

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 180**

51 Int. Cl.:

A61K 38/12 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
C07D 241/08 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2004 E 12005456 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2537524**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades mediadas por los linfocitos T**

30 Prioridad:

15.05.2003 US 471017 P
21.07.2003 US 489270 P
27.10.2003 US 514930 P
04.11.2003 US 517338 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.01.2017

73 Titular/es:

AMPIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
373 Inverness Parkway, Suite 200
Englewood, CO 80112, US

72 Inventor/es:

BAR-OR, DAVID;
BAR-OR, RAPHAEL y
SHIMONKEVITZ, RICHARD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 596 180 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

Tratamiento de enfermedades mediadas por los linfocitos T

5 Campo de la invención

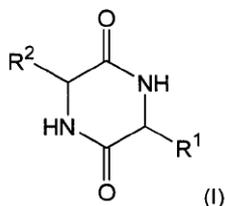
Esta invención se refiere a un medicamento (composición farmacéutica) que comprende dicetopiperazinas purificadas. También se describe, pero no como parte de la invención, el tratamiento de enfermedades mediadas por los linfocitos T, la inhibición de la activación de los linfocitos T utilizando ciertas dicetopiperazinas, métodos de síntesis de dicetopiperazinas y métodos de fabricación de composiciones farmacéuticas mejoradas de proteínas y péptidos para aumentar o reducir el contenido de dicetopiperazinas en las composiciones y las composiciones farmacéuticas mejoradas resultantes.

15 Antecedentes

Las enfermedades mediadas por los linfocitos T representan un gran número de trastornos del sistema inmune. En particular, se cree que los linfocitos T son células que inician y perpetúan las enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes son un grupo de ochenta enfermedades crónicas, graves, que, solo en Estados Unidos, afectan a millones de personas. Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la reactividad del sistema inmune hacia (auto)antígenos endógenos. Estas respuestas inmunes a los autoantígenos se mantienen mediante la activación persistente o recurrente de los linfocitos T autorreactivos y, directa o indirectamente, los linfocitos T autorreactivos son responsables de la lesión y destrucción tisulares características observadas en las enfermedades autoinmunes. Aunque se han propuesto muchos tratamientos para las enfermedades autoinmunes y otras enfermedades mediadas por los linfocitos T, todavía existe la necesidad de tratamientos adicionales.

25 Sumario de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Se describe, pero no como parte de la invención, un método para tratar enfermedades mediadas por los linfocitos T. El método comprende administrar, a un animal que la necesita, una cantidad eficaz de una dicetopiperazina que tiene la siguiente fórmula:



en la que:

35 R^1 y R^2 , que pueden ser iguales o diferentes, es cada uno:

(a) una cadena lateral de un aminoácido, en la que el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina; sin embargo, siempre que, cuando R^1 sea la cadena lateral de asparagina o glutamina, entonces R^2 no pueda ser la cadena lateral de lisina u ornitina, y cuando R^1 sea la cadena lateral de lisina u ornitina, entonces R^2 no pueda ser la cadena lateral de asparagina o glutamina;

45 (b) R^1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina y/o R^2 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina; o

(c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en el que el aminoácido es uno de los citados en (a), y la cadena lateral derivatizada tiene:

50 (i) un grupo $-\text{NH}_2$ reemplazado por un grupo $-\text{NHR}^3$ o $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, en el que cada R^3 puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

55 (ii) un grupo $-\text{OH}$ reemplazado por un grupo $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ u $-\text{OR}^3$, en el que cada R^3 puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iii) un grupo -COOH reemplazado por un grupo -COOR³, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

5 (iv) un grupo -COOH reemplazado por un grupo -CON(R⁴)₂, en el que cada R⁴ pueden ser, de manera independiente, H, o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

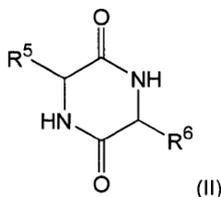
(v) un grupo -SH reemplazado por -S-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH o -S-S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH;

10 (vi) un grupo -CH₂- reemplazado por un grupo -CH(NH₂)- o un grupo -CH(OH)-;

(vii) un grupo -CH₃ reemplazado por un grupo -CH₂-NH₂ o un grupo -CH₂-OH; y/o

15 (viii) un H que está unido a un átomo de carbono reemplazado por un halógeno; o

una sal fisiológicamente aceptable de la misma. También se describe, pero no como parte de la invención, un método para inhibir la activación de los linfocitos T. El método comprende administrar, a un animal que la necesita, una cantidad eficaz de una dicetopiperazina de fórmula I o una sal fisiológicamente aceptable de la misma. Se describe además, pero no como parte de la invención, una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una dicetopiperazina que tiene la siguiente fórmula:



en la que:

R⁵ y R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, es cada uno:

25 (a) una cadena lateral de un aminoácido, en la que el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α-aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina u ornitina; sin embargo, siempre que, cuando R⁵ sea la cadena lateral de asparagina o glutamina, entonces R⁶ no pueda ser la cadena lateral de lisina u ornitina, y cuando R⁵ sea la cadena lateral de lisina u ornitina, entonces R⁶ no pueda ser la cadena lateral de asparagina o glutamina;

35 (b) R⁵ es -CH₂-CH₂-CH₂- o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina y/o R⁶ es -CH₂-CH₂-CH₂-o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina; o

(c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en el que el aminoácido es uno de los citados en (a), y la cadena lateral derivatizada tiene:

40 (i) un grupo -NH₂ reemplazado por un grupo -NHR³ o -N(R³)₂, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

45 (ii) un grupo -OH reemplazado por un grupo -O-PO₃H₂ u -OR³, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iii) un grupo -CH₂- reemplazado por un grupo -CH(NH₂)- o un grupo -CH(OH)-;

50 (iv) un grupo -CH₃ reemplazado por un grupo -CH₂-NH₂ o un grupo -CH₂-OH; y/o

(v) un H que está unido a un átomo de carbono reemplazado por un halógeno; o

una sal fisiológicamente aceptable de la misma.

55 Se describe además, pero no como parte de la invención, un método de tratamiento de una enfermedad mediada por los linfocitos T. El método comprende administrar, a un animal que la necesita, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína o un péptido que se encuentra normalmente en el animal, habiendo sido tratada la proteína o el péptido de manera que la composición también comprenda al menos un dicetopiperazina derivada de la proteína o del péptido.

Se describe además, pero no como parte de la invención, un método de inhibición de la activación de los linfocitos T. El método comprende administrar, a un animal que la necesita, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína o un péptido que se encuentra normalmente en el animal, habiendo sido tratada la proteína o el péptido de manera que la composición también comprende al menos una dicetopiperazina derivada de la proteína o del péptido.

También se describen, pero no como parte de la invención, métodos de síntesis de dicetopiperazinas. En un método, el método comprende calentar una solución de una proteína o de un péptido en condiciones eficaces para generar la formación de una dicetopiperazina. En un segundo método, el método comprende poner en contacto una solución de una proteína o de un péptido con una enzima que escinda los dos aminoácidos N-terminales o los dos aminoácidos C-terminales de la proteína o del péptido en condiciones eficaces para producir una dicetopiperazina.

La invención proporciona un medicamento mejorado que comprende dicetopiperazinas purificadas.

Se describe además, pero no como parte de la invención, un método de fabricación de una composición farmacéutica mejorada de una proteína o de un péptido. El método comprende retirar de la composición al menos parte de las dicetopiperazinas presentes en la composición.

Se describe además, pero no como parte de la invención, un método de fabricación de una composición farmacéutica mejorada de una proteína o de un péptido. El método comprende tratar una solución de la proteína o del péptido para aumentar el contenido de dicetopiperazinas en la composición.

También se describe, pero no como parte de la invención, una composición farmacéutica mejorada de una proteína o de un péptido. La mejora es que la composición comprende un mayor contenido de dicetopiperazinas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación de los recuentos frente a la concentración de ERK1/2 para las células TriPS (línea de linfocitos T CD4+ aislada de donantes inmunizados de la gripe que es específica de la hemaglutinina) aisladas el día 20 después de la estimulación con anticuerpos anti-CD3 OKT3 e incubadas con 25 ng de ácido mirístico de forbol (PMA), HC-RBL (fracción de calostro humano calentado de peso molecular inferior a 3 kD y que contiene MR-DKP) a una dilución 1:10 y DA-DKP 0,5 mM durante 15 minutos a 37 °C.

Figura 2. Gráfica de barras que muestra la inhibición de la secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF α) y de IL-16 por células TriPS 12 días después de la estimulación con anticuerpos anti-CD3 OKT3. Indica la inhibición de la secreción tanto de TNF α como de IL-16 mediante la banda DA-DKP de calostro humano (HC) 2626 (que contiene MR-DKP). La liberación máxima observada usando HC 2626 a 1:100 y diluciones 1:1.000 se debe al efecto lítico de las altas concentraciones del calostro humano. No se observa lisis usando DA-DKP 0,5 mM, y se reduce la secreción de TNF α e IL-16.

Figura 3. Gráfica de barras que muestra la inhibición de la secreción de TNF α por células TriPS 10 días después de la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 OKT3. Indica que es necesario examinar más a fondo HC RBL y DA-DKP en cuanto a la respuesta valorable como se ha visto con HC 2626. May indicó una potente actividad.

Figura 4. Gráfica de barras que muestra la inhibición de la secreción de TNF α por células TriPS en distintos momentos después de la estimulación con anticuerpos anti-CD3 OKT3. Indica que a principios del ciclo de estimulación, el efecto de DA-DKP y HC RBL es inhibitorio, mientras que más tarde (día 14), el efecto es estimulante. HC 2626 inhibe en todo momento, presumiblemente debido a otros constituyentes.

Figura 5. Gráfica de barras que muestra la inhibición de la secreción de TNF α por células H4#9.25 (línea de linfocitos T CD4+ aislada de tejido cerebral de la autopsia de un paciente con esclerosis múltiple que es específica de la proteína básica de mielina) en los días 7-10 después de la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 OKT3. Indica que la secreción de TNF α por esta línea de los linfocitos T también se inhibe por HC 2626, HC RBL y DA-DKP.

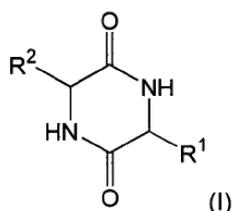
Descripción detallada de las realizaciones actualmente preferidas

La presente invención proporciona un medicamento que comprende dicetopiperazinas purificadas.

Se describe además, pero no como parte de la invención, un método de tratamiento de enfermedades mediadas por los linfocitos T. "Tratar" se usa en el presente documento en el sentido de reducir (total o parcialmente) los síntomas, la duración o la gravedad de una enfermedad, incluyendo la curación de la enfermedad o la prevención de la enfermedad.

Las enfermedades mediadas por los linfocitos T incluyen el rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra huésped, reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado no deseadas (tales como reacciones alérgicas de tipo retardado), enfermedades pulmonares mediadas por los linfocitos T y enfermedades autoinmunes. Las enfermedades pulmonares mediadas por los linfocitos T incluyen sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, neumonitis intersticial aguda, alveolitis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática y otras enfermedades caracterizadas por daño pulmonar inflamatorio. Las enfermedades autoinmunes incluyen esclerosis múltiple, neuritis, polimiositis, soriasis, vitíligo, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, pancreatitis autoinmune, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), enfermedad celíaca, glomerulonefritis, escleroderma, sarcoidosis, enfermedades autoinmunes de la tiroides (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves), miastenia gravis, enfermedad de Addison, uveorretinitis autoinmune, pénfigo vulgar, cirrosis biliar primaria, anemia perniciosa y lupus eritematoso sistémico.

