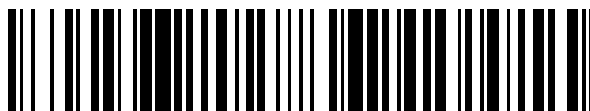


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 663**

51 Int. Cl.:

C07K 5/02 (2006.01)
C07D 487/14 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
C07D 403/06 (2006.01)
C07D 403/14 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2011 PCT/US2011/025571**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11103524**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2011 E 11745399 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2536732**

54 Título: **Tetrapéptidos cíclicos y aplicaciones terapéuticas de los mismos**

30 Prioridad:

19.02.2010 PL 39049310

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

09.05.2017

73 Titular/es:

PEPTADERM SP.Z.O.O. (50.0%)
Krakov Suburb 13, Region 141690076
00-071 Warsaw, PL y
LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY (50.0%)

72 Inventor/es:

ZABROCKI, JANUSZ;
ZIMECKI, MICHAL;
KASZUBA, ANDRZEJ y
KACZMAREK, KRZYSZTOF

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 611 663 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

Tetrapéptidos cíclicos y aplicaciones terapéuticas de los mismos

5 Antecedentes

Comúnmente se utilizan fármacos inmunosupresores en trasplantes y en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. La producción de estos fármacos es costosa, y el más frecuentemente utilizado de estos fármacos, a saber, ciclosporina A, tacrolimus y rapamicina, exhibe efectos secundarios indeseables. La búsqueda de nuevos fármacos inmunosupresores carentes de efectos secundarios, particularmente en la clase de inmunorreguladores de péptidos naturales y sus análogos, representa un serio desafío para la química médica.

El ciclinopéptido A (CLA), un nonapéptido cíclico muy hidrófobo, primero se aisló a partir de semillas de lino en 1959. El CLA fuertemente inmunosupresor, con una potencia comparable a aquella de la ciclosporina A (CsA). El mecanismo de acción del CLA se mostró que es similar a aquel del CsA, es decir el CLA forma un complejo con la ciclofilina A provocando la inactivación de la calcineurina, aunque con mucha menor afinidad (Gaymes et al., FEBS Lett, 1997, 418, 224-227). El CLA inhibe tanto la respuesta inmunitaria humoral como celular y reacción del injerto versus anfitrión; prolonga la supervivencia de los injertos de piel alogénicos; atenúa la poliartritis post-adyuvante en ratas y anemia hemolítica en ratones Negros de Nueva Zelanda; y, de manera similar en CsA, inhibe la producción de IL1 e IL-2. Desafortunadamente, la alta hidrofobicidad del CLA presenta un obstáculo para la aplicación potencial del compuesto en terapia.

Se encontraron que los análogos de CLA lineales que contenían residuos de alanina en posiciones sucesivas de la cadena de péptidos eran inmunosupresores (Wieczorek et al., Arch Immunol Ther Exp, 1992, 40, 213-216). También se encontró que la actividad de los análogos de CLA lineales disminuyó gradualmente con el acortamiento de la cadena de péptidos a partir desde el terminal N, al mismo tiempo que muestra un aumento de la actividad para tetra y tripéptidos de terminal C (Siemion et al., Arch Immunol Ther Exp, 1994, 42, 459-465). La introducción de un residuo de treonina único, hidrófilo en la molécula de CLA no resultó en la mejora de la solubilidad en agua. Sin embargo, se logró una mejora en la solubilidad mediante la introducción de un grupo sulfónico en la posición para del anillo fenilo de uno o dos residuos de fenilalanina, sin pérdida de actividad biológica (Siemion et al., Arch Immunol Ther Exp, 1992, 40, 257-261; Cebrat et al., J Peptide Res, 1997, 49, 415-420). Adicionalmente, se ha observado que la inclusión de fragmentos tetrapeptídicos (Pro-Pro-Phe-Phe) o tripeptídicos (Pro-Phe-Phe) en las cadenas de péptidos lineales más largas parecen tener importancia para la actividad inmunosupresora (Wieczorek et al., Arch Immunol Ther Exp, 1993, 41, 291-296; Cebrat et al., Pol. J Chem, 1997, 71, 1401).

Una serie de análogos en los que el enlace cis-péptido entre los residuos de prolina se reemplazó con anillo de tetrazol 1,5-disustituido (un buen imitador de enlaces amida en configuración cis) mostraron actividad inmunosupresora comparable con la del CsA. (Karczmarek et al., Biopolymers, 2002, 63, 343-357).

Los análogos de CLA sintéticos en los que los residuos de leucina en la posición 5 y/o 8 se reemplazaron con su análogo de hidroximetilo exhibieron un aumento de cuatro veces en la solubilidad en agua en comparación con CLA, pero también mostraron una disminución del 25% en la actividad biológica en comparación con CLA nativo (Zubrzak et al., Biopolymers (Peptide Science), 2005, 80, 347-356).

Una serie de nueve análogos de CLA se obtuvo mediante el reemplazo de residuos de prolina de CLA con β^2 -isoprolina y β^3 -homoprolina. En comparación con CsA, estos análogos de CLA mostraron fuertes propiedades inhibitorias en la respuesta inmunitaria celular. La mayoría de estos análogos prácticamente estaban desprovistos de toxicidad celular (Katarzynska et al., J Pept Sci, 2009, 14, 1283-1294).

Se proporcionan de acuerdo con una realización de la presente invención compuestos que tienen la fórmula I:



en la que

55 k, m, n y p son cada uno independientemente 0, 1 o 2, siempre que por lo menos uno de k, m, n y p no sea 0;

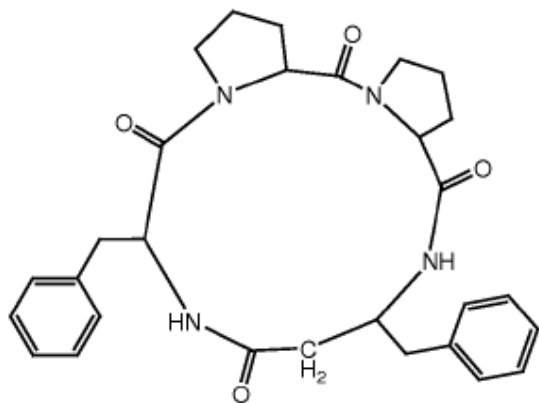
R y R' son cada uno independientemente seleccionados de H y alquilo C₁₋₃, o, cuando se toman juntos, R y R' son -CR¹R^{1'}-X-CH₂-, en la que CR¹R^{1'} se adhiere al nitrógeno de la estructura principal, R¹ y R^{1'} son cada uno independientemente seleccionados de H y alquilo C₁₋₃, y X se selecciona de -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH(OH)-, -O-, -S- y -NH-;

- 5 R'' y R''' son cada uno independientemente seleccionados de H y alquilo C₁₋₃, o, cuando se toman juntos, R'' y R''' son -CR²R^{2'}-X'-CH₂-, en la que CR²R^{2'} se adhiere al nitrógeno de la estructura principal, R² y R^{2'} son cada uno independientemente seleccionados de H y alquilo C₁₋₃, y X' se selecciona de -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH(OH)-, -O-, -S- y -NH-; y
- 10 R³ y R⁴ son cada uno independientemente seleccionados de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

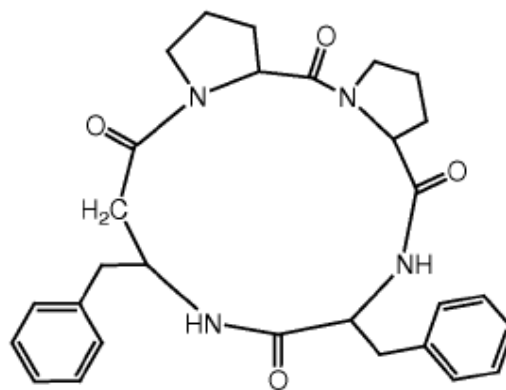
En algunas realizaciones, por lo menos uno de R³ y R⁴ es fenilo. En algunas realizaciones, por lo menos uno de R³ y R⁴ es 4-hidroxifenilo. En algunas realizaciones, por lo menos uno de R³ y R⁴ es 4-t-butoxifenilo. En algunas realizaciones, por lo menos uno de R³ y R⁴ es 2-indolilo. En algunas realizaciones, R³ y R⁴ ambos son fenilo. En algunas realizaciones, uno de R³ y R⁴ es fenilo y el otro de R³ y R⁴ es 4-hidroxifenilo. En algunas realizaciones, uno de R³ y R⁴ es fenilo y el otro de R³ y R⁴ es 4-t-butoxifenilo. En algunas realizaciones, uno de R³ y R⁴ es fenilo y el otro de R³ y R⁴ es 2-indolilo. En algunas realizaciones, el carbono al cual se adhiere -CH₂-R³ tiene estereoquímica (R) absoluta. En algunas realizaciones, el carbono al cual se adhiere -CH₂-R³ tiene estereoquímica (S) absoluta. En algunas realizaciones, el carbono al cual se adhiere -CH₂-R⁴ tiene estereoquímica (R) absoluta. En algunas realizaciones, el carbono al cual se adhiere -CH₂-R⁴ tiene estereoquímica (S) absoluta. En algunas realizaciones, uno de k, m, n y p es 1, y el resto de k, m, n y p son 0. En algunas realizaciones, dos de k, m, n y p son 1, y el resto de k, m, n y p son 0. En algunas realizaciones, por lo menos uno de k y m no es 0. En algunas realizaciones, por lo menos uno de n y p no es 0. En algunas realizaciones, por lo menos uno de k y m no es 0 y por lo menos uno de n y p no es 0. En algunas realizaciones, ambos de k y n son 0. En algunas realizaciones, ambos de k y n son 0, uno de m y p es 0, y el otro de m y p es 1. En algunas realizaciones, ambos de k y n son 0 y ambos m y p son 1. En algunas realizaciones, todos los cuatro aminoácidos son L-aminoácidos. En algunas realizaciones, tres de los aminoácidos son L-aminoácidos y uno de los aminoácidos es un D-aminoácido. En algunas realizaciones, dos de los aminoácidos son L-aminoácidos y dos de los aminoácidos son D-aminoácidos. En algunas realizaciones, uno de los aminoácidos es un L-aminoácido y tres de los aminoácidos son D-aminoácidos. En algunas realizaciones, todos los cuatro aminoácidos son D-aminoácidos.

En algunas realizaciones, R y R' se toman juntos para formar -(CH₂)₃-, es decir R y R' se toman juntos para formar -CR¹R^{1'}-X-CH₂- en la que R¹ y R^{1'} ambos son H y X es CH₂. En algunas realizaciones, R'' y R''' se toman juntos para formar -(CH₂)₃-, es decir R'' y R''' se toman juntos para formar -CR²R^{2'}-X'-CH₂- en la que R² y R^{2'} ambos son H y X' es CH₂. En algunas realizaciones, R y R' se toman juntos para formar -(CH₂)₄-, es decir R y R' se toman juntos para formar -CR¹R^{1'}-XCH₂- en la que R¹ y R^{1'} ambos son H y X es (CH₂)₂. En algunas realizaciones, R'' y R''' se toman juntos para formar -(CH₂)₄-, es decir R'' y R''' se toman juntos para formar -CR²R^{2'}-X-CH₂- en la que R² y R^{2'} ambos son H y X es (CH₂)₂. En algunas realizaciones, R y R' se toman juntos para formar -CH₂-CH(OH)-CH₂-, es decir R y R' se toman juntos para formar -CR¹R^{1'}-X-CH₂- en la que R¹ y R^{1'} ambos son H y X es CH(OH). En algunas realizaciones, R'' y R''' se toman juntos para formar -CH₂-CH(OH)-CH₂-, es decir R'' y R''' se toman juntos para formar -CR²R^{2'}-X'-CH₂- en la que R² y R^{2'} ambos son H y X' es CH(OH). En algunas realizaciones en las que R y R' se toman juntos, el carbono al cual se adhiere R' tiene estereoquímica (S) absoluta. En algunas realizaciones en las que R y R' se toman juntos, el carbono al cual se adhiere R' tiene estereoquímica (R) absoluta. En algunas realizaciones en las que R'' y R''' se toman juntos, el carbono al cual se adhiere R''' tiene estereoquímica (S) absoluta. En algunas realizaciones en las que R'' y R''' se toman juntos, el carbono al cual se adhiere R''' tiene estereoquímica (R) absoluta.

En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona del grupo que consiste de:

