



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 538**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03750165 .7**

96 Fecha de presentación : **15.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1558277**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

54 Título: **Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.**

30 Prioridad: **16.10.2002 AU 2002952084**
20.05.2003 AU 2003902452

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.10.2011

73 Titular/es: **PROMICS PTY LIMITED**
C/- Arana Therapeutics Limited Level 2 37 Epping
Road
Macquarie Park, NSW 2113, AU

72 Inventor/es: **Woodruff, Trent, Martin;**
Taylor, Stephen, Maxwell y
Fairlie, David

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 366 538 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).

DESCRIPCION

Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere al tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y especialmente al tratamiento de esta enfermedad con compuestos peptídicos y peptidomiméticos cíclicos novedosos que tienen la capacidad de modular la actividad de los receptores acoplados a proteínas G. Los compuestos actúan preferentemente como antagonistas del receptor del C5a y son activos contra los receptores del C5a en macrófagos y leucocitos polimorfonucleares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los receptores acoplados a proteínas G están extendidos por todo el cuerpo humano, comprenden aproximadamente el 60% de los tipos de receptores celulares conocidos y median la transducción de señales a través de la membrana celular para una gran variedad de ligandos endógenos. Participan en una variada selección de procesos fisiológicos y patofisiológicos, que incluyen, sin carácter limitante, aquellos asociados con trastornos cardiovasculares, del sistema nervioso central y periférico, reproductivos, metabólicos, digestivos, inmunológicos, inflamatorios y de crecimiento, así como otros trastornos de regulación y proliferación celular. Los agentes que modulan selectivamente las funciones de los receptores acoplados a proteínas G tienen aplicaciones terapéuticas importantes. Estos receptores se están reconociendo cada vez más como importantes objetivos para fármacos, debido a su función crucial en la transducción de señales (G protein-coupled Receptors, IBC Biomedical Library Series, 1996).

20 Uno de los receptores acoplados a proteínas G estudiado con más detalle es el receptor del C5a. El C5a es uno de los agentes quimiotácticos más potentes conocidos y se encarga de reclutar neutrófilos y macrófagos a los lugares de lesión, alterar su morfología; inducir degranulación; aumentar la movilización del calcio, la permeabilidad vascular (edema) y la adherencia neutrofílica; contraer el músculo liso; estimular la liberación de mediadores inflamatorios, que incluyen histamina, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, prostaglandinas y leucotrienos, y de enzimas lisosomales; promover la formación de radicales de oxígeno; y aumentar la producción de anticuerpos (Gerard and Gerard, 1994).

25 Los agentes que limitan la acción proinflamatoria del C5a tienen potencial para inhibir la inflamación crónica, así como el dolor y los daños provocados en el tejido que la acompañan. Debido a estos motivos, las moléculas que evitan la unión del C5a a sus receptores son útiles para tratar trastornos inflamatorios crónicos causados por la activación del complemento. Debido a que dichos compuestos actúan contra los diferentes mediadores inflamatorios mencionados anteriormente e inhiben la formación de muchos de estos compuestos, pueden tener un mayor efecto en el alivio o la prevención de los síntomas inflamatorios.

30 En la solicitud previa N.º PCT/AU98/00490, publicada como WO 99/00406, los inventores de la presente describieron la estructura tridimensional de algunos análogos del extremo C-terminal del C5a humano y utilizaron esta información para diseñar compuestos novedosos que se unieran al receptor del C5a humano (C5aR) y que actuaran como agonistas o antagonistas del C5a. Previamente se creía que un posible antagonista requeriría una arginina en el extremo C-terminal y un carboxilato en el extremo C-terminal para que se uniera el receptor y para que tuviera actividad antagonista (Konteatis *et al.* 1994). Los inventores de la presente han demostrado que, de hecho, generalmente no se requiere un grupo carboxilato terminal para obtener una unión de gran afinidad al C5aR ni para la actividad antagonista. En cambio, los inventores han descubierto que un aspecto estructural no reconocido hasta la fecha, la conformación de un giro, es el aspecto de reconocimiento clave para obtener una unión de gran afinidad al receptor del C5a humano en neutrófilos. Según se ha descrito en la solicitud de patente internacional N.º PCT/AU02/01427 de los presentes inventores, presentada el 17 de octubre de 2002 y publicada como WO 03/033528, dichos inventores utilizaron perfeccionamientos adicionales de estos descubrimientos para diseñar modelos estructurales de movimiento más restringido que permitieran que los grupos hidrofóbicos se distribuyeran en una disposición hidrofóbica para que interaccionaran con el receptor del C5a. Posteriormente los inventores han descubierto que un compuesto preferido de este tipo es capaz de inhibir la fibrosis cardíaca y pulmonar, esto está descrito en la solicitud de patente internacional N.º PCT/AU03/00415, presentada el 7 de abril de 2003 y publicada como WO 03/086448. Ambos documentos WO 03/033528 y WO 03/086448 se ajustan a lo dispuesto en el Artículo 54 (8) EPC.

40 La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) consiste en un grupo de enfermedades inflamatorias graves, crónicas y recidivantes que afectan al intestino delgado y al grueso, las cuales siguen siendo relativamente resistentes a los tratamientos actuales. La EII se caracteriza por una inflamación crónica y recidivante que aparece de forma espontánea, de la cual no se conoce el origen y para la cual resultan inadecuadas las opciones de tratamiento actuales (revisadas por van Deventer, 2002). A pesar de la investigación exhaustiva sobre la enfermedad en humanos y animales de experimentación, los mecanismos exactos de la patología todavía no se han elucidado. Se cree que debe estar implicado un huésped de mediadores inmunológicos e inflamatorios, que incluye aminas biogénicas, cininas, metabolitos del ácido araquidónico, radicales libres, óxido nítrico, varias citocinas proinflamatorias y proteínas del complemento (Nielsen *et al.* 1996).

55 Las terapias actuales para la EII se dirigen a uno o más de estos mediadores inflamatorios. Los avances recientes en el desarrollo de fármacos para la EII implican el uso de anticuerpos monoclonales para inhibir las citocinas

proinflamatorias, tales como las interleucinas, por ejemplo IL-8 (remítase al documento US 5.677.426), los interferones y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , por sus siglas en inglés). En particular, los anticuerpos anti-TNF- α CDP571 e infliximab se han utilizado en centros médicos para tratar la enfermedad de Crohn con cierto éxito. Sin embargo, estas nuevas terapias proteicas presentan grandes inconvenientes, tales como los costes de producción, inestabilidad, escasa biodisponibilidad, vías de administración limitadas e inmunogenicidad.

Existen varios tipos principales de EII, la enfermedad de Crohn (enteritis regional) y la colitis ulcerosa son los tipos más comunes de estas enfermedades. Debido a la naturaleza de su patología, existen varias enfermedades autoinmunitarias y mediadas por el sistema inmunitario del intestino delgado y del grueso, las cuales podrían beneficiarse del tratamiento con estos antagonistas del C5a. Estas incluyen enteritis linfocítica plasmocítica, enfermedad celíaca, colitis colágena, colitis linfocítica y enterocolitis eosinofílica. Otros tipos menos habituales de EII incluyen colitis indeterminada, colitis infecciosa (colitis viral, bacteriana o causada por protozoos, por ejemplo, colitis amebiana), colitis pseudomembranosa (colitis necrotizante) y enfermedad inflamatoria intestinal isquémica. Estas enfermedades se han diagnosticado en humanos y en varias especies animales.

En 1999 se diagnosticaron aproximadamente 1.7 millones de casos de esta enfermedad debilitante solamente en los Estados Unidos. Encontrar un tratamiento satisfactorio para la EII es una necesidad médica que todavía no se ha cubierto, ya que los agentes terapéuticos existentes no han resultado eficaces para reducir la enfermedad y evitar la necesidad de cirugía. Hasta el 40% de todos los pacientes con colitis ulcerosa son intervenidos quirúrgicamente, lo que habitualmente incluye la extirpación de parte del intestino grueso o una colostomía completa. Aunque la cirugía no cura la enfermedad de Crohn, el 75% de todos los pacientes se someterán al menos a una operación quirúrgica a lo largo de su vida y hasta el 90% de los pacientes requerirán operaciones adicionales. Un agente terapéutico que pudiera tratar satisfactoriamente la enfermedad inflamatoria intestinal podría mejorar enormemente la calidad de vida del paciente, a la vez que permitiría potencialmente que el sistema de salud ahorrara millones de dólares en costes asociados con procedimientos de cirugía invasiva.

En estas enfermedades, la inflamación crónica, causada por varios mediadores inflamatorios, se ha visto implicada en la patogénesis. El sistema del complemento ha sido reconocido como uno de estos mediadores inflamatorios, ya que se han encontrado niveles más elevados de productos del complemento en el colon de los pacientes con EII (Nielsen *et al.* 1996). La colitis ulcerosa, también conocida como colitis idiopática, se caracteriza por la inflamación del colon y el recto, los cuales se inflaman y presentan úlceras; su origen no está claro, aunque se suelen encontrar anticuerpos contra el epitelio de colon y contra la cepa 0119 B14 de *E. coli*. Su gravedad varía y los pacientes sufren recaídas frecuentes. La enfermedad de Crohn, también denominada enteritis regional o ileitis regional, se caracteriza por la inflamación, el endurecimiento y la aparición de úlceras en la pared intestinal, normalmente en la parte terminal del íleon, con mucosa edematosa o tejido blando endurecido, infiltración del mesenterio, pared intestinal endurecida y frecuentemente masas inflamadas, abscesos o bucles dilatados rellenos de fluido. Las complicaciones incluyen fístulas, tractos sinusales intramurales, abscesos, perforaciones, megacolon tóxico, obstrucción del intestino o hidronefrosis y existe un riesgo más elevado de adenocarcinoma en el íleon o el colon.

En ambas enfermedades se suelen requerir largos periodos de reposo absoluto y en los casos graves la parte afectada del intestino se puede extirpar quirúrgicamente, en cuyo caso es necesario el uso de una bolsa de ostomía. Los únicos agentes terapéuticos disponibles son corticosteroides tales como prednisolona, anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor de necrosis tumoral tales como Remicade (infliximab), agentes inmunosupresores tales como metotrexato, azatioprina, ciclosporina, tacrolimus y micofenolato de mofetilo u otros agentes antiinflamatorios tales como sulfasalacina. Estos agentes, especialmente los esteroides, pueden presentar una eficacia limitada y pueden tener efectos secundarios graves. Existe una variedad de otros agentes que se encuentran en diferentes fases de los ensayos clínicos, que incluyen corticosteroides tales como budesonida, antagonistas y agonistas de citocinas tales como interleucina-10 e interleucina-11, y un agonista del receptor nicotínico. A nuestro saber, ninguno de estos agentes aprobados o en experimentación y en particular ningún agente que sea una molécula pequeña, tiene como objetivo el receptor del C5a.

Por consiguiente, en el campo se necesitan en gran medida agentes eficaces no tóxicos que no requieran una administración mediante inyección y que se puedan producir con un coste razonable.

RESUMEN DE LA INVENCION

Debido a que no se conoce la implicación del complemento en la EII, los inventores de la presente han estudiado los posibles efectos inhibidores de inhibidores específicos del complemento en un modelo animal de colitis. Los inventores acaban de mostrar por primera vez que un inhibidor específico del receptor del C5a es capaz de aliviar los signos dañinos en la colitis inducida por el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en ratas. Este modelo se ha utilizado extensamente para investigar la patogénesis de la EII (Morris *et al.* 1989). Los inventores han descubierto grandes efectos protectores para los antagonistas del C3a y el C5a, los cuales sugieren que el complemento tiene una función importante y previamente indefinida como mediador de la EII.

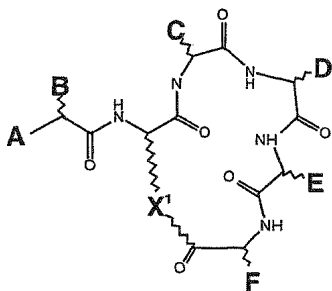
Este es el primer caso descrito de un inhibidor del sistema del complemento utilizado para modular la patología en un modelo de la EII.

Por consiguiente, el complemento es un objetivo potencial para la intervención terapéutica en la enfermedad inflamatoria intestinal.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que utiliza una cantidad eficaz de un inhibidor de un receptor acoplado a proteína G en un sujeto que necesite dicho tratamiento.

