levels were decreased in *Keap1*^{-/-} MEFs following adipogenesis but slightly increased in *Keap1*^{+/+} MEFs. Overall, an inverse association between NRF2 accumulation and adipogenesis was observed, further confirming the inhibitory role of NRF2 in this process.

Stable expression of *Ahr* and *Nrf2ΔNeh2* rescued *Nrf2*^{-/-} MEFs from adipocyte differentiation. To determine whether ectopic expression of *Ahr* and *Nrf2* can "rescue" *Nrf2*^{-/-} MEFs from differentiation, *Nrf2*^{-/-} MEFs were transfected with mock vector or with plasmids expressing mouse *Ahr* and *Nrf2ΔNeh2*, and stable cell lines were established from these cells. At poststimulation day 3, mock transfectants showed accelerated lipid accumulation and morphological changes compared to cells expressing *Ahr* and *Nrf2ΔNeh2* (Fig. 6A). The mRNA levels of *Fabp4* were substantially lower in *Ahr*- and *Nrf2ΔNeh2*-expressing cells than in control cells at day 3

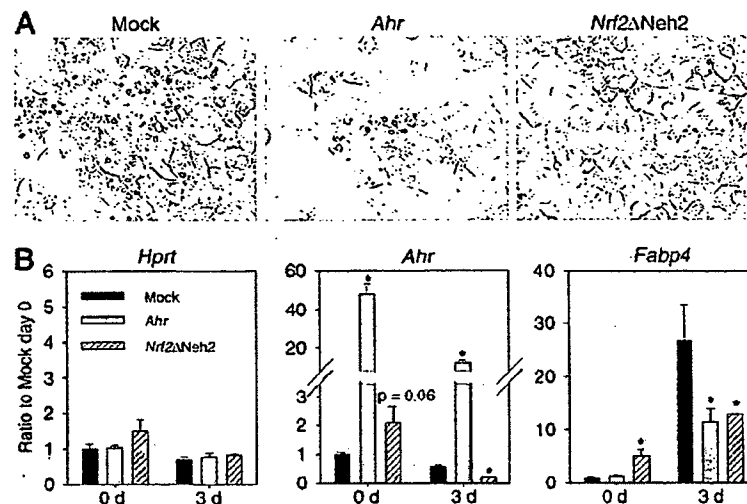


FIG. 6. Effects of ectopic expression of *Ahr* and *Nrf2ΔNeh2* on adipogenesis of *Nrf2*^{-/-} MEFs. (A) Representative photographs of the cells stained with Oil Red O and magnified 400-fold (3 days after stimulation of differentiation). (B) Transcript levels of *Hprt*, *Ahr*, and *Fabp4* at day 0 and day 3. The values for mock-transfected cells (black bars) and cells expressing *Ahr* (gray bars) and *Nrf2ΔNeh2* (hatched bars) are shown. Ratios to mock transfectants at day 0 (Ratio to Mock day 0) are shown on the y axes. Time (in days [d]) is shown on the x axes. Values are means plus standard errors (error bars) ($n = 3$). Values that are significantly different ($P \leq 0.05$) from that of the respective mock transfectant (*) are indicated.

(Fig. 6B). The fact that mRNA levels of *Hprt* were not affected by stable transfection and differentiation shows that stable transfection does not influence nonspecific targets. mRNA levels of *Ahr* were elevated in *Ahr*- and *Nrf2ΔNeh2*-expressing cells than in mock-transfected cells. However, the levels were significantly decreased in differentiated cells, suggesting that there are additional mechanisms that control *Ahr* gene transcription beside NRF2. The fact that the *Nrf2ΔNeh2*-expressing cells are more resistant to differentiation stimuli compared to mock-transfected cells excludes the possibilities that *Nrf2*^{-/-} MEFs have differences other than *Nrf2* genotype that influence the phenotype. The finding that forced expression of *Ahr* rescued *Nrf2*^{-/-} MEFs from adipogenesis provides direct support for our hypothesis that NRF2 inhibits adipogenesis through AHR signaling.

DISCUSSION

Studying interactive networks between signaling pathways is indispensable for understanding the complexity of a phenotype. For example, several transcription factors have been implicated in the inflammatory process associated with asthma, including the glucocorticoid receptor, NF- κ B, activator protein 1, nuclear factor of activated T-cells, cyclic AMP response element-binding protein, CEBP, PPAR, and NRF2 (38). Information on cross talk between signaling pathways may also provide insight into understanding the previously unrealized functions of a pathway and point to additional targets for interactions (11).

Nrf2 gene transcription is directly modulated by AHR activation of XRE-like elements in the *Nrf2* promoter (27). NRF2 is also known to autoregulate its own expression through an ARE-like element in the proximal region of its promoter (22).

However, this study is the first to show that NRF2 can affect *Ahr* transcription and downstream AHR signaling (Fig. 7). This bidirectional regulation of AHR and NRF2 pathways provides clues on the roles of NRF2 in complex diseases and in uncharacterized phenotypes.

The cross talk between NRF2 and AHR may help to explain the chemopreventive action of NRF2 activators. While studies on the AHR-CYP1A1 pathway often focus on production of toxic intermediates, the induction of both *CYP1A1* and *CYP1B1* resulted in an enhanced clearance of the procarcinogen benzo[a]pyrene (7). As suggested by Köhle and Bock (21), tightened coupling between the NRF2 and AHR pathways may result in attenuation of health risks caused by xenobiotics. The mode of action of bifunctional inducers, agents that enhance expression and activity of CYPs and cytoprotective enzymes (26), can be explained partially by our findings that NRF2 upregulates not only the expression of cytoprotective enzymes

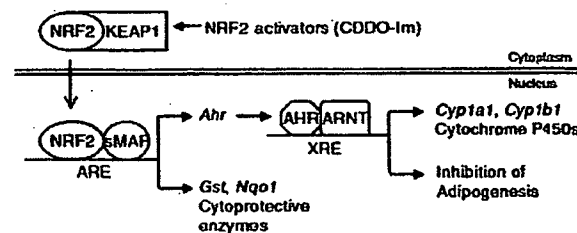


FIG. 7. Schematic representation of regulation of the AHR-XRE pathway by NRF2. The figure illustrates that interaction of NRF2 with ARE in the promoter of *Ahr* induces transcription of *Ahr* and triggers downstream events, the subsequent upregulation of cytochrome P450s and inhibition of adipogenesis. sMAF, small MAF proteins.

but also the expression of CYPs via AHR signaling. It is possible that drugs classified as bifunctional inducers increase expression of CYPs through NRF2-AHR-XRE interactions (Fig. 7).

Studies among various inbred strains of mice and F₁ hybrids have shown that inducibility of AHR-regulated enzymes is a function of the number of AHR molecules per cell (8). However, our studies do not indicate complete concordance between NRF2 levels, AHR levels, and AHR-regulated gene expression. Clearly, transcriptional upregulation of *Ahr* is one of the mechanisms by which NRF2 modulates AHR signaling. However, the 41% reduction of *Ahr* transcript levels in *Nrf2*^{-/-} MEFs compared to *Nrf2*^{+/+} MEFs may not be substantial enough to explain the complete abolishment of *Cyp1a1* and *Cyp1b1* induction by CDDO-Im in *Nrf2*^{-/-} MEFs (Fig. 1A). Moreover, the transcript levels of *Ahr* were 1.3-fold higher in *Keap1*^{-/-} MEFs than in *Keap1*^{+/+} MEFs, while *Cyp1a1* and *Cyp1b1* mRNA levels were 7.9-fold and 2.0-fold higher in *Keap1*^{-/-} MEFs, respectively (Fig. 5A). Immunoblots comparing *Keap1*^{-/-} and *Nrf2*^{-/-} MEFs to wild-type MEFs (Fig. 1D and 5B) imply that *Keap1* and *Nrf2* genotypes may also affect AHR expression in a posttranscriptional manner. Thus, it is possible that a minimal change in the level of *Ahr* mRNA is amplified during or after its translation.

Although the mRNA levels of *Cyp1a1* and *Cyp1b1* were analyzed as markers of transactivation by AHR and *Gsta1* as a marker of transactivation by NRF2, careful interpretation of the data is required. Isobutylmethylxanthine, which induces accumulation of cyclic AMP by inhibiting adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase, was included in the differentiation medium. It is known that cyclic AMP activates AHR and induces its nuclear translocation (31). Dexamethasone, another component of the differentiation medium, potentiates induction of *Cyp1a1* transcription by TCDD (23). Our data suggest that the differentiation medium induced transcription of *Cyp1a1* in *Nrf2*^{+/+} MEFs (Fig. 4). These data confirm that the activation of AHR-*Cyp1a1* signaling is dependent on *Nrf2* genotype because *Cyp1a1* transcription was not induced in *Nrf2*^{-/-} MEFs. Transcript levels of *Cyp1b1* also did not correlate perfectly with the mRNA levels of *Ahr* (Fig. 4 and 5). This can be explained perhaps by the fact that *Cyp1b1* mRNA levels are regulated in an AHR-independent manner during adipogenesis (6). Our data show that *Gsta1* mRNA levels were decreased in *Nrf2*^{+/+} MEFs and *Keap1*^{-/-} MEFs throughout adipogenesis, suggesting that the action of NRF2 decreased during differentiation. However, it is possible that *Gsta1* transcripts also reflect diminished expression of AHR because it is well-known that GSTs are also induced by AHR agonists, such as TCDD (21, 48).

Data shown in Fig. S1 in the supplemental material suggest that NRF2 binding to the promoter of *Ahr* was decreased during adipocyte differentiation. However, RT-PCR data confirmed that *Ahr* transcription was suppressed from 6 h after stimulation of differentiation (Fig. 4), while the change in NRF2 binding to ARE was detectable only after 24 h. Furthermore, *Ahr* mRNA levels were affected in *Nrf2*^{-/-} MEFs and *Nrf2*^{+/+} MEFs. These results suggest that NRF2 is not the only factor that controls *Ahr* gene transcription during adipocyte differentiation. Indeed, our results are consistent with the report of Shimba et al. (40) demonstrating that the sequence of

the *Ahr* promoter region responsible for differentiation-dependent suppression of *Ahr* transcription does not contain an ARE. Our findings also suggest that the level of expression of *Ahr* before stimulation of differentiation might be more important for determination of cell fate than transcriptional regulation during adipogenesis, since suppression of *Ahr* transcription was observed in *Nrf2*^{-/-} MEFs and *Nrf2*^{+/+} MEFs (Fig. 4) and in mock-transfected cells and *Nrf2*ΔNeh2-transfected cells (Fig. 6).

In addition to regulation of expression of CYPs, AHR plays a role in a number of processes, such as development, apoptosis, growth, and adipogenesis (34, 49, 52). Among these AHR-dependent phenotypes, our work evaluated the role of NRF2 on regulation of adipogenesis because of the central role of adipogenesis in multiple diseases, such as obesity (a major risk factor for diabetes, cancer, and cardiovascular diseases) and lipodystrophy (5, 16, 35). Various in vitro models for adipogenesis, such as embryonic stem cells, preadipocytes, and MEFs, are available (4). Among these models, adipogenesis using MEFs is particularly useful to study the effects of gene knockouts. The fact that disruption of *Nrf2* accelerated differentiation to adipocytes, while disruption of *Keap1* delayed the process (Fig. 3A and C) implies a negative role of NRF2 in adipogenesis. Pharmacological targeting of the NRF2 pathway with CDDO-Im, which inhibited differentiation (Fig. 3B), confirmed that NRF2 modulates components of adipocyte differentiation.

To evaluate how NRF2 regulates adipogenesis, differentiation markers involved at multiple stages of adipogenesis were analyzed. CEBPs and PPARs are the two families of transcription factors that play critical roles in adipogenesis (47). CEBPβ and CEBPδ function at an early phase of the differentiation process by sensing adipogenic stimuli and initiating expression of CEBPα and PPARγ (37, 47). CEBPα and PPARγ play roles at a later stage by inducing and maintaining expression of adipocyte-specific genes, such as *Fabp4* (14). The elevation of CEBPβ upon adipogenic stimulation is transient, while CEBPα and PPARγ remain upregulated for the duration of adipogenesis (43).

Although the mechanism by which AHR regulates adipogenesis has not been fully characterized, recent work suggests that AHR affects differentiation stages that follow CEBPβ activation, i.e., CEBPα or PPARγ upregulation. In 3T3-L1 preadipocytes, forced expression of AHR resulted in lower induction of *Fabp4* and *Cebpa* upon differentiation than in control cells, while the induction of *Pparγ* was not affected (41). *Pparγ* expression could be induced by differentiation in *Ahr*^{-/-} MEFs, but levels were lower than in *Ahr*^{+/+} MEFs (2). In addition, Vogel and Matsumura (45) demonstrated that although TCDD suppressed adipogenesis of MEFs, it induced expression of *Cebpβ* rather than inhibiting it.