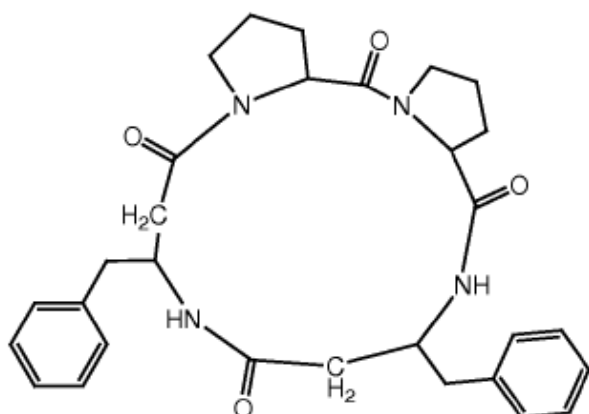


I-1 (Pro-Pro-β³hoPhe-) cíclico

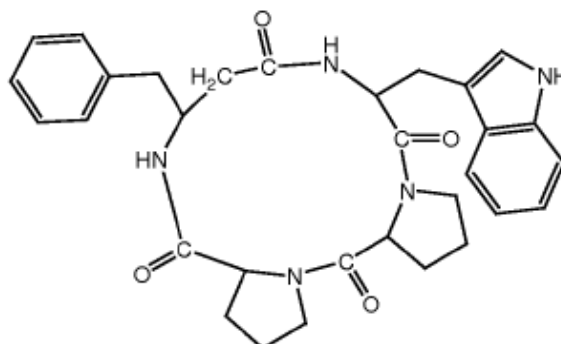


I-2 (Pro-Pro-Phe-β³hoPhe-) cíclico

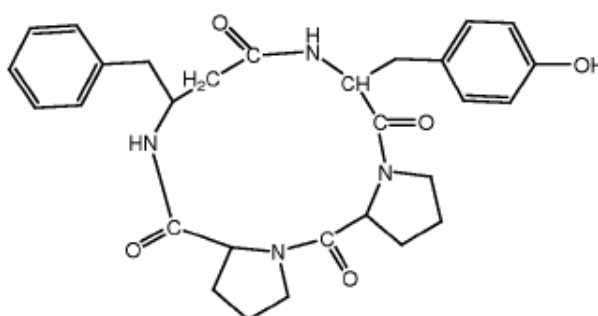
50



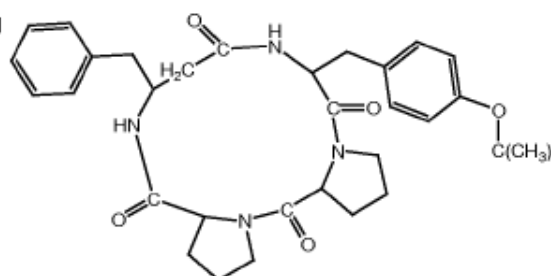
I-3 (Pro-Pro-β³hoPhe-β³hoPhe-) cíclico



I-4 (Pro-Pro-β³hoPhe-Trp-) cíclico

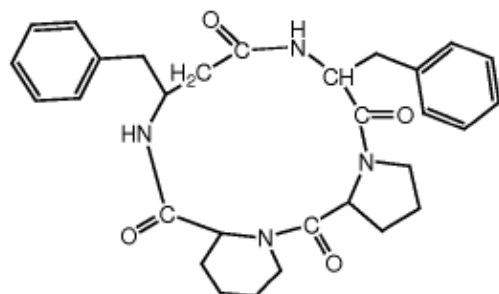


I-5 (Pro-Pro-β³hoPhe-Tyr-) cíclico

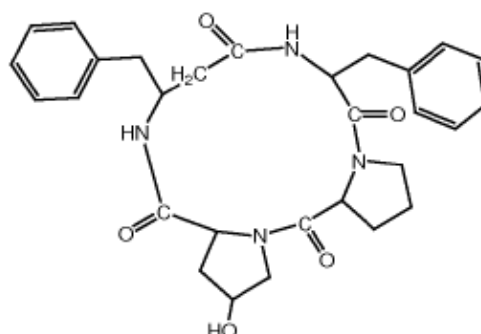


I-6 (Pro-Pro-β³hoPhe-Tyr (t-Bu)-) cíclico

5



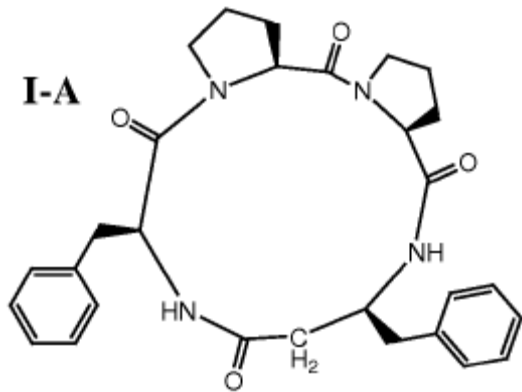
I-7 (Pro-Pip-β³hoPhe-Phe-) cíclico



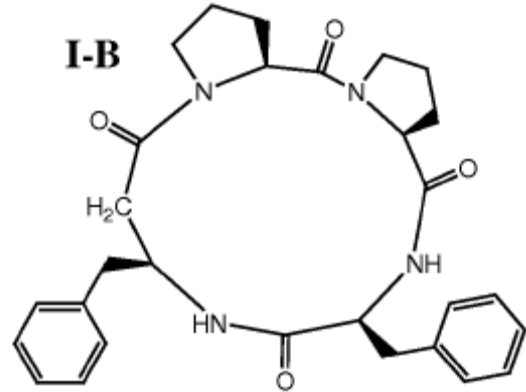
I-8 (Pro-Hyp-β³hoPhe-Phe-) cíclico

- 10 En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-5. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-6. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-7. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-8.
- 15

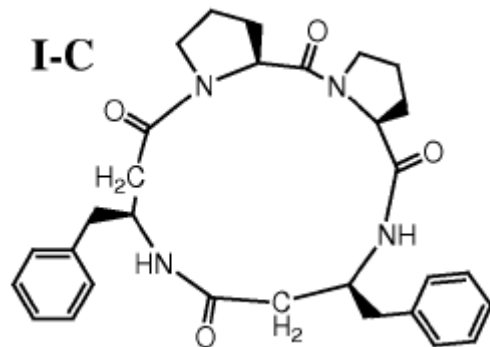
En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona del grupo que consiste de:



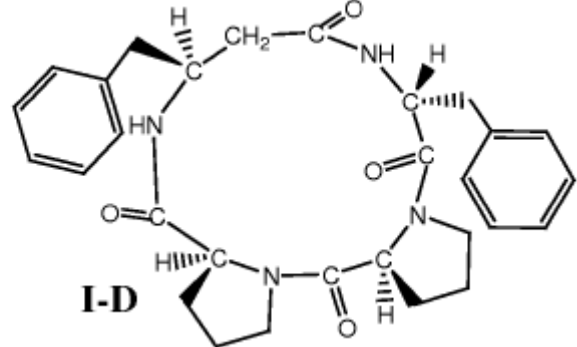
((-L)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(L)-Phe-) cíclico



(-L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-β³hoPhe-) cíclico

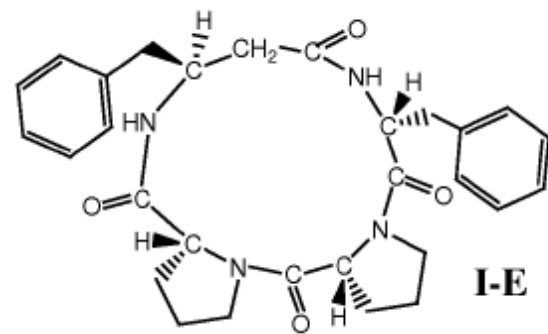


((-L)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(L)-β³hoPhe-) cíclico

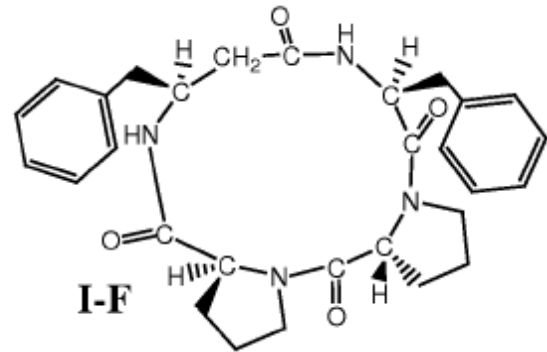


(-L)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(D)-Phe-) cíclico

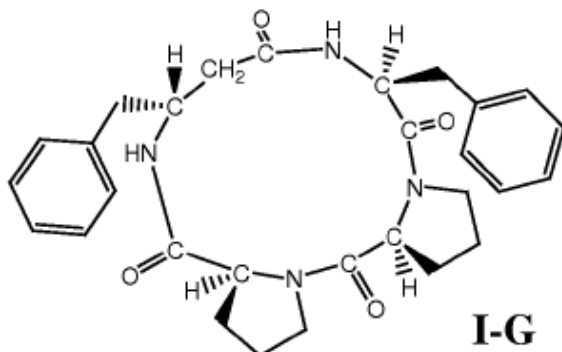
5



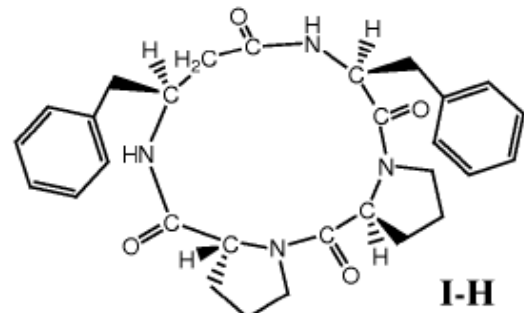
((-D)-Pro-(D)-Pro-(L)-β³hoPhe-(D)-Phe-) cíclico



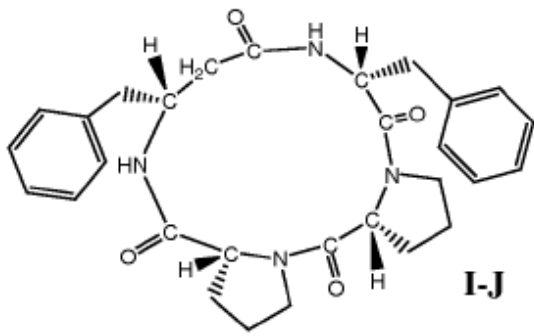
(-D)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(L)-Phe-) cíclico



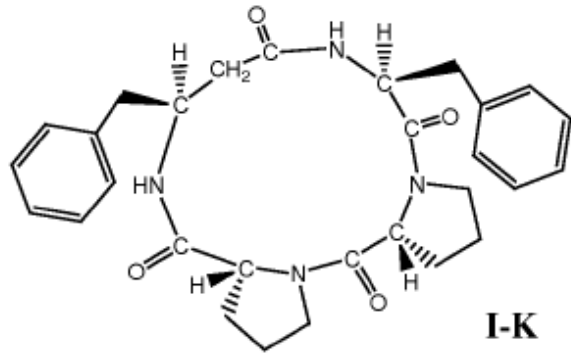
((-L)-Pro-(L)-Pro-(D)-β³hoPhe-(L)-β³hoPhe-) cíclico



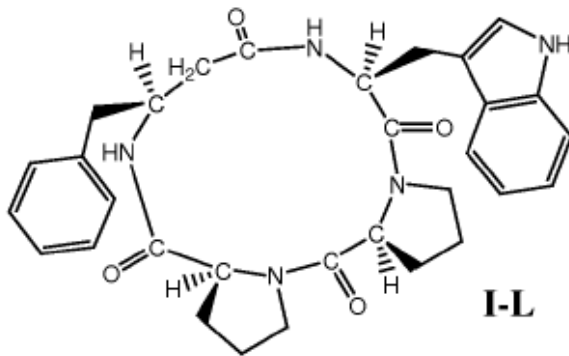
10



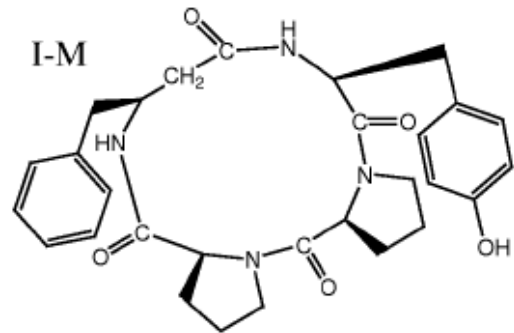
((-D)-Pro-(D)-Pro-(D)-β³hoPhe-(D)-Phe-) cíclico



(-D)-Pro-(D)-Pro-(L)-β³hoPhe-(L)-Phe-) cíclico

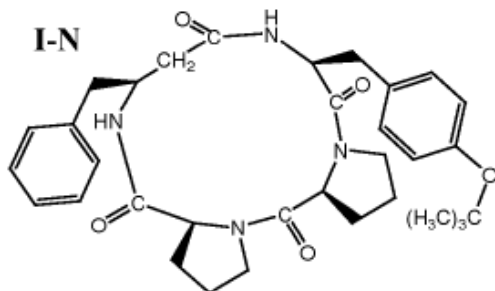


((-L)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(L)-Trp-) cíclico

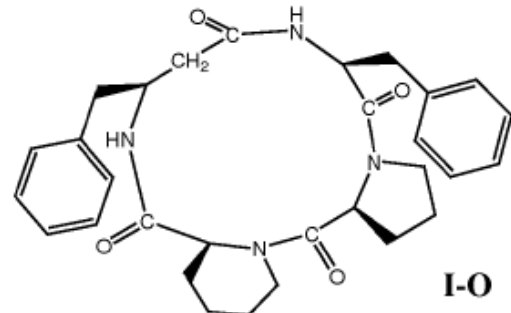


(-L)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(L)-Tyr-) c

5

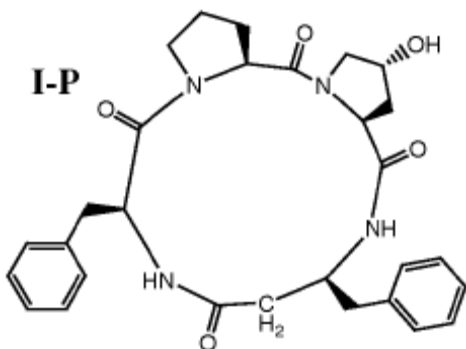


((-L)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(L)-Tyr(tBu-) cíclico



(-L)-Pro-(L)-Pip-(L)-β³hoPhe-(L)-Phe-) cíclico

10 y



((-L)-Pro-(L)-t-Hyp-(L)-β³hoPhe-(L)-Phe-) cíclico

15

20

En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-A. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-B. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-C. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-D. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-E. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-F. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-G. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-H. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-I. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-J. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-K. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-L. En algunas

realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-M. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-N. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-O. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-P.

5 En algunas realizaciones, uno o más grupos amino en el compuesto de la fórmula I están en forma protegida.

También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula I y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-5. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-6. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-7. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-8. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-A. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-B. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-C. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-D. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-E. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-F. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-G. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-H. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-I. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-J. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-K. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-L. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-M. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-N. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-O. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-P.

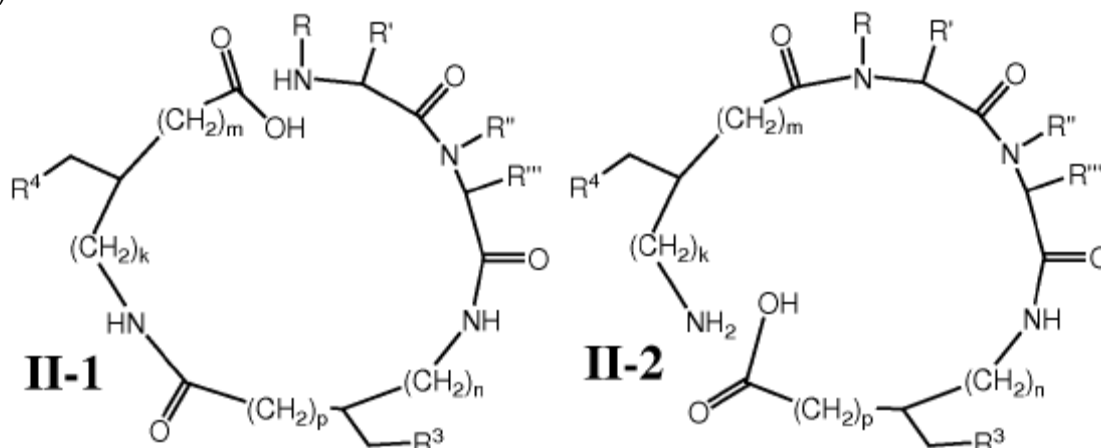
También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un compuesto de la fórmula I para uso en suprimir la respuesta inmunitaria en un paciente. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria que se suprime es inflamación. En algunas realizaciones la respuesta inmunitaria que se suprime es rechazo de trasplante. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-5. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-6. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-7. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-8. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-A. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-B. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-C. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-D. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-E. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-F. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-G. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-H. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-I. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-J. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-K. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-L. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-M. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-N. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-O. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-P.