La enfermedad mediada por los linfocitos T se puede tratar mediante la administración, a un animal que la necesita, de una cantidad eficaz de una dicetopiperazina que tiene la siguiente fórmula:



en la que:

R^1 y R^2 , que pueden ser iguales o diferentes, es cada uno:

- (a) una cadena lateral de un aminoácido, en la que el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina; sin embargo, siempre que, cuando R^1 sea la cadena lateral de asparagina o glutamina, entonces R^2 no pueda ser la cadena lateral de lisina u ornitina, y cuando R^1 sea la cadena lateral de lisina u ornitina, entonces R^2 no pueda ser la cadena lateral de asparagina o glutamina;
- (b) R^1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina y/o R^2 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina; o
- (c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en el que el aminoácido es uno de los citados en (a), y la cadena lateral derivatizada tiene:
- (i) un grupo $-\text{NH}_2$ reemplazado por un grupo $-\text{NHR}^3$ o $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, en el que cada R^3 puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- (ii) un grupo $-\text{OH}$ reemplazado por un grupo $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ u $-\text{OR}^3$, en el que cada R^3 puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- (iii) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado por un grupo $-\text{COOR}^3$, en el que cada R^3 puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- (iv) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado por un grupo $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$, en el que cada R^4 pueden ser, de manera independiente, H, o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- (v) un grupo $-\text{SH}$ reemplazado por $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ o $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$;
- (vi) un grupo $-\text{CH}_2-$ reemplazado por un grupo $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ o un grupo $-\text{CH}(\text{OH})-$;
- (vii) un grupo $-\text{CH}_3$ reemplazado por un grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ o un grupo $-\text{CH}_2-\text{OH}$; y/o
- (viii) un H que está unido a un átomo de carbono reemplazado por un halógeno; o

una sal fisiológicamente aceptable de la misma.

5 Por "reemplazado" se entiende que, con referencia a la fórmula de una cadena lateral de aminoácido, el grupo especificado está reemplazado por el otro grupo especificado. Por ejemplo, la fórmula de la cadena lateral de isoleucina es $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_3$. Si el grupo $-\text{CH}_3$ terminal se reemplaza por un grupo $-\text{CH}_2\text{-OH}$, entonces la fórmula de la cadena lateral de isoleucina derivatizada resultante sería $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$. Como otro ejemplo, la fórmula de la cadena lateral de alanina es $-\text{CH}_3$. Si uno de los átomos de hidrógeno se reemplaza por un átomo de cloro, entonces, la cadena lateral de alanina derivatizada resultante sería $-\text{CH}_2\text{-Cl}$. Cabe señalar que la cadena lateral de glicina es $-\text{H}$ y, si este H se reemplaza por un átomo de cloro (u otro halógeno), la cadena lateral resultante será Cl, con el átomo de cloro unido al carbono del anillo (por ejemplo, $\text{R}^1 = \text{Cl}$)

15 Se prefieren las dicetopiperazinas en las que R^1 , R^2 o ambos es la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico o un derivado de dicha cadena lateral en la que el grupo $-\text{COOH}$ se reemplaza por un grupo $-\text{COOR}^3$ o un grupo $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$, en los que R^3 y R^4 se definen anteriormente. De este grupo de compuestos, los más preferidos son las dicetopiperazinas que comprenden las cadenas laterales de ácido aspártico y alanina (Asp-Ala DKP o DA-DKP), las cadenas laterales de ácido glutámico y alanina (Glu-Ala DKP o EA-DKP), las cadenas laterales de tirosina y ácido aspártico (Tyr-Asp DKP o YD-DKP), las cadenas laterales de tirosina y ácido glutámico (Tyr-Glu DKP o YE-DKP) y derivados del ácido aspártico o cadenas laterales de ácido glutámico de estas cuatro dicetopiperazinas en las que el grupo $-\text{COOH}$ está reemplazado por un grupo $-\text{COOR}^3$ o un grupo $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$, en los que R^3 y R^4 se han definido anteriormente.

25 También se prefieren las dicetopiperazinas en las que R^1 y R^2 son ambas cadenas laterales hidrófobas (por ejemplo, la cadena lateral de fenilalanina) o derivados de cadena lateral hidrófoba. Por "derivado de cadena lateral hidrófoba" se entiende que la cadena lateral derivatizada es hidrófoba. En particular, se prefieren las dicetopiperazinas en las que cada R^1 y/o R^2 , que pueden ser iguales o diferentes, es la cadena lateral de glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina o fenilalanina, y/o R^1 y/o R^2 es $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ y, junto con el/los átomo/s de nitrógeno adyacente/s, forman prolina. De este grupo de compuestos, los más preferidos son las dicetopiperazinas que comprenden las cadenas laterales de glicina y leucina (Gly-Leu DKP o GL-DKP), prolina y fenilalanina (Pro-Phe DKP o PF-DKP) y alanina y prolina (Ala-Pro DKP o AP-DKP)

35 Otras dicetopiperazinas preferidas adicionales son aquellos en las que R^1 , R^2 o ambos es la cadena lateral de metionina, la cadena lateral de arginina o un derivado de estas cadenas laterales. La más preferida de este grupo es una dicetopiperazina, en la que R^1 es la cadena lateral de metionina y R^2 es la cadena lateral de arginina (Met-Arg DKP o MR-DKP).

40 Por "cadena lateral" de un aminoácido se entiende la parte del aminoácido unida a la cadena principal común $\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$ de todos los aminoácidos mencionados anteriormente. Por ejemplo, la cadena lateral de glicina es $-\text{H}$, la cadena lateral de alanina es $-\text{CH}_3$ y la cadena lateral de serina es $-\text{CH}_2\text{OH}$.

Por "hidrófobo" se entiende una cadena lateral o derivado de cadena lateral que no está cargada al pH fisiológico y es repelida por una solución acuosa.

45 Por "alquilo" se entiende un hidrocarburo ramificado o de cadena lineal saturada que contiene 1-10 átomos de carbono, preferentemente 1-6 átomos de carbono. "Alquilo inferior" significa un hidrocarburo ramificado o de cadena lineal saturada que contiene 1-6 átomos de carbono.

50 Por "cicloalquilo" se entiende un hidrocarburo cíclico saturado que contiene al menos un anillo, conteniendo cada anillo al menos tres átomos de carbono. Preferentemente, el cicloalquilo contiene un anillo de 4-8 átomos de carbono.

Por "heterocicloalquilo" se entiende un cicloalquilo que tiene uno o más de los átomos de carbono anulares de al menos uno de los anillos reemplazados por un O, S o N.

55 Por "arilo" se entiende un grupo aromático que tiene al menos un anillo aromático (por ejemplo, fenilo).

Por "alquilarilo" se entiende un alquilo inferior que tiene un H reemplazado por un arilo (por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$ o $-\text{CH}_3\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_3$).

60 Por "arilalquilo" se entiende un arilo que tiene un H reemplazado por un alquilo inferior (por ejemplo, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_3$).

Por "heteroarilo" se entiende un arilo que tiene uno o más de los átomos de carbono anulares de al menos uno de los anillos reemplazados por un O, S o N.

Por "sustituido" se entiende que el resto está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del siguiente grupo: OH, NH₂, -SH, -COOH y/o un átomo de halógeno.

Por "halógeno" se entiende cloro, flúor, bromo o yodo. El preferido es cloro o bromo.

Las dicetopiperazinas de fórmula I son eficaces en el tratamiento de enfermedades mediadas por los linfocitos T, ya que inhiben la activación de los linfocitos T. Por consiguiente, las dicetopiperazinas de fórmula I también se pueden usar para tratar la inflamación y enfermedades inflamatorias que están causadas por, agravadas por o en las que intervienen linfocitos T activados. "Inhibir" se usa en el presente documento en el sentido de reducir (total o parcialmente) o de prevenir.

Los métodos de fabricación de dicetopiperazinas se conocen bien en la técnica, y estos métodos se pueden emplear para sintetizar las dicetopiperazinas descritas en el presente documento. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.694.081, 5.817.751, 5.990.112, 5.932.579 y 6.555.543, solicitud de patente estadounidense con número de publicación 2004/0024180, solicitudes PCT WO 96/00391 y WO 97/48685, y Smith *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 8, 2369-2374 (1998).

Por ejemplo, las dicetopiperazinas se pueden preparar sintetizando primero dipéptidos. Los dipéptidos se pueden sintetizar mediante métodos bien conocidos en la técnica usando L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de D- y L-aminoácidos. Se prefieren los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Por supuesto, los dipéptidos también están disponibles en el mercado, en numerosas fuentes, incluyendo DMI Synthesis Ltd., Cardiff, RU (síntesis a petición del cliente), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (principalmente, síntesis a petición del cliente), Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA (síntesis a petición del cliente), Fisher Scientific (síntesis a petición del cliente) y Advanced ChemTech, Louisville, KY.

Una vez que se ha sintetizado o adquirido el dipéptido, se cicla para formar una dicetopiperazina. Esto se puede realizar mediante una variedad de técnicas.

Por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos con número de publicación 2004/0024180 describe un método de ciclación de dipéptidos. En resumen, se calienta el dipéptido en un disolvente orgánico mientras se retira el agua por destilación. Preferentemente, el disolvente orgánico es un azeótropo de bajo punto de ebullición con el agua, tal como acetonitrilo, alcohol alílico, benceno, alcohol bencílico, n-butanol, 2-butanol, t-butanol, butiléster de ácido acético, tetracloruro de carbono, cloroformo de clorobenceno, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, dietilacetil, dimetilacetil, etiléster del ácido acético, heptano, metilisobutilcetona, 3-pentanol, tolueno y xileno. La temperatura depende de la velocidad de reacción a la que se lleve a cabo la ciclación y del tipo de agente de separación azeotrópica usado. La reacción se lleva a cabo preferentemente a 50-200 °C, más preferentemente a 80-150 °C. El intervalo de pH en el que tiene lugar la ciclación se puede determinar fácilmente por el experto en la materia. Será ventajosamente de 2 a 9, preferentemente de 3 a 7.

Cuando uno o los dos aminoácidos del dipéptido tienen, o se derivatizan para que tengan, un grupo carboxilo en su cadena lateral (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico), el dipéptido se cicla preferentemente como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.555.543. En resumen, el dipéptido, con el carboxilo de la cadena lateral todavía protegido, se calienta en condiciones neutras. Por lo general, el dipéptido se calentará a de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 180 °C, preferentemente a aproximadamente 120 °C. El disolvente será un disolvente neutro. Por ejemplo, el disolvente puede comprender un alcohol (tal como, butanol, metanol, etanol y alcoholes superiores, pero no fenol) y un codisolvente azeotrópico (tal como tolueno, benceno o xileno). Preferentemente, el alcohol es butan-2-ol, y el codisolvente azeotrópico es tolueno. Se prosigue el calentamiento hasta que la reacción se completa, y dichos tiempos se pueden determinar empíricamente. Por lo general, el dipéptido se ciclará por calentamiento a reflujo durante aproximadamente 8 a 24 horas, preferentemente aproximadamente 18 horas. Por último, el grupo protector se retira de la dicetopiperazina. De este modo, se ha de evitar el uso de ácidos fuertes (ácidos minerales tales como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico), bases fuertes (bases alcalinas, tales como hidróxido de potasio o hidróxido de sodio) y agentes reductores fuertes (por ejemplo, hidruro de litio y aluminio) con el fin de mantener la quiralidad del compuesto final.

Los dipéptidos creados en resinas en fase sólida se pueden ciclar y liberarse de la resina en una etapa. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.817.751. Por ejemplo, la resina que tiene un dipéptido N-alquilado unido se suspende en tolueno o tolueno/etanol en presencia de ácido acético (por ejemplo, 1 %) o trietilamina (por ejemplo, 4 %). Por lo general, se prefieren las condiciones básicas de ciclación por sus tiempos de ciclación más rápidos.

Para preparar la dicetopiperazina de fórmulas I y II, en las que se derivatizan las cadenas laterales de aminoácidos, se pueden usar derivados de aminoácidos en la síntesis de los dipéptidos, los dipéptidos se pueden derivatizar y/o las dicetopiperazinas se pueden derivatizar como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, las referencias citadas anteriormente.