El inhibidor es un compuesto tal que:

- es un antagonista de un receptor acoplado a proteína G,
- no tiene sustancialmente actividad agonista y
- es un compuesto peptídico o peptidomimético cíclico de fórmula I



donde A es H, alquilo, arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, NH-arilo, NH-acilo, NH-benzoílo, NHSO₃, NHSO₂-alquilo, NHSO₂-arilo, OH, O-alquilo u O-arilo;

B es un grupo alquilo, arilo, fenilo, bencilo, naftilo o indol, o la cadena lateral de un aminoácido D o L, tal como L-fenilalanina o L-fenilglicina, pero no es la cadena lateral de glicina, D-fenilalanina, L-homofenilalanina, L-triptófano, L-homotriptófano, L-tirosina o L-homotirosina;

C es un sustituyente pequeño, tal como la cadena lateral de un aminoácido D o L o de un homoaminoácido, tal como glicina, alanina, leucina, valina, prolina, hidroxiprolina o tioprolina, pero preferentemente no es un sustituyente voluminoso, tal como isoleucina, fenilalanina o ciclohexilalanina;

D es la cadena lateral de un aminoácido D neutro, tal como D-leucina, D-homoleucina, D-ciclohexilalanina, D-homociclohexilalanina, D-valina, D-norleucina, D-homonorleucina, D-fenilalanina, D-tetrahidroisoquinolina, D-glutamina, D-glutamato o D-tirosina, pero preferentemente no es un sustituyente pequeño tal como la cadena lateral de glicina o D-alanina, una cadena lateral plana voluminosa tal como D-triptófano, o una cadena lateral cargada voluminosa tal como D-arginina o D-lisina;

E es la cadena lateral de un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, L-triptófano y L-homotriptófano, o es L-1-naftilalanina o L-3-benzotienilalanina;

F es la cadena lateral de L-arginina, L-homoarginina, L-citrulina o L-canavanina, o un bioisómero de estos, es decir, una cadena lateral en la cual se conserva la guanidina terminal o el grupo urea, pero el esqueleto carbonado se sustituye por un grupo que tiene una estructura diferente pero que es tal que la cadena lateral como un todo reacciona con la proteína objetivo de la misma manera que el grupo principal; y

X es -(CH₂)_nNH- o (CH₂)_nS-, donde n es un número entero de 1 a 4, preferentemente 2 ó 3; -(CH₂)₂O-; -(CH₂)₃O-; -(CH₂)₃-; -(CH₂)₄-; -CH₂COCHRNH-; o -CH₂-CHCOCHRNH-, donde R es la cadena lateral de cualquier aminoácido común o no común.

En C se pueden utilizar las formas *cis* y *trans* de la hidroxiprolina y la tioprolina.

Preferentemente, A es un grupo acetamida, un grupo aminometilo o un grupo sulfonamida sustituido o no sustituido.

Preferentemente, cuando A es una sulfonamida sustituida, el sustituyente es una cadena de alquilo de 1 a 6, preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono, o un grupo fenilo o toluilo.

En una realización particularmente preferida, el compuesto tiene actividad antagonista contra el C5aR y no tiene actividad agonista del C5a.

El compuesto es preferentemente un antagonista de los receptores del C5a en células humanas y de mamíferos, que incluyen, sin carácter limitante, leucocitos humanos polimorfonucleares y macrófagos humanos. Preferentemente, el compuesto se une fuertemente y de manera selectiva a los receptores del C5a, y más preferentemente tiene una actividad antagonista potente a concentraciones submicromolares. Aún más preferentemente, el compuesto tiene una afinidad por el receptor de C150 < 25 μM y una potencia antagonista de C150 < 1 μM .

Más preferentemente, el compuesto es el compuesto **1**, compuesto **33**, compuesto **60** o compuesto **45** descritos en la solicitud provisional N.º PCT/AU02/01427, publicada como WO 03/033528.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto según se ha definido anteriormente en la producción de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

El inhibidor se puede utilizar conjuntamente con uno o más agentes diferentes para el tratamiento de la EII, que incluyen, sin carácter limitante, corticosteroides tales como prednisolona y budesonida, otros agentes inmunosupresores tales como infliximab (Remicade, Johnson & Johnson), metotrexato o azatioprina, agentes antiinflamatorios tales como sulfasalacina, Colazal (balsalazida) y análogos, y agentes probióticos.

Los inventores han demostrado en la presente que el inhibidor del C3a, SB 290157, también es capaz de modular la patología de la EII en un sistema de modelo animal y, por lo tanto, se considera que una combinación de un inhibidor del C5a y un inhibidor del C3a será útil en el tratamiento de esta enfermedad.

Las composiciones de la invención se pueden formular para un uso oral, parenteral, inhalatorio, intranasal, rectal (intracolónico) o transdérmico, pero se prefieren las formulaciones orales o rectales. Las formulaciones adecuadas para cualquier vía de administración se pueden preparar mediante métodos estándar, por ejemplo, por referencia a libros de texto conocidos como *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Vol. II, 2000 (20.ª edición), A. R. Gennaro (ed), Williams & Wilkins, Pensilvania.

Las formulaciones preferidas incluyen cápsulas con recubrimiento entérico o formas farmacéuticas rectales (intracolónicas) tales como enemas, para facilitar la absorción en el colon, el área local de la inflamación.

La invención se puede aplicar al tratamiento de cualquier tipo de enfermedad inflamatoria intestinal, que incluye, sin carácter limitante, la enfermedad de Crohn (enteritis regional); colitis ulcerosa; enfermedades autoinmunitarias y mediadas por el sistema inmunitario del intestino delgado y del grueso, tales como enteritis linfocítica plasmocítica, enfermedad celíaca, colitis colágena, colitis linfocítica y enterocolitis eosinofílica; colitis indeterminada, colitis infecciosa (colitis viral, bacteriana o causada por protozoos, por ejemplo, colitis amebiana), colitis pseudomembranosa (colitis necrotizante) y enfermedad inflamatoria intestinal isquémica.

Aunque la invención no está restringida de ninguna manera al tratamiento de ningún animal o especie en particular, se considera particularmente que la invención será útil en el tratamiento médico de humanos y también será útil en el tratamiento veterinario, particularmente de animales de compañía tales como gatos y perros, ganado tal como ganado vacuno, caballos y ovejas, y animales de zoológico, que incluyen primates no humanos, bóvidos grandes, félidos, ungulados y cánidos. Por ejemplo, los felinos y particularmente los caninos sufren una variedad de enteropatías inflamatorias, las cuales tienen algunas similitudes con la EII en los humanos. Estas incluyen enterocolitis, colitis linfocítica plasmocítica canina, colitis prototecal y colitis ulcerosa histiocítica.

El compuesto se puede administrar en cualquier dosis adecuada y a través de cualquier vía adecuada. Se prefiere la administración oral o rectal, por la mayor conveniencia y aceptación de estas vías. Cabe esperar que la mayoría, sino todos los compuestos de la invención, sean estables en presencia de enzimas metabólicas, tales como las enzimas del intestino, sanguíneas, pulmonares o intracelulares. Dicha estabilidad se puede evaluar fácilmente mediante métodos rutinarios conocidos por los expertos en la materia.

La dosis eficaz dependerá de la naturaleza de la enfermedad por tratar, así como de la edad, peso y estado de salud subyacente del tratamiento individual. Esto se dejará al criterio del médico o veterinario encargado. Los niveles de la dosis adecuados se pueden determinar fácilmente mediante experimentación de ensayo y error, utilizando métodos conocidos en la materia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el efecto en el índice de mortalidad a los 8 días. pre = pretratamiento; post = postratamiento.

La Figura 2 muestra el efecto en la ingesta de comida. La cantidad de comida consumida se evaluó después de 24 h [A] o a los 8 días [B]. Los datos representan la media \pm desviación estándar de la media (n = 4-12). Ratas tratadas con fármaco *P < 0.05 frente al control de colitis. pre = pretratamiento; post = postratamiento.

La Figura 3 muestra el efecto en el peso corporal. Se evaluó el cambio del peso corporal tras la administración de TNBS después de [A] 24 h o [B] 8 días. Los datos representan la media \pm desviación estándar de la media (n = 4-12). Ratas tratadas con fármaco *P < 0.05 frente al control de colitis. pre = pretratamiento; post = postratamiento.

La Figura 4 resume las puntuaciones clínicas macroscópicas. Se otorgó una puntuación para cada colon según el daño macroscópico en una escala de 0-13 después de [A] 24 h o [B] 8 días. Los datos representan la media \pm desviación estándar de la media (n = 4-12). Ratas tratadas con fármaco *P < 0.05 frente al control de colitis. pre = pretratamiento; post = postratamiento.

La Figura 5 muestra el efecto en los niveles de mieloperoxidasa (MPO) en el colon. Los niveles de MPO en el colon de las ratas se evaluaron después de [A] 24 h o [B] 8 días. Los datos representan la media \pm desviación estándar de la media (n = 4-12). Ratas tratadas con fármaco *P < 0.05 frente al control de colitis. pre = pretratamiento; post = postratamiento.

La Figura 6 muestra el efecto en los niveles de edema del colon en estudios de 24 h y de 8 días. [A] 24 h; [B] 8 días. Los datos representan la media \pm desviación estándar de la media (n = 4-12). Ratas tratadas con fármaco *P < 0.05 frente al control de colitis. pre = pretratamiento; post = postratamiento.

La Figura 7 muestra el efecto en los niveles de TNF- α en el suero y en el colon después de 8 días. Los datos representan la media \pm desviación estándar de la media (n = 4-12).

[A] suero; [B] tejido del colon.

Ratas tratadas con fármaco *P < 0.05 frente al control de colitis. pre = pretratamiento; post = postratamiento.

La Figura 8 muestra la sección del colon de las ratas en el día 8 del estudio, teñida con hematoxilina y eosina (magnificación de x 40). Las imágenes son habituales y representativas de cada grupo de estudio.

[A] Rata con operación simulada inyectada con solución salina, con capa epitelial y de la mucosa (ML, por sus siglas en inglés) intactas;

[B] Rata de control de colitis TNBS exenta de fármacos, con daños extensos que incluyen infiltración de células inflamatorias (CI), edema (E) y destrucción completa de la arquitectura de la ML (indicada con flechas);

[C] Rata postratada tras TNBS con un antagonista del C5a (10 mg/kg/día, oral), con infiltración de CI y E, pero con la ML intacta; y

[D] Rata postratada tras TNBS con prednisolona (1 mg/kg/día, SC), con infiltración de CI, E, hemorragia extensa (H) y erosión de la ML (indicada con flechas).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En las reivindicaciones que siguen más adelante y en la descripción anterior de la invención, excepto donde el contexto requiera lo contrario por lengua expresa o por implicación necesaria, el término “comprender” o variaciones tales como “comprende/n” o “que comprende/n” se utilizan en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características mencionadas pero no para descartar la presencia o adición de otras características en varias realizaciones de la invención.

Según se utiliza en la presente, las formas en singular “un/o/a” y “el/la” incluyen referencias en plural, excepto que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, una referencia a “una enzima” incluye una pluralidad de dichas enzimas, y una referencia a “un aminoácido” es una referencia a uno o más aminoácidos. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que un experto en la materia a la cual pertenece esta invención suele sobreentender. Aunque se pueden utilizar cualesquiera materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en la presente para poner en práctica o ensayar la presente invención, se describen a continuación los materiales y métodos preferidos.

Las abreviaturas utilizadas en la presente son las siguientes:

Cit	citulina
dCha	D-ciclohexilamina
DPhe	D-fenilalanina
EII	enfermedad inflamatoria intestinal
ip	intraperitoneal
iv	intravenosa

LPS	lipopolisacárido
MPO	mieloperoxidasa
PMN	granulocito polimorfonuclear
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
5 vr	vía rectal
sc	subcutáneo
TNBS	ácido trinitrobencenosulfónico
TNF- α	factor de necrosis tumoral α

10 A lo largo de la descripción se utilizan códigos de especificación convencionales de una letra y de tres letras para representar los aminoácidos.

15 A los efectos de esta descripción, debe entenderse que el término “alquilo” se refiere a una cadena alquímica sustituida o no sustituida, lineal, ramificada o cíclica, de 1 a 6, preferentemente de 1 a 4 carbonos. Más preferentemente, el grupo alquilo es un grupo metilo. Debe entenderse que el término “acilo” se refiere a un acilo sustituido o no sustituido de 1 a 6, preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. Más preferentemente, el grupo acilo es acetilo. Debe entenderse que el término “arilo” se refiere a un grupo arilo homocíclico o heterocíclico, sustituido o no sustituido, en el cual el anillo contiene preferentemente 5 ó 6 miembros.

Un aminoácido “común” es un aminoácido L que se selecciona del grupo que consiste en glicina, leucina, isoleucina, valina, alanina, fenilalanina, tirosina, triptófano, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, cisteína, metionina, arginina, lisina, prolina, serina, treonina e histidina.

20 Un aminoácido “no común” incluye, sin carácter limitante, aminoácidos D, homoaminoácidos, *N*-alquilaminoácidos, dehidroaminoácidos, aminoácidos aromáticos que no sean fenilalanina, tirosina y triptófano, ácido *orto*-, *meta*- o *para*-aminobenzoico, ornitina, citrulina, canavanina, norleucina, ácido γ -glutámico, ácido aminobutírico, L-fluorenilalanina, L-3-benzotienilalanina y aminoácidos α,α -disustituidos.