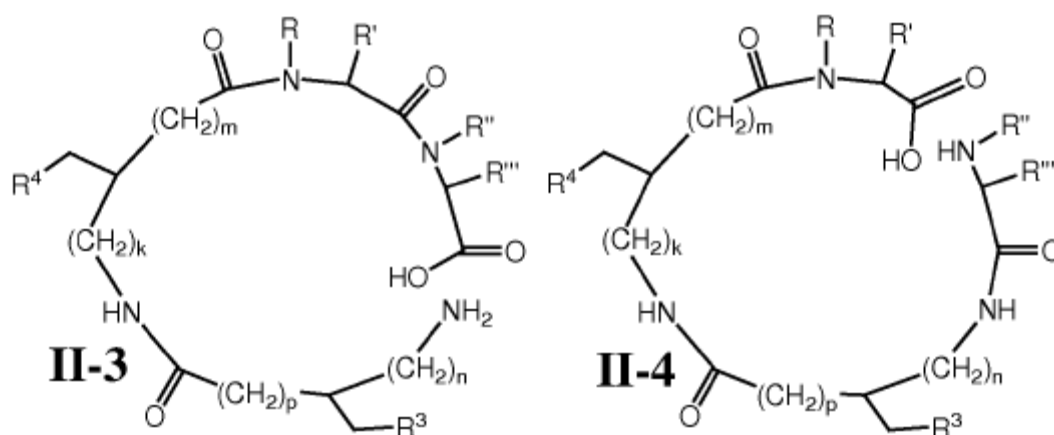
También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un compuesto de la fórmula I para uso en tratar o prevenir una enfermedad o afección inmunitaria en un paciente. También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un compuesto de la fórmula I para uso en reducción del perfil de toxicidad de un segundo fármaco. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona del grupo que consiste de enfermedades autoinmunitarias, procesos de inflamación, rechazo de trasplante, y reacciones alérgicas. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona de Psoriasis, liquen plano y otros trastornos papuloescamosos. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona de eczema y dermatitis. En algunas realizaciones, el eczema o dermatitis se selecciona de eczema, eczema atópico, dermatitis seborreica, y pomfólix. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria es una reacción de la piel a la luz solar. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona de irritación de la piel no específica y picadura de insecto. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria es una urticaria. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona del grupo que consiste de un tumor de piel primario (por ejemplo melanoma); artritis reumatoide (autoinmunitaria y provocada por infección); enfermedad de Crohn; enfermedad inflamatoria del intestino; síndrome del intestino irritable; una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo esclerosis múltiple); enfermedad de Parkinson; reacción del injerto versus anfitrión; psoriasis grave; y dermatitis atópica. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-5. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-6. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-7. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-8. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-A. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-B. En algunas realizaciones, el compuesto es un

5 compuesto de la fórmula I-C. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-D. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-E. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-F. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-G. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-H. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-I. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-J. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-K. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-L. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-M. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-N. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-O. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-P.

10 También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un kit, que comprende un compuesto de la fórmula I e instrucciones para utilizar el compuesto para (a) suprimir una respuesta inmunitaria en un paciente, (b) tratar o evitar una enfermedad o afección inmunitaria en un paciente, o (c) reducir el perfil de toxicidad de un segundo fármaco. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria es inflamación. En algunas realizaciones la respuesta inmunitaria es rechazo de trasplante. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona del grupo que consiste de enfermedades autoinmunitarias, procesos de inflamación, rechazo de trasplante, reacciones alérgicas. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona de Psoriasis, liquen plano y otros trastornos papuloescamosos. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona de eczema y dermatitis. En algunas realizaciones, el eczema o dermatitis se selecciona de eczema, eczema atópico, dermatitis seborreica, y pomfóliz. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria es una reacción de la piel a la luz solar. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona de irritación a la piel no específica y picadura de insecto. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria es una urticaria. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona del grupo que consiste de un tumor de piel primario (por ejemplo melanoma); artritis reumatoide (autoinmunitaria y provocada por infección); enfermedad de Crohn; enfermedad inflamatoria del intestino; síndrome del intestino irritable; una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo esclerosis múltiple); enfermedad de Parkinson; reacción del injerto versus anfitrión; psoriasis grave; y dermatitis atópica. En algunas realizaciones, las instrucciones enseñan a administrar el compuesto de la fórmula I en conjunto con un fármaco quimioterapéutico con el fin de reducir los efectos tóxicos del fármaco quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-5. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-6. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-7. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-8. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-A. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-B. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-C. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-D. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-E. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-F. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-G. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-H. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-I. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-J. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-K. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-L. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-M. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-N. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-O. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula I-P.

45 También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un método para elaborar un compuesto de la fórmula I, que comprende ciclizar un compuesto que tiene la fórmula II-1, II-2, II-3 o II-4, en la que R, R', R'', R''', R³, R⁴, k, m, n y p son como se define en la fórmula I (colectivamente mencionados en lo sucesivo como compuestos de la fórmula II):

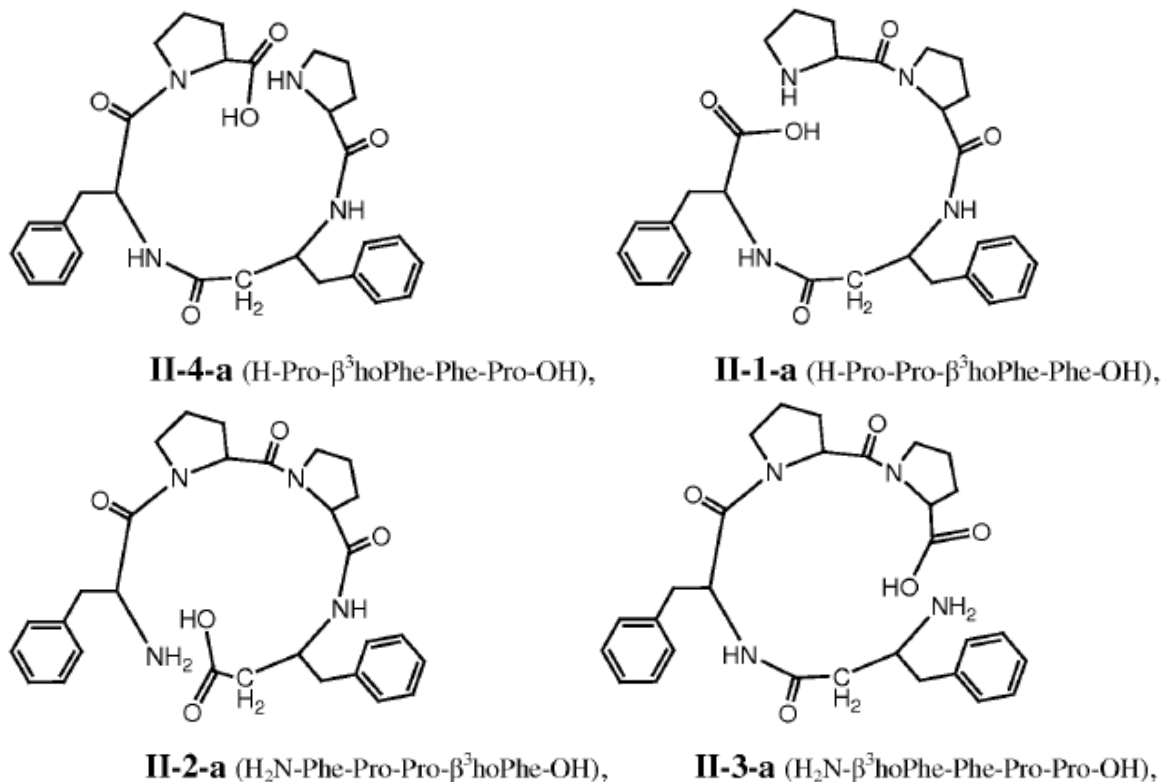


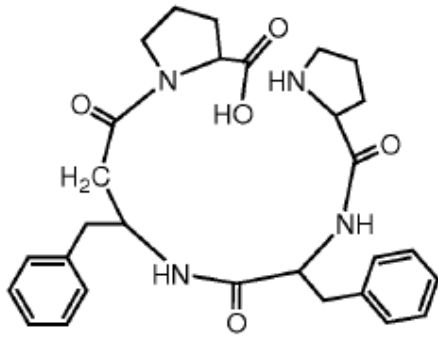


5 el compuesto correspondiente de la fórmula I. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente sintetizar el compuesto de la fórmula II-1, II-2, II-3 o II-4. En algunas realizaciones, el compuesto de la fórmula II-1, II-2, II-3 o II-4 se forma mediante síntesis en fase sólida.

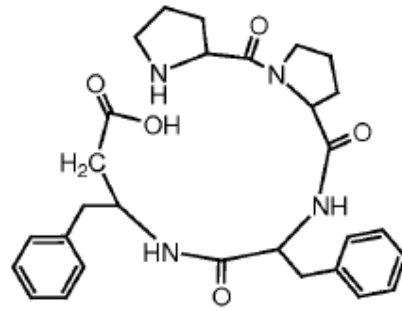
De acuerdo con las realizaciones de la invención, también se proporcionan compuestos de las fórmulas II-1, II-2, II-3 y II-4 per se, así como las versiones protegidas de estos compuestos (por ejemplo, en los que uno o más grupos amino, tales como el grupo amino de terminal N o un grupo amino de cadena lateral, están protegidos, por ejemplo, tert-butoxicarbonilo) y estos compuestos, en forma protegida o no protegida, cuando se unen a una resina en fase sólida. En lo sucesivo, a menos que se especifique lo contrario o sea ilógico en el contexto dado, cuando se hace referencia a un compuesto de la fórmula II o un subgénero o subespecie del mismo, se pretende que dicha referencia incluya dicho compuesto en una forma en la que esté (a)(i) por lo menos parcialmente protegido o (a)(ii) completamente no protegido o desprotegido; (b)(i) unido a una resina (1) directamente o (2) a través de un ligador, o (b)(ii) no unido a una resina; o una combinación de las condiciones (a) y (b). Adicionalmente, como se muestra aquí, en aras de la conveniencia, se muestran péptidos lineales libres, no protegidos como moléculas neutras, a saber teniendo H₂N- en el terminal N y -COOH en el terminal C; sin embargo, se apreciará que la carga real en estas unidades estructurales, así como en las unidades estructurales de cadena lateral ionizables (por ejemplo unidades estructurales de ácido carboxílico o amina en las cadenas laterales) dependerá del pH del entorno, y no necesariamente será como se muestra.

20 En algunas realizaciones, el compuesto de la fórmula II se selecciona del grupo que consiste de:

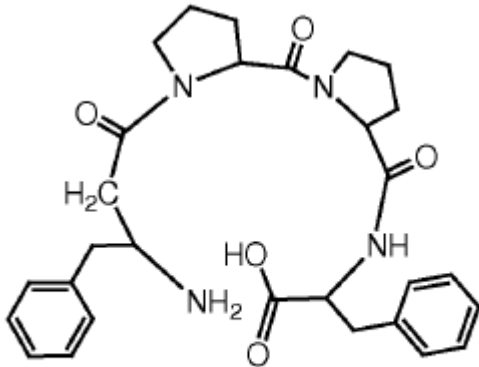




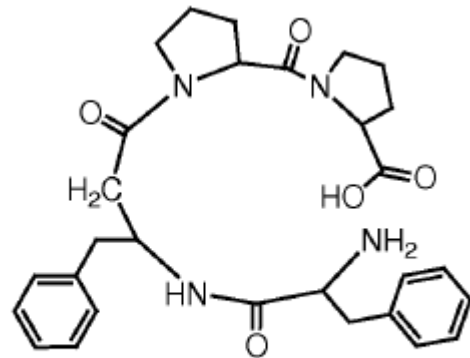
II-4-b (H-Pro-Pro-Phe- β^3 hoPhe-OH),



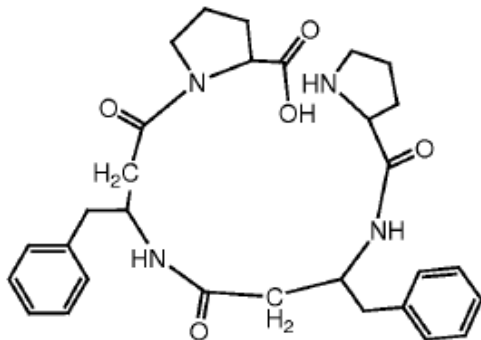
II-1-b (H-Pro-Pro-Phe- β^3 hoPhe-OH),



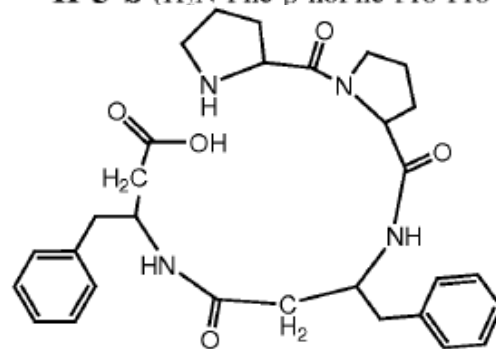
II-2-b (H₂N- β^3 hoPhe-Pro-Pro-Phe-OH),



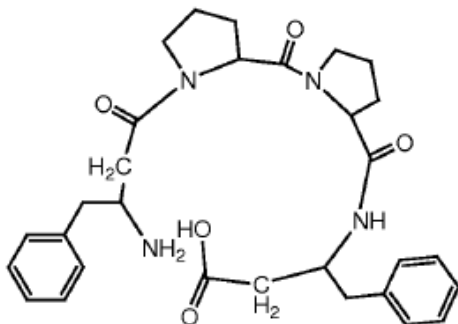
II-3-b (H₂N-Phe- β^3 hoPhe-Pro-Pro-OH),



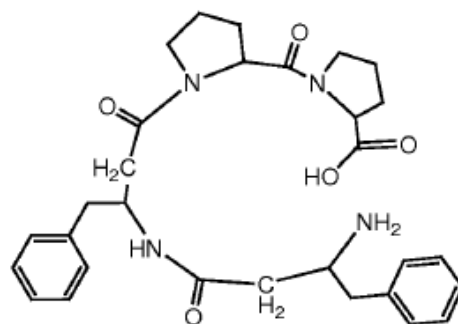
II-4-c (H-Pro- β^3 hoPhe- β^3 hoPhe-Pro-OH),