En la técnica, se conocen otros métodos de ciclación de dipéptidos y de preparación de dicetopiperazinas, y se pueden usar en la preparación de dicetopiperazinas útiles en la práctica de la invención. Véase, por ejemplo, las referencias mencionadas anteriormente. Además, muchas dicetopiperazinas adecuadas para su uso en la presente invención se pueden preparar como se describe a continuación a partir de proteínas y péptidos. Las dicetopiperazinas para su uso en la práctica de la invención también se pueden obtener comercialmente en, por ejemplo, DMI Synthesis Ltd., Cardiff, RU (síntesis a petición del cliente).

Las dicetopiperazinas de fórmulas I y II incluyen todos los estereoisómeros posibles que se pueden obtener mediante la variación de la configuración de los centros quirales, ejes o superficies individuales. En otras palabras, los dicetopiperazinas de fórmulas I y II incluyen todos los posibles diastereómeros, así como todos los isómeros ópticos (enantiómeros).

Las sales fisiológicamente aceptables de las dicetopiperazinas incluyen sales no tóxicas convencionales tales como sales derivadas de ácidos inorgánicos (tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, y similares), ácidos orgánicos (tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, glutámico, aspártico, benzoico, salicílico, oxálico, ascórbico y similares) o bases (tales como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o cationes orgánicos derivados de N,N-dibenciletilendiamina, D-glucosamina o etilendiamina). Las sales se preparan de una manera convencional, por ejemplo, por neutralización de la forma de base libre del compuesto con un ácido.

Como se ha señalado anteriormente, una dicetopiperazina, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, se puede usar para tratar una enfermedad mediada por los linfocitos T o para inhibir la activación de los linfocitos T. Para ello, se administra una dicetopiperazina, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, a un animal que la necesita. Preferentemente, el animal es un mamífero, tal como un conejo, cabra, perro, gato, caballo o ser humano. Las formas de dosificación eficaces, los modos de administración y las cantidades de dosificación para los compuestos se pueden determinar empíricamente, y la realización de dichas determinaciones pertenece a la técnica. Los expertos en la materia entienden que la cantidad de dosis variará con el compuesto empleado en particular, la enfermedad o la afección que se vaya a tratar, la gravedad de la enfermedad o de la afección, la/s vía/s de administración, la velocidad de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, la identidad de cualquier otro fármaco que se esté administrando al animal, la edad, el tamaño y la especie del animal, y factores similares conocidos en las técnicas médicas y veterinarias. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Sin embargo, la dosis diaria será determinada por un médico o veterinario asistente dentro del alcance del juicio médico. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día.

Se ha de continuar con la administración del compuesto hasta que se obtenga una respuesta aceptable.

Los compuestos (es decir, las dicetopiperazinas y sales fisiológicamente aceptables de las mismas) se pueden administrar a un paciente animal para terapia por cualquier vía de administración adecuada, incluyendo la vía oral, nasal, rectal, vaginal, parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular), intracisternal, transdérmica, intracraneal, intracerebral y tópica (incluyendo bucal y sublingual). Las vías preferidas de administración son la vía oral e intravenosa.

Aunque un compuesto descrito en el presente documento se puede administrar solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición). Los medicamentos de la invención comprenden una dicetopiperazina como principio activo en mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con uno o más de otros compuestos, fármacos u otros materiales. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el resto de ingredientes de la formulación y no perjudicial para el animal. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Las formulaciones de la invención adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga), y similares, conteniendo cada una cantidad predeterminada de un compuesto o compuestos descritos en el presente documento como principio activo. Un compuesto o compuestos también se pueden administrar en forma de bolo, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas de la invención para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), se mezcla el principio activo (es decir, uno o más dicetopiperazinas y/o sales fisiológicamente aceptables de las mismas) con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa,

5 alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; (3) humectantes tales como glicerol; (4) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la disolución tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

15 Se puede fabricar un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos fabricados por compresión se pueden preparar usando agente aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón de sodio o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar moldeando en una máquina adecuada una mezcla de compuesto en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte.

20 Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente, se pueden marcar o preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo en su interior usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberen el principio activo solo, o preferentemente, en una cierta parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada.

30 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral de los compuestos incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos.

40 Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

45 Las suspensiones, además del principio activo, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilénesteres de sorbitol y de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

50 Las formulaciones del medicamento de la invención para la administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio, que se puede preparar mezclando uno o más compuestos con uno o más excipientes o vehículos adecuados no irritantes que comprendan, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o salicilato, y que sea sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura corporal y, por lo tanto, que se funda en el recto o en la cavidad vaginal, liberando el compuesto activo. Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen vehículos como los conocidos en la técnica por ser apropiados.

55 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de los compuestos incluyen polvos, pulverizados, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas e inhalantes. El principio activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier tampón, o propulsor que se pueda necesitar.

60 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además del principio activo, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

65 Los polvos y pulverizados pueden contener, además del principio activo, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida o mezclas de estas sustancias. Los

pulverizados pueden contener además los propulsores habituales tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos tales como butano y propano.

5 Los parches transdérmicos tienen la ventaja adicional de proporcionar una liberación controlada de los compuestos en el organismo. Dichas formas de dosificación se pueden preparar disolviendo, dispersando o incorporando de otra manera uno o más compuestos en un medio adecuado, tal como un material de matriz elastomérica. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de dicho flujo se puede controlar bien proporcionando una membrana controladora de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o en un gel.

10 Los medicamentos incluyen los adecuados para la administración por inhalación o insuflación o para la administración nasal o intraocular. Para la administración en la parte superior (nasal) o inferior de las vías respiratorias por inhalación, los compuestos descritos en el presente documento se administran convenientemente desde un insuflador, nebulizador o un envase presurizado u otros medios convenientes de administración de un pulverizado en aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propulsor adecuado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida.

15 Como alternativa, para la administración por inhalación o insuflación, el medicamento puede adoptar la forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo de uno o más compuestos y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, cápsulas o cartuchos, o, por ejemplo, en gelatina o envases de blíster de los que el polvo se puede administrar con la ayuda de un inhalador, insuflador o un inhalador de dosis medidas.

20 Para la administración intranasal, los compuestos se pueden administrar por medio de gotas nasales o un pulverizado líquido, tal como por medio de un atomizador de botella de plástico o inhalador de dosis medidas. Los atomizadores más comunes son el Mistometer (Wintrop) y Medihaler (Riker).

25 Las gotas tales como las gotas oculares o las gotas nasales, se pueden formular con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Los pulverizados líquidos se administran convenientemente desde envases presurizados. Las gotas se pueden administrar por medio de un simple frasco con tapa cuentagotas para los ojos o por medio de un bote de plástico adaptado a la administración de contenido líquido gota a gota por medio de un cierre de forma especial.

30 Los medicamentos de la presente invención adecuados para la administración parenteral comprenden uno o más compuestos en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se puedan reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado, o agentes espesantes o de suspensión.

35 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en los medicamentos de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

40 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, se puede conseguir la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

45 En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco desde la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tenga poca hidrosolubilidad. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de un fármaco administrado parenteralmente se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

50 Las formas de depósito inyectables se elaboran formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la proporción del fármaco con respecto al polímero y de la naturaleza del polímero empleado en particular, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las

formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias.

5 Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitarias o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden conservarse en un estado liofilizado que solo requiera la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones para la inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

10 Se ha encontrado que las dicetopiperazinas están presentes en algunas composiciones farmacéuticas intravenosas disponibles en el mercado que contienen albúmina, inmunoglobulina y eritropoyetina. Las dicetopiperazinas presentes en estas preparaciones farmacéuticas se forman mediante las etapas de calentamiento que se usan a menudo en la fabricación de estas composiciones farmacéuticas. El calentamiento produce la escisión y la ciclación de los dos aminoácidos N-terminales y/o dos aminoácidos C-terminales de las proteínas para formar dicetopiperazinas.

15 Por consiguiente, las dicetopiperazinas se pueden preparar mediante el calentamiento de soluciones de albúmina, inmunoglobulina, eritropoyetina, y otras proteínas y péptidos. Por ejemplo, se prepara una solución de albúmina, inmunoglobulina, eritropoyetina, u otra proteína o péptido en tampón de fosfato a pH neutro. Preferentemente, la solución es una solución concentrada (por ejemplo, aproximadamente 100-500 mM) para lograr la protonación de los aminoácidos N-terminales y/o C-terminales. La solución se calienta a 60 °C durante de aproximadamente 2 horas a varios días, preferentemente aproximadamente 4 días, para generar la formación de las dicetopiperazinas. Preferentemente, se debería evitar la desnaturalización de la proteína. Esto se puede lograr mediante el uso de
20 tiempos más cortos y/o mediante la adición de ácido caprílico o N-acetiltriptófano a aproximadamente 0,02 M para cada uno.

25 Las dicetopiperazinas también se pueden preparar poniendo en contacto una solución de albúmina, inmunoglobulina, eritropoyetina, u otra proteína o péptido con una enzima que pueda escindir los dos aminoácidos N-terminales de la proteína o del péptido (por ejemplo, dipeptidil peptidasas) o una enzima que pueda escindir los dos aminoácidos C-terminales de la proteína o del péptido (por ejemplo, carboxipeptidasas). Las dipeptidil peptidasas y carboxipeptidasas adecuadas se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, en Sigma. La reacción debe realizarse a un pH de 6-8, preferentemente en un tampón, tal como tampón de fosfato, a una temperatura lo suficientemente alta como para acelerar la reacción, pero no tan alta como para provocar la
30 desnaturalización de la proteína (por ejemplo, 37 °C).

35 Se conocen las secuencias de aminoácidos de numerosas proteínas y péptidos, y se puede seleccionar una proteína o un péptido con la secuencia N-terminal y/o C-terminal deseada para dar la/s dicetopiperazina/s deseada/s usando cualquiera de los métodos. Además, los péptidos con una secuencia deseada se pueden sintetizar mediante métodos bien conocidos y usados.

40 De acuerdo con la presente invención, las dicetopiperazinas se purifican de las soluciones disponibles en el mercado que comprenden albúmina, inmunoglobulina y eritropoyetina, mediante métodos bien conocidos, tales como cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, filtración Centricon), cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando una columna de perlas que tenga unida a la misma un anticuerpo o anticuerpos dirigidos a la/s
45 dicetopiperazina/s deseada/s, o un anticuerpo o anticuerpos dirigidos a la proteína o al péptido truncado), intercambio de aniones o intercambio de cationes. Las dicetopiperazinas purificadas se usan e incorporan en medicamentos como se ha descrito anteriormente.

50 En lugar de purificar las dicetopiperazinas, para el tratamiento de una enfermedad mediada por los linfocitos T, se pueden administrar composiciones farmacéuticas que comprendan albúmina, inmunoglobulina, eritropoyetina y/u otras proteínas y/o péptidos que se encuentran normalmente en el animal receptor, y se pueden usar para inhibir la activación de los linfocitos T. Aunque las composiciones que comprenden estas proteínas y/o péptidos que están disponibles actualmente en el mercado se pueden usar si contienen dicetopiperazinas, es muy preferible tratar la
55 albúmina, inmunoglobulina, eritropoyetina, y/u otras proteínas y/o péptidos como se ha descrito anteriormente para aumentar el contenido de la/s dicetopiperazina/s deseada/s antes de la administración de las composiciones así mejoradas. El animal es preferentemente un ser humano, y las proteínas y/o los péptidos son preferentemente proteínas y/o péptidos humanos. Se prefiere la administración oral de la/s composición/es.