In the present study, mRNA levels of *Cebpa* and *Fabp4* were higher in *Nrf2*^{-/-} MEFs than in *Nrf2*^{+/+} MEFs both before and after differentiation, while induction of *Pparγ2* was not affected by *Nrf2* genotype (Fig. 4). mRNA levels of *Cebpβ* were lower in *Nrf2*^{-/-} MEFs than in *Nrf2*^{+/+} MEFs. In primary *Keap1*^{-/-} MEFs (Fig. 5A), disruption of *Keap1* (which leads to accumulation of NRF2 in the nucleus) resulted in minimal induction of *Cebpa*, *Fabp4*, and *Pparγ2* upon differentiation. *Cebpβ* mRNA levels remained higher in *Keap1*^{-/-} MEFs than

in *Keap1*^{+/+} MEFs, both before and after induction of adipogenesis. These data suggest that NRF2 negatively modulates expression of *Cebpa* and *Pparγ2* but not *Cebpb* during the course of adipogenesis. The stages of differentiation that are affected by NRF2 directly overlap with those affected by AHR, thereby supporting the hypothesis that NRF2 inhibits adipogenesis through cross talk with AHR signaling.

Although how AHR controls expression of XRE genes has been extensively studied, the molecular events that regulate *Ahr* expression itself have been less well investigated (40). Our findings represent a new perspective for control of *Ahr* expression by demonstrating that NRF2 directly binds to a functional ARE found in the proximal promoter of *Ahr* (Fig. 2). Our data also suggest that NRF2 affects AHR function (i.e., transcription of *Cyp1a1* and *Cyp1b1* and adipogenesis) in an exogenous ligand-independent manner. Tijet et al. (44) identified a number of genes for which expression is AHR dependent but TCDD independent, suggesting that the constitutive level of AHR may affect gene expression. Candidates for endogenous AHR ligand, such as indigo (42), may also play a role in the interaction with the NRF2 pathway.

In summary, the observation that NRF2 controls AHR signaling expands the function of NRF2 to include influencing the metabolism of xenobiotics and carcinogens via CYPs as well as controlling adipogenesis. Recent studies of *Ahr* *Nrf2* double knockout mice in comparisons with wild-type and single transcription factor knockout mice offer additional evidence for interactions between these pathways (30). Although not addressed experimentally in this report, our findings also imply that the modifying influence of the NRF2 pathway can be expanded to other AHR-dependent processes, such as programmed cell death and development. Moreover, our findings may allow a broader clinical application of NRF2 activators, such as in prevention and treatment of obesity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by NIH grants CA94076, HL081205, and ES03819. S. Shin is the recipient of a Samsung Scholarship (Samsung Foundation of Culture).

We thank K. N. Anuzis (Johns Hopkins University) for help with adipocyte differentiation, A. Singh (Johns Hopkins University) and M. K. Kwak (Yeungnam University) for help with the ChIP assay. We also thank K. Itoh (Hiroaki University), Y. Fujii-Kuriyama, and J. Mimura (University of Tsukuba) for providing anti-NRF2 antibody and *Nrf2*ΔNeh2-expression plasmid and M. B. Sporn (Dartmouth Medical School) for providing CDDO-Im.

REFERENCES

- Alexander, D. L., S. E. Elton, and C. R. Jefcoate. 1997. Ah receptor regulation of CYP1B1 expression in primary mouse embryo-derived cells. *Cancer Res.* 57:4498–4506.
- Alexander, D. L., L. G. Ganem, P. Fernandez-Salguero, F. Gonzalez, and C. R. Jefcoate. 1998. Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J. Cell Sci.* 111:3311–3322.
- Boone, C., H. Bussey, and B. J. Andrews. 2007. Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nat. Rev. Genet.* 8:437–449.
- Bost, F., M. Aouadi, L. Caron, and B. Binetruy. 2005. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 87:51–56.
- Camp, H. S., D. Ren, and T. Leff. 2002. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends. Mol. Med.* 8:442–447.
- Cho, Y. C., W. Zheng, M. Yamamoto, X. Liu, P. R. Hanlon, and C. R. Jefcoate. 2005. Differentiation of pluripotent C3H10T1/2 cells rapidly elevates CYP1B1 through a novel process that overcomes a loss of Ah receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 439:139–153.
- Ebert, B., A. Seidel, and A. Lampen. 2005. Induction of phase-I metabolizing enzymes by oltipraz; flavone and indole-3-carbinol enhance the formation and transport of benzo[a]pyrene sulfate conjugates in intestinal Caco-2 cells. *Toxicol. Lett.* 158:140–151.
- Eisen, H. J., R. R. Hannah, C. L. Legraverend, A. B. Okey, and D. W. Nebert. 1983. The Ah receptor: controlling factor in the induction of drug-metabolizing enzymes by certain chemical carcinogens and other environmental pollutants, p. 227–258. In G. Litwack (ed.), *Biochemical actions of hormones*, vol. 10. Academic Press, New York, NY.
- Fong, C. J., L. D. Burgoon, and T. R. Zacharewski. 2005. Comparative microarray analysis of basal gene expression in mouse Hepa-1c1c7 wild-type and mutant cell lines. *Toxicol. Sci.* 6:342–353.
- Friling, R. S., A. Bensimon, Y. Tichauer, and V. Daniel. 1990. Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6258–6262.
- Gianchandani, E. P., D. L. Brautigan, and J. A. Papin. 2006. Systems analyses characterize integrated functions of biochemical networks. *Trends Biochem. Sci.* 31:284–291.
- Goldring, C., N. Kitteringham, R. Jenkins, I. Copple, J. F. Jeannin, and B. K. Park. 2006. Plasticity in cell defence: access to and reactivity of critical protein residues and DNA response elements. *J. Exp. Biol.* 209:2337–2343.
- Gouédard, C., R. Barouki, and Y. Morel. 2004. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 24:5209–5222.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, and H. S. Sul. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78:783–809.
- Hankinson, O. 2005. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 433:379–386.
- Harp, J. B. 2004. New insights into inhibitors of adipogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* 15:303–307.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, and M. Yamamoto. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13:76–86.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi, and S. Biswal. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:89–116.
- Kobayashi, A., M. I. Kang, Y. Watai, K. I. Tong, T. Shibata, K. Uchida, and M. Yamamoto. 2006. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* 26:221–229.
- Köhle, C., and K. W. Bock. 2006. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* 72:795–805.
- Köhle, C., and K. W. Bock. 2007. Coordinate regulation of phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem. Pharmacol.* 73:1853–1862.
- Kwak, M. K., K. Itoh, M. Yamamoto, and T. W. Kensler. 2002. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the *nrf2* promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22:2883–2892.
- Lai, K. P., M. H. Wong, and C. K. Wong. 2004. Modulation of AhR-mediated CYP1A1 mRNA and EROD activities by 17β-estradiol and dexamethasone in TCDD-induced H411E cells. *Toxicol. Sci.* 78:41–49.
- Loose, M., and R. Patient. 2006. Global genetic regulatory networks controlling hematopoietic cell fates. *Curr. Opin. Hematol.* 13:229–236.
- Ma, Q., K. Kinneer, Y. Bi, J. Y. Chan, and Y. W. Kan. 2004. Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction. *Biochem. J.* 377:205–213.
- Miao, W., L. Hu, M. Kandeuz, D. Hamilton, and G. Batist. 2004. A cell-based system to identify and characterize the molecular mechanism of drug-metabolizing enzyme (DME) modulators. *Biochem. Pharmacol.* 67:1897–1905.
- Miao, W., L. Hu, P. J. Scrivens, and G. Batist. 2005. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 280:20340–20348.
- Nakata, K., Y. Tanaka, T. Nakano, T. Adachi, H. Tanaka, T. Kaminuma, and T. Ishikawa. 2006. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21:437–547.
- Nebert, D. W., A. L. Roe, M. Z. Dieter, W. A. Solis, Y. Yang, and T. P. Dalton. 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59:65–85.
- Noda, S., N. Harada, A. Hida, Y. Fujii-Kuriyama, H. Motohashi, and M. Yamamoto. 2003. Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2

- compound null mutant mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303:105-111.
31. Oesch-Bartlomowicz, B., A. Huelster, O. Wiss, P. Antoniou-Lipfert, C. Dietrich, M. Arand, C. Weiss, E. Bockamp, and F. Oesch. 2005. Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:9218-9223.
 32. Okawa, H., H. Motohashi, A. Kobayashi, H. Aburatani, T. W. Kensler, and M. Yamamoto. 2006. Hepatocyte-specific deletion of the *keap1* gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339:79-88.
 33. Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
 34. Puga, A., C. R. Tomlinson, and Y. Xia. 2005. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem. Pharmacol.* 69:199-207.
 35. Rodriguez, A., A. Duran, M. Selloum, M. F. Champy, F. J. Diez-Guerra, J. M. Flores, M. Serrano, J. Auwerx, M. T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 2006. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* 3:211-222.
 36. Rosen, E. D., C. J. Walkey, P. Paigserver, and B. M. Spiegelman. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14:1293-1307.
 37. Rosen, E. D. 2005. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73:31-34.
 38. Roth, M., and J. L. Black. 2006. Transcription factors in asthma: are transcription factors a new target for asthma therapy? *Curr. Drug Targets* 7:589-595.
 39. Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon, and C. A. Bradfield. 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6731-6736.
 40. Shimba, S., M. Hayashi, T. Ohno, and M. Tezuka. 2003. Transcriptional regulation of the Ahr gene during adipose differentiation. *Biol. Pharm. Bull.* 26:1266-1271.
 41. Shimba, S., T. Wada, and M. Tezuka. 2001. Arylhydrocarbon receptor (Ahr) is involved in negative regulation of adipose differentiation in 3T3-L1 cells: Ahr inhibits adipose differentiation independently of dioxin. *J. Cell Sci.* 114:2809-2817.
 42. Sugihara, K., S. Kitamura, T. Yamada, T. Okayama, S. Ohta, K. Yamashita, M. Yasuda, Y. Fujii-Kuriyama, K. Saeki, S. Matsui, and T. Matsuda. 2004. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318:571-578.
 43. Tang, Q. Q., J. W. Zhang, and M. D. Lane. 2004. Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319:235-239.
 44. Tijet, N., P. C. Boutros, I. D. Moffat, A. B. Okey, J. Tuomisto, and R. Pohjanvirta. 2006. Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Mol. Pharmacol.* 69:140-153.
 45. Vogel, C. F., and F. Matsumura. 2003. Interaction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) with induced adipocyte differentiation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) involves tyrosine kinase c-Src. *Biochem. Pharmacol.* 66:1231-1244.
 46. Wakabayashi, N., K. Itoh, J. Wakabayashi, H. Motohashi, S. Noda, S. Takahashi, S. Imakado, T. Kotsuji, F. Otsuka, D. R. Roop, T. Harada, J. D. Engel, and M. Yamamoto. 2003. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.* 35:238-245.
 47. Wu, Z., N. L. Bucher, and S. R. Farmer. 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor γ during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP β , C/EBP δ , and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 16:4128-4136.
 48. Xiao, G. H., J. A. Pinaire, A. D. Rodrigues, and R. A. Prough. 1995. Regulation of the Ah gene battery via Ah receptor-dependent and independent processes in cultured adult rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 23:642-650.
 49. Yang, X., D. Liu, T. J. Murray, G. C. Mitchell, E. V. Hesterman, S. I. Karchner, R. R. Merson, M. E. Hahn, and D. H. Sherr. 2005. The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene* 24:7869-7881.
 50. Yates, M. S., and T. W. Kensler. 2007. Chemopreventive promise of targeting the Nrf2 pathway. *Drug News Perspect.* 20:109-117.
 51. Yates, M. S., M. Tauchi, F. Katsuoka, K. C. Flanders, K. T. Liby, T. Honda, G. W. Gribble, D. A. Johnson, J. A. Johnson, N. C. Burton, T. R. Guilarte, M. Yamamoto, M. B. Sporn, and T. W. Kensler. 2007. Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. *Mol. Cancer Ther.* 6:154-162.
 52. Zaher, H., P. M. Fernandez-Salguero, J. Letterio, M. S. Sheikh, A. J. Fornace, Jr., A. B. Roberts, and F. J. Gonzalez. 1998. The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 54:313-321.

Fulbright & Jaworski, L.L.P.

IPT Docketing

Docketed By:

hm13082 at 3:45 pm, 4/13/09

ENT COOPERATION TRE

hm13082

Docketing:1

AO-REAT:027WO/10814442

SLH/MHV/--/SDS

Search and Opinion rec'd

AO-REAT:027US/10814435L OF

SLH/MHV/--/PPG

Reminder 6/9/09, IDS off ISR 7/9/09

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

FULBRIGHT & JAWORSKI LLP

To:

IPT DOCKETING

FULBRIGHT & JAWORSKI L.L.P.

Docketed ☐ Not Req'd ☐ Confirmation ☐

Attn. Voges, Mark H.