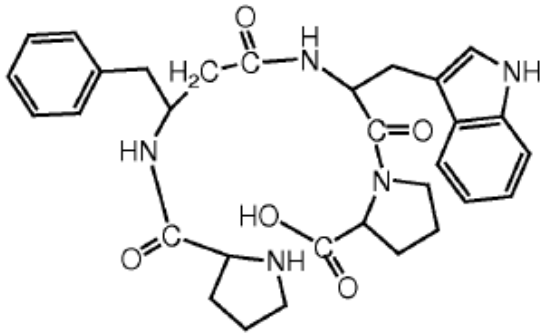
II-1-c (H-Pro-Pro- β^3 hoPhe- β^3 hoPhe-OH),



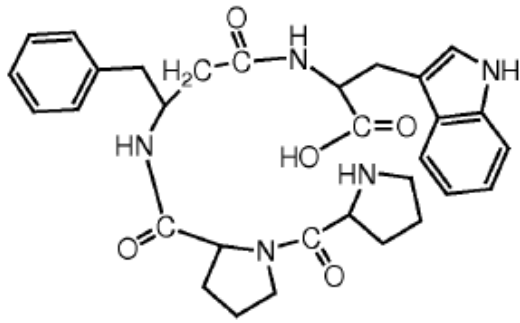
II-2-c (H₂N- β^3 hoPhe-Pro-Pro- β^3 hoPhe-OH),



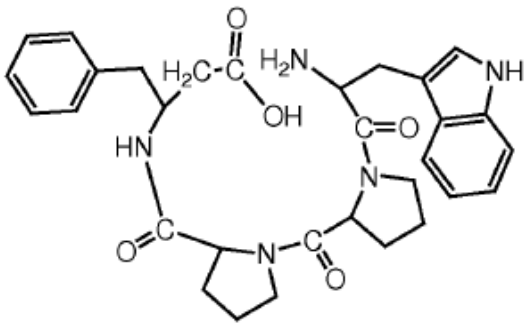
II-3-c (H₂N- β^3 hoPhe- β^3 hoPhe-Pro-Pro-OH),



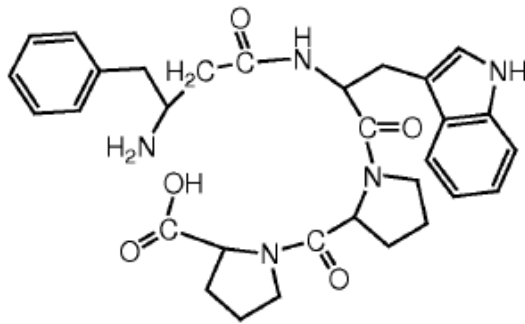
II-4-d (H-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Trp-OH),



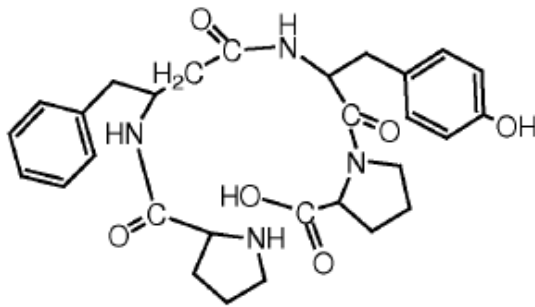
II-1-d (H-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Trp-OH),



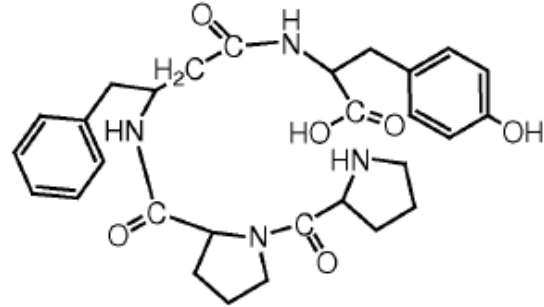
II-2-d (H-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Trp-OH),



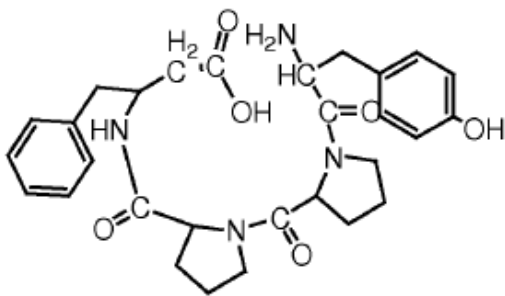
II-3-d (H_2N - β^3 hoPhe-Trp-Pro-Pro-OH),



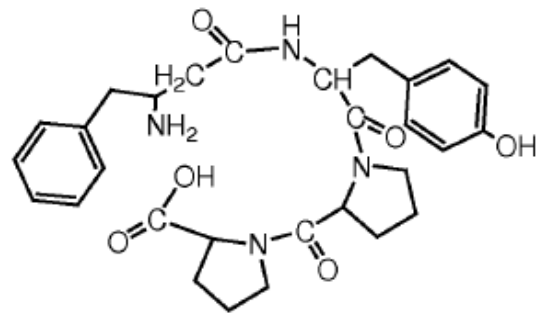
II-4-e (H-Pro- β^3 hoPhe-Tyr-Pro-OH),



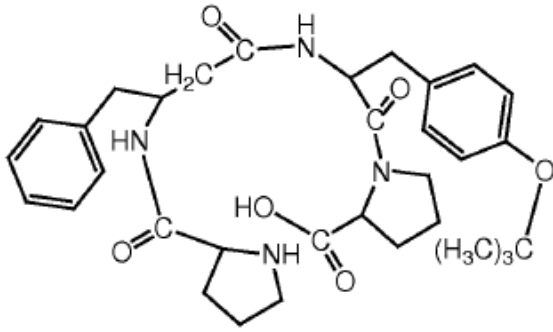
II-1-e (H-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Tyr-OH),



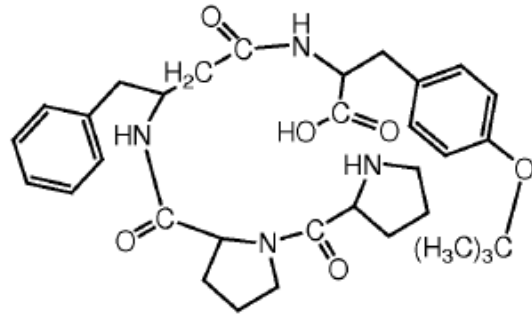
II-2-e (H_2N -Tyr-Pro-Pro- β^3 hoPhe-OH),



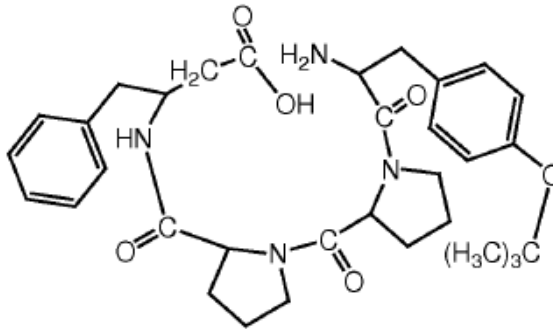
II-3-e (H_2N - β^3 hoPhe-Tyr-Pro-Pro-OH),



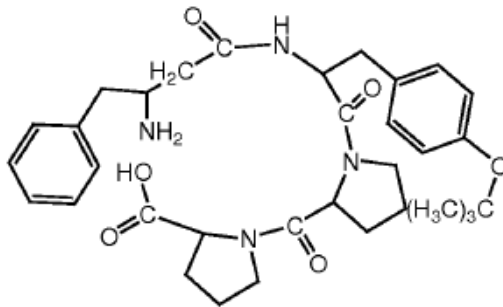
II-4-f (H-Pro- β^3 hoPhe-Tyr(t-Bu)-Pro-OH),



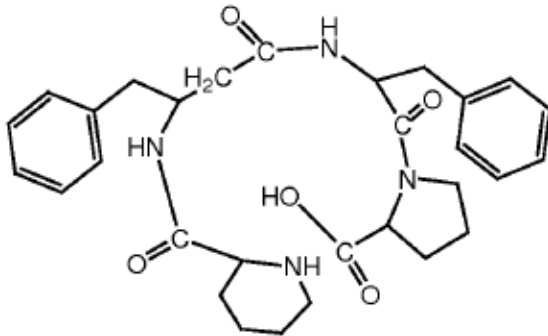
II-1-f (H-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Tyr(t-Bu)-OH),



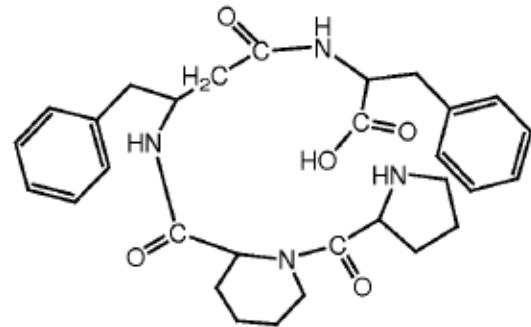
II-2-f (H₂N-Tyr(t-Bu)-Pro-Pro- β^3 hoPhe-OH),



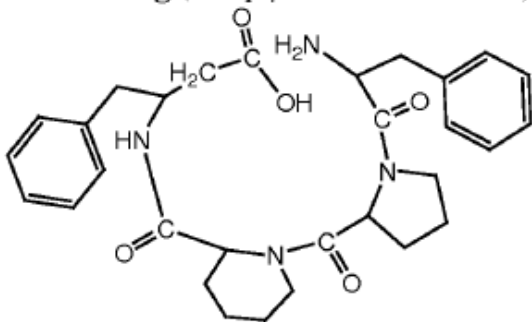
II-3-f (H₂N- β^3 hoPhe-Tyr(t-Bu)-Pro-Pro-OH),



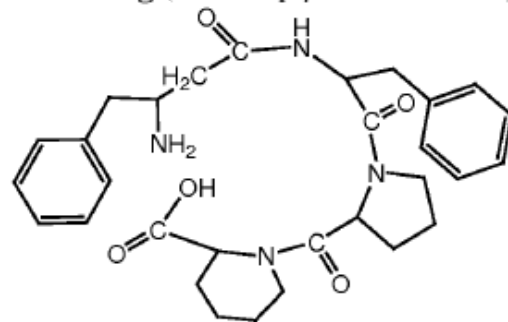
II-4-g (H-Pip- β^3 hoPhe-Phe-Pro-OH),



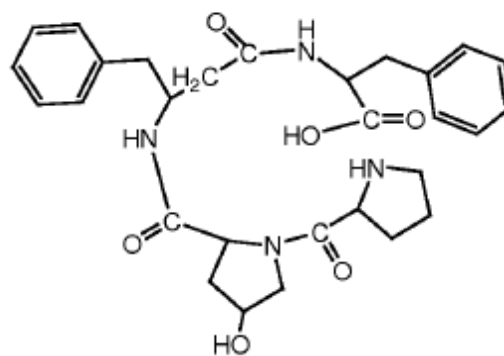
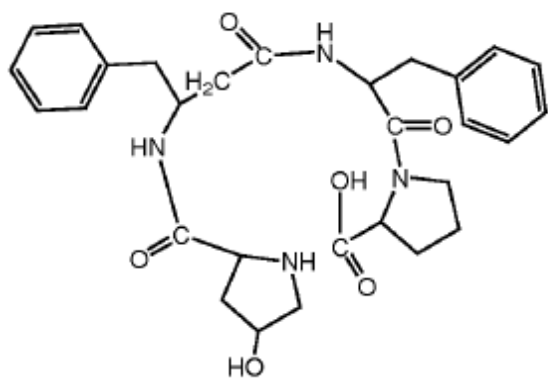
II-1-g (H-Pro-Pip- β^3 hoPhe-Phe-OH),



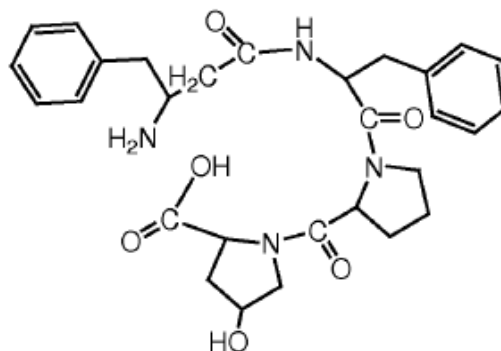
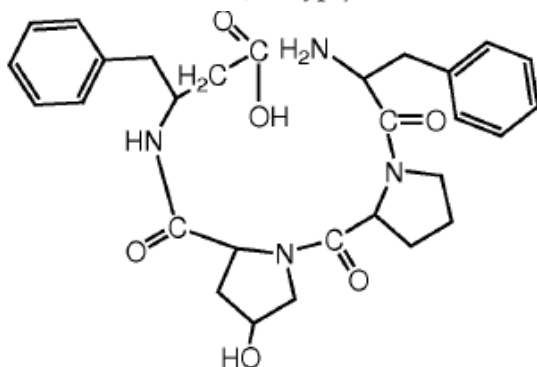
II-2-g (H₂N-Phe-Pro-Pip- β^3 hoPhe-OH),



II-3-g (H₂N- β^3 hoPhe-Phe-Pro-Pip-OH),



II-4-h (H-Hyp- β^3 hoPhe-Phe-Pro-OH) **II-1-h** (H-Pro-Hyp- β^3 hoPhe-Phe-OH)

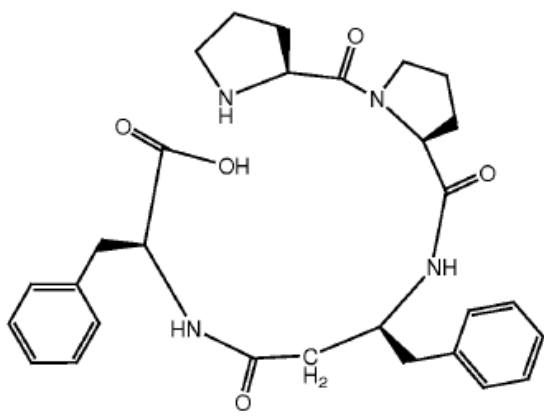


II-2-h (H₂N-Phe-Pro-Hyp- β^3 hoPhe-OH), and

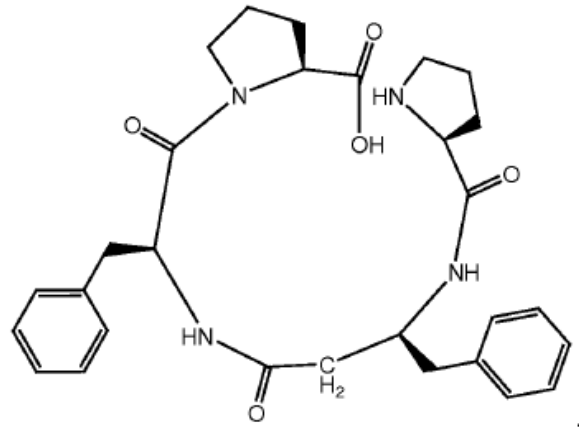
II-3-h (H₂N- β^3 hoPhe-Phe-Pro-Hyp-OH).