60 Las cantidades de dosificación eficaces de las composiciones de proteínas y/o de péptidos se pueden determinar empíricamente, y la realización de dichas determinaciones pertenece a la técnica. En particular, para determinar una cantidad de dosificación eficaz de una composición de proteínas y/o de péptidos, se puede medir la cantidad de una o más dicetopiperazinas presentes en la composición, y se puede administrar al animal una cantidad de la
65 composición suficiente para administrar una cantidad eficaz de la/s dicetopiperazina/s. Los expertos en la materia entienden que la cantidad de dosificación variará con la composición empleada en particular, la enfermedad o afección que se vaya a tratar, la gravedad de la enfermedad o de la afección, la/s vía/s de administración, la

velocidad de excreción, la duración del tratamiento, la identidad de cualquier otro fármaco que se esté administrando al animal, la edad, el tamaño y la especie del animal, y factores similares conocidos en las técnicas médicas y veterinarias. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de proteínas y/o de péptidos será la cantidad que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Sin embargo, la dosis diaria será determinada por un médico o veterinario asistente dentro del alcance del juicio médico. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día. Se debe continuar con la administración hasta que se logre una respuesta aceptable.

Como se ha señalado anteriormente, se ha encontrado que las dicetopiperazinas se encuentran en composiciones farmacéuticas intravenosas de albúmina, inmunoglobulina y eritropoyetina disponibles en el mercado, donde la fabricación de estas composiciones consiste en una o más etapas de calentamiento (por ejemplo, para la esterilización). Las dicetopiperazinas, probablemente, también se encuentran presentes en otras composiciones farmacéuticas de proteínas y péptidos en las que la fabricación de las composiciones implica etapas de calentamiento. Como se describe en el presente documento, muchas dicetopiperazinas tienen la capacidad de inhibir la activación de los linfocitos T. Por lo tanto, en muchas situaciones, puede no ser deseable administrar composiciones de albúmina, inmunoglobulina, eritropoyetina, u otras proteínas o péptidos que contengan dicetopiperazinas a los pacientes. Por ejemplo, la albúmina se suele administrar a pacientes que tienen traumatismo, la inmunoglobulina se suele administrar a pacientes que padecen infecciones o deficiencias inmunitarias, y la eritropoyetina se administra a pacientes con cáncer anémico o enfermedades crónicas cuyos sistemas inmunes suelen estar comprometidos. Por consiguiente, se describe un método de extracción de al menos parte de, preferentemente esencialmente todas, las dicetopiperazinas de dichas composiciones. Las dicetopiperazinas se pueden extraer como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, filtración Centricon), cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando una columna de perlas que tenga unida a la misma un anticuerpo o anticuerpos dirigidos a la/s dicetopiperazina/s deseada/s, o un anticuerpo o anticuerpos dirigidos a la albúmina, la inmunoglobulina, la eritropoyetina, u otra proteína o péptido), intercambio de aniones o intercambio de cationes) para producir composiciones mejoradas de albúmina, inmunoglobulina, eritropoyetina, y otras proteínas y péptidos.

30 Ejemplos

Ejemplo 1: Absorción de Asp Ala DKP (DA-DKP) y Glu Ala DKP (EA-DKP) de intestino de rata

Se aisló marginalmente intestino de rata desde el esfínter pilórico hasta el recto y se perfundió por la arteria mesentérica con un líquido de perfusión a base de eritrocitos que contenía albúmina de suero bovino. Se recogió el líquido de perfusión efluente del intestino mediante canulación de la vena porta y se volvió a hacer circular (tras la reoxigenación). Después de un período de equilibrio, se administró una solución (de aproximadamente 1 ml) que contenía aproximadamente 1 mg de Asp-Ala dicetopiperazina (DA-DKP) o 1,4 mg de Glu-Ala dicetopiperazina (EA-DKP) mediante inyección en el lumen del duodeno.

Tras la dosificación, se recogieron muestras seriadas del líquido de perfusión a intervalos de tiempo de hasta 2 horas posteriores a la dosificación. Se centrifugaron dichas muestras y se ensayaron los plasmas para ambos dipéptidos cíclicos por espectrometría de masas de cromatografía líquida (LC-MS).

Los resultados mostraron que, tras solo 2 horas de perfusión, las cantidades de DA-DKP y EA-DKP que habían sido absorbidas desde el lumen intestinal al sistema circulatorio correspondían al 95 % y 100 % (en realidad, al 112 %), respectivamente, de la dosis administrada.

Por lo tanto, ambos péptidos cíclicos se absorben rápidamente y de manera eficaz desde el lumen intestinal a la sangre, sin pruebas de metabolismo durante el transporte a través de la pared intestinal. Por lo tanto, estos posibles productos terapéuticos se pueden administrar por vía oral.

La rápida absorción de DA-DKP y EA-DKP sin cambios desde el tracto gastrointestinal a la sangre, combinada con la falta de aclaramiento hepático de primer paso de ambos compuestos en el hígado de rata perfundido aislado (datos no mostrados) demuestra que el aclaramiento presistémico es bajo. Por consiguiente, la dosificación oral será una vía ideal de administración.

Por otra parte, los estudios con aislados de riñón de rata perfundido mostraron que, a diferencia de muchos péptidos de cadena lineal, que son ampliamente metabolizados por las peptidasas renales, el aclaramiento renal de los dos dipéptidos cíclicos es relativamente lento.

En conjunto, estos datos sugieren que es probable que una pauta de dosificación de dosis diarias bajas de dicetopiperazinas sea adecuada para los propósitos terapéuticos.

Los datos farmacocinéticos preliminares en ratas tras la administración oral coincidieron con lo anterior para ambos dipéptidos cíclicos, con valores de $T_{m\acute{a}x}$ de 30-60 minutos y valores de $C_{m\acute{a}x}$ de 4-6 $\mu\text{g/ml}$ (DA-DKP) y 0,6-1,1 $\mu\text{g/ml}$

(EA-DKP) después de la dosificación oral a 1,1-3,7 mg/kg de peso corporal (DA-DKP) y 1,5-4,8 mg/kg de peso corporal (EA-DKP) ($T_{\text{máx}}$ es el tiempo en el que la concentración alcanza un máximo, y $C_{\text{máx}}$ es la concentración máxima alcanzada; ambos se calcularon a partir de una ecuación de ajuste de curva para los datos obtenidos).

- 5 Los datos preliminares sugieren que DA-DKP y otras dicetopiperazinas atraviesan la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, DA-DKP y otras dicetopiperazinas de la invención deben ser útiles para tratar trastornos del sistema nervioso, tales como la esclerosis múltiple.

10 Ejemplo 2: Inhibición de la producción de citocinas de linfocitos T humanas *in vitro* mediante fracciones de calostro humano que contienen Met-Arg DKP (MR-DKP) y mediante Asp-Ala DKP (DA-DKP)

A. Materiales

15 El presente ejemplo demuestra que DA-DKP, calostro humano (HC 2626) que contiene MR-DKP y una fracción de bajo peso molecular de calostro humano (HC RBL; una fracción de calostro humano que contiene componentes de pesos moleculares inferiores a 3.000 preparada mediante filtración Centricon de calostro desgrasado) que también contiene MR-DKP, inhibieron la producción de citocinas de linfocitos T humanas. DA-DKP y MR-DKP se obtuvieron de DMI Synthesis, Ltd, Cardiff, RU. Estas dos dicetopiperazinas son pequeños compuestos de origen natural generados durante la respuesta fisiológica a la inflamación. A veces también se encuentran en la inmunoglobulina intravenosa humana (IVIg), albúmina humana y otros preparados biológicos.

B. Inhibición de la producción de citocinas de linfocitos T

25 Se ensayaron dos clones humanos de linfocitos T CD4 positivos diferentes. Una de las líneas celulares (TRiPS) se aisló de un donante inmunizado de la gripe, y es específica del péptido de hemaglutinina 307-319. La otra línea celular (H4#9.25) se aisló del tejido cerebral de la autopsia de un donante con esclerosis múltiple, y es específica de la proteína básica de la mielina (aminoácidos 87-99). Ambos clones de linfocitos T producen interleucina 8 (IL-8), IL-16, interferón-gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) tras la estimulación *in vitro* bien con (1) antígeno específico más células presentadoras de HLA DR2 positivas; (2) anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28.

30 Se estimularon las líneas celulares de linfocitos T para el paso usando aproximadamente 4×10^5 células el día 18-20 después de una estimulación previa. Se lavaron las células una vez en medio esencial mínimo de Dulbecco modificado de Iscove frío (IMDM, Sigma) más suero bovino fetal al 10 % (FBS; Colección americana de cultivos tipo (ATCC)) y se volvieron a suspender en 1,0 ml de medio IMDM frío que contenía una dilución 1:500 de anticuerpo monoclonal OKT3 anti-CD3 (preparado a partir de fluido de ascitis de ratón). Se incubaron las células con el anticuerpo durante 30 minutos en hielo, después se lavaron con medio frío sin FBS y se combinaron con aproximadamente 2×10^6 leucocitos de sangre periférica de donantes humanos normales irradiados con 4000R (PBL), como células de alimentación, en un medio más 50 U/ml de IL-2 humana (Xenometrix). Los cultivos se expandieron mediante la adición de medio IMDM recién preparado con FBS más IL-2 el día 3. El día del cultivo se midió desde el día de la estimulación con OKT3. Las células se pueden usar para los experimentos a partir del día 7 (en la proliferación máxima), normalmente en el día 14 (más sensible a la reestimulación) y hasta el día 21 (células de reposo que se aproximan a la senescencia).

45 Los experimentos de activación se realizaron mediante la retirada de una parte alícuota de células y el lavado dos veces con medio IMDM (37 °C) calentado. Para cada ensayo específico, se incubaron previamente 2×10^5 células viables en un volumen total de 0,9 ml de medio IMDM calentado que contenía la cantidad especificada de aditivo de tratamiento (por ejemplo, HC 2626, DA-DKP, PMA, etc.) durante 15 minutos a 37 °C. A continuación, se añadió una parte alícuota de 2×10^5 Dynabeads CD3/CD28 (Dyna), como estímulo de activación, en 0,1 ml de IMDM calentado, y se incubaron los cultivos durante la noche (18 horas) a 37 °C. Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares tras la aglomeración de las células por centrifugación. El contenido de citocinas se ensayó mediante ELISA específica (por ejemplo, TNF α , IFN γ , IL-8, IL-16; Endogen).

50 Como se muestra en las Figuras 1-5, el calostro humano (HC 2626) inhibió la producción de citocinas *in vitro* por ambas líneas celulares de linfocitos T de una manera dependiente de la dosis. Como también se muestra en las Figuras 1-5, HC RBL y DA-DKP inhibieron la producción de citocinas *in vitro* por ambas líneas de linfocitos T de una manera dependiente de la dosis al principio del ciclo de estimulación. Sin embargo, los efectos de HC RBL y DA-DKP en un momento posterior del ciclo (día 14 o posterior) fueron estimulantes (véase la Figura 4). Tanto HC 2626 como HC RBL contienen MR-DKP (según lo determinado por espectrometría de masas), pero HC 2626 contiene otros componentes (incluyendo las caseínas, que son proteínas relativamente desfosforiladas que, por tanto, pueden ser antiinflamatorias, como se describe en la solicitud en trámite junto con la presente 10/723.247, presentada el 25 de noviembre de 2003), además de MR-DKP, que puede ser responsable de sus efectos inhibidores en un momento posterior del ciclo celular. Por consiguiente, HC RBL y HC 2626 (conteniendo ambos MR-DKP), MR-DKP y DA-DKP deben ser útiles en la modulación por disminución de la respuesta inflamatoria de las citocinas en las enfermedades mediadas por los linfocitos T y/o autoinmunes, tales como la esclerosis múltiple, ya que todos ellos inhiben la producción de citocinas por parte de los linfocitos T al principio del ciclo de estimulación. Estos resultados también

sugieren que HC RBL, HC 2626, MR-DKP y DA-DKP afectarán de forma selectiva a los linfocitos T específicos del antígeno sin afectar a los linfocitos T en reposo.

