

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 183**

51 Int. Cl.:

A61K 31/40 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2005 E 11157590 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2351564**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento de una enfermedad de tipo inflamatorio**

30 Prioridad:

12.01.2004 US 754547

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.02.2016

73 Titular/es:

**NATROGEN THERAPEUTICS INTERNATIONAL,
INC. (100.0%)
213 Vosburgh, NYMC
Valhalla, NY 10595, US**

72 Inventor/es:

**WANG, LONGGUI;
LIU, XIAOMEI;
MO, LIAN;
MENCHER, SIMON, K. y
MCCARRON, JAMES, P., JR.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 559 183 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de tratamiento de una enfermedad de tipo inflamatorio

Campo de la técnica

5 La invención se refiere a usos y composiciones farmacéuticas y a procedimientos de tratar enfermedades de tipo inflamatorio asociadas con la expresión de citocinas proinflamatorias y/o la expresión reducida de citocinas antiinflamatorias, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

10 La inflamación irregular y/o anormal es un componente principal de una amplia gama de enfermedades humanas. Las personas que sufren múltiples trastornos degenerativos a menudo exhiben niveles excesivos de marcadores proinflamatorios en su sangre. Un tipo de estos marcadores proinflamatorios son las citocinas marcadoras proinflamatorias, incluyendo IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, oncostatina e IFN γ , β , γ .

15 Una lista no limitante de problemas médicos comunes causados directamente por las citocinas inflamatorias incluyen: artritis en la que las citocinas inflamatorias destruyen conduce a lesión en la membrana sinovial y destrucción del cartílago articular y del hueso; insuficiencia renal, en la que las citocinas inflamatorias restringen la circulación y dañan las nefronas; lupus, en el que las citocinas inflamatorias inducen un ataque autoinmune; asma, en el que las citocinas inflamatorias cierran las vías respiratorias; psoriasis, en la que las citocinas inflamatorias inducen dermatitis, pancreatitis, en la que las citocinas inflamatorias inducen lesiones celulares pancreáticas; alergia, en la que las citocinas inflamatorias inducen reacciones autoinmunes; fibrosis, en la que las citocinas inflamatorias atacan el tejido traumatizado; complicaciones quirúrgicas, en las que las citocinas inflamatorias impiden la cicatrización; anemia, en la que las citocinas inflamatorias atacan la producción de eritropoyetina; y fibromialgia en la que las citocinas inflamatorias están elevadas en los pacientes de fibromialgia. Otras enfermedades asociadas con la inflamación crónica incluyen cáncer, que está causado por inflamación crónica; ataque cardíaco en el que la inflamación crónica contribuye a aterosclerosis coronaria; enfermedad de Alzheimer, en la que la inflamación crónica destruye las células cerebrales; insuficiencia congestiva cardíaca, en la que la inflamación crónica produce consunción del músculo cardíaco; ictus, en el que la inflamación crónica estimula acontecimientos tromboembólicos; y estenosis de la válvula aórtica, en la que la inflamación crónica daña las válvulas cardíacas. La arteriosclerosis, la osteoporosis, la enfermedad de Parkinson, las infecciones, la enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, así como la esclerosis múltiple (una enfermedad autoinmune de tipo inflamatorio) también están relacionadas con la inflamación (1-18). Algunas enfermedades en estadios avanzados pueden ser potencialmente mortales. Se dispone de varias metodologías para el tratamiento de dichas enfermedades inflamatorias; no obstante, los resultados generalmente son insatisfactorios, como pone de manifiesto la falta de eficacia y los efectos secundarios relacionados con el fármaco asociados con las mismas.

Enfermedad intestinal inflamatoria

35 La enfermedad intestinal inflamatoria (EII) comprende la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), ambas enfermedades crónicas idiopáticas que se producen con una frecuencia creciente en muchas partes del mundo. En EE.UU., afecta a más de 600.000 anualmente. La EII puede afectar tanto al intestino delgado como al grueso. La EC puede afectar a cualquier porción del tracto intestinal, pero con mayor frecuencia afecta al intestino delgado distal y al colon. No afecta al recto o causa inflamación o infección con drenaje alrededor del recto. La CU suele producir úlceras en la parte inferior del intestino grueso, a menudo a partir del recto. Los síntomas pueden variar, pero pueden incluir diarrea, fiebre y dolor. Los pacientes con CU prolongada tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon. Actualmente no existe un tratamiento satisfactorio, ya que la causa de la EII sigue sin estar clara, aunque se han propuesto mecanismos infecciosos o inmunológicos. Los tratamientos de la EII están dirigidos a controlar los síntomas inflamatorios, usando de forma convencional corticosteroides, aminosalicilatos y agentes inmunosupresores convencionales, tales como azatioprina (captipurina de 6 unidades), metotrexato y ciclosporina. De estos, las únicas terapias modificadoras de la enfermedad son los agentes inmunosupresores azatioprina y metotrexato, ambos con un inicio de la acción lento y con una eficacia únicamente moderada. La terapia a largo plazo puede producir daños hepáticos (fibrosis o cirrosis) y supresión de la médula ósea. Asimismo, los pacientes a menudo se convierten en resistentes a este tratamiento. Otras pautas terapéuticas simplemente abordan los síntomas (19, 20).

Psoriasis

55 La psoriasis es una de las enfermedades cutáneas crónicas en las que interviene el sistema inmunológico más frecuentes que se presenta en formas diferentes y varios niveles de gravedad, que afecta aproximadamente al 2% o más de 4,5 millones de personas de EE.UU., de los cuales 1,5 millones se considera que tienen una forma moderada o grave de la enfermedad. Del diez al treinta por ciento de los pacientes con psoriasis también desarrolla una forma de artritis, la artritis psoriásica, que daña al hueso y al tejido conjuntivo alrededor de las articulaciones. La psoriasis aparece en forma de parches de piel roja elevada cubierta por una acumulación como copos blancos. También puede tener un aspecto de grano (psoriasis pustular) o de quemadura (eritrodérmica). La psoriasis puede

también producir un picor y ardor intensos. Los pacientes sufren psicológicamente además de físicamente. Actualmente se dispone de varias modalidades para el tratamiento de la psoriasis, incluyendo el tratamiento tópico, la fototerapia y las aplicaciones sistémicas. No obstante, generalmente se consideran solamente supresoras de la enfermedad y modificadoras de la enfermedad. Y ninguna de ellas es curativa. Además, muchos tratamientos son cosméticamente indeseables, incómodos para su uso a largo plazo o se asocian con una toxicidad significativa.

Con un mayor conocimiento de las propiedades biológicas de la psoriasis durante las últimas 2 décadas, se ha dispuesto de terapias biológicas dirigidas a la actividad de los linfocitos T y de las citocinas responsables de la naturaleza inflamatoria de esta enfermedad. En la actualidad, entre los fármacos prescritos para la psoriasis se incluyen los inhibidores del TNF- α usados inicialmente para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), ENBREL® (etanercept), REMICADE® (infiximab) y HUMIRA® (adalimumab) y el inhibidor de linfocitos T AMEVIVE® (alefacept) de Biogen aprobado en 2002 y RAPTIVA® (Efalizumab) de Genentech/Xoma aprobado en 2003 (21). AMEVIVE ALEFACEPT® es una proteína de fusión de inmunoglobulina compuesta por el primer dominio extracelular del LFA-3 humano fusionado con los dominios bisagra C(H)2 y C(H)3 de la IgG(1) humana. Inhibe la proliferación de los linfocitos T a través de las células NK (22), RAPTIVA® también se conoce como anti-CD11a, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido a la molécula de adhesión de los linfocitos T, el antígeno 1 asociado con la función de los leucocitos (LFA-1). La prevención de la unión de LFA-1 a su ligando (ICAM-1, molécula 1 de adhesión intercelular) inhibe la activación y la migración de los linfocitos, lo que tiene como resultado una disminución de la infiltración linfocitaria, de modo que se limita la cascada de acontecimientos que en última instancia conducen a los signos y los síntomas de la psoriasis (23). No obstante, los potenciales efectos secundarios del inhibidor del TNF- α son graves, incluido el desarrollo de linfoma (24), empeoramiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, lo que tiene como resultado una infección grave y sepsis, y exacerbaciones de la esclerosis múltiple y problemas del sistema nervioso central (25, 26). Mientras que los efectos secundarios del inhibidor de linfocitos T de AMEVIVE®/RAPTIVA® pueden ser más tolerables en el tratamiento de la psoriasis, RAPTIVA® es un agente inmunosupresor. Los agentes inmunosupresores tienen el potencial de incrementar el riesgo de infección, reactivar infecciones crónicas latentes o incrementar el riesgo de desarrollar cáncer.

Aunque se han realizado muchos avances en el conocimiento de las propiedades biológicas de la psoriasis durante las últimas 2 décadas y se ha dispuesto de un tratamiento no convencional para la psoriasis como se ha descrito anteriormente, gran parte del sufrimiento que produce todavía no se ha abordado adecuadamente. Una encuesta con más de 40.000 pacientes americanos con psoriasis realizada por la National Psoriasis Foundation in 1998 mostró que un 79% de los pacientes más jóvenes se sentían frustrados por la ineficacia de su tratamiento. De aquéllos con enfermedad grave, el 32% sentía que su tratamiento no era lo bastante agresivo (27, 28).

Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) representa otro ejemplo de molesto trastorno inflamatorio. Es una frecuente enfermedad crónica de tipo inflamatorio caracterizada por inflamación crónica del revestimiento de la membrana (sinovio) de las articulaciones y/u otros órganos internos. Las células inflamatorias también pueden invadir y dañar los huesos y los cartílagos. La articulación implicada puede perder su forma y alineación, lo que tiene como resultado pérdida de movimiento. Los pacientes con AR tienen dolor, rigidez, calor, enrojecimiento e inflamación de las articulaciones y otros síntomas sistémicos, fiebre, fatiga y anemia. Aproximadamente el 1% de la población o 2,1 millones en EE.UU. actualmente están afectados, de los cuales hay más mujeres (1,5 millones) que varones (0,6 millones). La patología de la AR no se entiende del todo, aunque la cascada de reacciones inmunológicas inadecuadas se ha postulado como mecanismo. El tratamiento convencional es, por desgracia, ineficiente en la AR (29). La enfermedad no responde completamente a los medicamentos sintomáticos, incluyendo corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) usados desde la década de 1950. Asimismo, estos medicamentos pueden comportar un riesgo de efectos adversos graves. Los efectos terapéuticos de los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), tal como metotrexato (MTX), a menudo son inconsistentes y de corta duración.

Recientemente se ha desarrollado una nueva clase de FARME biológicos (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad) para el tratamiento de la AR en base al conocimiento del papel de las citocinas, TNF- α e IL-1, en el proceso inflamatorio. El FDA ha aprobado varios de estos FARME, incluyendo ENBREL® (etanercept) de Immunex/Amgen Inc. en 1998, REMICADE® (infiximab) de Centocor /Johnson & Johnson, HUMIRA® (adalimumab) de Abbott Laboratories Inc. en 2002, y KINERET® (anakinra) de Amgen in 2001. ENBREL® es una proteína recombinante receptora del TNF (TNFR). REMICADE® es un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado (quimérico) anti-TNF- α . HUMIRA® es un anticuerpo monoclonal completamente humano anti-TNF creado usando la tecnología de expresión en fagos que tiene como resultado un anticuerpo con regiones variables de las cadenas pesada y ligera derivadas del ser humano y las regiones constantes IgG1:k humana. Todos estos 3 fármacos basados en proteínas están dirigidos y se unen al TNF- α para bloquear los efectos de TNF- α . KINERET® es un antagonista recombinante del receptor de IL-1, que es similar al IL-1Ra humano nativo, a excepción de la adición de un solo residuo de metionina en su extremo amino. KINERET® bloquea la actividad biológica de la IL-1 inhibiendo de forma competitiva la unión de la IL-1 al receptor de tipo I de la IL-1 (IL-1R1) y, en consecuencia, reduciendo los efectos proinflamatorios de la IL-1.

El tratamiento con estos FARME biológicos alivia los síntomas, inhibe la progresión del daño estructural y mejora la función física en pacientes con AR activa moderada o grave. Los 3 agentes bloqueantes del TNF- α comercializados

tienen una eficacia similar cuando se combinan con MTX, un FARME de uso amplio, en el tratamiento de pacientes con AR (30). Aunque proporcionan una eficacia significativa y un buen perfil de seguridad global a corto y a medio plazo en muchos pacientes con AR, estos tratamientos biológicos pueden crear graves problemas y efectos secundarios a largo plazo, tal como en el hígado, y todavía se tienen que evaluar. Ha habido una asociación molesta entre el uso de ENBREL® o EMICADE® y el desarrollo de linfoma (24). Como se ha descrito anteriormente, en varios informes se ha demostrado que en los pacientes tratados con ENBREL® o REMICADE® empeora su insuficiencia cardíaca congestiva y se desarrollan infecciones graves y sepsis, y se incrementan las exacerbaciones de la esclerosis múltiple y de otros problemas del sistema nervioso central (26, 27).

Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmunitaria diagnosticada en 350.000 a 500.000 personas en EE.UU. La presencia de múltiples áreas de inflamación y cicatrización de la mielina en el cerebro y la médula espinal significan la enfermedad. Los pacientes con EM exhiben varios grados de deterioro neurológico en función de la localización y extensión de la cicatrización de la mielina. Los síntomas comunes de la EM incluyen fatiga, debilidad, espasticidad, problemas de equilibrio, problemas de la vejiga urinaria e intestinales, entumecimiento, pérdida de visión, temblores y depresión. El tratamiento actual de la EM solo alivia los síntomas o retrasa la progresión de la discapacidad, y varios tratamientos nuevos de la EM, incluyendo el trasplante de células madre y la terapia génica son conservadores (31, 32). Aunque se ha demostrado que los anticuerpos anti-TNF tienen efectos protectores en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), agravan la enfermedad en pacientes con EM, lo que sugiere que la inhibición del TNF- α solo no es suficiente (33).

Trastornos neurodegenerativos

La enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (PK) son los 2 trastornos neurodegenerativos más frecuentes. La EA es un trastorno cerebral. Afecta gravemente a la capacidad de una persona para llevar a cabo las actividades cotidianas. Afecta a las partes del cerebro que controlan el pensamiento, la memoria y el lenguaje. Se ha estimado que aproximadamente 4 millones de americanos, normalmente mayores de 60 años, sufren EA.

La PK es un trastorno progresivo del sistema nervioso central que afecta a más de 1,5 millones de personas en EE.UU. Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por una disminución de los movimientos espontáneos, dificultad para andar, inestabilidad postural, rigidez y temblores. La PK se debe a la degeneración de las neuronas pigmentadas en la sustancia negra del cerebro, lo que tiene como resultado una disminución de la disponibilidad de dopamina. Las causas de estos trastornos neurodegenerativos son desconocidas y actualmente no existe una cura para la enfermedad.

Por tanto, se necesitan nuevos abordajes para el tratamiento de las enfermedades de tipo inflamatorio anteriores y otras. Aunque los mecanismos por los cuales se producen las enfermedades de tipo inflamatorio todavía no están claros y a menudo varían entre sí, se ha demostrado que la disfunción del sistema inmunológico causada por la alteración de la regulación de las citocinas desempeña un importante papel en el inicio y progresión de la inflamación (Tabla 1) (27, 34, 35).

Generalmente, las citocinas se pueden clasificar en 3 tipos: proinflamatorias (IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, oncostatina e IFN γ 1 α , β , γ); antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-11, W-13 y TGF β); y quimiocinas (IL-8, Gro α , MIP-1, MCP-1, ENA-78, y RANTES)..

En muchas afecciones inflamatorias, las citocinas proinflamatorias, especialmente TNF- α , IL-1 β , e IL-6, así como la citocina antiinflamatoria IL-10, parecen desempeñar un papel importante en la patogenia de varias enfermedades de tipo inflamatorio y, por tanto, pueden servir como potenciales objetivos terapéuticos. Por ejemplo, los niveles elevados de algunas citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN γ , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-12) y quimiocinas (IL-8, MCP-1 y RANTES) se han observado en varias enfermedades de tipo inflamatorio, tales como EC, psoriasis, AR, enfermedad de Grave y tiroiditis de Hashimoto (34), en paralelo con un incremento de los receptores solubles de TNF, antagonistas de los receptores de IL-1 y la citocina antiinflamatoria IL-10 (36, 37). Se ha demostrado que la IL-10 suprime la producción de niveles elevados de citocinas proinflamatorias, tanto *in vitro* en cultivos de LPMC como en pacientes *in vivo* (38). La respuesta positiva de los pacientes de EC tratados con IL-10 demuestra que también podría haber un desequilibrio entre la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en la EC.

En resumen, el abordaje del tratamiento de enfermedades de tipo inflamatorio ha sufrido un cambio evolutivo en los últimos años, en parte como consecuencia de problemas crecientes de la gravedad de estas enfermedades y en parte debido al considerable progreso en el conocimiento del importante papel de las citocinas en su inmunopatogenia. La mayoría de los esfuerzos se han centrado en apuntar al TNF- α e IL-1 (39), y varios productos (inhibidores de TNF- α infliximab, un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α ; y etanercept, el receptor de p75 TNF- α) actualmente se han comercializado o están en ensayos clínicos para el tratamiento de la AR, la psoriasis y la EII como se ha mencionado anteriormente. Otros diversos fármacos candidatos o estrategias dirigidas a IEL-1 (40), IL-6 o IL-10 se están desarrollando (40-42). Estos tratamientos biológicos proporcionan una eficacia significativa a corto y medio plazo en muchos pacientes con AR (43-46). Aunque estos fármacos son bien tolerados y tienen un perfil de seguridad global bueno, se necesita una farmacovigilancia activa. En base a este mecanismo de acción y las

notificaciones previas de una amplia variedad de efectos adversos, los riesgos a largo plazo de los efectos secundarios, incluyendo hematológicos, infecciosos, neuróticos, oncológicos e inmunológicos, tienen que examinarse.

5 Las estrategias dirigidas a una única citocina proinflamatoria como terapia antiinflamatoria ignoran un hecho muy importante, que es que las enfermedades de tipo inflamatorio implican un "sistema" de redes de citocinas sofisticado. Por ejemplo, las quimiocinas, una familia de moléculas inmunitarias relacionadas con la IL-8, contienen aproximadamente 50 ligandos y 20 receptores, que a menudo actúan con redundancia, lo que hace que la selección de los antagonistas específicos adecuados sea no solo difícil sino que carezca de eficacia a largo plazo. Además, los productos actualmente comercializados o los productos en desarrollo son, principalmente, agentes basados en proteínas, que son caras de producir e incómodas de administrar (es decir, infusión). Por tanto, dado que el funcionamiento del sistema inmunológico está finamente equilibrado por las actividades de los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios o citocinas, la modulación de múltiples citocinas pro/antiinflamatorias en lugar de bloquear únicamente una citocina proinflamatoria concreta mediante pequeñas moléculas no solo conseguiría mejor eficacia terapéutica con menos efectos secundarios sino que también tendría las muchas ventajas de los fármacos de molécula pequeña.

Según este concepto, los inventores examinaron varios tipos de moléculas pequeñas para analizar su capacidad en la regulación de múltiples citocinas y exploraron sus potenciales aplicaciones clínicas para el tratamiento de diversas enfermedades de tipo inflamatorio.

20 El meisoíndigo es un derivado de indirubina que se ha usado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) en China con efectos secundarios minoritarios (47). En la patente anterior de los inventores (patente de EE.UU. Nº 6.566.341), los inventores demostraron que el meisoíndigo y sus derivados son activos contra tumores sólidos por su capacidad para inhibir las quinasas dependientes de ciclina, inducir la diferenciación celular y estimular la apoptosis. En la invención actual, los autores muestran nuevas actividades terapéuticas de esta clase de moléculas en el tratamiento de diversas enfermedades de tipo inflamatorio, incluyendo enfermedades inflamatorias intestinales y psoriasis en roedores y en seres humanos. Los inventores han demostrado que este tipo de agente inhibe la secreción y expresión de múltiples citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 β , IL-6 y TNF- α en las líneas celulares y estimula la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10. En un caso humano, también se ha demostrado que el meisoíndigo es muy eficaz contra la EII y no se observaron efectos secundarios significativos.

30 El documento EP 1 079 826 de Eisenbrand y col., titulado "Use of Indigoid Bisindole Derivatives for the Manufacture of a Medicament to Inhibit Cyclin Dependent Kinases," está dirigido al uso de derivados de bisindol indigoide para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas con la pérdida de control de la proliferación. De acuerdo con el documento EP 1 079 826, la psoriasis, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades infecciosas, los trastornos nefrológicos y neurodegenerativos e infecciones virales son todas ellas enfermedades asociadas con la pérdida del control de la proliferación. El documento EP 1 079 826 enseña que el medicamento es eficaz en el tratamiento de estas enfermedades asociadas con la pérdida del control de la proliferación a través de la inhibición de las quinasas dependientes de ciclina (CDK).

40 Por el contrario, los solicitantes descubrieron que el isoíndigo, el índigo, la indirubina y derivados definidos por las reivindicaciones adjuntas se pueden usar para suprimir o inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias, por ejemplo TNF- α , IL-1 e IL-6, para tratar las enfermedades de tipo inflamatorio asociadas con la expresión de citocinas.

Aunque determinadas enfermedades mencionadas en el documento EP 1 079 826 como asociadas con la pérdida de control de la proliferación celular también están relacionadas con la expresión de citocinas. Los solicitantes han descubierto que la cantidad de agente terapéutico necesaria para tratar estas correspondientes enfermedades inhibiendo los niveles de citocinas es significativamente menor que el necesario para inhibir las CDK tal como enseña el documento EP 1 079 826. El documento WO 03/051900 se refiere a isoíndigo, índigo e indirubina y a su uso en el tratamiento del cáncer.

Sumario de la invención

50 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y permite el tratamiento de diversas enfermedades de tipo inflamatorio con mínimos efectos secundarios. Una de las ventajas más importantes de la presente invención es que los compuestos terapéuticos no solo abordan los síntomas de varias enfermedades de tipo inflamatorio, sino que también modifican las enfermedades a través de la supresión de la expresión/secreción de múltiples citocinas proinflamatorias (IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, oncostatina o IFN γ 1 α , β , γ) y/o mediante la estimulación de la expresión de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-11, W-13 o TGF β).

55 La presente invención a menudo tiene como resultado una curación en lugar de simplemente una remisión temporal de los síntomas de la enfermedad. Por el contrario, las terapias existentes para las enfermedades de tipo inflamatorio, en la mayoría de los casos solo alivian los síntomas durante un corto periodo de tiempo. Adicionalmente, los compuestos terapéuticos de la presente invención son moléculas pequeñas que son simples, químicamente estables y son sustancialmente fáciles de producir y de administrar. Adicionalmente, los solicitantes

han descubierto que dosis/concentraciones comparativamente bajas de los compuestos generalmente son suficientes para inhibir sustancialmente las citocinas proinflamatorias en el paciente, reduciendo el riesgo de producir efectos secundarios asociados con el tratamiento.

- 5 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen, preferentemente, al menos un compuesto seleccionado de isoíndigo, índigo, indirubina o un derivado definido en las reivindicaciones adjuntas, un agente antiinflamatorio y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 es una representación esquemática de los papeles de las citocinas pro/antiinflamatorias y factores de crecimiento y los sitios de acción del meisoíndigo en el proceso patológico de las enfermedades crónicas de tipo inflamatorio.