25 Generalmente, los términos “que se trata”, “tratamiento” y análogos se utilizan en la presente para referirse a que afectan a un sujeto, tejido o célula para obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico, en el sentido que prevenga completa o parcialmente una enfermedad o señal o síntoma de esta, y/o puede ser terapéutico, en el sentido que cure completa o parcialmente una enfermedad.

30 Según se utiliza en la presente, el término “que se trata” engloba cualquier tratamiento o prevención de una enfermedad en un vertebrado, un mamífero, particularmente un humano, e incluye: prevenir la enfermedad en un sujeto que pueda estar predispuesto a dicha enfermedad, pero que todavía no se le haya diagnosticado; inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o aliviar o mejorar los efectos de la enfermedad, es decir, provocar una regresión de los efectos de la enfermedad.

35 La invención incluye el uso de varias composiciones farmacéuticas útiles para aliviar la enfermedad reivindicada. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con una realización de la invención se preparan introduciendo un compuesto de fórmula I o sales de este y uno o más agentes farmacéuticamente activos o combinaciones del compuesto de fórmula I y uno o más agentes farmacéuticamente activos, en una forma adecuada para ser administrada a un sujeto utilizando portadores, excipientes y aditivos o auxiliares.

40 Algunos portadores o auxiliares utilizados frecuentemente incluyen carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteínas lácteas, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales, glicoles polietilénicos y disolventes, tales como agua esterilizada, alcoholes, glicerol y alcoholes polihídricos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores fluidos y nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes. Otros portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, que incluyen sales, conservantes, tampones y análogos, según se describe, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20.^a edición, Williams & Wilkins (2000) y *The British National Formulary*, 43.^a edición (Asociación Médica Británica y Real Sociedad de Farmacia del Reino Unido, 2002; <http://bnf.rhn.net>). El pH y la concentración exacta de los diferentes componentes de la composición farmacéutica se ajustan según los procedimientos rutinarios en la materia. Remítase a *The Pharmacological Basis for Therapeutics* de Goodman y Gilman (7.^a edición, 1985).

50 Las composiciones farmacéuticas se preparan y se administran preferentemente en dosis unitarias. Las dosis unitarias sólidas incluyen comprimidos, cápsulas y supositorios. Para tratar a un sujeto se pueden utilizar diferentes dosis diarias, dependiendo de la actividad del compuesto, la vía de administración, la naturaleza y gravedad del trastorno, y la edad y el peso corporal del sujeto. Sin embargo, en ciertas circunstancias pueden ser adecuadas unas dosis diarias mayores o menores. La administración de la dosis diaria se puede llevar a cabo mediante una única

administración en forma de una dosis unitaria individual o mediante varias dosis unitarias más pequeñas y también mediante una administración múltiple de dosis subdivididas en intervalos específicos.

5 Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la invención se pueden administrar local o sistémicamente en una dosis terapéuticamente eficaz. Las cantidades efectivas para este uso dependerán, obviamente, de la gravedad de la enfermedad y del peso y el estado general del sujeto. Habitualmente, las dosis utilizadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil de las cantidades útiles para la administración *in situ* de la composición farmacéutica, y se pueden utilizar modelos animales para determinar las dosis eficaces para el tratamiento de los efectos secundarios citotóxicos. Se describen varias consideraciones, por ejemplo, en *Science*, 249: 1527 (1990) de Langer. Las formulaciones para uso oral se pueden presentar en forma de cápsulas duras de gelatina, en las cuales el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. También se pueden presentar en forma de cápsulas blandas de gelatina, en las cuales el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

15 Normalmente, las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en una mezcla con excipientes adecuados para la producción de suspensiones acuosas. Dichos excipientes pueden ser agentes de suspensión tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; agentes dispersantes o humectantes, los cuales pueden ser

- (a) un fosfolípido que existe de forma natural tal como la lecitina;
- (b) un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, por ejemplo, estearato de polioxietileno;
- 20 (c) un producto de condensación del óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol;
- (d) un producto de condensación del óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y hexitol, tal como monooleato de sorbitol polioxietilenado; o
- 25 (e) un producto de condensación del óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado.

30 Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en forma de una suspensión esterilizada inyectable acuosa u oleaginosa. Esta suspensión se puede formular según los métodos conocidos utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados, tales como los mencionados anteriormente. El preparado esterilizado inyectable también puede ser una solución o suspensión esterilizada inyectable en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer y una solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos esterilizados como disolventes o medios de suspensión. Se puede utilizar cualquier aceite fijo simple con este propósito, incluidos los mono- o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden utilizar ácidos grasos, tales como el ácido oleico, para preparar inyectables.

35 Los compuestos de fórmula I también se pueden administrar en forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de varios fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

40 Los niveles de dosis del compuesto de fórmula I de la presente invención normalmente serán del orden de aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal, con una dosis preferida que oscila entre aproximadamente 0.5 mg y aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal por día (de aproximadamente 0.5 g a aproximadamente 3 g por paciente por día). La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una dosis única variará dependiendo del huésped a tratar y la vía particular de administración. Por ejemplo, una formulación diseñada para administración oral en humanos puede contener de aproximadamente 5 mg a 1 g de un compuesto activo con una cantidad adecuada y conveniente de material portador, la cual puede variar de aproximadamente el 5 al 95 por ciento de la composición total. Las formas de dosis unitaria generalmente contendrán entre aproximadamente 5 mg y 500 mg de principio activo.

45 Sin embargo, se entenderá que el nivel específico de dosis para cualquier paciente particular dependerá de varios factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a la terapia.

50 Además, algunos de los compuestos de la invención pueden formar solvatos con agua o disolventes orgánicos comunes. Dichos solvatos están globados en el alcance de la invención.

Los compuestos de la invención se pueden combinar adicionalmente con otros compuestos terapéuticos para proporcionar una combinación operativa. Se pretende incluir cualquier combinación químicamente compatible de

agentes farmacéuticamente activos, siempre que la combinación no elimine la actividad del compuesto de fórmula I de esta invención.

La invención se describirá a continuación solamente haciendo referencia a los siguientes métodos generales y ejemplos experimentales.

5 **Métodos generales**

Síntesis de péptidos

10 Los compuestos peptídicos cíclicos de fórmula I se preparan de acuerdo con los métodos descritos detalladamente en las anteriores solicitudes de los inventores N.º PCT/AU98/00490 (publicada como WO 99/00406) y PCT/AU02/01427 (publicada como WO 03/033528). En la solicitud australiana provisional N.º 2003902743 de los inventores, se describe un método alternativo de síntesis. Con esta referencia se incorporan en la presente todas las explicaciones de estas descripciones. Aunque la invención se ilustra específicamente en referencia al compuesto AcF-[OPdChaWR] (PMX53), cuyo péptido lineal correspondiente es Ac-Phe-Orn-Pro-dCha-Trp-Arg, se entenderá claramente que la invención no se limita a este compuesto.

15 Los compuestos **1-6, 17, 20, 28, 30, 31, 36** y **44** descritos en la solicitud de patente internacional N.º PCT/AU98/00490 (publicada como WO 99/00406) y los compuestos **10-12, 14, 15, 25, 33, 35, 40, 45, 48, 52, 58, 60, 66** y **68-70** descritos por primera vez en la solicitud provisional australiana N.º PCT/AU02/01427 (publicada como WO 03/033528) tienen una potencia antagonista apreciable ($CI_{50} < 1 \mu M$) contra el receptor del C5a en neutrófilos humanos. El PMX53 y los compuestos **33, 45** y **60** de la solicitud PCT/AU02/01427 (publicada como WO 03/033528) son los más preferidos.

20 Los inventores han descubierto que todos los compuestos de fórmula I que se han estudiado hasta ahora tienen actividades farmacológicas similares en líneas generales, aunque las propiedades físico-químicas, la potencia y la biodisponibilidad de los compuestos individuales varían un poco, dependiendo de los sustituyentes específicos.

Los ensayos generales descritos a continuación se pueden utilizar como una criba inicial de candidatos para actuar como inhibidores de los receptores acoplados a proteínas G y, especialmente, de los receptores del C5a.

25 **Preparación del fármaco y formulación**

El antagonista del receptor del C5a humano AcF-[OPdChaWR] (AcPhe[Orn-Pro-D-Ciclohexilalanina-Trp-Arg]) se sintetizó según se ha descrito anteriormente, se purificó mediante HPLC en fase reversa y se caracterizó completamente mediante espectroscopía de masas y espectroscopía de RMN de protón. El antagonista del C5a se preparó en aceite de oliva (10 mg/mL) para las dosis orales y en una solución al 30% en polietilenglicol (0.6 mg/mL) para las dosis SC. El antagonista del C3a SB 290157 (Ph₂CHCH₂OCH₂CO-Arg-OH) se ha descrito en detalle anteriormente (Ames *et al.* 2001). Se sintetizó y se purificó mediante HPLC en fase reversa y se caracterizó mediante espectroscopía de masas y espectroscopía de RMN. Se preparó en una solución al 50% en propilenglicol (30 mg/kg) para las inyecciones IP. El glucocorticosteroide prednisolona (Sigma, EE. UU.) se preparó en una solución al 30% en polietilenglicol para las dosis SC. El inhibidor del TNF- α infliximab (Remicade[®]) se preparó en una solución salina esterilizada (3 mg/mL) según las indicaciones para dosis IV. No se observaron efectos antiinflamatorios para el propilenglicol ni para el polietilenglicol en ratas con colitis inducida con TNBS.

Ensayo de unión del receptor

40 Los ensayos se llevan a cabo con PMN humanos frescos, aislados según se ha descrito anteriormente (Sanderson *et al.* 1995), utilizando una solución amortiguadora de HEPES 50 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, 0.5% de albumina de suero bovino, 0.1% de bacitracina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 μM . En los ensayos realizados a 4 °C, se añaden de forma secuencial la solución amortiguadora, el C5a recombinante humano no marcado (Sigma) o péptido, el C5a marcado con ¹²⁵I utilizando el reactivo de Hunter/Bolton (~ 20 pM) (New England Nuclear, MA) y los PMN (0.2×10^6) en un pocillo de ensayo Millipore Multiscreen (HV 0.45) con un volumen final de 200 μL /pocillo. Después de incubar durante 60 min a 4 °C, las muestras se filtran y se lava el pocillo una vez con la solución amortiguadora. Se secan los filtros, se puncionan y se evalúan en un contador gamma LKB. La unión no específica se determina mediante la inserción de péptido 1 mM o de C5a 100 nM, que suele provocar una unión total del 10-15%.

Los datos se analizan utilizando métodos estadísticos y de regresión no lineal con el post-test de Dunnett.

Ensayo de liberación de mieloperoxidasa para determinar la actividad antagonista

50 Se aíslan las células según se ha descrito anteriormente (Sanderson *et al.* 1995) y se incuban con citocalasina B (5 $\mu g/mL$, 15 min, 37 °C). Se añaden solución salina equilibrada de Hank, que contiene el 0.15% de gelatina, y péptido a una placa de 96 pocillos (volumen total de 100 μL /pocillo) y a continuación se añaden 25 μL de células ($4 \times 10^6/mL$). Para evaluar la capacidad de cada péptido para actuar como antagonista del C5a, las células se incuban durante 5 min a 37 °C con cada péptido y a continuación se añade C5a (100 nM) y se incuba durante 5 min más. A continuación se añaden 50 μL de fosfato de sodio (0.1 M, pH de 6.8) a cada pocillo, se enfría la placa hasta temperatura ambiente y se

añaden a cada pocillo 25 µL de una mezcla recién preparada de volúmenes iguales de dimetoxibencidina (5.7 mg/mL) y H₂O₂ (0.51%). Se detiene la reacción a los 10 min mediante la adición de azida de sodio al 2%. Se evalúan las absorbancias a 450 nm en un analizador de placas Bioscan 450, se corrigen con los valores de control (sin péptido) y se analizan por regresión no lineal.

5 Ejemplo 1 Efecto de PMX53 en la enfermedad inflamatoria intestinal

Debido a que actualmente no se conoce la implicación del complemento en la EII, los inventores de la presente pretenden evaluar los posibles efectos de inhibición de PMX53 (AcF-[OPdChaWR]) en ratas con colitis inducida por el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). A efectos comparativos, los inventores también examinan la eficacia de un antagonista del C3a, SB 290157 (Ames *et al.* 2001), del corticosteroide prednisolona y del anticuerpo del TNF-α infliximab.