C. Mecanismo de acción

Se investigó el mecanismo de acción de DA-DKP y HC 2626 (con contenido de MR-DKP). Para ello, se incubaron 1×10^6 células TriPS del día 18 durante 30 minutos a 37 °C, bien sin ninguna adición ("Sin nada"), con adición de Dynabeads CD3/CD28 (perlas CD3/CD28), con perlas CD3/CD28 y DA-DKP 0,5 mM, o con adición de perlas CD3/CD28 y dilución de 1:500 de HC 2626. Tras la incubación, las células se lisaron en reactivo de extracción de células de mamífero Cell-Lytic (Sigma).

A continuación, se incubaron los extractos celulares por separado con matrices Hypromatrix por duplicado durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de dos lavados siguiendo el protocolo del fabricante (Hypromatrix). La matriz Hypromatrix es una membrana de nylon transferida con anticuerpos contra los factores de transcripción que figuran en la Tabla 1 (fabricados a petición del cliente por Hypromatrix). Se añadió un cóctel de anticuerpos específico de la tirosina fosforilada, serina fosforilada y treonina fosforilada (Zymed), y se incubó durante 1 hora. Después, se añadió un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con biotina. Tras separar por lavado la biotina anti-inmunoglobulina, se añadió estreptavidina-peroxidasa, y se lavaron las matrices una última vez antes de la adición de un sustrato luminiscente reactivo a la peroxidasa.

Los resultados se visualizaron mediante la exposición a la película y se calificaron como 0 (negativo) o + a ++++ (positivos) como se presenta en la Tabla 2. Como se muestra en la Tabla 2, alguna activación de factores de transcripción de citocinas (ERK1/2) y liberación de citocinas preformadas fueron inhibidas por HC 2626 (que contenía MR-DKP) y DA-DKP.

TABLA 1: MATRIZ HYPROMATRIX (A PETICIÓN DEL CLIENTE): PROTEÍNAS PARA LA FOSFORILACIÓN

NUMERO	ACRÓNIMO	COMPUESTO
1	Akt 1/2	proteína quinasa B, quinasa antiapoptótica
2	c-Cbl	vía de inhibición de TcR; la fosforilación en Tyr ²⁹² activa la unión y la inactivación de Syk y ZAP-70
3	CBP	proteína de unión a csk (PAG); proteína de la membrana <i>integral</i> desfosforilada en Tyr transitoriamente (y a bajo nivel) para liberar csk
4	CREB	proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP; fosforilada (unk) para activar/regular por disminución el promotor de IL-2
5	csk	quinasa src del extremo COOH; fosforilada en Ser ³⁶⁴ , también fosforilada en Tyr (¿actividad?)- fosforila e inactiva lck
6	ERK1	quinasa relacionada con las señales extracelulares
7	c-fos	constituyente de AP-1 activado por la estimulación de TcR; fosforilado en ambos restos N- y C-unk
8	NFATC	factor nuclear de linfocitos T activados; anergia intacta
9	c-jun	constituyente de AP-1 activado por la activación de TcR; fosforilado por JNK-MAPK en Ser ⁶³
10	IκB-α	inhibidor de NFκB
11	pIκB-α	inhibidor de NFκB fosforilado en Ser e inactivado
12	p38 MAPK	proteína quinasa activada con mitógenos
13	quinasa p13 /p85	activada por glucocorticoides y R β2-adrenérgico
14	pten	3'-inositol fosfatasa citoplasmática; el gen supresor de tumores antagoniza la PI 3'quinasa volviendo a convertir PI-PO en formas inactivas
15	c-Raf-1	
16	Rap1	GTPasa reguladora de TcR negativa
17	Ras	quinasa; inactivada durante la anergia
18	fyn	quinasa de señales de TcR inmediatas unida a la membrana celular
19	lck	quinasa de señales de TcR inmediatas unida a la membrana celular, la forma activa está fosforilada en Tyr ³⁹⁵ ; inactivada por la fosforilación de csk en Tyr C-terminal
20	Quinasa ZAP70	señalizador de CD3ζ; fosforilada en ? por lck/fyn, ZAP70 fosforila LAT (enlazador para la activación de linfocitos T) en Tyr y Tyr en SLP-76

TABLA 2: RESULTADOS

<u>COMPUESTO</u>	<u>NADA</u>	<u>CD3/CD28</u>	<u>DKP</u>	<u>HC2626</u>
Akt 1/2	+	++	+++	++
c-Cbl	--	--	--	--
CBP	+	++	++	++
CREB	--	--	--	--
csk	+	++	+	+
ERK1	+	+	+	+
c-fos	--	--	--	--
NFATC	--	--	--	--
c-jun	++	+	+	+
IκB-α	++	++	+	+
pIκB-α	--	--	--	--
p38 MAPK	++	+++	+++	+++
quinasa p13/p85	+	++	+	++
pten	--	--	--	--
c-Raf-1	--	--	--	--
Rap1	+	++	++	+
Ras	--	--	--	--
fyn	+	+	+	+
lck	--	--	--	--
quinasa ZAP70	--	--	--	--

Ejemplo 3: Inhibición de la producción de los linfocitos T citocina humana *in vitro* por Gly-Leu DKP (GL-DKP) y DKP Ala-Pro (AP-DKP)

5 Se ensayaron GL-DKP y AP-DKP (obtenidos en DMI Synthesis, Ltd, Cardiff, RU) como se describe en el Ejemplo 2 usando líneas celulares TriPS y H4#9.25. GL-DKP y AP-DKP resultaron inhibir la producción *in vitro* de citocinas por estas dos líneas celulares de linfocitos T de una manera dependiente de la dosis. El mecanismo de acción está actualmente en investigación como se describe en el Ejemplo 2, y parecen verse afectadas tanto la activación del factor de transcripción de citocinas como la liberación de citocina previamente formada.

10 Ejemplo 4: Inhibición de la producción de citocinas de linfocitos T humanas *in vitro* por Asp Ala DKP (DA-DKP) y Tyr Glu DKP (YE-DKP)

15 Se aislaron linfocitos humanos normales de la sangre periférica de un donante humano normal con Histopaque (Sigma). A continuación, se suspendieron, $3-4 \times 10^5$ de los linfocitos en 1 ml de medio IMDM sin suero. Las células se estimularon mediante la adición de 25 µl de una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-CD3 (Pharmingen, San Diego, CA) y la incubación durante 18 horas a 37 °C.

20 A continuación, se añadió uno de los tres preparados de DKP y dexametasona (concentración final de 10^{-5} M) a cultivos por triplicado. Los tres preparados de DKP fueron:

1. DA-DKP (obtenido en DMI Synthesis, Ltd, Cardiff, RU; concentración final de 25 µg/ml en los cultivos).
2. DKP-ZLB, un preparado de albúmina al 25 % (obtenido en ZLB Bioplasma, AG 3000 Berna 22 Suiza) calentado durante 4 días a 60 °C, tras lo que resultó contener DA-DKP 0,5 mM, según lo determinado por espectrometría de masas (concentración final de 14 µg/ml de DA-DKP en los cultivos).
- 25 3. DKP-γ-glob: se filtró un preparado de γ-globulina (obtenido en Sigma, número G-4386) que contenía 12 mg/ml de γ-globulina en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, usando un filtro Centricon 3000, y se usó el filtrado (que contenía componentes que tenían un PM inferior a 3.000). El filtrado contenía una masa de 292, que es la masa de Tyr-Glu DKP (YE-DKP), según lo determinado por HPLC de intercambio aniónico acoplada a espectrometría de masas por electropulverización negativa. El filtrado se usó a una dilución final de 1:4 en los cultivos.

35 Tras la adición de los preparados de DKP o dexametasona, los cultivos se incubaron durante 18 horas a 37 °C. A continuación, se midieron las cantidades de IL-2, IFNγ y TNFα liberadas en cada cultivo por ELISA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL 61105).

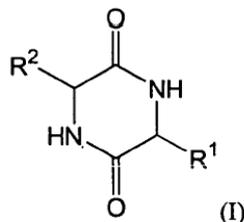
Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 3. Como se puede observar, la mayor reducción de la liberación de las tres citocinas se obtuvo con DKP- γ -glob. La citometría de flujo relativa al número de linfocitos T CD69+ (CD69 es un marcador encontrado en los linfocitos T activados) también mostró que DKP- γ -glob redujo el número de linfocitos T CD69+ en aproximadamente un 90 %, en comparación con una reducción del aproximadamente 50 % por la dexametasona, a pesar de la internalización del complejo de receptor de linfocitos T.

TABLA 3

Estimulación	Tratamiento	U/ml de IL-2	pg/ml de IFN γ	pg/ml de TNF α
Nada	---	0,24 \pm 0,1	2,3 \pm 0,9	2,8 \pm 0,5
CD3	---	2,6 \pm 0,5	289 \pm 35	98 \pm 3,2
CD3	DA-DKP	1,4 \pm 0,3	306 \pm 17	74 \pm 4,7
CD3	DKP-ZLB	1,4 \pm 0,4	311 \pm 18	130 \pm 2,9
CD3	DKP- γ -glob	0,24 \pm 0,25 (reducción del 91 %)	2,1 \pm 0,1 (reducción del 99 %)	1,6 \pm 0,6 reducción del 98 %
CD3	Dexametasona	0,9 \pm 0,1 (reducción del 65 %)	76 \pm 7,32 (reducción del 74 %)	4,1 \pm 0,3 reducción del 96 %)

Se desvelan además y no como parte de la invención, las siguientes cláusulas:

1. Un método de tratamiento de una enfermedad mediada por los linfocitos T, que comprende administrar, a un animal que la necesita, una cantidad eficaz de una dicetopiperazina que tiene la siguiente fórmula:



en la que:

R¹ y R², que pueden ser iguales o diferentes, es cada uno:

(a) una cadena lateral de un aminoácido, en la que el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina; sin embargo, siempre que, cuando R¹ sea la cadena lateral de asparagina o glutamina, entonces R² no pueda ser la cadena lateral de lisina u ornitina, y cuando R¹ sea la cadena lateral de lisina u ornitina, entonces R² no pueda ser la cadena lateral de asparagina o glutamina;

(b) R¹ es -CH₂-CH₂-CH₂- o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina, R² es -CH₂-CH₂-CH₂-o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina; o tanto R¹ como R² son cada uno, de manera independiente, -CH₂-CH₂-CH₂-o -CH₂-CH(OH)-CH₂-, y, junto con los nitrógenos de anillos adyacentes forman prolina e hidroxiprolina; o

(c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en el que el aminoácido es uno de los citados en (a), y la cadena lateral derivatizada tiene:

(i) un grupo -NH₂ reemplazado por un grupo -NHR³ o -N(R³)₂, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(ii) un grupo -OH reemplazado por un grupo -O-PO₃H₂ u -OR³, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iii) un grupo -COOH reemplazado por un grupo -COOR³, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iv) un grupo -COOH reemplazado por un grupo -CON(R⁴)₂, en el que cada R⁴ pueden ser, de manera independiente, H, o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(v) un grupo -SH reemplazado por -S-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH o -S-S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH;