15 La Figura 2 muestra el efecto del meisoíndigo sobre la secreción de IL-1 β en células THP-1 monocíticas humanas estimuladas con LPS. Efecto inhibitor del meisoíndigo sobre la producción de IL-1 β en células THP-1 monocíticas humanas estimuladas con LPS. Las células THP-1 se trataron/estimularon con y sin 1 μ g de lipopolisacárido (LPS, Sigma) y se expusieron durante 24 horas a una serie de concentraciones de meisoíndigo (de 31,25 nM a 16.000 nM). La viabilidad de las células se examinó al microscopio tras tinción con azul de tripano. Los niveles proteicos de IL-1 β secretados en los medios de cultivo se midieron mediante ELISA y se calcularon a partir de su curva estándar (panel A) usando un kit de ensayo de R&D Systems como se describe en Materiales y Procedimientos en el Ejemplo 1 a continuación. Se usó la prueba t de student para determinar la significación estadística, *** indica P < 0,001. Como se ha mostrado en el panel B, el meisoíndigo inhibe significativamente la producción de IL-1 β a una concentración tan baja como 31 nM.

25 La Figura 3 muestra el efecto del meisoíndigo sobre la secreción y expresión de IL-6 en células THP-1 monocíticas humanas estimuladas con LPS. Efectos del meisoíndigo sobre la producción (panel B) y la transcripción (panel C) de la IL-6 en células THP-1 estimuladas con LPS: las células THP-1 se trataron/estimularon con y sin 1,0 μ g/ml de LPS y se expusieron a una serie de concentraciones de meisoíndigo (de 0,031 a 16 μ M) durante 24 horas. La proteína IL-6 en el medio se midió mediante ELISA y la transcripción de IL-6 en las células se midió mediante PCR en tiempo real como se describe en Materiales y Procedimientos en el Ejemplo 2 siguiente. Panel A: Curva estándar establecida usando la proteína IL-6 pura y se usó para el cálculo de la producción de proteínas en el panel B; Panel C: Ensayo de PCR en tiempo real para la transcripción de IL-6. ***: < 0,001. Como se muestra en los paneles B y C, el meisoíndigo inhibe significativamente tanto la secreción como la transcripción de IL-6.

35 La Figura 4 muestra el efecto del meisoíndigo sobre la secreción y la expresión de TNF- α en células THP-1 monocíticas humanas. Efectos del meisoíndigo sobre la producción de proteínas (panel B) y la transcripción génica (panel C) de TNF- α en células THP-1 estimuladas con LPS: las células THP-1 se trataron/estimularon con y sin 1,0 μ g/ml de LPS y se expusieron a una serie de concentraciones de meisoíndigo (de 0,031 to 16 μ M) durante 24 horas. La proteína TNF- α en el medio se midió mediante ELISA y su transcripción en las células se midió mediante tecnología PCR en tiempo real como se describe en Materiales y Procedimientos en el Ejemplo 3 siguiente. Panel A: Curva estándar establecida usando la proteína TNF- α pura y se usó para el cálculo de la producción de proteínas en el panel B. Se obtuvo una inhibición dependiente de la concentración de meisoíndigo en la secreción de TNF- α (Panel B). Panel C: Ensayo de PCR en tiempo real para la transcripción de TNF- α . No se observaron efectos del agente sobre la transcripción de TNF- α . ***: P < 0,001.

45 La Figura 5 muestra la estimulación de IL-10 con meisoíndigo en células THP-1. Estimulación del meisoíndigo sobre la producción de IL-10 en células THP-1 tratadas con LPS. Las células THP-1 se trataron con y sin 1,0 μ g/ml de LPS y se expusieron a una serie de concentraciones de meisoíndigo (de 0,031 to 16 μ M) durante 24 horas. La proteína IL-10 en el medio se midió mediante ELISA como se describe en Materiales y Procedimientos en el Ejemplo 4 siguiente. Panel A: La curva estándar se estableció usando la proteína IL-10 pura y se usó para el cálculo de la producción de proteínas en el panel B. Aunque el LPS estimulante de la inflamación disminuyó el nivel proteico de IL-10, el meisoíndigo aumentó significativamente la producción de proteínas y el efecto de estimulación máximo se produjo a 62,5 nM con un incremento de aproximadamente 2 veces de la secreción de IL-10 (panel B). **: P < 0,01.

50 La Figura 6 muestra los efectos del meisoíndigo y NATURA sobre la expresión de citocinas proinflamatorias y quinasas dependientes de ciclina en células THP-1. Las células THP-1 que crecieron exponencialmente se estimularon con (panel A y B) y sin (panel C) 1 μ g de LPS y se expusieron durante 24 horas a las concentraciones indicadas de meisoíndigo o NATURA. La viabilidad de las células se analizó con ensayo de excepción con azul de tripano. Los niveles proteicos de IL-1 β , IL-6 e IL-10 secretados en los medios de cultivo se midieron mediante ELISA como se ha descrito en los ejemplos anteriores usando un kit de ensayo de R&D Systems como se describe en Materiales y Procedimientos en el Ejemplo 5 a continuación. Se usó la prueba t de Student para determinar la significación estadística, * indica P < 0,001. El meisoíndigo y NATURA inhiben significativamente la producción de IL-1 β e IL-6 y estimularon la producción de IL-10 a las concentraciones de 31,25 y 62,5 nM. Por el contrario, no se observó efecto inhibitor de los compuestos sobre CDK2 a las

concentraciones bajas (31,25 y 62,50 nM) en las mismas condiciones experimentales.

La Figura 7 muestra que el meisoíndigo es eficaz contra la colitis ulcerosa aguda inducida por DSS en ratones. Ejemplos de histoquímica de las paredes colónicas de colitis ulcerosa aguda inducida con 5% de DSS en ratones Balb/c tratados con y sin meisoíndigo (tinción con H y E, aumento original x 100). La inducción con DSS y el tratamiento con meisoíndigo se realizaron como se describe en Materiales y Procedimientos en el ejemplo 7 siguiente. El Panel A muestra la morfología normal de la pared colónica de animales en el grupo control normal a los que se administró agua de bebida sin DSS. El Panel B muestra la pared colónica de un ratón con colitis ulcerosa aguda inducida por 5% de DSS que indica la presencia de infiltración intensa de células inflamatorias (folículos linfoides, flechas rojas) y la desaparición focal de las criptas mucosas (lesiones erosivas, flechas azules). El Panel C muestra la pared colónica de un ratón tratado con meisoíndigo con colitis ulcerosa aguda inducida por DSS al 5%. La morfología es similar a la mostrada en el control normal (panel A), lo que indica que el meisoíndigo es eficaz contra la colitis ulcerosa aguda inducida por DSS en ratones.

La Figura 8 son fotografías de sigmoidoscopia flexible de un paciente con enfermedad intestinal inflamatoria antes y después del tratamiento con meisoíndigo. Los paneles superiores son las fotos de dos sitios de la inflamación (A y B) que muestran claramente inflamación con edema grave. El examen patológico realizado por un anatomopatólogo del Mount Sinai Medical Center de Nueva York concluyó "protocolitis crónica muy activa" con erosión y características sugestivas de enfermedad intestinal inflamatoria idiopática". Los paneles inferiores son las fotos de sigmoidoscopia flexible de las mismas localizaciones 9 semanas después de tratar al paciente con meisoíndigo. Después del tratamiento, la superficie del colon pasó a estar normal, el edema desapareció y los vasos se pueden ver claramente, aunque hay cicatrices en la localización B (panel inferior) durante la remisión. El informe del anatomopatólogo concluyó "protocolitis crónica inactiva" sugestiva de enfermedad intestinal inflamatoria idiopática".

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Un uso preferido de la presente invención comprende administrar a un animal que necesite dicho tratamiento uno o más como se define en las reivindicaciones. En una realización preferida, el compuesto se administra en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad de tipo inflamatorio inhibiendo la expresión de citocinas proinflamatorias y/o estimulando las citocinas antiinflamatorias.

Debe entenderse que los presentes usos incluyen, entre otros, tratar la enfermedad de tipo inflamatorio impidiendo la inflamación asociada con la enfermedad a través de la regulación de las citocinas implicadas en el progreso patológico, impidiendo por tanto el inicio de la enfermedad de tipo inflamatorio.

La enfermedad de tipo inflamatorio se selecciona del grupo constituido por: diabetes de tipo I; enfermedad de Sjögren; uveítis; enfermedad celíaca; conjuntivitis alérgica y colitis no específica.

Otras enfermedades de tipo inflamatorio divulgadas en el presente documento pero no reivindicadas incluyen: artritis, artritis reumatoide, una enfermedad intestinal inflamatoria; psoriasis; esclerosis múltiple; un trastorno neurodegenerativo; insuficiencia cardíaca congestiva; ictus; estenosis de la válvula aórtica; insuficiencia renal; lupus; pancreatitis; alergia; fibrosis; anemia; aterosclerosis; una enfermedad metabólica; una enfermedad ósea; una enfermedad cardiovascular, una complicación de la quimioterapia/radioterapia; diabetes de tipo II; una enfermedad hepática; un trastorno gastrointestinal; una enfermedad oftalmológica; retinopatía diabética; un trastorno pulmonar, una enfermedad renal; dermatitis; caquexia relacionada con el VIH; malaria cerebral; espondilitis anquilosante; lepra; anemia y fibromialgia.

Trastornos neurodegenerativos divulgados en el presente documento incluyen: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson; la enfermedad intestinal inflamatoria se selecciona del grupo constituido por: enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; la complicación gastrointestinal es diarrea, la enfermedad hepática se selecciona del grupo constituido por: una hepatitis autoinmune, hepatitis C, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria o insuficiencia hepática fulminante; la enfermedad ósea es osteoporosis; el trastorno pulmonar se selecciona del grupo constituido por: rinitis alérgica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inflamación granulomatosa crónica, fibrosis quística y sarcoidosis; la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo constituido por: enfermedad cardíaca aterosclerótica; insuficiencia cardíaca congestiva; y la enfermedad renal se selecciona del grupo constituido por: glomerulonefritis y vasculitis.

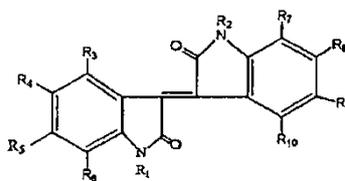
Como se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, la enfermedad es enfermedad inflamatoria intestinal (EII), incluyendo específicamente la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, o la enfermedad que se está tratando es artritis, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad posradioterapia o aterosclerosis.

El compuesto está en una cantidad para inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias y/o para estimular la expresión de citocinas antiinflamatorias. En una realización, el compuesto está, preferentemente, en una cantidad para inhibir al menos un 30% la expresión de una o más de las citocinas proinflamatorias seleccionadas del grupo constituido por: IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, oncostatina y IFN γ , β , γ :

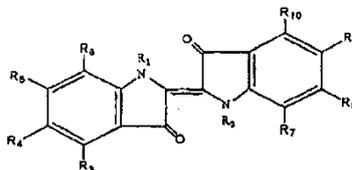
Más preferentemente, se inhibe al menos el 40% de la expresión de la citocina y, lo más preferentemente, se inhibe el 50% o más. En otra realización, el compuesto está, preferentemente, en una cantidad para estimular la expresión de citocinas antiinflamatorias. En esta realización, el compuesto está, preferentemente, en una cantidad para aumentar las citocinas antiinflamatorias seleccionadas del grupo constituido por: citocinas IL-4, IL-10, IL-11, W-13 o TGFβ en al menos un 25%, más preferentemente al menos 50% y, lo más preferentemente, al menos 75%.

Estructuras químicas:

La presente invención está dirigida al uso de un grupo específico de compuestos de Fórmulas (I) o (II)



FÓRMULA (I)



FÓRMULA (II)

en las que R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno; un grupo hidroxilo; un grupo nitroso; un grupo nitro; un monosacárido; un disacárido; un átomo de halógeno; un grupo hidrocarbilo o un grupo hidrocarbilo funcional insustituido o sustituido con uno o más restos hidroxilo, restos carboxi, restos nitroxilo, monosacáridos, disacáridos, aminas, amidas, tioles, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas o halógenos, en los que el hidrocarbilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono; un grupo -R₁₁R₁₂, en el que R₁₁ y R₁₂ pueden ser iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene de 1 a 18 átomos de carbono que puede portar, adicionalmente, uno o más grupos hidroxilo y/o amino, un grupo arilo sustituido o insustituido que puede comprender uno o más heteroátomos o un grupo acilo, o R₁₁ y R₁₂ forman juntos un anillo que tiene de 2 a 6, grupos CH₂ opcionalmente sustituidos; un grupo azo -N=N-R₁₃, en el que R₁₃ representa un sistema aromático que puede estar sustituido con uno o más grupos carboxilo y/o grupos fosforilo o un grupo seleccionado del grupo constituido por azúcares, aminoácidos, péptidos u hormonas esteroides; o R₁ y R₆, y R₂ y R₇, respectivamente, forman, de forma independiente entre sí, un anillo juntos que tiene de 1 a 4 grupos CH₂ opcionalmente sustituidos;

Los grupos R₁ y R₂ son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno; un grupo hidroxilo; un grupo hidrocarbilo o un grupo hidrocarbilo funcional insustituido o sustituido con uno o más restos hidroxilo, restos carboxi, restos nitroxilo, monosacáridos, disacáridos, aminas, amidas, tioles sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas o halógenos, en los que el hidrocarbilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono; un grupo mono-, di- o triarilsililo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono independientemente uno de otro en cada caso en el grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada; un grupo mono-, di- o triarilsililo con grupos arilo sustituidos o insustituidos independientemente entre sí en cada caso; un grupo -NR₁₇R₁₈, en el que R₁₇ y R₁₈ pueden ser iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene de 1 a 18 átomos de carbono que puede portar adicionalmente uno o más grupos hidroxilo y/o amino, un grupo arilo sustituido o insustituido que puede comprender uno o más heteroátomos, o un grupo acilo; un grupo metilnamino -CH₁₇R₁₈, en el que R₁₇ y R₁₈ tienen las definiciones anteriores; un residuo de aminoácidos fisiológicos unidos al nitrógeno como una amida, monosacárido, disacáridos u oligosacáridos sustituidos o insustituidos; o un azúcar, aminoácido, péptido u hormona esteroide.

Compuestos preferidos son aquellos en los que al menos uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ o R₁₀ es, de forma independiente, un monosacárido, un disacárido o un grupo hidrocarbilo o un grupo hidrocarbilo funcional sustituido con uno o más restos hidroxilo, restos carboxi, restos nitroxilo, monosacáridos, disacáridos, aminas, amidas, tioles o halógenos, en los que el hidrocarbilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono; y al menos uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ o R₁₀ potencia la bioactividad o la biodisponibilidad del compuesto.

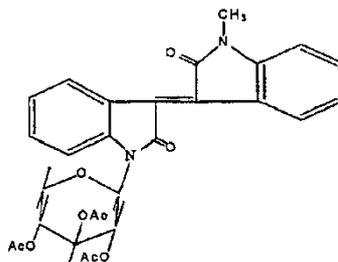
Es preferible que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ o R₁₀ potencie la bioactividad o la biodisponibilidad del compuesto aumentando la solubilidad del compuesto. Es más preferible que tanto la bioactividad como la biodisponibilidad aumenten por uno o más de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ o R₁₀.

Compuestos preferidos son aquellos en los que al menos R₁ o R₂ es un monosacárido, un disacárido insustituido o

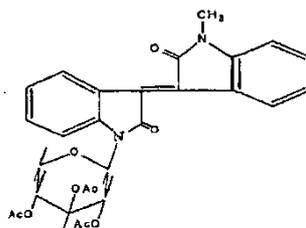
5 sustituido con uno o más restos hidroxilo o restos carboxi, un halógeno, un grupo hidrocarbilo o un grupo hidrocarbilo funcional insustituido o sustituido con uno o más restos hidroxilo, restos carboxi, restos nitroxi, monosacáridos, disacáridos, aminas, amidas, tioles, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas o halógenos, en que el hidrocarbilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono. En muchos casos, solo uno de R₁ o R₂ necesita ser uno de los restos citados, siendo uno de los sustituyentes más preferidos -CH₂CH₂OH.

Compuestos más preferidos de las fórmulas (I) o (II) son unos en los que R₁ o R₂ es una molécula glicósido, lo más preferentemente un monosacárido y, lo más preferentemente, un monosacárido acetilado.

En una realización de la invención, los usos implican los compuestos meisoíndigo, glico-meisoíndigo triacetilado (profármaco) (mostrado como fórmula (V)) y NATURA (mostrado como Fórmula (VI)).



FÓRMULA (V)



FÓRMULA (VI)

15 El término "hidrocarbilo" en el contexto de la presente invención y en las fórmulas anteriores, se refiere ampliamente a un grupo hidrocarburo monovalente en el que la valencia deriva por abstracción de un hidrógeno de un átomo de carbono. Hidrocarbilo incluye, por ejemplo, grupos alifáticos (de cadena lineal y ramificada), cicloalifáticos, aromáticos y de carácter mixto (p. ej., aralquilo y alcarilo). Hidrocarbilo también incluye los grupos con insaturación interna e insaturación activada. Más específicamente, hidrocarbilo incluye (entre otros) grupos tales como alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, alcarilo, alqueniilo, cicloalqueniilo y alquiniilo, preferentemente que tiene hasta 12 átomos de carbono. Las realizaciones preferidas incluyen aquellas en las que el grupo hidrocarbilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Estos y otros grupos hidrocarbilo pueden contener, opcionalmente, un grupo o grupos carbonilo (que está/están incluido/s en el recuento de carbonos) y/o un heteroátomo o heteroátomos (tales como al menos un oxígeno, azufre, nitrógeno o silicio) en la cadena o anillo.

25 El término "hidrocarbilo funcional" en el contexto de la presente invención y en las fórmulas anteriores, se refiere ampliamente a un grupo hidrocarbilo que posee funcionalidades "reactivas" y/o "reactivas latentes" pendientes y/o terminales y/o grupos salientes. Funcionalidades reactivas hacen referencia a funcionalidades que son reactivas con funcionalidades de monómero/polímero comunes en condiciones normales bien entendidas por los expertos en la técnica en cuestión. Ejemplos de funcionalidades reactivas son grupos que contienen hidrógeno activo tales como hidroxilo, amino, carboxilo, tio, amido, carbamoilo y metileno activado; grupos isocianato, ciano y epoxi; grupos etilénicamente insaturados tales como alilo y metalilo; y grupos insaturados activados tales como acrililo y metacrililo, y maleato y maleimido (incluyendo los aductos de Diels-Alder de los mismos con dienos tales como butadieno). Funcionalidades reactivas latentes dentro del significado de la presente invención y, como entenderán claramente los expertos en la técnica en cuestión, hacen referencia a funcionalidades que están bloqueadas o enmascaradas para impedir la reacción prematura. Ejemplos de funcionalidades reactivas latentes son cetiminas y aldminas (aminas bloqueadas, respectivamente, con cetonas y aldehídos), sales de amina-carboxilato e isocianatos bloqueados tales como alcohol (Carbamatos), oxima y variaciones bloqueadas de caprolactama. Un "grupo saliente" dentro del significado de la presente invención, y, como entenderán claramente los expertos en la técnica en cuestión, es un sustituyente unido a la cadena o anillo hidrocarbilo durante que durante la reacción se desplaza creando una valencia sobre un carbono o heteroátomo en la cadena o anillo de hidrocarbilo. Ejemplos de grupos salientes son átomos de halógeno tales como cloro, bromo y yodo; sales de amonio cuaternario, sales de sulfonio y sulfonatos.

Un monosacárido o disacárido de la presente invención es, preferentemente, glucosa, fructosa, ribulosa, galactosa,

manosa, celobiosa, alosa, altrosa, ribosa, xilosa, arabinosa, sacarosa o lactosa. Lo más preferentemente es D-glucosa, D-ribosa, D-galactosa, D-lactosa, D-xilosa o D-sacarosa.

En una realización preferida, el monosacárido o disacárido está acetilado, preferentemente al menos diacetilado y, lo más preferentemente, triacetilado.

5 El término “halógeno” indica flúor, cloro, bromo o yodo. Preferentemente, es flúor o cloro.

Como se usa en el presente documento, aminoácido significa un aminoácido L o D (o un residuo del mismo), preferentemente L, seleccionado del grupo constituido por alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina. El término péptido es dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico, que contiene, preferentemente, de 2 a 8 aminoácidos y, lo más preferentemente, que contiene de 2 a 6 aminoácidos.

Preparaciones farmacéuticas y administraciones:

La invención se puede usar para tratar a un animal con una enfermedad de tipo inflamatorio como se define en las reivindicaciones, siendo preferible que el animal sea un mamífero y más preferible que el animal sea un ser humano.

15 También debe señalarse que los beneficios terapéuticos normalmente se llevan a cabo mediante la administración de al menos 1, 2, 3 o más de los compuestos como se define en las reivindicaciones de forma concurrente o secuencial. Los compuestos como se definen en las reivindicaciones también se pueden combinar con otras terapias para proporcionar cantidades combinadas terapéuticamente eficaces. El compuesto como se define en las reivindicaciones se puede administrar, por ejemplo, en combinación con agentes adicionales, preferentemente agentes antiinflamatorios.

20 En una realización preferida, la composición farmacéutica para tratar una enfermedad de tipo inflamatorio asociada con la expresión de citocinas proinflamatorias como se define en las reivindicaciones incluye uno o más compuestos como se define en las reivindicaciones; un agente antiinflamatorio y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el agente antiinflamatorio se selecciona del grupo constituido por: un analgésico, un agente antirreumático, un agente gastrointestinal, una preparación para la gota, glucocorticoides, preparación oftálmica, agente respiratorio, una preparación nasal y un agente de membrana mucosa.

Preferentemente, el analgésico se selecciona del grupo constituido por: naproxeno, indometacina, ibuprofeno, trometamina ketorolaco, trisalicilato de colina magnesio y rofecoxib; el agente antirreumático se selecciona del grupo constituido por: ciclosporina, sulfasalazina, valdecoxib, penicilamina y dexametasona; el agente gastrointestinal se selecciona del grupo constituido por: mesalamina, balsalazida disódica y olsalazina sódica; la preparación para la gota es sulindac; el glucocorticoide se selecciona del grupo constituido por: dexametasona, dexametasona fosfato, acetato de metilprednisolona, hidrocortisona e hidrocortisona sódica fosfato; la preparación nasal se selecciona del grupo constituido por dipropionato de beclometasona monohidrato, propionato de fluticasona, triamcinolona acetónido, flunisolida, furoato de mometasona monohidrato y budesonida; la preparación oftálmica es trometamina ketorolaco; el agente respiratorio es nedocromilo sódico; y el agente de membrana mucosa se selecciona del grupo constituido por: dipropionato de alclometasona, butirato de hidrocortisona, flurandrenolida, valerato de betametasona y propionato de clobetasol.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende meisoíndigo y/o NATURA. Típicamente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un diluyente inerte.

