



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 361 422**

⑤① Int. Cl.:
A61K 31/198 (2006.01) **A23L 1/305** (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01) **A61P 37/08** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) **A61P 17/06** (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) **A61K 38/06** (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **06024288 .0**

⑨⑥ Fecha de presentación : **08.02.2002**

⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1749524**

⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2007**

⑤④ Título: **Compuestos antiinflamatorios.**

③⑩ Prioridad: **14.02.2001 DE 101 06 852**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2011

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2011

⑦③ Titular/es: **Thomas Luger**
Langemarck Strasse 64
48147 Münster, DE
Thomas Brzoska y
Stephan Grabbe

⑦② Inventor/es: **Luger, Thomas**

⑦④ Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 422 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos antiinflamatorios

5 La hormona tridecapeptídica estimulante de α -melanocitos (α MSH) se origina a partir de la hormona precursora proopiomelanocortina (POMC). Varias hormonas peptídicas biológicamente activas como p. ej. la β -lipotropina, la adrenocorticotropina (ACTH), la β -endorfina y las melanotropinas (α , β y γ MSH) se derivan del producto génico de la POMC. Para el procesamiento de estos péptidos son necesarias enzimas proteolíticas con diferentes especificidades. Aparte de esto, pueden tener lugar modificaciones postraduccionales tales como acetilaciones.

10 Los efectos de la α MSH y de otros péptidos de la POMC sobre diferentes tejidos son inducidos por una familia de receptores específicos. Estos receptores de melanocortina (MC) pertenecen al grupo de receptores acoplados a la proteína G. Se clonaron cinco receptores de melanocortina diferentes (MC-1 a MC-5). Se acepta que la α MSH es una señal importante para la regulación de distintas funciones de los melanocitos. Por ejemplo, la proliferación, diferenciación y producción de citoquinas de melanocitos estarían influenciadas por la α MSH.

15 También se mostró que los productos génicos de la POMC pueden influir en reacciones inmunes y reacciones inflamatorias. Por ejemplo, se parte de que la α MSH regula a la baja varias citoquinas proinflamatorias, mientras que la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 se estimula mediante α MSH. La α MSH tiene con ello una función importante en la supresión de reacciones inmunes e inflamatorias. Varios estudios apuntan a que los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de la α MSH son inducidos por la región C-terminal del α MSH (aminoácidos 11-13: Lys-Pro-Val), pues la administración del tripéptido C-terminal es suficiente para inducir estos efectos (Catania y Lipton, 1993, Endoc. Rev. 14, 564-576; Bhardvaj et al., 1996, J. Immunol. 156, 2517-2521).

20 El documento WO 88/00833 divulga la utilización del tripéptido Lys-Pro-Val en la producción de un medicamento para el tratamiento de inflamaciones. El tripéptido C-terminal de α MSH también se ha propuesto como agente contra la caída del cabello (FR 2 733 421).

25 Rajora et al (1997) Peptides, Vol. 18(3), 381-385, describe experimentos para examinar los mecanismos en que se basan las enfermedades inflamatorias intestinales. Para ello se administró el péptido α -MSH a un ratón de muestra de colitis. Los resultados apuntaron a que el α -MSH experimental modula enfermedades inflamatorias intestinales inducidas.

El documento WO 99/57148 A1 describe compuestos que serían selectivos para el receptor I de la melanocortina. La selección de compuestos se basa en que estos se unen con gran afinidad al receptor MC1, pues α -MSH presenta una gran afinidad por el receptor MC1.

30 Macaluso et al (1994) The Journal of Neuro-science 14(4), 2377-2382, describe estudios sobre el efecto antiinflamatorio de moléculas de α -MSH gracias a sus efectos centrales y periféricos.

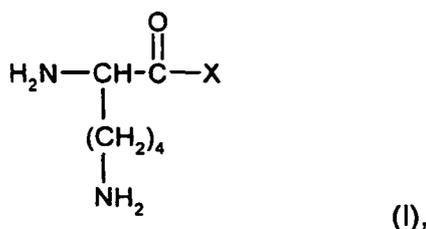
El documento WO 89/09226 A1 divulga distintos péptidos para el tratamiento del dolor, incluyendo los péptidos reivindicados.

El documento WO 02/06316 A describe polipéptidos que contienen α -MSH, para el tratamiento de inflamaciones.

35 Un objetivo de la presente invención es poner a disposición otros compuestos antiinflamatorios.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el tripéptido Lys-Pro-Thr presenta propiedades antiinflamatorias. En contra de lo esperado, compuestos incluso más pequeños como Lys-Pro muestran propiedades ventajosas.

El objetivo de la presente invención es por tanto un compuesto con la fórmula (I)



40 en la que X es Pro o Pro-Thr, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su aplicación en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias del intestino. El concepto "enfermedades inflamatorias" comprende no sólo las inflamaciones, sino también las enfermedades en las que está implicada una inflamación, como por ejemplo, las enfermedades autoinmunes o los rechazos a los implantes.

El compuesto utilizado conforme a la invención puede ser el dipéptido lisina-prolina, pero preferiblemente se utiliza el

tripéptido lisina-prolina-treonina (=KPT).

Los aminoácidos que se dan de manera natural presentan generalmente la configuración (L). Los aminoácidos de los compuestos utilizados conforme a la invención pueden tener o bien la configuración (L) o bien la (D). Por tanto, posibles compuestos de la estructura KPT son

- 5 (L)Lys-(D)Pro-(L)Thr,
 (L)Lys-(L)Pro-(D)Thr,
 (L)Lys-(D)Pro-(D)Thr,
 (L)Lys-(L)Pro-(L)Thr,
 (D)Lys-(D)Pro-(L)Thr,
 10 (D)Lys-(D)Pro-(D)Thr,
 (D)Lys-(L)Pro-(L)Thr,
 (D)Lys-(L)Pro-(D)Thr,

siendo preferido entre todos el compuesto (L)Lys-(D)Pro-(L)Thr.

- 15 El compuesto de la fórmula (I) puede estar modificado químicamente en el N-terminal y/o en el C-terminal, por ejemplo por un grupo acilo, preferiblemente un grupo acetilo en el N-terminal y/o una amidación o esterificación en el C-terminal. Son también posibles otros grupos protectores conocidos de por sí.

En el marco de la presente solicitud, la expresión "compuesto de la fórmula (I)" también comprende las sales farmacéuticamente tolerables del compuesto.

- 20 Los compuestos citados se pueden utilizar para el tratamiento de todo tipo de inflamaciones agudas o crónicas del intestino. A ellas pertenecen, entre otras, las inflamaciones agudas y crónicas, p. ej. las enfermedades autoinmunes y los rechazos a los trasplantes.

- 25 Conforme a la invención, los péptidos se utilizan para las enfermedades inflamatorias intestinales. Además de las irritaciones temporales del intestino, que se pueden causar debido a intoxicaciones alimentarias leves, ejemplos de enfermedades inflamatorias son las enfermedades intestinales crónicas, como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.

Los compuestos utilizados conforme a la invención son también efectivos para tratar o prevenir inflamaciones de manera sistémica. El compuesto se administra entonces preferiblemente por vía intraperitoneal, intravenosa u oral. La dosis de una administración es en general de 20 µg a 10 mg por kg de peso corporal, preferiblemente 100 µg a 1 mg por kg de peso corporal.

- 30 Por último, los compuestos mencionados también se pueden utilizar en forma de pulverización, por ejemplo en inhalación, para el tratamiento de inflamaciones de las vías respiratorias.

Es posible emplear varios compuestos distintos de la fórmula (I) para el tratamiento. En esta forma de realización, para el tratamiento de inflamaciones se utilizan al menos dos compuestos diferentes de la fórmula (I).

- 35 Los compuestos de la fórmula (I) se pueden utilizar también para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de inflamaciones. Esta utilización comprende de manera análoga todas las formas de realización antes indicadas. El compuesto se mezcla habitualmente con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Procedimientos conocidos de por sí para la fabricación de medicamentos se indican en Forth, Henschler, Rummel (1996). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer.

- 40 Los compuestos de la fórmula (I) se pueden añadir también a productos alimenticios para reducir el potencial alérgico de determinados componentes de los productos alimentarios. La concentración en los productos alimentarios puede ser de 1 µM a 1 mM.

También es posible utilizar un compuesto de la fórmula (I) como aditivo no farmacológico en cosméticos. Por ejemplo, en el caso de piel irritada o tras la exposición al sol, se pueden emplear cremas que contengan un compuesto de la fórmula (I).

- 45 El péptido Lys-Pro-Thr impide la activación del factor de transcripción NF-κB mediante TNFα, IL-1 o LPS en células endoteliales y en queratinocitos. Como consecuencia, se llega a una expresión reducida de moléculas de adhesión celular (células endoteliales) y quimiocinas (queratinocitos). Los inventores pudieron demostrar también que el péptido KPT, por ejemplo, impide la aparición de alergias de contacto (Contact Hypersensitivity Reactions, CHS Reactions) e induce una tolerancia específica a los alérgenos duradera. En el caso de las reacciones de CHS hay que diferenciar dos períodos: un primer contacto (fase de inducción) con un antígeno sienta las bases para una reacción de CHS posterior; el siguiente contacto con el antígeno lleva a la aparición de la reacción (eczema de contacto, es decir, hinchazón, picazón, etc). Los compuestos utilizados conforme a la invención se pueden emplear antes de los dos períodos, en el caso de su empleo antes del primer contacto (por inyección o administración tópica) se llega a reprimir la CHS y a la inducción de tolerancia; si se emplea en el momento en que surge el eczema de
- 50

contacto, los compuestos impiden la aparición del eczema. En todas estas aplicaciones se llega a una inhibición prácticamente total de la reacción alérgica.

5 También se ha encontrado que Lys-Pro-Thr reduce la expresión de moléculas coestimulantes en células dendríticas. Con gran probabilidad, se trata de una parte del mecanismo para la represión de CHS y de la inducción de tolerancia. Al mismo tiempo, los compuestos incrementan la secreción del IL-10 antiinflamatorio a través de monocitos. Este efecto forma también parte del mecanismo en el contexto de los eczemas de contacto alérgicos.

10 Los compuestos conformes a la invención podrían unirse a receptores β -adrenérgicos. También se puede partir de que los péptidos empleados conforme a la invención tienen la capacidad de unirse al receptor de IL-1 de tipo I. No se puede excluir tampoco que los péptidos conformes a la invención se unan también a otros receptores, como por ejemplo al receptor κ -opioide. Partiendo de esta aceptación, se piensa que los péptidos conformes a la invención se pueden unir a varios receptores, que tras la activación y a través de sus ligandos originales intervendrían todos de forma pro-inflamatoria en el episodio inflamatorio. Con la unión de los péptidos conformes a la invención a estos receptores se impide la unión de los ligandos originales a estos receptores y con ello, se impide la inducción de los efectos pro-inflamatorios. Por otra parte, la unión de los péptidos conformes a la invención a los receptores de sus sustancias base (α MSH) activa estos receptores e induce así un nuevo componente del mecanismo de acción, que es antiinflamatorio en conjunto.

La figura 1 muestra que la inyección intravenosa de α MSH, KPV (lisina-prolina-valina) o KPT (lisina-prolina-treonina) reprime la fase de sensibilización de CHS ("contact hypersensitivity reaction", reacción de hipersensibilidad al contacto).

20 La figura 2 muestra que la administración intravenosa de α MSH, KPV o KPT puede inducir tolerancia.

La figura 3 ilustra la secreción de IL-10 (interleucina 10) por PBL humanos ("peripheral blood lymphocytes", linfocitos de sangre periférica) 24 horas después del tratamiento con α MSH, KPV o KPT.

La figura 4 muestra la secreción de IL-10 por PBL humanos 48 horas después del tratamiento con α MSH, KPV o KPT.

25 La figura 5 muestra que los linfocitos THP-1 (una línea celular monocítica) expresan receptores de α MSH.

Las figuras 6a-6d, 7a-7d y 8a-8d muestran que en un ensayo de competición, las α MSH, KPV o KPT no marcadas pueden desplazar a la α MSH marcada con biotina de los puntos de unión a linfocitos THP-1

30 La figura 9a muestra la expresión de "Cell Adhesion Molecules" (CAMs) sobre la superficie de células HMEC-1 ("Human Microvascular Endothelial Cell Line 1") 24 horas después del tratamiento con TNF α + α MSH o TNF α + KPT.