Initials 1st

Initials 2nd

600 Congress Avenue Suite 2400

Austin TX 78701

ETATS-UNIS D'AMERIQUE

APR 13 2009

NO
THE INT
THE WRIT
SEARCHIN

Attorney

Docket

Act

Rule-of-2, Verified By:

ns14442 at 9:16 am, 4/14/09

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

09/04/2009

Applicant's or agent's file reference

REAT: 027WO

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2009/030771

International filing date
(day/month/year)

12/01/2009

Applicant

REATA PHARMACEUTICALS, INC.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Iris Hodzic

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/089545
PCT/US2009/030771

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
AVAILABILITY OF THE PUBLICATION
OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

To:

VOGES, Mark, H.
Fulbright & Jaworski L.L.P.
600 Congress Ave., Suite 2400
Austin, TX 78701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 16 July 2009 (16.07.2009)		
Applicant's or agent's file reference REAT:027WO		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/US2009/030771	International filing date (day/month/year) 12 January 2009 (12.01.2009)	Priority date (day/month/year) 11 January 2008 (11.01.2008)
Applicant REATA PHARMACEUTICALS, INC. et al		

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:

☒ has **published** the above-indicated international application on 16 July 2009 (16.07.2009) under No. WO 2009/089545

☐ has **republished** the above-indicated international application on under No. WO

For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the published international application.

A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address: www.wipo.int/pctdb (in the appropriate field of the structured search, enter the PCT or WO number).

The applicant may also obtain a paper copy of the published international application from the International Bureau by sending an e-mail to patentscope@wipo.int or by submitting a written request to the contact details provided below.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Simin Baharlou
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt09.pct@wipo.int

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

VOGES, Mark, H.
Fulbright & Jaworski L.L.P.
600 Congress Ave., Suite 2400
Austin, TX 78701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 21 January 2009 (21.01.2009)	
Applicant's or agent's file reference REAT:027WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2009/030771	International filing date (day/month/year) 12 January 2009 (12.01.2009)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 11 January 2008 (11.01.2008)
Applicant REATA PHARMACEUTICALS, INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
11 January 2008 (11.01.2008)	61/020,624	US	18 January 2009 (18.01.2009)
28 October 2008 (28.10.2008)	61/109,114	US	18 January 2009 (18.01.2009)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Simin Baharlou e-mail PT09.PCT@WIPO.INT Telephone No. +41 22 338 74 09
---	--

Facsimile No. +41 22 338 82 70

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/089545
PCT/US2009/030771

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

VOGES, Mark, H.
Fulbright & Jaworski L.L.P.
600 Congress Ave., Suite 2400
Austin, TX 78701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)
14 May 2010 (14.05.2010)

Applicant's or agent's file reference
REAT:027WO

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2009/030771

International filing date (day/month/year)
12 January 2009 (12.01.2009)

Priority date (day/month/year)
11 January 2008 (11.01.2008)

Applicant

REATA PHARMACEUTICALS, INC. et al

- ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.
- Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
16 July 2009 (16.07.2009)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1 :

AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Simin Baharlou

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt09.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/089545
PCT/US2009/030771

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

VOGES, Mark, H.
Fulbright & Jaworski L.L.P.
600 Congress Ave., Suite 2400
Austin, TX 78701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)
13 August 2009 (13.08.2009)

Applicant's or agent's file reference
REAT:027WO

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2009/030771

International filing date (day/month/year)
12 January 2009 (12.01.2009)

Priority date (day/month/year)
11 January 2008 (11.01.2008)

Applicant

REATA PHARMACEUTICALS, INC. et al

- ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).
- Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
16 July 2009 (16.07.2009)

None

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

LU, TZ, UG

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of **19 months** from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **20 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 20-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Simin Baharlou

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt09.pct@wipo.int

FULBRIGHT & JAWORSKI L.L.P.

A REGISTERED LIMITED LIABILITY PARTNERSHIP

600 CONGRESS AVENUE, SUITE 2400

AUSTIN, TEXAS 78701

WWW.FULBRIGHT.COM

TELEPHONE: 512.474.5201

FACSIMILE: 512.536.4598

Date: Thursday, July 23, 2009 11:32:58 AM**No. of pages (including cover):** 03**Matter No.:** 10814442**TO**

Madam or Sir

International Bureau of WIPO

PHONE NO.**FACSIMILE NO.** 01141223388720**FROM**

Mark H. Voges, Agent

PHONE NO. 1-512-536-3111

Should recipient confirm, by telephone, receipt of this facsimile transmission? No

COMMENTS:

Please find attached a request to record for PCT/US2009/030771.
We appreciate your assistance in this matter.

CAUTION - CONFIDENTIAL

THE INFORMATION CONTAINED IN THIS FACSIMILE IS CONFIDENTIAL AND MAY ALSO CONTAIN PRIVILEGED ATTORNEY-CLIENT INFORMATION OR WORK PRODUCT. THE INFORMATION IS INTENDED ONLY FOR THE USE OF THE INDIVIDUAL OR ENTITY TO WHOM IT IS ADDRESSED. IF YOU ARE NOT THE INTENDED RECIPIENT, OR THE EMPLOYEE OR AGENT RESPONSIBLE TO DELIVER IT TO THE INTENDED RECIPIENT, YOU ARE HEREBY NOTIFIED THAT ANY USE, DISSEMINATION, DISTRIBUTION OR COPYING OF THIS COMMUNICATION IS STRICTLY PROHIBITED. IF YOU HAVE RECEIVED THE FACSIMILE IN ERROR, PLEASE IMMEDIATELY NOTIFY US BY TELEPHONE, AND RETURN THE ORIGINAL MESSAGE TO US AT THE ADDRESS ABOVE VIA THE U.S. POSTAL SERVICE. THANK YOU.

If you experience problems with this transmission or have questions, please call the sender.

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCT

NOTIFICATION CONCERNING PAYMENT OF PRESCRIBED FEES

(PCT Rules 12bis.1(c), 14, 15 and 16 and Administrative
Instructions, Sections 102bis(c), 304,
323(b), 707(b) and 803)

To:

MARK H. VOGES
FULBRIGHT & JAWORSKI L.L.P.
600 CONGRESS AVE., SUITE 2400
AUSTIN, TEXAS 78701

Date of mailing
(day/month/year)

23 Jan 2009

Applicant's or agent's file reference

REAT:027WO

PAYMENT DUE

see item 3 for time limits

International application No.

PCT/US09/30771

International filing date/Date of receipt
(day/month/year)

12 Jan 2009

Priority date (day/month/year)

11 Jan 2008

Applicant

REATA PHARMACEUTICALS, INC.

1. The applicant is hereby notified that this receiving Office has received:



the payment of all the prescribed fees, and



an overpayment, which will be refunded in due course.



no or insufficient payment of the prescribed fees and the applicant is hereby invited to pay the balance due, as summarized under item 2, within the time limit(s) indicated under item 3.

2. Fees and payment calculation:

4,679.00

Total fees payable

-

4,679.00

Amount paid

=

0.00

Balance



The details of the calculation are given in the Annex.

3. Time limit(s) for payment and amount(s) payable (Rules 14.1, 15.4 and 16.1(f)):



within ONE MONTH from the date of receipt of the international application (for the transmittal fee (if any), the search fee and the international filing fee). The amount payable for each fee is the amount applicable on the date of receipt of the international application.



within 16 MONTHS from the priority date (only for the fee for priority document). The applicant's attention is drawn to the fact that the request made by the applicant under Rule 17.1(b) will be considered not to have been made unless the fee is paid within that time limit.

4. Additional observations (if necessary):



The search copy will not be transmitted to the International Searching Authority until the search fee is paid (therefore the start of the international search will be delayed) (Rule 23.1(a) and (b)).

Name and mailing address of the receiving Office

Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer

Felicia Lawrence

Telephone No. 703-308-9290 EX 133

ANNEX TO FORM PCT/RO/102
CALCULATION OF THE PRESCRIBED FEES

International application No.
PCT/US09/30771

T Transmittal Fee

Prescribed amount: 240.00 **T**
Amount paid: 240.00
Balance: = 0.00

☒ correct amount
☐ overpayment
☐ balance due

S Search Fee

Prescribed amount: 2,410.00 **S**
Amount paid: 2,410.00
Balance: = 0.00

☒ correct amount
☐ overpayment
☐ balance due

I International Filing Fee

Fixed amount for first 30 sheets: 1,119.00 **i1**

65 x 14.00 = 910.00 **i2**
Number of sheets Fee per sheet
in excess of 30

Additional component: . . .400 x 0.00 = 0.00 **i3**
Fee per sheet

Reduction where the international application is filed
(See PCT Applicant's Guide, International Phase for
details on the availability of this reduction):

using the PCT-EASY software: 0.00 **r**

or

in electronic form where the text of the
description, claims and abstract is not in
character coded format: 0.00 **r**

or

in electronic form where the text of the
description, claims and abstract is in character
coded format: 0.00 **r**

Sub-total: = 2,029.00 **i1+i2+i3-r**

Applicants from certain States are entitled to a reduction of 90% of the
international filing fee. Where the applicant is (or all applicants are) so
entitled, the total to be entered at I is 10% of the sub-total entered at
(i1+i2+i3-r); (see Notes to the Fee Calculation Sheet as annexed to the
Request Form, PCT/RO/101, for details):

2,029.00 **I**
Amount paid: 2,029.00
Balance: = 0.00

☒ correct amount
☐ overpayment
☐ balance due

P Fee for Priority Document

Prescribed amount: 0.00 **P**
Amount paid: 0.00
Balance: = 0.00

☒ correct amount
☐ overpayment
☐ balance due

ES Fee for Earlier Search Documents

Prescribed amount: 0.00 **ES**
Amount paid: 0.00
Balance: = 0.00

☐ correct amount
☐ overpayment
☐ balance due

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCT

To:

MARK H. VOGES
FULBRIGHT & JAWORSKI L.L.P.
600 CONGRESS AVE., SUITE 2400
AUSTIN, TEXAS 78701

NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION NUMBER AND OF THE
INTERNATIONAL FILING DATE

(PCT Rule 20.2(c))

Confirmation No: 1929

Date of mailing
(day/month/year)

23 Jan 2009

Applicant's or agent's file reference

REAT:027WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US09/30771

International filing date (day/month/year)

12 Jan 2009

Priority date (day/month/year)

11 Jan 2008

Applicant

REATA PHARMACEUTICALS, INC.

Title of the invention

SYNTHETIC TRITERPENOIDS AND METHODS OF USE IN THE TREATMENT OF DISEASE

1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.

2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:



was transmitted to the International Bureau on

23 Jan 2009



has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:



because the necessary national security clearance has not yet been obtained.



because (reason to be specified):

* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).

3. FOREIGN TRANSMITTAL LICENSE INFORMATION

Completed by: FL



Additional license for foreign transmittal not required. This subject matter is covered by a license already granted or the equivalent U.S. national application. Refer to that license for information concerning its scope.



License for foreign transmittal not required. 37 CFR. 5.11(e)(1) or 37 CFR 5.11(e)(2). However, a license may be required for additional subject matter. See 37 CFR 5.15(b).



Foreign transmittal license granted. 35 U.S.C. 184; 37 CFR 5.11 on 15 Jan 2009

(date)



37 CFR 5.15(a)



37 CFR 5.15(b)

Name and mailing address of the receiving Office

Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer

Felicia Lawrence

Telephone No. 703-308-9290 EX 133

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCT

To:
MARK H. VOGES
FULBRIGHT & JAWORSKI L.L.P.
600 CONGRESS AVE., SUITE 2400
AUSTIN, TEXAS 78701

INVITATION TO CORRECT DEFECTS IN
THE INTERNATIONAL APPLICATION

(PCT Articles 3(4)(i) and 14(1) and Rule 26)

Date of mailing (day/month/year) 23 Jan 2009	
Applicant's or agent's file reference REAT:027WO	REPLY DUE within TWO MONTHS from the above date of mailing
International application No. PCT/US09/30771	International filing date (day/month/year) 12 Jan 2009
Applicant REATA PHARMACEUTICALS, INC.	

1. ☒ The applicant is hereby **invited**, within the time limit indicated above, to correct, **in the international application as filed**, the defects specified on the attached:

☐ Annex A

☐ Annex B1 (text matter of the international application as filed)

☒ Annex C1 (drawings of the international application as filed)

2. ☐ The applicant is hereby **invited**, within the time limit indicated above, to correct, **in the translation of the international application** furnished under Rule 12.3 or 12.4, the defects specified on the attached:

☐ Annex A

☐ Annex B2 (text matter of the translation of the international application)

☐ Annex C2 (drawings of the translation of the international application)

Additional observations (if necessary):

HOW TO CORRECT THE DEFECTS?

Except where the defect is in the request, any correction must be submitted by filing a replacement sheet embodying the correction and a letter accompanying the replacement sheet, which shall draw attention to the difference between the replaced sheet and the replacement sheet. For a defect in the request, a correction may simply be stated in a letter if it is of such a nature that the correction can be transferred clearly onto the request record copy (Rule 26.4).

ATTENTION

Failure to correct the defects will result in the international application being considered withdrawn by this receiving Office (see Rule 26.5 for further details).

A copy of this Invitation and any attachments has been sent to the International Bureau

☒ and the International Searching Authority.

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer Felicia Lawrence Telephone No. 703-308-9290 EX 133
---	---

ANNEX A TO FORM PCT/RO/106

International application No.