40 Adicionalmente, en otra realización más, los compuestos, como se define en las reivindicaciones, están en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad de tipo inflamatorio mediante la inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias y/o mediante la estimulación de la expresión de citocinas antiinflamatorias. En esta realización, el agente antiinflamatorio adicional mencionado anteriormente no se requiere en la composición para que sea eficaz, pero es ventajoso.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden tomar diversas formas adaptadas a la vía de administración elegida como se ha tratado anteriormente. Los expertos en la técnica reconocerán diversas metodologías sintéticas que se pueden usar para preparar composiciones farmacéuticamente aceptables no tóxicas de los compuestos descritas en el presente documento. Los expertos en la técnica reconocerán una amplia variedad de disolventes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que se pueden usar para preparar solventes de los compuestos de la invención, tales como agua, etanol, aceite mineral, aceite vegetal y dimetilsulfóxido.

50 Las composiciones se pueden administrar por vía oral, tópica, parenteral, mediante inhalación o pulverización o rectal en formulaciones monodosis que contienen vehículos, adyuvantes y transportadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables convencionales. También se entiende que el mejor procedimiento de administración puede ser una combinación de procedimientos. La administración oral en forma de una píldora, cápsula, elixir, jarabe, pastilla, troscito o similares es particularmente preferida. El término “parenteral”, como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, intradérmicas, intravasculares (p. ej., intravenosa) intramusculares, espinales, inyección intratecal o inyecciones similares o técnicas de infusión.

Las composiciones farmacéuticas están, preferentemente, en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires.

5 Las composiciones destinadas a uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica para fabricar composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo constituido por edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente refinadas y agradables al gusto. Los comprimidos pueden comprender el principio activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, que son adecuados para fabricar comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes tales como
10 carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo almidón de maíz, o ácido algínico; aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábiga, y lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas que se conoce que retrasan la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y, de este modo, proporcionan una acción sostenida durante un periodo de tiempo largo. Por
15 ejemplo, se puede emplear un material de retraso de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formulaciones de uso oral se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo está mezclado con un diluyente sólido inerte, Por ejemplo carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo está mezclado con agua o un medio oleoso, por ejemplo
20 aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosa. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los dispersantes o humectantes pueden ser una fosfatida natural, por ejemplo lecitina, o
25 productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilen-oxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitano. Las suspensiones acuosas pueden también contener uno o más conservantes, por ejemplo etilo, o p-hidroxi-benzoato de n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.
30

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo los principios activos en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir edulcorantes, tales como los que se han indicado con anterioridad, y agentes edulcorantes para proporcionar preparaciones orales agradables al gusto. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.
35

Polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en mezcla con un dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Ejemplos de dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión son como los que ya se han mencionado en lo que antecede. También pueden estar presentes excipientes, por ejemplo edulcorantes, aromatizantes y conservantes adicionales.
40

Las composiciones farmacéuticas pueden también estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de éstos. Emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo goma arábiga o goma tragacanto, fosfatidas naturales, por ejemplo soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol; anhídridos, tales como monooleato de sorbitán; y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán. Las emulsiones puede
45 también contener edulcorantes y aromatizantes.
50

Los jarabes y elixires se pueden formular con edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones pueden también contener un demulcente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una solución acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles en forma de un disolvente o un medio de
55 suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos.
60

Además, pueden usarse aceites grasos tales como ácido oleico en la preparación de sustancias inyectables.

La composición también se puede administrar en forma de supositorios, por ejemplo para administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a las temperaturas habituales pero líquido a la temperatura rectal y que por lo tanto se funda en el recto liberando el fármaco. Dichos materiales son manteca de cacao y polietilenglicoles.

Como alternativa, las composiciones se pueden administrar por vía parenteral en un medio estéril. El fármaco, dependiendo del vehículo y la concentración usada, puede suspenderse o disolverse en el vehículo. De forma ventajosa, los adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tampón se pueden disolver en el vehículo.

Para la administración a animales no humanos, la composición que contiene el compuesto terapéutico se puede añadir al alimento o al agua de la bebida del animal. Asimismo, será conveniente formular productos de alimento y de agua de bebida para animales de forma que el animal tome una cantidad adecuada del compuesto en su dieta. También será conveniente presentar el compuesto en una composición como premezcla para la adición al alimento o al agua de bebida. La composición también se puede añadir como suplemento alimenticio o de bebida para seres humanos.

Los niveles de dosis del orden de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 250 mg por kilogramo de peso corporal al día y, más preferentemente, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 150 mg por kilogramo de peso corporal al día, son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas anteriormente. La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales vehiculantes para producir una forma farmacéutica unitaria variará en función de la afección que se esté tratando y el modo de administración concreto. Las formas farmacéuticas unitarias generalmente contendrán entre de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de principio activo. La dosificación preferentemente será al menos tres veces menos para tratar enfermedades inflamatorias mediante la modulación de citocinas que para tratar trastornos de proliferación inhibiendo la CDK. Por ejemplo, una dosis de meisoíndigo para tratar la LMC es, generalmente, de aproximadamente 125 mg al día, mientras que la dosis de meisoíndigo para tratar la EII normalmente es de 25 mg al día. Esto se debe a la cantidad significativamente menor necesaria para la regulación de citocinas por esta clase de moléculas que se requiere para regular las CDK.

La frecuencia de la dosis también puede variar en función del compuesto usado y la enfermedad concreta tratada. No obstante, para el tratamiento de la mayoría de los trastornos se prefiere una pauta de dosificación de 4 veces al día o menos. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la afección particular que se somete a tratamiento.

Los compuestos, como se define en las reivindicaciones, tendrán propiedades farmacológicas deseables que incluyen, entre otras, la biodisponibilidad oral, la toxicidad baja, la baja unión de las proteínas séricas y las semividas *in vitro* e *in vivo* deseables. La penetración de la barrera hematoencefálica para los compuestos usados para tratar trastornos del SNC es necesaria, mientras a menudo se prefieren niveles cerebrales bajos de los compuestos usados para tratar los trastornos periféricos.

Se pueden usar ensayos para predecir estas propiedades farmacológicas deseables. Los ensayos usados para predecir la biodisponibilidad incluyen el transporte a través de las monocapas de células intestinales humanas, incluyendo monocapas de células Caco-2. Se puede usar la toxicidad para hepatocitos cultivados para predecir la toxicidad del compuesto. La penetración de la barrera hematoencefálica de un compuesto en seres humanos se puede predecir a partir de los niveles cerebrales de animales de laboratorio que reciben el compuesto por vía intravenosa.

La unión de las proteínas séricas se puede predecir en los ensayos de unión a albúmina. Dichos ensayos se describen en una recapitulación de Oravcova, y col. (Journal of Chromatography B (1996) volumen 677, páginas 1-27).

La semivida del compuesto es inversamente proporcional a la frecuencia de dosis de un compuesto. Las semividas *In vitro* de los compuestos se pueden predecir a partir de ensayos de semivida microsómica como describen Kuhnz y Gieschen (Drug Metabolism and Disposition, (1998) volumen 26, páginas 1120-1127).

La cantidad de la composición requerida para usar en el tratamiento variará no solo con el compuesto concreto seleccionado sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se esté tratando y la edad y la afección del paciente y, en última instancia, será a discreción del médico o clínico responsable.

Indicaciones terapéuticas del meisoíndigo y otros derivados como se definen en las reivindicaciones adjuntas de isoíndigo, índigo e indirrubina:

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En los últimos 10 años, el desarrollo de inhibidores de TNF- α y otras citocinas ha sido una de las áreas más activas del desarrollo de fármacos para el tratamiento de varias enfermedades de tipo inflamatorio. Aunque periodos cortos de resultados clínicos de la aplicación de dichos inhibidores específicos para el tratamiento de varias enfermedades de tipo inflamatorio son positivos e incluso emocionantes y el futuro desarrollo de tratamientos anti-TNF- α y anti-citocinas será, en general, interesante (34), la eficacia a largo plazo de estos tratamientos se ha complicado por el hecho de que en el proceso patológico de las enfermedades de tipo inflamatorio no solo participa una sola ruta sino un complicado sistema de redes de citocinas.

Las citocinas proinflamatorias han participado en una amplia gama de procesos inflamatorios patológicos, como también lo ha hecho la expresión reducida de citocinas antiinflamatorias.

La Figura 1 muestra la representación esquemática de procesos patológicos en enfermedades de tipo inflamatorio humanas que implican a varias citocinas y factores de crecimiento que proporcionan una representación esquemática de citocinas pro/antiinflamatorias y factores de crecimiento, y sitios de acción de derivados como se definen en las reivindicaciones adjuntas, tales como meisoíndigo en el proceso patológico de las enfermedades de tipo inflamatorio. La estimulación patológica de la inflamación desencadena células respondedoras inflamatorias (linfocitos, monocitos, neutrófilos, células endoteliales, macrófagos tisulares y mastocitos) para liberar citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento. A su vez, estas citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento conducen a la salida de las células inmunitarias, neutrófilos y monocitos sanguíneos del suministro de sangre y su posterior acumulación en los sitios de inflamación. En consecuencia, estos causan diversas enfermedades de tipo inflamatorio y/o trastornos autoinmunitarios. Estas enfermedades incluyen enfermedad intestinal inflamatoria (EII), psoriasis, artritis reumatoide, neurodegeneración y otras. El meisoíndigo, a concentraciones bajas (p. ej., 30 nM) inhibe la producción de múltiples citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 β , IL-6, and TNF- α , y estimula la citocina antiinflamatoria IL-10.

En la Tabla 1 se resume la implicación de varias citocinas en el proceso patológico de los trastornos autoinmunitarios. Aunque en los tejidos/órganos de enfermedades autoinmunitarias se han encontrado incrementos significativos de varias citocinas proinflamatorias, algunas citocinas reguladoras están moderadamente elevadas para equilibrar las citocinas proinflamatorias sobreactivadas. También se cree que los trastornos autoinmunitarios se deben a un desequilibrio entre las citocinas proinflamatorias y las reguladoras (48).

Las observaciones de los inventores muestran que el meisoíndigo regula por disminución la secreción/expresión de varias citocinas proinflamatorias. TNF- α , IL-1 e IL-6 y regula por aumento las citocinas antiinflamatorias IL-10. La expresión "consecuencias de la liberación de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento" hace referencia al epidermotropismo de los linfocitos T, la inducción de la hiperproliferación de K6/16, macrófagos de revestimiento, infiltración de neutrófilos y linfocitos T activados, incremento y activación de mastocitos, inducción de ICAM-1 y MHC de clase II, angiogénesis, cambio en la permeabilidad vascular, apoptosis, daños cerebrales y del sistema nervioso central, regulación de la proliferación de células sinoviales, degradación del cartílago y resorción ósea.

Tabla 1. Lista de citocinas y factores de crecimiento implicados en el proceso patológico de varios trastornos inflamatorios

Citocinas proinflamatorias	Citocinas reguladoras	Quimiocinas	Factores de crecimiento
TNF- α	IL -4	IL -8	FGF
LT	IL -10	Gro α	PDGF
LIF	IL-11	MIP-1	VEGF
Oncostatina M	W-13	MCP-1	GM-CSF
W15		ENA-78	M-CSF
IFNc1 α/β		RANTES	TGF- β
IFN γ			
IL-1 α, β			
IL-2			
IL-3			
IL-6			
IL-7			

(continuación)

Citocinas proinflamatorias	Citocinas reguladoras	Quimiocinas	Factores de crecimiento
IL-9			
IL-12			
IL-17			
IL-18			

5 Enfermedad intestinal inflamatoria (EII): La EII comprende la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), que son 2 enfermedades de tipo inflamatorio crónicas solapantes del tracto gastrointestinal causadas por la alteración de la regulación del sistema inmunitario (20). Los pacientes con EII tienen una función de barrera epitelial intestinal defectuosa, lo que permite la colonización bacteriana del epitelio. Como resultado, los productos bacterianos y citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 e IL-6) producen estimulación inflamatoria persistente. Los antígenos bacterianos se introducen en el sistema inmunitario mediante células dendríticas mucosas y macrófagos. En respuesta, los fagocitos intestinales (principalmente monocitos y neutrófilos) proliferan e incrementan la expresión y la secreción de citocinas proinflamatorias. Como los inhibidores del crecimiento celular y los inductores de la diferenciación celular demostrados en la patente anterior de los inventores, el meisoíndigo y derivados del isoíndigo, índigo e indirubina inhibirán de forma eficaz la proliferación sobreactiva de las células inflamatorias al tiempo que suprimirán su expresión/secreción de las citocinas proinflamatorias como se demuestra en los Ejemplos 1 a 4. Esta conclusión se ha confirmado en modelos animales, así como en un paciente con EII, como se muestra en los Ejemplos 7-8.

10 Psoriasis: Las citocinas son mensajeros intercelulares que tienen un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación cutánea. Se ha notificado que una serie de citocinas desempeñan papeles cruciales en la patogenia de trastornos cutáneos inflamatorios. IL-1, TNF- α e IFN- γ inducen la expresión de ICAM-1 y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II (48, 49). IL-1, TNF- α y el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos son capaces de inducir la activación, maduración y migración de células dendríticas y la IL-2 activa los mastocitos (50). IL-6 y TGF- α potencian la proliferación de queratinocitos. IL-1, TNF- α , TGF- α y VEGF inducen angiogénesis y atraen las células inflamatorias (51-53). La primacía de las citocinas en la producción de respuestas inmunitarias cutáneas las convierten en una diana muy atractiva para nuevos modificadores de la respuesta biológica (18). Por tanto, como reguladores de múltiples citocinas, las moléculas pequeñas reivindicadas en la presente invención, el meisoíndigo y derivados del isoíndigo, índigo e indirubina serán eficaces contra la psoriasis. Como se muestra en el Ejemplo 6, los inventores han demostrado en un modelo de roedores que el meisoíndigo era verdaderamente eficaz de un modo dependiente de la dosis contra la psoriasis y el efecto fue mejor que el control positivo MTX.

20 Artritis reumatoide (AR): El papel de la red de citocinas en la inflamación y la destrucción articular en la AR se ha investigado extensamente en los últimos años. Además del TNF- α , la IL-1 desempeña una función central en la patogenia y las manifestaciones clínicas de la AR (54). La capacidad de la IL-1 para dirigir la inflamación y la erosión articular y para inhibir los procesos de reparación de tejidos se ha establecido claramente en sistemas *in vitro* y en modelos animales y se ha conseguido aliviar los síntomas de inflamación en pacientes de AR mediante el bloqueo de la IL-1 (55). La IL-6 es una citocina multifuncional que regula la respuesta inmunitaria, la hematopoyesis, la respuesta de fase aguda y la inflamación. La alteración de la regulación de la producción de IL-6 está implicada en la patología de varias enfermedades, incluyendo la AR. Un abordaje terapéutico para bloquear la señal de la IL-6 se ha llevado a cabo usando anticuerpo anti-IL-6R humanizado para la AR entre otras enfermedades (11, 56). La IL-10 es una citocina antiinflamatoria. Se ha demostrado que la expresión de IL-10 previene la artritis o mejora la enfermedad en modelos animales (57, 58). Aunque es obvio que citocinas tales como TNF- α , IL-1, IL-6 y IL-10 tienen papeles independientes, actúan juntas participando en determinados procesos patofisiológicos en la AR. El hallazgo de una clase de moléculas descritas en la presente invención, que son capaces de modular estas diferentes citocinas, tendrá como resultado un espectacular progreso terapéutico en el tratamiento de la AR.

30 Esclerosis múltiple (EM): La EM es un trastorno inflamatorio autoinmune. Aunque la causa de que el cuerpo ataque a su propia mielina en pacientes con EM sigue sin estar clara, las citocinas de regulación alterada están claramente implicadas en el proceso de la enfermedad. Usando la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo ampliamente usado para los estudios de EM basado en similitudes autoinmunes, histopatológicas, genéticas y clínicas, se ha demostrado que en el estado claramente activo, tanto la EAE como la EM se caracterizan por la presencia de infiltrados inflamatorios perivasculares diseminados en el SNC, un proceso en el que las citocinas quimioatrayentes (quimiocinas) desempeñan un papel importante. Existen pruebas de que la expresión de quimiocinas (miembros de la familia de la IL-8) durante la inflamación autoinmune del SMC está regulada por algunas citocinas proinflamatorias, tales como el TNF (59). Los papeles de otras citocinas pro/antiinflamatorias tales como IL-1 β , IL-6 e IL-10 también se confirmaron en modelos animales de EAE ((60-62) así como en seres humanos

(63). La IL-1 β está presente en lesiones de EM. El antagonista de los receptores de IL-1 (IL-1Ra) modera la inducción de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). Se ha observado un incremento del riesgo de EM en individuos con altos niveles de IL-1 (3 sobre la producción IL-1Ra y una elevada proporción de la producción de TNF sobre IL-10 (63).

5 Trastornos neurodegenerativos: La enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (PK) son los 2 trastornos neurodegenerativos más frecuentes relacionados con neuroinflamación. La neuroinflamación es una característica del tejido afectado patológicamente en varios trastornos neurodegenerativos. Estos cambios se observan particularmente en áreas del cerebro afectadas de casos de EA (64). El papel de las citocinas se ha implicado en la patogenia de la EA, aunque el mecanismo por el cual las citocinas contribuyen a la patogenia no se entiende completamente. En la EA, las microglías, especialmente las asociadas con depósitos de amiloide, tienen un fenotipo que es consistente con un estado de activación, incluyendo inmunorreactividad con anticuerpos frente a antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y frente a las citocinas inflamatorias IL-1 β y TNF- α (65). Una de las características neuropatológicas principales de la EA es el depósito en el cerebro de placas seniles que están compuestas principalmente de péptidos beta amiloide tóxicos (Abeta) que se generan a partir de una familia de Abeta que contiene las proteínas precursoras (AbetaPP). Se ha demostrado que las citocinas estimulan la expresión de la transcripción de AbetaPP (66). El análisis del linaje genético de los loci que controlan la edad de inicio en la EA y la EP reveló una asociación significativa entre la EA y la glutatión-S-transferasa, genes omega 1 y 2 (GSTO1, GSTO2) (7). La función de GSTO1 parece relacionada con el procesamiento postraduccional de la citocina proinflamatoria IL-1 β (67).

20 Inflamación relacionada con consecuencias de radioterapia: Las enfermedades inflamatorias relacionadas con los daños producidos por la radiación en el recto y el colon sigmoideo son complicaciones de lo más frecuente con la radioterapia para cáncer de la región pélvica, entre los que se incluyen los cánceres de cuello uterino, útero, próstata, vejiga urinaria y testículos. La proctosigmoiditis por radiación es la forma clínicamente evidente más frecuente de daños colónicos tras radiación pélvica con una incidencia del 5% al 20%. Normalmente, los pacientes exhiben síntomas de tenesmo, hemorragia, diarrea de volumen bajo y dolor rectal. Rara vez se pueden desarrollar obstrucción de grado bajo o tractos fistulosos en los órganos adyacentes.

30 El mecanismo de la radioterapia es a través de sus daños al ADN en las células en proliferación activa. Los daños patológicos tras la radioterapia localizada en el intestino/colon se pueden dividir en fases agudas y crónicas. Los cambios patológicos iniciales incluyen una pérdida de linfocitos en la lámina propia y daños microscópicos en las células epiteliales de la mucosa y las células endoteliales vasculares. Estos cambios se manifiestan como un aplanamiento de las vellosidades y una disminución de las células regenerativas de las criptas, seguido de un marcado edema submucoso con incremento de la permeabilidad vascular.

35 La endarteritis progresiva parece ser el principal mecanismo por el cual se producen los efectos crónicos que después se manifiestan como fibrosis progresiva que conduce a atrofia mucosa, formación de estenosis y trombosis, lo que causa daños isquémicos secundarios. La colitis por radiación en la fase crónica demuestra una distorsión muy significativa de las criptas, telangiectasia vascular y fibrosis de la lámina propia. Es interesante el hecho de que algunos de estos cambios patológicos también están presentes en la EII de larga duración (68).

40 Por tanto, las citocinas pueden desempeñar un papel entre varias enfermedades gastrointestinales en las que la inflamación exhiben una parte significativa. Los estudios recientes se han centrado en el papel crucial de las citocinas en la EII crónica (69-74). Para aclarar el papel de las citocinas en la proctitis por radiación, Indaram y col. (75) examinaron los niveles de citocinas en la mucosa colónica en pacientes con proctitis por radiación y compararon estos valores con los obtenidos de controles normales y pacientes con EII. Hallaron que los niveles en la mucosa de IL-2, IL-6, and IL-8 eran significativamente más altos y estadísticamente significativos ($p < 0,05$) tanto en la mucosa enferma ($5,62 \pm 0,13$, $1,60 \pm 0,31$, $21,45 \pm 4,03$ pg/mg) como en la de aspecto normal ($3,83 \pm 0,78$, $1,36 \pm 0,34$, $13,45 \pm 3,18$ pg/mg) en el grupo de proctitis por radiación en comparación con los de los controles normales ($1,74 \pm 0,23$, $0,67 \pm 0,05$, $4,99 \pm 1,39$ pg/mg).

50 Por tanto, estos hallazgos demuestran una activación similar de las citocinas en pacientes con proctitis por radiación y EII. En los pacientes de proctitis por radiación se demostró que los niveles de IL-2, IL-6 e IL-8 en la mucosa era significativamente mayor en comparación con los controles normales. En comparación, los pacientes de EII (CU y EC) demostraron niveles significativamente mayores de las citocinas, incluyendo IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8 en comparación con los controles normales.

55 La similitud en la expresión de citocinas en la mucosa en estas 2 enfermedades se relaciona de forma plausible directamente con la naturaleza de inflamación intensa de las enfermedades. Se ha postulado que esta similitud en la activación de citocinas en estas 2 enfermedades se puede traducir en los cambios patológicos similares observados en la EII crónica y la proctitis por radiación. Esta hipótesis está avalada por el hecho de que el tratamiento médico de la proctitis por radiación, aunque bastante insatisfactorio, incluye tratamiento con diversos derivados de ácido aminosalicílico y corticosteroides administrados por vía oral o tópica. Estas opciones de tratamiento son idénticas para la gestión de la EII.

Como se demuestra en la presente invención, el meisoíndigo y su clase de moléculas pequeñas como se define en

las reivindicaciones adjuntas son capaces de regular por disminución la IL-1 β , la IL-6 y el TNF- α , y la regulación por aumento de la citocina reguladora IL-10; cabe esperar una eficacia elevada y efectos secundarios bajos para este tratamiento.

5 Otras enfermedades relacionadas con la alteración de la regulación de las citocinas: Las enfermedades cardiovasculares (ECV), la aterosclerosis y las enfermedades metabólicas (el síndrome metabólico) también se han ligado a una secreción/expresión inadecuada de las citocinas pro/antiinflamatorias (10, 12-14, 76).

10 Diabetes: Un defecto fundamental en la diabetes de tipo II es la resistencia a la insulina, por la cual la insulina no suprime la producción de glucosa en el hígado ni estimula el consumo por tejidos periféricos, lo que da como resultado hiperglucemia. Las células β pancreáticas responden a un exceso de glucosa en plasma secretando más insulina para superar los efectos de la resistencia a la insulina. A medida que progresa la resistencia a la insulina y las células β ya no pueden cumplir el requisito de incrementar la cantidad de insulina, los niveles de glucosa en plasma aumentan y se desarrolla diabetes de tipo II.

