

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 205**

51 Int. Cl.:

C07C 233/47 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

C07C 233/11 (2006.01)

C07C 231/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2010 PCT/KR2010/005759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12026639**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2010 E 10856464 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2617707**

54 Título: **Compuesto novedoso que acelera la secreción de péptido antimicrobiano de origen humano, método para preparar el mismo, y composición que tiene el mismo como principio activo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2017

73 Titular/es:

**NEOPHARM CO., LTD. (100.0%)
928 Tamnip-dong Yuseong-gu
Daejeon 305-510, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, BYOEUNG-DEOG;
BAE, JONG-HWAN;
JEONG, SE-KYOO y
GWAK, HYOUNG-SUB**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 610 205 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

Compuesto novedoso que acelera la secreción de péptido antimicrobiano de origen humano, método para preparar el mismo, y composición que tiene el mismo como principio activo

Campo técnico

- 5 La presente descripción se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de síndromes que resultan de una infección por xenoantígenos.

Antecedentes

10 Los péptidos antimicrobianos son materiales antimicrobianos naturales implicados en mecanismos de inmunidad innata *in vivo* y materiales de péptido de bajo peso molecular que conservan actividades antimicrobianas frente a diversos microorganismos que incluyen bacterias, hongos y virus e inducen biofilaxis local y respuesta inmunitaria sistémica. El péptido antimicrobiano tiene generalmente una estructura anfipática y, según el mecanismo antimicrobiano del mismo, una parte de catión del mismo se une a un fosfolípido aniónico incluido en una membrana celular del microorganismo para romper la membrana celular del microorganismo.

15 Las defensinas son uno de los péptidos antimicrobianos que más se han estudiado y se clasifican en su gran mayoría en α -defensina y β -defensina dependiendo de las características estructurales de las mismas. β -defensina es un material péptido que se expresa en el epitelio mucoso tal como la piel, los pulmones, los órganos, los riñones, los órganos reproductivos, etc. Hasta ahora, se han separado e identificado 6 tipos de β -defensinas humanas, β -defensina-1 humana (hBD-1), β -defensina-2 humana (hBD-2), β -defensina-3 humana (hBD-3), β -defensina-4 humana (hBD-4), β -defensina-5 humana (hBD-5) y β -defensina-6 humana (hBD-6). En particular, mientras que hBD-1 se expresa uniformemente en células epidérmicas, hBD-2 se expresa progresivamente en una región infectada o una región físicamente dañada y se conoce que juega un papel importante en el control de una respuesta inmunitaria sistémica y una respuesta inflamatoria. Además, se ha notificado recientemente que hBD-3 se expresa de manera muy elevada en regiones de lesiones cutáneas de pacientes con psoriasis. En los últimos años, se ha conocido recientemente que la β -defensina está implicada no solamente en la filaxis local pero también en
25 inmunidad adquirida que resulta de la migración quimiotáctica de células dendríticas, linfocitos T, monocitos, etc.

Las catelicidinas tienen amplias actividades antimicrobianas y diversas funciones inmunomodulatorias. LL-37, uno de los productos de degradación de catelicidina humana, tiene una estructura de hélice α y tiene amplias actividades antimicrobianas y funciones moduladoras de la inflamación *in vivo*. En otras palabras, LL-37 presenta actividades antimicrobianas directas frente a bacterias, hongos, virus, etc., y quimiotaxia para neutrófilos, células mononucleares y células T, e induce proliferación de endotelios. En particular, LL-37 presente en la piel impulsa la defensa en el momento de penetración de xenoantígenos y, por tanto, tiene funciones inhibitoras de antígenos (Braff MH, Bardan A, Nizet V, *et al.* Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* (2005) 125, 9).

35 Cuando se produce daño físico o infección en la piel, se secretan defensina y LL-37, que son péptidos antimicrobianos, para inducir actividad antimicrobiana y una respuesta inmunitaria sistémica, y particularmente inducir diferenciación y proliferación de queratinocitos epidérmicos, para implicarse de ese modo en la cicatrización (Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, *et al.* Antimicrobial peptides human β -defensins promote epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* (2007) 127, 594). Además, los resultados de estudios han notificado recientemente que la expresión de β -defensina-2, LL-37, etc., que son péptidos antimicrobianos, disminuyó en la piel de pacientes con dermatitis atópica, que es una causa de alta sensibilidad a estafilococo (Ong PY, *et al.* Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis. *The England Journal of Medicine* (2002) 347, 1151-1160).

45 Por tanto, los péptidos antimicrobianos juegan papeles importantes en la defensa primaria y el tratamiento frente a fuentes exógenas de infección. En particular, los péptidos antimicrobianos se inducen por expresión en la piel, inhibiendo así principalmente infecciones de la piel y bloqueando la penetración de fuentes exógenas de infección promoviendo la recuperación de la región dañada y, por tanto, juegan papeles importantes en la protección de la piel y el mantenimiento de la salud cutánea.

50 La técnica relacionada notificó materiales que promueven la secreción de péptidos antimicrobianos *in vivo*. La publicación de patente coreana abierta a consulta por el público n.º 10-2006-0076775 da a conocer que diversos ácidos orgánicos promueven la secreción de β -defensina y la publicación de patente internacional abierta a consulta por el público n.º WO 0168085 da a conocer que el aminoácido, isoleucina, promueve la secreción de defensina. Sin embargo, hay limitaciones en que algunos materiales tienen efectos desfavorables y otros materiales inducen la secreción simultánea de citocinas inflamatorias así como péptidos antimicrobianos. Por este motivo, se han requerido compuestos que tengan una actividad superior para promover la secreción de péptido antimicrobiano y no induzcan la secreción de citocinas inflamatorias. El documento WO 00/40217 A1 da a conocer composiciones

tópicas que comprenden N-acetilaldesaminas o N-acetil aminoácidos útiles para aliviar o mejorar diversos trastornos cosméticos y dermatológicos y afecciones cutáneas asociados con o debido al picor y/o la inflamación. Da a conocer específicamente la preparación de composiciones que contienen N-acetil-L-tirosina y éster metílico de N-acetil-L-tirosina.

- 5 Los presentes inventores sintetizaron diversos materiales para producir nuevos materiales para promover péptidos antimicrobianos durante un largo periodo de tiempo, y realizaron experimentos para determinar las actividades de los mismos. Como resultado, los presentes inventores sintetizaron nuevos compuestos que tienen efectos excelentes para promover la secreción de β -defensinas y LL-37 humanos *in vivo*, y finalizaron la presente invención.

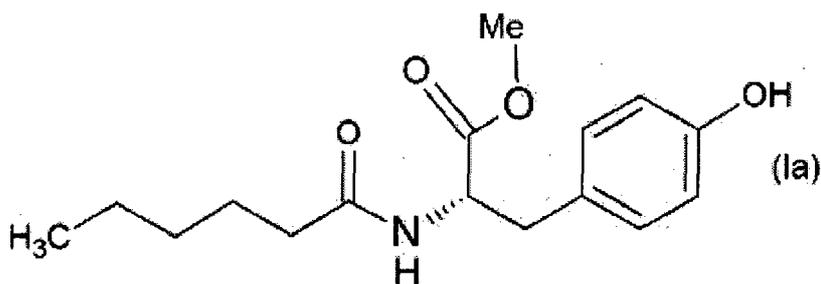
Sumario

- 10 Se ha encontrado un nuevo compuesto para promover la secreción de péptido antimicrobiano humano *in vivo*.

Además, se ha encontrado un método para preparar el nuevo compuesto para promover la secreción de péptidos antimicrobianos humanos *in vivo*.

El objeto de la presente invención es el de proporcionar una composición que incluye el nuevo compuesto para promover la secreción de péptidos antimicrobianos humanos *in vivo* como principio activo.

- 15 En un aspecto general, se proporciona un nuevo compuesto para promover la secreción de péptidos antimicrobianos humanos *in vivo* representado por la fórmula química (Ia) a continuación.