PCT/US09/30771

The receiving Office has found the following defects in the international application as filed:

1. As to signature of the international application (Rules 4.15, 26.2bis(a) and 90.4), the request:

- a. ☐ is not signed* by the applicant or, if there is more than one applicant, by at least one of them
- b. ☐ is not accompanied by the statement referred to in the check list in Box No. IX of the request explaining the lack of the signature of an applicant for the designation of the United States of America
- c. ☐ is signed by what appears to be an agent/common representative but:
- ☐ the international application is not accompanied by a power of attorney appointing him
- ☐ the power of attorney accompanying the international application is not signed by all the applicants
- d. ☐ other (*specify*):

* Although Rule 4.15 requires that all applicants must sign the request (e.g. including all inventors/applicants for the designation of the United States of America), for the purposes of Article 14(1)(a)(i), if there is more than one applicant, it shall be sufficient that the request be signed by one of them (Rule 26.2bis(a)).

However, the applicant's attention is drawn to the fact that the national law applied by each designated Office may require, in connection with the processing of the international application in the national phase, that the applicant furnish the confirmation of the international application by the signature of any applicant for the designated State who has not signed the request (Rule 51bis.1(a)(vi)).

2. As to indications concerning the applicant* who is entitled, according to Rule 19.1, to file the international application with the receiving Office, the request (Rules 4.4, 4.5 and 26.2bis(b)):

- a. ☐ does not properly indicate the applicant's name (*specify*):
- b. ☐ does not indicate the applicant's address
- c. ☐ does not properly indicate the applicant's address (*specify*):
- d. ☐ does not indicate the applicant's nationality
- e. ☐ does not indicate the applicant's residence

☐ Further observations about indications concerning other applicants (if applicable):

* Although Rules 4.4 and 4.5 require indications concerning the applicant, or if there are several applicants, of each of them, for the purposes of Article 14(1)(a)(ii), if there is more than one applicant, it shall be sufficient that the indications required under Rule 4.5(a)(ii) and (iii) be provided in respect of one of them who is entitled according to Rule 19.1 to file the international application with the receiving Office (Rule 26.2bis(b)).

However, the applicant's attention is drawn to the fact that the national law applied by each designated Office may require, in connection with the processing of the international application in the national phase, that the applicant furnish any missing indication required under Rule 4.5(a)(ii) and (iii) in respect of any applicant for the designated State (Rule 51bis.1(a)(vii)).

3. As to the language of certain elements of the international application, other than the description and claims (Rules 12.1(c) and 26.3ter(a) and (c)):

- a. ☐ the request is not in a language of publication accepted by this receiving Office; (the) language(s) accepted by this receiving Office is/are:
- b. ☐ the text matter of the drawings is not in the language in which the international application is to be published, which is:
- c. ☐ the abstract is not in the language in which the international application is to be published, which is:

4. The title of the invention:

- a. ☐ is not indicated in Box No. I of the request (Rule 4.1(a))
- b. ☐ is not indicated at the top of the first sheet of the description (Rule 5.1(a))
- c. ☐ as appearing in Box No. I of the request is not identical with the title heading the description (Rule 5.1(a))

5. As to the abstract (Rules 8 and 26.1(b)):

- ☐ the international application does not contain an abstract

This receiving Office has found that, with regard to the presentation of the text matter of the international application as filed, the physical requirements are not complied with to the extent that compliance therewith is necessary for:

1. ☐ reasonably uniform international publication (Rules 11 and 26.3(a)(i)) (*defects to be specified*):

	Request	Description	Claims	Abstract
a. ☐ the sheets do not admit of direct reproduction	☐	☐	☐	☐
b. ☐ the element does not commence on a new sheet	☐	☐	☐	☐
c. ☐ sheets are not free from creases, cracks, folds	☐	☐	☐	☐
d. ☐ sheets are not used in the upright position	☐	☐	☐	☐
e. ☐ one side of the sheets is not left unused	☐	☐	☐	☐
f. ☐ the paper of the sheets is not flexible/strong/white/smooth/non-shiny/durable	☐	☐	☐	☐
g. ☐ the sheets are not connected as prescribed (Rule 11.4(b))	☐	☐	☐	☐
h. ☐ sheets are not A4 size (29.7cm x 21cm)	☐	☐	☐	☐
i. ☐ the minimum margins on the sheets are not as prescribed (top: 2cm; left side: 2.5cm; right side: 2cm; bottom: 2cm)		☐	☐	☐
j. ☐ the file reference number indicated on the sheets does not appear in the left-hand corner of the sheets, within 1.5 cm of the top of the sheets		☐	☐	☐
k. ☐ the file reference number exceeds the maximum of 12 characters	☐	☐	☐	☐
l. ☐ the sheets of the description, claims and abstract are not numbered in consecutive Arabic numerals		☐	☐	☐
m. ☐ the sheet numbers are not centered at the top or bottom of the sheets	☐	☐	☐	☐
n. ☐ the sheet numbers are in the margin (see i. above for the size of the margins)		☐	☐	☐
o. ☐ the text matter is not typed or printed	☐	☐	☐	☐
p. ☐ the typing on the sheets is not 1½-spaced		☐	☐	☐
q. ☐ the characters in the text matter on the sheets are less than 0.28 cm high in capital letters	☐	☐	☐	☐
r. ☐ the text matter on the sheets is not in dark, indelible color	☐	☐	☐	☐
s. ☐ the element contains drawings	☐	☐	☐	☐
t. ☐ the sheets contain alterations/overwritings/interlineations/too many erasures	☐	☐	☐	☐
u. ☐ the sheets contain photocopy marks	☐	☐	☐	☐

2. ☐ satisfactory reproduction (Rules 11 and 26.3(b)(i))

Further observations (if necessary):

This receiving Office has found that, with regard to the presentation of the drawings of the international application as filed, the physical requirements are not complied with to the extent that compliance therewith is necessary for:

1. ☒ reasonably uniform international publication (Rules 11 and 26.3(a)(i)) (*defects to be specified*):

Sheets containing drawings:

- a. ☐ the sheets do not admit of direct reproduction
- b. ☐ the sheets are not free from creases, cracks, folds
- c. ☐ one side of the sheets is not left unused
- d. ☐ the paper of the sheets is not flexible/strong/white/smooth/non-shiny/durable
- e. ☐ the drawings do not commence on a new sheet
- f. ☐ the sheets are not connected as prescribed (Rule 11.4(b))
- g. ☐ the sheets are not A4 size (29.7cm x 21cm)
- h. ☐ the minimum margins on the sheets are not as prescribed (top: 2.5cm; left side: 2.5cm; right side: 1.5cm; bottom: 1cm)
- i. ☐ the file reference number indicated on the sheets does not appear in the left-hand corner of the sheets, within 1.5 cm of the top of the sheets
- j. ☐ the file reference number exceeds the maximum of 12 characters
- k. ☐ the sheets are not free from frames around usable or used surfaces
- l. ☒ the sheets are not numbered in consecutive Arabic numerals (e.g. 1/3, 2/3, 3/3)
- m. ☐ the sheet numbers are not centered at the top or bottom of the sheets
- n. ☐ the sheet numbers are in the margin (see h. above for the size of the margins)
- o. ☐ the sheets contain alterations/overwritings/interlineations/too many erasures
- p. ☐ the sheets contain photocopy marks

Drawings (Rule 11.13):

- a. ☐ do not admit of direct reproduction
- b. ☐ contain unnecessary text matter
- c. ☐ contain words so placed as to prevent translation without interference with lines thereof
- d. ☐ are not executed in durable black color; the lines are not uniformly thick and well-defined
- e. ☐ contain cross-sections not properly hatched
- f. ☐ would not be properly distinguishable in reduced reproduction
- g. ☐ contain scales not represented graphically
- h. ☐ contain numbers, letters and reference lines lacking simplicity and clarity
- i. ☐ contain lines drafted without the aid of drafting instruments
- j. ☐ contain disproportionate elements of a figure not necessary for clarity
- k. ☐ contain numbers and letters of height less than 0.32 cm
- l. ☐ contain letters not conforming to the Latin, and where customary, Greek alphabets
- m. ☐ contain figures on two or more sheets which form a single complete figure but which are not able to be assembled without concealing parts thereof
- n. ☐ contain figures which are not properly arranged and clearly separated
- o. ☐ contain different figures not numbered in consecutive Arabic numerals
- p. ☐ contain different figures not numbered independently of the numbering of the sheets
- q. ☐ are not restricted to reference signs mentioned in the description
- r. ☐ do not contain reference signs that are mentioned in the description
- s. ☐ contain the same feature denoted by different reference signs
- t. ☐ are not arranged in an upright position, clearly separated from one another
- u. ☐ are not presented sideways with the top of the figures at the left side of the sheets

2. ☐ satisfactory reproduction (Rules 11 and 26.3(b)(i))

Further observations (if necessary):

NEW DRAWINGS REQ'D

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

VOGES, Mark, H.
Fulbright & Jaworski L.L.P.
600 Congress Ave., Suite 2400
Austin, TX 78701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 20 January 2009 (20.01.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference REAT:027WO	International application No. PCT/US2009/030771

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

REATA PHARMACEUTICALS, INC. et al (for all designated States except US)
SPORN, Michael et al (for US)

International filing date: 12 January 2009 (12.01.2009)

Priority date(s) claimed: 11 January 2008 (11.01.2008)

28 October 2008 (28.10.2008)

Date of receipt of the record copy by the International Bureau: 18 January 2009 (18.01.2009)

List of designated Offices:

AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

ATTENTION: The applicant should carefully check the data appearing in this notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau. **In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:**

- time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)
- requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer N'Diaye Anta e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
---	--

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Form PCT/IB/301 (October 2005)

1/DXKLVETQ0

INFORMATION ON ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the **"national phase"** must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with **other special requirements** applicable in certain Offices. It is the **applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The **applicable time limit** for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time**, in respect of certain designated or elected Offices. For **regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit)**, Office by Office, refer to the *PCT Gazette* ("Section IV" part published on a weekly basis), to the *PCT Newsletter* (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the *PCT Applicant's Guide* (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages of the site, including those of the *Gazette*, *Newsletter* and *Guide*, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for **filing a demand for international preliminary examination** is set out in the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before the date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau and if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 2(xi)(b)).

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
AS RECEIVING OFFICE

In re Application of: Reata Pharmaceuticals, Inc.
et al.

Serial No.: PCT/US20009/030771

Filed: 12 January 2009

For: Synthetic Triterpenoids and Methods of Use
in the Treatment of Disease

Atty. Dkt. No.: REAT:027WO

RESPONSE TO INVITATION TO CORRECT DEFECTS
MAILED 23 JANUARY 2009

MAIL STOP PCT

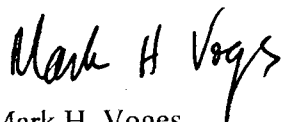
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Responsive to the Invitation to Correct Defects mailed 23 January 2009, Applicant
furnishes the corrected drawings.

Should any fees be required for any reason relating to the enclosed materials, please
deduct said fees from Fulbright & Jaworski Account No.: 50-1212/REAT:027WO.