15 Muchos factores pueden contribuir al inicio de la diabetes de tipo II. Dado que el 80% de los pacientes con diabetes de tipo II son obesos y la obesidad siempre se asocia con la resistencia a la insulina, se han realizado investigaciones extensas sobre los mediadores moleculares que ligan la obesidad a la resistencia a la insulina. Se han identificado diversos factores como causas contribuyentes de la resistencia a la insulina en la obesidad y la diabetes de tipo II relacionada con la obesidad, principalmente los producidos por el tejido adiposo, AGL (ácidos grasos libres), TNF α , IL-6, leptina, adiponectina y resistina. Los niveles de ARNm y de proteínas de TNF α están muy aumentados en los tejidos adiposos de animales obesos (77) y sujetos humanos (78). Todos los tipos diferentes de células en el tejido adiposo pueden producir citocinas. Los adipocitos expresan receptores de TNF α y son también la fuente principal del TNF α , que se piensa que funciona predominantemente de un modo autocrino/paracrino en el tejido adiposo.

20 La exposición a largo plazo de células cultivadas (79) o animales (80) a TNF α induce resistencia a la insulina, mientras que la neutralización de TNF α aumenta la sensibilidad a la insulina y reduce la hiperglucemia en un modelo animal de diabetes de tipo II (81). La ausencia de TNF α o de receptores de TNF α por inactivación génica mejora significativamente la sensibilidad a la insulina en modelos animales de obesidad (82).

25 Se han propuesto mecanismos para la resistencia a la insulina inducida por TNF α en adipocitos, así como sistémicamente (83). El TNF α inhibe la fosforilación del receptor de la insulina y el sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1) a través del inhibidor kB quinasa - β (IKK- β). La activación de NF-kB por el TNF α es obligatoria para la represión de los genes abundantes en adipocitos esenciales para la función de los adipocitos y también es suficiente para inhibir la transcripción génica mediada por PPAR-gamma. Asimismo, el TNF α estimula la lipólisis y otra expresión de citocinas en el tejido adiposo y desencadena la liberación de AGL. De hecho, los niveles de FFV aumentan antes de una hiperglucemia franca en algunos modelos animales de resistencia a la insulina (83). Existen extensas pruebas que implican al exceso de AGL en plasma en la inducción y progresión de la resistencia sistémica a la insulina. En hepatocitos, los AGL contribuyen a un exceso de glucosa y producción de VLDL. En células musculares, niveles altos de AGL alteran la señalización de la insulina y estimulan la oxidación de AGL que conducen a una disminución considerable de la oxidación de la glucosa.

30 Los fármacos de sensibilización a la insulina disponibles en la actualidad, que pertenecen al agonista de PPAR-gamma, inhiben el perfil de expresión génica de los adipocitos inducido por TNF α a través de la ruta de NF-kB (84). Como el TNF α derivado de adipocitos funciona como factor autocrino o paracrino, la liberación sistémica de anticuerpos frente a TNF α puede no ser eficaz en el bloqueo de la actividad biológica del TNF α expresado localmente en el tejido adiposo (85). NATURA, que representa un nuevo tipo de inhibidor del TNF α de molécula pequeña a través de una simple difusión, podría, por tanto, ser un agente eficaz para bloquear la función de TNF α expresado localmente y potencialmente útil en el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

35 La diabetes mellitus de tipo I es una enfermedad autoinmune caracterizada por infiltración de células mononucleares en los islotes de Langerhans y la destrucción selectiva de las células beta productoras de insulina. Aunque los linfocitos T CD8 + pueden ser iniciadores importantes, los linfocitos T CD4 + (86) y los macrófagos (87, 88) son los principales efectores celulares del proceso inmunitario que conduce a la muerte de las células beta. Los macrófagos activados secretan directamente IL-1beta, IL-6, IL-12, TNF-alfa, indirectamente desencadenan la producción de IFN-gamma de los linfocitos T activados. La implicación de las citocinas como TNF-alfa, IFN-gamma, IL-1beta, IL-6 e IL-10, en la patogenia de la diabetes de tipo 1 se ha aclarado bien a través de estudios de correlación de la expresión de citocinas y el desarrollo de la diabetes de tipo 1, estudios de aumento de niveles de citocinas y estudios de deficiencia de citocinas (89). Además de los anticuerpos neutralizantes de citocinas y los receptores solubles de citocinas, los compuestos antiinflamatorios también muestran los efectos de retrasar o prevenir el inicio de la diabetes de tipo 1 en modelos animales.

40 La patogenia de la diabetes, desde la insulinitis a la destrucción completa de las células beta, es un proceso relativamente crónico. El meisoíndigo, NATURA y otros derivados como se definen en las reivindicaciones adjuntas inhiben las citocinas proinflamatorias y estimulan las citocinas antiinflamatorias y, por tanto, se pueden usar como agentes para prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad, así como para tratarla.

En resumen, la alteración de la regulación de las citocinas está implicada en diversas enfermedades, incluyendo enfermedades de tipo inflamatorio y las que normalmente no se consideran enfermedades de tipo inflamatorio. Una molécula que es capaz de modular las citocinas pro y antiinflamatorias debería proporcionar beneficios terapéuticos con efectos secundarios mínimos para todos los tipos de enfermedades relacionadas con la alteración de la función de estos componentes de la inflamación. Como se demuestra en la presente invención, la naturaleza del meisoíndigo, una molécula pequeña representativa de los derivados, como se definen en las reivindicaciones adjuntas, de isoíndigo, índigo e indirubina, sobre la regulación de la expresión/secreción de múltiples citocinas pro/antiinflamatorias permite usar con eficacia los compuestos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas para tratar trastornos de tipo inflamatorio asociados con la expresión de citocinas proinflamatorias como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: El meisoíndigo reduce la secreción de IL- β en células THP-1 de la línea celular monocítica humana

Materiales y procedimientos

Materiales: El meisoíndigo y NATURA fueron sintetizados por Natrogen Therapeutics, Inc, se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) con una pureza del 98,5% y sus estructuras confirmadas mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN).

El meisoíndigo es un cristal rojizo oscuro con un peso molecular de 376. Se preparó en una solución de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y se almacenó a -20°C para los experimentos *in vitro*. La línea celular de monocitos humanos THP-1 (90= se adquirió de la ATCC. Las células se mantuvieron de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se cultivaron aproximadamente 1×10^5 células/ml a 37°C , 5% de CO_2 durante 24 horas en medio RPMI-1640 modificado (Invitrogen) suplementado con 10% de FBS.

Procedimientos: Las células se estimularon con o sin lipopolisacárido $1 \mu\text{M}$ (LPS, Sigma) y se expusieron durante 24 horas a diferentes concentraciones de meisoíndigo (de 31,25 nM a 16.000 nM). La viabilidad de las células se examinó al microscopio tras tinción con azul de tripano. Los niveles proteicos de IL-1 β secretada en los medios de cultivo por las células se midieron después mediante ELISA y se calcularon a partir de su curva estándar usando un kit de ensayo de R&D Systems de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor. El procedimiento se estableció y se validó mediante una buena curva estándar obtenida. En la Fig. 2, panel A, se muestra un ejemplo de la curva estándar.

Análisis estadístico: Todos los datos se expresaron como la media \pm SD. La significación estadística de cualquier diferencia entre los grupos control (LPS) y experimental se determinó mediante la prueba t de Student. Los valores p entre los 2 grupos deben ser al menos inferiores a 0,05 para que se consideren estadísticamente significativos.

Resultados y discusión

La IL-1 β es una citocina proinflamatoria pleiotrópica implicada en el proceso patológico de varias enfermedades de tipo inflamatorio. Para aclarar la actividad del meisoíndigo, una molécula pequeña representativa de los derivados de índigo, isoíndigo e indirubina, contra la inflamación, los inventores analizaron la actividad del meisoíndigo sobre la secreción de IL-1 β en células THP-1 monocíticas humanas. Como se muestra en la Fig. 2, panel B, se encontró que el nivel basal de IL-1 β en las células THP-1 monocíticas humanas era indetectable. Anteriormente se ha demostrado que los incrementos en los niveles de la proteína IL-1 β y del ARNm en respuesta al lipopolisacárido (LPS) son principalmente el resultado de un incremento de la transcripción del gen (91, 92). En la presente invención, los inventores también observaron que tras la estimulación de LPS, las células THP-1 secretaban una gran cantidad de IL-1 β en el medio ($92,38 \pm 3,667 \text{ pg/ml}$, Fig. 2, panel B). Es interesante el hecho de que la secreción estimulada de IL- β se inhibía significativamente mediante exposición simultánea de las células a meisoíndigo. Lo más importante, los inventores encontraron que el meisoíndigo era un potente, aunque también moderado, inhibidor de IL-1 β .

Esta característica será una ventaja para los pacientes por la elevada eficacia con menos efectos secundarios cuando se usa para el tratamiento de trastornos inflamatorios. Potente porque una reducción superior al 50% de la secreción de IL-1 β mediada por LPS se consiguió repetidamente cuando las células se expusieron a meisoíndigo a concentraciones tan bajas como de 31,25 nM; moderado porque el incremento de la concentración de meisoíndigo hasta $8 \mu\text{M}$ no tuvo como resultado una reducción adicional de la secreción, lo que es indicativo de que la actividad alcanzada era máxima. Esto es diferente del efecto del meisoíndigo o NATURA sobre la inhibición de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) en el que se necesita una concentración mucho más alta para la inhibición del 50% de la actividad de CDK (aproximadamente $1,6 \mu\text{M}$) en células de cáncer de próstata LNCaP como se demuestra en la patente previa de los inventores.

El último punto es significativo, ya que el documento anterior EP 1 079 826 solo expuso la inhibición de CDK, en lugar de citocinas. Como resultado, en la presente invención se usan concentraciones mucho menores de medicamentos en comparación con la técnica anterior. Adicionalmente, derivados concretos también pueden ser más adecuados para la inhibición de citocinas en comparación con la inhibición de CDK.

Ejemplo 2: El meisoíndigo inhibe la secreción y la expresión de IL-6 en células THP-1 de la línea celular monocítica humanaMateriales y procedimientos

5 Materiales: Se usó el derivado representativo de meisoíndigo. La línea celular y el procedimiento de ELISA fueron los mismos que se describen en el Ejemplo 1. La proteína IL-6 estándar se usó para establecer una curva estándar para el cálculo de IL-6 en el medio secretado por las células (células estimuladas con LPS o no estimuladas en presencia o ausencia de meisoíndigo). En la Fig. 3, panel A, se muestra una curva estándar típica. El análisis estadístico también siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

Procedimientos:

10 PCR en tiempo real: El efecto del meisoíndigo sobre la transcripción de la IL-6 (niveles de ARN) se determinó mediante una técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real). El ARN total se extrajo usando un kit mini Qiagen Rneasy y el gen HPRT se usó como control interno.

15 Las células THP-1 monocíticas humanas en fase de crecimiento exponencial se expusieron a 1 µg/ml de LPS, meisoíndigo 1 µM o 1 µg/ml de LPS más meisoíndigo 1 µM durante 24 horas. Después se recogieron las células, se lavaron y se extrajo el ARN total para el ensayo de PCR en tiempo real. El ARN total (300 ng) se trató con DNasa I (Promega, Madison, WI) y se usaron SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) y oligo(dT) para la transcripción inversa de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un volumen de 25-µl que contenía ADNc diluido, mezcla maestra para PCR Sybr Green (Applied Biosystems) y una concentración 2,5 µM de cada cebador específico del gen de la IL-6: I: 5'- TCAATTCGTTCTGAAGAGG (SEC ID N° 20 1) y D: 5'- CCCCAGGAGAAGATTCC (SEC ID N° 2). Se usó un analizador ABI SDS7700 (Applied Biosystems) a 50°C durante 2 minutos y a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los resultados de ADNc del ensayo se normalizaron a un control interno de HPRT medido en la misma placa. Después de los ciclos, la especificidad de la amplificación se validó mediante la generación de una curva de fusión mediante desnaturalización lenta de los productos de PCR y después mediante electroforesis en gel.

25 Resultados y discusión

La IL-6 es otra citocina proinflamatoria implicada en la inflamación. Por tanto, se investigó el efecto del meisoíndigo sobre la secreción/expresión. De un modo similar a IL-1β, el nivel basal de IL-6 fue indetectable en las células THP-1 monocíticas humanas. Tras la estimulación con 1 µg/ml de LPS, las células secretaron moderadamente IL-6 al medio (33,64 ± 3,29 pg/ml). Se encontró que el meisoíndigo inhibía fuertemente la secreción de IL-6 en las células THP-1 estimuladas con LPS. Aproximadamente El 85% de la reducción de la secreción se observó cuando las células estimuladas se expusieron a meisoíndigo a la concentración más baja de 31,25 nM del experimento (P < 0,001) (Fig. 3, panel B).

35 Para explorar si la reducción de la secreción de IL-6 mediada por meisoíndigo se debía a su inhibición sobre la expresión de IL-6 estimulada por LPS, se aplicó una PCR en tiempo real para medir el efecto del meisoíndigo sobre la transcripción de ARNm de IL-6. Como se muestra en la Fig. 3, panel C, se observó una inducción significativa de la transcripción de la IL-6 cuando las células THP-1 se expusieron a 1 µg/ml de LPS, que es consistente con los informes anteriores (93). Es interesante el hecho de que la transcripción de la IL-6 inducida por LPS pudo suprimirse completamente exponiendo las células THP-1 estimuladas por LPS a una concentración 1 µM de meisoíndigo (P < 0,001). Por tanto, este hallazgo indica que la inhibición del meisoíndigo sobre la secreción estimulada por LPS de IL-6 probablemente sea el resultado de la supresión del agente sobre la producción de IL-6 mediada por LPS en células THP-1.

45 La estimulación de LPS sobre los monocitos humanos activa las rutas de señalización de la transcripción de la IL-6. El LPS se puede unir a una proteína denominada proteína de unión a LPS (LBP). Se ha demostrado que tras su transferencia mediante la LBP al receptor de CD14, el LPS interactuó con el receptor de la señalización TLR4 y la proteína auxiliar MD-2. Esta interacción tuvo como resultado la activación de NF-κB y 3 MAP quinasas, de modo que se incrementa la transcripción de IL-6 (94, 95). Si la supresión del meisoíndigo sobre la transcripción de IL-6 mediada por LPS se debe a la interrupción de las vías de transducción de señal o no se tiene que investigar posteriormente.

Ejemplo 3: El meisoíndigo suprime la secreción de TNF-α en células THP-1 monocíticas humanas50 Materiales y procedimientos

Se usó el derivado representativo de meisoíndigo. La línea celular y el procedimiento de ELISA para medir la secreción de TNF-α fueron los mismos que se describen en el Ejemplo 1, a excepción de que se usó la proteína de TNF-α estándar para establecer una curva estándar para el cálculo de la proteína secretada en el medio por las células (células estimuladas con LPS o no estimuladas en presencia o ausencia de meisoíndigo). En la Fig. 4, panel A, se muestra una curva estándar típica.

5 El efecto del meisoíndigo sobre la transcripción de TNF- α (niveles de ARN) se determinó mediante una técnica de PCR en tiempo real usando los mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 2, a excepción de que los cebadores específicos del TNF- α se usaron del siguiente modo: 5'-TGCCAG-ACTCGGCAAAG (SEC ID N° 3) y 5'GGAGAAGGGTGACCGACT (SEC ID N° 4). El ARN total se extrajo usando un kit mini Qiagen Rneasy y el gen HPRT se usó como control interno.

Células THP-1 monocíticas humanas en crecimiento exponencial se expusieron a 0,1 μ g/ml de LPS, meisoíndigo 4 μ M o 1 μ g/ml de LPS más meisoíndigo 4 μ M durante 24 horas. Después se recogieron las células, se lavaron y se extrajo el ARN total para el ensayo de PCR en tiempo real, como se escribe en el Ejemplo 2.

Resultados y discusión

10 El TNF- α es una citocina proinflamatoria crucial investigada extensamente durante la última década debido a sus importantes funciones biológicas contra el cáncer y a su papel patológico en los trastornos inflamatorios. Se han comercializado varios inhibidores del TNF- α para el tratamiento de varias enfermedades de tipo inflamatorio. Como potencial agente antiinflamatorio, los inventores exploraron un papel del meisoíndigo en la regulación del TNF- α en la presente invención.

15 Como sistema de modelo establecido, la estimulación de las células THP-1 con LPS tuvo como resultado una enorme secreción de TNF- α (Fig. 4, panel B). No obstante, el meisoíndigo inhibió con eficacia la secreción de TNF- α en las células THP-1 estimuladas con LPS de un modo dependiente de la concentración (Fig. 4, panel B). Aproximadamente una reducción del 50% de la secreción se alcanzó cuando las células estimuladas se expusieron a meisoíndigo 2,0 μ M durante 24 horas ($P < 0,001$, en comparación con LPS más meisoíndigo con LPS solo) a la cual no se observaron células apoptóticas usando tinción con azul de tripano. El incremento de la concentración de meisoíndigo hasta 8 μ M no produjo más reducción de la secreción de TNF- α aunque no se observaron células muertas. No obstante, se obtuvo una inhibición completa cuando las células estimuladas se trataron con meisoíndigo 16 μ M, concentración a la cual solo apareció aproximadamente un 20% de células apoptóticas.

25 Los ensayos de PCR en tiempo real no mostraron efectos del meisoíndigo (4 μ M) sobre los niveles de ARNm de TNF- α (Fig. 4, panel C), lo que indica que la reducción de la producción de TNF- α en células THP-1 estimuladas con LPS mediante meisoíndigo se produce a nivel posttranscripcional. Está bien establecido que los elementos ricos en AU (ARE) en la 3' UTR del ARNm del TNF- α están implicados en la estabilidad del ARNm y la eficiencia de la traducción (96). El ARE de TNF- α es una diana del factor estabilizante del ARNm HuR (97). La maduración del ARNm de TNF- α se ve afectada por un elemento cis (2-APRE) en la 3'UTR, que hace el corte y empalme de los transcritos precursores de TNF- α dependientes de la activación de la proteína quinasa activada por ARN (PKR) (98).

30 Aunque los mecanismos por los cuales el meisoíndigo inhibe la secreción de TNF- α en células THP-1 estimuladas por LPS tienen que establecerse, el meisoíndigo es una nueva molécula pequeña que inhibe el TNF- α sin citotoxicidades, lo que lo convertiría en un medicamento ideal para el tratamiento de enfermedades de tipo inflamatorio, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 **Ejemplo 4: El meisoíndigo estimula la secreción de IL-10 en células THP-1 monocíticas humanas**

Materiales y procedimientos

40 El meisoíndigo y la línea celular THP-1 usada en este ejemplo fueron las mismas que se describen en el Ejemplo 1. Los procedimientos de ELISA para medir la secreción de IL-10 también siguieron los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, a excepción de que se usó la proteína IL-10 estándar para establecer la curva estándar (Fig. 5, panel A) para el cálculo de la proteína secretada en el medio por las células (células estimuladas con LPS o no estimuladas en presencia o ausencia de meisoíndigo).

Resultados y discusión

45 El funcionamiento del sistema inmunológico está finamente ajustado por las actividades de los mediadores o citocinas proinflamatorias y reguladores y las enfermedades de tipo inflamatorio se han considerado un resultado del desequilibrio entre estos tipos de moléculas (41, 46). Para entender si los efectos antiinflamatorios de las moléculas pequeñas reivindicadas en la presente invención son capaces de inducir citocinas reguladoras se investigó el efecto del meisoíndigo en la secreción de IL-10. Como se muestra en la Fig. 5, panel B, se observó una moderada aunque significativa estimulación de la secreción de IL-10 en las células THP-1. Se consiguió un incremento de aproximadamente el 60% en la secreción de IL-10 cuando las células THP-1 se trataron con meisoíndigo 0,0625 μ M ($P < 0,05$). Por el contrario, como estimulante de la inflamación, el LPS disminuyó ligeramente la secreción de citocinas.

Ejemplo 5: El meisoíndigo y sus derivados a concentraciones bajas seleccionan citocinas en lugar de CDK como dianas moleculares primarias

Materiales y procedimientos

Materiales: El meisoíndigo y NATURA se sintetizaron en Natrogen Therapeutics, Inc, como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

La línea celular de monocitos humanos THP-1 (90= se adquirió de la ATCC. Las células se mantuvieron de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se cultivaron aproximadamente 1×10^5 células/ml a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 horas en medio RPMI-1640 modificado (Invitrogen) suplementado con 10% de FBS.

Procedimientos:

1) Efectos de meisoíndigo y NATURA sobre la expresión/secreción de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10: se estimularon células THP-1 monocíticas humanas con crecimiento exponencial con o sin lipopolisacárido 1 μ M (LPS, Sigma) y se expusieron durante 24 horas a diferentes concentraciones de meisoíndigo y NATURA (de 31,25 nM a 62,5 nM), respectivamente. La viabilidad de las células se analizó con ensayo de excepción con azul de tripano. Los niveles proteicos de IL-1 β secretada en los medios de cultivo por las células se midieron después mediante ELISA y se calcularon a partir de su curva estándar usando un kit de ensayo de R&D Systems de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor, como se describe en los ejemplos 1 a 4.

2) Efectos de meisoíndigo y/o NATURA sobre la actividad de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) en células THP-1 (99): se expusieron células THP-1 de crecimiento exponencial a meisoíndigo o NATURA 31,25, 62,5 y 1500 nM durante 24 horas, respectivamente. Se recogieron las células, se lavaron y se extrajeron las proteínas totales como se ha descrito anteriormente (100). Cien μ g de las proteínas se inmunoprecipitaron usando anticuerpos contra cdk2, cdk4/6 o ciclina D1 durante la noche a 4°C en presencia de un cóctel de inhibidores de la proteasa. Los inmunoprecipitados se lavaron 4 veces con tampón de extracción de proteínas y una vez con tampón de ensayo de la quinasas y se hicieron reaccionar con 75 μ g/ml de histona H1 en presencia de [γ -³²P]-ATP (10 μ Ci/10 μ M). La histona H1 fosforilada (representa actividad cdk) se midió mediante recuento por centelleo o mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (101, 102).

3) Análisis estadístico: Todos los datos se expresaron como la media \pm SD. La significación estadística de cualquier diferencia entre los grupos control (LPS) y experimental se determinó mediante la prueba t de Student. Los valores p entre los 2 grupos deben ser como mínimo inferiores a 0,05 para que se consideren estadísticamente significativos.

Resultados y discusión

Dado que se ha demostrado que la indirrubicina y sus derivados inhibían las quinasas dependientes de ciclina, podría, por tanto, ser un tratamiento eficaz de las enfermedades asociadas con la pérdida de control de la proliferación mediante la inhibición de CK. Para examinar qué moléculas celulares son las dianas primarias relacionadas con las propiedades antiinflamatorias de esta clase de compuestos, los inventores compararon cómo el meisoíndigo y NATURA modulaban las actividades de las CDK y las citocinas en las mismas condiciones de concentración baja experimentales.

Como se muestra en la Fig. 6, similar a la observación mostrada en los Ejemplos 1, 2 y 4, los incrementos estimulados por LPS de la producción de IL-1 β e IL-6 se inhibieron significativamente mediante la exposición de las células a meisoíndigo y NATURA a concentraciones tan bajas como de 31,25 nM, mientras que la supresión mediada por LPS de IL-10 en las células THP-1 se multiplicó casi por 2 veces mediante meisoíndigo y NATURA [[n]] a concentraciones similares (Fig. 6A).