5 En algunas realizaciones el compuesto es un compuesto de la fórmula II-4-a. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-1-a. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-2-a. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-3-a. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-4- b. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-1-b. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-2-b. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-3-b. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-4-c. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-1-c. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-2-c. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-3-c. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-4-d. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-1-d. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-2-d. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-3-d. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-4-e. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-1-e. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-2-e. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-3-e. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-4-f. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-1-f. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-2-f. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-3-f. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-4-g. En algunas realizaciones, el compuesto es le compuesto de la fórmula II-1-g. En algunas realizaciones, el compuesto es le compuesto de la fórmula II-2-g. En algunas realizaciones, el compuesto es le compuesto de la fórmula II-3-g. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-4-h. En algunas realizaciones, el compuesto es le compuesto de la fórmula II-1-h. En algunas realizaciones, el compuesto es le compuesto de la fórmula II-2-h. En algunas realizaciones, el compuesto es le compuesto de la fórmula II-3-h.

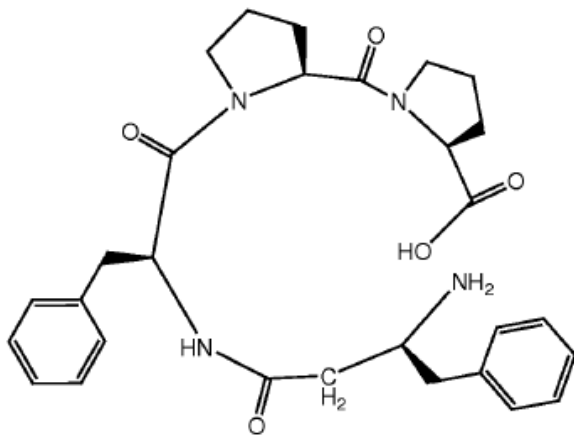
En algunas realizaciones el compuesto de la fórmula II se selecciona del grupo que consiste de:



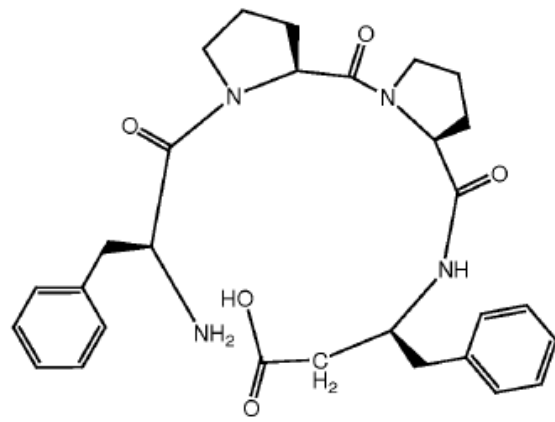
II-A-1



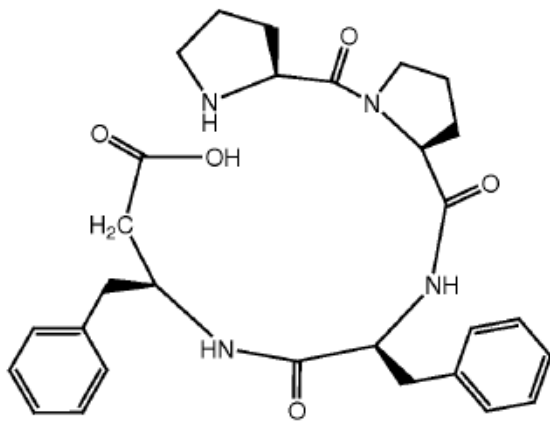
II-A-2



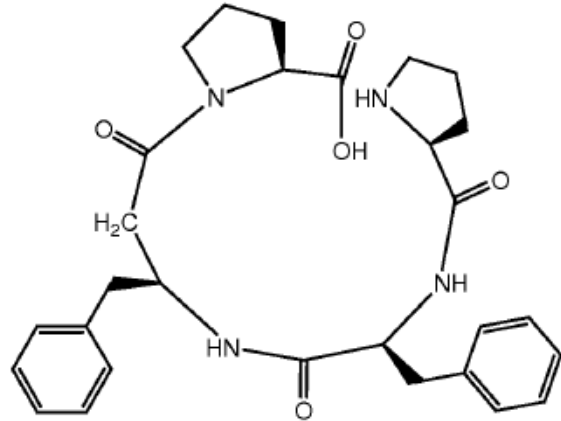
II-A-3



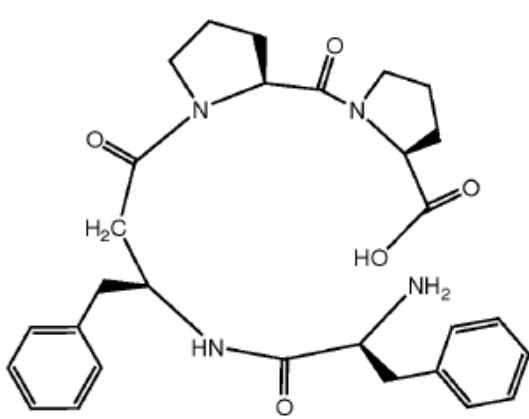
II-A-4



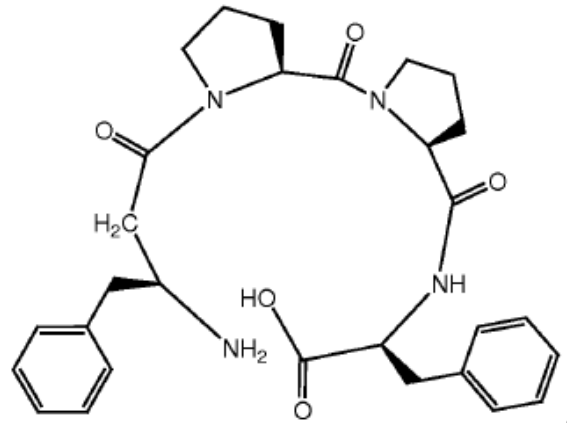
II-B-1



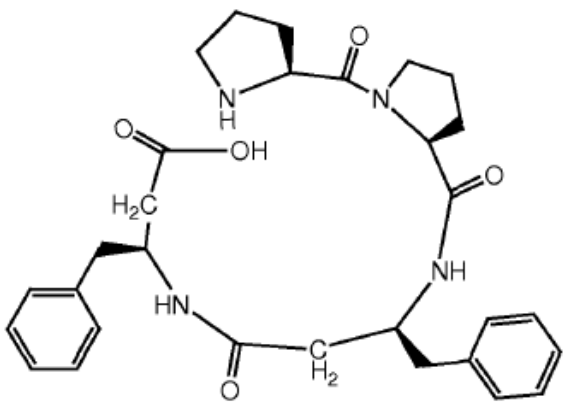
II-B-2



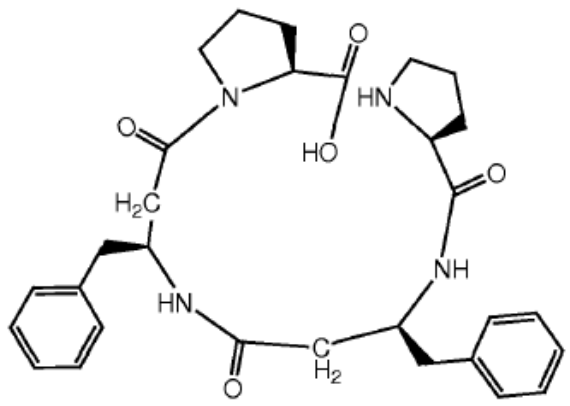
II-B-3



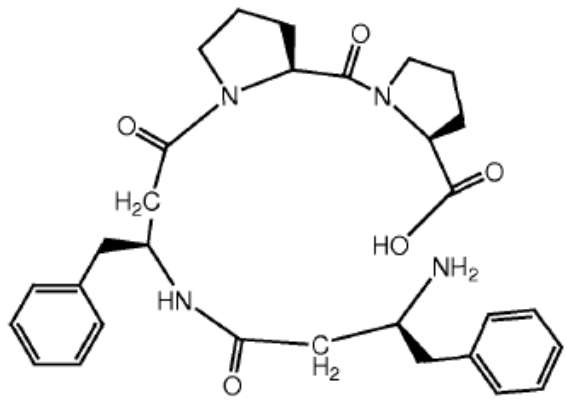
II-B-4



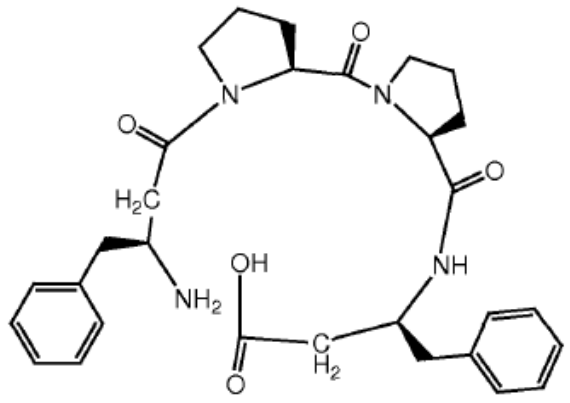
II-C-1



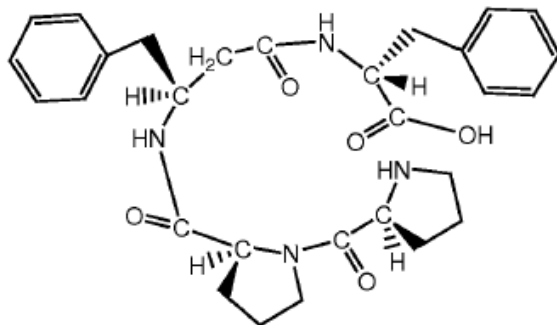
II-C-2



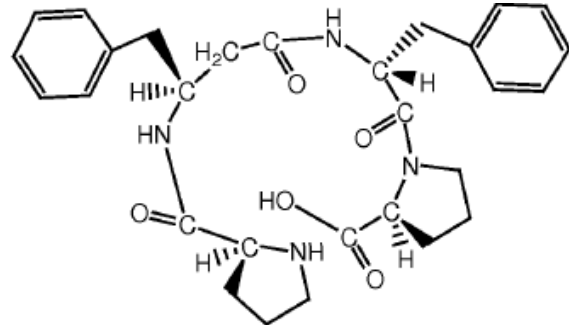
II-C-3



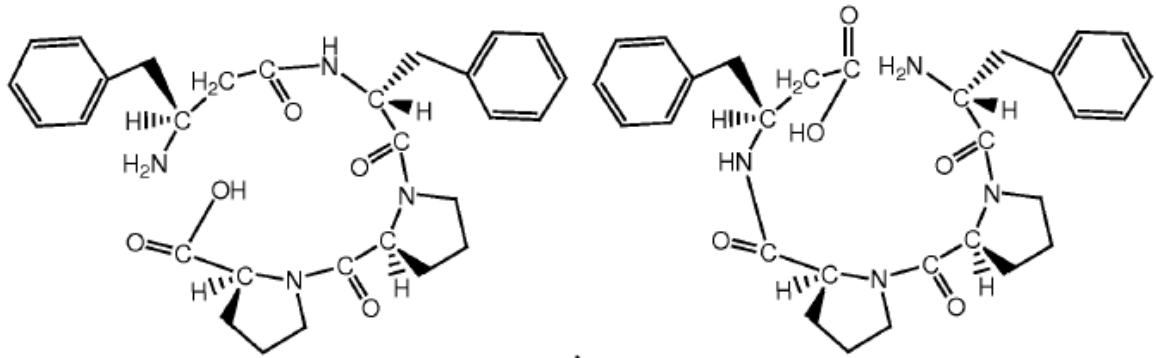
II-C-4



II-D-1

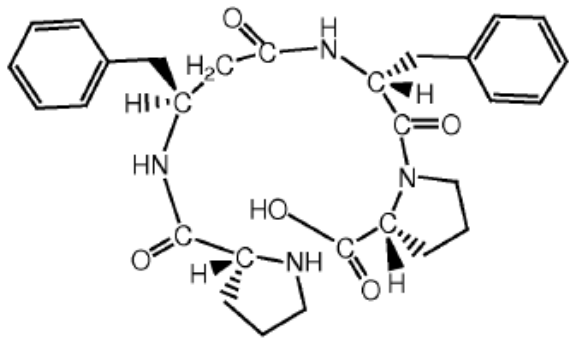
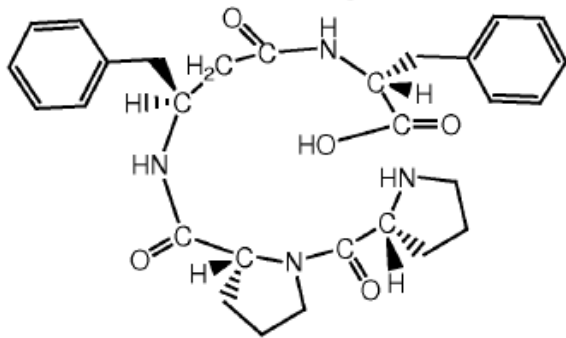


II-D-2



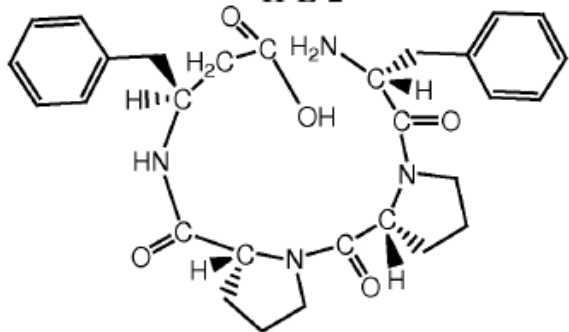
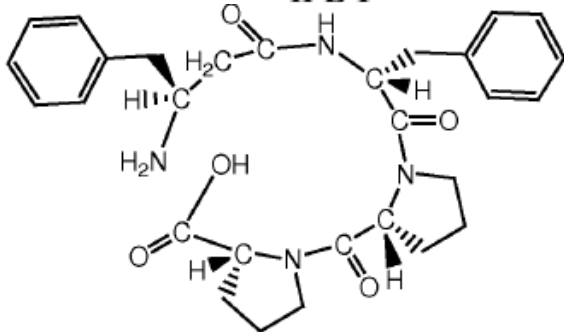
II-D-3