La figura 9b muestra la adhesión de linfocitos a HDMEC ("Human Dermal Microvascular Endothelial Cells") (Chromium Release Assay). A: Molt4 Linfocitos-T; B: JY linfocitos-B.

La figura 10 muestra la influencia de α MSH, KP, KPV o KPT sobre la activación de NF- κ B (factor nuclear κ B) en células HMEC-1 tratadas en LPS (lipopolisacárido).

35 La figura 11a muestra que el número de vasos que expresan E-selectina en cortes de tejidos disminuye mediante tratamiento con α MSH.

La figura 11b muestra que el número de lesiones petequiales en las orejas de ratones tratados con LPS se reduce mediante tratamiento con α MSH.

40 La figura 12 muestra que se puede reprimir la CHS e inducir tolerancia mediante el tratamiento in vitro de BMCD ("bone marrow derived dendritic cells", células dendríticas derivadas de médula ósea) con α MSH o KP.

La figura 13a muestra que en un "Band Shift Assay" de NF- κ B, la intensidad de las bandas heterodímeras NF- κ B -p65/p50 se reduce con el uso de distintos péptidos derivados de α MSH.

45 La figura 13b muestra el efecto de α MSH, KP o K en la reacción CHS y el efecto de α MSH o KP en la inducción de tolerancia en ratones BalbC.

La figura 14 muestra la represión de CHS mediante linfocitos T que fueron puestos en contacto in vitro con DC cargadas de antígenos y tratadas con α MSH o con un derivado.

La figura 15 muestra la inducción de tolerancia mediante linfocitos T que fueron puestos en contacto in vitro con DC cargadas de antígeno y α MSH.

50 La figura 16 muestra la sobreexpresión de CTLA-4 en linfocitos T después del contacto con DC cargadas de

antígenos y tratadas con α MSH o con un derivado. A: linfocitos T CD4 positivos; B: linfocitos T CD8 positivos.

Los siguientes ejemplos explicarán en detalle la invención.

Ejemplo 1

Ratones:

- 5 Se recibieron ratones Balb/C hembra de 7 a 10 semanas de edad de Charles River (Sulzfeld, Alemania) y se mantuvieron de acuerdo con las normativas federales.

Administración de α MSH (ejemplo de referencia), KPV (ejemplo de referencia), KPT o KP:

- 10 La α MSH, y los péptidos se conservaron hasta su utilización como partes alícuotas a -20°C. Antes de la inyección, el compuesto respectivo se disolvió en PBS y 0,1% de suero de ratón y, hasta el momento de la inyección intravenosa en la vena caudal de los ratones, se conservó en hielo. Se inyectaron 5 μ g de α MSH o 1,5 μ g de péptido (KP: 50 μ g) por cada ratón 2 horas antes de la sensibilización.

Determinación de la CHS y la tolerancia:

- 15 Los ratones fueron sensibilizados mediante la extensión de 75 μ l de DNFB al 0,5% en acetona-aceite de oliva (4:1) sobre el vientre rasurado de ratones no tratados previamente. Para desencadenar la CHS, a los ratones se les untaron las orejas con 10 μ l de DNFB al 0,3%, en ambos lados de una oreja. La CHS se determinó por el grado de hinchazón de la oreja expuesta al hapteno, en comparación con la otra oreja tratada como control, y se midió con un compás de espesores tensado con resorte, 24 horas después de la exposición al hapteno. Los ratones cuyas orejas fueron expuestas a hapteno sin previa sensibilización sirvieron de control negativo. Para determinar si la inyección de α MSH o de péptidos antes de la aplicación del hapteno conduce a la inducción de tolerancia, se inyectaron a los ratones de manera intravenosa (abdomen) α MSH o péptidos 2 horas antes de la sensibilización o se les expuso (oreja izquierda) como se ha descrito. Para confirmar la supresión de la CHS inducida por α MSH, se expuso las orejas de los ratones al hapteno, 7 días después de la sensibilización, y de 24 a 36 horas después se determinó la respuesta de hinchazón de la oreja. 14 días después se sensibilizaron nuevamente los mismos ratones en la espalda rasurada (ahora en ausencia de α MSH exogénico) y se examinó su capacidad de inducir una respuesta de CHS con una segunda exposición a hapteno en la oreja derecha, una semana después.
- 25

En algunos experimentos se utilizaron preparados tópicos de α MSH. En estos experimentos, los ratones se untaron en la zona de la sensibilización (abdomen) inmediatamente antes, o 3 o 24 horas antes de la sensibilización.

Resultado:

- 30 La inyección intravenosa de α MSH, o bien de KPV, KPT o KP, inhibe la capacidad de los ratones de inducir una respuesta de CHS a una exposición a DNFB que tuvo lugar 7 días más tarde. Por tanto, estos ratones no desarrollan ninguna sensibilización específica a DNFB. El KPT reprimió la respuesta de CHS de la manera más eficaz (véanse figuras 1 y 13b).

- 35 Para diferenciar entre inmunosupresión temporal y tolerancia inmunológica específica, los ratones fueron sensibilizados por segunda vez y expuestos a hapteno. Los ratones que habían sido inyectados con α MSH, KPV o KPT antes de la primera sensibilización, no pudieron ser sensibilizados ni siquiera por aplicación de una segunda dosis de haptenos sensibilizantes, lo que apunta a que estos ratones han desarrollado tolerancia frente a DNFB. KPV mostró un efecto débil, mientras que α MSH, KPT y KP inhibieron de manera muy potente la respuesta de hinchazón de la oreja (véanse figuras 2 y 13b).

Ejemplo 2

Material y métodos:

- 40 Se separaron células mononucleares (PBMC) de "Human Buffy Coats" por centrifugación en gradiente de densidades de Ficoll-Hypaque. Las células (1×10^6 por ml), cultivadas en RPMI 1640 con antibióticos y 10% de FCS, o bien no fueron tratadas o se estimularon con α MSH (ejemplo de referencia) o con los péptidos KPV (ejemplo de referencia) o KPT, con o sin IL-1 β (10 U/ml). Los sobrenadantes de los cultivos de PBMC se reunieron después de 45 24 o 48 horas de incubación y se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización. Para la detección de IL-10 se empleó un ELISA que se puede adquirir comercialmente.

Resultados:

- 50 Los PBMC humanos que no fueron tratados o que habían sido tratados con distintas concentraciones de α MSH o de péptidos, tras 24 horas de incubación solo produjeron concentraciones bajas de IL-10 (5-10 μ g/ml). La α MSH (10^{-11} M), KPV (10^{-8} a 10^{-9} M) y KPT (10^{-8} a 10^{-9} M) induce de forma evidente la producción de IL-10 (véase figura 3).

Tras 48 horas de incubación, los PBMC humanos produjeron cantidades importantes de IL-10. La α MSH, KPV y

KPT incrementaron de manera importante la producción de IL-10 mediante PBLC humano. No hubo una diferencia esencial entre la α MSH y los péptidos (véase figura 4).

Los resultados mostrados prueban que el péptido KPT, como α MSH y KPV puede inhibir la sensibilización de CHS después de su administración intravenosa, y puede inducir tolerancia específica a los haptenos. KPT también está en condiciones de inducir IL-10 in vivo e in vitro. Los datos muestran que es también probable que el efecto inmunosupresor del α MSH in vivo no dependa sólo de la inducción de IL-10.

Ejemplo 3

Material y métodos:

Todas las etapas se llevaron a cabo a una temperatura de 0° C hasta 4° C. La línea celular monocítica THP-1 se lavó una vez en PBS, una vez en solución tampón de glicina ácida (glicina 50 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 3) y tres veces con RPMI. A continuación se resuspendieron las células ($2,5 \times 10^6$ por ml) en 100 μ l de RPMI/1% de BSA y se transfirieron a placas de microtitulación con 96 pocillos. Después de la adición de α MSH (10^{-10}) marcado con biotina se incubaron las células durante 1 hora a 4°C, se lavaron una vez con PBS, se resuspendieron en 100 μ l de PBS/1% de BSA y se incubaron en oscuridad con estreptavidina (40 μ g/ml) marcada con FITC durante 30 minutos a 4°C. Después de una última etapa de lavado, las células se resuspendieron en PBS. La cantidad de α MSH ligada marcada con biotina, se analizó con un citómetro de caudal. En experimentos de control, las células se incubaron sin α MSH marcado con biotina pero en presencia de estreptavidina FITC. Las células muertas fueron excluidas por adición de yoduro de propidio poco antes del análisis de FACS. La especificidad de la unión del MSH marcado con biotina se determinó por adición de α MSH sin marcar (de 10^{-6} a 10^{-12} M) (ejemplo de referencia), KPV (ejemplo de referencia) o KPT (de 10^{-6} a 10^{-12} M).

Resultados:

Según el análisis de FACS con α MSH marcado con biotina, los linfocitos THP-1 no estimulados expresan cantidades significativas en puntos de unión que son específicos de α MSH, en comparación con las partidas de control que sólo se incuban con estreptavidina FITC. En este experimento se empleó α MSH en una concentración 10^{-10} M (véase figura 5).

Para determinar si los linfocitos THP-1 expresan uno de los conocidos receptores de melanocortina (MC), se llevó a cabo un RT-PCR con iniciadores específicos MC-1, MC-2, MC-3 y MC-4. Todo el RNA se obtuvo a partir de linfocitos THP-1. Se detectó un producto de PCR específico de MC-1 con una longitud esperada de 416 pb (Rajora et al., 1996, J. Leuk, Biol. 59, 248). No se detectaron productos de PCR específicos de MC-2, MC-3 o MC-4. Estos resultados ponen de manifiesto que los linfocitos THP-1 expresan MC-1, el cual, al contrario que otros receptores de melanocortina, es específico de α MSH y ACTH.

Para examinar si los puntos de unión que se expresan sobre THP-1 son específicos de α MSH, se llevaron a cabo experimentos de competición con α MSH o KPV o KPT. La unión específica se obtuvo por incubación de células de THP-1 con α MSH marcado con biotina (10^{-10} M) y distintas concentraciones de α MSH o péptidos no marcados. El α MSH no marcado, en una concentración de 10^{-8} reprimió significativamente la unión de α MSH. Cuando se empleó α MSH en concentraciones de 10^{-6} M, 10^{-10} M o 10^{-12} M no se pudo observar supresión significativa alguna (figuras de 6a a 6d).

Cuando se utilizó KPV no marcado, sólo se pudo observar una inhibición significativa con una concentración 10^{-6} M (véanse figuras de 7a a 7d).

En el caso del péptido KPT se pudo observar una inhibición importante de la unión de α MSH en cada una de las concentraciones probadas (10^{-6} a 10^{-12} M, véanse figuras de 8a a 8d).

Estos resultados muestran que el péptido KPT se une al receptor de melanocortina en linfocitos THP-1, que es específico de α MSH, lo que apunta a que α MSH y KPT presentan un punto de unión común. Pero puesto que KPT ya a concentraciones muy bajas muestra competición por el receptor, es probable que este péptido tenga una afinidad incluso mayor hacia el receptor de MC-1 que el MSH.

Ejemplo 4

Material y métodos:

"Human Dermal Microvascular Endothelial Cells" (HDMEC) y la línea celular de HMEC-1 (Human Micro-vascular Endothelial Cell Line 1) se trataron, o bien con TNF α o bien con LPS en presencia o ausencia de uno de los péptidos. Para el aislamiento del RNA se recogieron las células 3 y 6 horas después del tratamiento o bien para el EIA de la molécula de adhesión o para el análisis de FACS se recogieron 3, 6, 16 o 24 horas después del tratamiento. El RNA se transcribió de forma inversa, y se sometieron unas muestras a una PCR para E-selectina, ICAM-1, VCAM o para β -actina como "Housekeeping Gene" para llevar a cabo una valoración semicuantitativa. Para el ensayo de adhesión de linfocitos, las células endoteliales se sembraron en cápsulas y se incubaron con linfocitos

marcados con Cr⁵¹. Después de una etapa de lavado, se determinó la cantidad de linfocitos sobrantes que estaban unidos a la capa de EC, por medición de la radioactividad en las muestras.