Por el contrario, con las mismas exposiciones, tanto meisoíndigo como NATURA no pudieron inhibir las actividades de las quinasas 2, 4 y 6 dependientes de ciclina, así como los niveles de la ciclina D1 (datos no mostrados). Una inhibición parcial (23%) de dichos compuestos solo se consiguió cuando las células se trataron con una concentración 1,5 μ M (48 veces mayor) de meisoíndigo o NATURA (Fig. 6B).

Además, el efecto de NATURA sobre la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β) también se investigó en la presente invención, ya que los inhibidores de CDK normalmente también son inhibidores de GSK-3[beta]. No obstante, no se observó actividad cuando las células se expusieron a NATURA a una concentración tan alta como de 50 mM (datos no mostrados)

Por tanto, los datos en este ejemplo muestran claramente que el meisoíndigo y una clase relacionada de moléculas es capaz de modular significativamente varias citocinas (inhiben las citocinas proinflamatorias y estimulan las citocinas antiinflamatorias) a una concentración considerablemente baja, donde no se consiguen efectos inhibidores de la actividad CDK. Esto demuestra que a concentraciones bajas comparadas con las necesarias para la inhibición de CDK, el meisoíndigo y sus derivados están dirigidos, principalmente, a citocinas en lugar de a quinasas dependientes de ciclina. Esta conclusión está respaldada por la reciente observación de que la indirrubina y sus derivados no son inhibidores de la CDK verdaderamente biológicos, ya que la inhibición de CDK por dichos compuestos se produce a través de agregación física en lugar de mediante reacción biológica. Además, la conclusión de los inventores también está respaldada por las observaciones clínicas de que se necesita una dosis total de **8696 mg** de meisoíndigo para alcanzar la remisión máxima de la leucemia mieloide crónica (LMC) (104), mientras que solo se necesitan **525 mg** del fármaco para obtener una cura completa de la enfermedad intestinal

inflamatoria.

Resumen

Las células THP-1 secretaron IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α , pero no IL-2, IL-4, IL-10 e IL-12 tras 24 horas de estimulación de LPS, mientras que los niveles basales de estas citocinas eran indetectables mediante ELISA, lo que es coherente con los informes anteriores (93, 105). Para evaluar las potenciales aplicaciones clínicas de una clase de moléculas pequeñas de derivado de isoíndigo, índigo e indirubina (Estructuras mostradas como las fórmulas I y II) en el tratamiento de varias enfermedades de tipo inflamatorio, los inventores examinaron los efectos reguladores del meisoíndigo, como ejemplos sobre la secreción y expresión de las citocinas pro y antiinflamatorias en un modelo de células THP-1 monocíticas humanas. Los datos están resumidos en la tabla 2. El meisoíndigo inhibió significativamente las secreciones de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en células THP-1 estimuladas por LPS y estimularon la secreción de la citocina IL-10 reguladora pero no se observaron efectos sobre la IL-2 simplemente porque no se pudo estimular a las células para secretar estas citocinas proinflamatorias. Las reducciones o estimulaciones máximas de las secreciones de estas citocinas están resumidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Modulación del meisoíndigo sobre la secreción de citocinas proinflamatorias y reguladoras en células THP-1 estimuladas con LPS

Tratamiento	Porcentaje de respuesta máxima sin citotoxicidad			
	TNF- α (inhibición)	IL-1 β (Inhibición)	IL-6 (inhibición)	IL-10 (estimulación)
LPS	100,00 \pm 4,85	100,00 \pm 3,43	100,00 \pm 9,78	-18,27 \pm 10,15
LPS/Meisoíndigo	49,20 \pm 3,37	48,76 \pm 3,68	83,51 \pm 5,41	201,97 \pm 11,2

La reducción de la secreción de IL-6 mediante meisoíndigo en células THP-1 estimuladas con LPS puede ser un resultado de la regulación por disminución de la transcripción del gen de citocinas usando una técnica de PCR en tiempo real. El ensayo de PCR en tiempo real también mostró una inhibición moderada de meisoíndigo sobre IL-15 en células THP-1 estimuladas con LPS (datos no mostrados). No se observó dicha regulación por disminución para el gen del TNF- α usando la misma tecnología. Aunque los mecanismos por los cuales el meisoíndigo y las moléculas de esta clase regulan las citocinas pro y antiinflamatorias tienen que investigarse adicionalmente, los datos de los inventores en la presente invención demuestran que esta clase de moléculas pequeñas es capaz de modular citocinas importantes relacionadas con varias enfermedades de tipo inflamatorio.

Durante los últimos años, se han creado estrategias dirigidas a las citocinas proinflamatorias con diversos agentes basados en proteínas para el tratamiento de varios trastornos inflamatorios, incluyendo los inhibidores del TNF- α etanercept (ENBREL $\text{\textcircled{R}}$), infliximan (REMICADE $\text{\textcircled{R}}$; Centocor), adalimumab (HUMIRA $\text{\textcircled{R}}$; Abbott) y el antagonista del receptor de la IL-1 KINERET $\text{\textcircled{R}}$. Las primeras etapas de aplicación clínica de estos agentes indicaron que estos revolucionarios agentes terapéuticos han supuesto un avance en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como EII, AR y psoriasis. No obstante, las actuales terapias a base de proteínas inyectables tienen riesgos asociados, incluida la posibilidad de incremento de las neoplasias malignas, infecciones e incremento de la insuficiencia congestiva cardíaca (42). Además, estas estrategias también tienen limitaciones y se ven dificultadas por la sofisticada red de citocinas. Aunque se ha demostrado que varios tipos de moléculas pequeñas son un inhibidor específico de citocinas proinflamatorias, tales como inhibidores de TNF- α y NF- κ B y tienen varias ventajas sobre los agentes basados en proteína, dirigido a una única citocina proinflamatoria pueden no ser bastante fuertes para interrumpir las vías patológicas inflamatorias, lo que limita su eficacia clínica.

Por el contrario, además de todas las ventajas de las moléculas pequeñas en aplicaciones clínicas, como el hecho de que son fáciles de fabricar y cómodas de administrar, lo más importante es que las moléculas reivindicadas en la invención no solo suprimen de forma concurrente varias citocinas proinflamatorias, es decir IL-1 β , IL-6, and TNF- α , sino que también estimulan la citocina antiinflamatoria IL-10. Además, en la patente anterior de los inventores se ha demostrado que estas moléculas inducen diferenciación celular e inhiben la proliferación celular a concentraciones más altas. Por tanto, proporcionan una actividad clínica mayor. Esta conclusión se ve respaldada por los excelentes resultados de eficacia conseguidos usando meisoíndigo para el tratamiento de un paciente con EII sin efectos secundarios. Esta demostración se proporciona en el Ejemplo 7 de la presente invención.

Ejemplo 6: El meisoíndigo potencia la diferenciación de células epidérmicas e inhibe la hiperplasia y la hiperqueratosis en roedores

Materiales y procedimientos

Materiales: El meisoíndigo se sintetizó, purificó y su estructura se caracterizó en Natrogen Therapeutics, Inc. La pureza del compuesto fue del 98,5 %, como se describe en los ejemplos anteriores. Una suspensión de meisoíndigo se preparó recientemente en metilcelulosa sódica al 0,5% y se administró por vía oral para las pruebas de animales

descritas más adelante. Otras sustancias químicas usadas en los siguientes experimentos se adquirieron en Sigma.

5 Ratones Kunning hembra sin patógenos de 12 semanas de edad con pesos corporales de 22 a 25 gramos se estabularon a razón de 5 por jaula y se les administró a voluntad agua corriente fresca y pienso para roedores comercial. Las estancias para animales se controlaron a $24 \pm 2^\circ \text{C}$ con una humedad relativa de $60 \pm 5 \%$ y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (07:00-19:00 h).

Procedimientos:

10 Efecto del meisoíndigo sobre la diferenciación de células epidérmicas en colas de ratón: Sesenta ratones Kunming hembra se dividieron aleatoriamente en 5 grupos, 20 en el grupo control y 10 en 4 grupos analizados con fármaco. El meisoíndigo se preparó recientemente como una suspensión en metilcelulosa sódica al 0,5%. El fármaco se administró por vía oral a dosis de 50, 100, and 200 mg/kg, respectivamente, una vez al día durante 13 días. Se usó metotrexato (MTX) como control positivo a una dosis de 1 mg/kg, i.p. una vez cada 2 días, durante el mismo periodo de tiempo. Como control negativo se usaron el mismo volumen y vehículo para la suspensión de meisoíndigo. Veinticuatro horas después de la última administración, se sacrificó a los animales y sus colas se cortaron a 1,5 cm de la base. Se prepararon portaobjetos para su análisis histológico como describieron originalmente Bosman y col., (106). Los portaobjetos se prepararon cortando las colas en secciones longitudinales y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E). Después, los portaobjetos se analizaron con un microscopio óptico para evaluar el grado de ortoqueratosis (OQ) e hiperplasia epidérmica. Lo último se realizó midiendo la longitud horizontal de la capa granular completamente desarrollada, el estrato granuloso, dentro de una escala individual en relación con su longitud total. La actividad del fármaco se definió mediante el incremento de las células escamosas positivas que contiene el estrato granuloso de la capa granular entre dos folículos pilosos.

15 Efectos antimitóticos del meisoíndigo sobre el epitelio vaginal de ratón: Sesenta ratones Kunming hembra se dividieron aleatoriamente en 5 grupos, 20 en el grupo control y 10 en 4 grupos analizados con fármaco. Todos los ratones recibieron estrógenos a una dosis de 0,2 mg/animal durante 3 días para permitir que las células epiteliales vaginales se desarrollaran bajo la estimulación de la hormona estrógeno. El meisoíndigo se preparó recientemente como una suspensión en de metilcelulosa sódica al 0, %. El fármaco se administró por vía oral a dosis de 50, 100, and 200 mg/kg, respectivamente, una vez al día durante 3 días. Se usó metotrexato (MTX) como control positivo a una dosis de 1 mg/kg, i.p. una vez al día, durante el mismo periodo de tiempo. Como control negativo se usaron el mismo volumen y vehículo para la suspensión de meisoíndigo. Una hora después de la última administración se administró a los animales colchicina i.p., 2 mg/kg, para detener las células en la fase M. Cinco horas después, se sacrificó a los animales y los tejidos vaginales se fijaron en formalina al 10%, se incluyeron en parafina y se prepararon los portaobjetos. Los portaobjetos se tiñeron con H y E y al menos 500 células del fondo se examinaron al microscopio. Se calculó el índice mitótico (porcentaje de células mitóticas).

Resultados y discusión

35 En este ejemplo se usó el modelo de cola de ratón habitual para medir cuantitativamente si los compuestos reivindicados en la presente invención pueden potenciar la diferenciación de células epidérmicas, disminuyendo de este modo la hiperplasia y la hiperqueratosis. Este modelo fue descrito originalmente por Jarrett A (107) y fue modificado por Bosman y col. (106), y en la actualidad está siendo usado por otros (108-110).

40 El efecto del meisoíndigo sobre la formación de una capa granular en las células epiteliales escamosas de la cola del ratón se muestra en la Tabla 3. Se observó un incremento significativo de la formación de la capa granular en el epitelio de la cola de ratón cuando los ratones recibieron meisoíndigo durante 13 días de un modo dependiente de la dosis. El efecto terapéutico a las 3 dosis fue mejor que el del control positivo, en el que se administró a los ratones el fármaco clínico disponible MTX para el tratamiento de la psoriasis.

Tabla 3. Efecto del meisoíndigo sobre la formación de la capa granular en las células epiteliales escamosas de colas de ratones

Grupos	Dosis (mg/kg)	Nº de animal	Escamas granulosas (X ± SD)	Valor p
Control	N/A	20	14,81 ± 4,61	
MTX	1,0	10	17,22 ± 4,92	< 0,05
Meisoíndigo	50,0	10	22,37 ± 6,20	< 0,01
Meisoíndigo	100,0	10	25,98 ± 4,12	< 0,001
Meisoíndigo	200,0	10	31,30 ± 7,92	< 0,001

45 El MTX es un agente quimioterapéutico inmunosupresor que inhibe significativamente la mitosis celular. Para

- 5 analizar si el meisoíndigo potencia la diferenciación de las células epidérmicas, disminuyendo de este modo la hiperplasia y la hiperqueratosis mediante el mecanismo similar al del MTX, se investigó el efecto del meisoíndigo sobre el índice mitótico (IM) del epitelio vaginal de ratón. Como se muestra en la Tabla 4, el tratamiento de los ratones con MTX durante 3 días tuvo como resultado una disminución significativa del IM en comparación con el control sin tratar ($14,76 \pm 4,29$ de los grupos tratados con MTX frente a $20,04 \pm 3,71$ del control, $P < 0,001$). Por el contrario, como se muestra en la Tabla 4, no se produjeron efectos significativos del meisoíndigo sobre el IM a dosis menores (50 y 100 mg/kg, $P > 0,05$) en las mismas condiciones experimentales. Solo se observó una ligera disminución del IM ($16,06 \pm 2,66$ de los grupos tratados frente a $20,04 \pm 3,71$ del control, $P < 0,05$) a una dosis mayor (200 mg/kg).
- 10 Nuestros datos mostraron que el meisoíndigo estimulaba significativamente la formación de la capa granular en el epitelio de la cola de ratón mientras que no se observó ningún efecto sobre el IM, lo que sugiere que el meisoíndigo inducía diferenciación de las células epiteliales y estimulaba a las células epiteliales escamosas diferenciadas incompletamente a que madurasen. Esta observación *in vivo* confirma además el informe anterior de los inventores en el que se indicaba que el meisoíndigo podría inducir diferenciación de células ML-1 *in vitro* (111).
- 15 Tabla 4. Efecto del meisoíndigo sobre el índice mitótico en epitelio vaginal estimulado con estrógenos de ratones hembra

Grupos	Dosis (mg/kg)	Nº de animal	Índice mitótico (X ± SD)	Valor p
Control	N/A	20	$20,04 \pm 3,71$	
MTX	1,0	10	$14,76 \pm 4,29$	$< 0,001$
Meisoíndigo	50,0	10	$20,01 \pm 4,29$	$> 0,05$
Meisoíndigo	100,0	10	$17,92 \pm 4,75$	$> 0,05$
Meisoíndigo	200,0	10	$16,06 \pm 2,66$	$< 0,05$

- 20 El modelo de cola de ratón usado en este ejemplo es un modelo *in vivo* de uso habitual para evaluar el valor terapéutico de agentes para el tratamiento de la psoriasis. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y no se refiere al tratamiento de la psoriasis, no obstante, las observaciones anteriores de los inventores sugieren que las moléculas pequeñas definidas en el presente documento son capaces de tratar la enfermedad de tipo inflamatorio psoriasis. Los mecanismos de la actividad anti-psoriasis de estas moléculas pequeñas son diferentes del agente inmunosupresor y quimioterapéutico MTC, ya que no se observó un efecto directo del meisoíndigo sobre la mitosis celular. En su lugar, la modulación de la secreción/expresión de varios tipos diferentes de citocinas demostrada en los ejemplos 1-4 en la presente invención más la capacidad de estas moléculas para inducir la diferenciación celular es, probablemente, la base molecular de la acción anti-psoriasis.
- 25

Ejemplo 7: El meisoíndigo suprime la colitis ulcerosa aguda inducida en ratones Balb/c

Materiales y procedimientos

- 30 Materiales: El meisoíndigo se sintetizó, purificó y su estructura se caracterizó en Natrogen Therapeutics, Inc. como se describe en los ejemplos anteriores. Una suspensión de meisoíndigo se preparó recientemente en metilcelulosa sódica al 0,5% y se administró por vía oral para las pruebas de animales descritas más adelante. El DSS (sal de dextrano sulfato sódico, peso molecular: 36.000-44.000) se adquirió en ICN Biomedicals. Otras sustancias químicas usadas en los siguientes experimentos se adquirieron en Sigma.

- 35 Ratones Balb/c hembra sin patógenos de 12 semanas de edad con pesos corporales de 22 a 25 gramos se estabularon a razón de 5 por jaula y se les administró a voluntad agua corriente fresca y pienso para roedores comercial. Las estancias para animales se controlaron a $24 \pm 2^\circ$ C con una humedad relativa de 60 ± 5 % y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (07:00-19:00 h).

- 40 Inducción de colitis ulcerosa aguda. Colitis inducida por DSS en ratones Balb/c: La colitis se indujo con DSS en el agua de bebida (PM 36.000 - 50.000, ICN biochemicals) como se ha descrito anteriormente (112). En resumen, los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos compuestos por 10 ratones cada uno. En el grupo de control negativo (Grupo 1), se administró a los ratones agua corriente fresca a voluntad y pastillas de MF, cambiando por recientes dos veces a la semana, durante 7 días. En el grupo control positivo (grupo tratado con DSS o Grupo 2), se administró 5% de DSS en el agua corriente durante 7 días para inducir colitis y se alimentó a los ratones con pastillas de MF. En el grupo tratado con DSS-Meisoíndigo (grupo de ensayo o grupo 3), se administró a los ratones DSS al 5% en el agua de bebida y se les administró meisoíndigo por vía oral una vez al día a una dosis de 50 mg/kg durante 7 días consecutivos. Se registraron las indicaciones fecales de colitis diariamente, incluyendo el peso corporal y la naturaleza de las heces (sueltas y/o hemorragia o sangre oculta). Después se sacrificó a los ratones.
- 45

Se extrajeron tejidos de colon, se fijaron en formalina al 10 % /PBS y se incluyeron en parafina. Para minimizar los artefactos físicos, el colon extraído se colocó sobre un papel de filtro cualitativo grueso sin estirar. Después, se expuso la parte interior del colon cortándolo longitudinalmente. Los portaobjetos se tiñeron con H y E y 3 técnicos/anatomopatólogos los analizaron histoquímicamente de forma enmascarada.

5 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm SD. La significación estadística de cualquier diferencia entre los grupos control y experimental se determinó mediante la prueba t de Student con un valor p de al menos $< 0,05$.

Resultados y discusión

10 Todos los animales en el grupo control positivo manifestaron de forma gradual heces sueltas, sangre oculta y pérdida de peso después de beber DSS al 5% el día 4. En varios casos graves (7/10), la sangre macroscópica se adhirió al ano además de los síntomas mencionados anteriormente. Aunque los procedimientos para inducir colitis ulcerosa en este experimento eran muy agresivos y los síntomas que se produjeron eran muy agudos (manifestados en el plazo de 4 días), se observó sangre oculta en el grupo tratado con meisoíndigo solo en el 40% (4/10) de los animales. Los otros síntomas, como heces sueltas, también fueron menos graves que los del grupo control. No se observaron síntomas de colitis en los animales del grupo control negativo (ratones normales), Fig. 7, panel A.

15 Los análisis histológicos mostraron que tejidos de todos los animales del grupo control positivo desarrollaron lesiones similares a colitis ulcerosa grave como se pone de manifiesto por una infiltración celular inflamatoria, incluyendo leucocitos polimorfonucleares y múltiples lesiones erosivas (puntuaciones 1-3). También se observaron abscesos en las criptas y epitelio regenerado en la mucosa colónica (Fig. 7, panel B). Para evitar el juicio subjetivo, 3 técnicos/anatomopatólogos individuales contaron de forma cuantitativa y enmascarada los daños ulcerosos del colon en ratones de control positivo y de los grupos tratados con meisoíndigo al microscopio. Se observó una reducción del 55% de las ulceraciones en animales del grupo tratado con meisoíndigo en comparación con el grupo control positivo ($2,89 \pm 1,46$ en el grupo tratado con meisoíndigo frente a $6,38 \pm 2,20$ en el grupo control positivo). La Fig. 7, Panel C, muestra la pared colónica de un ratón tratado con meisoíndigo con colitis ulcerosa aguda inducida por DSS al 5%. La morfología es similar a la mostrada en el control normal (panel A), lo que indica que el meisoíndigo es eficaz contra la colitis ulcerosa aguda inducida por DSS en ratones.

Ejemplo 8: El meisoíndigo detuvo completamente la enfermedad inflamatoria idiopática en un paciente

30 Paciente: Se diagnosticó a una mujer de 43 años de edad en un periodo de más de cuatro años un caso de proctocolitis crónica activa con erosión y características sugestivas de enfermedad intestinal inflamatoria idiopática. El primer diagnóstico se realizó en la North Shore University Hospital Manhasset, Long Island, Nueva York en 1999 mediante colonoscopia. Los principales síntomas incluyeron diarrea, heces sueltas y hemorragia, mientras que su estado de salud global se consideró excelente. Se determinó que el índice de actividad clínica (Tabla 5) (113) estaba entre 7 y 8. Su médico le prescribió espuma de hidrocortisona, que se administró durante 10 días de acuerdo con las instrucciones del médico. No obstante, no se obtuvo un efecto terapéutico con este agente. En febrero de 2000, volvió a su casa en China y varias veces visitó a los médicos chinos y probó varias hierbas medicinales chinas sugeridas, pero no se observó un efecto terapéutico. A principios de 2002, acudió a un hospital médico chino muy conocido y respetado en Beijing, donde se le realizó una sigmoidoscopia flexible. De nuevo se le diagnosticó enfermedad intestinal inflamatoria activa.

Tabla 5. Índice de actividad clínica para la evaluación de pacientes con colitis ulcerosa (113)

Síntoma	Puntuación estándar	Puntuación del paciente	
		Antes del tratamiento	Después del tratamiento
Diarrea (nº de heces diarias)			
0-2	0		
3 o 4	1		
5 o 6	2	2	0
7-9	3		
10 o más	4		
Diarrea nocturna			
No	0	0	0

(continuación)

Síntoma	Puntuación estándar	Puntuación del paciente	
		Antes del tratamiento	Después del tratamiento
Sí	1		
Sangre visible en heces (% de movimientos)			
0	0		
< 50	1		
>50	2	2	0
100	3		
Incontinencia fecal			
No	0		
Sí	1	1	0
Dolor o retortijones abdominales			
Ninguno	0		
Leves	1	1	0
Moderados	2		
Intensos	3		
Bienestar general			
Perfecto	0		
Muy bueno	1		
Bueno	2	2	0
Normal	3		
Malo	4		
Terrible	5		
Dolor en la palpación abdominal			
Ninguno	0		
Leve y localizado	1		
Leve o moderado y difuso	2	0	0
Intenso o de rebote	3		
Necesidad de fármacos antidiarreicos			
No	0	1	0
Sí	1		
Puntuación máxima	21	9	0

En este momento, como los tratamientos previos no habían tenido efectos, su médico le prescribió medicamentos

tradicionales chinos. Se le administraron estos durante varios meses aunque no tuvo como resultado ninguna mejora de sus síntomas. Durante el periodo de febrero de 2000 al verano de 2002, también probó otros diversos medicamentos tradicionales chinos debido a la naturaleza constante y muy molesta de su enfermedad, pero nada tuvo éxito. Después de volver a EE.UU. en 2002, fue al Mount Sinai Medical Center, un centro americano reconocido nacionalmente para el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria. En octubre de 2001, su nuevo médico le realizó de nuevo una colonoscopia junto con un análisis histológico de dos muestras de biopsia (A y B) (Fig. 8, panel A, antes del tratamiento). Los análisis concluyeron que dos localizaciones (A y B) de la inflamación eran "proctocolitis crónica muy activa con erosión y características sugestivas de enfermedad intestinal inflamatoria idiopática". El médico prescribió CANASA® (mesalamina en forma de supositorio), un fármaco recientemente aprobado por la FDA y considerado el mejor fármaco disponible para su afección.