Se evaluó la habilidad de PMX53 (AcF-[OPdChaWR]) para aliviar los signos dañinos en ratas con colitis inducida por el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Este modelo se ha utilizado extensamente en la investigación de la patogénesis de la EII (Morris *et al.* 1989).

Se privó de comida a ratas Wistar macho (250-300 g) durante 24 horas antes de ser anestesiadas con ketamina (80 mg/kg i.p.) y xilacina (8 mg/kg i.p.). A continuación se insertó intracolónicamente un catéter de polietileno con un diámetro externo de 1.7 mm, a una distancia de 8 cm del ano. A continuación se infundieron 120 mg/kg de TNBS (solución de 50 mg/mL) junto con 250 µL de etanol (100%) en las ratas, las cuales permanecieron boca abajo durante 30 min para prevenir pérdidas. Las ratas con operación simulada (ratas sin colitis) recibieron solución salina o bien 250 µL de etanol y solución salina. A continuación, se dejó que las ratas se recuperaran bajo observación.

Al finalizar cada experimento, las ratas se anestesiaron con zolazepam (50 mg/kg, i.p.) y xilacina (12 mg/kg, i.p.), se tomaron muestras de sangre y se almacenó el suero a -20 °C para determinar posteriormente las concentraciones del TNF-α. El colon de cada rata se diseccionó, se lavaron los 8 cm distales con solución salina y un observador independiente puntuó ciegamente el daño macroscópico clínico, utilizando una escala de 0-13, según se expone más adelante (Bobin-Dubigeon *et al.* 2001). A continuación se tomó una sección del colon afectado, se pesó, se introdujo en un horno a 80 °C durante 24 h, a continuación se volvió a pesar y se determinó la proporción del peso húmedo frente al peso seco como una medida del edema del colon (Rachmilewitz *et al.* 1989). También se tomó una sección separada del colon afectado y se homogeneizó con 1 mL de una solución salina amortiguadora de fosfato, se sonicó durante 20 segundos y se centrifugó (14 000 x g, 10 min). A continuación, el sobrenadante resultante se almacenó (-20 °C) para determinar posteriormente el TNF-α, o bien se utilizó inmediatamente en un ensayo para determinar los niveles de mieloperoxidasa (MPO). En pocas palabras, el ensayo consistió en la adición de 20 µL de sustrato (o-dianisidina, 2.85 mg/mL, Sigma, EE. UU.; y 0.85% de peroxidasa de hidrógeno) a una dilución de 1:40 del sobrenadante en una solución salina amortiguadora de fosfato. A continuación se determinaron las absorbancias a 450 nm, 5 min después de la adición del sustrato para las muestras de 24 h y 15 min después de la adición para las muestras de 8 días. Los resultados del contenido de MPO en el colon se convirtieron en unidades de absorbancia/g de tejido. Se tomaron secciones adicionales del colon y se almacenaron en formalina al 10% para análisis histopatológico. Las muestras fijas de colon se incrustaron en cera de parafina y se tiñieron las secciones utilizando un colorante de hematoxilina y eosina, se fotografiaron y un observador independiente las examinó ciegamente. Se determinaron los niveles de TNF-α en tejido y en suero en las muestras almacenadas, utilizando un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima según se ha descrito anteriormente (Arumugam *et al.* 2002), utilizando muestras no diluidas. Los resultados del contenido de TNF-α en el colon se convirtieron posteriormente en pg de TNF-α/g de tejido.

Se seleccionaron dos franjas horarias para este estudio, una franja horaria grave (24 horas) y una franja horaria crónica (8 días). Durante el transcurso del estudio, se evaluaron diariamente el peso corporal y la ingesta de comida. En el estudio de 24 horas, todos los tratamientos farmacológicos se iniciaron 2 días antes de la infusión de TNBS (prevención). Las ratas tratadas con PMX53, con prednisolona y con una combinación de estos se trataron una vez al día, y las ratas tratadas con el antagonista del C3a recibieron la dosis dos veces al día. Las ratas tratadas con el anticuerpo monoclonal del anti-TNF-α, infliximab, recibieron la dosis por vía intravenosa en una ocasión, 2 días antes de la infusión de TNBS. En el modelo de 24 horas, se utilizaron los siguientes grupos de tratamiento:

- (a) PMX53 (10 mg/kg, en aceite de oliva, oral),
- (b) PMX53 (0.3 mg/kg, en 30% de polietilenglicol, subcutáneo),
- 50 (c) antagonista del C3a (30 mg/kg, 2 veces al día, IP),
- (d) prednisolona (1 mg/kg, en 80% de polietilenglicol, subcutáneo),
- (e) una combinación de PMX53 (10 mg/kg, en aceite de oliva, oral) y prednisolona (1 mg/kg, en 80% de polietilenglicol, subcutáneo), y
- (f) infliximab (1 mg/kg, en solución salina, intravenoso).

En el estudio de 8 días, las ratas tratadas farmacológicamente se trataron antes de inducir la colitis (2 días antes; prevención) o tras la inducción de la colitis (24 horas después; reversión). En el estudio de 8 días, se utilizaron los siguientes grupos de tratamiento:

- 5 (a) PMX53 (10 mg/kg, en aceite de oliva, oral, antes y después de la inducción),
- (b) PMX53 (0.3 mg/kg, en 30% de polietilenglicol, subcutáneo, solo antes de la inducción),
- (c) PMX53 (1 mg/kg, en aceite de oliva, oral, solo después de la inducción),
- (d) prednisolona (1 mg/kg, en 80% de polietilenglicol, subcutáneo, antes y después de la inducción),
- (e) una combinación de PMX53 (10 mg/kg, en aceite de oliva, oral) y prednisolona (1 mg/kg, en 80% de polietilenglicol, subcutáneo) (solo antes de la inducción), y
- 10 (f) infliximab (1 mg/kg, en solución salina, intravenoso, solo antes de la inducción).

A continuación se evaluó el colon de cada rata macroscópicamente en condiciones ciegas en una escala de 1-14, según se muestra a continuación:

<u>Formación de úlceras</u>	<u>Diarrea</u>	<u>Adhesiones</u>
0- Sin daños	0- Ausente	3- Ausente
1- Hiperemia focal	1- Moderado	4- Moderado
2- Hiperemia y endurecimiento del intestino	2- Grave	5- Grave
3- Úlcera en un punto		
4- Úlcera en dos puntos		
5- Úlcera > 1 cm		
6-10 Úlcera > 2 cm; la puntuación aumenta en 1 por cada cm adicional		

15 En las Figuras 1-7 se resumen los resultados para varios parámetros. Todos los resultados experimentales se expresan como la media \pm desviación estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc. EE. UU.). Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo entre los grupos tratados farmacológicamente y los animales de control de colitis utilizando un análisis de varianza de una vía y a continuación un análisis de comparación post-test de Dunnett. La significancia estadística se determinó a un valor de $P < 0.05$.

20 Índice de mortalidad: Según se muestra en la Figura 1, la inducción de colitis en ratas exentas de fármaco provocó un elevado índice de mortalidad, el 39%, empezando 2 días después de la administración de TNBS. Todos los tratamientos farmacológicos, excepto el postratamiento con prednisolona, provocaron una disminución de la mortalidad ($n = 8-16$) en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco ($n = 13$). No se registraron muertes en los animales con operación simulada ($n = 4$). Las ratas tratadas con el antagonista del C5a, tanto antes de la inducción (10 mg/kg/día oral y 0.3 mg/kg/día SC) como 24 h después de la inducción (1 ó 10 mg/kg/día oral), mostraron una mayor supervivencia, con índices de mortalidad menores o iguales al 20%. Las ratas pretratadas con el corticosteroide prednisolona (1 mg/kg/día SC) mostraron una reducción similar en el índice de mortalidad, hasta el 11%; sin embargo, el postratamiento con prednisolona no mostró ningún efecto significativo en la reducción de la mortalidad. El postratamiento con infliximab (3 mg/kg IV) redujo la mortalidad hasta el 20%, el cual resultó ser menos eficaz que el antagonista del C5a (con 10 mg/kg oral o 0.3 mg/kg SC) o el pretratamiento con prednisolona. No se registraron muertes entre las ratas pretratadas con una combinación del antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral) y prednisolona (1 mg/kg/día SC) o en ratas pretratadas con el antagonista del C5a con 0.3 mg/kg SC.

35 Ingesta de comida: No se observó ninguna mejora significativa en la ingesta de comida después de 24 horas del tratamiento farmacológico en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Después de 8 días, todas las ratas tratadas, excepto las postratadas con prednisolona, comieron significativamente más comida que las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Según se muestra en la Figura 2A, la inducción de colitis provocó una disminución en la ingesta de comida en todas las ratas a las cuales se administró TNBS en comparación con las ratas con operación simulada después de 24 horas. El tratamiento farmacológico no mejoró significativamente la ingesta de comida durante 24 horas.

Según se ilustra en la Figura 2B, al cabo de 8 días las ratas exentas de fármaco todavía comían menos que las ratas con operación simulada. Las ratas tratadas con el antagonista del C5a, tanto antes de la inducción (10 mg/kg/día oral y 0.3 mg/kg/día SC) como 24 h después de la inducción (1 ó 10 mg/kg/día oral), comieron significativamente más comida que las ratas de control de colitis y consumieron niveles similares de comida a los de las ratas con operación simulada en el día 8 ($P < 0.05$). Las ratas pretratadas con prednisolona (1 mg/kg/día SC) también comieron significativamente más comida que las ratas de control de colitis después de 8 días ($P < 0.05$); sin embargo, las ratas postratadas con este fármaco no mostraron ninguna mejora en la ingesta de comida ($P > 0.05$). Las ratas pretratadas con infliximab (3 mg/kg IV) también comieron significativamente más comida que las ratas exentas de fármaco después de 8 días, y también lo hicieron las ratas pretratadas con una combinación del antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral) y prednisolona (1 mg/kg/día SC) ($P < 0.05$).

Peso corporal: No se observó ninguna reducción significativa de la pérdida de peso después de 24 horas del tratamiento farmacológico en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Después de 8 días, solamente las ratas tratadas con el antagonista del C5a ganaron peso significativamente en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Todas las ratas que recibieron TNBS mostraron una considerable pérdida de peso a las 24 horas después de la inducción en comparación con las ratas con operación simulada, según se muestra en la Figura 3A. El tratamiento farmacológico no afectó significativamente esta pérdida de peso durante 24 horas.

Según se muestra en la Figura 3B, durante el periodo de 8 días del estudio las ratas exentas de fármaco continuaron perdiendo peso, con una pérdida de peso media en el día 8 de -21 ± 8 g ($n = 8$). Las ratas tratadas con el antagonista del C5a, tanto antes de la inducción de colitis (10 mg/kg/día oral y 0.3 mg/kg/día SC) como 24 h después de la inducción (1 ó 10 mg/kg/día oral), ganaron peso sustancialmente durante los 8 días, con pesos significativamente más elevados en comparación con las ratas de control de colitis ($P < 0.05$). Contrariamente, las ratas tanto pretratadas como postratadas con prednisolona (1 mg/kg/día SC) o las ratas pretratadas con una combinación del antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral) y prednisolona (1 mg/kg/día SC) perdieron peso durante los 8 días y no mostraron ninguna diferencia significativa en comparación con las ratas de control de colitis en el día 8 ($P > 0.05$). Las ratas pretratadas con infliximab (3 mg/kg IV) mostraron solamente un pequeño aumento de peso en el día 8; sin embargo, estos niveles no fueron significativamente más elevados que en las ratas de control de colitis ($P > 0.05$).

Puntuación macroscópica: Un observador independiente examinó de forma ciega cada colon macroscópicamente en busca de hemorragias y úlceras, utilizando un sistema de puntuación previamente establecido (Bobin-Dubigeon *et al.* 2001). Después de 24 horas, todos los tratamientos farmacológicos, excepto infliximab, provocaron una mejora significativa de las puntuaciones macroscópicas en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Después de 8 días, todos los tratamientos farmacológicos, excepto el postratamiento con prednisolona, provocaron una mejora significativa de las puntuaciones macroscópicas en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Los animales con operación simulada no mostraron daños macroscópicos apreciables.