II-D-4



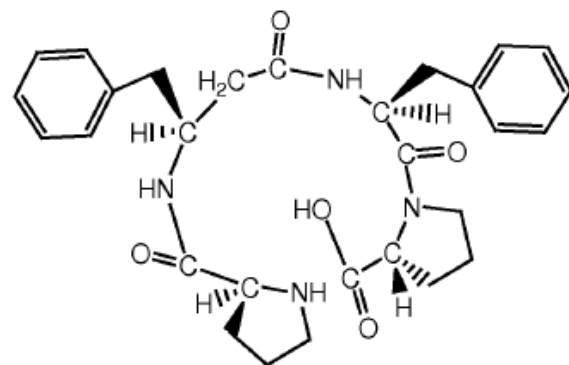
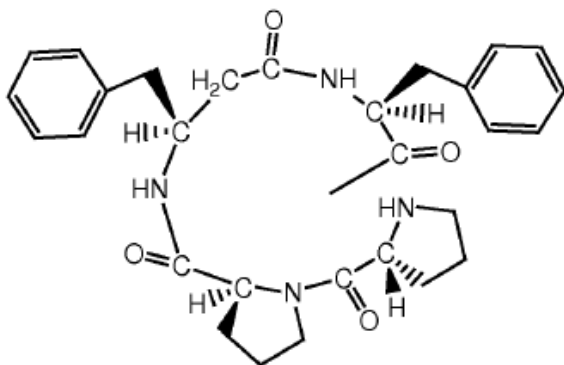
II-E-1