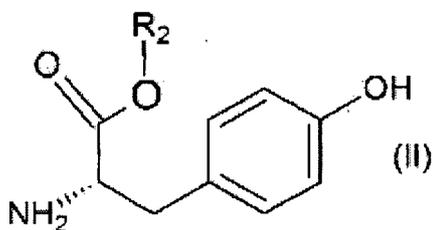


En otro aspecto general, se proporciona un método para preparar un nuevo compuesto para promover la secreción de péptido antimicrobiano *in vivo*, que incluye:

- 20 (A) disolver un compuesto de la fórmula química (II) o clorhidrato del mismo en un disolvente orgánico en presencia de una base orgánica; y

(B) añadir un compuesto de la fórmula química (III) a lo mismo a una temperatura de reacción de 0°C~5°C, seguido de agitación.

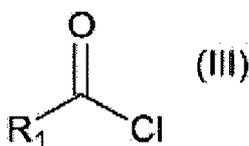
Compuesto de la fórmula química (II)



25

[en la que, en la fórmula química (II), R₂ es metilo]

Compuesto de la fórmula química (III)



[en la que, en la fórmula química (III), R₁ es alquilo C5 de cadena lineal]

En todavía otro aspecto general, se proporciona una composición para promover la secreción de péptidos antimicrobianos *in vivo*, incluyendo la composición el nuevo compuesto de la fórmula química (Ia) como principio activo.

- 5 En este caso, como principio activo, el compuesto de la fórmula química (Ia) puede estar contenido al 0,001-90% en peso, y más preferiblemente el 0,001~50% en peso, en la composición.

10 En este caso, el tipo de formulación de la composición puede no estar particularmente limitado siempre que pueda aplicarse en el cuerpo humano incluyendo membranas mucosas, tales como, piel, vías respiratorias, cavidad bucal, fosas nasales, o similares, como agente de administración local, y puede prepararse la composición en una fase de líquido, una fase de emulsión, una fase de suspensión, una fase de crema, una fase de pomada, una fase de gel, una fase de gelatina o una fase de aerosol.

En este caso, el tipo de formulación de la composición puede no estar particularmente limitado siempre que pueda aplicarse en el cuerpo humano como administración sistémica, y puede prepararse la composición como administración por vía oral, una inyección, o similares.

15 **Efectos ventajosos**

20 Como se expone anteriormente, puesto que los péptidos antimicrobianos humanos, defensina y LL-37, tienen rápidas actividades antimicrobianas y se secretan en diversos tejidos y órganos del cuerpo, incluyendo la piel, se administraron el nuevo compuesto de la presente invención para promover la secreción de defensina y LL-37 y la composición que incluye el mismo para uso externo o para uso interno, presentando de ese modo actividades antimicrobianas eficaces en diversas regiones del cuerpo mientras se superan vías de administración restringidas, generación de bacterias antibióticas, problemas de seguridad, y similares, de los agentes antimicrobianos existentes.

25 El material para promover la secreción de defensina y LL-37 humanos *in vivo* de la presente invención puede inducir la promoción de la secreción de β -defensina-2 y LL-37 *in vivo* en la región aplicada del mismo y, por tanto, potenciar actividades antimicrobianas y funciones inmunitarias, mejorando de este modo la respuesta de defensa biológica. Por tanto, el material para promover la secreción de péptidos antimicrobianos de la presente invención es eficaz en la predicción y el tratamiento de síndromes que resultan de una infección por xenoantígenos, tales como bacterias, hongos y virus. En particular, la presente invención induce un aumento en péptidos antimicrobianos en una región de lesión de dermatitis atópica en la que los péptidos antimicrobianos se reducen y, por tanto, puede obtener ventajas eficaces en la supresión de infecciones de la piel.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un gráfico que muestra los grados de expresión de péptidos antimicrobianos humanos, hBD-2 y LL-37 *in vivo*, por un compuesto de la presente invención;

la figura 2 es un gráfico que muestra la capacidad de recuperación de la barrera cutánea en el ratón recubierto con el compuesto de la presente invención;

35 la figura 3 es un gráfico que muestra la eficacia antiinflamatoria del compuesto de la presente invención en un modelo animal con dermatitis atópica;

la figura 4 es una imagen que muestra los grados de expresión de péptido antimicrobiano de ratón, CRAMP, que tiene una estructura similar al péptido antimicrobiano humano, LL-37, en la capa córnea de la piel, cuando se recubre el compuesto de la presente invención sobre un modelo animal atópico;

40 la figura 5 es una imagen que muestra los grados de proliferación de células en la capa epidérmica cuando se recubre el compuesto de la presente invención sobre un modelo animal atópico;

la figura 6 es un gráfico que muestra mastocitos cuando se recubre el compuesto de la presente invención sobre un modelo animal atópico; y

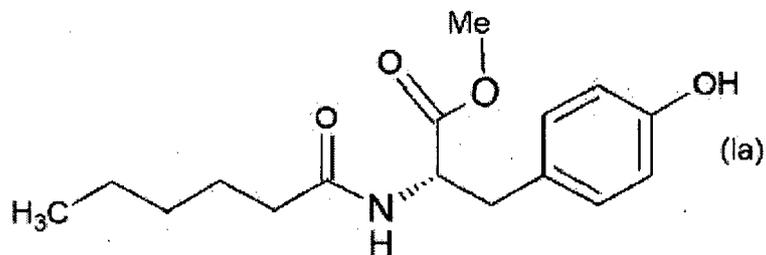
la figura 7 es un gráfico que muestra la citotoxicidad del compuesto de la presente invención.

45 **Descripción detallada de realizaciones**

A continuación en el presente documento, se describirá en detalle un nuevo compuesto para promover la secreción

de péptidos antimicrobianos humanos *in vivo*.

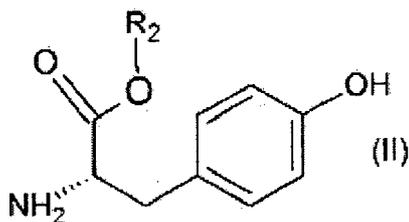
Un nuevo compuesto para promover la secreción de péptidos antimicrobianos humanos *in vivo* tiene una estructura de la fórmula química



- 5 El compuesto de la fórmula química (Ia) se prepara mediante el siguiente método.

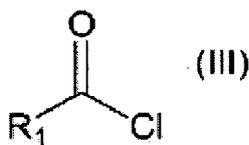
El compuesto de la fórmula química (Ia) puede prepararse incluyendo: disolver un compuesto de la fórmula química (II) o clorhidrato del mismo en un disolvente orgánico en presencia de una base orgánica; añadir un compuesto de la fórmula química (III) a lo mismo a una temperatura de reacción de 0°C~5°C, seguido de agitación; y extraer, secar, y filtrar el material reaccionado.

- 10 Compuesto de la fórmula química (II)



[En la que, en la fórmula química (II), R₂ es metilo.]

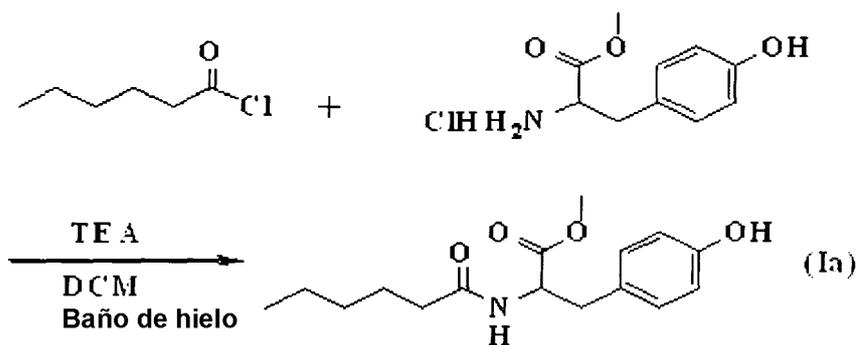
Compuesto de la fórmula química (III)



- 15 [En la que, en la fórmula química (III), R₁ es alquilo C5 de cadena lineal.]

En la reacción anterior, la base orgánica se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en trietilamina, dietilamina, trimetilamina y dimetilamina, y más preferible es trimetilamina. Además, el disolvente orgánico usado en la reacción se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en diclorometano, N,N-dimetilformamida, cloroformo, acetonitrilo y acetona, y más preferible es diclorometano. En la reacción, la etapa (B) se realiza preferiblemente agitando durante 3-4 horas a 0°C.