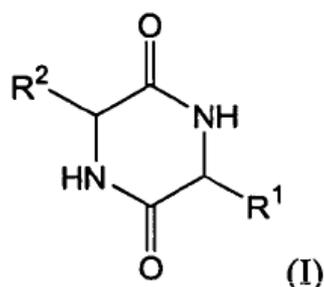
- (vi) un grupo $-CH_2-$ reemplazado por un grupo $-CH(NH_2)-$ o un grupo $-CH(OH)-$;
- (vii) un grupo $-CH_3$ reemplazado por un grupo $-CH_2-NH_2$ o un grupo $-CH_2-OH$; y/o
- (viii) un H que está unido a un átomo de carbono reemplazado por un halógeno; o
- una sal fisiológicamente aceptable de la misma.
2. El método de la Cláusula 1, en el que R^1 , R^2 o ambos es la cadena lateral de ácido aspártico, la cadena lateral de ácido glutámico o un derivado de una cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$.
3. El método de la Cláusula 2, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico o un derivado de la cadena lateral de ácido aspártico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$, y R^2 es la cadena lateral de alanina.
4. El método de la Cláusula 2, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico o un derivado de la cadena lateral de ácido aspártico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$, y R^2 es la cadena lateral de tirosina.
5. El método de la Cláusula 2, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido glutámico o un derivado de la cadena lateral de ácido glutámico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$, y R^2 es la cadena lateral de alanina.
6. El método de la Cláusula 2, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido glutámico o un derivado de la cadena lateral de ácido glutámico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$, y R^2 es la cadena lateral de tirosina.
7. El método de la Cláusula 2, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico, y R^2 es la cadena lateral de alanina.
8. El método de la Cláusula 2, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico, y R^2 es la cadena lateral de tirosina.
9. El método de la Cláusula 1, en el que R^1 y R^2 son ambos una cadena lateral hidrófoba o un derivado de cadena lateral hidrófoba.
10. El método de la Cláusula 9, en el que:
- (a) R^1 y R^2 , que pueden ser iguales o diferentes, es cada uno la cadena lateral de glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina o fenilalanina;
- (b) R^1 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina, y R^2 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina; o
- (c) R^1 es la cadena lateral de glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina o fenilalanina, y R^2 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina.
11. El método de la Cláusula 10, en el que R^1 es la cadena lateral de glicina, y R^2 es la cadena lateral de leucina.
12. El método de la Cláusula 10, en el que R^1 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina, y R^2 es la cadena lateral de fenilalanina.
13. El método de la Cláusula 10, en el que R^1 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina, y R^2 es la cadena lateral de alanina.
14. El método de la Cláusula 1, en el que R^1 , R^2 o ambos es la cadena lateral de metionina, la cadena lateral de arginina o un derivado de estas cadenas laterales.
15. El método de la Cláusula 14, en el que R^1 es la cadena lateral de metionina y R^2 es la cadena lateral de arginina.
16. El método de una cualquiera de las Cláusulas 1-15, en el que el animal es un ser humano.

17. El método de una cualquiera de las Cláusulas 1-15, en el que la enfermedad mediada por los linfocitos T es rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra huésped, una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado no deseada, enfermedad pulmonar mediada por los linfocitos T o una enfermedad autoinmune.

5 18. El método de una cualquiera de las Cláusulas 1-15, en el que la enfermedad mediada por los linfocitos T es esclerosis múltiple, neuritis, polimiositis, soriasis, vitíligo, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, pancreatitis autoinmune, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, glomerulonefritis, escleroderma, sarcoidosis, enfermedades autoinmunes de la tiroides, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, miastenia grave, enfermedad de Addison, uveorretinitis autoinmune, pénfigo vulgar, cirrosis biliar primaria, anemia perniciosa, o lupus eritematoso sistémico.

19. El método de una cualquiera de las Cláusulas 1-15, en el que la enfermedad mediada por los linfocitos T es fibrosis pulmonar o fibrosis pulmonar idiopática.

15 20. Un método de inhibición de la activación de los linfocitos T que comprende administrar, a un animal que la necesita, una cantidad eficaz de una dicetopiperazina que tiene la siguiente fórmula:



en la que:

20 R¹ y R², que pueden ser iguales o diferentes, es cada uno:

(a) una cadena lateral de un aminoácido, en la que el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α-aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina; sin embargo, siempre que, cuando R¹ sea la cadena lateral de asparagina o glutamina, entonces R² no pueda ser la cadena lateral de lisina u ornitina, y cuando R¹ sea la cadena lateral de lisina u ornitina, entonces R² no pueda ser la cadena lateral de asparagina o glutamina;

(b) R¹ es -CH₂-CH₂-CH₂- o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina, R² es -CH₂-CH₂-CH₂-o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina; o tanto R¹ como R² son cada uno, de manera independiente, -CH₂-CH₂-CH₂-o -CH₂-CH(OH)-CH₂-, y, junto con los nitrógenos de anillos adyacentes forman prolina e hidroxiprolina; o

(c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en el que el aminoácido es uno de los citados en (a), y la cadena lateral derivatizada tiene:

(i) un grupo -NH₂ reemplazado por un grupo -NHR³ o -N(R³)₂, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(ii) un grupo -OH reemplazado por un grupo -O-PO₃H₂ u -OR³, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iii) un grupo -COOH reemplazado por un grupo -COOR³, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

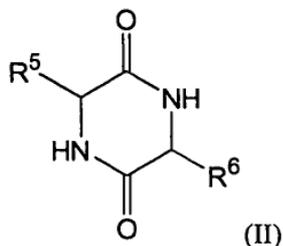
(iv) un grupo -COOH reemplazado por un grupo -CON(R⁴)₂, en el que cada R⁴ pueden ser, de manera independiente, H, o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(v) un grupo -SH reemplazado por -S-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH o -S-S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH;

(vi) un grupo -CH₂- reemplazado por un grupo -CH(NH₂)- o un grupo -CH(OH)-;

- (vii) un grupo $-CH_3$ reemplazado por un grupo $-CH_2-NH_2$ o un grupo $-CH_2-OH$; y/o
- (viii) un H que está unido a un átomo de carbono reemplazado por un halógeno; o
- 5 una sal fisiológicamente aceptable de la misma.
21. El método de la Cláusula 20, en el que R^1 , R^2 o ambos es la cadena lateral de ácido aspártico, la cadena lateral de ácido glutámico o un derivado de una cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$.
- 10 22. El método de la Cláusula 21, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico o un derivado de la cadena lateral de ácido aspártico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$, y R^2 es la cadena lateral de alanina.
- 15 23. El método de la Cláusula 21, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico o un derivado de la cadena lateral de ácido aspártico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$, y R^2 es la cadena lateral de tirosina.
- 20 24. El método de la Cláusula 21, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido glutámico o un derivado de la cadena lateral de ácido glutámico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$, y R^2 es la cadena lateral de alanina.
- 25 25. El método de la Cláusula 21, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido glutámico o un derivado de la cadena lateral de ácido glutámico, en el que el grupo $-COOH$ está reemplazado por un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$, y R^2 es la cadena lateral de tirosina.
26. El método de la Cláusula 21, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico, y R^2 es la cadena lateral de alanina.
- 30 27. El método de la Cláusula 21, en el que R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico, y R^2 es la cadena lateral de tirosina.
28. El método de la Cláusula 20, en el que R^1 y R^2 son ambos una cadena lateral hidrófoba o un derivado de cadena lateral hidrófoba.
- 35 29. El método de la Cláusula 28, en el que:
- (a) R^1 y R^2 , que pueden ser iguales o diferentes, es cada uno la cadena lateral de glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina o fenilalanina;
- 40 (b) R^1 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina, y R^2 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina; o
- 45 (c) R^1 es la cadena lateral de glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina o fenilalanina, y R^2 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina.
30. El método de la Cláusula 29, en el que R^1 es la cadena lateral de glicina, y R^2 es la cadena lateral de leucina.
31. El método de la Cláusula 29, en el que R^1 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina, y R^2 es la cadena lateral de fenilalanina.
- 50 32. El método de la Cláusula 29, en el que R^1 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina, y R^2 es la cadena lateral de alanina.
- 55 33. El método de la Cláusula 20, en el que R^1 , R^2 o ambos es la cadena lateral de metionina, la cadena lateral de arginina o un derivado de estas cadenas laterales.
34. El método de la Cláusula 33, en el que R^1 es la cadena lateral de metionina y R^2 es la cadena lateral de arginina.
- 60 35. El método de una cualquiera de las Cláusulas 20-34, en el que el animal es un ser humano.
36. El método de una cualquiera de las Cláusulas 20-34 en el que la dicetopiperazina se usa para tratar la inflamación o una enfermedad inflamatoria que está causada o agravada, al menos en parte, por la activación de los linfocitos T.
- 65

37. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una dicetopiperazina que tiene la siguiente fórmula:



5 en la que:

R⁵ y R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, es cada uno:

10 (a) una cadena lateral de un aminoácido, en la que el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α-aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, p-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina u ornitina; sin embargo, siempre que, cuando R⁵ sea la cadena lateral de asparagina o glutamina, entonces R⁶ no pueda ser la cadena lateral de lisina u ornitina, y cuando R⁵ sea la cadena lateral de lisina u ornitina, entonces R⁶ no pueda ser la cadena lateral de asparagina o glutamina;

15 (b) R⁵ es -CH₂-CH₂-CH₂- o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina, R⁶ es -CH₂-CH₂-CH₂-o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y, junto con el nitrógeno del anillo adyacente, forma prolina o hidroxiprolina; o tanto R⁵ como R⁶ son cada uno, de manera independiente, -CH₂-CH₂-CH₂-o -CH₂-CH(OH)-CH₂-, y, junto con los nitrógenos de anillos adyacentes forman prolina e hidroxiprolina; o

20 (c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en el que el aminoácido es uno de los citados en (a), y la cadena lateral derivatizada tiene:

25 (i) un grupo -NH₂ reemplazado por un grupo -NHR³ o -N(R³)₂, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

30 (ii) un grupo -OH reemplazado por un grupo -O-PO₃H₂ u -OR³, en el que cada R³ puede ser, de manera independiente, un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iii) un grupo -CH₂- reemplazado por un grupo -CH(NH₂)- o un grupo -CH(OH)-;

35 (iv) un grupo -CH₃ reemplazado por un grupo -CH₂-NH₂ o un grupo -CH₂-OH; y/o

(v) un H que está unido a un átomo de carbono reemplazado por un halógeno; o

una sal fisiológicamente aceptable de la misma.

40 38. El método de la Cláusula 37, en el que R⁵ y R⁶ son ambos una cadena lateral hidrófoba o un derivado de cadena lateral hidrófoba.

39. La composición de la Cláusula 38, en la que:

45 (a) R⁵ y R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, es cada uno la cadena lateral de glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α-aminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina o fenilalanina;

50 (b) R⁵ es -CH₂-CH₂-CH₂- y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina, y R⁶ es -CH₂-CH₂-CH₂- y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina; o

(c) R⁵ es la cadena lateral de glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α-aminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina o fenilalanina, y R⁶ es -CH₂-CH₂-CH₂- y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina.

55 40. La composición de la Cláusula 39, en la que R⁵ es la cadena lateral de glicina y R⁶ es la cadena lateral de leucina.