Resultados:

5 El tratamiento de las células endoteliales con α MSH (ejemplo de referencia) o KPT inhibió la expresión inducida por LPS o TNF α de las moléculas de adhesión. Este efecto se observó en un intervalo de concentraciones de 10^{-6} a 10^{-12} M de α MSH o de péptido. El péptido KPT tuvo el efecto más potente sobre la expresión de la molécula de adhesión mRNA.

10 La expresión de superficie de moléculas de adhesión inducida por LPS o TNF α se redujo en pequeña medida mediante todos los agonistas. Estos datos se obtuvieron tanto por EIA, en donde se emplearon células enteras, como también por FACS con anticuerpos específicos (véanse figuras 9a, que muestra datos de EIA).

La α MSH reduce de manera importante la unión de linfocitos T y B en capas de EC tratadas con LPS o TNF- α MSH (véase figura 9b). Considerados en conjunto, estos resultados muestran que α MSH tiene un efecto en la adhesión de linfocitos a EC y, por consiguiente, reduce también la extravasación de linfocitos en situaciones de inflamación de tejidos. Ello se confirma por los datos in vivo relativos a la vasculitis localizada.

15 **Ejemplo 5 (ejemplo de referencia)**

Material y métodos:

20 Se trataron células epidérmicas (EC) o queratinocitos humanos normales (HNK) con IL-1, LPS o TNF α en presencia o ausencia de péptidos. Al cabo de 15 o 30 minutos se obtuvieron las proteínas nucleares y se sometieron a un "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) con un oligonucleótido marcado radiactivamente, con secuencia de uniones específica NF- κ B. El oligonucleótido no marcado se utilizó como competidor. En algunos experimentos se emplearon anticuerpos contra la cadena p65 o p50 de NF- κ B para confirmar la identidad de las bandas detectadas bien como homodímeros p50 o como heterodímeros p50/p65.

Resultado:

25 En las ECs tratadas con TNF α o LPS, como en las HNK tratados con IL-1, la adición de los péptidos conduce a una activación reducida del factor de transcripción NF- κ B (véanse las figuras 10 y 13a). Esto conduce por su parte a un debilitamiento de la transcripción de los genes para un gran número de mediadores proinflamatorios (citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, etc.). La identidad de las bandas observadas en el EMSA como heterodímero NF- κ B se confirmó empleando anticuerpos anti-p65.

Ejemplo 6 (ejemplo de referencia)

Material y métodos:

30 Los ratones se trataron mediante inyección subcutánea de LPS en una oreja. Esta inyección preparada induce un incremento duradero en la expresión de E-selectina en el lugar de la inyección de LPS. 24 horas más tarde se inyectó intraperitonealmente una segunda dosis de LPS (Challenge). Esta segunda inyección de LPS conduce a una rápida necrosis vascular y a la formación de lesiones petequiales, que se pueden detectar fácilmente gracias a su magnitud y número. En el momento de la inyección preparada de LPS se administró α MSH (25 μ g).

Resultado:

La inyección de α MSH en el momento de la administración preparada de LPS inhibe la inducción de la expresión local de E-selectina en la oreja (véase figura 11a) y reduce significativamente el número y tamaño de lesiones petequiales que se formaron después de la inyección de "Challenge" de LPS (véase figura 11b).

40 **Ejemplo 7**

Material y métodos:

45 Se aislaron células dentríticas de médula ósea (BMDC) del hueso fémur de ratones y se trataron con IL-4 y GM-CSF durante 6 o 9 días. El 6º y el 9º día, las células se trataron con α MSH (2×10^{-11} M) (ejemplo de referencia) o con el péptido KP (2×10^{-6} M) durante 3 horas y 2,5 horas antes de la reinyección en ratones no tratados, con los mismos antecedentes genéticos. 2 horas antes de la reinyección se trataron las células con hapteno (1 mM DNBS, la forma soluble de DNFB). Inmediatamente antes de la reinyección, las células se lavaron 2 veces con PBS. Se inyectaron por vía intravenosa 5×10^5 células por cada animal. Las células de control se trataron o bien con DNBS sólo o con α MSH solo, o se dejaron sin tratar. 5 días después de la inyección, los animales fueron contactados en la oreja con DNFB, y al día siguiente se midió el grosor de la oreja. 2 semanas más tarde, los animales fueron resensibilizados con DNFB y de nuevo 5 días después fueron contactados de nuevo en la oreja. Por último se midió la hinchazón de la oreja.

Resultados:

Los animales receptores que fueron inyectados con células no tratadas o linfocitos tratados con α MSH, no mostraron reacción inmune alguna después del primer "Challenge", tal como se esperaba. Los animales receptores que habían sido inyectados con BMDC tratado con DNBS, mostraron una reacción CHS correspondiente al momento del primer "Challenge". Esta reacción se suprimió en los animales que habían sido inyectados con células que se habían tratado previamente in vitro con TNBS y α MSH o TNBS y KP. Por tanto, el contacto de DCs con α MSH o péptido es suficiente para desencadenar la inhibición de los CHS (véase figura 12)

En el momento del segundo "Challenge" y de la correspondiente resensibilización, los animales a los que se habían inyectado de nuevo linfocitos tratados con DNBS no mostraron respuesta inmune alguna, mientras que los animales a los que se habían inyectado linfocitos tratados con DNBS/ α MSH no mostraron respuesta inmune alguna, lo que apunta a que la tolerancia inducida por α MSH se induce igualmente por DC (véase figura 12).

Ejemplo 8**"Inmunoterapia con células dendríticas o linfocitos T tratados con α MSH o con un derivado de α MSH"**

Se aislaron células dendríticas (DC) (a partir de sangre, médula ósea o tejidos). También se pueden utilizar de todos modos mezclas celulares que contengan DC (p. ej. mezclas celulares epidérmicas) y se cultivaron en presencia de GM-CSF e IL-4 (preferiblemente: 250-1000 μ /ml para cada una de las sustancias).

Después de un tiempo de maduración (preferiblemente, 6-9 días) se cargan las células con antígenos (la concentración depende del correspondiente antígeno, también del período de tiempo) y se trataron con α MSH (ejemplo de referencia) o derivados suyos. Los derivados corresponden al menos a los aminoácidos 12 y 13 de la α MSH (Lys-Pro), también son posibles los derivados que contienen Lys-Pro-Val (ejemplo de referencia). La configuración D- y L- de los AS (aminoácidos) es posible. También se puede utilizar Lys-Pro-Thr derivada del IL-1 β . La adición del péptido puede tener lugar antes de la adición del antígeno, al mismo tiempo, más tarde, de forma simple o múltiple (la dosis preferida depende del correspondiente péptido; para α MSH por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-14} M).

Las células así tratadas se inyectan después por vía intravenosa en el organismo receptor (es posible también intraperitoneal o subcutáneamente); ratón: 2×10^5 células como límite inferior. Según el antígeno, puede ser suficiente efectuar una única inyección o si fuera necesario, varias inyecciones. También es posible que después de períodos de tiempo prolongados se tengan que repetir las inyecciones (para ello no existen datos todavía).

De forma alternativa, es posible poner en contacto DC con linfocitos T fuera del cuerpo e inyectar después la mezcla o los linfocitos T. Para ello, la carga de antígenos de las DC se puede efectuar antes del contacto con los linfocitos T o durante el mismo. Los linfocitos T pueden proceder también de individuos ya sensibilizados contra el correspondiente antígeno. En el ratón, el límite inferior es aproximadamente 1 millón de linfocitos T, son preferibles más linfocitos (figuras 14 y 15).

Las ventajas de un modo de aplicación de este tipo son la prevención de cualquier clase de reacción inmune no deseada, que sea antígeno específica y en la cual los linfocitos específicos de antígenos (linfocitos B o T) jueguen un papel patogenético. Entre ellas se encuentran, entre otras, las alergias, enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas o implantes. Con el empleo de un número suficientemente alto de linfocitos también es posible la curación de enfermedades ya existentes.

Los sorprendentes resultados, sin querer estar ligados a una teoría, se pueden considerar en el sentido de que α MSH es un potente inmunomodulador y posee numerosas propiedades antiinflamatorias. A ellas pertenece, entre otras, su propiedad de reducir la expresión de moléculas coestimulantes en DC. Los derivados de α MSH conformes a la invención presentan también propiedades análogas, que alcanzan hasta el tripéptido C-terminal y también el dipéptido Lys-Pro. También los derivados con otra composición de aminoácidos (sustituciones conservadoras de aminoácidos) tienen propiedades comparables, entre ellos se encuentran en concreto la Lys-Pro-Thr derivada de IL-1 β (de modo que se puede suponer que también los péptidos alargados por el N-terminal (análogamente a α MSH) con la secuencia colineal de IL-1 β actúan de igual manera).

In vivo, la α -MSH, como también sus derivados, están en condiciones de inducir una tolerancia específica a haptenos. Las DC son células que presentan antígenos profesionalmente, que están en condiciones de inducir innumerables tipos de reacciones inmunes y que también determinan el transcurso de esta clase de reacciones. A estas reacciones inmunes pertenecen sobre todo las reacciones inmunes mediadas por linfocitos T.

Se pudo demostrar entonces que el tratamiento in vitro de DC o mezclas celulares de DC y linfocitos T con un antígeno, en presencia de α -MSH o derivados de éste, lleva a que tras su inyección en un organismo, estas linfocitos también induzcan una tolerancia específica a los haptenos.

El mecanismo aquí parece ser que la presentación de antígenos de las DC se modula mediante la α MSH o sus derivados de tal modo que se llega a la generación de linfocitos T supresoras. Así, se pudo demostrar que en las

correspondientes mezclas, los linfocitos T presentan una elevada expresión de CTLA-4 (fig. 16). Esta es una de las moléculas de superficie que caracterizan a los linfocitos T supresores.

5 Con DC o linfocitos T generados de este modo, es posible impedir preventivamente enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas o alergias. También se puede prevenir un rechazo a implantes o trasplantes. En el caso de utilizar un número suficientemente alto de células se puede considerar también la curación de un estado patológico ya existente.

Los compuestos conformes a la invención se pueden utilizar también para el tratamiento de tumores mediante una activación in situ de células dendríticas. Posiblemente, también se pueda recurrir a este método para conseguir tolerancia en presencia de los péptidos conformes a la invención.

10

REIVINDICACIONES

1. Compuesto, seleccionado del grupo constituido por el dipéptido lisina-prolina, el tripéptido lisina-prolina-treonina y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para su aplicación en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino.
- 5 2. Compuesto para la aplicación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el compuesto es el tripéptido lisina-prolina-treonina.
3. Compuesto para la aplicación de acuerdo con la reivindicación 1 o la 2, **caracterizado porque** el compuesto es (L)Lys-(D)Pro-(L)Thr.
- 10 4. Compuesto para la aplicación conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la enfermedad inflamatoria del intestino es una enfermedad intestinal crónica.
5. Compuesto para la aplicación de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** la enfermedad intestinal crónica es la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.
6. Compuesto para la aplicación conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la enfermedad inflamatoria del intestino es una irritación temporal del intestino causada por una intoxicación alimentaria leve.
- 15 7. Compuesto para la aplicación conforme a una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el compuesto se administra intraperitoneal, intravenosa u oralmente.
8. Compuesto para la aplicación conforme a la reivindicación 7, **caracterizado porque** se administran de 20 µg por kg de peso corporal a 10 mg por kg de peso corporal.
- 20 9. Compuesto para la aplicación conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** se utilizan al menos dos compuestos distintos de los compuestos definidos en la reivindicación 1.