- 20 El compuesto de la fórmula química (Ia) como compuesto representativo del compuesto de la fórmula química (I) puede prepararse tal como se muestra en el esquema de reacción a continuación.



Se añade diclorometano (DCM) a sal de HCl de éster metílico de (L)-tirosina, y se añade trietilamina (TEA) a lo mismo, disolviendo así la sal de HCl. Se reduce la temperatura del reactor hasta 0°C usando un baño de hielo, y se añade lentamente cloruro de hexanoilo, seguido de agitación durante 3-4 horas. Se añade agua al material reaccionado, seguido de extracción con acetato de etilo. Se realiza secado sobre sulfato de sodio seguido de filtración. Se retira el disolvente del filtrado mediante evaporación rotatoria, seguido de solidificación con hexano y acetato de etilo, obteniendo así un sólido blanco [Compuesto de la fórmula química (Ia)].

En cuanto a los resultados de experimentos que confirman si el compuesto así sintetizado de la fórmula química (Ia) simula la secreción de β -defensina y catelicidina, puede observarse que el compuesto de la presente invención promueve la secreción de β -defensina-2 y LL-37 en células humanas que se cultivan.

Además, puede confirmarse que usando el compuesto de la fórmula química (Ia) se aumenta la expresión de péptidos antimicrobianos en la piel y se mejoran la eficacia antiinflamatoria y la función de la barrera cutánea como resultado de la aplicación a un modelo animal con dermatitis atópica, y se promueve significativamente la recuperación de la barrera cutánea como resultado de experimentos que usan un modelo animal con alteración aguda de la barrera cutánea.

[Ejemplos]

A continuación en el presente documento, se describirá la presente invención mediante los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1

20 Preparación de propanoato de (S)-metil-2-(hexanamido)-3-(4-hidroxifenilo)

Se añadieron 200 ml de diclorometano (DCM) a sal de HCl de éster metílico de (L)-tirosina (23,16 g, 0,1 mol), y se añadieron 28 ml de trietilamina (TEA, 0,2 mol) a lo mismo, disolviendo así la sal de HCl. Se redujo la temperatura del reactor hasta 0°C usando un baño de hielo, y se añadió lentamente cloruro de hexanoilo (13,8 ml, 0,1 mol), seguido de agitación durante 3~4 horas. Se añadieron 200 ml de agua al material reaccionado, seguido de extracción con 400 ml de acetato de etilo. Se realizó secado sobre sulfato de sodio seguido de filtración. Se eliminó el disolvente del filtrado mediante evaporación rotatoria, seguido de solidificación con hexano y acetato de etilo, obteniendo así un sólido blanco (27,1 g, el 92,5% de rendimiento) [a continuación en el presente documento denominado compuesto la].

p.f.: 96°C

30 RMN (400 MHz CDCl₃) ¹H. 0,873 (3H, t, CH₃CH₂), 1,261(4H, m, CH₃CH₂CH₂), 1,584(2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CO), 2,175(2H, t, CH₂CH₂CO), 2,955~3,118(2H, dd,dd, CHCH₂Ph), 3,742(3H, s, OCH₃), 4,883(1H, m, CH₂CH(NH)CO), 5,922(1H,d, NH), 6,720(2H, d, CHC(OH)CH), 6,933(2H, d, CH(CH₂)CCH)

Ejemplo de referencia 2

Preparación de propanoato de (S)-metil-3-(4-hidroxifenil)-2-(octanamido)

35 Se añadieron 200 ml de diclorometano (DCM) a sal de HCl de éster metílico de (L)-tirosina (23,16 g, 0,1 mol), y se añadieron 28 ml de trietilamina (TEA, 0,2 mol) a lo mismo, disolviendo así la sal de HCl. Se redujo la temperatura del reactor hasta 0°C usando un baño de hielo, y se añadieron lentamente 16,6 ml de cloruro de octanoilo (0,1 mol), seguido de agitación durante 3-4 horas. Se añadieron 200 ml de agua al material reaccionado, seguido de extracción con 400 ml de acetato de etilo. Se realizó secado sobre sulfato de sodio seguido de filtración. Se eliminó el

disolvente del filtrado mediante evaporación rotatoria, seguido de separación mediante cromatografía en columna usando hexano y acetato de etilo (Hex:EA=2:1), obteniendo así un sólido blanco (30,1 g, el 93,3% de rendimiento).

p.f. : 76°C

5 RMN (400 MHz CDCl₃) ¹H : 0,881(3H,t, CH₃CH₂) , 1,262 (8H, m, CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂) , 1,581(2H, m, CH₂CH₂CH₂CO), 2,177(2H, t, CH₂CH₂CO), 2,960~3. 111(2H, dd,dd, CHCH₂Ph) , 3,740(3H, s, OCH₃), 4,888(1H, m, CH₂CH(NH)CO) , 5,926(1H, d, NH), 6,725(2H, d, CHC(OH)CH), 6,931(2H, d, CH(CH₂)CCH)

Ejemplo de referencia 3

Preparación de propanoato de (S)-metil-2-(dodecanamido)-3-(4-hidroxifenilo)

10 Se añadieron 300 ml de diclorometano (DCM) a sal de HCl de éster metílico de (L)-tirosina (23,16 g, 0,1 mol) y se añadieron 28 ml de trietilamina (TEA, 0,2 mol) a lo mismo, disolviendo así la sal de HCl. Se redujo la temperatura del reactor hasta 0°C usando un baño de hielo, y se añadieron lentamente 21,88 g de cloruro de dodecanoilo (0,1 mol), seguido de agitación durante 3-4 horas. Se añadieron 200 ml de agua al material reaccionado, seguido de extracción con 500 ml de acetato de etilo. Se realizó secado sobre sulfato de sodio seguido de filtración. Se eliminó el disolvente del filtrado mediante evaporación rotatoria, seguido de separación mediante cromatografía en columna usando hexano y acetato de etilo (Hex:EA=2:1), obteniendo así un sólido blanco (34,2 g, el 90,5% de rendimiento).

15 p.f. : 89°C

RMN (400 MHz CDCl₃) ¹H : 0,881(3H, t, CH₃CH₂), 1,262(16H, m, CH₃ (CH₂)₈), 1,581(2H, m, CH₂CH₂CH₂CO), 2,177(2H, t, CH₂CH₂CO), 2,960~3,111(2H, dd,dd, CHCH₂Ph), 3,740(3H, s, OCH₃), 4,888(1H, m, CH₂CH(NH)CO) , 5,926(1H, d, NH), 6,725(2H, d, CHC(OH)CH), 6,931(2H, d, CH(CH₂)CCH)

20 Ejemplo de referencia 4

Preparación de propanoato de (S)-metil-3-(4-hidroxifenil)-2-(palmitamido)

25 Se añadieron 300 ml de diclorometano (DCM) a sal de HCl de éster metílico de (L)-tirosina (23,16 g, 0,1 mol), y se añadieron 28 ml de trietilamina (TEA, 0,2 mol) a lo mismo, disolviendo así la sal de HCl. Se redujo la temperatura del reactor hasta 0°C usando un baño de hielo, y se añadieron lentamente 27,49 g de cloruro de palmitoilo (0,1mol), seguido de agitación durante 3-4 horas. Se añadieron 200 ml de agua al material reaccionado, seguido de extracción con 500 ml de acetato de etilo. Se realizó secado sobre sulfato de sodio seguido de filtración. Se eliminó el disolvente del filtrado mediante evaporación rotatoria, seguido de solidificación con hexano y acetato de etilo, obteniendo así un sólido blanco (39,4 g, el 90,8% de rendimiento).

p.f. : 100°C

30 RMN (400 MHz CDCl₃) ¹H : 0,881(3H, t, CH₃CH₂), 1,262 (24H, m, CH₃(CH₂)₁₂), 1,581(2H,m, CH₂CH₂CH₂CO), 2,177(2H, t, CH₂CH₂CO), 2,960~3,111(2H, dd,dd, CHCH₂Ph), 3,740(3H,s, OCH₃), 4,888(1H,m, CH₂CH(NH)CO), 5,926(1H, d, NH), 6,725(2H,d, CHC(OH)CH), 6,931(2H,d, CH(CH₂)CCH)