Respectfully submitted,

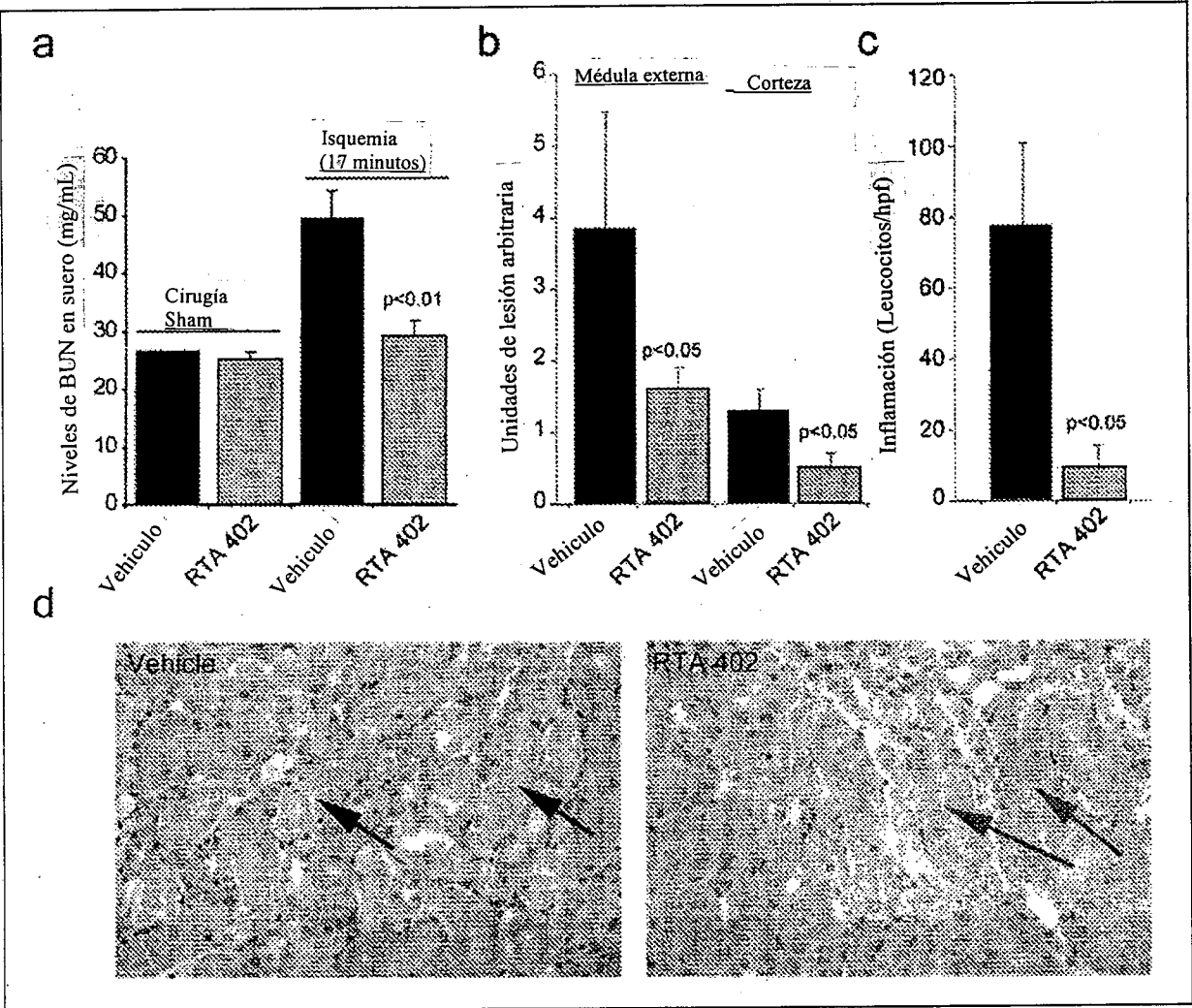


Mark H. Voges
Reg. No. 58,112

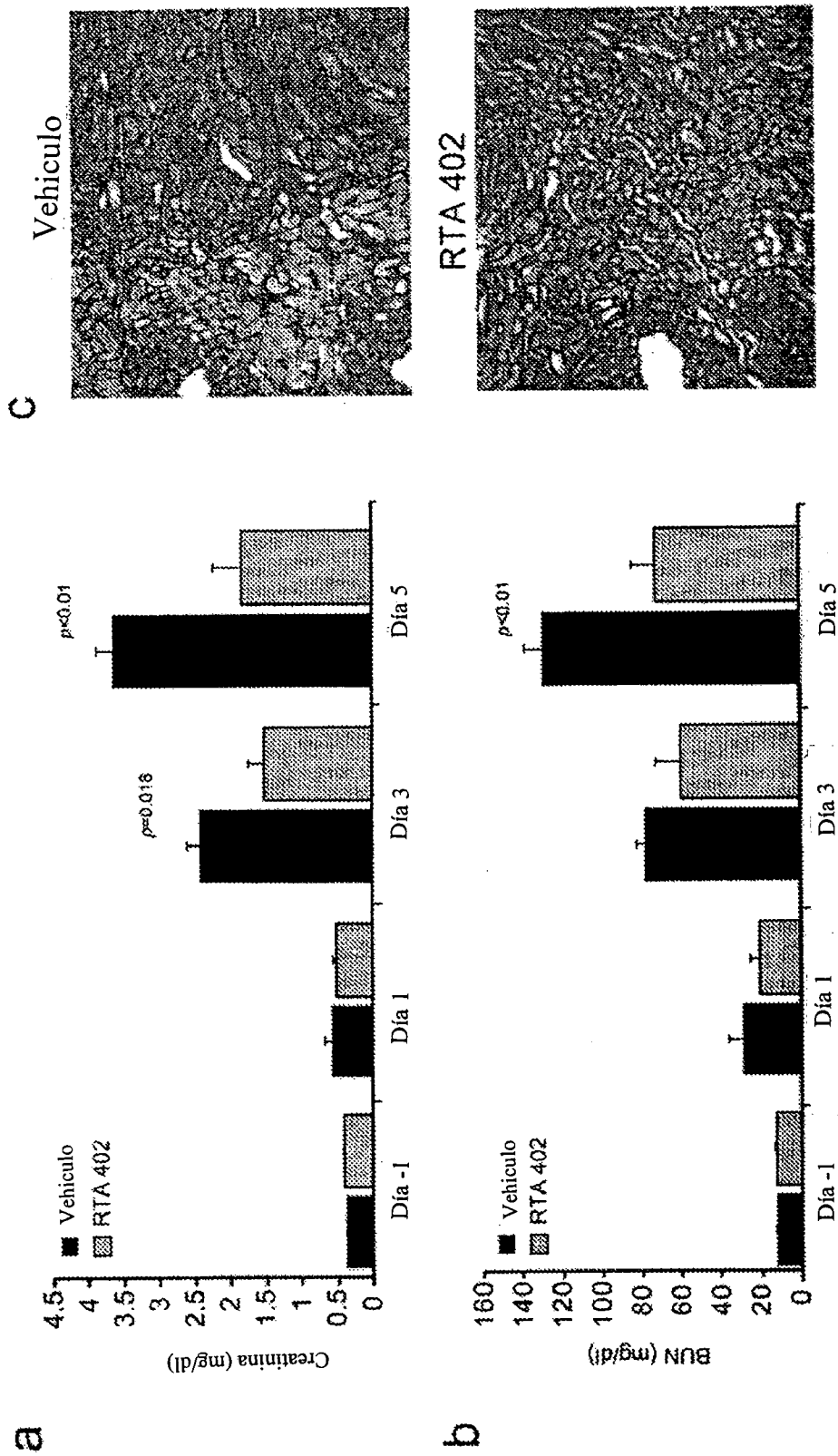
Agent for Applicant(s)

FULBRIGHT & JAWORSKI, L.L.P.
600 Congress Avenue, Suite 2400
Austin, Texas 78701
Telephone No.: 512.474.5201
Facsimile No.: 512.536.4598