II-E-2



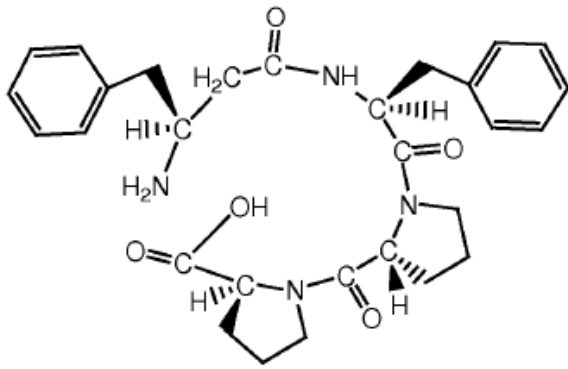
II-E-3

II-E-4

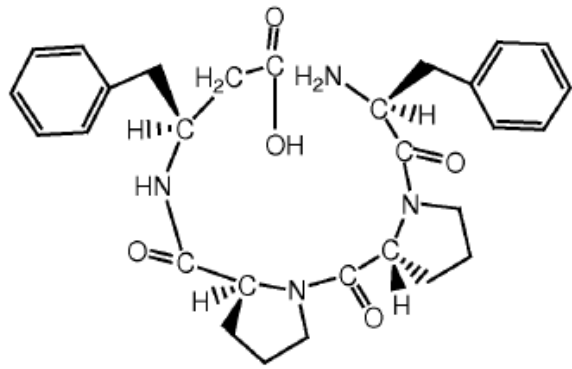


II-F-1

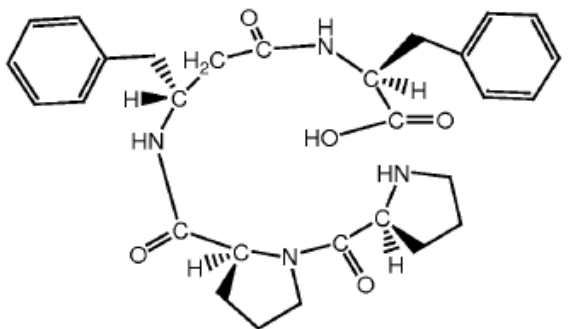
II-F-2



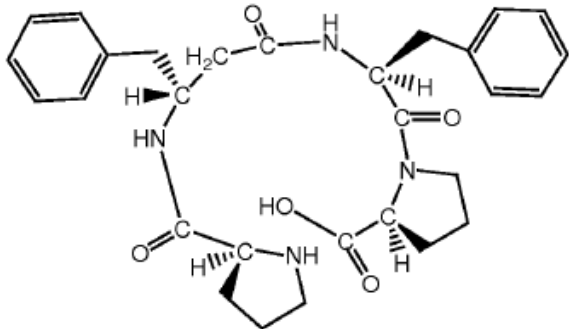
II-F-3



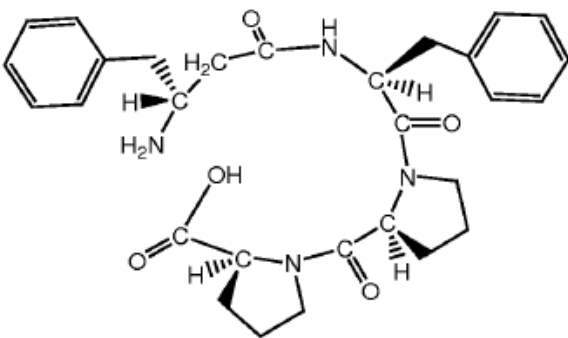
II-F-4



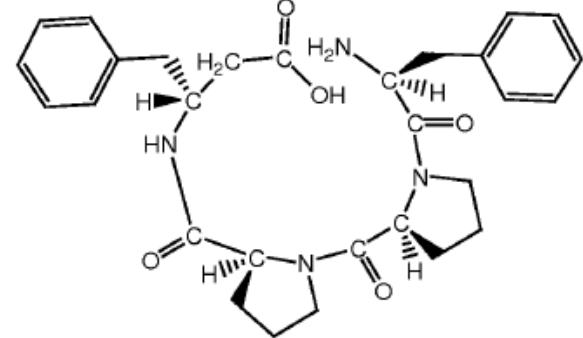
II-G-1



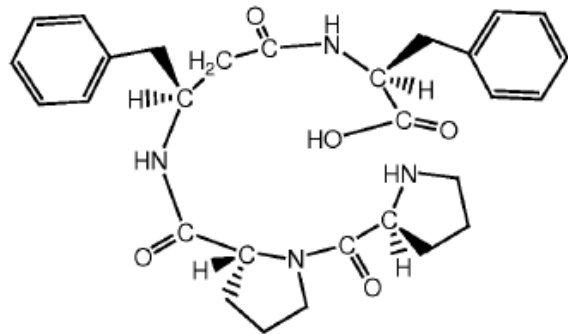
II-G-2



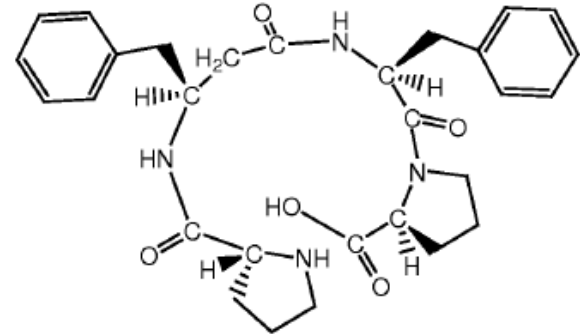
II-G-3



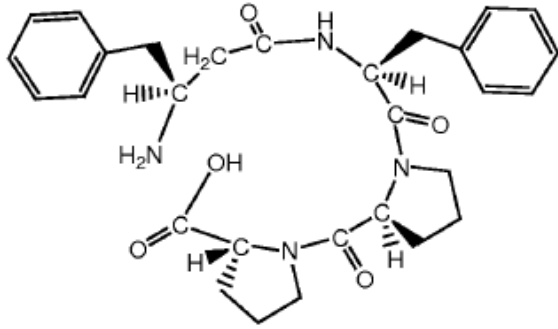
II-G-4



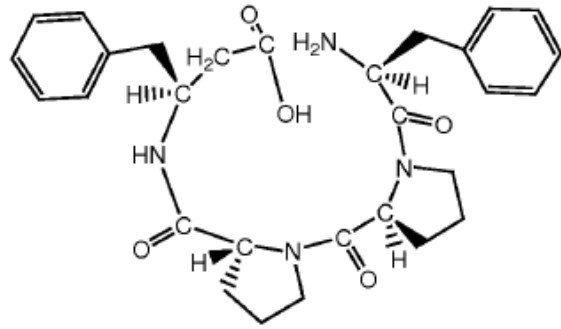
II-H-1



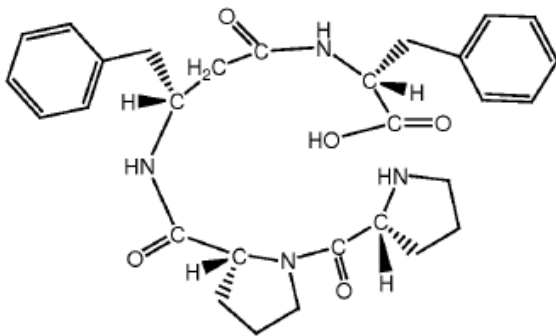
II-H-1



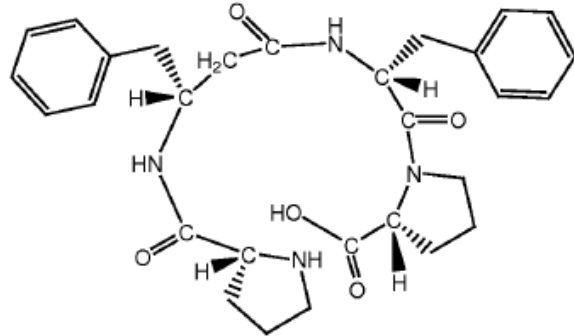
II-H-3



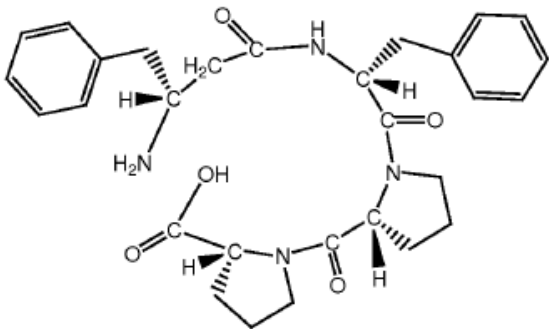
II-H-4



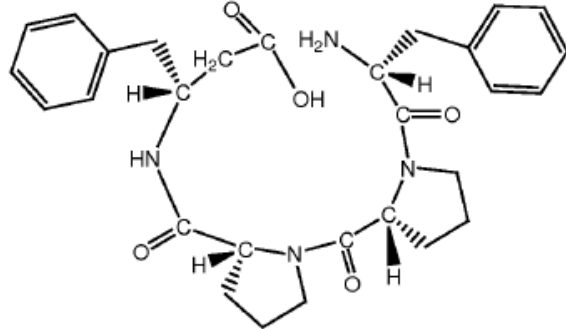
II-J-1



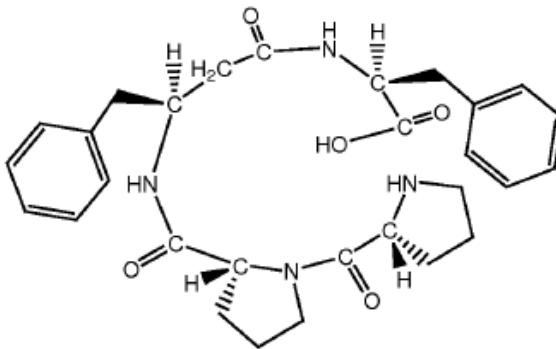
II-J-3



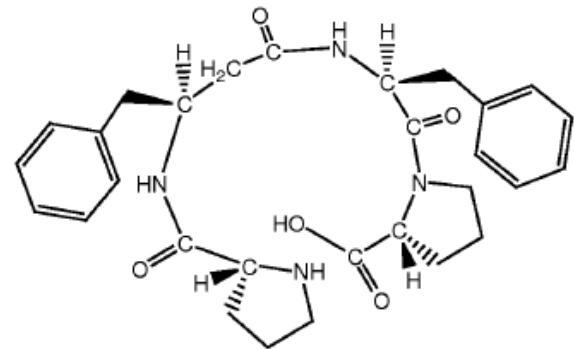
II-J-3



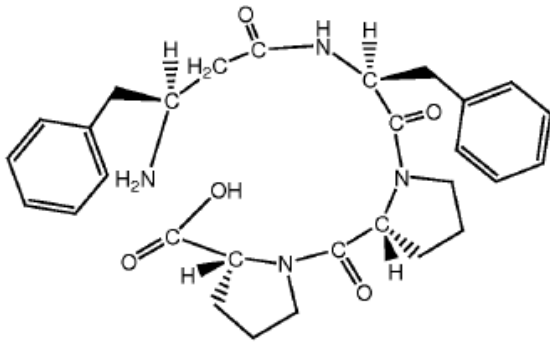
II-J-4



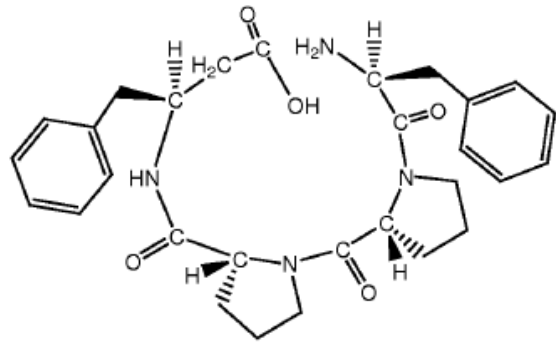
II-K-1



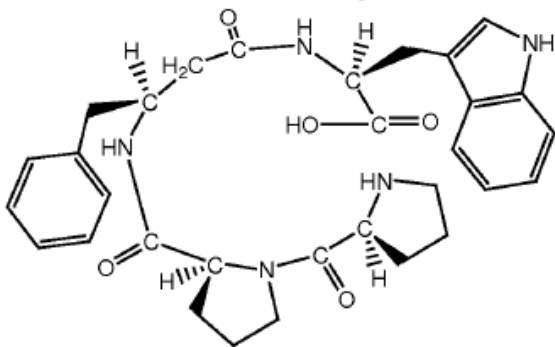
II-K-2



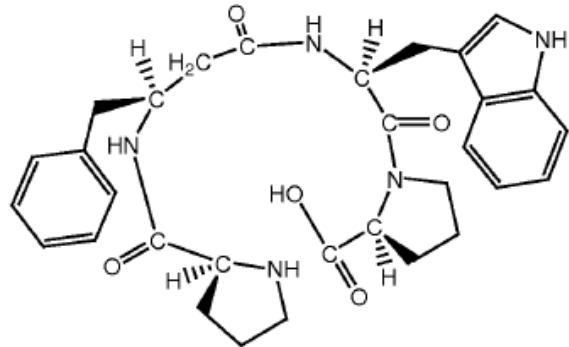
II-K-3



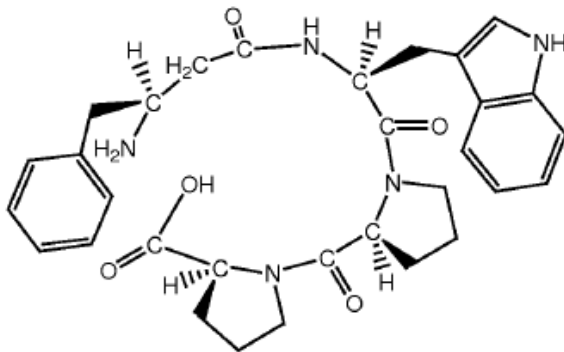
II-K-4



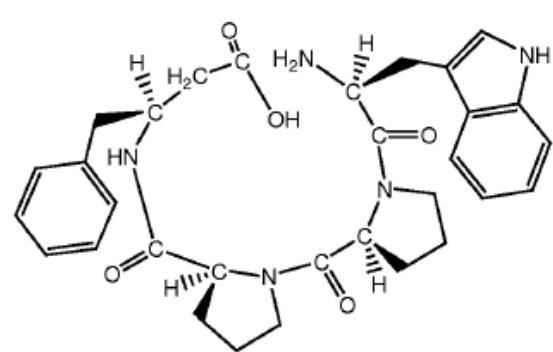
II-L-1



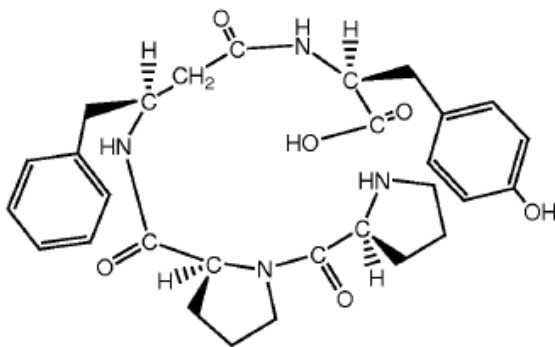
II-L-1



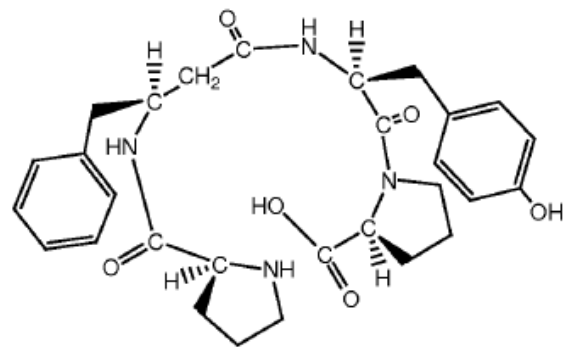
II-L-3



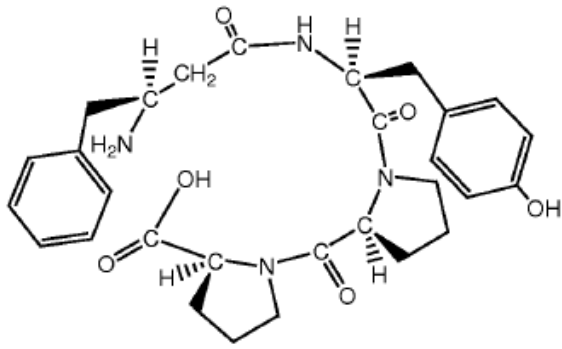
II-L-4



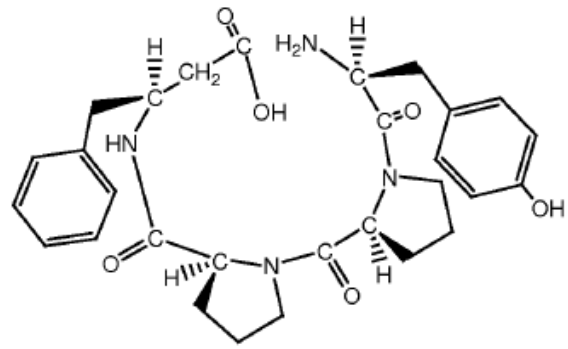
II-M-1



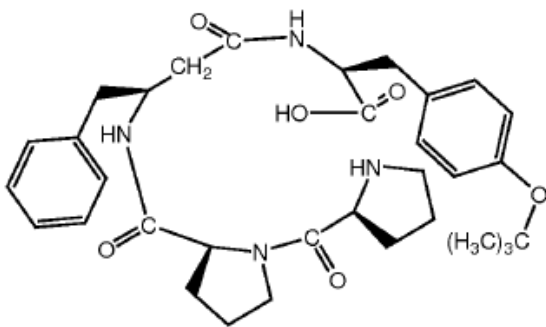
II-M-2



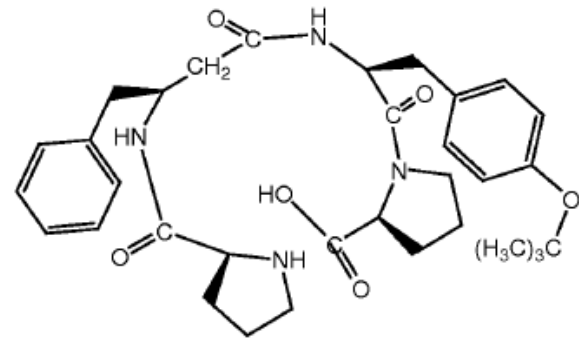
II-M-3



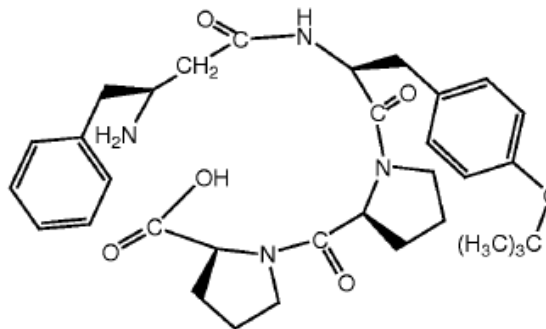
II-M-4



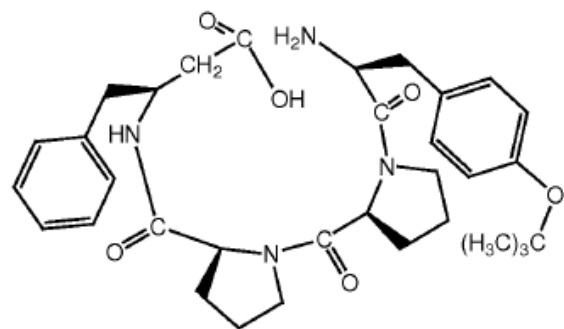
II-N-1



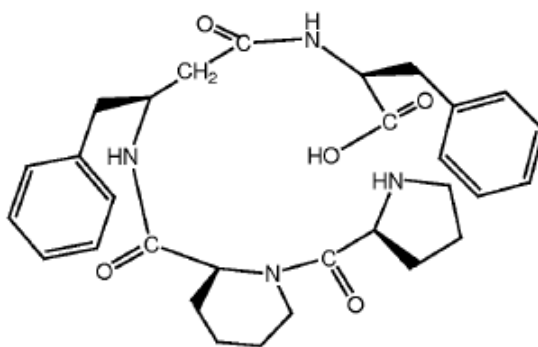
II-N-1



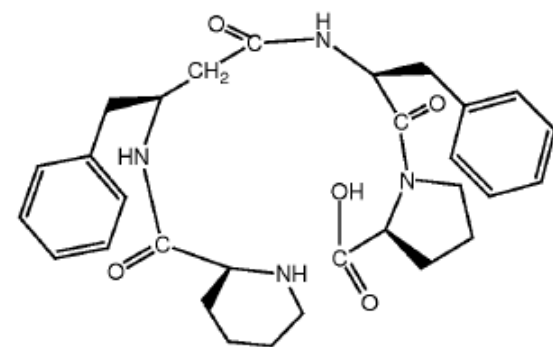
II-N-3



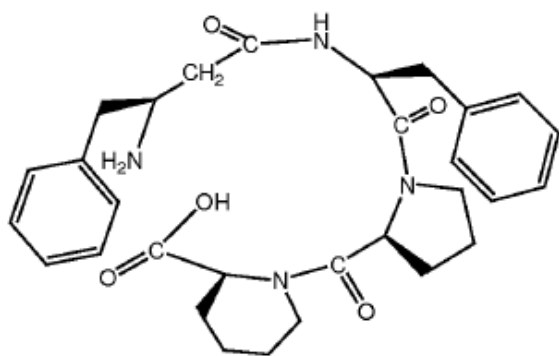
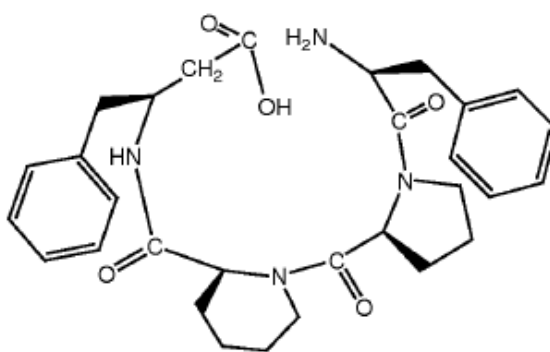
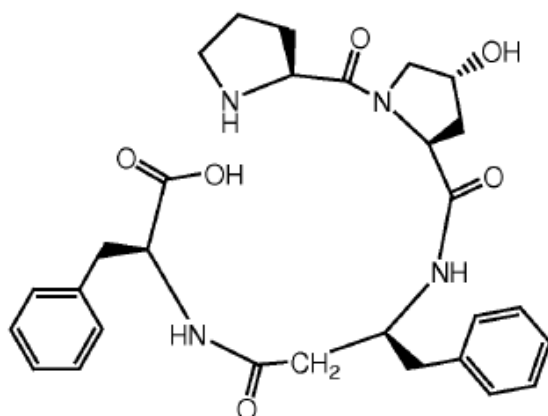
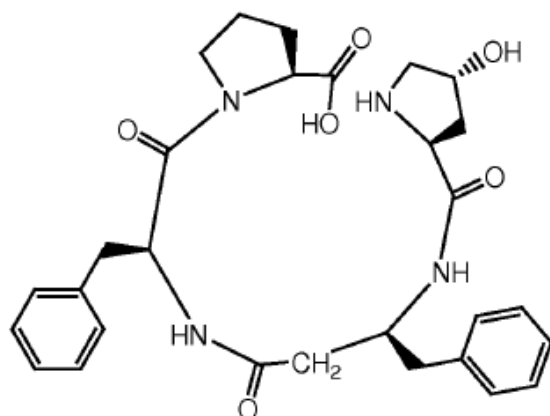
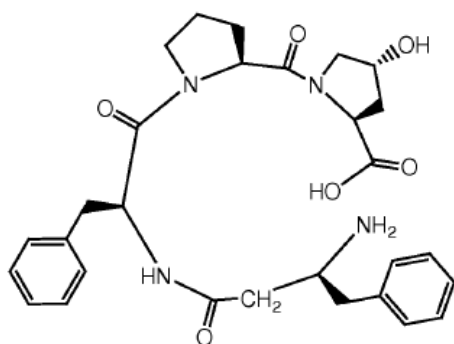
II-N-4



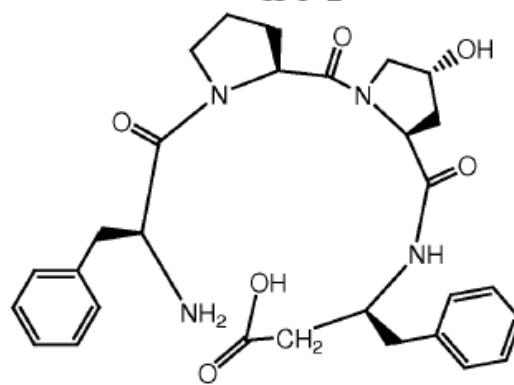
II-O-1



II-O-2

**II-O-3****II-O-4****II-P-1****II-P-2****II-P-3**

y

**II-P-4**

- 5 En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-A-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-A-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-A-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-A-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-B-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-B-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-B-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-B-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-C-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-C-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-C-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-C-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-D-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-D-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-D-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-D-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-E-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-E-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-E-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-E-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-F-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-F-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-F-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-F-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-G-1. En algunas realizaciones, el compuesto es

un compuesto de la fórmula II-G-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-G-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-G-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-H-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-H-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-H-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-H-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-J-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-J-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-J-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-J-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-K-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-K-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-K-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-K-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-L-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-L-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-L-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-L-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-M-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-M-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-M-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-M-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-N-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-N-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-N-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-N-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-O-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-O-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-O-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-O-4. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-P-1. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-P-2. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-P-3. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de la fórmula II-P-4.

25 Descripción detallada

Se ha encontrado que los compuestos de fórmula I exhiben actividad inmunosupresora y/o antiinflamatoria, mientras que al mismo tiempo exhiben menos toxicidad, que algunos compuestos conocidos. De esta manera los compuestos de fórmula I pueden ser útiles como agentes inmunosupresores y/o antiinflamatorios. Como se utiliza aquí, el término “inmunitario” se refiere a una enfermedad o afección en la que el sistema inmunológico del cuerpo sobre-reacciona y/o ataca el cuerpo.

A lo largo de esta especificación, los términos y sustituyentes conservan sus definiciones.

35 Se pretende que “alquilo” incluya estructuras de hidrocarburos saturados lineales, ramificadas o cíclicas y combinaciones de las mismas. Alquilo inferior se refiere a grupos alquilo de 1 a 6 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo inferiores incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, s-butilo y t-butilo. Los grupos alquilo preferidos son aquellos de C_{20} o inferiores. El cicloalquilo es un subconjunto de alquilo e incluye grupos de hidrocarburos cíclicos de 3 a 8 átomos de carbono. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen c-propilo, c-butilo, c-pentilo, y norbornilo.

40 El hidrocarburo C_1 a C_{20} incluye alquilo, cicloalquilo, policicloalquilo, alqueno, alquino, arilo y combinaciones de los mismos. Ejemplos incluyen bencilo, fenetilo, ciclohexilmetilo, canforilo y naftiletilo. El término “carbociclo” pretende incluir sistemas de anillos constituidos totalmente de carbono, pero de cualquier estado de oxidación. Por lo tanto el carbociclo (C_3 - C_{10}) se refiere a sistemas tales como ciclopropano, benceno y ciclohexeno; carbopoliciclo (C_8 - C_{12}) se refiere a dichos sistemas como norbornano, decalina, indano y naftaleno.