Ejemplo de referencia 5

Preparación de propanoato de (S)-metil-3-(4-hidroxifenil)-2-(fenilacetamido)

35 Se añadieron 200 ml de diclorometano (DCM) a sal de HCl de éster metílico de (L)-tirosina (23,16 g, 0,1 mol), y se añadieron 28 ml de trietilamina (TEA, 0,2 mol) a lo mismo, disolviendo así la sal de HCl. Se redujo la temperatura del reactor hasta 0°C usando un baño de hielo, y se añadieron lentamente 15,46 g de cloruro de fenilacetilo (0,1 mol), seguido de agitación durante 3~4 horas. Se añadieron 200 ml de agua al material reaccionado, seguido de extracción con 400 ml de acetato de etilo. Se realizó secado sobre sulfato de sodio seguido de filtración. Se eliminó el disolvente del filtrado mediante evaporación rotatoria, seguido de solidificación con hexano y acetato de etilo, obteniendo así un sólido blanco (27,7 g, el 88,1% de rendimiento).

40 p.f. : 101°C

45 RMN (400 MHz CDCl₃) ¹H. 2,852~3,032(2H, dd,dd, CHCH₂Ph), 3,554(2H, s, PhCH₂CO) 3,709(3H, s, OCH₃), 4. 837 (1H, m, CH₂CH(NH)CO), 5,917(1H, d, NH), 6,628(2H, d, CHC(OH)CH), 6,724(2H, d, CH(CH₂)CCH), 7,155-7,348 (5H, m, PhCH₂)

Ejemplo 6: Producción de formulación de crema

Se produjo una formulación de crema que tiene la siguiente composición mediante un método general para formar cremas.

Tabla 1

	Función	Componente	Peso (%)
Fase acuosa	Antiséptico	Metilparabeno	0,2
	Polímero	Goma xantana	0,1
	Hidratante	Glicerina	8,0
	Agua purificada	Agua	74,0
Fase aceitosa	Ácido graso	Ácido esteárico	2,0
	Alcohol superior	Cetanol	2,0
	Cera	Cera de abeja	2,0
	Tensioactivo	POE(15) GMS	2,5
	Tensioactivo	POE(10) GMS	1,0
	Tensioactivo	GMS	1,5
	Aceite	Aceite de nuez de macadamia	3,0
	Aceite	Escualeno	3,0
	Antiséptico	Propilparabeno	0,1
	Principio activo	Material sintetizado del ejemplo1 (Compuesto 1a)	0,5
Aditivo	Aroma	Fragancia	0,1

5

Se confirmó que la crema producida a partir del ejemplo 6 tenía una estabilidad de almacenamiento y sensación de uso excelentes.

Para evaluar la promoción de secreción de péptido antimicrobiano usando el compuesto la del ejemplo 1, se realizaron experimentos *in vitro*.

10 Ejemplo de prueba 1: Promoción de la secreción de β -defensina y LL-37

Se usó un medio que contenía el 1% de penicilina/estreptomina pero no suero para cultivar queratinocito humano (HaCaT). Se cultivó el queratinocito humano en un incubador con el 5% de CO₂ a 37°C. Se sembraron las células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos a 3x10⁵ células/pocillo, y entonces se cultivaron durante 48 horas. Se añadieron a lo mismo cloruro de calcio 1,7 mM y el nuevo material sintetizado a partir del ejemplo 1, y se dejaron cultivar las células durante 24 horas.

15

Para la evaluación, se usaron juntos al menos un control no tratado y al menos un control positivo. Se usaron 2,5 ng/mL de lipopolisacáridos (LPS), que se sabe que promueven la expresión de hBD-2 y LL-37, como control positivo, y se dejó reaccionar. Después de que finalizara la reacción, se recogió un sobrenadante, y entonces se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS) y se recogieron usando una disolución de tripsina-EDTA, y se almacenaron en un tubo. Se añadió 1 ml de un reactivo de triazol para extraer ARNm. Después de reaccionar durante 15 segundos a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ l de cloroformo. Se realizó separación centrífuga a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante en otro tubo, y entonces se añadieron 500 μ l de isopropanol a lo mismo, seguido de separación centrífuga a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se lavó el ARN precipitado usando etanol al 70%. Después de realizar el lavado dos veces, se disolvió ARN usando agua destilada en el momento del tercer lavado. Se analizó el ARN diluido a una longitud de onda de entre 260 nm y 280 nm, y se cuantificó.

20

25

Se sometió el ARN así obtenido a procedimiento de RT-PCR para obtener resultados de PCR. Para el RT-PCR, se colocaron en el tubo 2 μ l de MgCl₂, 1 μ l de tampón de RT, 1 μ l de mezcla de dNTP, 0,25 μ l de inhibidor de RNasa, 0,5 μ l de RTasa, 0,5 μ l de oligo dT, 3,75 μ l de agua destilada, y 2 μ l de ARN, y se dejaron reaccionar. Las condiciones de RT-PCR fueron 45°C durante 1 hora y 95°C durante 5 minutos. Se realizó PCR para análisis cuantitativo en GAPDH, hBD-2 y -3, y LL-37. Se obtuvieron los cebadores usados de los siguientes documentos (Kim JE, Kim BJ, Jeong MS, *et al*, Expression and Modulation of LL-37 in Normal Human Keratinocytes HaCaT Cells and Inflammatory Skin Diseases. J Korean Med Sci (2005) 20, 649; Pernet I, Reymermier C, Guezennec A, *et al*, Calcium triggers beta-defensin (hBD-2 and hBD-3) and chemokine macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3alpha/CCL20) expression in monolayers of activated human keratinocytes. Exp Dermatol (2003) 12, 755).

30

35

Los cebadores usados son como sigue.

GAPDH sentido: 5'-GGG CAT GAA CCA TGA GAA GT-3'

GAPDH antisentido: 5'-GTC TTC TGG GTG GCA GTG AT-3'

hBD-2 sentido: 5'-CCA GCC ATC AGC CAT GAG GGT-3'

hBD-2 antisentido: 5'-GGA GCC CTT TCT GAA TCC GCA-3'

5 hBD-3 sentido: 5'-TTC CAG GTC ATG GAG GAA TC-3'

hBD-3 antisentido: 5'-GAG CAC TTG CCG ATC TGT TC-3'

TNF- α sentido: 5'-GAG AAG GGT GAC CGA CTC AG-3'

TNF- α antisentido: 5'-ATG TTC GTC CTC CTC ACA GG-3'

LL-37 sentido: 5'-TCG GAT GCT AAC CTC TAC CG-3'

10 LL-37 antisentido: 5'-GGG TAC AAG ATT CCG CAA AA-3'

Se introdujeron 12,5 μ l de mezcla previa de PCR, 2 μ l de cebador sentido (10 uM), 2 μ l de cebador antisentido (10 uM), 1,5 μ l de ADNc y 7 μ l de agua destilada, y entonces se realizó PCR. Las condiciones de PCR de hBD-2 y -3 fueron 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y entonces 72°C durante 10 minutos. Las condiciones de PCR de LL-37 fueron 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y entonces 72°C durante 10 minutos. Tras la amplificación, se mezclaron juntos los productos finales, se cargó la disolución final en gel de agarosa que contiene una inserción de ácido nucleico visible bajo UV (tal como, bromuro de etidio), que se gelifica al 1,5%. Se migró la muestra y entonces leyó bajo UV en una habitación oscura, y se fotografió digitalmente. Se analizaron las fotos del gel mediante software de procesamiento de imágenes que cuantifica las intensidades de banda. Ya que los niveles basales de expresión de defensina y LL-37 (control no tratado) no fueron detectables, la expresión de péptido antimicrobiano fue detectable usando razones de intensidad de las bandas de hBD-2/GAPDH, hBD-3/GAPDH y LL-37/GAPDH en los grupos de control positivo y tratados con muestra. Se realizó PCR en tiempo real para clarificar más estos resultados. Se introdujeron 5 μ l de Sybergreen, 2 μ l de cebador sentido (10 uM), 2 μ l de cebador antisentido (10 uM), 1 μ l de ADNc y 1 μ l de agua destilada, y entonces se realizó PCR en tiempo real.