Después de administrar CANASA® durante 7 días, sus síntomas parecían aliviarse; no obstante, al mismo tiempo se produjeron efectos secundarios significativos. Estos incluyeron picor cutáneo, retortijones abdominales, dolor y hemorragia. A continuación solicitó consejo a su médico y se le indicó que usara esta medicación de forma intermitente. No obstante, los efectos secundarios empeoraron realmente cada vez que se usó la medicación. Por tanto, la paciente detuvo toda aplicación de este medicamento.

Se sugirió el meisoíndigo como posible tratamiento en base a los hallazgos de los inventores de que se podían suprimir varias citocinas proinflamatorias y que se podían estimular citocinas antiinflamatorias, tales como citocina IL-10. Dado que se notificaron efectos secundarios muy minoritarios a una dosis de 150 mg al día de este medicamento en China para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica se sugirió el uso de meisoíndigo.

El paciente administró voluntariamente meisoíndigo a una dosis recomendada de 25 mg, una vez al día durante tres semanas de tratamiento programado. Después de las primeras tres dosis, el paciente obtuvo una remisión completa (tres días después del tratamiento) y todos los síntomas inflamatorios desaparecieron. Esto tuvo como resultado una puntuación cero usando el índice de actividad clínica (Tabla 5). Después de nueve semanas de remisión (tres semanas con el medicamento, tres semanas sin el medicamento y tres semanas con el medicamento de nuevo), el paciente de nuevo visitó a su médico y requirió una sigmoidoscopia flexible para determinar si su remisión era subjetiva u objetiva. La sigmoidoscopia flexible se realizó el 4 de noviembre de 2003. Después de revisar los resultados, su médico concluyó que su inflamación se había detenido completamente. Los análisis anatomopatológicos confirmaron esta conclusión e indicaron que las muestras A y B eran ahora "proctocolitis crónica inactiva que hace pensar en enfermedad intestinal inflamatoria idiopática." La Fig. 7 muestra la foto antes (panel A, octubre de 2002) y después del tratamiento (panel B, 4 de noviembre de 2003) del mismo sitio de inflamación en los análisis de colon realizados por el mismo médico.

Ejemplo 9: Efecto terapéutico del meisoíndigo en la colitis ulcerosa crónica en ratones Balb/c

Se ha demostrado que el meisoíndigo es un regulador de múltiples citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α , que se sabe que están implicadas en los procesos patológicos y el mantenimiento de varias enfermedades inflamatorias. Asimismo, se ha demostrado que el meisoíndigo es un agente citostático que inhibe la proliferación de las células en rápido crecimiento y estimula la diferenciación y maduración celular.

Los experimentos previos de los inventores demostraron que el meisoíndigo tiene un efecto de cicatrización en la colitis ulcerosa agresiva aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS) en ratones Balb/c. Estos resultados muestran que el meisoíndigo es un agente eficaz contra varias enfermedades inflamatorias crónicas como se define en las reivindicaciones y la enfermedad intestinal inflamatoria (EII), que no se reivindica.

Para este experimento se usó un modelo de colitis ulcerosa crónica inducida por DSS para comprobar las dianas moleculares *in vivo* y evaluar la actividad del meisoíndigo contra la EII.

Materiales y procedimientos

Materiales: El meisoíndigo se sintetizó, purificó y se caracterizó su estructura en Natrogen Therapeutics, Inc. Se preparó recientemente una suspensión de meisoíndigo en metilcelulosa sódica al 0,5% y se almacenó a 4°C. La suspensión farmacológica se administró por vía oral para los ensayos animales descritos a continuación. El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) se adquirió en Sigma/ el DSS (sal de dextrano sulfato sódico, peso molecular: 36.000-44.000) se adquirió en ICN Biomedicals. Otras sustancias químicas usadas en los siguientes experimentos se adquirieron en Sigma.

Ratones Balb/c sin patógenos de 12 semanas de edad con pesos corporales de 22 a 25 gramos se estabularon a razón de 5 por jaula y se les administró a voluntad agua corriente fresca y pienso para roedores comercial. Las estancias para animales se controlaron a 24 \pm 2° C con una humedad relativa de 60 \pm 5 % y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (07:00-19:00 h).

Procedimientos: Inducción de colitis ulcerosa crónica. Colitis inducida por DSS en ratones Balb/c: La colitis ulcerosa crónica se indujo con DSS en el agua de bebida (PM 36.000 - 44.000, ICN biochemicals) como se ha descrito anteriormente (4). En resumen, 60 ratones se dividieron aleatoriamente en 5 grupos compuestos por 12 ratones cada uno. El grupo 1 se usó como control negativo (sin inducción de la enfermedad) y se administró agua corriente

fresca a voluntad y las pastillas de alimentos se cambiaron por nuevas dos veces a la semana, desde el inicio al final del experimento. Los grupos 2-5 se usaron para inducir crónicamente la colitis ulcerosa y para analizar la actividad del meisoíndigo. Los animales en los grupos 2-5 se alimentaron con normalidad así como el grupo control negativo y también se les administró agua de bebida con 5 % de DSS (PM 36.000 - 44.000) durante 7 días, seguido de agua destilada durante 10 días después. De nuevo se administró a los animales agua de bebida que contenía 5% de DSS durante 7 días, seguido de agua destilada durante otros 10 días. Este procedimiento se repitió durante un total de 3 ciclos.

Después de 3 ciclos se desarrolló colitis ulcerosa crónica y se estabilizó como se ha descrito. El grupo 2 (grupo control positivo) se alimentó con solución salina y el grupo 3 se trató con 5-ASA a 50mg/kg/d mediante sonda como control farmacológico positivo. Los grupos 4 y 5 se trataron con meisoíndigo a dosis de 25 y 75 mg/kg, una vez al día durante 12 días.

Durante el periodo del experimento, un investigador independiente determinó y registró a diario los índices de actividad de la enfermedad (IAE), reflejados mediante los pesos corporales, la consistencia de las heces y la aparición de sangre oculta y sangre rectal visible, de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente [[114, 116]. Dichos parámetros clínicos son medidas funcionales exhaustivas similares a los síntomas clínicos subjetivos observados en la colitis ulcerosa (CU) humana y se correlacionan bien con el grado de cicatrización histológica medida como puntuaciones de las criptas [114-116]. Después se sacrificó a los ratones. Se extrajeron tejidos/órganos del bazo, el colon y otros, se examinó el aspecto y se registraron sus pesos. Para minimizar los artefactos físicos, el colon extraído se colocó sobre un papel de filtro cualitativo grueso sin estirar. Se expuso la parte interior del colon cortándolo longitudinalmente. Todos los tejidos de colon se fijaron en formalina al 10 % /PBS, se incluyeron en parafina y se realizaron secciones para portaobjetos. Los portaobjetos se tiñeron con H y E para su análisis histológico. Los portaobjetos fueron analizados de forma enmascarada por técnicos/anatomopatólogos y se fotografiaron. Las intensidades de la colitis ulcerosa se clasificaron en una escala de 0 – 3 y se expresaron como el índice patológico de acuerdo con el sistema de puntuación estándar. 0, normal; 1, infiltración focal de células inflamatorias, incluyendo leucocitos polimorfonucleares; 2, infiltración de células inflamatorias, atrofia glandular y abscesos en las criptas; 3, ulceración de la mucosa. Los números de daños ulcerosos en los folículos linfoides se contaron en las secciones longitudinales médicas del colon al microscopio óptico.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media ± SD. La significación estadística de cualquier diferencia entre los grupos control y experimental se determinó mediante la prueba t de Student con un valor p de al menos < 0,05.

Resultados y discusión:

Índice de actividad de la enfermedad (IAE): Después de beber DSS al 5% durante 7 días, todos los ratones manifestaron inicialmente diarrea y sangre oculta en sus heces con disminuciones significativas del peso corporal, aunque no se observaron dichos síntomas en animales alimentados con agua destilada. No obstante, estos signos desaparecieron (el IAE alcanzó el nadir en 8 – 9 días) después de administrar a los ratones agua destilada durante los siguientes 10 días. No obstante, en posteriores administraciones de DSS (3 ciclos de administración), estos síntomas clínicos no se recuperaron sino que se deterioraron durante el periodo de consumo de agua destilada de 10 días.

Después del tercer ciclo de alimentación con DSS, se trató a los animales durante 12 días mediante sonda con vehículo, 50 mg/kg/día de 5-ASA, 25 o 75 mg/kg/día de meisoíndigo. Veinticuatro horas después de la última administración, se determinaron las puntuaciones del IAE para los cinco grupos. Como se muestra en la Tabla 6 más adelante, después de cesar la alimentación con DSS durante 12 días, el IAE disminuyó en un 50% en el grupo tratado con vehículo, lo que muy probablemente se debía a autocuración [111]. No obstante, la extensión de la disminución del IAE en los grupos tratados con 5-SA y dos grupos tratados con meisoíndigo se potenció significativamente hasta un 70%, lo que refleja una respuesta terapéutica del tratamiento farmacológico. La eficacia del meisoíndigo con ambas dosis fue igual a la del 5-ASA.

Tabla 6- Índice de actividad de la enfermedad (pérdida de peso, consistencia de las heces y hemorragia/3)

Agente		Tratamiento previo Media ± SD	Tratamiento posterior Media ± SD	Recuperación (%)
Solución salina	Hembras (n = 5)	2,40 ± 0,2	1,07 ± 1,0	
	Machos (n = 6)	2,40 ± 0,2	1,33 ± 1,15	
	Media (n = 11)	2,40 ± 0,2	1,2 ± 1,2	50,6

(continuación)

Agente		Tratamiento previo Media \pm SD	Tratamiento posterior Media \pm SD	Recuperación (%)
ASA 50 mg/kg	Hembras (n = 0)	N/A	N/A	
	Machos (n = 10)	3,27 \pm 0,3	0,86 \pm 1,0	
	Media (n = 10)	3,27 \pm 0,3	0,86 \pm 1,0	73,1 (p = 0,031)
Meisoíndigo 25 mg/kg	Hembras (n = 5)	3,20 \pm 0,2	0,67 \pm 1,15	
	Machos (n = 7)	2,73 \pm 0,35	0,93 \pm 1,0	
	Media (n = 12)	3,00 \pm 0,1	0,80 \pm 1,06	73,3 (p = 0,023)
Meisoíndigo 75 mg/kg	Hembras (n = 6)	3,11 \pm 0,68	0,93 \pm 1,0	
	Machos (n = 6)	3,27 \pm 0,75	0,97 \pm 1,0	
	Media (n = 12)	3,22 \pm 0,71	0,95 \pm 1,0	70,3 (p = 0,033)
Nada	Hembras (n = 6)	0	0	N/A
	Machos (n = 6)	0	0	N/A
	Media (n = 12)	0	0	N/A

Puntuaciones de sangre oculta:

- 5 La tabla 7 a continuación muestra las puntuaciones de sangre oculta en todos los grupos de animales tratados o no tratados. Doce días después de detener la alimentación con DSS, los animales del grupo tratados con vehículo mostraron una ligera recuperación (27,2 %), que fue consistente con la naturaleza crónica de colitis inducida por 3 ciclos consecutivos de alimentación con DSS, como se ha indicado previamente [4]. Por el contrario, se observó una mejora significativa en los grupos tratados con 5-ASA y con meisoíndigo. Los animales en el grupo de dosis baja de meisoíndigo mostraron la mejor respuesta terapéutica (87%) en comparación con 75,7 % en el grupo tratado con la dosis alta. La dosis baja también fue mejor que el control positivo con 5-ASA con una recuperación del 80%. La cicatrización con meisoíndigo de la hemorragia en la EII inducida con DSS en animales también es coherente con una observación previa de que el tratamiento con meisoíndigo produjo una terminación rápida de la hemorragia en un paciente con colitis ulcerosa.

Histología cualitativa:

- 15 Las secciones transversales (medias) de los colon de ratones se prepararon en formalina para su inclusión en parafina. Los portaobjetos se tiñeron con H y E. Dos ratones de cada grupo se usaron para preparar los portaobjetos y para el análisis de la calidad de la preparación de portaobjetos y la tinción.
- 20 La histología de los animales tratados con vehículo mostró pérdida de epitelio superficial, pérdida de glándulas y la presencia de inflamación crónica. Los portaobjetos de los animales de los grupos tratados con meisoíndigo son más similares a los grupos tratados con 5-ASA que mostraron menos erosión, infiltrados inflamatorios menos intensos en comparación con los de los ratones con EII.

Tabla 7- Puntuación de sangre oculta

Agente		Tratamiento previo Media ± SD	Tratamiento posterior Media ± SD	Recuperación (%)
Solución salina	Hembras (n = 5)	2,4 + 0,89	1,2 + 1,09	50
	Machos (n = 6)	2,0 + 0	2,0 + 0	0
	Media (n = 11)	2,2 + 0,6	1,6 + 0,8	27,2
ASA 50 mg/kg	Hembras (n = 0)	N/A	N/A	N/A
	Machos (n = 10)	3,0 + 1,05	0,6 + 0,96	80,0
	Media (n = 10)	3,0 + 1,05	0,6 + 0,96	80,0 (p < 0,01)
Meisoíndigo 25 mg/kg	Hembras (n = 5)	2,8 + 1,09	0,8 + 1,0	71,4
	Machos (n = 7)	3,1 + 1,06	0 + 0	100
	Media (n = 12)	3,0 + 1,04	0,4 + 0,77	86,7 (p < 0,01)
Meisoíndigo 75 mg/kg	Hembras (n = 6)	3,3 + 1,03	0,6 + 1,0	81,8
	Machos (n = 6)	3,6 + 0,81	1,0 + 1,0	72,2
	Media (n = 12)	3,5 + 0,9	0,83 + 1,0	76,3 (p < 0,01)
Nada	Hembras (n = 6)	0	0	N/A
	Machos (n = 6)	0	0	N/A
	Media (n = 12)	0	0	N/A

Referencias

5 1. Bebo, B. F., Jr., Yong, T., Orr, E. L., y Linthicum, D. S. Hypothesis: a possible role for mast cells and their inflammatory mediators in the pathogenesis of autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, 45: 340-348, 1996.

2. Mennicken, F., Maki, R., de Souza, E. B., y Quirion, R. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol Sci*, 20: 73-78, 1999.

10 3. Watanabe, T. y Fan, J. Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis. *Int J Cardiol*, 66 Suppl 1: S45-53; discussion S55, 1998.

4. Sullivan, G. W., Sarembock, I. J., y Linden, J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol*, 67: 591-602, 2000.

15 5. Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., y De Benedictis, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 908: 244-254, 2000.

6. Rogers, J. y Shen, Y. A perspective on inflammation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 924: 132-135, 2000.

20 7. Li, Y. J., Oliveira, S. A., Xu, P., Martin, E. R., Stenger, J. E., Scherzer, C. R., Hauser, M. A., Scott, W. K., Small, G. W., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Koller, W. C., Pahwa, R., Stern, M. B., Hiner, B. C., Jankovic, J., Goetz, C. G., Mastaglia, F., Middleton, L. T., Roses, A. D., Saunders, A. M., Schmechel, D. E., Gullans, S. R., Haines, J. L., Gilbert, J. R., Vance, J. M., y Pericak-Vance, M. A. Glutathione S-Transferase Omega 1 modifies age-at-onset of Alzheimer Disease and Parkinson Disease. *Hum Mol Genet*, 12: 3259-3267, 2003.

8. Maccarrone, M., Bari, M., Battista, N., y Finazzi-Agro, A. Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1: 53-63, 2002.

25 9. Lindsberg, P. J. y Grau, A. J. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke*, 34: 2518-

- 2532, 2003.
10. DeGraba, T. J. The role of inflammation in atherosclerosis. *Adv Neurol*, 92: 29-42, 2003.
11. Ito, H. IL-6 and Crohn's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2: 125-130, 2003.
- 5 12. von der Thusen, J. H., Kuiper, J., van Berkel, T. J., y Biessen, E. A. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev*, 55: 133-166.2003.
13. Schmidt, M. I. y Duncan, B. B. Diabetes: an inflammatory metabolic condition. *Clin Chem Lab Med*, 41: 1120-1130, 2003.
14. Virdis, A. y Schiffrin, E. L. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12: 181-187, 2003.
- 10 15. Tracy, R. P. Inflammation, the metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Int J Clin Pract Suppl* 10-17, 2003.
16. Haugeberg, G., Orstavik, R. E., y Kvien, T. K. Effects of rheumatoid arthritis on bone. *Curr Opin Rheumatol*, 15: 469-475, 2003.
- 15 17. Tanaka, Y., Okada, Y., y Nakamura, T. Inter- and intracellular signaling in secondary osteoporosis. *J Bone Miner Metab*, 21: 61-66, 2003.
18. Williams, J. D. y Griffiths, C. E. Cytokine blocking agents in dermatology. *Clin Exp Dermatol*, 27: 585-590, 2002.
19. Rutgeerts, P. A critical assessment of new therapies in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 17 Suppl: S176-185, 2002.
- 20 20. Rutgeerts, P., Lemmens, L., Van Assche, G., Noman, M., Borghini-Fuhrer, I., y Goedkoop, R. Treatment of active Crohn's disease with oncept (recombinant human soluble p55 tumour necrosis factor receptor): results of a randomized, open-label, pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*, 17: 185-192, 2003.
21. Weinberg, J. M., Saini, R., y Tutrone, W. D. Biologic therapy for psoriasis--the first wave: infliximab, etanercept, efalizumab, and alefacept. *J Drugs Dermatol*, 1: 303-310, 2002.
- 25 22. Cooper, J. C., Morgan, G., Harding, S., Subramanyam, M., Majeau, G. R., Moulder, K., y Alexander, D. R. Alefacept selectively promotes NK cell-mediated deletion of CD45R0 + human T cells. *Eur J Immunol*, 33: 666-675, 2003.
23. Cather, J. C. y Menter, A. Modulating T cell responses for the treatment of psoriasis: a focus on efalizumab. *Expert Opin Biol Ther*, 3: 361-370, 2003.
- 30 24. Brown, S. L., Greene, M. H., Gershon, S. K., Edwards, E. T., y Braun, M. M. Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum*, 46: 3151-3158, 2002.
25. Weisman, M. H. What are the risks of biologic therapy in rheumatoid arthritis? An update on safety. *J Rheumatol Suppl*, 65: 33-38, 2002.
- 35 26. Antoni, C. y Braun, J. Side effects of anti-TNF therapy: current knowledge. *Clin Exp Rheumatol*, 20: S152-157, 2002.
27. Mendonca, C. O. y Burden, A D. Current concepts in psoriasis and its treatment. *Pharmacol Ther*, 99: 133-147, 2003.
- 40 28. Schon, M. P. Animal models of psoriasis - what can we learn from them? *J Invest Dermatol*, 112: 405-410, 1999.
29. Bessis, N., Doucet, C., Cottard, V., Douar, A. M., Firat, H., Jorgensen, C., Mezzina, M., y Boissier, M. C. Gene therapy for rheumatoid arthritis. *J Gene Med*, 4: 581-591.2002.
- 45 30. Hochberg, M. C., Tracy, J. K., Hawkins-Holt, M., y Flores, R H. Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept, and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 62 Suppl 2: ii13-16, 2003.
31. Fassas, A. y Kimiskidis, V. K. Stem cell transplantation for multiple sclerosis: What is the evidence? *Blood Rev*, 17: 233-240, 2003.

32. Furlan, R., Pluchino, S., y Martino, G. Gene therapy-mediated modulation of immune processes in the central nervous system. *Curr Pharm Des*, 9: 2002-2008, 2003.
33. Ghezzi, P. y Mennini, T. Tumor necrosis factor and motoneuronal degeneration: an open problem. *Neuroimmunomodulation*, 9: 178-182, 2001.
- 5 34. Andreakos, E. T., Foxwell, B. M., Brennan, F. M., Maini, R. N., y Feldmann, M. Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 299-313, 2002.
35. Najarian, D. J. y Gottlieb, A. B. Connections between psoriasis and Crohn's disease. *J Am Acad Dermatol*, 48: 805-821; quiz 822-804, 2003.
- 10 36. Noguchi, M., Hiwatashi, N., Liu, Z., y Toyota, T. Secretion imbalance between tumour necrosis factor and its inhibitor in inflammatory bowel disease. *Gut*, 43: 203-209, 1998.
37. Autschbach, F., Braunstein, J., Helmke, B., Zuna, I., Schurmann, G., Niemir, Z. I., Wallich, R., Otto, H. F., y Meuer, S. C. In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol*, 153: 121-130, 1998.
- 15 38. Schreiber, S., Heinig, T., Thiele, H. G., y Raedler, A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 108: 1434-1444, 1995.
39. Baugh, J. A. y Bucala, R. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 4: 635-650.2001.
40. Gabay, C. IL-1 trap. Regeneron/Novartis. *Curr Opin Investig Drugs*, 4: 593-597, 2003.
- 20 41. Palladino, M. A., Bahjat, F. R., Theodorakis, E. A., y Moldawer, L. L. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov*, 2: 736-746, 2003.
42. Girolomoni, G., Pastore, S., Albanesi, C., y Cavani, A. Targeting tumor necrosis factor-alpha as a potential therapy in inflammatory skin diseases. *Curr Opin Investig Drugs*, 3: 1590-1595, 2002.
- 25 43. Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., y Woody, J. N. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet*, 344: 1125-1127, 1994.
44. Moreland, L. W., Baumgartner, S. W., Schiff, M. H., Tindall, E. A., Fleischmann, R. M., Weaver, A. L., Ettlinger, R. E., Cohen, S., Koopman, W. J., Mohler, K., Widmer, M. B., y Blosch, C. M. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med*, 337: 141-147, 1997.
- 30 45. Campion, G. V., Lebsack, M. E., Lookabaugh, J., Gordon, G., y Catalano, M. Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group. *Arthritis Rheum*, 39: 1092-1101, 1996.
46. Feldmann, M. Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol*, 2: 771-773, 2001.
- 35 47. Ji, X. J., Liu, X. M., Li, K., Chen, R. H., y Wang, L. G. Pharmacological studies of meisoindigo: absorption and mechanism of action. *Biomed Environ Sci*, 4: 332-337, 1991.
48. Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A., y Springer, T. A. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*, 137: 245-254, 1986.
- 40 49. Strange, P., Skov, L., y Baadsgaard, O. Interferon gamma-treated keratinocytes activate T cells in the presence of superantigens: involvement of major histocompatibility complex class II molecules. *J Invest Dermatol*, 102: 150-154, 1994.
50. Subramanian, N. y Bray, M. A. Interleukin 1 releases histamine from human basophils and mast cells in vitro. *J Immunol*, 138: 271-275, 1987.
- 45 51. Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B., y Gottlieb, A. B. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 6367-6371, 1989.
52. Schreiber, A. B., Winkler, M. E., y Derynck, R. Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*, 232: 1250-1253, 1986.
53. Detmar, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., Yeo, K. T., Kocher, O., Jackman, R. W., Berse, B., y Dvorak, H. F.

- Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med*, 180: 1141-1146, 1994.
54. Dayer, J. M. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 42 Suppl 2: ii3-10, 2003.
- 5 55. Bresnihan, B., Alvaro-Gracia, J. M., Cobby, M., Doherty, M., Doxnljan, Z., Emery, P., Nuki, G., Pavelka, K., Rau, R., Rozman, B., Watt, I., Williams, B., Aitchison, R., McCabe, D., y Musikic, P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 41: 2196-2204, 1998.
56. Ishihara, K. y Hirano, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 357-368, 2002.
- 10 57. Whalen, J. D., Lechman, E. L., Carlos, C. A., Weiss, K., Kovesdi, I., Glorioso, J. C., Robbins, P. D., y Evans, C. H. Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws. *J Immunol*, 162: 3625-3632, 1999.
58. Lechman, E. R., Jaffurs, D., Ghivizzani, S. C., Gambotto, A., Kovesdi, I., Mi, Z., Evans, C. H., y Robbins, P. D. Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and contralateral control knees. *J Immunol*, 163: 2202-2208, 1999.
- 15 59. Glabinski, A. R., Bielecki, B., y Ransohoff, R. M. Chemokine upregulation follows cytokine expression in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol*, 58: 81-88, 2003.
60. Diab, A., Zhu, J., Xiao, B. G., Mustafa, M., y Link, H. High IL-6 and low IL-10 in the central nervous system are associated with protracted relapsing EAE in DA rats. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56: 641-650, 1997.
- 20 61. Samoilova, E. B., Horton, J. L., Hilliard, B., Liu, T. S., y Chen, Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol*, 161: 6480-6486, 1998.
62. Robertson, J., Beaulieu, J. M., Doroudchi, M. M., Durham, H. D., Julien, J. P., y Mushynski, W. E. Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biol*, 155: 217-226, 2001.
- 25 63. de Jong, B. A., Huizinga, T. W., Bollen, E. L., Uitdehaag, B. M., Bosma, G. P., van Buchem, M. A., Remarque, E. J., Burgmans, A. C., Kalkers, N. F., Polman, C. H., y Westendorp, R G. Production of IL-1beta and IL-1Ra as risk factors for susceptibility and progression of relapse-onset multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 126: 172-179, 2002.
- 30 64. McGeer, E. G. y McGeer, P. L. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27: 741-749, 2003.
65. Dickson, D. W., Lee, S. C., Mattiace, L. A., Yen, S. H., y Brosnan, C. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia*, 7: 75-83, 1993.
- 35 66. Lahiri, D. K., Chen, D., Vivien, D., Ge, Y. W., Greig, N. H., y Rogers, J. T. Role of cytokines in the gene expression of amyloid beta-protein precursor: identification of a 5'-UTR-binding nuclear factor and its implications in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 5: 81-90, 2003.
67. Laliberte, R. E., Perregaux, D. G., Hoth, L. R., Rosner, P. J., Jordan, C. K., Peese, K. M., Egger, J. F., Dombroski, M. A., Geoghegan, K. F., y Gabel, C. A. Glutathione s-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1beta posttranslational processing. *J Biol Chem*, 278: 16567-16578, 2003.
- 40 68. Haboubi, N. Y., Kaftan, S. M., y Schofield, P. F. Radiation colitis is another mimic of chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol*, 45: 272, 1992.
69. Brynskov, J., Tvede, N., Andersen, C. B., y Vilien, M. Increased concentrations of interleukin 1 beta, interleukin-2, and soluble interleukin-2 receptors in endoscopic mucosal biopsy specimens with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 33: 55-58, 1992.
- 45 70. Matsuura, T., West, G. A., Youngman, K. R., Klein, J. S., y Fiocchi, C. Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 104: 448-458, 1993.
71. Beagley, K. W. y Elson, C. O. Cells and cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Gastroenterol Clin North Am*, 21: 347-366, 1992.
- 50 72. MacDermott, R. P. Alterations in the mucosal immune system in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Med*

- Clin North Am, 78: 1207-1231, 1994.
73. Isaacs, K. L., Sartor, R. B., y Haskill, S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology*, 103: 1587-1595, 1992.
- 5 74. Indaram, A. V., Nandi, S., Weissman, S., Lam, S., Bailey, B., Blumstein, M., Greenberg, R., y Bank, S. Elevated basal intestinal mucosal cytokine levels in asymptomatic first-degree relatives of patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 6: 49-52, 2000.
75. Indaram, A. V., Visvalingam, V., Locke, M., y Bank, S. Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 95: 1221-1225, 2000.
- 10 76. Ito, T. y Ikeda, U. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2: 257-265, 2003.
77. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., y Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259: 87-91, 1993.
- 15 78. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., y Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 95: 2409-2415, 1995.
79. Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N., y Spiegelman, B. M. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 4854-4858, 1994.
80. Lang, C. H., Dobrescu, C., y Bagby, G. J. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology*, 130: 43-52, 1992.
- 20 81. Hotamisligil, G. S. y Spiegelman, B. M. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, 43: 1271-1278, 1994.
82. Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., y Hotamisligil, G. S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389: 610-614, 1997.
- 25 83. Ruan, H. y Lodish, H. F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 447-455, 2003.
84. Ruan, H., Pownall, H. J., y Lodish, H. F. Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB. *J Biol Chem*, 278: 28181-28192, 2003.
- 30 85. Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., y Taylor, R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes*, 45: 881-885, 1996.
86. Suri, A. y Katz, J. D. Dissecting the role of CD4 + T cells in autoimmune diabetes through the use of TCR transgenic mice. *Immunol Rev*, 169: 55-65, 1999.
- 35 87. Jun, H. S., Santamaria, P., Lim, H. W., Zhang, M. L., y Yoon, J. W. Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8 + T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice. *Diabetes*, 48: 34-42, 1999.
88. Yoon, J. W., Jun, H. S., y Santamaria, P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*, 27: 109-122, 1998.
- 40 89. Rabinovitch, A. y Suarez-Pinzon, W. L. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*, 4: 291-299, 2003.
90. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., y Tada, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26: 171-176, 1980.
- 45 91. Schumann, R. R., Belka, C., Reuter, D., Lamping, N., Kirschning, C. J., Weber, J. R., y Pfeil, D. Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood*, 91: 577-584, 1998.
92. Yoza, B. K., Hu, J. Y., y McCall, C. E. Protein-tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of interleukin 1beta and NFkappaB activation, but not NFkappaB nuclear translocation. *J Biol Chem*, 271: 18306-18309, 1996.

93. Haversen, L., Ohlsson, B. G., Hahn-Zoric, M., Hanson, L. A., y Mattsby-Baltzer, I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol*, 220: 83-95, 2002.
94. Guha, M., O'Connell, M. A., Pawlinski, R., Hollis, A., McGovern, P., Yan, S. F., Stern, D., y Mackman, N. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*, 98: 1429-1439, 2001.
95. Guha, M. y Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13: 85-94, 2001.
96. Wang, E., Ma, W. J., Aghajanian, C., y Spriggs, D. R. Posttranscriptional regulation of protein expression in human epithelial carcinoma cells by adenine-uridine-rich elements in the 3'-untranslated region of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA. *Cancer Res*, 57: 5426-5433, 1997.
97. Dean, J. L., Wait, R., Mahtani, K. R., Sully, G., Clark, A. R., y Saklatvala, J. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol*, 21: 721-730, 2001.
98. Osman, F., Jarrous, N., Ben-Asouli, Y., y Kaempfer, R. A cis-acting element in the 3'-untranslated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR. *Genes Dev*, 13: 3280-3293, 1999.
99. Liu, J. H., Wei, S., Burnette, P. K., Gamero, A. M., Hutton, M., y Djeu, J. Y. Functional association of TGF-beta receptor II with cyclin B. *Oncogene*, 18: 269-275, 1999.
100. Wang, L. G., Liu, X. M., Kreis, W., y Budman, D. R. Down-regulation of prostate-specific antigen expression by finasteride through inhibition of complex formation between androgen receptor and steroid receptor-binding consensus in the promoter of the PSA gene in LNCaP cells. *Cancer Res*, 57: 714-719, 1997.
101. Wang, L. G., Liu, X. M., Wikiel, H., y Bloch, A. Activation of casein kinase II in ML-1 human myeloblastic leukemia cells requires IGF-1 and transferrin. *J Leukoc Biol*, 57: 332-334, 1995.
102. Kong, M., Barnes, E. A., Ollendorff, V., y Donoghue, D. J. Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *Embo J*, 19: 1378-1388, 2000.
103. McGovern, S. L. y Shoichet, B. K. Kinase inhibitors: not just for kinases anymore. *J Med Chem*, 46: 1478-1483, 2003.
104. Group, C. Phase III clinical trials of Meisoindigo on the treatment of chronic myeloid leukemia. *J. Chinese Hematology*, 18: 69-72, 1997.
105. Tang, X., Fenton, M. J., y Amar, S. Identification and functional characterization of a novel binding site on TNF-alpha promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 4096-4101, 2003.
106. Bosman, B., Matthiesen, T., Hess, V., y Friderichs, E. A quantitative method for measuring antipsoriatic activity of drugs by the mouse tail test. *Skin Pharmacol*, 5: 41-48, 1992.
107. Jarrett, A. The physiology and pathophysiology of the skin. *Lancet*, 2: 445, 1973.
108. Sebok, B., Szabados, T., Kerényi, M., Schneider, I., y Mahrle, G. Effect of fumaric acid, its dimethylester, and topical antipsoriatic drugs on epidermal differentiation in the mouse tail model. *Skin Pharmacol*, 9: 99-103, 1996.
109. Sebok, B., Bonnekoh, B., Kerényi, M., y Gollnick, H. Tazarotene induces epidermal cell differentiation in the mouse tail test used as an animal model for psoriasis. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 13: 285-291, 2000.
110. Feldman, S. R., Garton, R., Averett, W., Balkrishnan, R., y Vallee, J. Strategy to manage the treatment of severe psoriasis: considerations of efficacy, safety and cost. *Expert Opin Pharmacother*, 4: 1525-1533, 2003.
111. Liu, X. M., Wang, L. G., Li, H. Y., y Ji, X. J. Induction of differentiation and down-regulation of c-myc gene expression in ML-1 human myeloblastic leukemia cells by the clinically effective anti-leukemia agent meisoindigo. *Biochem Pharmacol*, 51: 1545-1551, 1996.
112. Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., y Nakaya, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98: 694-702, 1990.
113. Lichtiger, S., Present, D. H., Kornbluth, A., Gelernt, I., Bauer, J., Galler, G., Michelassi, F., y Hanauer, S. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med*, 330: 1841-1845, 1994.

114. Cooper, H.S., y col., "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis," Lab Invest, Vol. 69, pp. 238-249, 1993.

115. Murthy, S., y col., "The efficacy of BATy1015 in dextran sulfate model of mouse colitis," Inflamm Res Vol. 46, No. 6, pp. 224-233, 1997.

5 116. Murthy, S.N., y col., "Treatment Of Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis By Intracolonic Cyclosporine," Digestive Diseases and Sciences, Vol. 38, No. 9, pp. 1722-1734, 1993.

117. Okayasu, I., y col., "A novel method in induction or reliable experimental acute and chronic colitis in mice," Gastroenterology Vol. 98, pp. 694-702, 1990.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> Natrogen Therapeutics, Inc.
Wang, Longgui
Liu, Xiao Mei
Mo, Lian
15 Mencher, Simon K.
McCarron, Jr., James P.

<120> PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR UNA ENFERMEDAD DE TIPO INFLAMATORIO

20

<130> 81481-301

<150> US 10/754.547
<151> 12-01-2004

25

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

30

<210> 1
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Cebador específico del gen de la IL-6

<400> 1
tcaattcggt ctgaagagg 19

40

<210> 2
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Cebador específico del gen de la IL-6

<400> 2
ccccaggag aagattcc 18

50

<210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Cebador específico del TNF-alfa

60

<400> 3
tgcccagact cggcaaag 18

<210> 4
<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

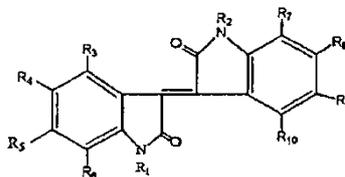
<223> Cebador específico del TNF-alfa

<400> 4

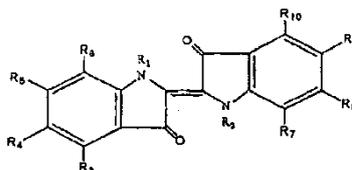
ggagaagggt gaccgact 18

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad de tipo inflamatorio asociada con los niveles de expresión de citocinas, que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) o fórmula (II)



FÓRMULA (I)



FÓRMULA (II)

5
10
15
20
25
30
35

en las que R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 y R10 son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno; un grupo hidroxilo; un grupo nitroso; un grupo nitro; un monosacárido; un disacárido; un átomo de halógeno; un grupo hidrocarbilo o un grupo hidrocarbilo funcional insustituido o sustituido con uno o más restos hidroxilo, restos carboxi, restos nitroxilo, monosacáridos, disacáridos, aminas, amidas, tioles, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas o halógenos, en los que el hidrocarbilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono; un grupo -R11R12, en el que R11 y R12 pueden ser iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene de 1 a 18 átomos de carbono que puede portar, adicionalmente, uno o más grupos hidroxilo y/o amino, un grupo arilo sustituido o insustituido que puede comprender uno o más heteroátomos o un grupo acilo, o R11 y R12 forman juntos un anillo que tiene de 2 a 6 grupos CH2 opcionalmente sustituidos; un grupo azo -N=N-R13, en el que R13 representa un sistema aromático que puede estar sustituido con uno o más grupos carboxilo y/o grupos fosforilo o un grupo seleccionado del grupo que consiste en azúcares, aminoácidos, péptidos u hormonas esteroideas; o R1 y R6, y R2 y R7, respectivamente, forman, de forma independiente entre sí, un anillo juntos que tiene de 1 a 4 grupos CH2 opcionalmente sustituidos; y

R1 y R2 son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno; un grupo hidroxilo; un grupo hidrocarbilo o un grupo hidrocarbilo funcional insustituido o sustituido con uno o más restos hidroxilo, restos carboxi, restos nitroxilo, monosacáridos, disacáridos, aminas, amidas, tioles sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas o halógenos, en los que el hidrocarbilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono; un grupo mono-, di- o trialkilsililo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono independientemente uno de otro en cada caso en el grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada; un grupo mono-, di- o triarilsililo con grupos arilo sustituidos o insustituidos independientemente entre sí en cada caso; un grupo -NR17R18, en el que R17 y R18 pueden ser iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene de 1 a 18 átomos de carbono que puede portar adicionalmente uno o más grupos hidroxilo y/o amino, un grupo arilo sustituido o insustituido que puede comprender uno o más heteroátomos, o un grupo acilo; un grupo metilenoamino -CH2-NR17R18, en el que R17 y R18 tienen las definiciones anteriores; un residuo de aminoácido fisiológico unido al nitrógeno como una amida, monosacárido, disacáridos u oligosacáridos sustituidos o insustituidos; o un azúcar, aminoácido, péptido u hormona esteroide;

y en la que la enfermedad de tipo inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en: diabetes de tipo I; síndrome de Sjögren; uveítis; conjuntivitis alérgica; enfermedad celíaca y colitis no específica.

2. Uso de al menos un compuesto como se define en la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de tipo inflamatorio asociada con los niveles de expresión de citocinas en un animal,

y en el que la enfermedad de tipo inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en: diabetes de tipo I; síndrome de Sjögren; uveítis; conjuntivitis alérgica; enfermedad celíaca y colitis no específica.

3. Al menos un compuesto de Fórmula (I) o Fórmula (II) como se define en la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de una enfermedad de tipo inflamatorio asociada con los niveles de expresión de citocinas en un animal,

y en el que la enfermedad de tipo inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en: diabetes de tipo I; síndrome de Sjögren; uveítis; conjuntivitis alérgica; enfermedad celíaca y colitis no específica.

4. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, o el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en los que al menos R₁ o R₂ es un monosacárido, un disacárido insustituido o sustituido con uno o más restos hidroxilo o restos carboxi; un halógeno; un grupo hidrocarbilo o un grupo hidrocarbilo funcional insustituido o sustituido con uno o más restos hidroxilo, restos carboxi, restos nitroxilo, monosacáridos, disacáridos, aminas, amidas, tioles, sulfatos, sulfonatos, sulfonamidas o halógenos, en los que el hidrocarbilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono.
5. La composición para uso, o el uso, o el compuesto para uso, de acuerdo con la reivindicación 4, en los que al menos R₁ o R₂ es un monosacárido triacetilado.
6. La composición para uso, o el uso, o el compuesto para uso, de acuerdo con la reivindicación 4, en los que al menos R₁ o R₂ es un grupo metilo.
7. La composición para uso, o el uso, o el compuesto para uso, de acuerdo con la reivindicación 6, en los que R₁ o R₂ es un monosacárido acetilado.
8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, o el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en los que el compuesto de fórmula (I) es meisoíndigo o es glico-meisoíndigo triacetilado o es NATURA.
9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un agente antiinflamatorio.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el medicamento comprende además un agente antiinflamatorio.
11. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el compuesto se administra en combinación con un agente antiinflamatorio.
12. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9, o el uso de acuerdo con la reivindicación 10, o el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en los que el agente antiinflamatorio se selecciona del grupo que consiste en: un analgésico, un agente antiirreumático, un agente gastrointestinal, una preparación para la gota, glucocorticoides, preparación oftálmica, agente respiratorio, una preparación nasal y un agente de membrana mucosa.
13. La composición para uso, o el uso, o el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en los que el analgésico se selecciona del grupo que consiste en: naproxeno, indometacina, ibuprofeno, trometamina ketorolaco, trisalicilato de colina magnesio y rofecoxib; el agente antiirreumático se selecciona del grupo que consiste en: ciclosporina, sulfasalazina, valdecoxib, penicilamina y dexametasona; el agente gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en: mesalamina, balsalazida disódica y olsalazina sódica; la preparación para la gota es sulindaco; el glucocorticoide se selecciona del grupo que consiste en: dexametasona, dexametasona fosfato, acetato de metilprednisolona, hidrocortisona e fosfato sódico de hidrocortisona; la preparación nasal se selecciona del grupo que consiste en dipropionato de beclometasona monohidrato, propionato de fluticasona, triamcinolona acetónido, flunisolida, furoato de mometasona monohidrato y budesonida; la preparación oftálmica es trometamina ketorolaco; el agente respiratorio es nedocromilo sódico; y el agente de membrana mucosa se selecciona del grupo que consiste en dipropionato de aclometasona, butirato de hidrocortisona, flurandrenolida, valerato de betametasona y propionato de clobetasol.
14. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, o el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en los que el compuesto se administra a una concentración suficiente para inhibir las citocinas IL-1 α , β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, TNF- α , LT, LIF, oncostatina o IFN γ .
15. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, o el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en los que el compuesto se administra a una concentración suficiente para estimular la expresión de las citocinas IL-4, IL-10, IL-11, W-13 o TGF β .