Fig. 1

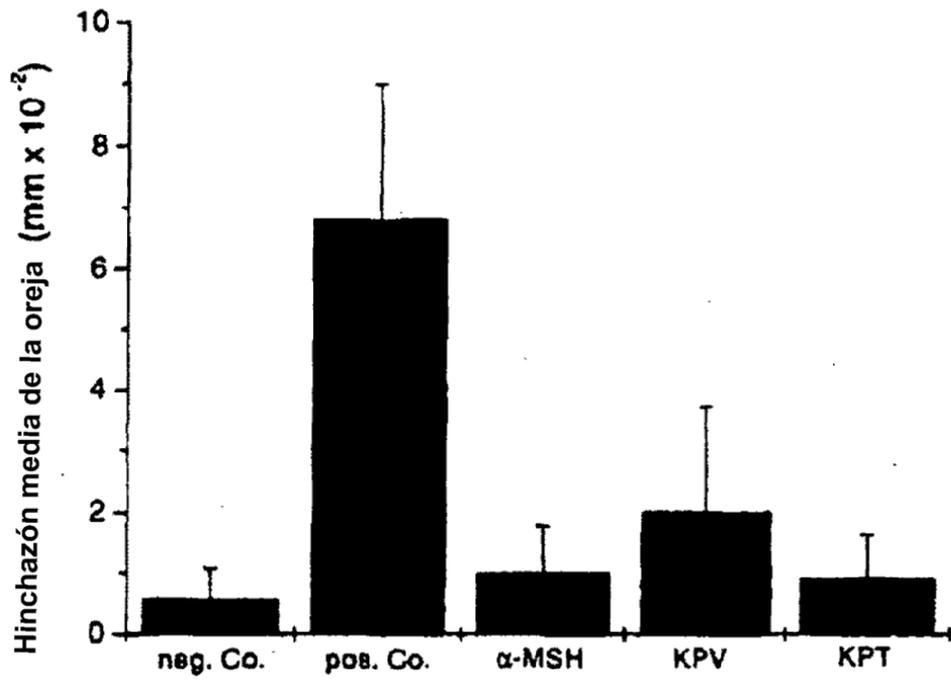


Fig. 2

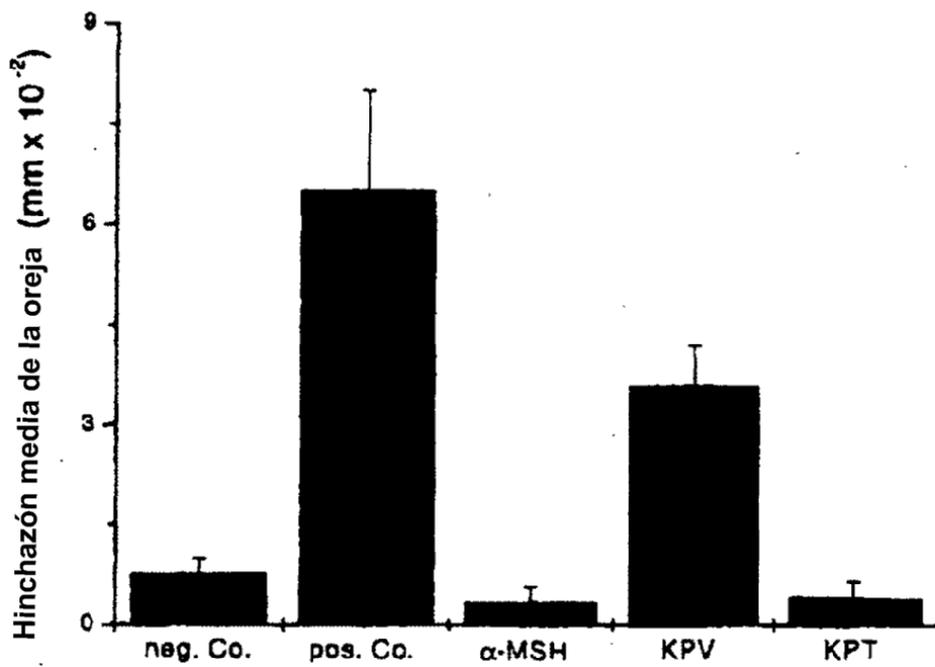


Fig. 2 Inducción de tolerancia por α-MSM y péptidos derivados

Fig. 3

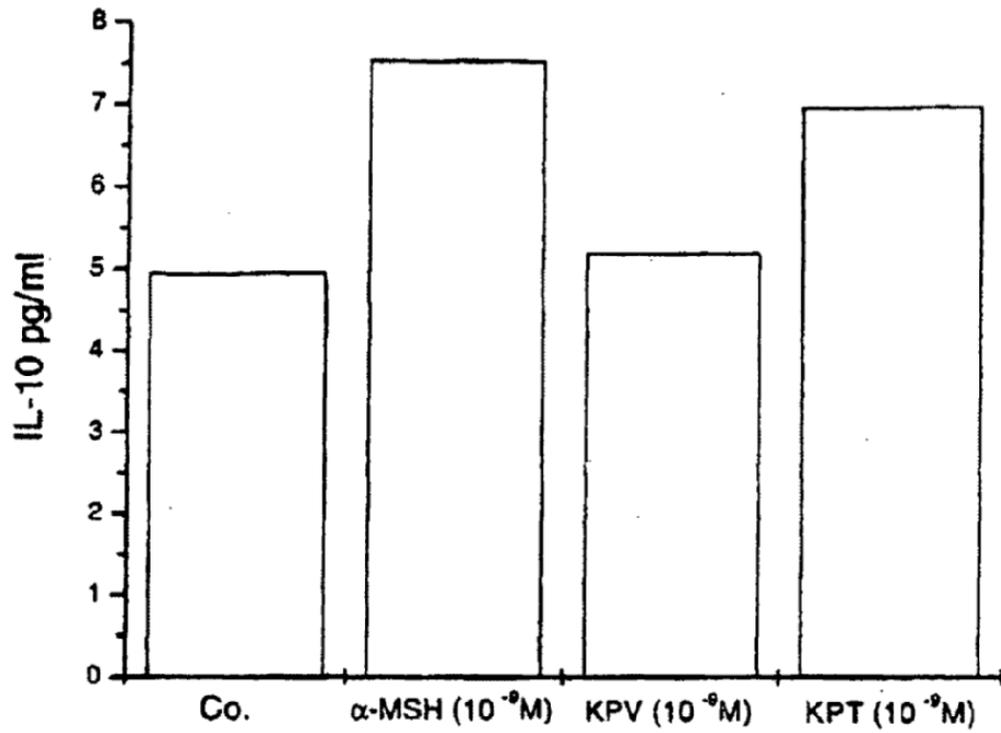


Fig. 4

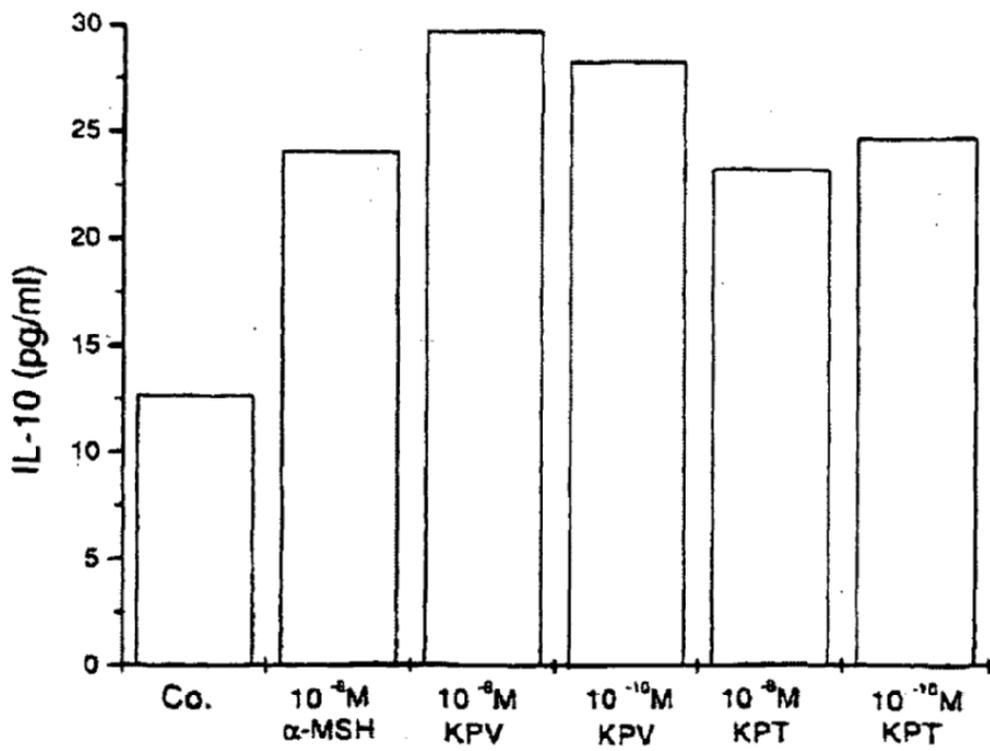


Fig. 5

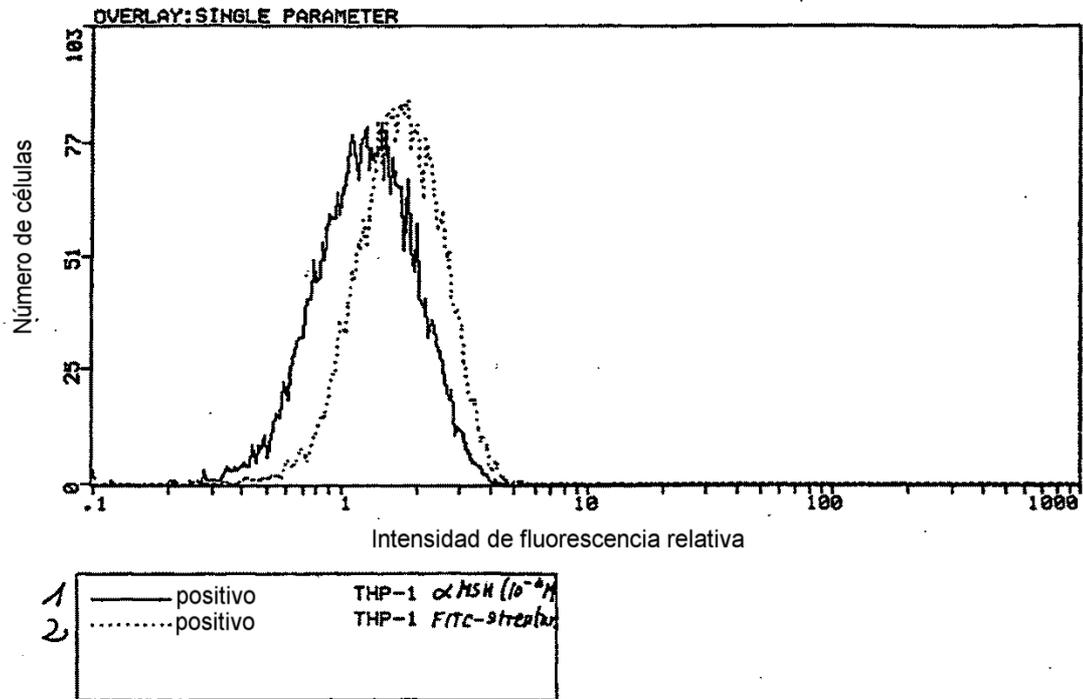


Fig. 6a

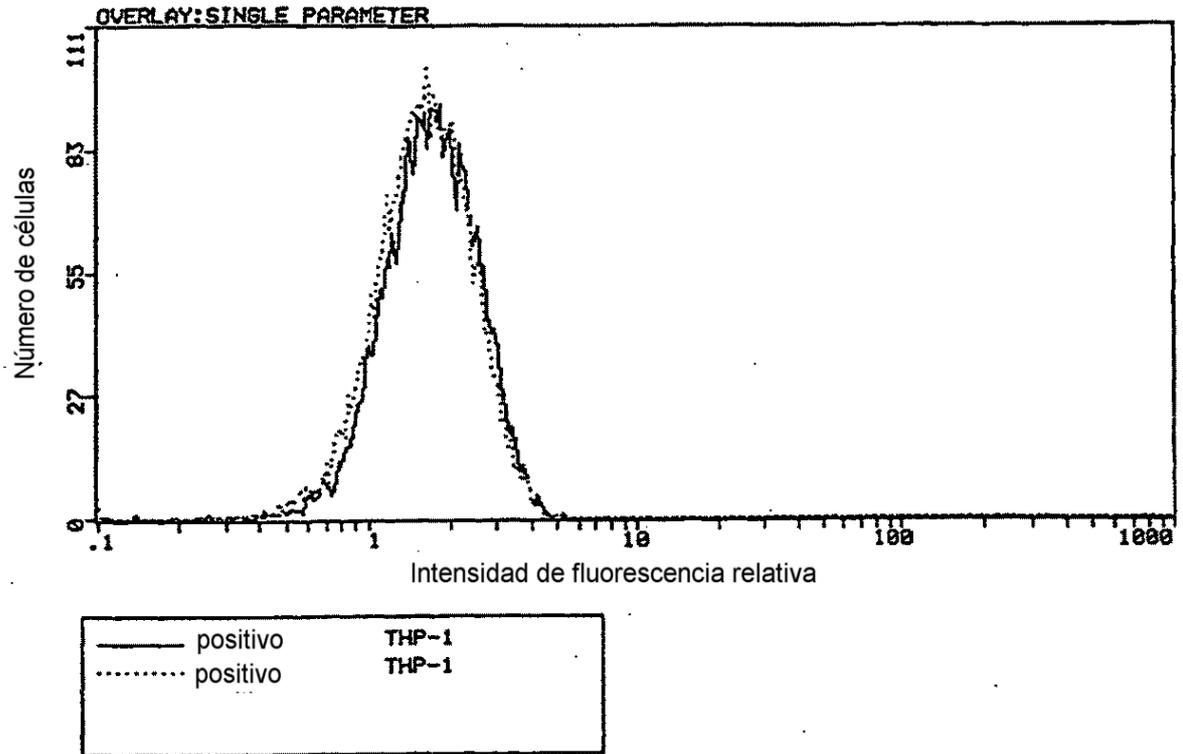