25 Los resultados se muestran en la figura 1. Como puede observarse en la figura 1, puede observarse que el compuesto de la presente invención promueve la secreción de β -defensina-2 y LL-37 humanos a partir de células de origen humano cultivadas.

Ejemplo de prueba 2: Recuperación del daño de la barrera cutánea

30 Se dañaron intensamente las barreras cutáneas de ratones desnudos, y entonces se evaluaron los efectos del nuevo material representado en el ejemplo 1 sobre la recuperación de barreras cutáneas agudas. Se usó D-Squame para inducir daño de la barrera cutánea en las regiones izquierda y derecha de la espalda de ratones desnudos de 6-8 semanas de edad. En este caso, todos los grupos experimentales se mantuvieron para no tener diferencias en la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) a través de la medición de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL), y entonces, se recubrieron el vehículo (PEG:EtOH=7:3) y el nuevo material representado en el ejemplo. Se midió la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) en el momento de 0 h, 3 h, 6 h y 24 h para confirmar la recuperación de la barrera cutánea, y se realizaron biopsias de la piel en el momento respectivo, para así implementar exámenes histológicos y otros exámenes.

40 Los resultados se muestran en la figura 2. Puede confirmarse a partir de los resultados de la figura 2 que el nuevo compuesto de la presente invención muestra resultados significativos sobre la recuperación del daño de la barrera cutánea.

Ejemplo de prueba 3: Evaluación de la eficacia en modelo animal con dermatitis atópica

45 Se construyó un modelo animal con dermatitis atópica recubriendo los abdómenes de ratones desnudos de 6-8 semanas de edad con disolución de oxazolona al 5% una vez para sensibilización percutánea; tras la semana, con disolución de oxazolona al 0,1% cada dos días, seis veces, y disolución de oxazolona al 1% cada dos días, cuatro veces. Se ha notificado que en el caso del modelo animal con dermatitis atópica usando oxazolona, se redujeron los péptidos antimicrobianos en la piel (Man M-Q, Hatano Y, Lee SH, *et al.* Characterization of a hepten-induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic, and biochemical changes following single

versus multiple oxazolone challenges. J Invest Dermatol (2008) 128, 79-86). Se recubrió la piel del modelo animal con dermatitis atópica construido como antes con vehículo (PEG:EtOH=7:3) y compuesto la del ejemplo 1 diluido con el vehículo a una concentración del 0,1% una vez por la mañana y por la tarde durante un total de cuatro días. En el último día, se midió el grosor de la piel. Se usó el fármaco basado en corticosteroides, dexametasona, que es un agente antiinflamatorio eficaz, como control positivo.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3. Estos resultados confirmaron que el nuevo material sintetizado según el ejemplo tenía un efecto inflamatorio en el modelo animal con dermatitis atópica.

El nuevo compuesto sintetizado según el ejemplo 1 se recubrió durante cuatro días, y entonces se realizó biopsia del tejido cutáneo para formar un bloque de parafina. Se dejó adherir el tejido al portaobjetos usando una cuchilla de parafina. Después de que se cargaran 500 µl de un reactivo de bloqueo de peróxidos, se realizó la reacción durante 30 minutos. Se realizó el lavado con disolvente de PBS tres veces en el intervalo de tiempo de 5 minutos. Después de que se cargaran 500 µl de un reactivo de bloqueo de peróxidos, se realizó la reacción durante 15 minutos. Se dejó reaccionar el primer CRAMP de cabra anti-ratón a 25°C durante 30 minutos. Se realizó la reacción usando IgG-HRP de burro anti-cabra como anticuerpo a 25°C durante 30 minutos. Se realizó la reacción usando DAB como agente de formación del color durante 10 minutos. Después de que finalizara la reacción, se midió la expresión de CRAMP en la capa córnea de la piel a través de un microscopio. Se tabularon los resultados obtenidos en la tabla 4. A), B), C) y D) de la figura 4 muestran normal, control negativo, dexametasona al 0,01% y compuesto 1a al 0,1%, respectivamente.

Se usó otro portaobjetos para medir antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Después de que se cargaran 500 µl de un reactivo de bloqueo de peróxidos, se realizó la reacción durante 30 minutos. Se realizó el lavado con disolvente de PBS tres veces en un intervalo de tiempo de 5 minutos. Después de que se cargaran 500 µl de un reactivo de bloqueo de peróxidos, se realizó la reacción durante 15 minutos. Se dejó reaccionar el primer PCNA de conejo anti-ratón a 25°C durante 30 minutos. Se realizó la reacción usando IgG-HRP de burro anti-conejo como anticuerpo a 25°C durante 30 minutos. Se realizó la reacción usando DAB como agente de formación del color durante 10 minutos. Después de que finalizara la reacción, se midió la proliferación de células cutáneas en la capa epidérmica de la piel a través de un microscopio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.

Se usó otro portaobjetos para medir mastocitos. Después de que se retirara parafina del portaobjetos, se realizó la reacción en la disolución de permanganato de potasio durante 2 minutos. Se lavó el portaobjetos usando agua destilada. Se realizó la reacción en la disolución de metabisulfito de potasio durante 1 minuto. Se lavó el portaobjetos usando agua destilada durante 3 minutos. Se realizó la reacción en la disolución de azul de toluidina acidificada durante 5 minutos. Se lavó el portaobjetos usando agua destilada. Después de que finalizara la reacción, se midieron los mastocitos de la piel a través de un microscopio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.

Puede observarse a partir de los resultados de las pruebas anteriores que el nuevo compuesto de la presente invención tiene eficacia inflamatoria superior y promueve significativamente la mejora y recuperación de la barrera cutánea.

Ejemplo de prueba 4: Citotoxicidad

Se usó un medio que contenía el 1% de penicilina/estreptomicina pero no suero para cultivar queratinocito humano (HaCaT). Se cultivó el queratinocito humano un incubador con el 5% de CO₂ a 37°C. Se sembraron las células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a 2,5x10⁴ células/pocillo, y entonces se cultivaron durante 48 horas. Se cultivaron las células adicionalmente durante 24 horas usando un medio sin suero. Al día siguiente, se añadió el nuevo material sintetizado por el ejemplo a diferentes concentraciones del mismo, y entonces se realizó la reacción durante 24 horas. Tras cuatro horas después de que se pusiera el reactivo de formación de color, se midió la apoptosis a una absorbancia de 590 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.

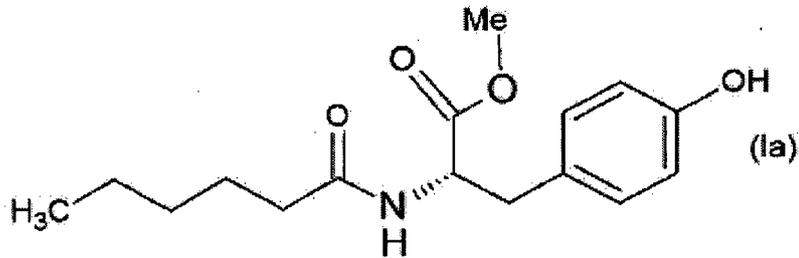
Puede observarse de los resultados de las pruebas anteriores que el nuevo compuesto de la presente invención tampoco tiene problemas en cuanto a la estabilidad.

Aplicabilidad industrial

La presente invención se basa en el hallazgo de un compuesto novedoso industrialmente aplicable que puede inducir la expresión directa o indirecta de β-defensina-2 y -3 y LL-37 humanos, que son péptidos antimicrobianos humanos, un método para preparar el mismo, y una composición que comprende el mismo como principio activo.

REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso en el tratamiento de síndromes que resultan de una infección por xenoantígenos, tales como bacterias, hongos y virus, promoviendo la composición la secreción de péptidos antimicrobianos *in vivo*, comprendiendo la composición un compuesto de la fórmula química (Ia) a continuación como principio activo:



2. Composición según la reivindicación 1, en la que el compuesto como principio activo está contenido al 0,001~90% en peso.

3. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición es una formulación seleccionada del grupo que consiste en una fase de líquido, una fase de emulsión, una fase de suspensión, una fase de crema, una fase de pomada, una fase de gel, una fase de gelatina y una fase de aerosol.

10

4. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición es una formulación seleccionada del grupo que consiste en un comprimido, un líquido, un polvo y una inyección.

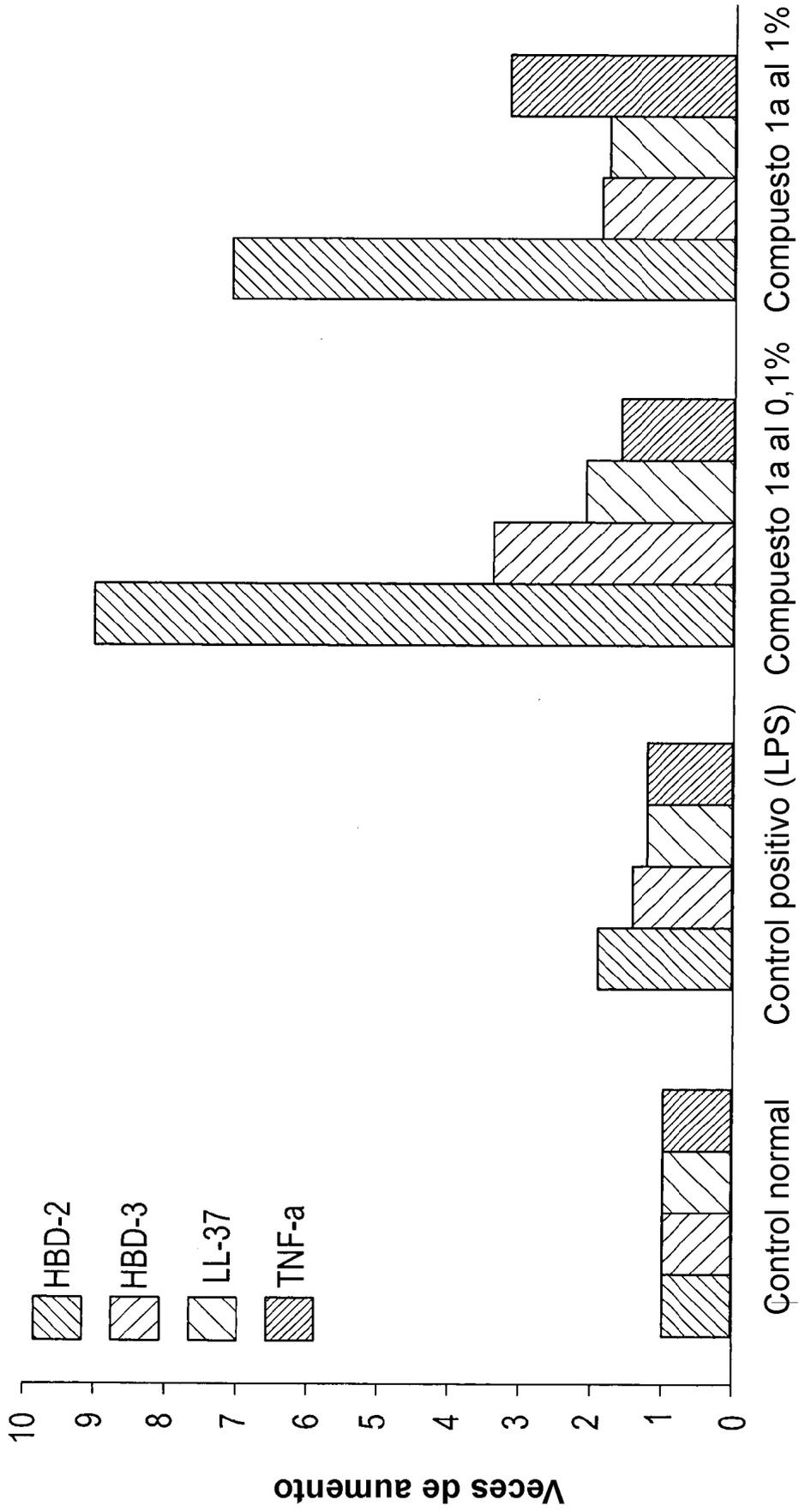


FIG. 1

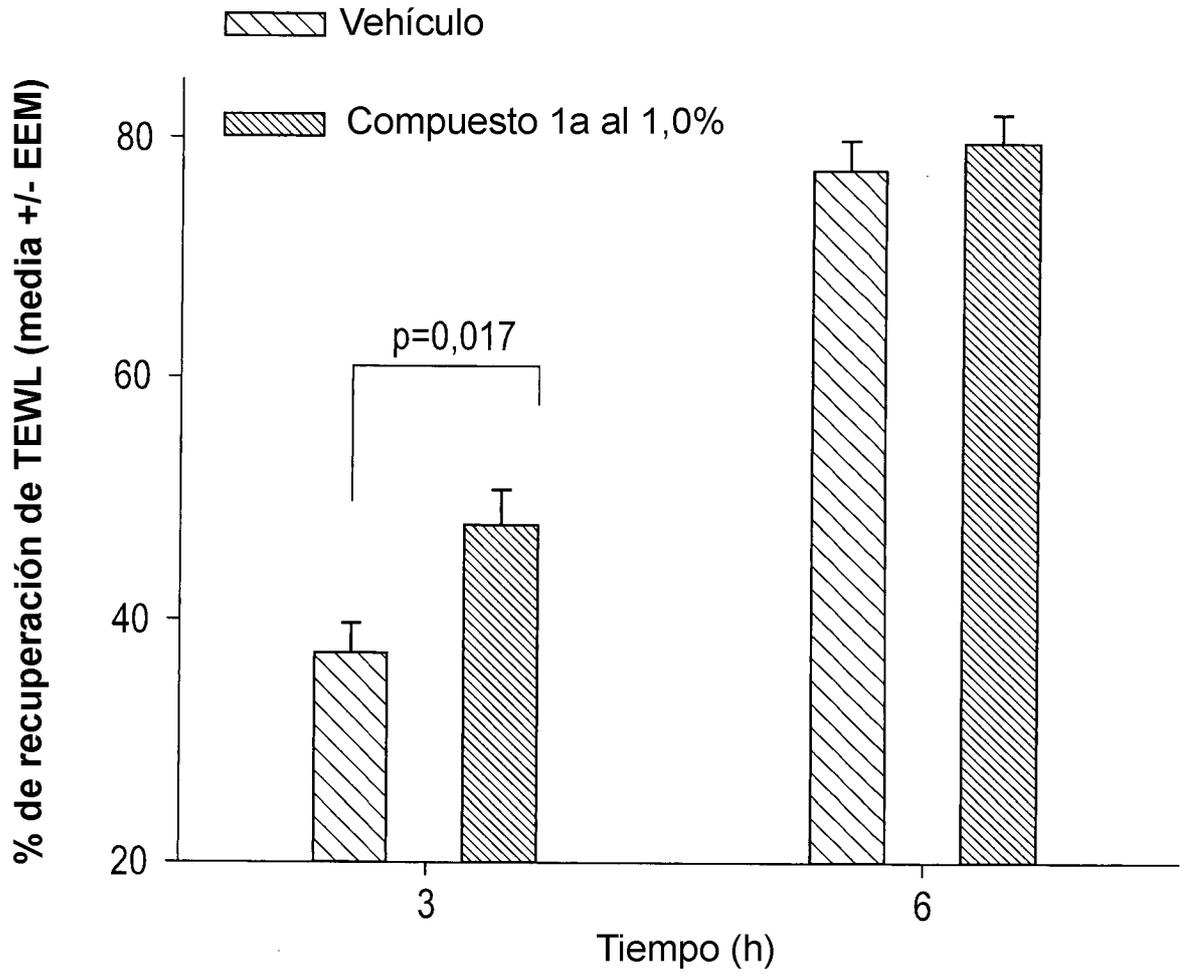


FIG. 2

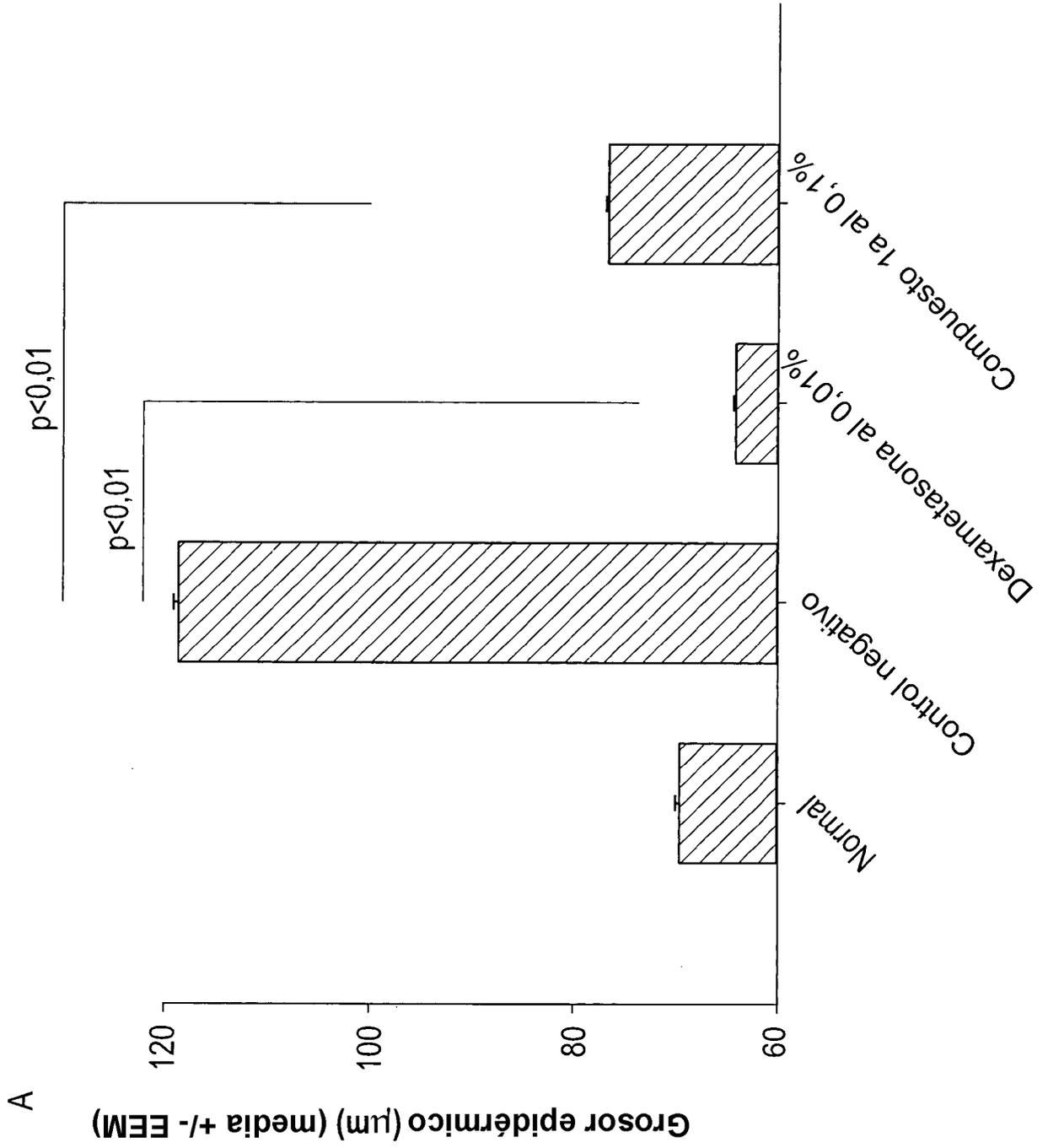
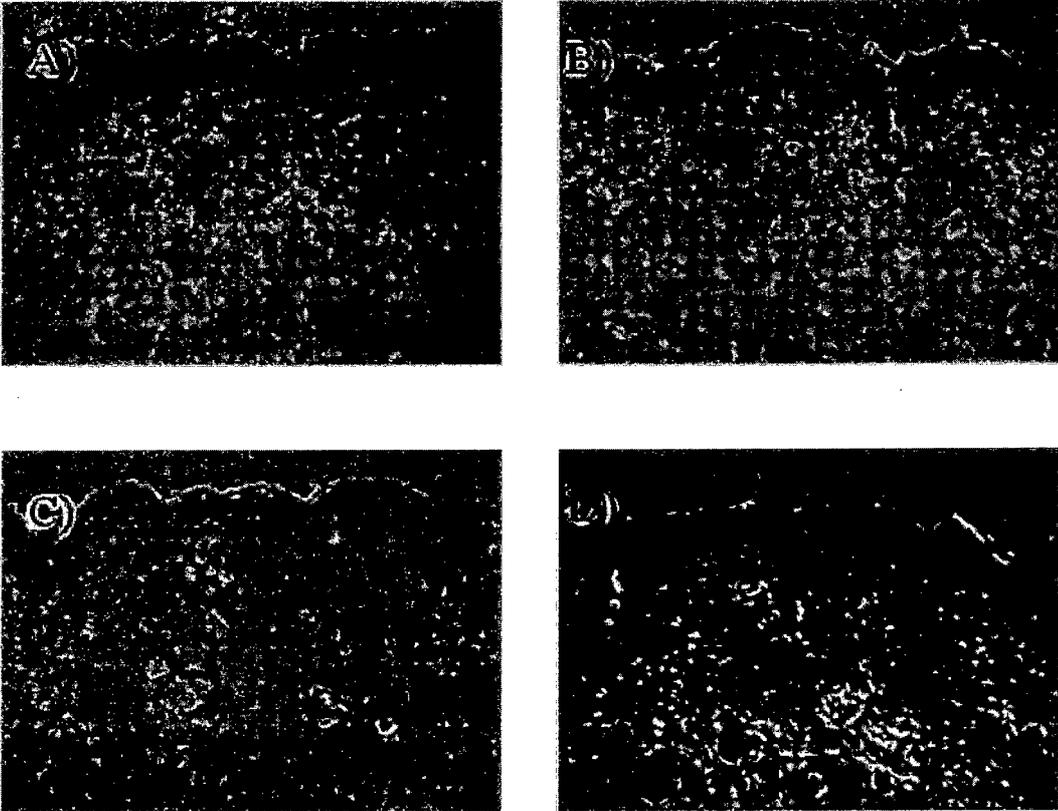