Según se muestra en la Figura 4A, después de 24 horas el colon de todas las ratas tratadas con TNBS presentó grandes hemorragias, edema y un inicio de formación de úlcera. No se observaron adhesiones y la diarrea fue mínima. Las ratas exentas de fármaco presentaron una puntuación macroscópica media de 7.2 ± 0.5 ($n = 12$) a las 24 h. El pretratamiento de las ratas con cualquier fármaco en el estudio de 24 h provocó reducciones de las puntuaciones macroscópicas y se observó una mejora significativa en todos los grupos de tratamiento excepto con infliximab ($P < 0.05$). Según se muestra en la Figura 4B, después de 8 días el colon de las ratas tratadas con TNBS presentó daños considerablemente mayores que a las 24 h, lo cual indica que la patología fue progresiva. Aunque el colon presentó menos hemorragia, la formación de úlceras fue extensiva y las adhesiones y la diarrea fueron habituales. Las ratas de control de colitis presentaron una puntuación macroscópica media de 11.5 ± 0.8 ($n = 12$) en el día 8. Las ratas tratadas con el antagonista del C5a, tanto antes de la inducción de colitis (10 mg/kg/día oral y 0.3 mg/kg/día SC) como 24 h después de la inducción (1 ó 10 mg/kg/día oral), presentaron puntuaciones macroscópicas significativamente mejoradas en comparación con las ratas de control de colitis, como también lo hicieron las ratas pretratadas con prednisolona (1 mg/kg/día SC) ($P < 0.05$). Las ratas pretratadas con infliximab (3 mg/kg IV) también mostraron una reducción significativa de las puntuaciones en el día 8 ($P < 0.05$). Las ratas postratadas con prednisolona (1 mg/kg/día SC) no presentaron ninguna mejora de las puntuaciones macroscópicas en el día 8 ($P > 0.05$).

MPO en el colon: Después de 24 h, solamente las ratas tratadas tanto con el antagonista del C5a como con una combinación del antagonista del C5a y prednisolona, mostraron una mejora significativa de los niveles de MPO en el colon en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Después de 8 días, todos los tratamientos farmacológicos, excepto el postratamiento con prednisolona, provocaron una mejora significativa de los niveles de MPO en el colon en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Según se muestra en la Figura 5A, los niveles de MPO en el colon de las ratas exentas de fármaco fueron sustancialmente más elevados a las 24 horas que los de las ratas con operación simulada. Los niveles de esta enzima se redujeron en todas las ratas tratadas farmacológicamente después de 24 h y se observó una mejora significativa en las ratas tanto pretratadas con el antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral o 0.3 mg/kg/día SC) como con una combinación del antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral) y prednisolona (1 mg/kg/día SC) ($P < 0.05$).

Según se muestra en la Figura 5B, los niveles de MPO en el colon después de 8 días en las ratas a las cuales se administró TNBS se redujeron todavía más en comparación con dichos niveles a las 24 h. En las ratas tratadas con el antagonista del C5a, tanto antes de la inducción (10 mg/kg/día oral y 0.3 mg/kg/día SC) como 24 h después de la inducción (1 y 10 mg/kg/día oral), o en las ratas pretratadas con una combinación del antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral) y prednisolona (1 mg/kg/día SC), los niveles de MPO en el colon se redujeron hasta niveles similares a los de los animales con operación simulada después de 8 días ($P < 0.05$). Las ratas pretratadas tanto con prednisolona (1 mg/kg/día SC) como con infliximab (3 mg/kg IV) también mostraron una reducción significativa de los niveles de MPO después de 8 días, aunque el grado de mejora no fue tan elevado como en las ratas tratadas con el antagonista del C5a ($P < 0.05$). Las ratas postratadas con prednisolona (1 mg/kg/día SC) no presentaron ninguna mejora de los niveles de MPO en el colon ($P > 0.05$).

Edema del colon: Se determinó el edema del colon tanto a las 24 h como a los 8 días, a partir de las proporciones de peso húmedo frente a peso seco. Los resultados se muestran en la Figura 6. Tanto después de 24 h como después de 8 días, solamente las ratas tratadas tanto con el antagonista del C5a como con una combinación del antagonista del C5a y prednisolona, mostraron una mejora significativa de las proporciones de peso húmedo frente a peso seco en el colon, en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Según se muestra en la Figura 6A, las proporciones de peso húmedo frente a peso seco en el colon de las ratas a las cuales se administró TNBS aumentaron significativamente en comparación con las de las ratas con operación simulada después de 24 h, lo cual indica la presencia de edema. En este punto, solamente las ratas pretratadas con el antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral o 0.3 mg/kg/día SC) o con una combinación del antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral) y prednisolona (1 mg/kg/día SC) mostraron una reducción significativa de las proporciones de peso húmedo frente a peso seco en comparación con las ratas de control de colitis ($P < 0.05$). El antagonista del C3a no mostró ningún efecto significativo.

Según se muestra en la Figura 6B, el nivel de edema del colon después de 8 días en las ratas a las cuales se administró TNBS todavía era considerablemente más elevado que el de las ratas con operación simulada, aunque era menor que el observado a las 24 h. Se observaron reducciones significativas de las proporciones de peso húmedo frente a peso seco en las ratas tratadas con el antagonistas del C5a, tanto antes de la inducción (10 mg/kg/día oral y 0.3 mg/kg/día SC) como 24 h después de la inducción (1 y 10 mg/kg/día oral), así como en las ratas pretratadas con una combinación del antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral) y prednisolona (1 mg/kg/día SC) en esta franja temporal de 8 días ($P < 0.05$). El postratamiento con prednisolona (1 mg/kg/día SC) no mostró ningún efecto en la reducción del edema, mientras que las ratas pretratadas con prednisolona (1 mg/kg/día SC) e infliximab (3 mg/kg IV) no mostraron ninguna reducción significativa en comparación con las ratas de control de colitis ($P > 0.05$).

Niveles de TNF- α en suero y en tejido: A continuación se evaluaron los niveles de TNF- α después de 8 días tanto en el suero como en el tejido del colon. Los resultados se ilustran en la Figura 7. Los niveles de TNF- α en el suero aumentaron en los animales de control de colitis exentos de fármaco y todos los tratamientos farmacológicos redujeron significativamente estos niveles. Todos los tratamientos farmacológicos, excepto el postratamiento con prednisolona, mejoraron significativamente los niveles de TNF- α en el colon en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco. Los niveles de TNF- α en el suero y en el tejido del colon no aumentaron en las ratas tratadas con TNBS en comparación con las ratas con operación simulada después de 24 h. Según se muestra en la Figura 7A, los niveles de TNF- α en el suero después de 8 días en las ratas de control de colitis aumentaron en comparación con las ratas con operación simulada. Todas las ratas tratadas farmacológicamente presentaron niveles de TNF- α en el suero similares a los de las ratas de operación simulada y estos niveles eran significativamente reducidos en comparación con los niveles de control de colitis ($P < 0.05$). Los niveles de TNF- α en el homogeneizado del tejido del colon, mostrados en la Figura 7B, también aumentaron en las ratas exentas de fármaco en comparación con los animales de operación simulada. Todas las ratas tratadas farmacológicamente presentaron niveles de esta citocina en el tejido significativamente menores, en comparación con las ratas de control de colitis ($P < 0.05$), excepto las ratas postratadas con prednisolona (1 mg/kg/día SC), las cuales no mostraron ninguna reducción significativa ($P > 0.05$).

Histopatología: Un observador independiente examinó ciegamente las secciones teñidas del colon en busca de signos de la patología. 24 horas después de la administración de TNBS, las secciones del colon mostraron signos de inflamación grave. En los casos moderados, se observó edema de las capas de la submucosa del intestino e infiltración, predominantemente por neutrófilos, en la mucosa y submucosa. En los casos más graves, se observó necrosis de las células de la mucosa del colon y edema e infiltración celular inflamatoria más graves. No se observaron mejoras en las secciones del colon de las ratas tratadas farmacológicamente en comparación con las ratas de control de colitis exentas de fármaco en esta franja temporal grave.

8 días después del reto con TNBS, se observaron evidencias de curación, ya que se observó que la mucosa afectada fue reemplazada por tejido fibroso. Se observó infiltración de PMN en los tejidos afectados. Cuando se identificaron úlceras discretas, la mucosa limitante apareció normal, aunque se observó una inflamación de la submucosa generalizada, que consistió en células inflamatorias y edema moderado. Las secciones del colon de las ratas de control de colitis exentas de fármaco mostraron la patología más grave después de 8 días (Figura 8B). En comparación, las secciones del colon de las ratas con operación simulada mostraron signos mínimos de daños (Figura 8A). Después de 8 días, las secciones del colon de todas las ratas pretratadas tanto con el antagonista del C5a como con prednisolona, infliximab o una combinación del antagonista del C5a/prednisolona mostraron una mejora de la patología en comparación con las ratas exentas de fármaco. Las secciones del colon de las ratas postratadas con el

antagonista del C5a (10 mg/kg/día oral) también mostraron una mejora de la patología de la enfermedad después de 8 días, indicada por una menor formación de úlceras, edema, infiltración celular inflamatoria, sin perforaciones y con las capas de la mucosa intactas en comparación con las secciones de las ratas exentas de fármaco (Figura 8C). Contrariamente, las secciones del colon de las ratas postratadas con prednisolona (1 mg/kg/día SC) no mostraron ninguna mejora de la patología de la enfermedad en comparación con las ratas exentas de fármaco (Figura 8D).

En el estudio de 24 horas, las ratas tratadas con PMX53 presentaron unas puntuaciones macroscópicas del colon significativamente menores y unos pesos corporales y un consumo de comida mayores. El nivel de edema del colon, la acumulación neutrófila y los niveles de TNF- α en el colon también se redujeron significativamente. En comparación con prednisolona e infliximab, los cuales se utilizan actualmente en la terapia de la EII, las ratas tratadas con PMX53 mostraron una inhibición mayor de los parámetros evaluados. Estos resultados muestran que el bloqueo de la proteína inflamatoria C5a por parte de PMX53 mejora significativamente la patología de la enfermedad en el modelo grave de 24 horas de la EII, en un grado al menos tan elevado como el alcanzado por prednisolona e infliximab.

En el estudio de 8 días, las ratas tanto pretratadas como postratadas con PMX53 perdieron significativamente menos peso corporal y comieron significativamente más comida en comparación con los animales de control de colitis. Estas ratas también presentaron puntuaciones macroscópicas del colon, edema del colon, acumulación neutrófila y niveles de TNF- α en el colon significativamente menores. Es importante destacar que las ratas tratadas con PMX53 también mostraron una mortalidad reducida en comparación con las ratas de control de colitis. En comparación, solamente las ratas pretratadas con prednisolona mostraron alguna mejora de los parámetros de la enfermedad evaluados. Las ratas tratadas con infliximab también mostraron una reducción significativa de los parámetros de la enfermedad, sin embargo, en menor grado que la observada en las ratas tratadas con PMX53.

Histológicamente, las secciones del colon de las ratas tratadas con PMX53 mostraron una reducción de la acumulación celular inflamatoria y de la formación de hemorragia, y esto se muestra en la Figura 8. Sorprendentemente, estos resultados muestran que el bloqueo de la proteína inflamatoria C5a por parte de PMX53 tanto previene como revierte la patología de la enfermedad en un modelo con ratas de colitis crónica. Este efecto de reversión de la patología no se observó en las ratas tratadas con prednisolona.

En resumen, estos estudios demuestran por primera vez que un inhibidor del sistema del complemento tiene efectos beneficiosos en un modelo establecido de la EII. La mejora observada con PMX53 fue mayor que la observada con prednisolona o infliximab. Esto indica que PMX53 será útil en el tratamiento clínico de la EII.

Ejemplo 2 Otros estudios en modelos animales

Se utiliza una franja temporal de 8 días en otros estudios animales, ya que esto proporciona la patología más significativa y clínicamente relevante. Todos los fármacos se administran 24 horas después de la inducción de colitis (terapia de reversión) y a continuación diariamente a lo largo del periodo del estudio. El PMX53 se administra con dosis de 0.1, 0.3, 1 y 10 mg/kg en aceite mineral por vía rectal (vr). También se administra PMX53 oralmente con dosis de 0.1, 0.3, 1 y 10 mg/kg en una cápsula con recubrimiento entérico.

También se evalúan análogos de PMX53 con varias dosis, que oscilan entre 0.1-10 mg/kg, en aceite de oliva como disolvente, para determinar su eficacia en comparación con PMX53. En el primer ejemplo se evalúan los siguientes análogos:

PMX205: Hidrocinamato-[OPdChaWR]

PMX73: AcF-[OPdPheWR]

PMX201: AcF-[OPdChaWCitrulina]

Estos compuestos se administran después del tratamiento con una dosis de 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg/día en el estudio de 8 días.

Además del sistema modélico de TNBS, los felinos y particularmente los caninos sufren una variedad de enteropatías inflamatorias, las cuales tienen algunas similitudes con la EII en los humanos (Tams, 1993; German *et al.* 2003). Estas incluyen enterocolitis, colitis linfocítica plasmocítica canina, colitis prototecal y colitis ulcerosa histiocítica. También se evaluaron el PMX53 y sus análogos en estas afecciones.

Ejemplo 3 Evaluación de la eficacia clínica

La eficacia clínica en humanos de los compuestos que se ha descubierto que son eficaces en modelos animales se determina utilizando métodos estándar de ensayos clínicos.