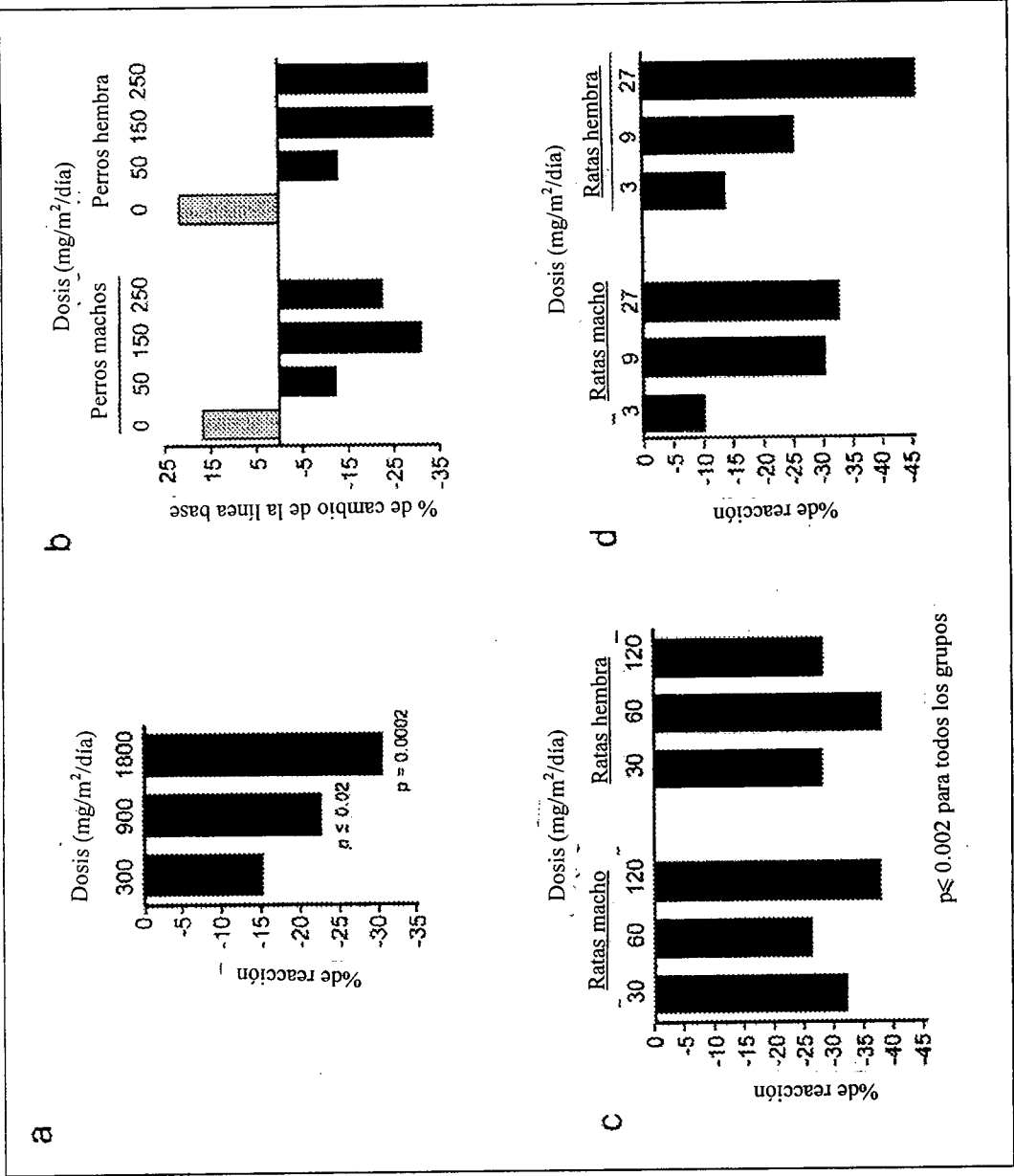
Date: May 5, 2009



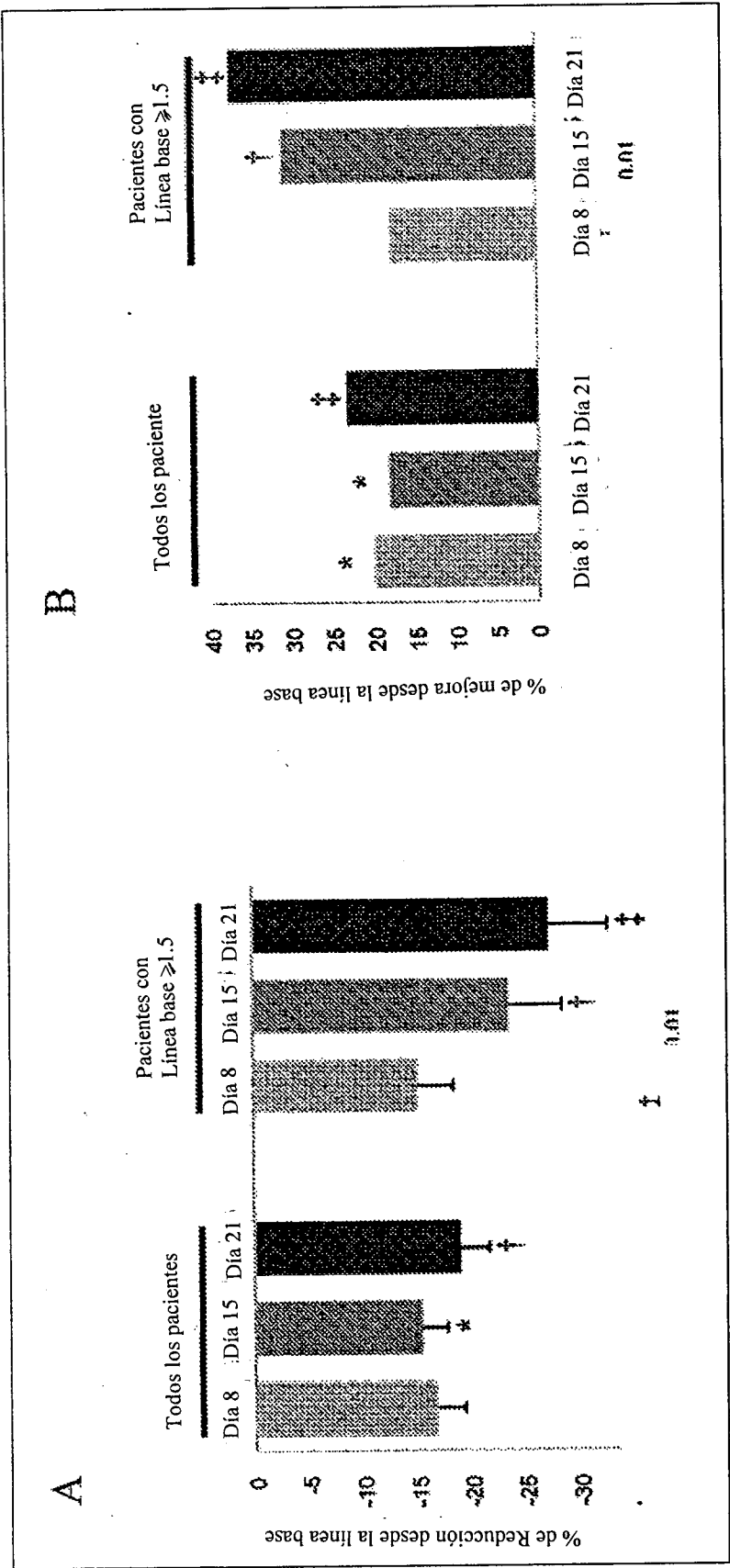
FIGURAS 1A-D



FIGURAS 2A-C



FIGURAS 3A-D



FIGURAS 4A-D

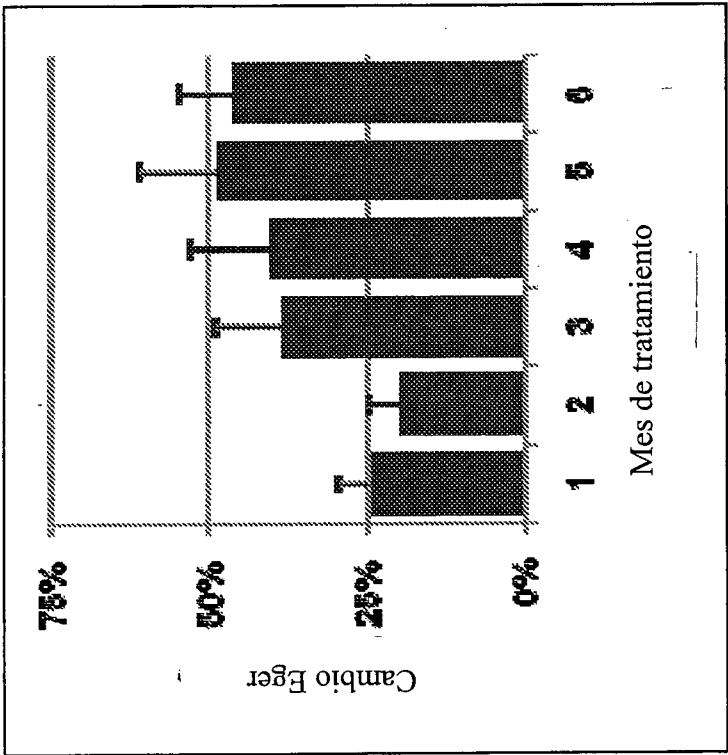


FIGURA 5

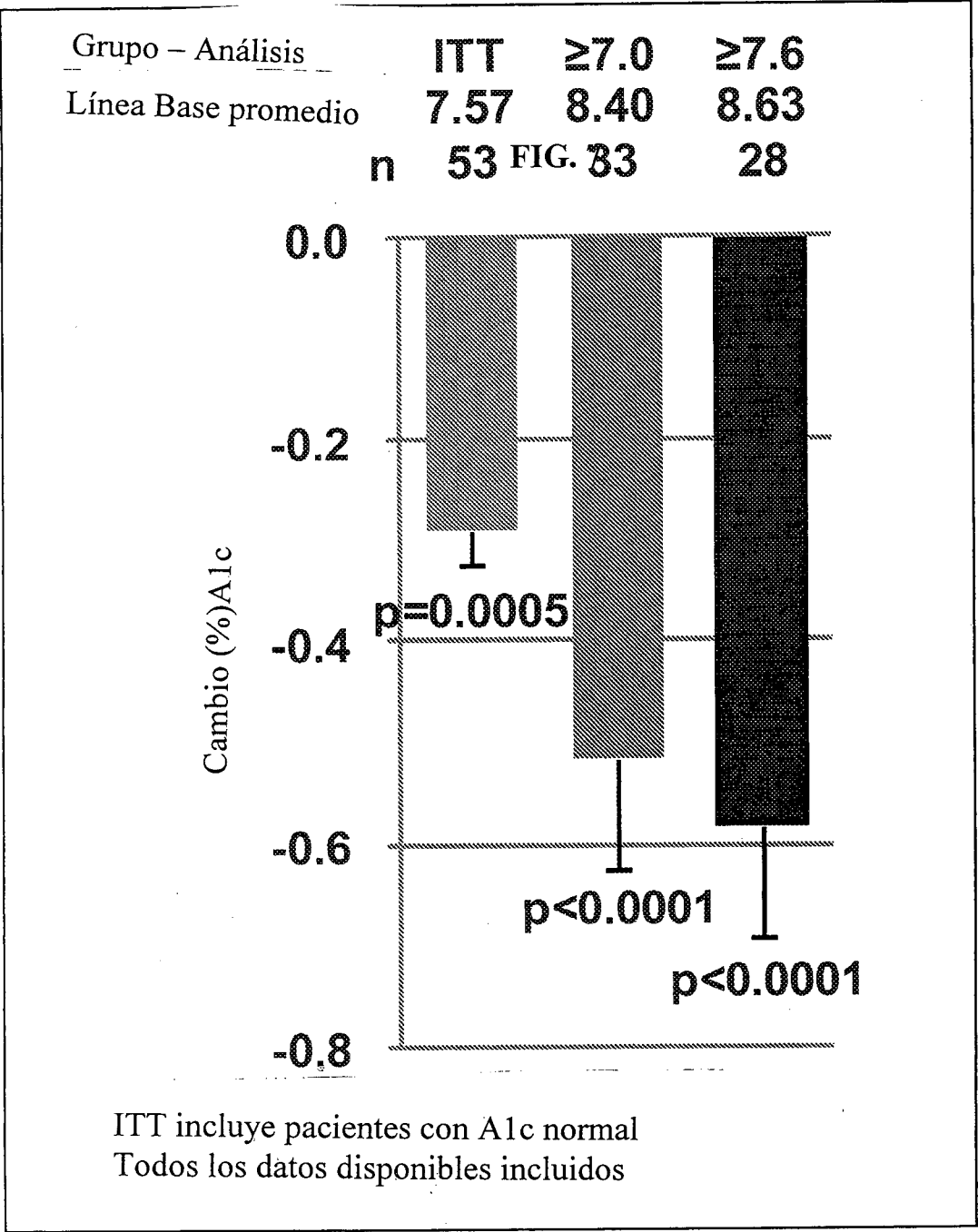


FIGURA 6

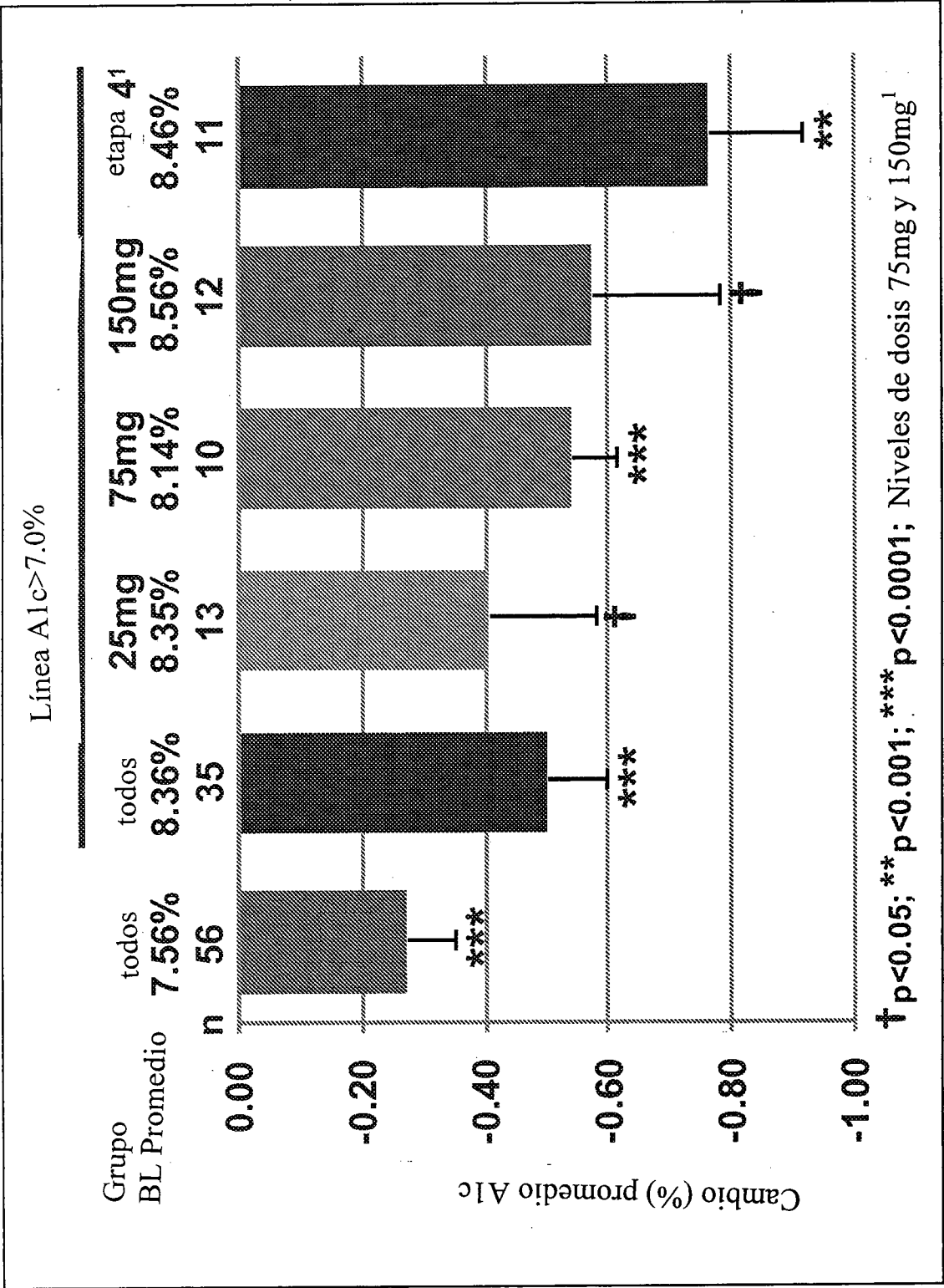


FIGURA 7

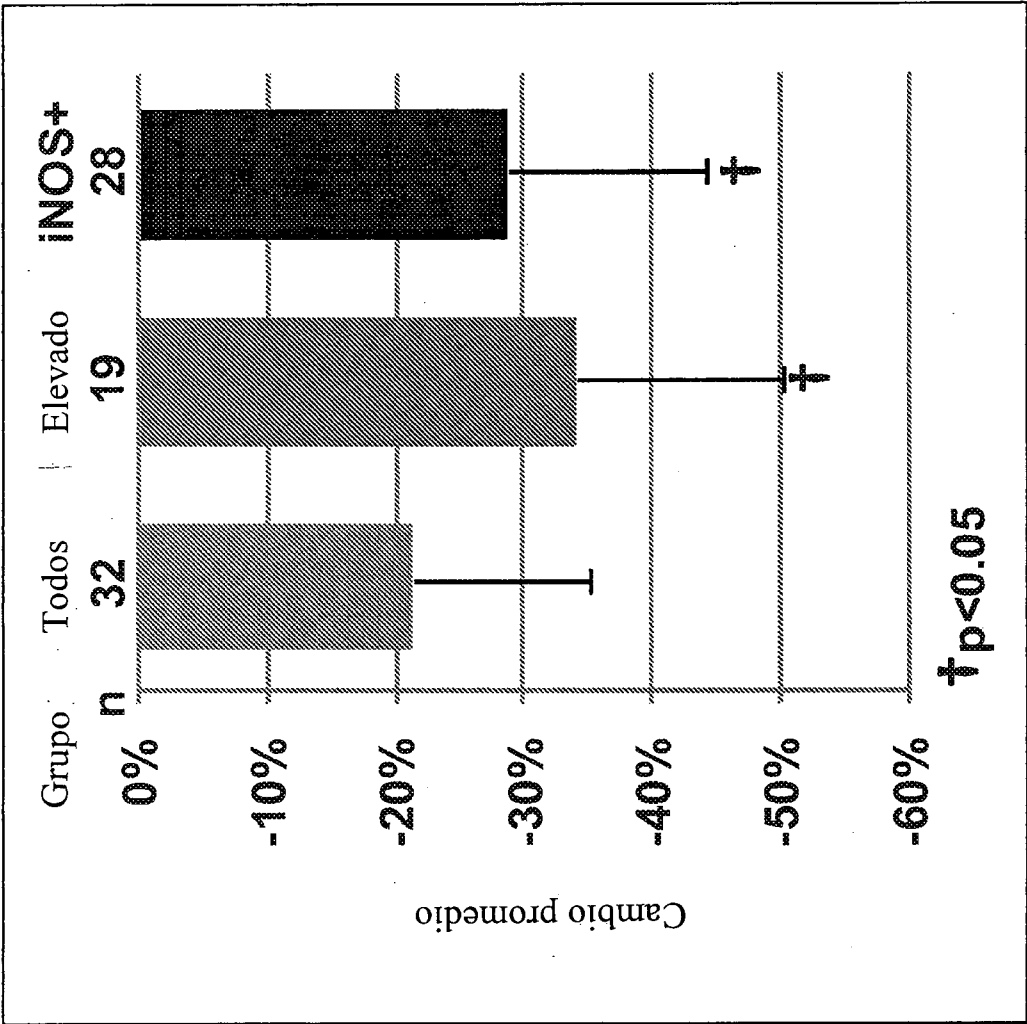


FIGURA 8

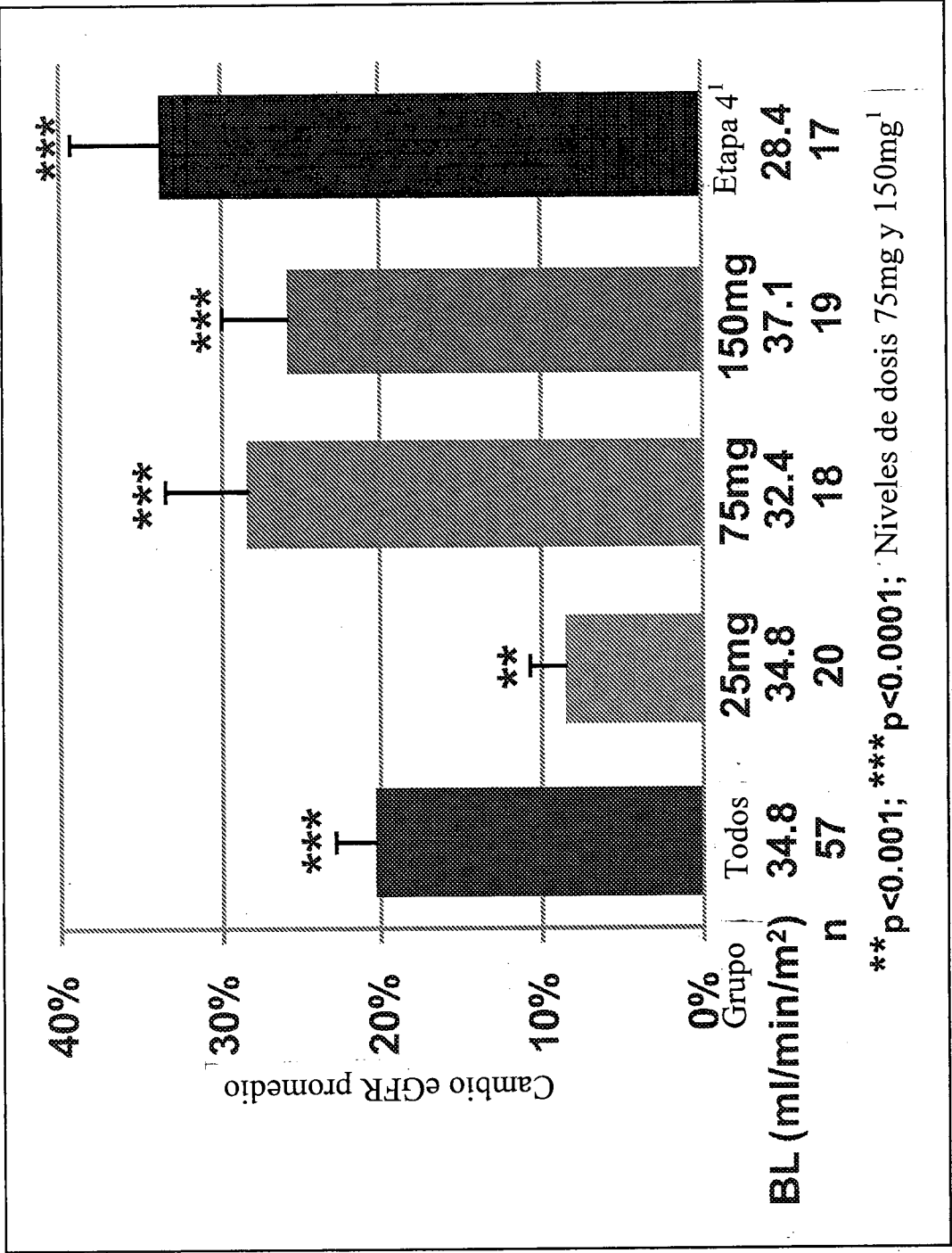