FIG. 3

FIG. 4



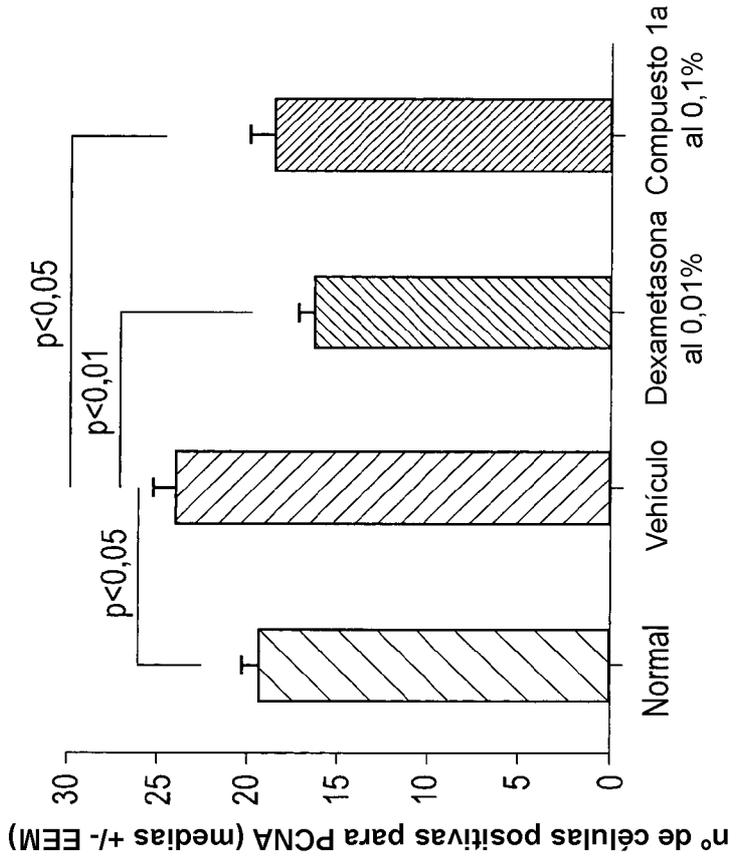
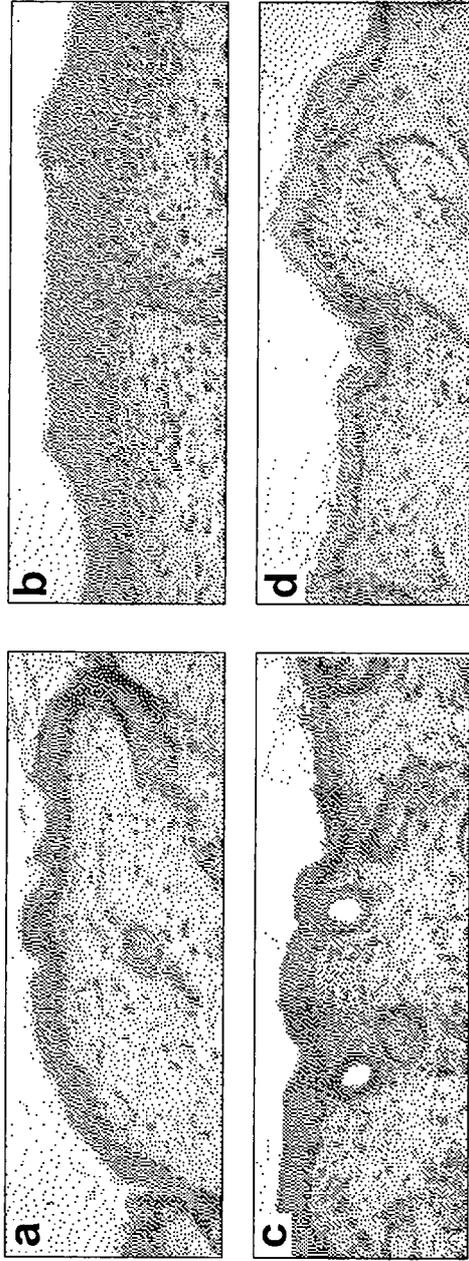


FIG. 5

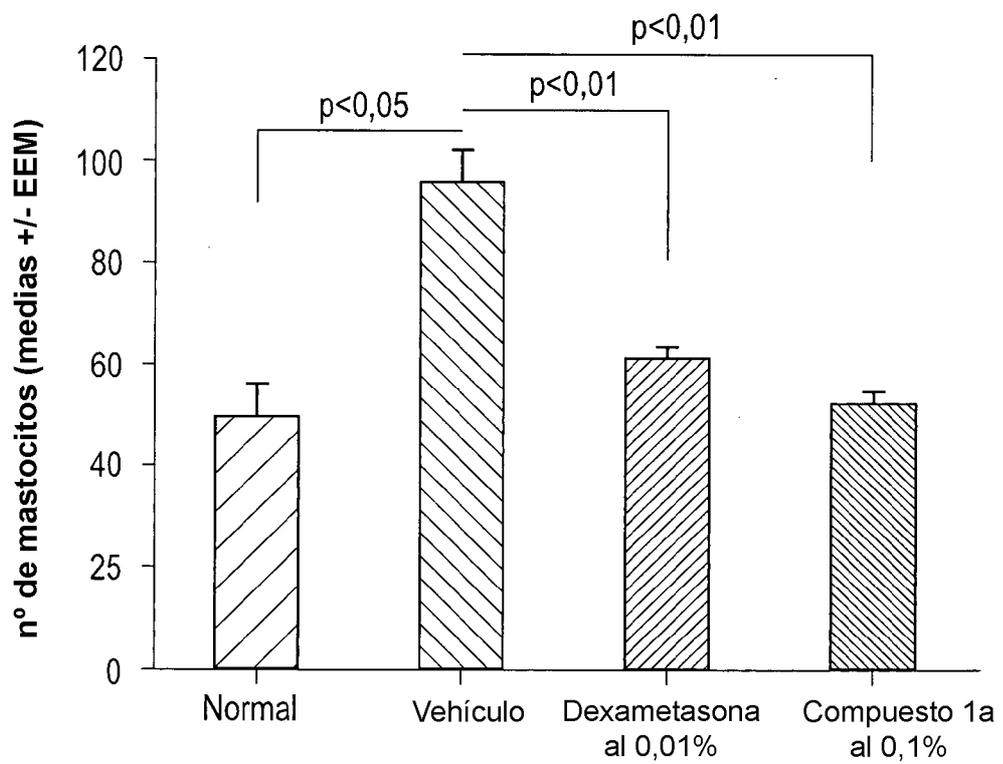
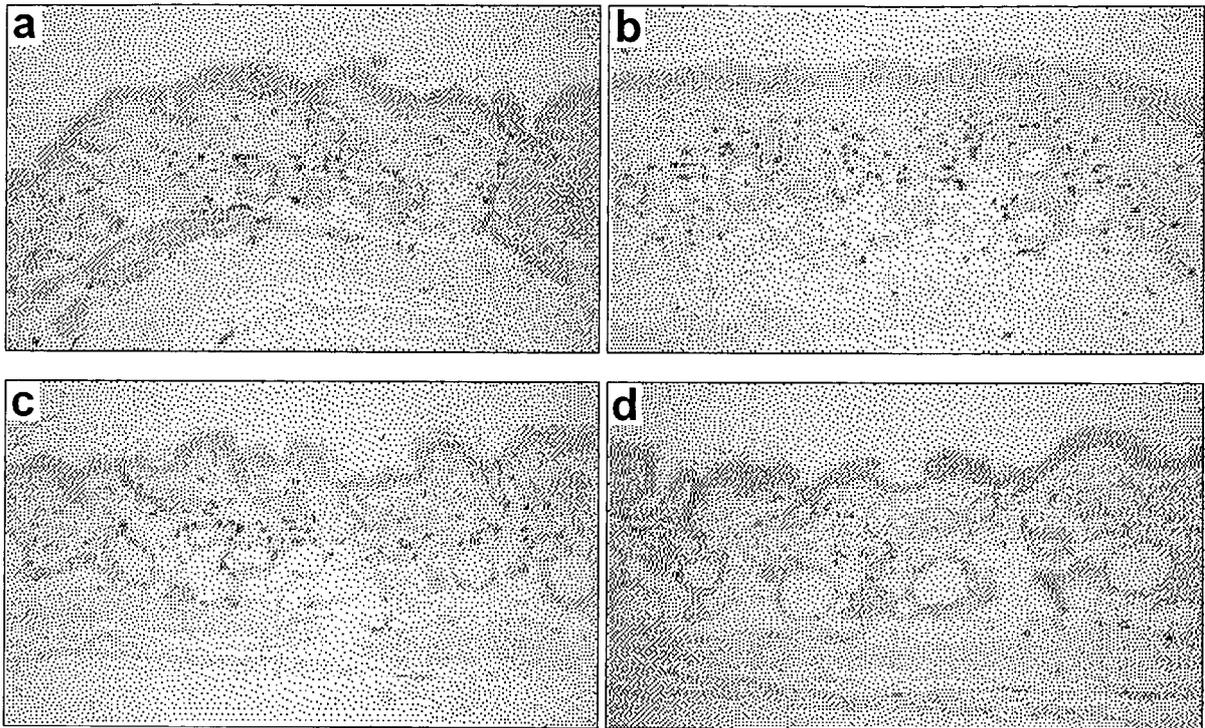


FIG. 6

FIG. 7