Por ejemplo, un ensayo en fase II aleatorizado controlado por placebo en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Crohn de moderada a grave habitualmente emplea al menos dos niveles de dosis del compuesto de prueba. Una disminución mayor de 70 puntos en el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI, por sus siglas en inglés), una herramienta estandarizada diseñada para evaluar específicamente la actividad de la enfermedad, es un criterio de evaluación primaria para indicar la eficacia. La remisión de la enfermedad es un criterio de evaluación secundaria. Se establece una ventaja en el efecto del tratamiento si significativamente más receptores del compuesto de prueba en comparación con los receptores de placebo presentan puntuaciones del CDAI coherentes con la resolución de los síntomas durante una exacerbación grave de la enfermedad inflamatoria intestinal.

En la colitis ulcerosa, los efectos del tratamiento con el compuesto de prueba se evalúan en pacientes con síntomas de colitis ulcerosa activa los cuales o bien no se han tratado previamente o bien también están recibiendo un tratamiento médico estándar. Los criterios de evaluación son la inducción de remisión completa o la mejora significativa de los signos y síntomas de la colitis ulcerosa, según se reflejan en los cambios de la puntuación del índice de actividad de la colitis (CAI, por sus siglas en inglés). La puntuación del CAI evalúa la frecuencia de deposición la hemorragia rectal, el aspecto endoscópico del colon e incluye la evaluación global de un médico.

También se registran los perfiles del efecto adverso y de la tolerancia del compuesto de prueba para cada afección.

DISCUSIÓN

Los péptidos cíclicos presentan varias ventajas importantes con respecto a los péptidos acíclicos como candidatos a fármacos (Fairlie *et al.* 1995, Fairlie *et al.* 1998, Tyndall and Fairlie, 2001). Los compuestos cíclicos descritos en esta descripción son estables frente a la degradación proteolítica durante al menos varias horas a 37 °C en sangre o plasma humano, en jugos gástricos humanos o de rata o en presencia de enzimas digestivas tales como pepsina, tripsina y quimotripsina. Contrariamente, los péptidos lineales cortos compuestos por L-aminoácidos se degradan rápidamente en sus aminoácidos componentes en pocos minutos cuando se someten a estas condiciones. Una segunda ventaja se basa en las conformaciones únicas de movilidad restringida adoptadas por las moléculas cíclicas y no peptídicas, contrariamente a los péptidos lineales o acíclicos, los cuales son suficientemente flexibles como para adoptar múltiples estructuras en disolución distintas de la requerida para la unión con el receptor. En tercer lugar, los compuestos cíclicos como los descritos en esta invención son habitualmente más liposolubles y más farmacológicamente biodisponibles como fármacos que los péptidos acíclicos, los cuales raramente se pueden administrar oralmente. En cuarto lugar, las vidas medias en plasma de las moléculas cíclicas son normalmente más largas que las de los péptidos.

Los modelos de la EII habitualmente implican la administración dentro del colon de un agente antiinflamatorio o de haptización. El modelo de colitis inducida por TNBS utilizado en la presente es un modelo simple y fiable que se ha utilizado mucho para examinar la eficacia de varios candidatos a fármacos para el tratamiento de la EII.

Los inventores han descubierto que 24 h después de la administración de TNBS, el colon de las ratas mostró grandes áreas de hemorragia, edema e infiltración celular inflamatoria. Sin embargo, en este modelo grave resultó difícil para los inventores detectar algún efecto terapéutico significativo de los fármacos en comparación con las ratas con colitis exentas de fármaco. Contrariamente, 8 días después de la inducción de colitis, el colon de las ratas mostró un daño considerablemente mayor que el observado a las 24 h y resultó más fácil comprar los efectos de los distintos fármacos. El mayor daño observado a los 8 días confirma que la patología se continúa desarrollando, incluso después de que el agente iniciador se haya metabolizado. En este modelo crónico, una proporción sustancial de las ratas murió y se observaron unos niveles elevados de TNF- α en el suero y en el tejido del colon de las ratas que sobrevivieron. El experimento de 8 días también permitió incluir los tratamientos farmacológicos después de la inducción, para determinar si los fármacos se podrían utilizar para tratar y quizás revertir la enfermedad en desarrollo.

Los inventores utilizaron ambas franjas temporales, la de 24 h y la de 8 días, para comparar la eficacia de dos antagonistas recientemente desarrollados del receptor del C3a y del C5a con la del esteroide prednisolona y la del inhibidor de TNF- α infliximab. Todos los fármacos evaluados resultaron eficaces en la reducción de algunos o todos los parámetros evaluados. Sin embargo, se determinó que el antagonista del C5a fue superior a los otros fármacos.

Los corticosteroides, tales como prednisolona, son terapias que se prescriben habitualmente en el tratamiento de la EII. Son fármacos potentes que actúan a nivel genético y que provocan la regulación por disminución de varios mediadores proinflamatorios, tales como las citocinas, así como de las vías inmunológicas. Debido a sus acciones no específicas, los corticosteroides presentan numerosos efectos secundarios y deben utilizarse con precaución en los pacientes, particularmente en el tratamiento crónico. En el presente estudio, el pretratamiento con prednisolona resultó eficaz en la reducción de la mayoría de los parámetros evaluados, según era de esperar. Sin embargo, las ratas tratadas con prednisolona perdieron un peso corporal considerable. Esto se atribuyó al catabolismo, uno de los efectos secundarios principales de la terapia con esteroides. Aunque los esteroides se utilizan mucho en la terapia de la colitis, cabe destacar el hecho de que las ratas tratadas con esteroides 24 h después de la inducción de colitis no mostraron efectos terapéuticos apreciables. Debido al tiempo necesario para que los esteroides sean efectivos, pudo resultar demasiado tarde para poder observar algún efecto apreciable de la prednisolona en la patología de la enfermedad.

Como alternativa, la ausencia de efecto pudo ser provocada por la tendencia de los tratamientos con esteroides a inhibir los procesos de curación naturales asociados con la patología de la enfermedad.

Se cree que la citocina proinflamatoria TNF- α contribuye de manera importante en la patología de la EII. Los avances recientes en el desarrollo de fármacos han producido varios anticuerpos que bloquean los efectos de esta citocina (Muller, 2002). Se ha descrito que uno de estos anticuerpos, infliximab, es eficaz en la reducción de la patología de la EII y actualmente se comercializa en varios países para el tratamiento de la EII. Dichas terapias basadas en anticuerpos presentan problemas de suministro en los hospitales y son significativamente más caras que las terapias con otros fármacos (Valle *et al.* 2001).

Según los inventores, la eficacia de infliximab en un modelo animal de la EII no se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, los inventores han utilizado este compuesto como un fármaco comparativo para los antagonistas del receptor del C5a y C3a. Aunque el pretratamiento de las ratas con infliximab redujo la gravedad de las lesiones, no resultó tan eficaz como el antagonista del C5a o la prednisolona. Infliximab resultó más eficaz en las ratas tratadas durante 8 días que en las ratas del estudio de 24 h. Puesto que solo se observaron aumentos detectables de los niveles de TNF- α en el suero y en el tejido del colon en el estudio de 8 días, cabría esperar que el efecto de este compuesto en la inhibición de TNF- α fuera mínimo durante los estadios graves de esta enfermedad.

Se sospecha que la actividad anormal del complemento es importante en la patología de la EII, aunque a día de hoy existe una evidencia limitada de ello. En este estudio se examinó la eficacia del antagonista del C3a SB 290157. Se ha descrito recientemente que este compuesto es un antagonista del receptor del C3a humano y que muestra actividad en varias pruebas *in vitro* e *in vivo* (Mollnes *et al.* 2002, Ames *et al.* 2001). Los inventores han descubierto que este antagonista es eficaz en la reducción de algunos de los parámetros evaluados en el estudio de 24 h. Cabe destacar que redujo la intensidad del daño macroscópico en comparación con las ratas de control de colitis. El régimen de dosis seleccionado en el estudio de los inventores (30 mg/kg ip dos veces al día) fue el mismo que el utilizado en estudios previos *in vivo* y parece ser que esta dosis elevada es necesaria para obtener efectos terapéuticos con este compuesto (Ames *et al.* 2001). Debido a la necesidad de inyectar a los animales por vía intraperitoneal dos veces al día, el fármaco no se evaluó en el modelo de 8 días. A pesar de los efectos inhibitorios observados con SB 290157 después de 24 h, se deberán llevar a cabo estudios adicionales durante un periodo de tiempo más largo para identificar el papel exacto del C3a en la colitis inducida por TNBS.

El péptido cíclico antagonista del C5a PMX53 (AcF-[OPdChaWR]) resultó ser el agente más eficaz utilizado en este estudio. Los inventores han descubierto que el pretratamiento de las ratas con el antagonista del C5a tanto por vía oral como SC redujo considerablemente todos los indicadores de la enfermedad evaluados. Las ratas tratadas por vía oral 24 h después de establecer la colitis también mostraron una reducción significativa de todos los indicadores de la enfermedad. Se ha mostrado que este antagonista del C5a es específico para el receptor del C5a en humanos, ratas y perros (Woodruff *et al.* 2001) y que es específico para el receptor del C5a frente a otros receptores humanos relacionados (Finch *et al.* 1999). En particular, PMX53 no se une al receptor del C3a (Finch *et al.* 1999) y no tiene ningún efecto en la formación del complejo de ataque de membrana (Arumugam *et al.* 2003). La mayor eficacia observada con el antagonista del C5a frente al antagonista del C3a, al menos en el estudio de 24 h, es coherente con la potencia más elevada y la mayor actividad proinflamatoria del C5a en comparación con el C3a *in vivo*.

La mayor eficacia del antagonista del C5a en comparación con infliximab se puede explicar por el papel central del C5a en la cascada inflamatoria. Existe constancia de que el C5a induce la liberación no solo del TNF- α , sino también de un huésped de otras citocinas inflamatorias y varios mediadores, los cuales supuestamente también están involucrados en la EII (Haynes *et al.* 2002, Mollnes *et al.* 2002). También existe constancia de que este antagonista del C5a previene la formación de varios de estos mediadores (Finch *et al.* 1999, Haynes *et al.* 2002), lo cual probablemente explica su mayor eficacia en comparación con infliximab, el cual solamente inhibe el TNF- α . Los inventores acaban de mostrar que un antagonista de los receptores del C5a humano también es un tratamiento eficaz y potente para la EII en un modelo con ratas.

Cuando las ratas se pretrataron con una combinación del antagonista del C5a y prednisolona, no se observó ninguna reducción más importante de los indicadores de la enfermedad en comparación con el antagonista del C5a solo. Esto sugiere una regulación por disminución habitual de los mediadores inflamatorios.

En resumen, este estudio demuestra que los componentes del complemento C3a y C5a, y especialmente el C5a, tienen un papel significativo en la patogénesis de la colitis inducida por TNBS en ratas. Por consiguiente, el complemento puede tener un papel fundamental en el desarrollo de la EII en humanos. Esto debería fomentar el desarrollo de terapias basadas en el anticomplemento. Los potentes efectos terapéuticos del antagonista del C5a humano oralmente activo AcF-[OPdChaWR] y su mayor eficacia en comparación con prednisolona e infliximab, apoyan el hecho de considerar el uso de los antagonistas del C5a en el tratamiento de la EII en humanos.

Las referencias citadas en la presente se enumeran en las páginas siguientes.