ES 2 596 180 T3

41. La composición de la Cláusula 39, en la que R⁵ es -CH₂-CH₂-CH₂- y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina, y R⁶ es la cadena lateral de fenilalanina.
- 5 42. La composición de la Cláusula 39, en la que R⁵ es -CH₂-CH₂-CH₂- y, junto con el átomo de nitrógeno adyacente, forma prolina, y R⁶ es la cadena lateral de alanina.
43. La composición de la Cláusula 37, en la que R⁵, R⁶ o ambos es la cadena lateral de metionina, la cadena lateral de arginina o un derivado de estas cadenas laterales.
- 10 44. La composición de la Cláusula 43, en la que R⁵ es la cadena lateral de metionina y R⁶ es la cadena lateral de arginina.
45. Un método de tratamiento de una enfermedad mediada por los linfocitos T, que comprende administrar, a un animal que la necesita, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína o un péptido que se encuentra normalmente en el animal, habiendo sido tratados la proteína o el péptido de manera que la composición también comprenda al menos una dicetopiperazina derivada de la proteína o del péptido.
- 15 46. El método de la Cláusula 45, en el que la proteína es albúmina.
47. El método de la Cláusula 45, en el que la proteína es inmunoglobulina.
- 20 48. El método de la Cláusula 45, en el que la proteína es eritropoyetina.
49. El método de una cualquiera de las Cláusulas 45-48, en el que la composición farmacéutica se administra por vía oral.
- 25 50. El método de una cualquiera de las Cláusulas 45-48, en el que el animal es un ser humano y la proteína o el péptido es una proteína humana o un péptido humano.
- 30 51. Un método de inhibición de la activación de los linfocitos T que comprende administrar, a un animal que la necesita, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína o un péptido que se encuentra normalmente en el animal, habiendo sido tratados la proteína o el péptido de manera que la composición también comprenda al menos una dicetopiperazina derivada de la proteína o del péptido.
- 35 52. El método de la Cláusula 51, en el que la proteína es albúmina.
53. El método de la Cláusula 51, en el que la proteína es inmunoglobulina.
54. El método de la Cláusula 51, en el que la proteína es eritropoyetina.
- 40 55. El método de una cualquiera de las Cláusulas 51-54, en el que la composición farmacéutica se administra por vía oral.
56. El método de una cualquiera de las Cláusulas 51-54, en el que el animal es un ser humano, y la proteína o el péptido es una proteína humana o un péptido humano.
- 45 57. Un método de síntesis de una dicetopiperazina que comprende calentar una solución de una proteína o de un péptido en condiciones eficaces para generar la formación de la dicetopiperazina.
- 50 58. El método de la Cláusula 57, en el que la proteína es albúmina.
59. El método de la Cláusula 57, en el que la proteína es una inmunoglobulina.
60. El método de la Cláusula 57, en el que la proteína es eritropoyetina.
- 55 61. El método de la Cláusula 57, en el que la dicetopiperazina se purifica de la solución.
62. El método de una cualquiera de las Cláusulas 57-61, en el que la solución se calienta durante cuatro días a 60 °C.
- 60 63. Un método de síntesis de una dicetopiperazina que comprende poner en contacto una solución de una proteína o de un péptido con una enzima que escinda los dos aminoácidos N-terminales o los dos aminoácidos C-terminales de la proteína o del péptido en condiciones eficaces para producir la dicetopiperazina.
- 65 64. El método de la Cláusula 63, en el que la proteína es albúmina.

65. El método de la Cláusula 63, en el que la proteína es una inmunoglobulina.
66. El método de la Cláusula 63, en el que la proteína es eritropoyetina.
- 5 67. El método de la Cláusula 63, en el que la enzima es una dipeptidil peptidasa.
68. El método de la Cláusula 63, en el que la enzima es una carboxipeptidasa.
69. El método de una cualquiera de las Cláusulas de 63-68 en el que la dicetopiperazina se purifica de la solución.
- 10 70. Una composición farmacéutica mejorada de una proteína o de un péptido, mejora que comprende un menor contenido de dicetopiperazinas en la composición.
71. La composición de la Cláusula 70, en la que la proteína es albúmina.
- 15 72. La composición de la Cláusula 70, en la que la proteína es una inmunoglobulina.
73. La composición de la Cláusula 70, en la que la proteína es eritropoyetina.
- 20 74. Un método de fabricación de una composición farmacéutica mejorada de una proteína o de un péptido, método que comprende retirar de la composición al menos parte de las dicetopiperazinas presentes en la composición.
75. La composición de la Cláusula 74, en la que la proteína es albúmina.
- 25 76. La composición de la Cláusula 74, en la que la proteína es una inmunoglobulina.
77. La composición de la Cláusula 74, en la que la proteína es eritropoyetina.
78. Un método de fabricación de una composición farmacéutica mejorada de una proteína o de un péptido, método que comprende tratar una solución de la proteína o del péptido para aumentar el contenido de dicetopiperazinas.
- 30 79. El método de la Cláusula 78, en el que la solución se calienta en condiciones eficaces para generar la formación de dicetopiperazinas.
- 35 80. El método de la Cláusula 79, en el que la solución se calienta durante cuatro días a 60 °C.
81. El método de la Cláusula 78, en el que la solución se pone en contacto con una enzima que escinde los dos aminoácidos N-terminales o los dos aminoácidos C-terminales de la proteína o del péptido en condiciones eficaces para producir las dicetopiperazinas.
- 40 82. El método de la Cláusula 81, en el que la enzima es una dipeptidil peptidasa.
83. El método de la Cláusula 81, en el que la enzima es una carboxipeptidasa.
- 45 84. El método de la Cláusula 78, en el que la proteína es albúmina.
85. El método de la Cláusula 78, en el que la proteína es una inmunoglobulina.
- 50 86. El método de la Cláusula 78, en el que la proteína es eritropoyetina.
87. Una composición farmacéutica mejorada de una proteína o de un péptido, mejora que comprende un mayor contenido de dicetopiperazinas en la composición.
88. La composición de la Cláusula 87, en la que la proteína es albúmina.
- 55 89. La composición de la Cláusula 87, en la que la proteína es una inmunoglobulina.
90. La composición de la Cláusula 87, en la que la proteína es eritropoyetina.
- 60 91. La composición de una cualquiera de las Cláusulas 87-90 que es adecuada para la administración oral.

REIVINDICACIONES

1. Un medicamento que comprende dicetopiperazina purificada preparada a partir de una solución disponible en el mercado que comprende una proteína seleccionada entre albúmina, inmunoglobulina o eritropoyetina mediante la purificación de la dicetopiperazina a partir de la solución, donde la dicetopiperazina se selecciona del grupo que consiste en YE-DKP, MR-DKP y DA-DKP.
- 5 2. El medicamento de la Reivindicación 1, donde la proteína es una proteína humana.
- 10 3. El medicamento de la Reivindicación 1 o 2, donde la proteína es albúmina y la dicetopiperazina es DA-DKP.