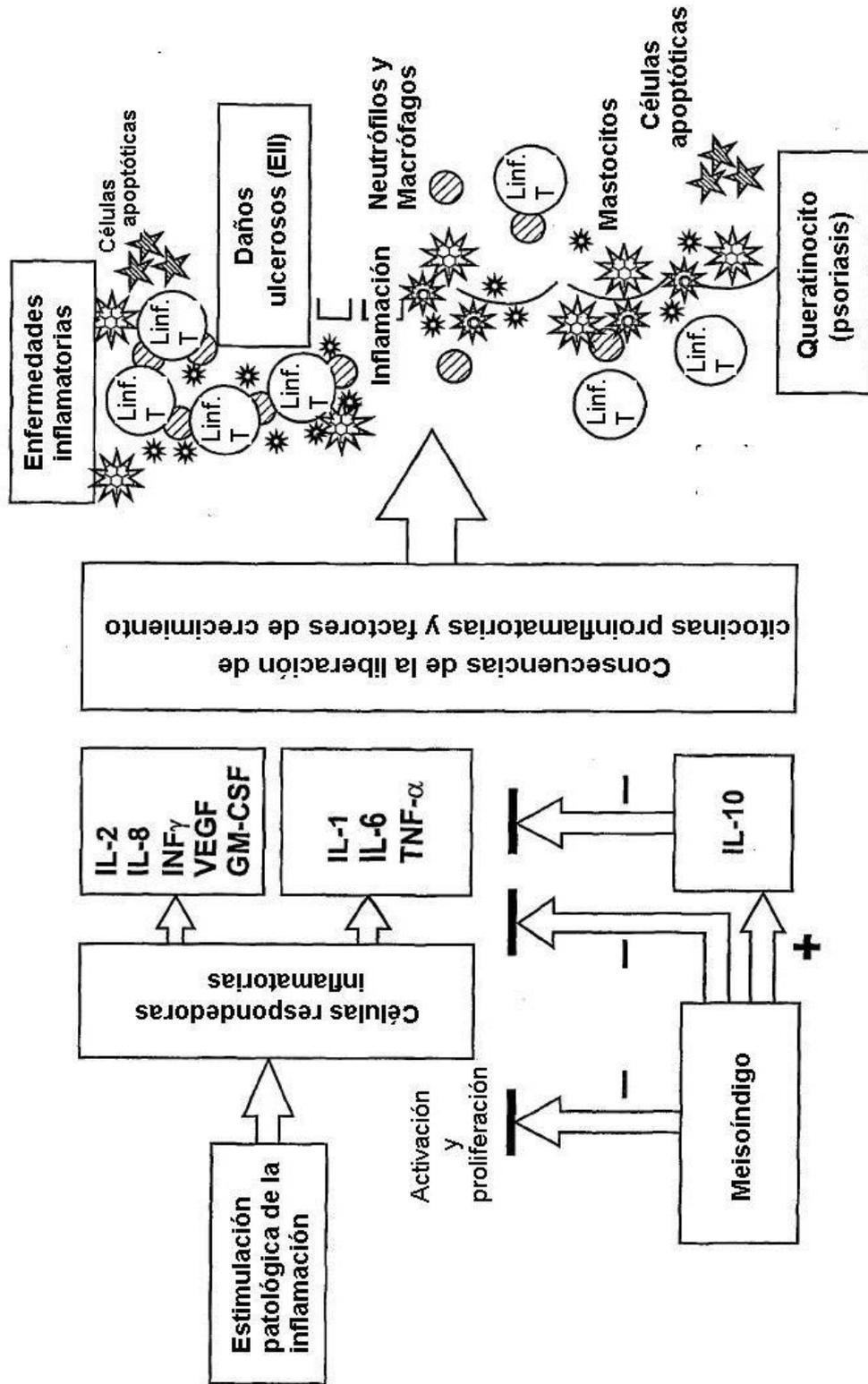


FIG. 1

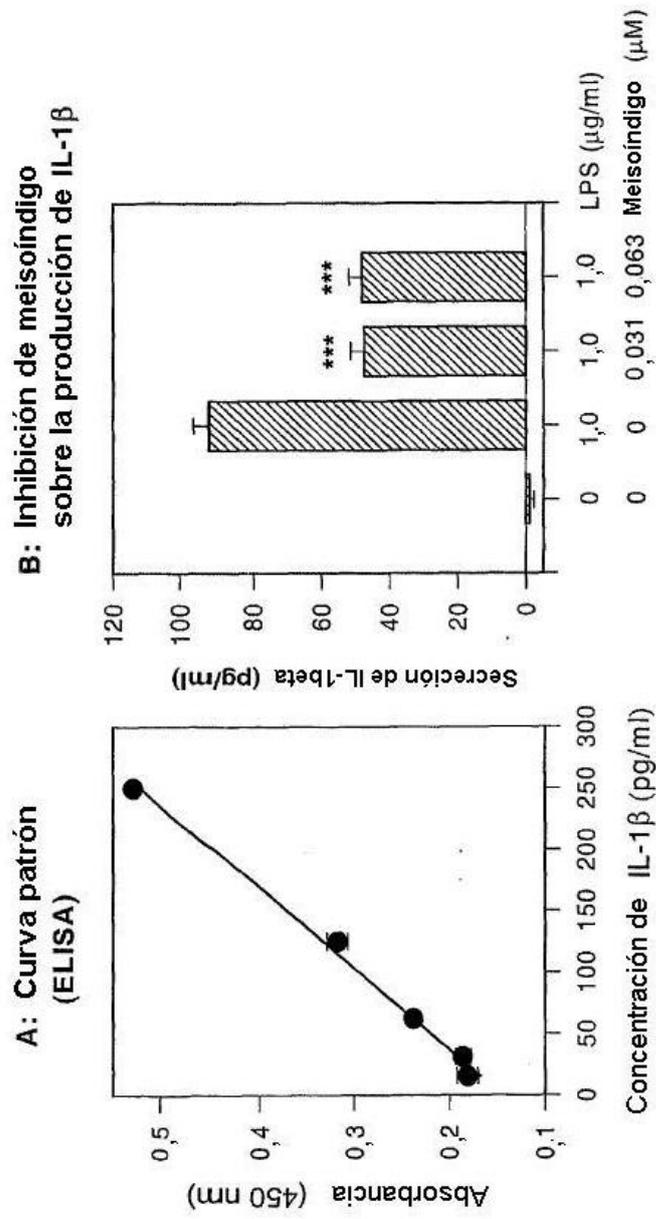


FIG. 2

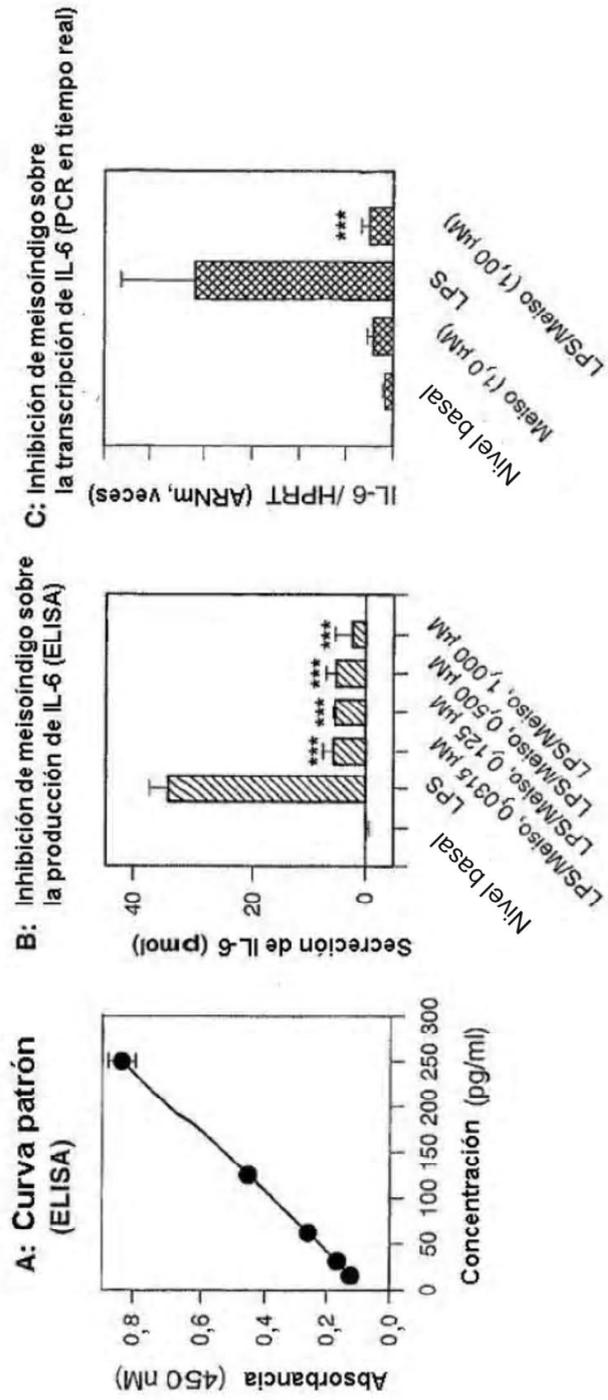


FIG. 3

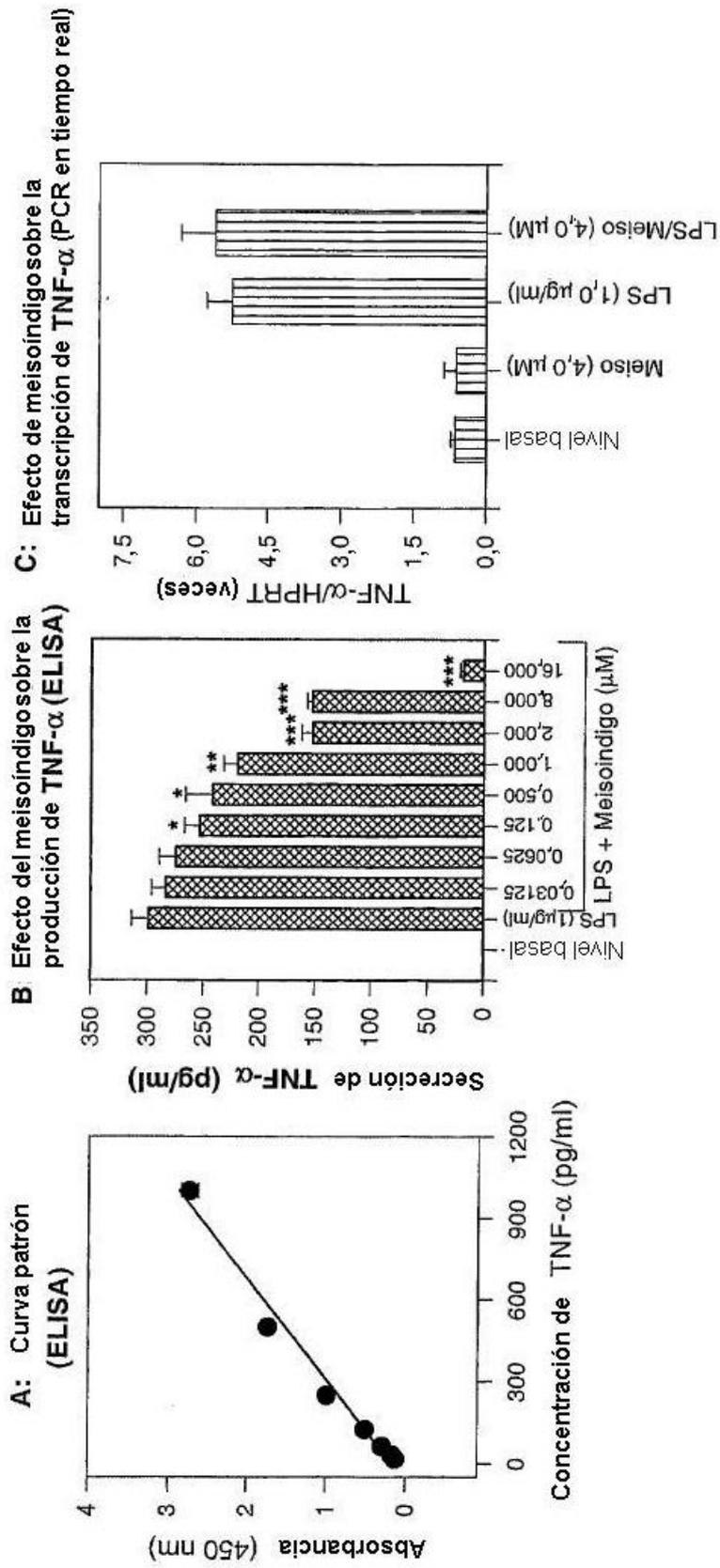


FIG. 4

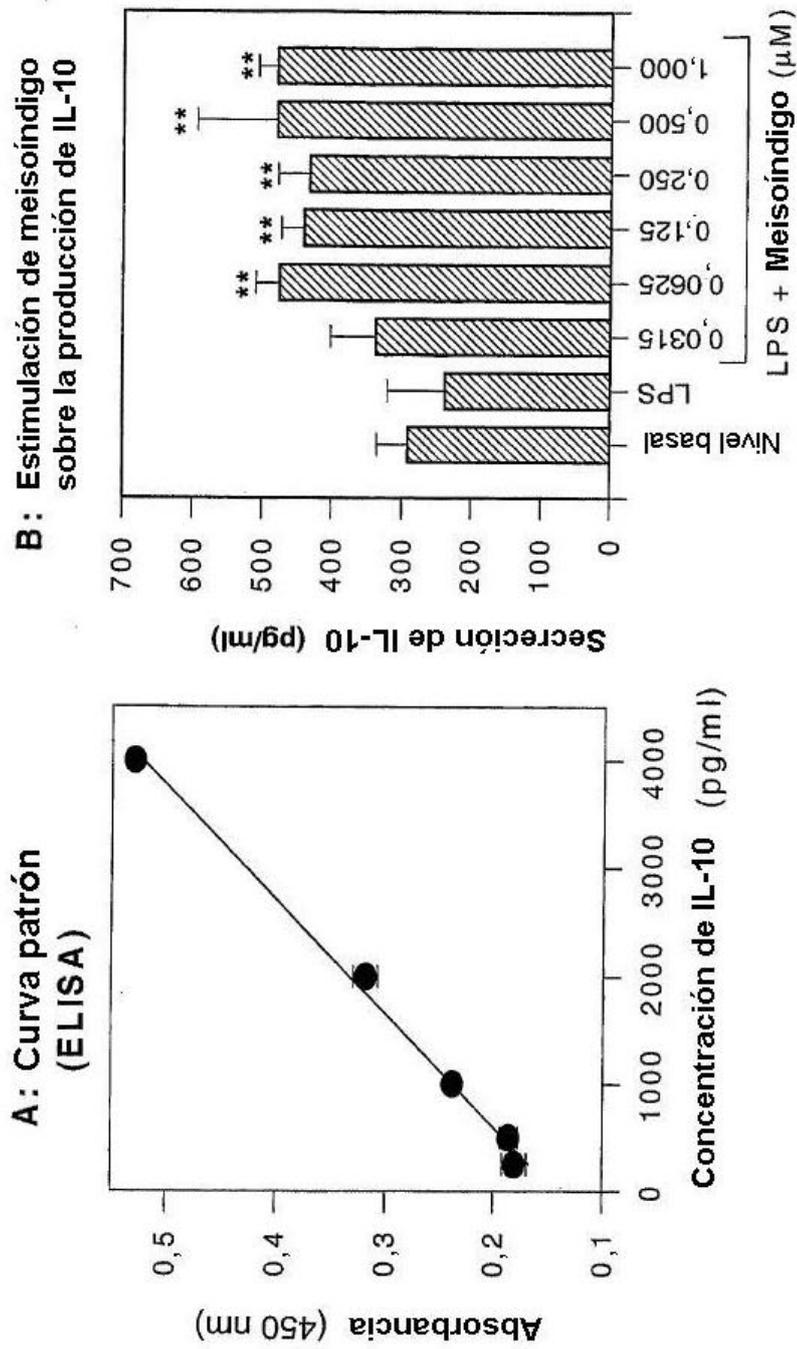


FIG. 5

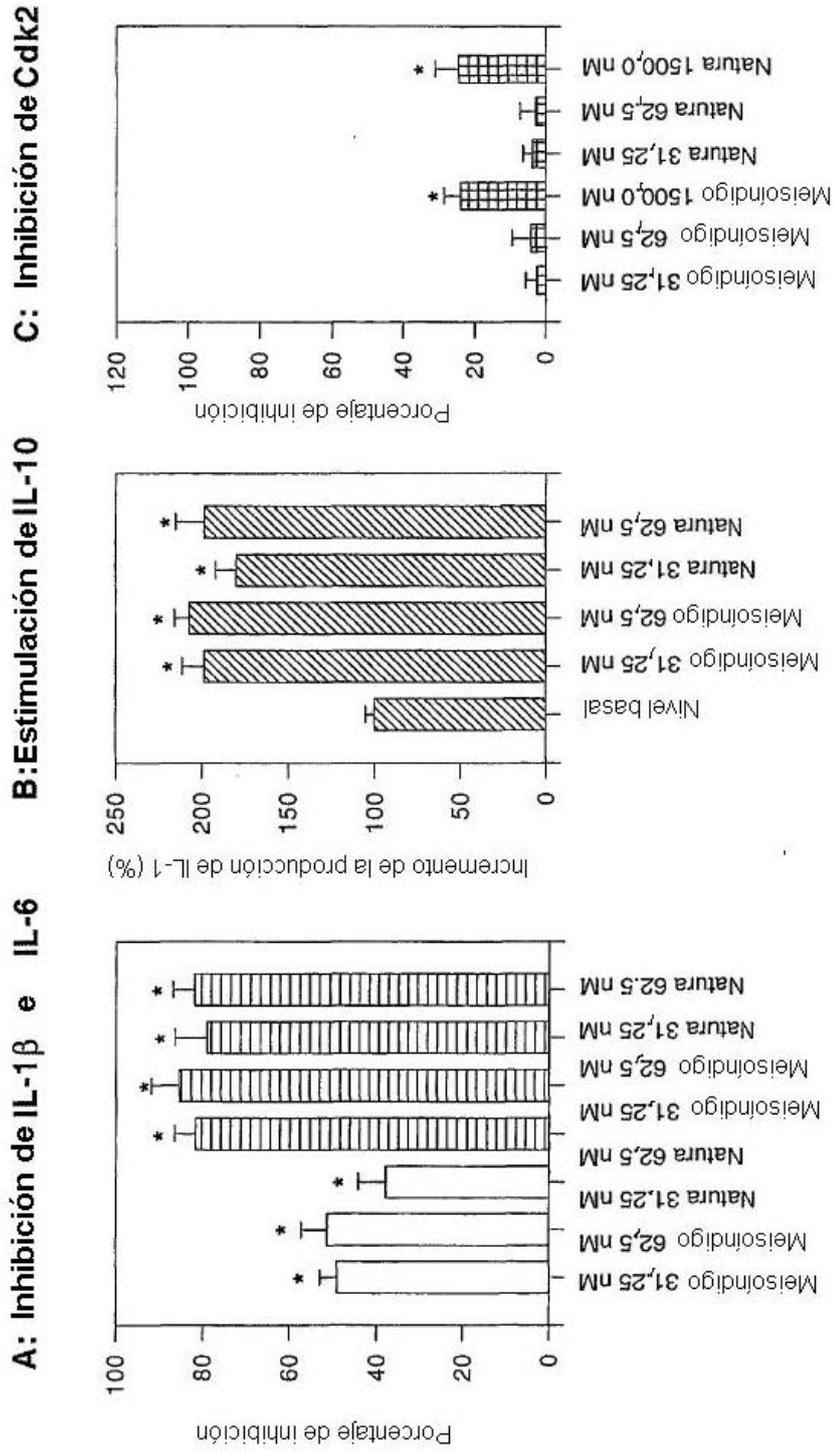


FIG. 6

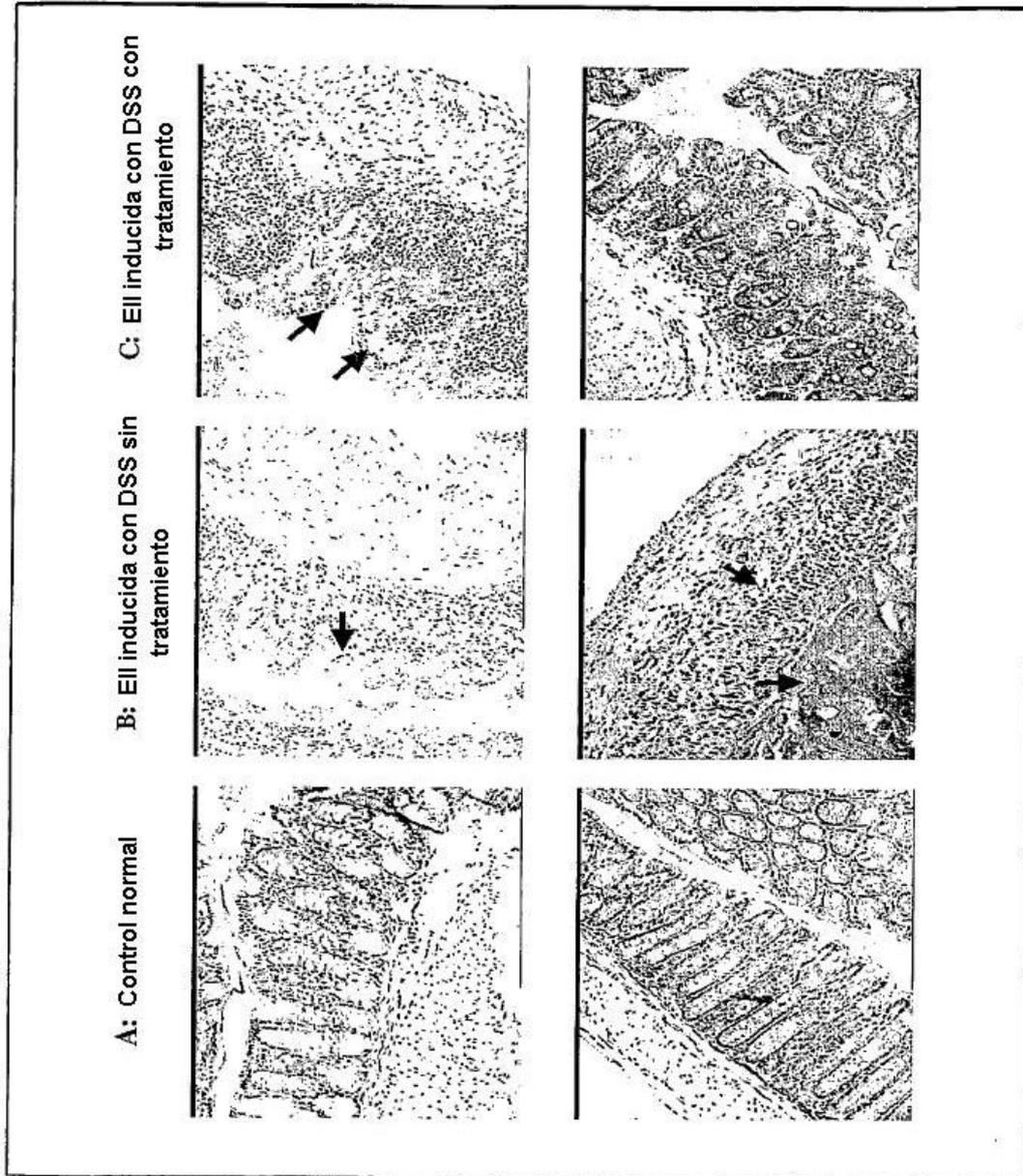


FIG. 7

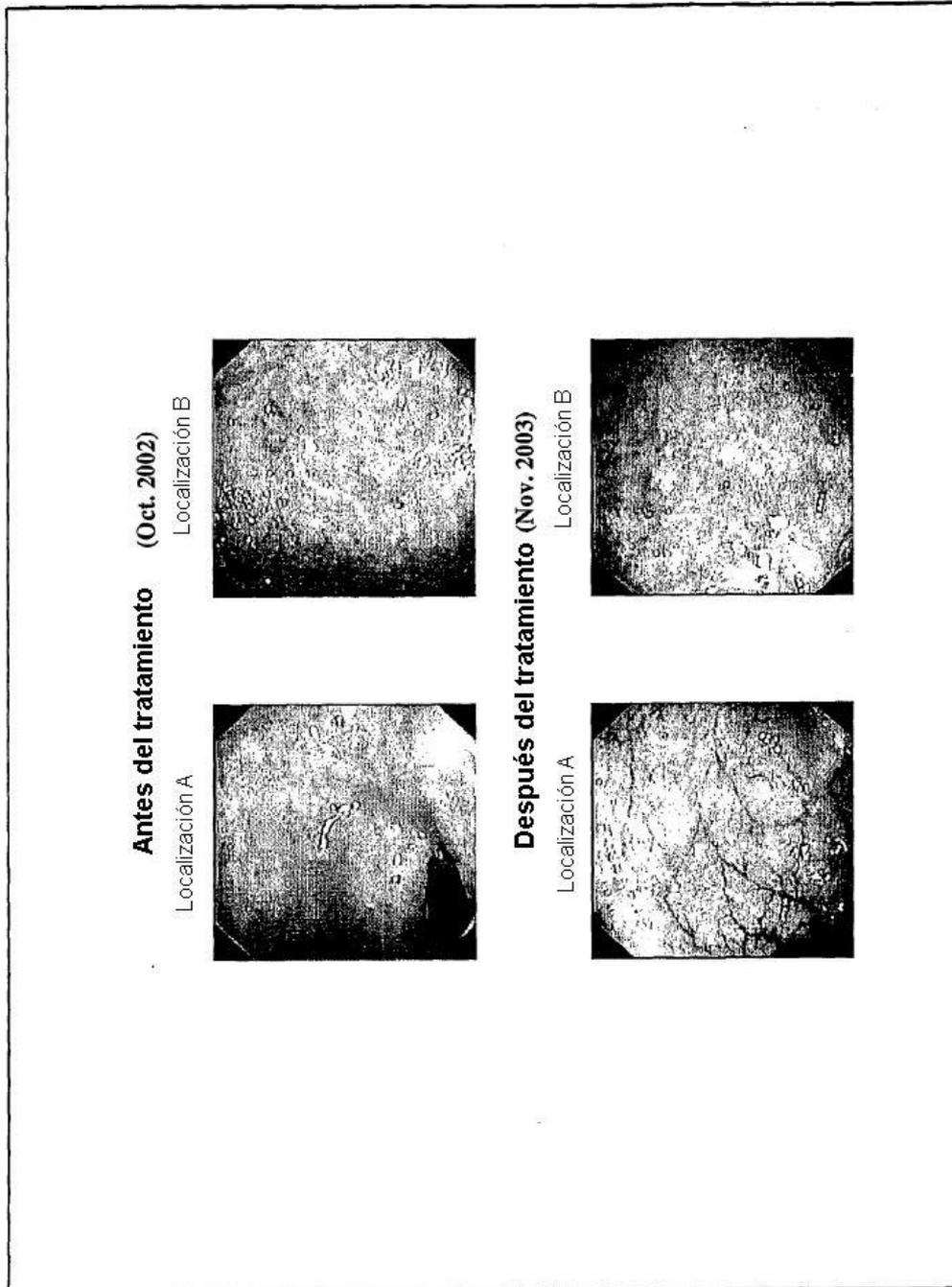


FIG. 8