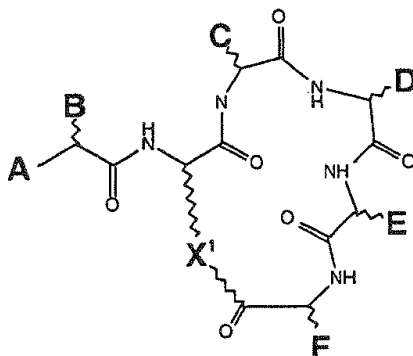
REFERENCIAS

- Ames RS, Lee D, Foley JJ, Jurewicz AJ, Tornetta MA, Bautsch W, Settmacher B, Klos A, Erhard KF, Cousins RD, Sulpizio AC, Hieble JP, McCafferty G, Ward KW, Adams JL, Bondinell WE, Underwood DC, Osborn RR, Badger AM, Sarau HM.
- 5 *J. Immunol.* 2001, 166(10):6341-8.
- Fairlie, D.P., Wong, A.K.; West, M.W.
- Curr. Med. Chem.* 1998, 5, 29-62.
- Fairlie, D.P., Abbenante, G. y March, D.
- Curr. Med. Chem.* 1995, 2, 672-705.
- 10 Gerard, C. y Gerard, N.P.
- Ann. Rev. Immunol.* 1994, 12, 775-808.
- German, A.J., Hall, E.J. y Day, M.J.
- J. Vet. Intern. Med.* 2003 enero-febrero; 17(1):8-20.
- 15 Konteatis, Z.D., Siciliano, S.J., Van Riper, G., Molineaux, C.J., Pandya, S., Fischer, P., Rosen, H., Mumford, R.A. y Springer, M.S.
- J. Immunol.* 1994, 153, 4200-4204.
- Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, Videm V, Lappegard KT, Kohl J, Lambris JD.
- Blood.* 2002 septiembre 1;100(5):1869-77.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL.
- 20 *Gastroenterol.* 1989;96:795-803.
- Nielsen OH, Rask-Madsen J.
- Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 1996;31:149-159.
- Sanderson, S.D., Kirnarsky, L., Sherman, S.A. Vogen, S.M., Prakesh, O., Ember, J.A., Finch, A.M. y Taylor, S.M.
- J. Med. Chem.* 1995, 38, 3669-3675.
- 25 Tams, T.R.
- Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1993, 23:569-86.
- Tyndall, J.D.A.; Fairlie, D.P.
- Curr. Med. Chem.* 2001, 8, 893-907.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un inhibidor de un receptor acoplado a proteína G en la producción de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, en el cual el inhibidor es un compuesto tal que:

- (a) es un antagonista de un receptor acoplado a proteína G,
- (b) no tiene actividad agonista y
- (c) es un compuesto peptídico o peptidomimético cíclico de fórmula I



donde A es H, alquilo, arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, NH-arilo, NH-acilo, NH-benzoílo, NHSO₃, NHSO₂-alquilo, NHSO₂-arilo, OH, O-alquilo u O-arilo;

B es un grupo alquilo, arilo, fenilo, bencilo, naftilo o indol, o la cadena lateral de un aminoácido D o L, pero no es la cadena lateral de glicina, D-fenilalanina, L-homofenilalanina, L-triptófano, L-homotriptófano, L-tirosina o L-homotirosina;

C es la cadena lateral de un aminoácido D o L o de un homoaminoácido, pero no es la cadena lateral de isoleucina, fenilalanina o ciclohexilalanina;

D es la cadena lateral de un aminoácido D neutro, pero no es la cadena lateral de glicina o D-alanina, una cadena lateral plana voluminosa o una cadena lateral cargada voluminosa;

E es la cadena lateral de un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, L-triptófano y L-homotriptófano, o es L-1-naftilalanina o L-3-benzotienilalanina;

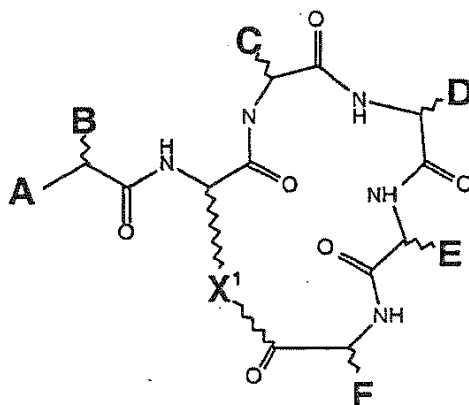
F es la cadena lateral de L-arginina, L-homoarginina, L-citrulina o L-canavanina, o un bioisómero de estos; y

X¹ es -(CH₂)_nNH- o (CH₂)_nS-, donde n es un número entero de 1 a 4; -(CH₂)₂O-; -(CH₂)₃O-; -(CH₂)₃-;

-(CH₂)₄-; -CH₂COCHRNH-; o -CH₂-CHCOCHRNH-, donde R es la cadena lateral de cualquier aminoácido común o no común.

2. Un inhibidor de un receptor acoplado a proteína G para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, en el cual el inhibidor es un compuesto tal que:

- (a) es un antagonista de un receptor acoplado a proteína G,
- (b) no tiene actividad agonista y
- (c) es un compuesto peptídico o peptidomimético cíclico de fórmula I



donde A es H, alquilo, arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, NH-arilo, NH-acilo, NH-benzoílo, NHSO₃, NHSO₂-alquilo, NHSO₂-arilo, OH, O-alquilo u O-arilo;

5

B es un grupo alquilo, arilo, fenilo, bencilo, naftilo o indol, o la cadena lateral de un aminoácido D o L, pero no es la cadena lateral de glicina, D-fenilalanina, L-homofenilalanina, L-triptófano, L-homotriptófano, L-tirosina o L-homotirosina;

C es la cadena lateral de un aminoácido D o L o de un homoaminoácido, pero no es la cadena lateral de isoleucina, fenilalanina o ciclohexilalanina;

10

D es la cadena lateral de un aminoácido D neutro, pero no es la cadena lateral de glicina o D-alanina, una cadena lateral plana voluminosa o una cadena lateral cargada voluminosa;

E es la cadena lateral de un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, L-triptófano y L-homotriptófano, o es L-1-naftilalanina o L-3-benzotienilalanina;

F es la cadena lateral de L-arginina, L-homoarginina, L-citrulina o L-canavanina, o un bioisómero de estos; y

15

X¹ es -(CH₂)_nNH- o (CH₂)_nS-, donde n es un número entero de 1 a 4; -(CH₂)₂O-; -(CH₂)₃O-; -(CH₂)₃-;

-(CH₂)₄-; -CH₂COCHRNH-; o -CH₂-CHCOCHRNH-, donde R es la cadena lateral de cualquier aminoácido común o no común.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el inhibidor de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual n es 2 ó 3.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 3 o el inhibidor de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en el cual A es un grupo acetamida, un grupo aminometilo o un grupo sulfonamida sustituido o no sustituido.

20

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o el inhibidor de acuerdo con la reivindicación 3, en el cual A es una sulfonamida sustituida y el sustituyente es una cadena alquilo de 1 a 6 átomos de carbono o un grupo fenilo o toluilo.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5 o el inhibidor de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual el sustituyente es una cadena alquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

25

7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el cual B es la cadena lateral de L-fenilalanina o L-fenilglicina.

8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 7 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el cual C es la cadena lateral de glicina, alanina, leucina, valina, prolina, hidroxiprolina o tioprolina.

30

9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 8 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el cual D es la cadena lateral de D-leucina, D-homoleucina, D-ciclohexilalanina, D-homociclohexilalanina, D-valina, D-norleucina, D-homonorleucina, D-fenilalanina, D-tetrahidroisoquinolina, D-glutamina, D-glutamato o D-tirosina.

35

10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 9 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el cual el inhibidor es un compuesto que tiene actividad antagonista contra el C5aR y no tiene actividad agonista del C5a.

11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 10 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el cual el inhibidor tiene una actividad antagonista potente a concentraciones submicromolares.
- 5 12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 11 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el cual el compuesto tiene una afinidad por el receptor de $CI_{50} < 25 \mu M$ y una potencia antagonista de $CI_{50} < 1 \mu M$.
- 10 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 12 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el cual el compuesto se selecciona del grupo que consiste en los compuestos **1 a 6, 10 a 15, 17, 19, 20, 22, 25, 26, 28, 30, 31, 33 a 37, 39 a 45, 47 a 50, 52 a 58 y 60 a 70** descritos en el documento WO 03/033528.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 o el inhibidor de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual el compuesto es PMX53 (compuesto **1**), compuesto **33**, compuesto **60** o compuesto **45** descritos en el documento WO 03/033528.
- 15 15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 14 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, en el cual el inhibidor se utiliza conjuntamente con uno o más agentes diferentes para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15 o el inhibidor de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el otro agente es infliximab o es un inhibidor del C3a.
- 20 17. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 16 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16, en el cual el tratamiento es para prevenir o aliviar las reapariciones graves de la enfermedad inflamatoria intestinal.
18. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 16 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16, en el cual el tratamiento es para prevenir o aliviar una aparición primaria de la enfermedad inflamatoria intestinal.
- 25 19. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 18 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, en el cual la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enteritis linfocítica plasmocítica, enfermedad celíaca, colitis colágena, colitis linfocítica y enterocolitis eosinofílica, colitis indeterminada, colitis infecciosa, colitis pseudomembranosa (colitis necrotizante) y enfermedad inflamatoria intestinal isquémica.
- 30 20. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 18 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, en el cual la enfermedad inflamatoria intestinal es la colitis ulcerosa.
21. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 18 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, en el cual la enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn.
- 35 22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 18 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, en el cual la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona del grupo que consiste en enterocolitis, colitis linfocítica plasmocítica canina, colitis prototecal y colitis ulcerosa histiocítica.
23. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 20 o el inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 20, en el cual el inhibidor se administra en una cápsula con recubrimiento entérico o por vía rectal.