FIGURA 1

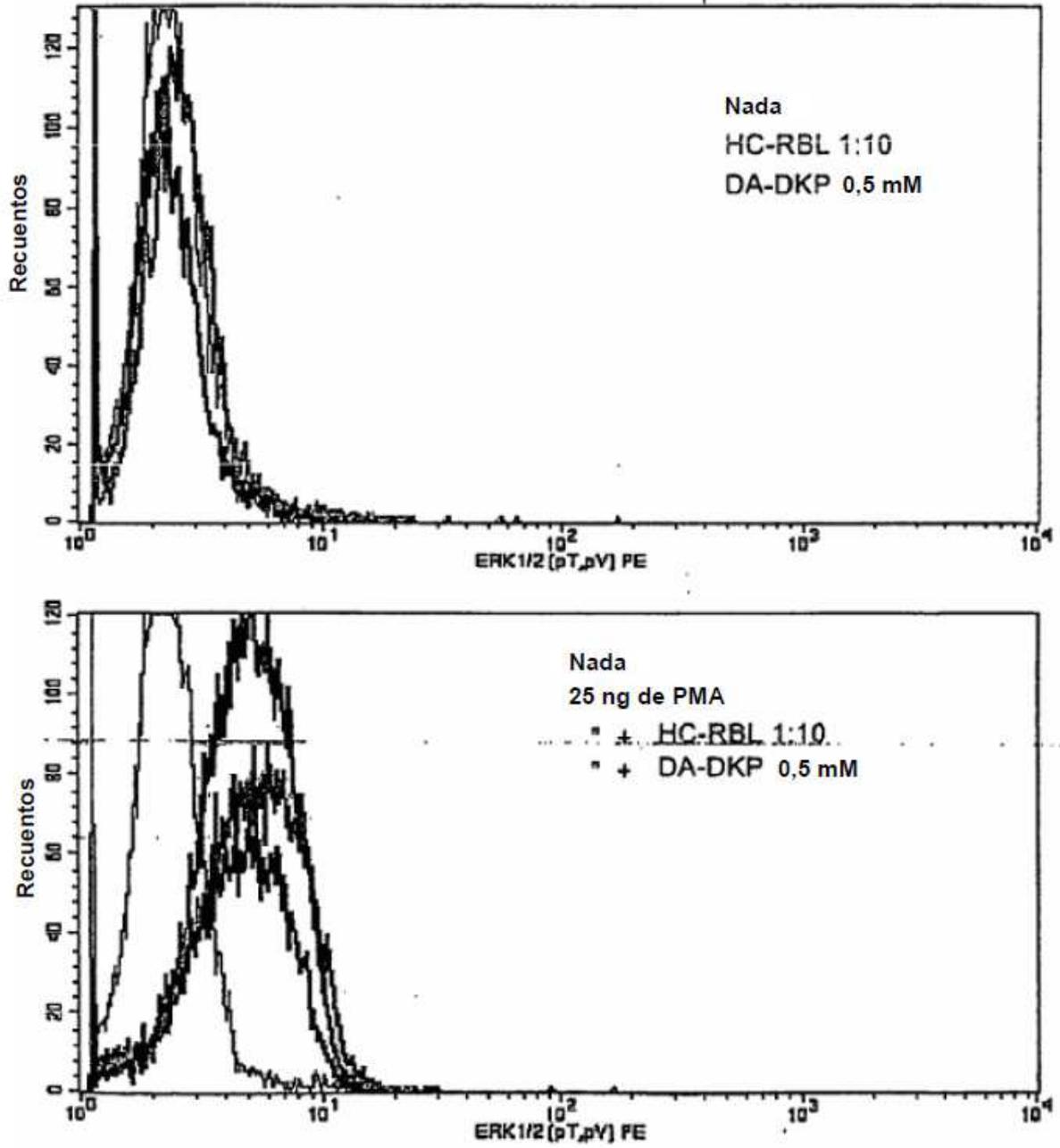


FIGURA 2

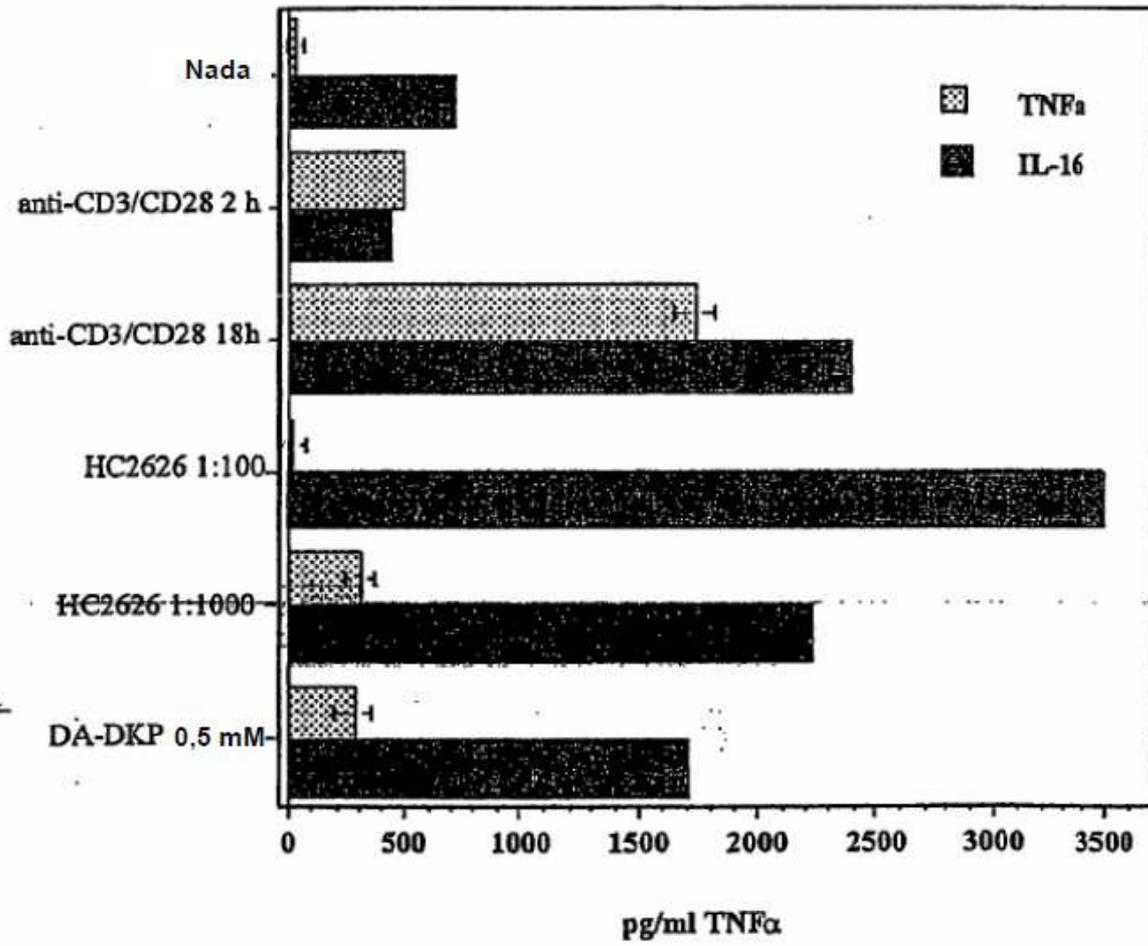


FIGURA 3

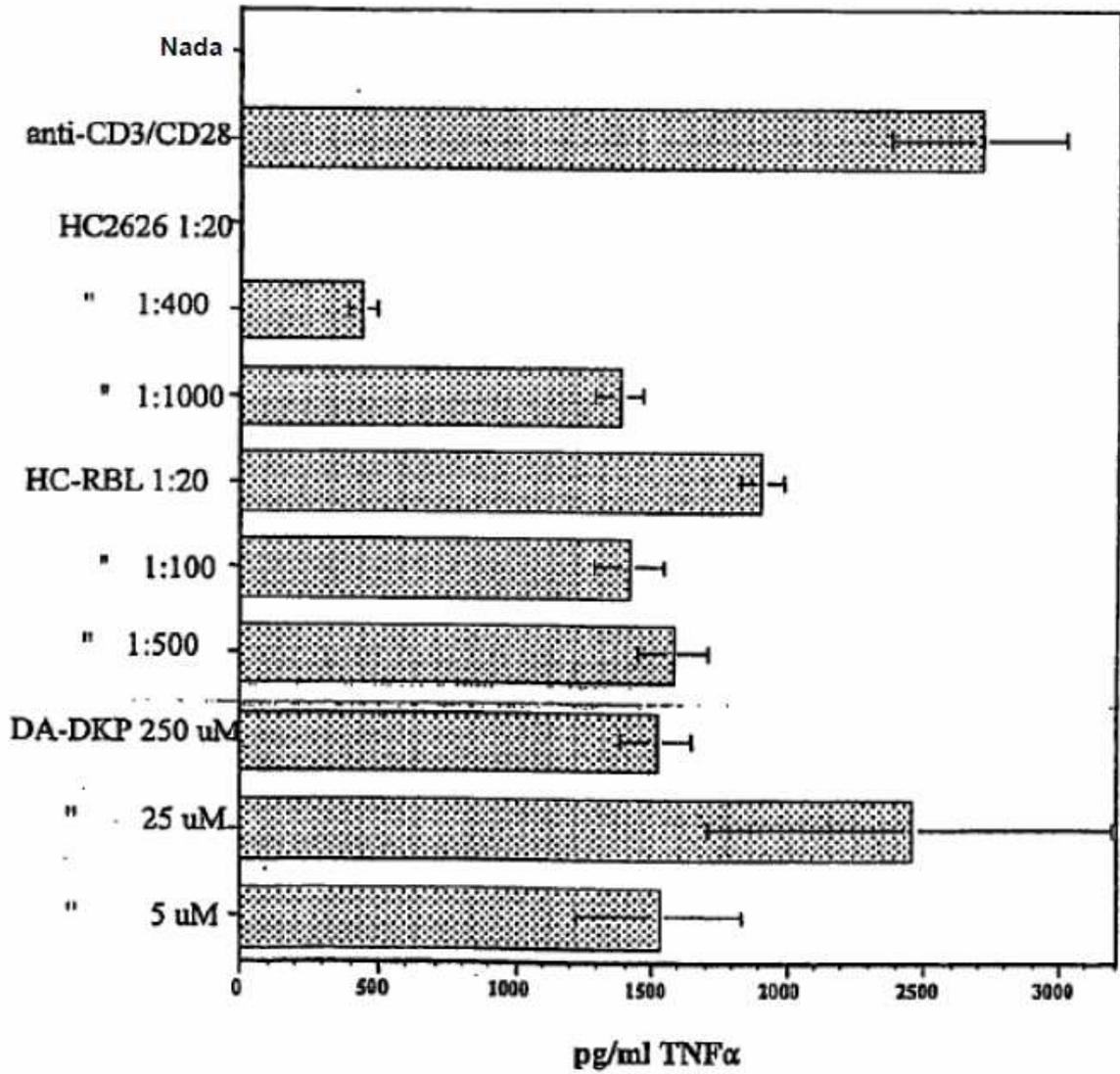
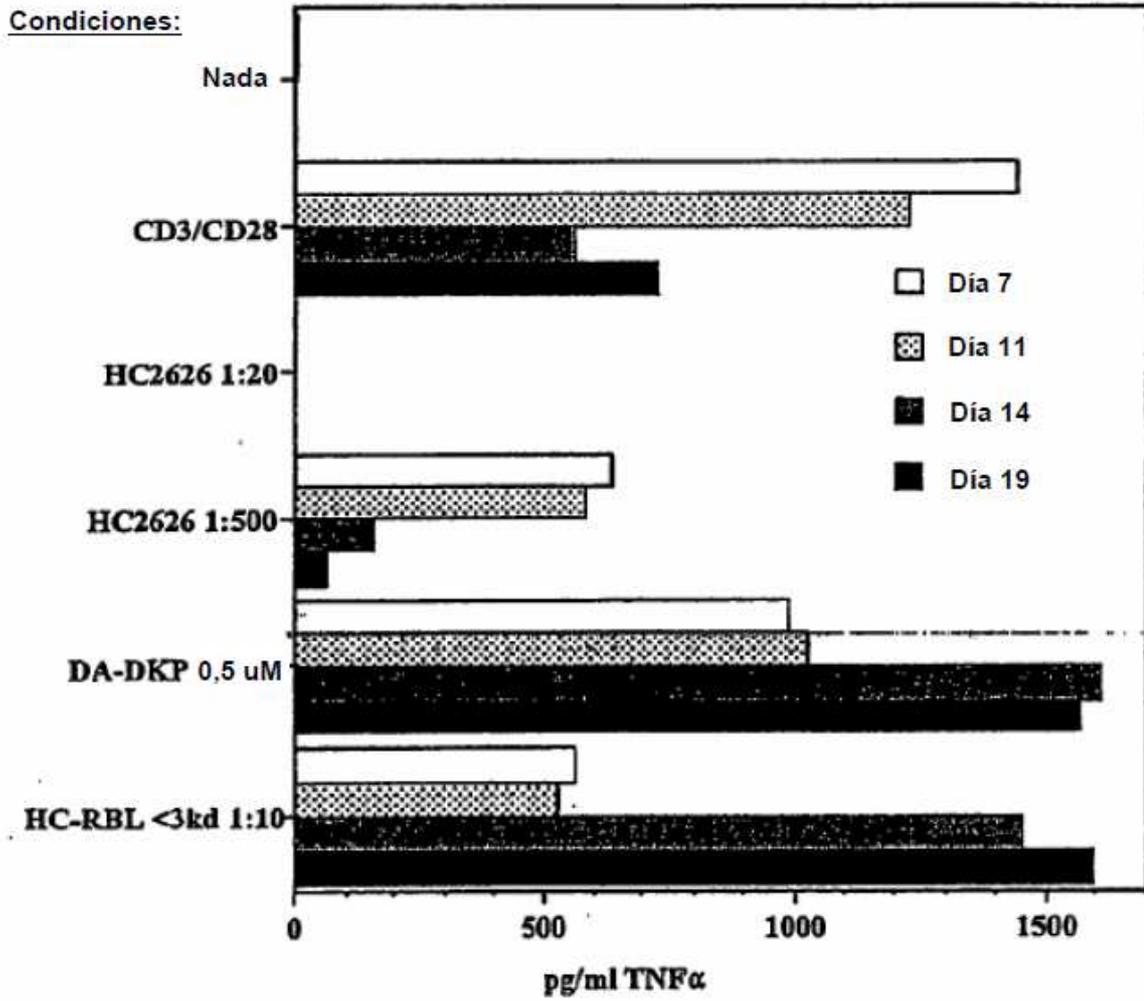


FIGURA 4



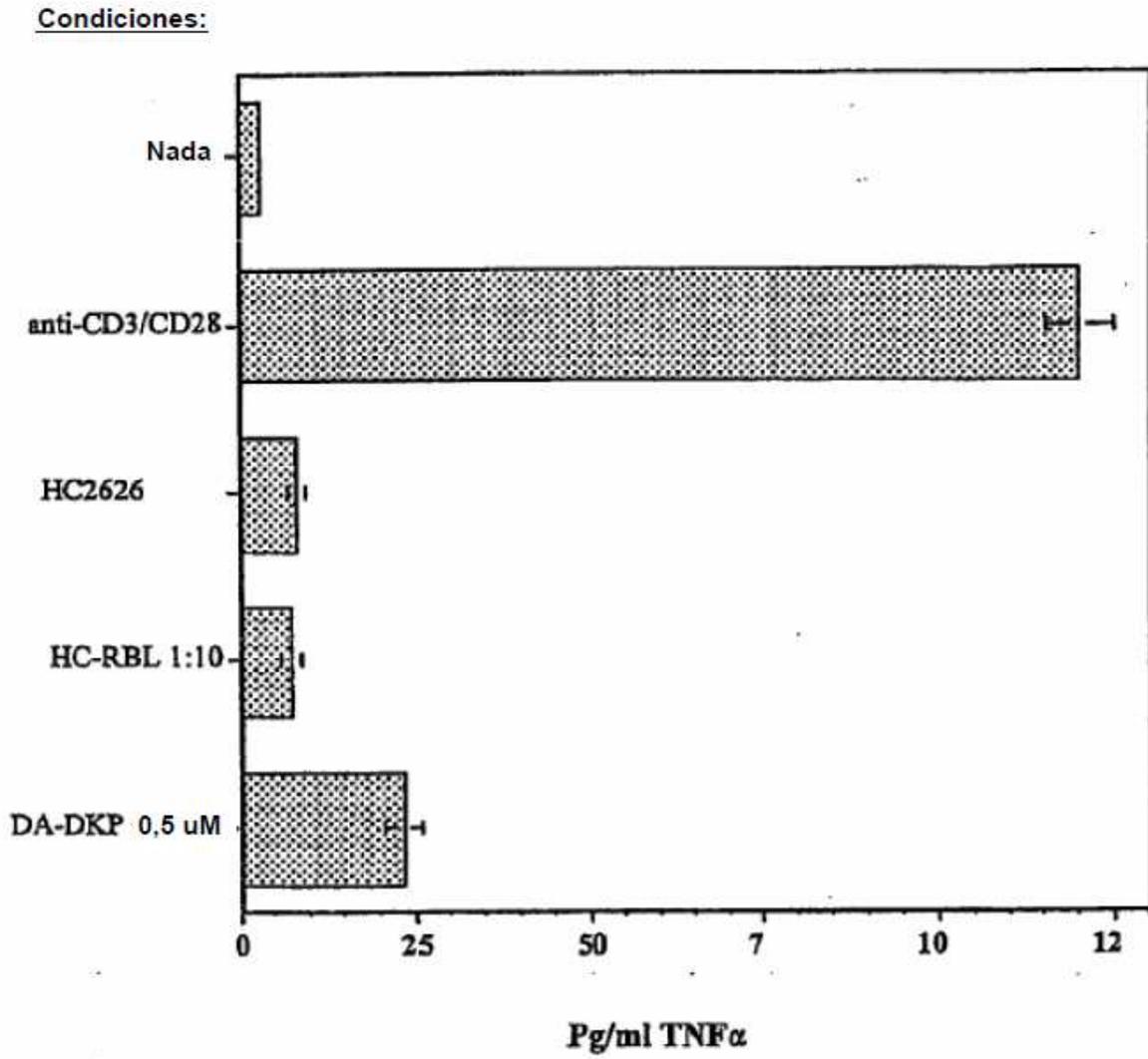


FIGURA 5