FIGURA 9

10/15

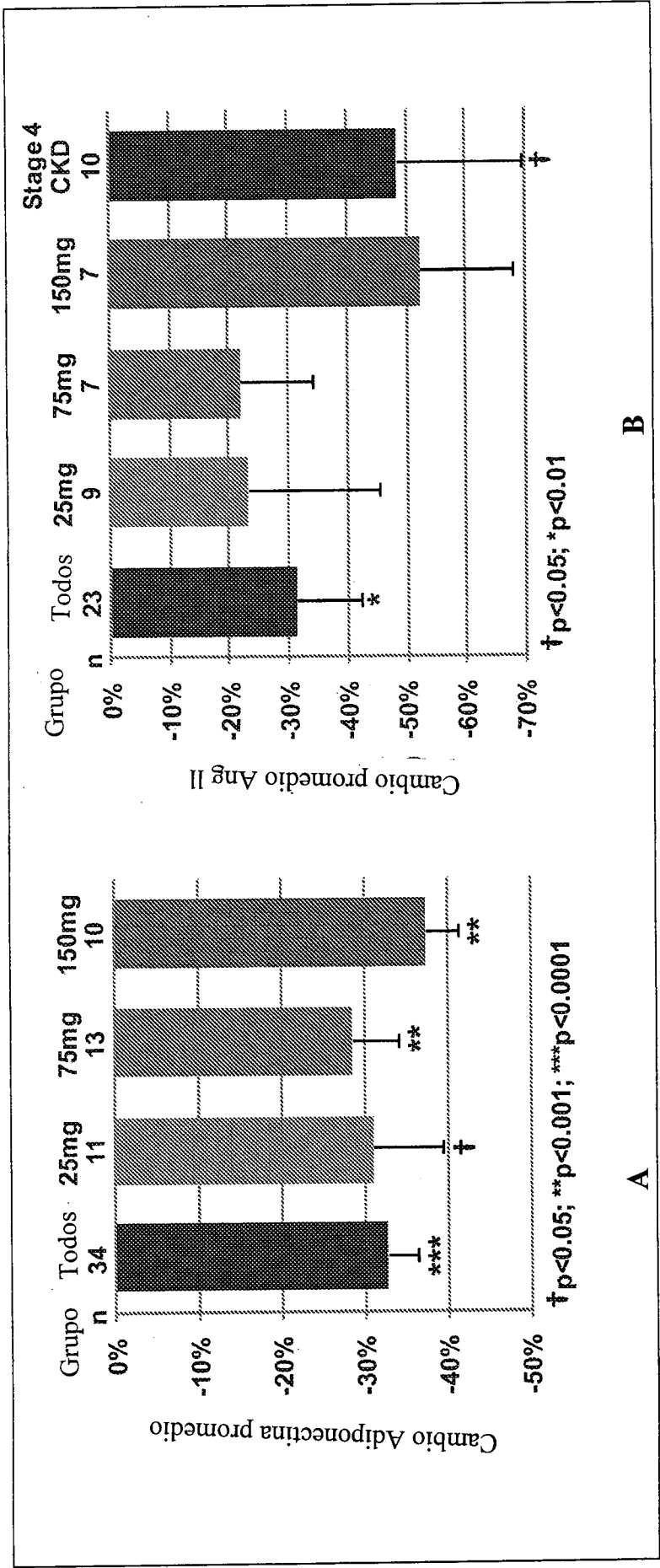


FIGURA 10A-B

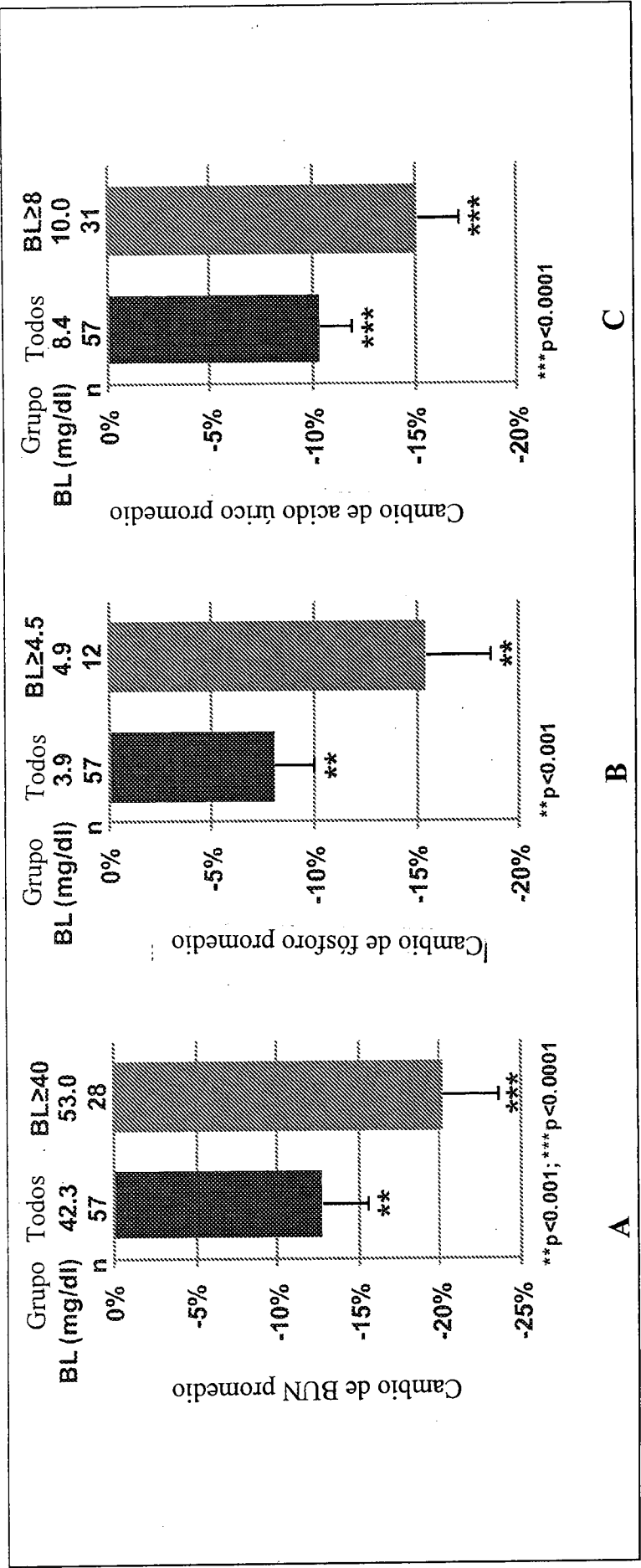


FIGURA 11A-C

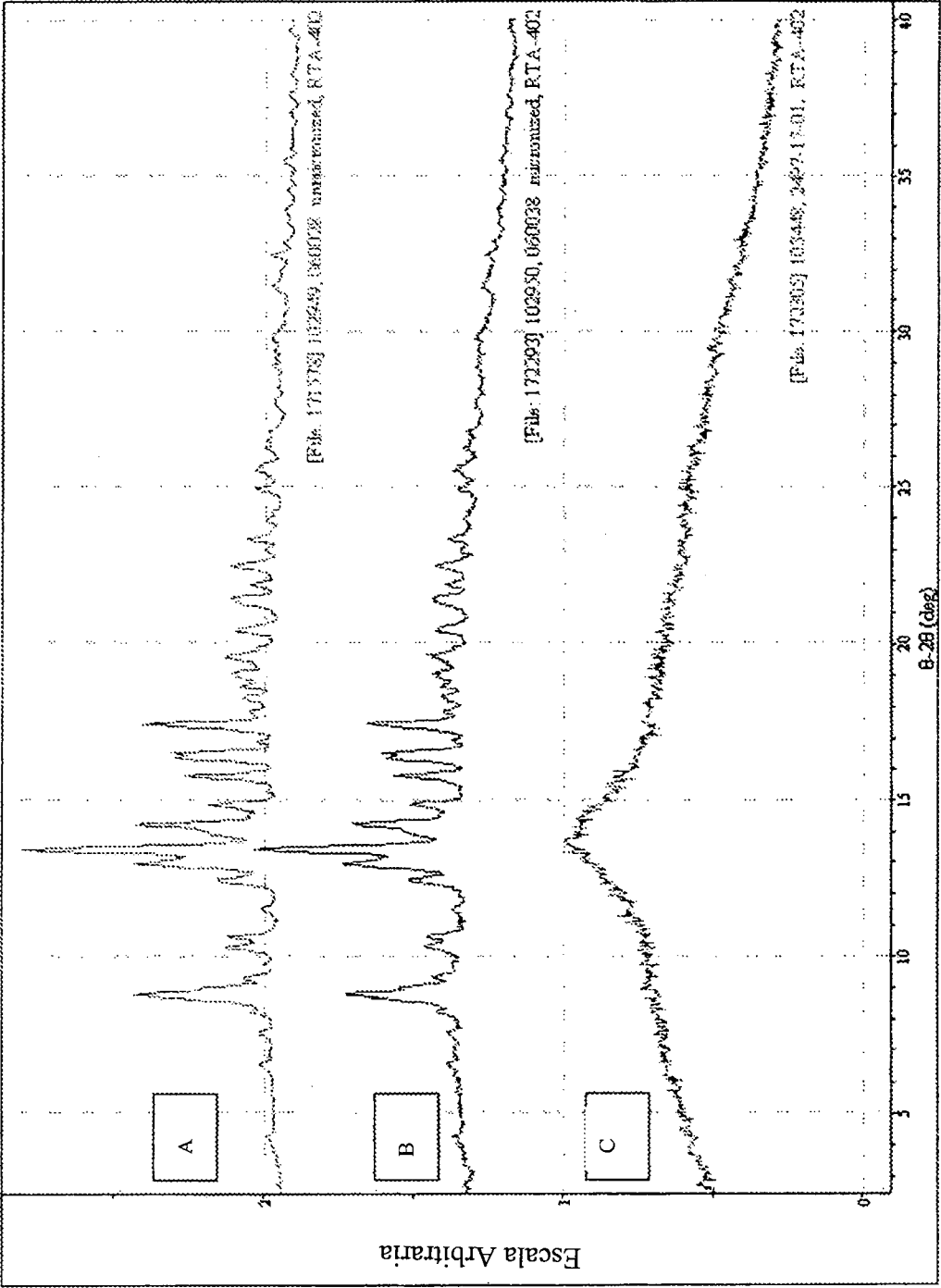


FIGURA 12A-C

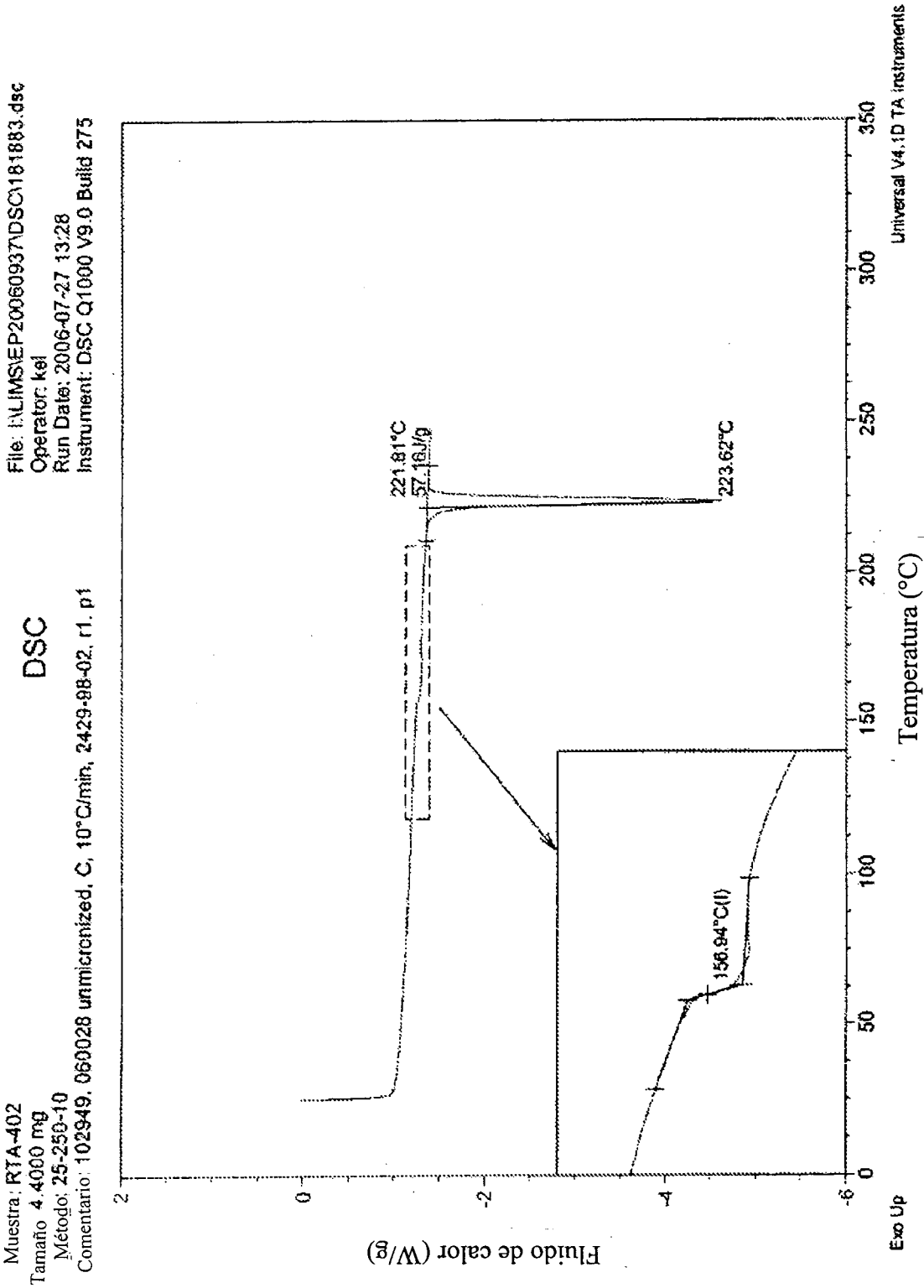


FIGURA 13

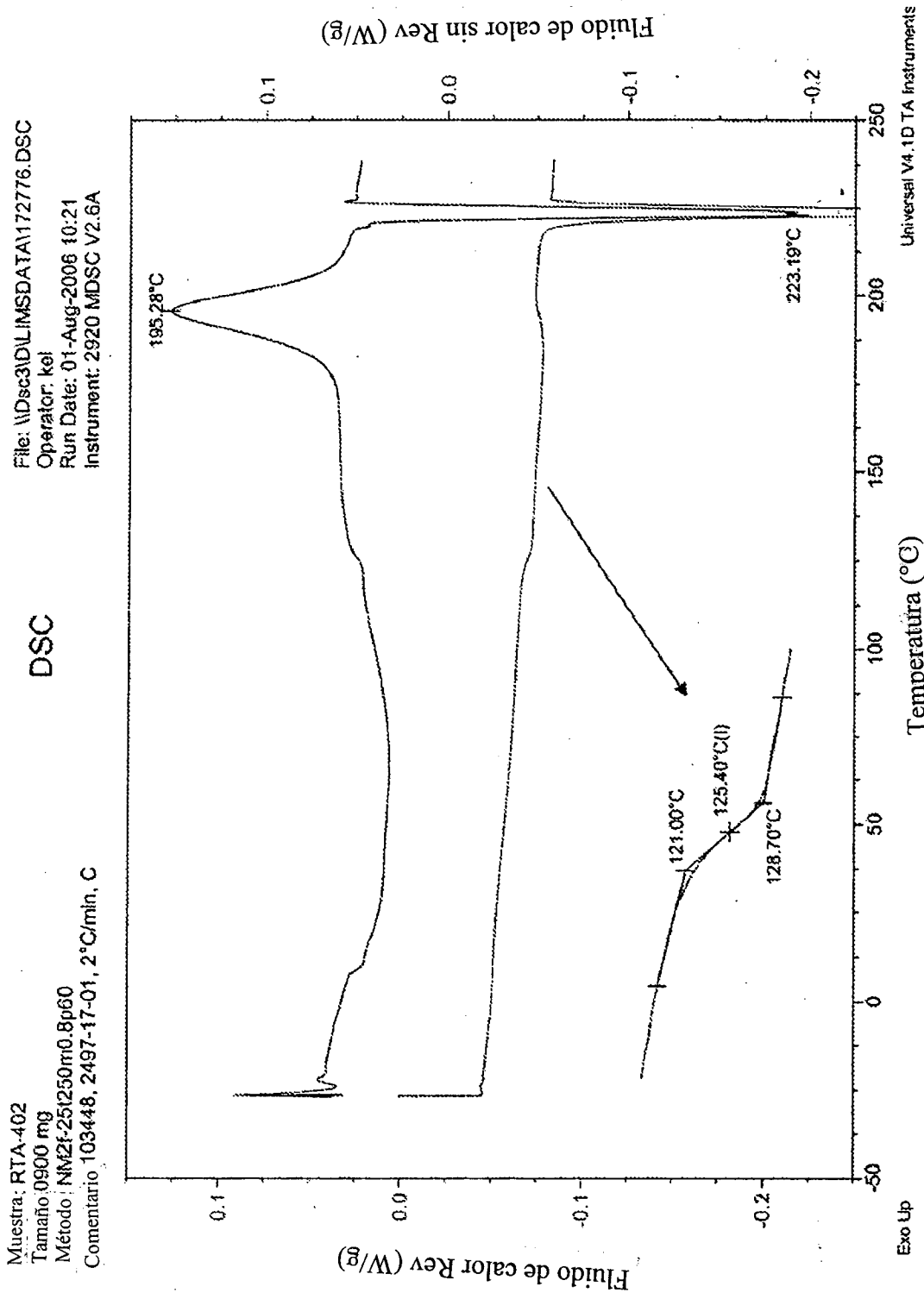


FIGURA 14

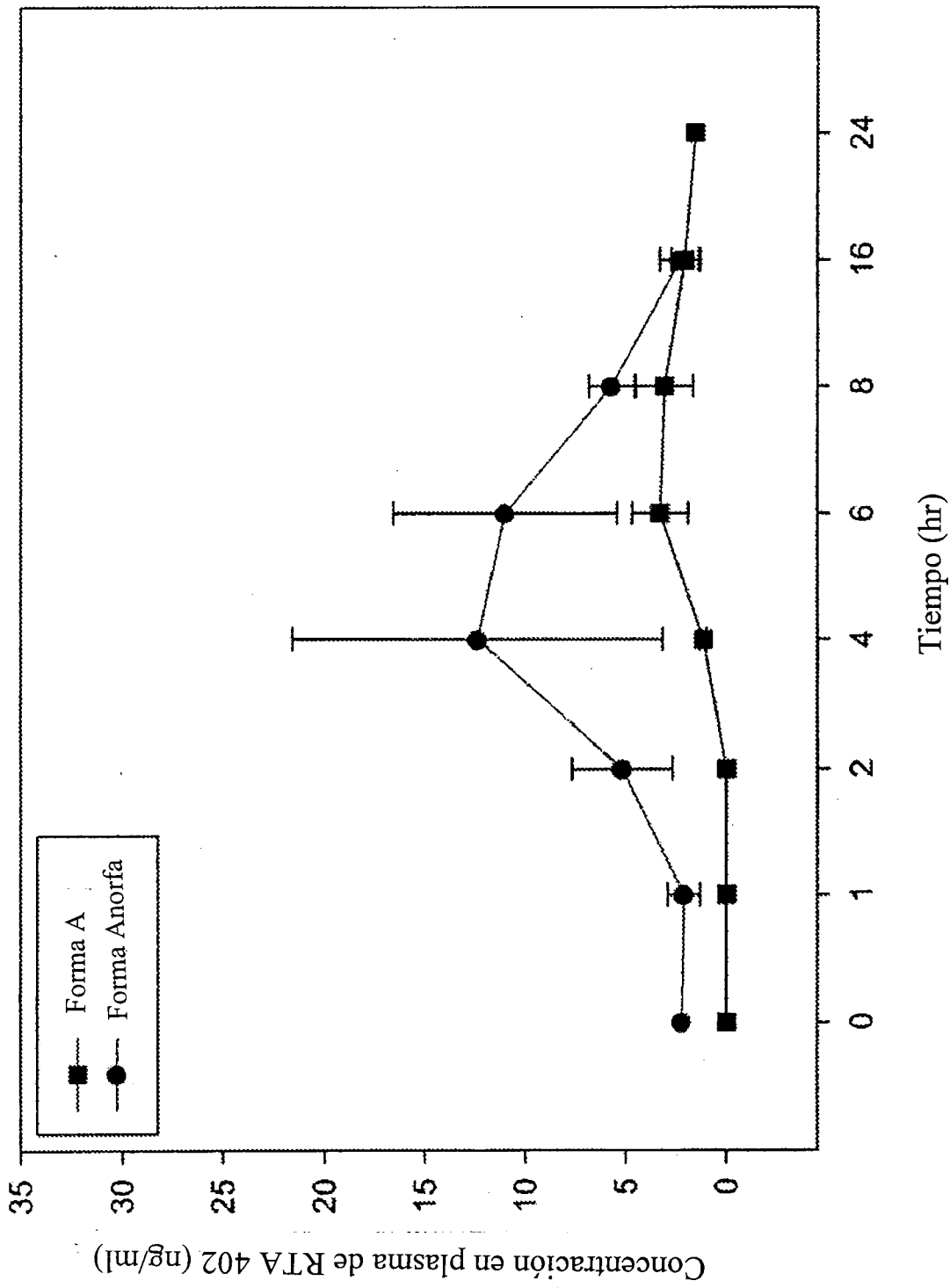


FIGURA 15



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D' ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
REATA PHARMACEUTICALS INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 098518
	Solicitud internacional	PCT/US2009/030771
	Fecha inicio fase nacional	11/08/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1 2 5 4 4

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 098518



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

24 SET. 2010