Figura 1

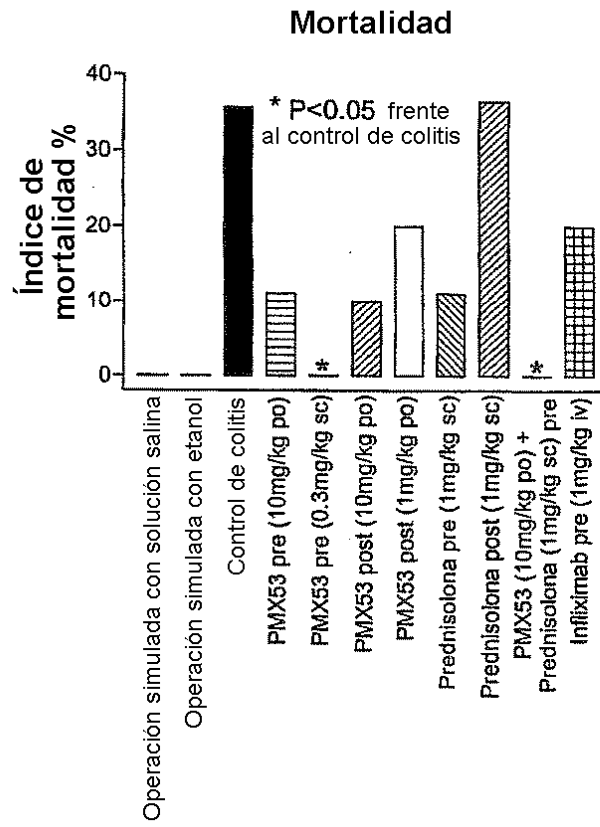


Figura 2

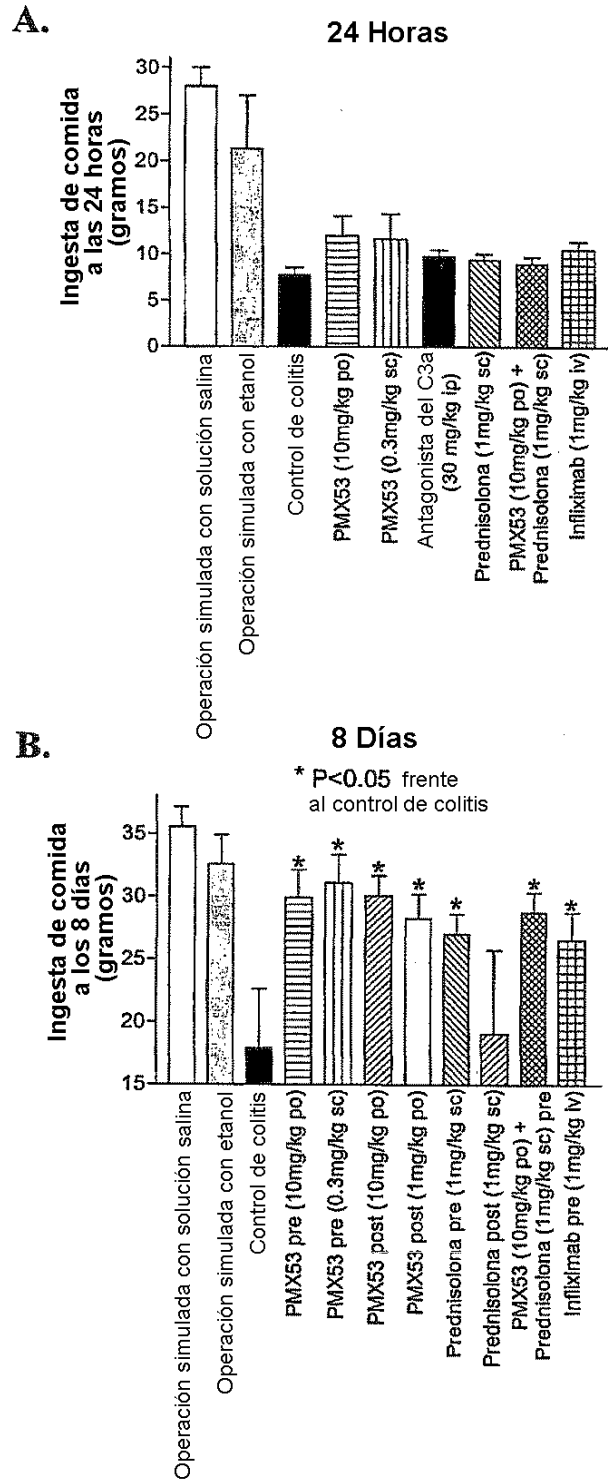


FIGURA 3

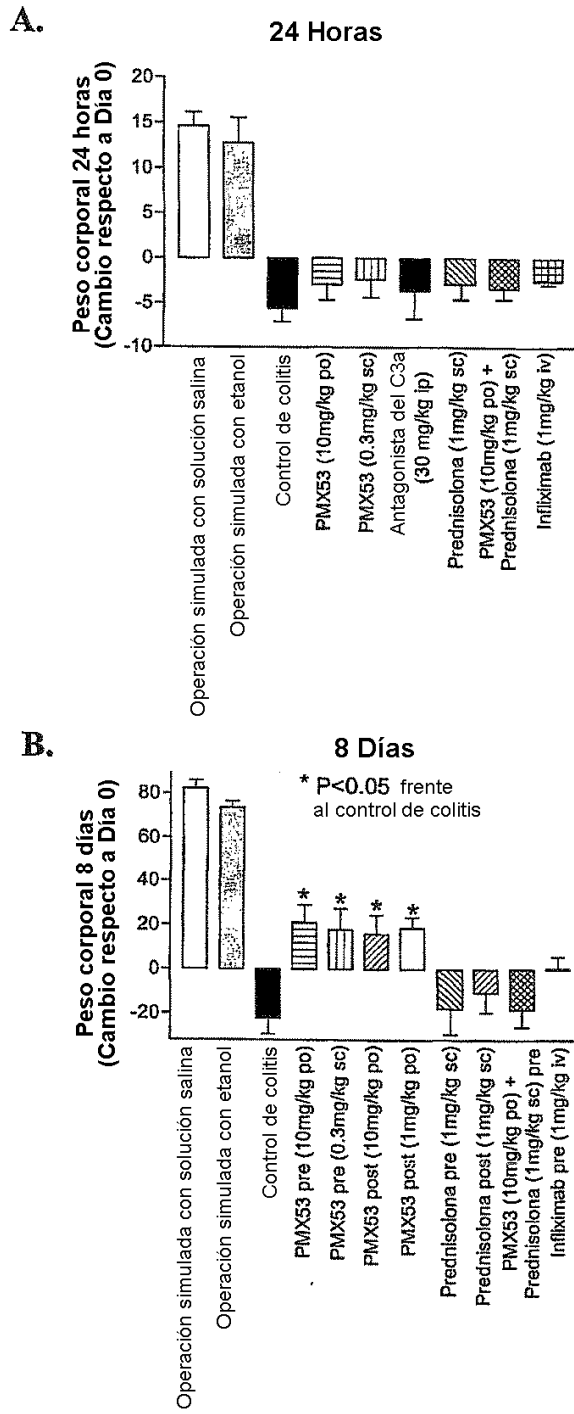


FIGURA 4

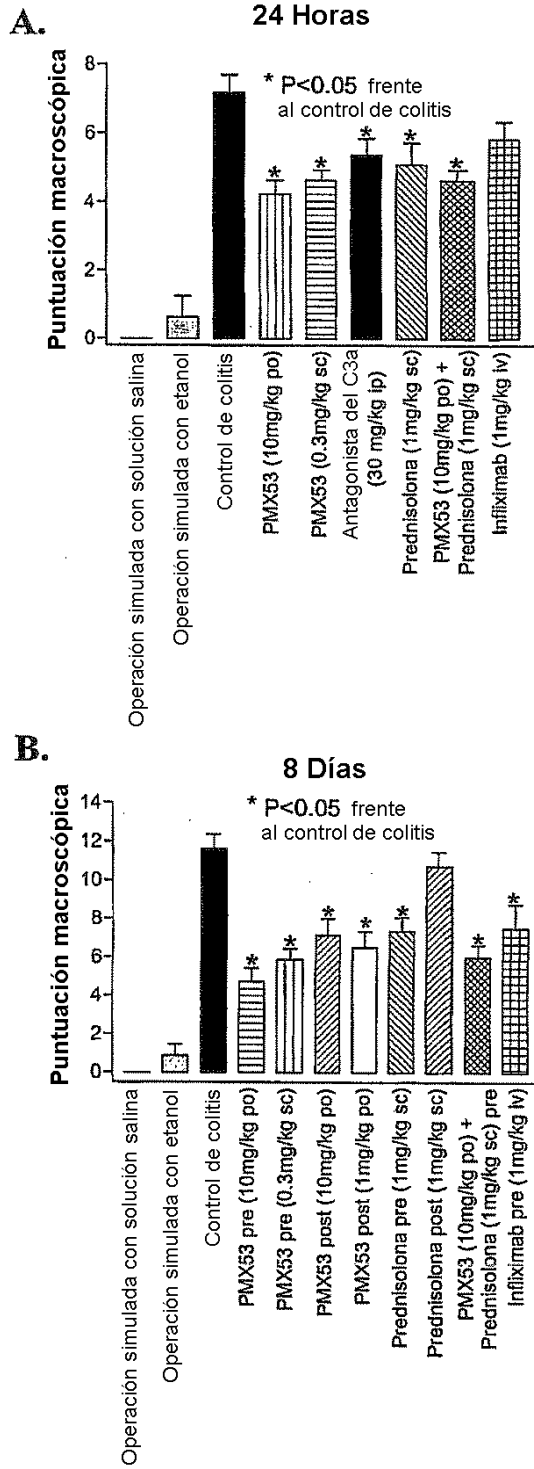


FIGURA 5

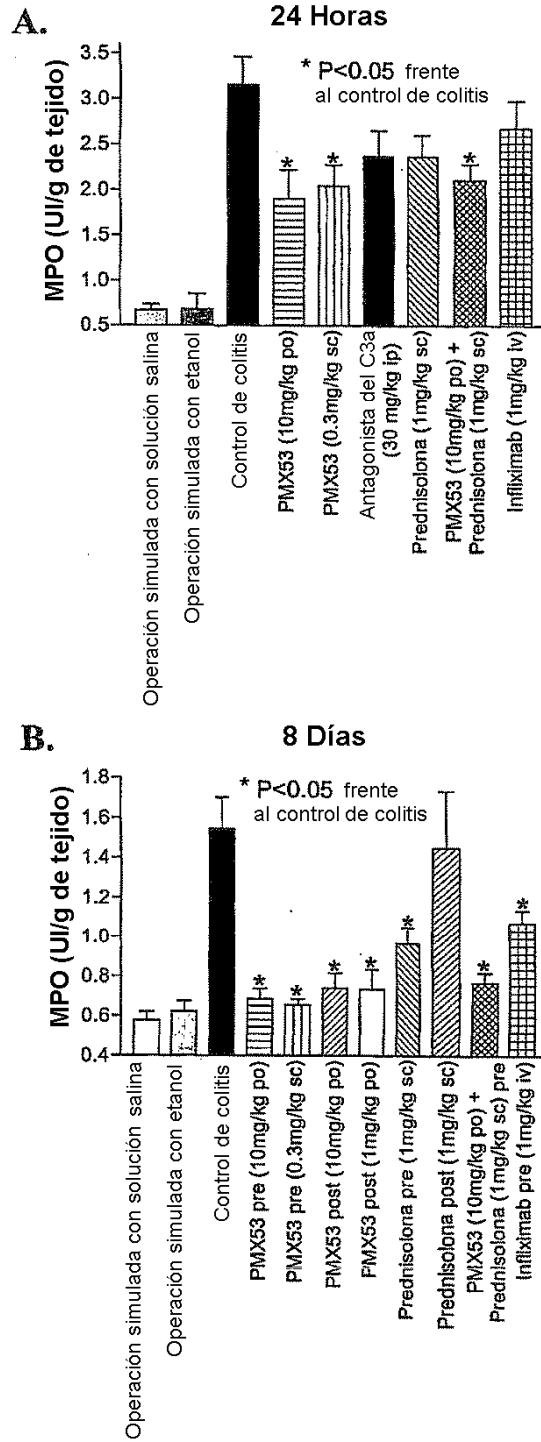


FIGURA 6

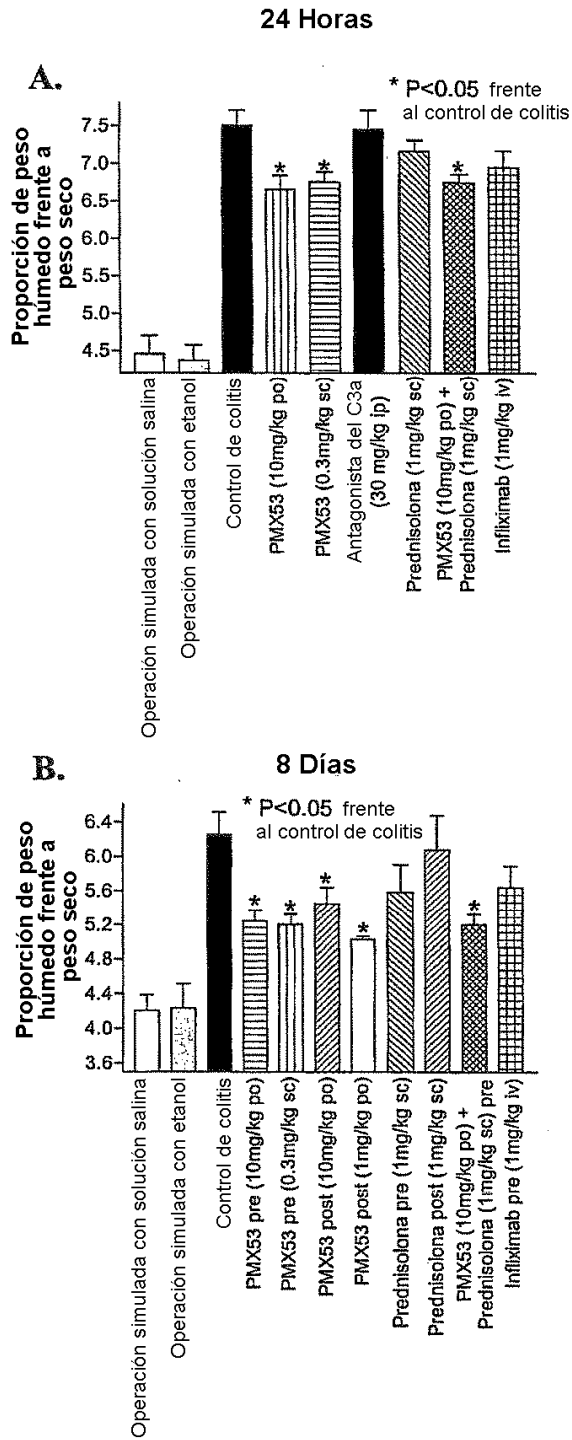


FIGURA 7

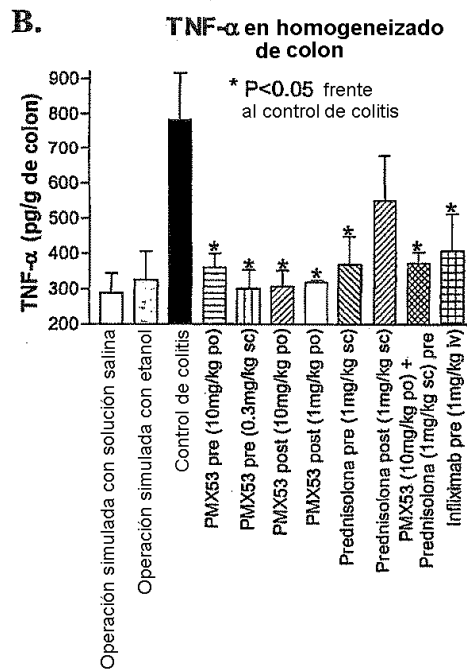
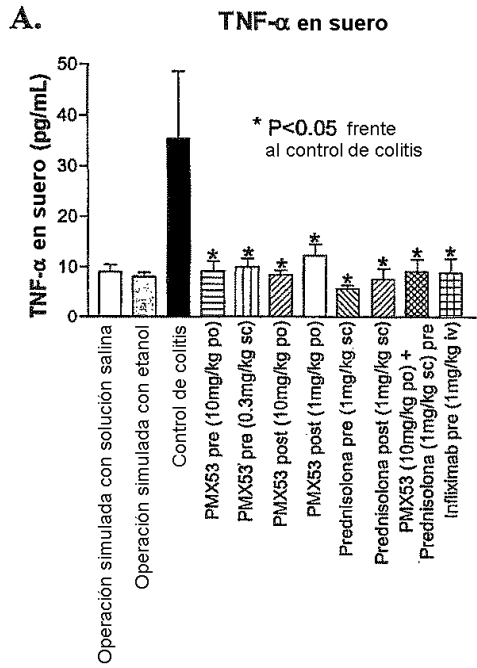


FIGURA 8