Fig. 6b

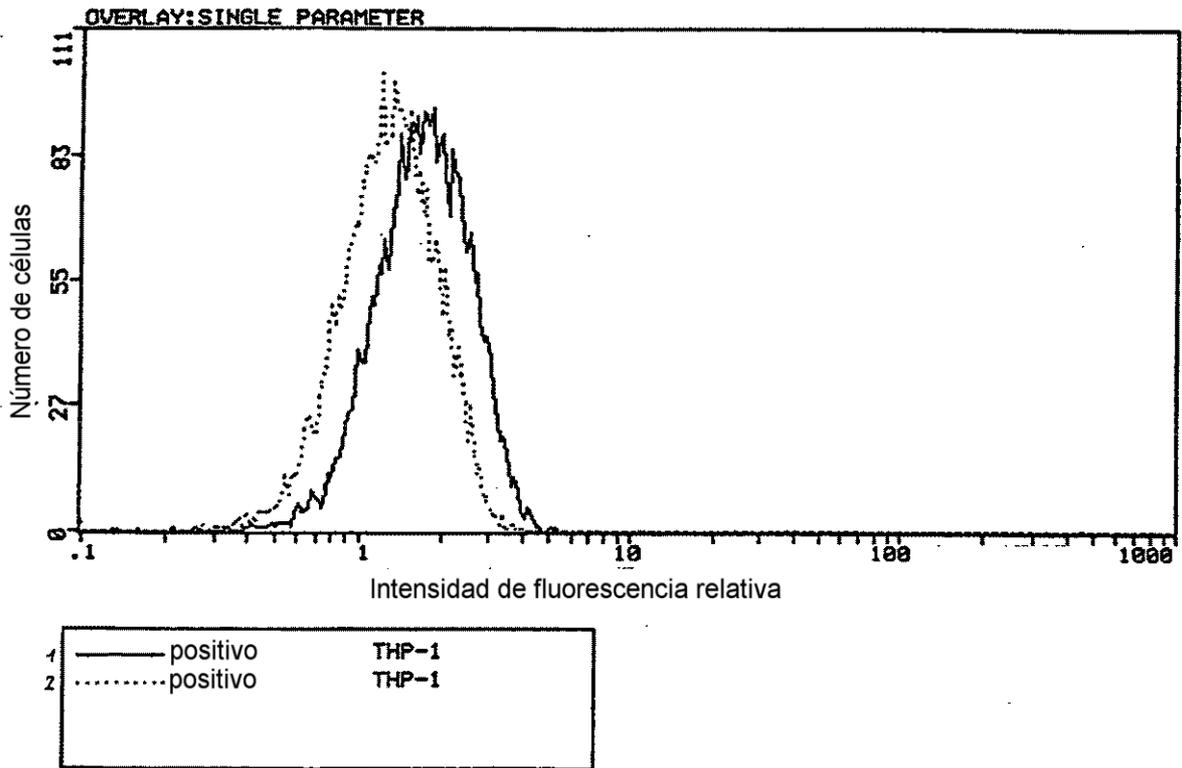


Fig. 6c

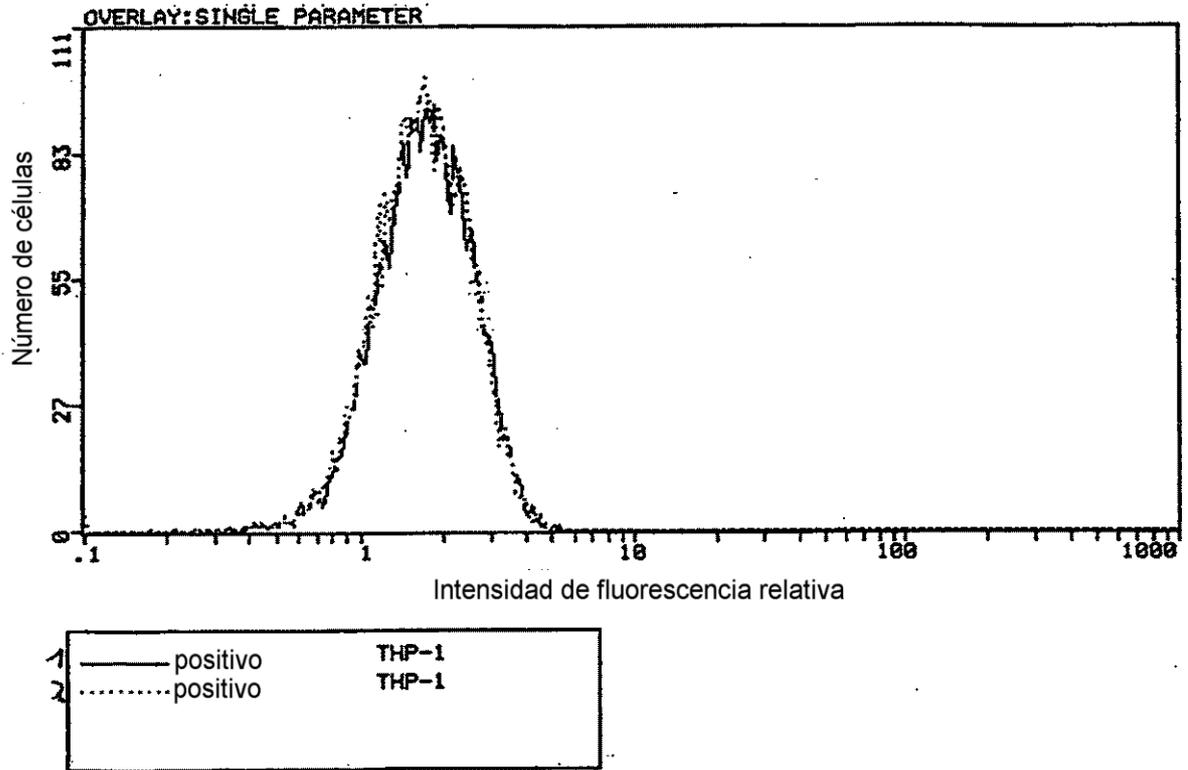


Fig. 6d

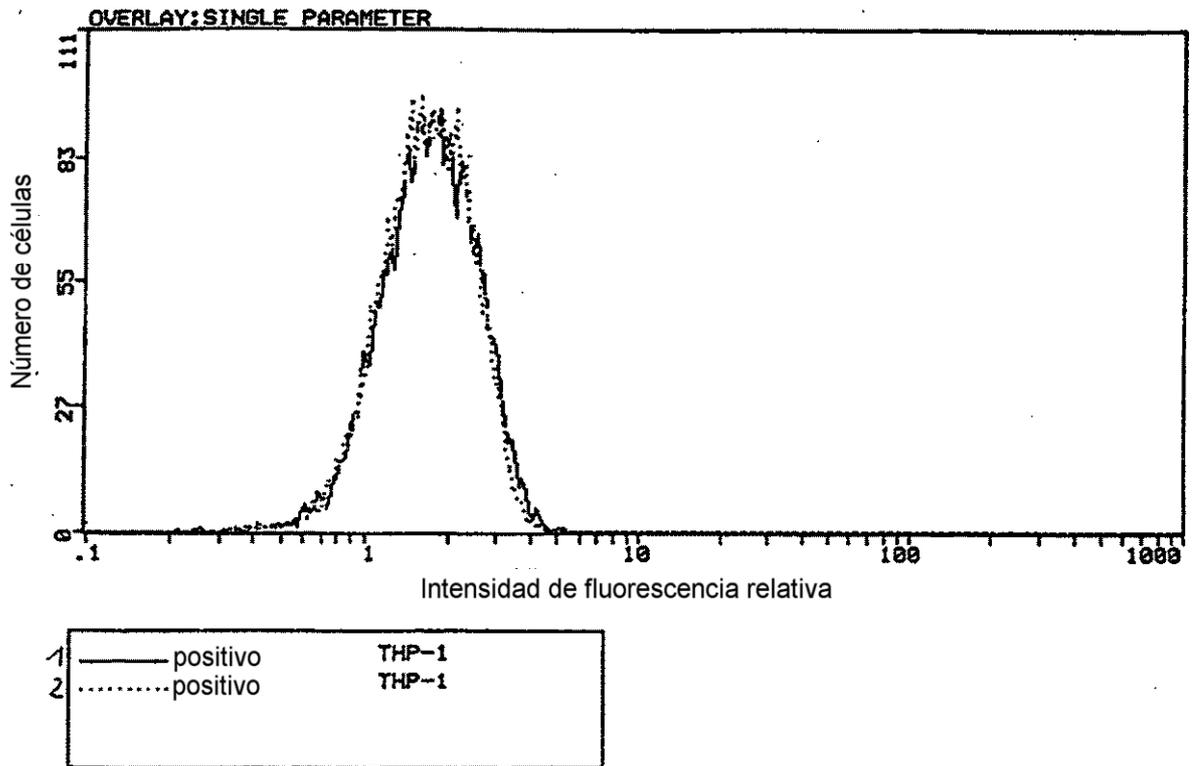


Fig. 7a

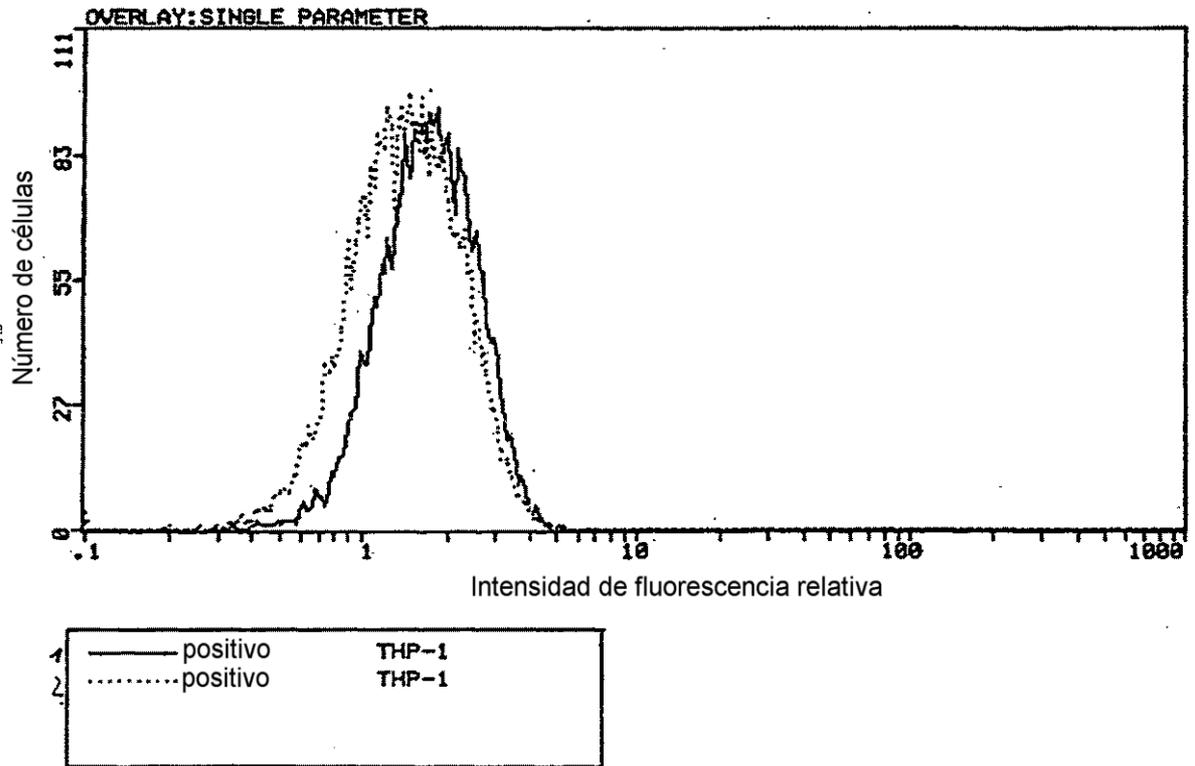


Fig. 7b

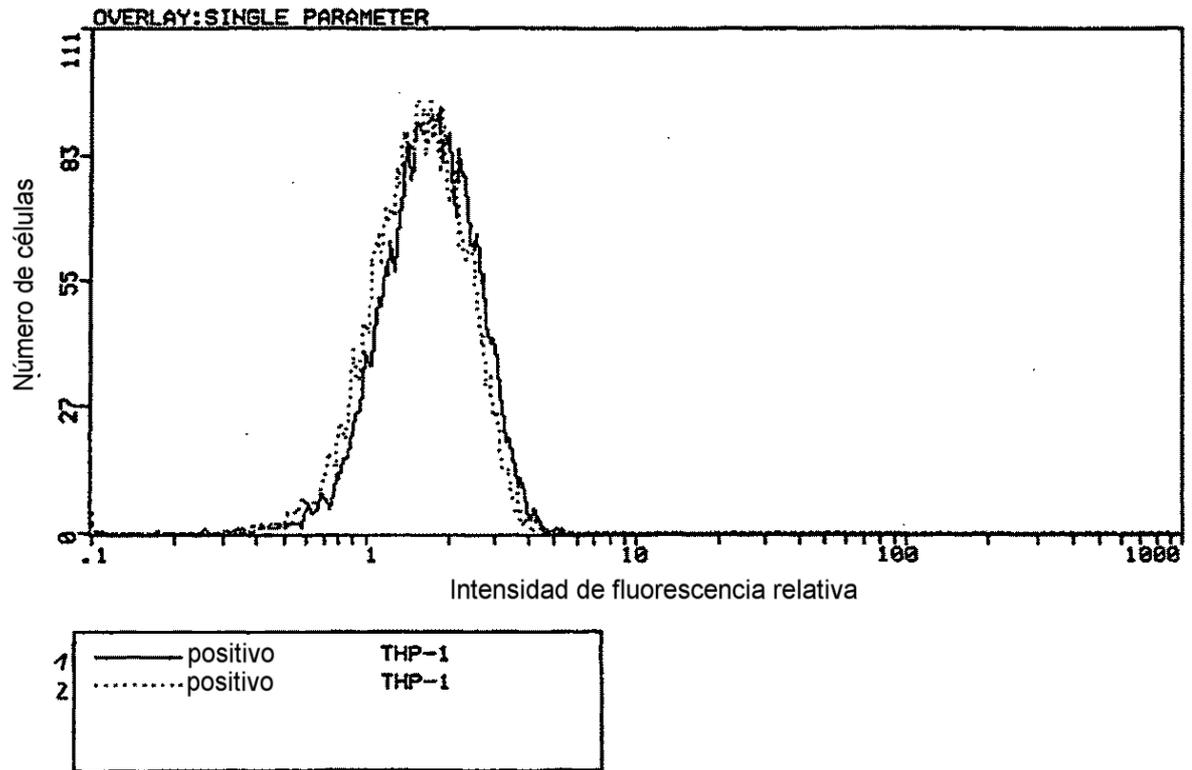


Fig. 7c

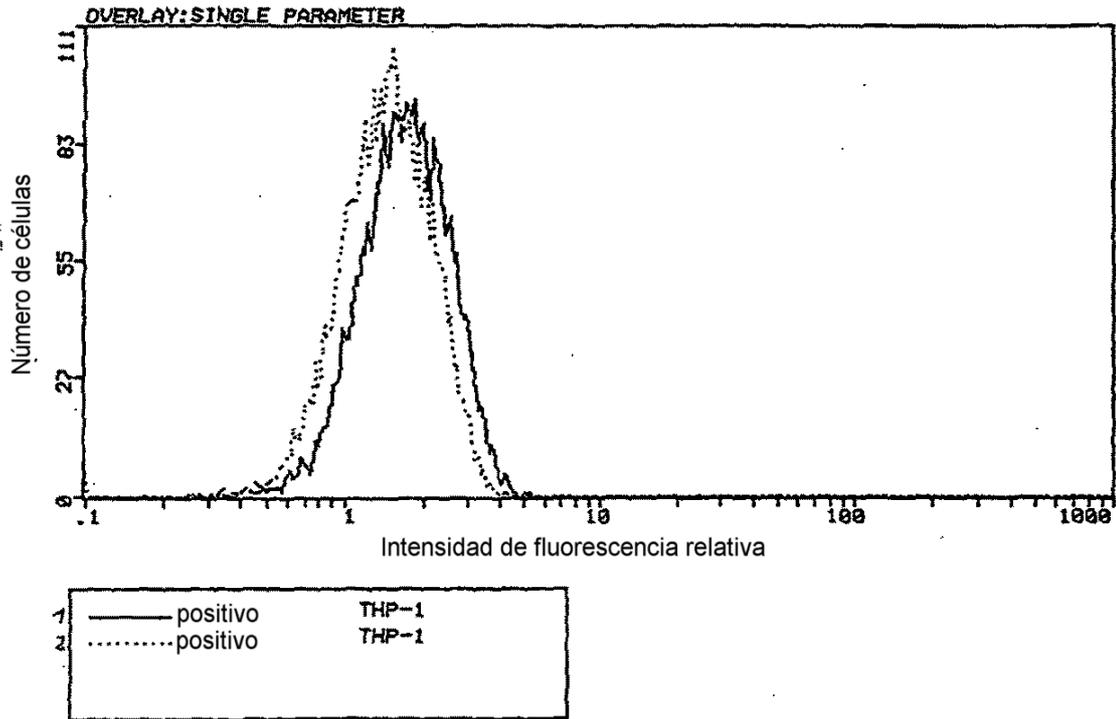


Fig. 7d

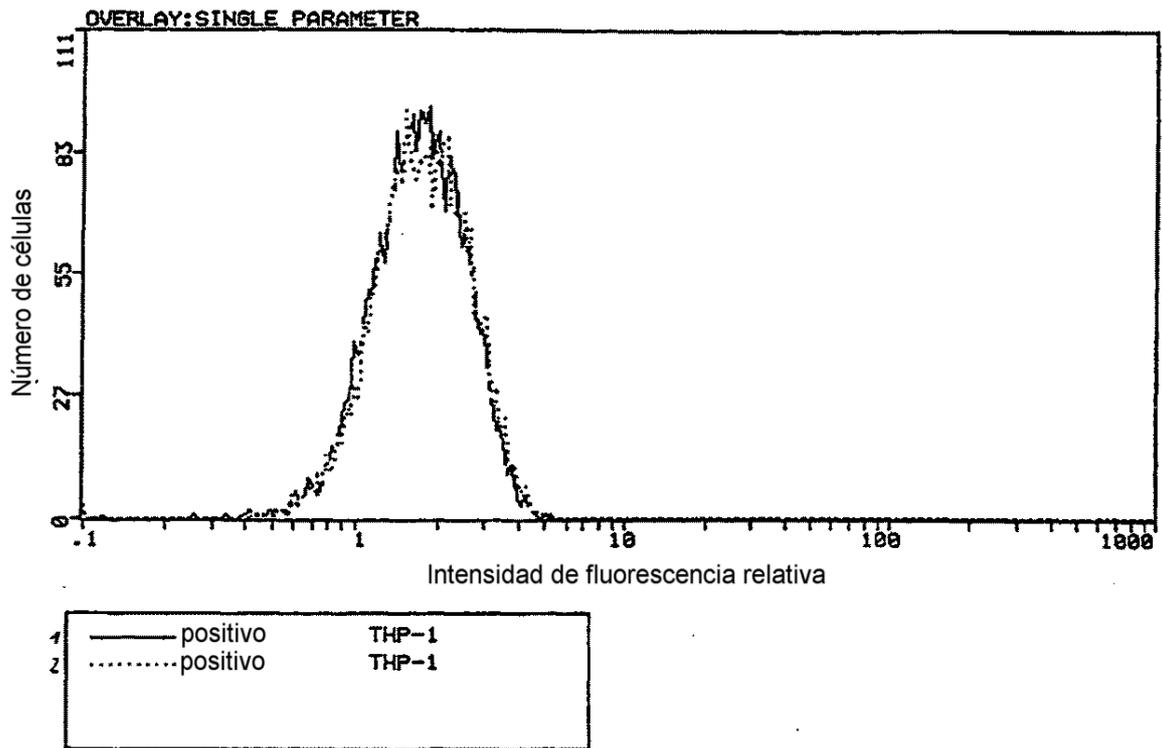


Fig. 8a

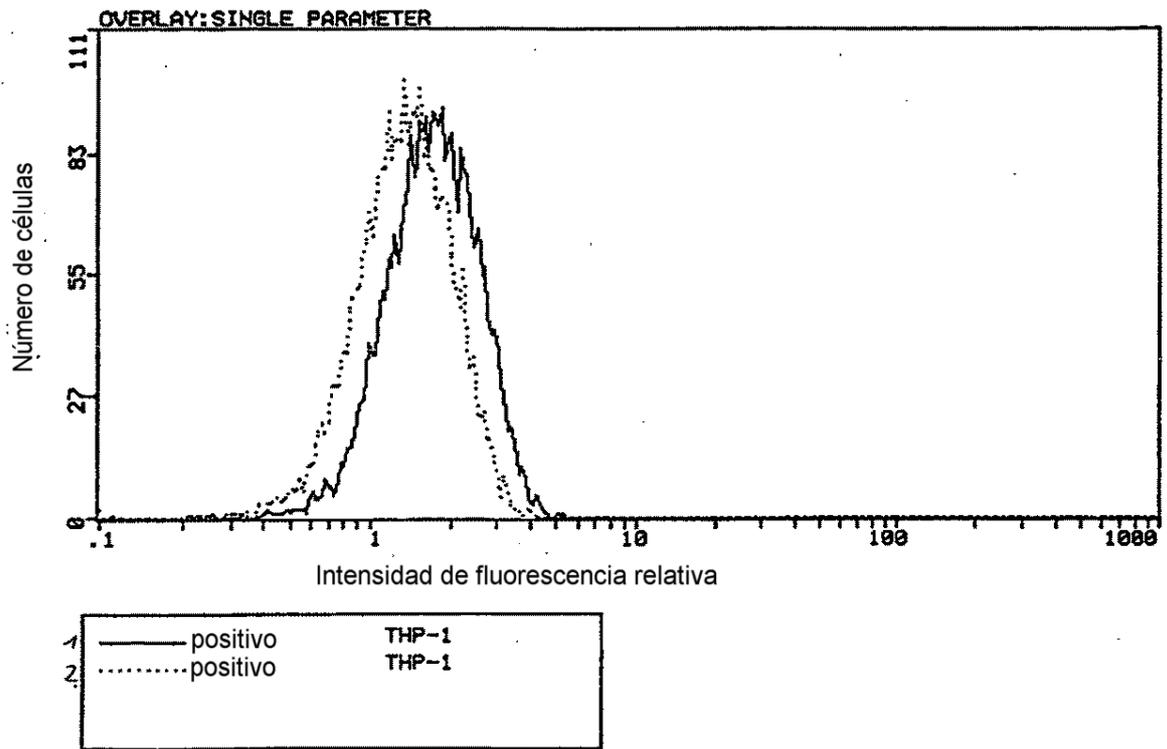


Fig. 8b

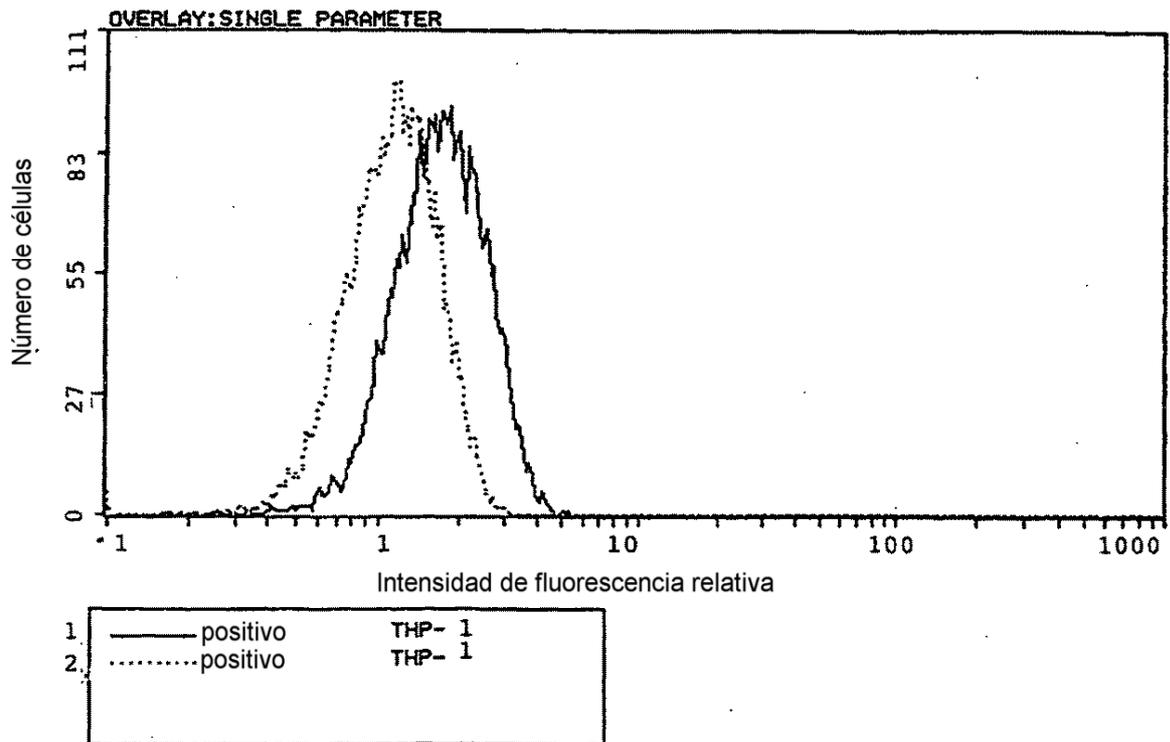


Fig. 8c

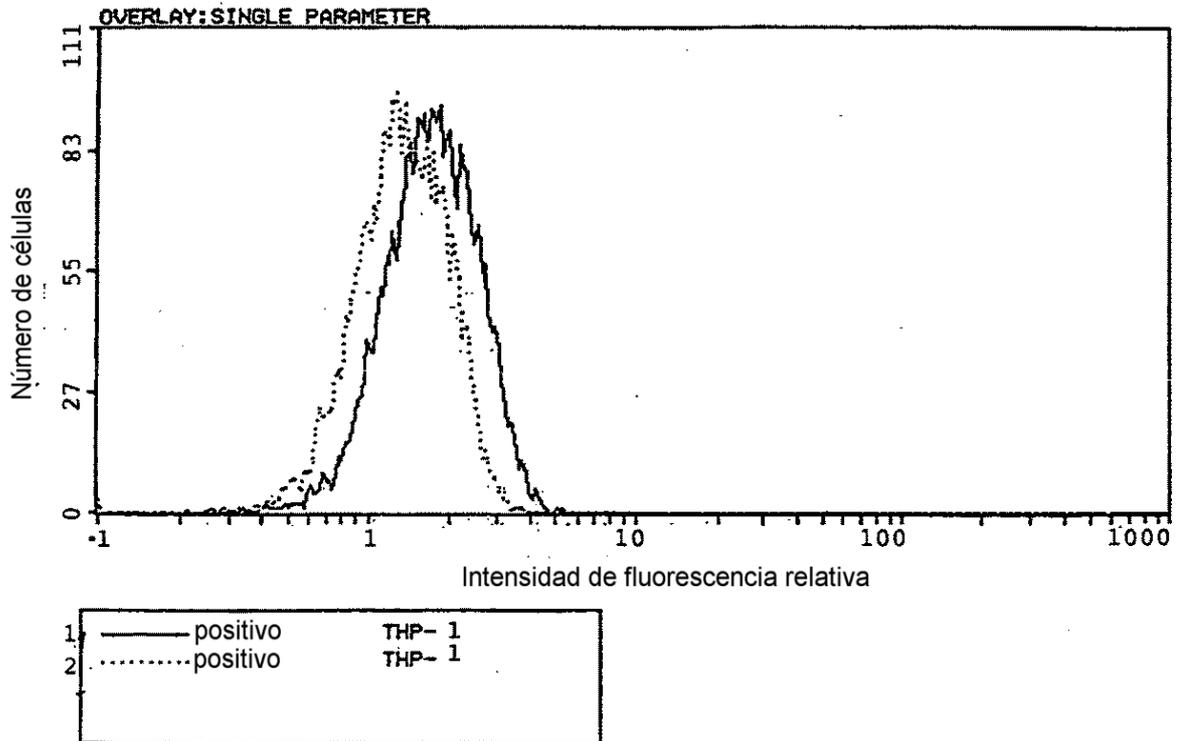


Fig. 8d

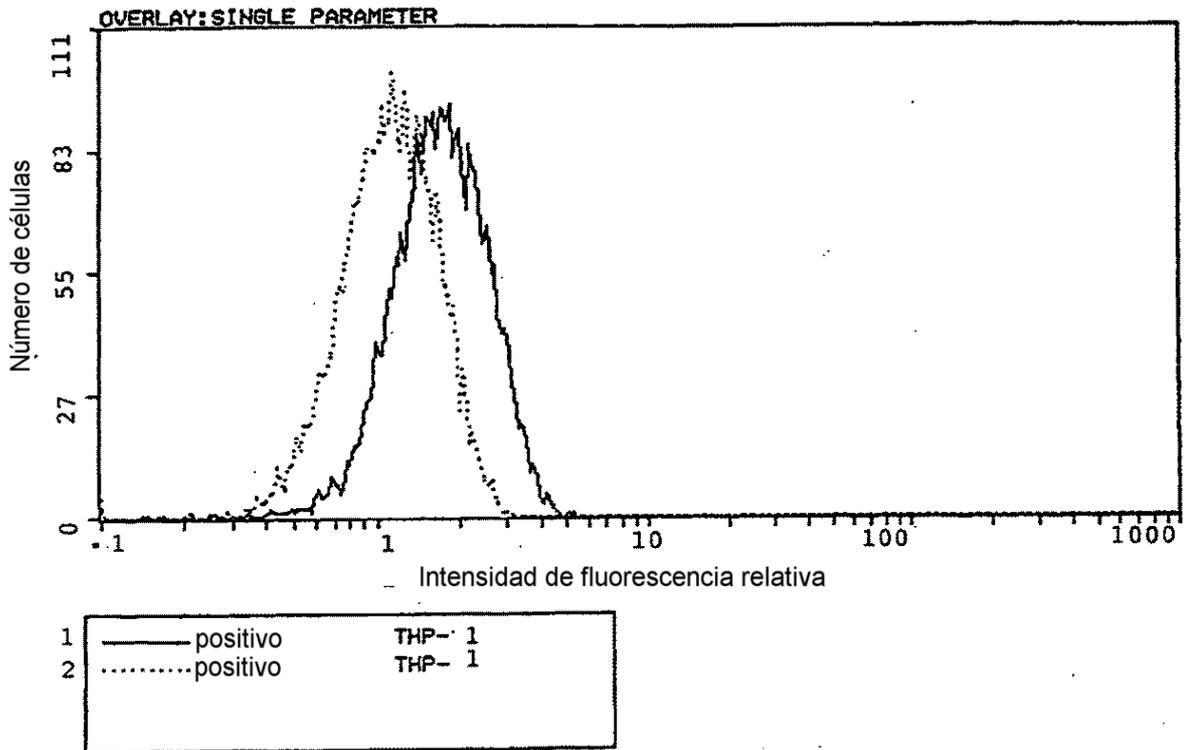


Fig. 9a

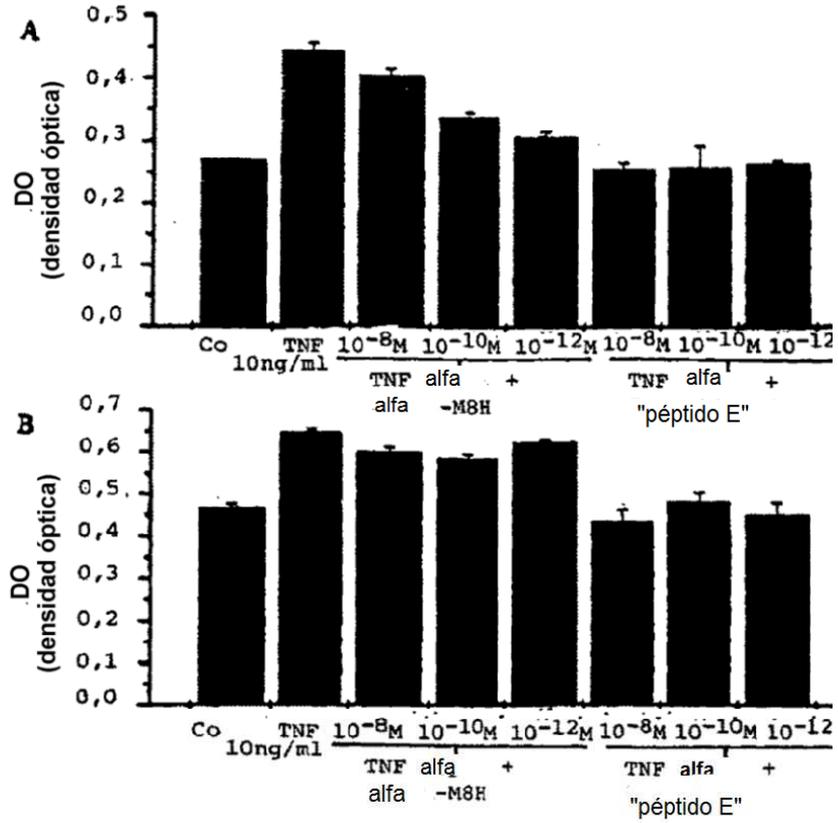


Fig. 9b

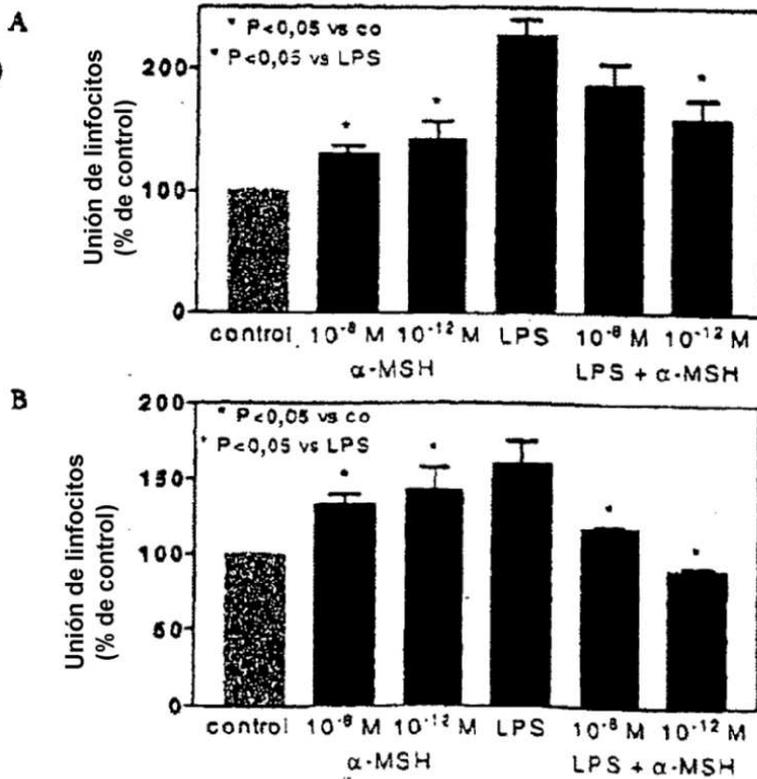


Fig. 10

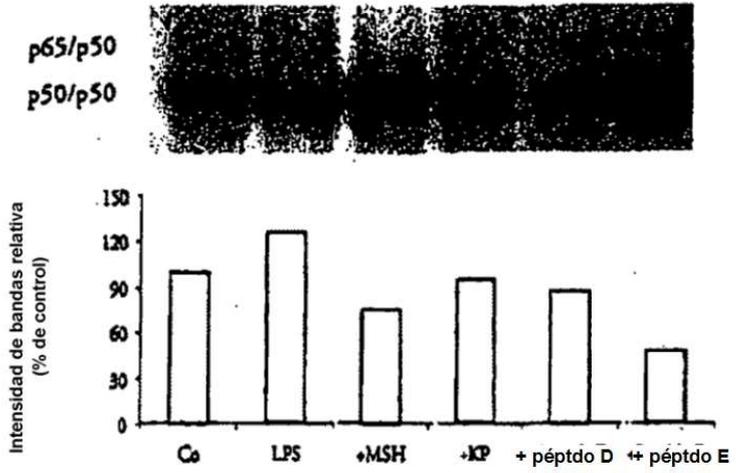


Fig. 11a

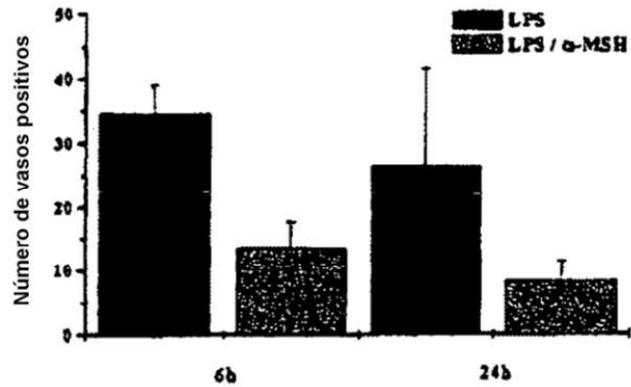


Fig. 11b

Número de petequias:

	2 h	3 h	4.5 h
Control positivo (solo LPS)	6	10	10
	3	6	6
	5	5	6
	6	15	15
	5	10	15
	3	3	6
α -MSH	0	0	0
	15	20	20
	1	1+6	1+6
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0

Fig. 12

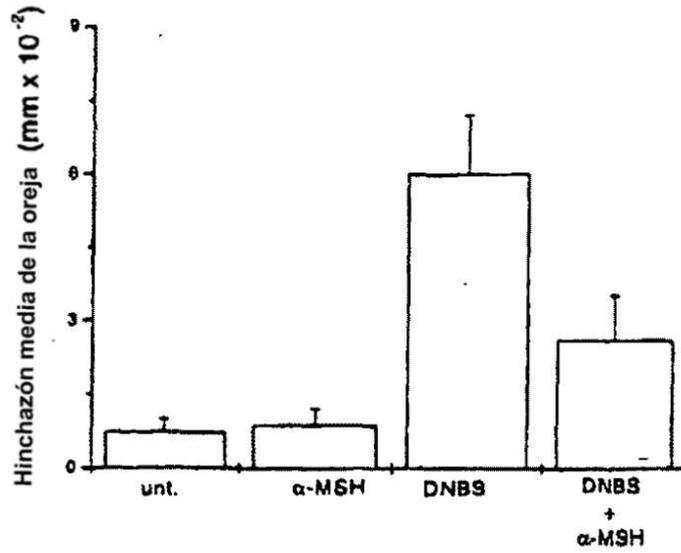
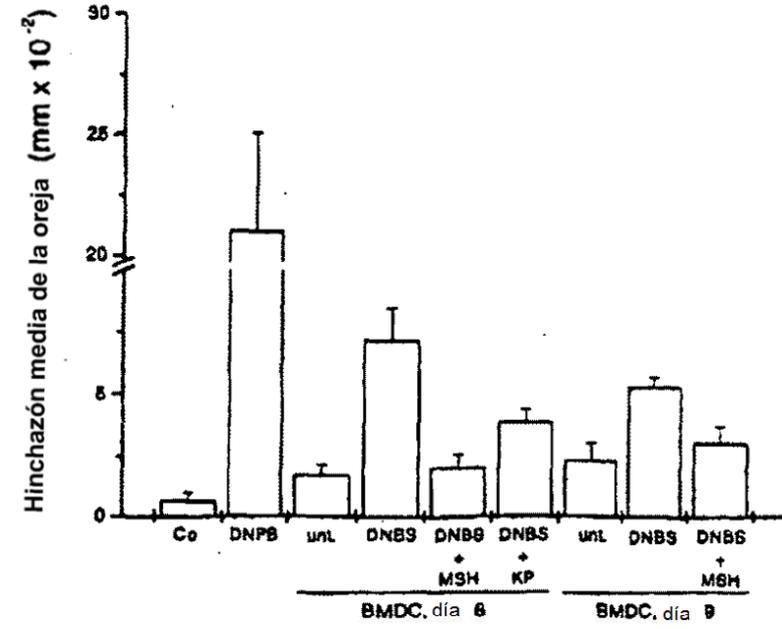
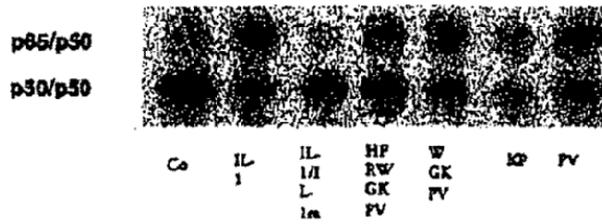


Fig. 13a I



II

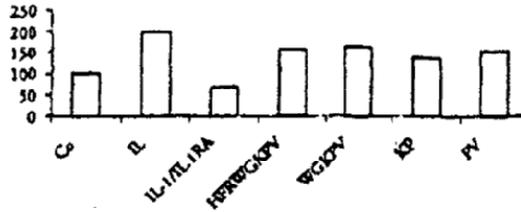
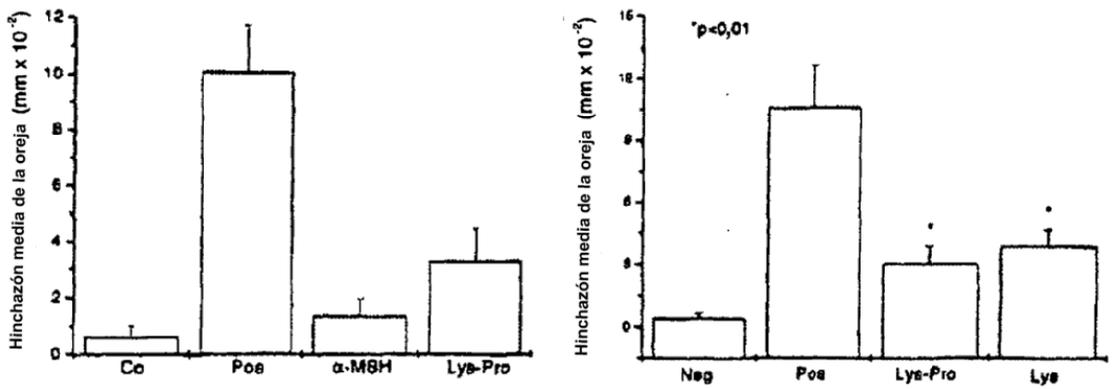


Fig. 13b

I



II

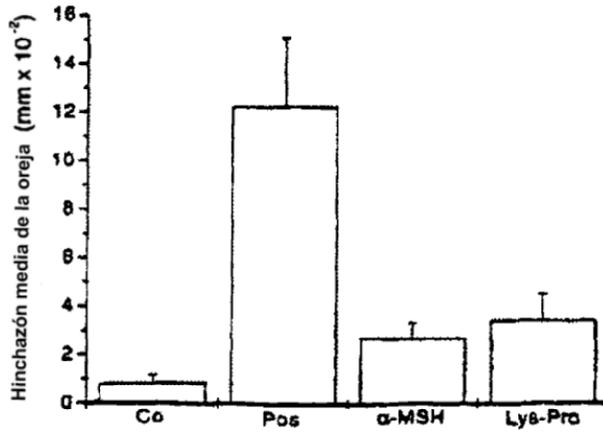


Fig. 14

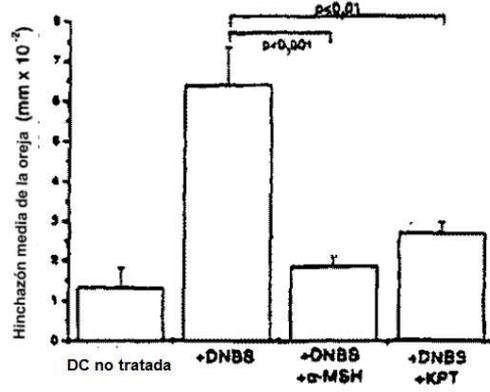


Fig. 15

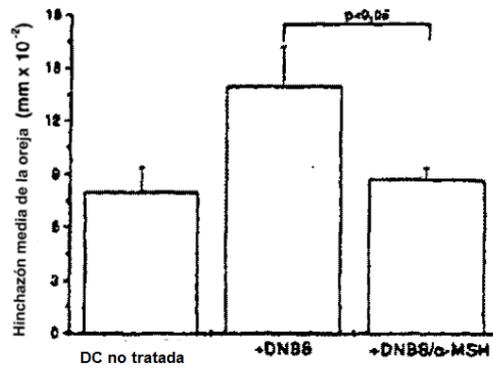
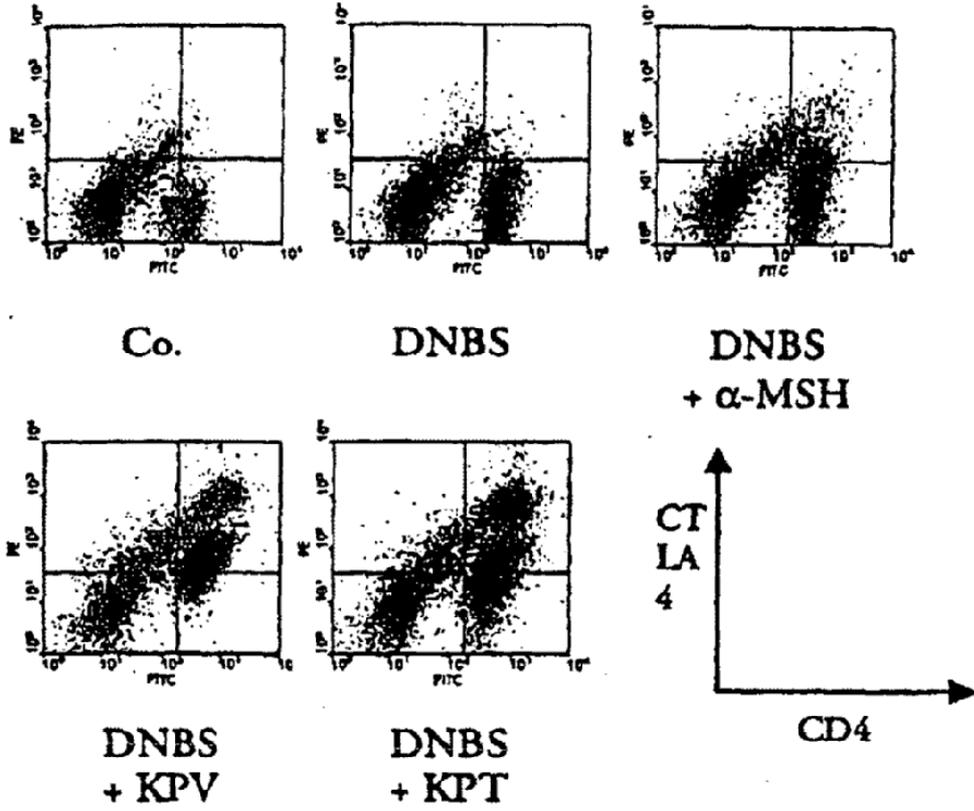


Fig. 16

A



B