45 Alcoxi o alcoxilo se refiere a grupos de 1 a 8 átomos de carbono de una configuración recta, ramificada, cíclica y combinaciones de las mismas adheridas a la estructura progenitora a través de un átomo de oxígeno. Ejemplos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, ciclopropiloxi y ciclohexiloxi. Alcoxi inferior se refiere a grupos que contienen de uno a cuatro átomos de carbono.

Oxalquilo se refiere a residuos de alquilo en los que uno o más átomos de carbono se ha reemplazado por oxígeno. Ejemplos incluyen metoxipropoxi y 3,6,9-trioxadecilo.

55 Acilo se refiere a grupos desde 1 hasta 8 átomos de carbono de una configuración lineal, ramificada, cíclica, saturada, insaturada y aromática y combinaciones de las mismas, adheridos a la estructura progenitora a través de una funcionalidad carbonilo. Uno o más átomos de carbono en el residuo de acilo se pueden reemplazar por nitrógeno, oxígeno o azufre, siempre que el punto de adhesión a la matriz permanezca en el carbonilo. Ejemplos incluyen acetilo, benzoilo, propionilo, isobutirilo, t-butoxicarbonilo y benciloxicarbonilo. Acilo inferior se refiere a grupos que contienen de uno a cuatro átomos de carbono.

60 Arilo significa un anillo aromático de 6 miembros; un sistema de anillo aromático de 9 o 10 miembros bicíclico; o un sistema de anillo aromático de 13 o 14 miembros tricíclico. Los anillos carbocíclicos aromáticos de 6 a 14 miembros incluyen, por ejemplo, benceno, naftaleno, indano, tetralina, y fluoreno.

65

Heteroarilo significa un anillo heteroaromático de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N, o S; un sistema de anillos heteroaromático de 9 o 10 miembros bicíclico que contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N, o S; o un sistema de anillos heteroaromático de 13 o 14 miembros tricíclico que contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N, o S. Los anillos heterocíclicos aromáticos de 5 a 10 miembros incluyen, por ejemplo, imidazol, piridina, indol, tiofeno, benzopirano, tiazol, furano, bencimidazol, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, pirimidina, pirazina, tetrazol y pirazol.

Arilalquilo se refiere a un sustituyente en el que un residuo arilo se adhiere a la estructura progenitora a través de alquilo. Ejemplos son bencilo y fenetilo. El heteroarilalquilo se refiere a un sustituyente en el que un residuo heteroarilo se adhiere a la estructura progenitora a través de alquilo. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, piridinilmetil y pirimidiniletilo.

Heterociclo significa un residuo de cicloalquilo o arilo en el que de uno a tres átomos de carbono se reemplaza por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de N, O y S. Los heteroátomos de nitrógeno y azufre opcionalmente se pueden oxidar, y opcionalmente se puede cuaternizar el heteroátomo de nitrógeno. Ejemplos de heterociclos incluyen pirrolidina, pirazol, pirrol, indol, quinolina, isoquinolina, tetrahydroisoquinolina, benzofurano, benzodioxano, benzodioxol (comúnmente denominado como metilendioxifenilo, cuando se producen como un sustituyente), tetrazol, morfolina, tiazol, piridina, piridazina, pirimidina, tiofeno, furano, oxazol, oxazolona, isoxazol, dioxano y tetrahydrofurano. Cabe señalar que el heteroarilo es un subconjunto heterociclo en el que el heterociclo es aromático. Ejemplos de residuos heterociclicos incluyen, adicionalmente, piperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxo-pirrolidinilo, 2-oxoazepinilo, azepinilo, 4-piperidinilo, pirazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, pirazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, quinuclidinilo, isotiazolidinilo, bencimidazolilo, tiadiazolilo, benzopiranilo, benzotiazolilo, tetrahydrofurilo, tetrahydropiranilo, tienilo, benzotienilo, tiamorfolinilo, tiamorfolinilsulfóxido, tiamorfolinilsulfona, oxadiazolilo, triazolilo y tetrahydroquinolinilo.

El alquilo, arilo, cicloalquilo, heterociclico sustituido etc. se refiere a alquilo, arilo, cicloalquilo, o heterociclico, en los que hasta tres átomos de H en cada residuo se reemplazan con alquilo, halógeno, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxi, carboxilo (también se mencionan como alcoxycarbonilo), carboxamido (también se menciona como alquilaminocarbonilo), ciano, carbonilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, mercapto, alquiltio, sulfóxido, sulfona, acilamino, amidino, fenilo, bencilo, heteroarilo, fenoxi, benciloxi, o heteroaliloxi.

El término "halógeno" significa flúor, cloro, bromo o yodo.

Las siguientes abreviaturas y términos tienen los significados indicados:

Boc = t-butiloxi carbonilo
 c- = ciclo
 DCM = diclorometano = cloruro de metileno = CH_2Cl_2
 DIE = N,N-diisopropiletilamina
 DIPEA = diisopropiletilamina
 DMF = N,N-dimetilformamida
 Fmoc = 9-fluorenilmetoxycarbonilo
 HATU = hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametiluronio
 HBTU = hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametiluronio
 HOAc = ácido acético
 HOAt = 1-hidroxi-7-azabenzotriazol
 HOBt = 1-hidroxibenzotriazol
 Hyp = 4-hidroxi prolina
 Me = metilo
 Pip = ácido pipecólico
 Phe = fenilalanina
 Pro = prolina
 PyBOP = hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-trispimolidinafosfonio
 rt = temperatura ambiente
 TBTU = O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
 TFA = ácido trifluoroacético
 t-Hyp trans-4-hidroxi prolina
 Trp = triptófano
 Tyr = tirosina
 Tyr(tBu) = (O-terc-butil) tirosina

Adicionalmente, una lista completa de las abreviaturas utilizadas por los químicos orgánicos (es decir, personas con experiencia común en la técnica) aparece en la primera emisión de cada volumen del Journal of Organic Chemistry. La lista se presenta normalmente en una tabla titulada "Lista Estándar de Abreviaturas". Adicionalmente, con respecto a los aminoácidos de origen no natural en los que un grupo metileno adicional está presente en la cadena principal, la notación " β^3 -Ho-" (o "beta 3-homo-") se utiliza aquí para referirse a un grupo aminoácido que tiene un metileno adicional (-CH₂-) en la estructura principal entre el átomo de carbono que lleva la cadena lateral y el átomo de carbono terminal; la

notación "β²-Ho-" (o "beta 2-homo-") se utiliza aquí para referirse a un aminoácido que tiene un metileno adicional en la cadena principal entre el átomo de carbono que lleva la cadena lateral y el átomo de nitrógeno terminal.

5 Las realizaciones de la presente invención incluyen compuestos de fórmula I en forma de sales, en particular sales de adición de ácido. Las sales adecuadas incluyen aquellas formadas con ácidos tanto orgánicos como inorgánicos. Dichas sales de adición de ácido serán normalmente sales farmacéuticamente aceptables, aunque las sales no farmacéuticamente aceptables pueden ser de utilidad en la preparación y purificación del compuesto en cuestión. Por lo tanto, las sales preferidas incluyen aquellas formadas a partir de ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, cítrico, tartárico, fosfórico, láctico, pirúvico, acético, succínico, oxálico, fumárico, maleico, oxaloacético, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluensulfónico, bencenosulfónico e isetiónico. Las sales de los compuestos de fórmula I se pueden preparar al hacer reaccionar el compuesto apropiado en forma de base libre con el ácido apropiado.

15 Los compuestos de fórmula I de acuerdo con las realizaciones de la invención son tetrapéptidos cíclicos. La síntesis de estos péptidos se puede lograr mediante ciclización de péptidos lineales que en sí mismos se sintetizan utilizando metodologías conocidas en la técnica correspondiente; véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1964); Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5132 (1985); Kelley & Winkler in Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J. K, ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19 (1990); Stewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984); Mergler et al. (1988) Tetrahedron Letters 29:4005-4008; Mergler et al. (1988) Tetrahedron Letters 29:4009-4012; Kamber et al. (eds), Peptides, Chemistry and Biology, ESCOM, Leiden (1992) pp. 525-526; Riniker et al. (1993) Tetrahedron Letters 49:9307-9320; Lloyd-Williams et al. (1993) Tetrahedron Letters 49:11065-11133; Andersson et al. (2000) Biopolymers 55:227-250; Bray, Nature Reviews 2:587-593 (2003), Patentes Estadounidenses Nos. 4,105,603, 3,972,859, 3,842,067, 3,862,925, 6,015,881, 6,197,927, y 7,439,222. Dicha síntesis se puede lograr a través de la síntesis de fase líquida o fase sólida, o por una combinación de ambos, como se conoce en la técnica.

25 Los métodos de fase líquida (a menudo denominados como métodos en fase de solución) de la síntesis llevan a cabo todas las reacciones en una fase homogénea. Los aminoácidos sucesivos se acoplan en solución hasta que se forma el material de péptido deseado. Durante la síntesis, los sucesivos péptidos intermedios se purifican mediante precipitación y/o lavados.

30 En la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), un primer grupo de aminoácidos o péptido se une a un soporte insoluble, tal como una resina. Los aminoácidos sucesivos o grupos de péptidos se agregan al primer grupo de aminoácidos o péptidos hasta que se forma el material de péptido de interés. El producto de síntesis en fase sólida es de esta manera un péptido unido a un soporte insoluble. Los péptidos sintetizados a través de técnicas de SPPS luego se dividen de la resina, y se aísla el péptido dividido.

35 Más específicamente, la síntesis en fase sólida comienza en el terminal carboxi del péptido putativo al acoplar un aminoácido protegido a un soporte sólido inerte. El soporte sólido inerte puede ser cualquier macromolécula capaz de servir como un ancla para el terminal C del aminoácido inicial. Normalmente, el soporte macromolecular es una resina polimérica cruzada (por ejemplo, una resina de poliamida o poliestireno) como se muestra en las Figuras 1-1 y 1-2, en las páginas 2 y 4 de Stewart & Young, supra. En algunos casos, el aminoácido de terminal C se acopla a una resina de poliestireno para formar un éster de bencilo. Un soporte macromolecular se selecciona de tal manera que el enlace de anclaje de péptido es estable bajo las condiciones utilizadas para desproteger el grupo α-amino de los aminoácidos bloqueados en la síntesis de péptidos. Si se utiliza un grupo α-protector lábil básico, entonces es deseable utilizar un enlace lábil en medio ácido entre el péptido y el soporte sólido. Por ejemplo, una resina de éter lábil ácido es efectiva para la síntesis de péptidos de Fmoc-aminoácido lábil básico como se describe en la página 16 de Stewart & Young, supra. Alternativamente, se pueden utilizar un enlace de anclaje de péptido y el grupo α-protector que es diferencialmente lábil para acidólisis. Por ejemplo, una resina de aminometilo tal como la resina de fenilacetamidometilo (Pam) funciona bien en conjunto con la síntesis de péptidos Boc-aminoácido como se describe en las páginas 11-12 de Stewart & Young, supra. Guiller et al., Chem Rev. 2000, 100, 2091-2157, revisa los ligadores y estrategias de división en la síntesis orgánica en fase sólida y química combinatoria, que incluyen la síntesis de péptidos.

40 Después de que el aminoácido inicial se acopla a un soporte sólido inerte, el grupo α-amino protector del aminoácido inicial se elimina con, por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metileno y se neutraliza en, por ejemplo, trietilamina (TEA). Después de la desprotección del grupo α-amino del aminoácido inicial, se agrega el siguiente α-amino y el aminoácido protegido de cadena lateral en la síntesis. El α-amino restante y, si es necesario, aminoácidos protegidos de cadena lateral luego se acoplan secuencialmente en el orden deseado mediante condensación para obtener un compuesto intermedio relacionado con el soporte sólido. Alternativamente, algunos aminoácidos se pueden acoplar entre sí para formar un fragmento del péptido deseado seguido por la adición del fragmento de péptido a la cadena de péptidos en fase sólida creciente.

45 La reacción de condensación entre dos aminoácidos, o un aminoácido y un péptido, o un péptido y un péptido se puede llevar a cabo de acuerdo con los métodos de condensación habituales tales como el método azida, método de anhídrido de ácido mezclado, métodos DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) o DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida), método de éster activo, método de éster de p-nitrofenilo, método BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris [dimetilamino] fosfonio), método de éster imido ácido N-hidroxisuccínico, etc., y método del reactivo K de Woodward.

Es común en las síntesis químicas de péptidos proteger cualesquier grupos de cadena lateral reactivos de los aminoácidos con grupos protectores adecuados. Por último, estos grupos protectores se eliminan después de que se ha ensamblado de forma secuencial la cadena de polipéptidos deseada. También es común la protección del grupo α -amino de un aminoácido o fragmento de péptido, mientras que el grupo carboxi de terminal C del fragmento de aminoácido o péptido reacciona con el grupo amino de terminal N libre de la cadena de polipéptidos en fase sólida creciente, seguido por la eliminación selectiva del grupo protector α -amino para permitir la adición del siguiente aminoácido o fragmento de péptido a la cadena de polipéptidos de fase sólida. De acuerdo con lo anterior, es común en la síntesis de polipéptidos que se produzca un compuesto intermedio que contenga cada uno de los residuos de aminoácidos localizados en la secuencia deseada en la cadena de péptido en la que los residuos individuales todavía llevan grupos protectores de cadena lateral. Estos grupos protectores se pueden eliminar sustancialmente al mismo tiempo para producir el producto de polipéptido deseado después de eliminación de la fase sólida.

Se pueden proteger las cadenas laterales α - y ω -amino, por ejemplo, con grupos benciloxicarbonilo (abreviado Z), isonicotiniloxicarbonilo (iNoc), o-clorobenciloxicarbonilo [Z(2Cl) o 2-Cl-Z], p-nitrobenciloxicarbonilo [Z(NO₂)], p-metoxibenciloxicarbonilo [Z(OMe)], t-butoxicarbonilo (Boc), t-amiloxicarbonilo (Aoc), isoborniloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo (Adoc), 2-(4-bifenil)-2-propiloxicarbonilo (Bpoc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), metilsulfonietoxicarbonilo (Msc), trifluoroacetilo, ftalilo (Pht), formilo (For), 2-nitro-fenilsulfenilo (Nps), difenilfosfinotiolo (Ppt), y dimetilfosfinotiolo (Mpt). Ejemplos adicionales de grupos protectores de cadena lateral incluyen acetilo (Ac), benzoilo (Bz), tert-butilo (t-Bu), trifenilmetilo (tritilo, Trt), tetrahidropirano, bencilo (Bzl), 2,6-diclorobencilo, nitro, p-toluenosulfonilo (Tos), xantilo (Xan), bencilo, metilo, etilo, y éster de t-butilo, y grupos protectores tipo uretano aromáticos o alifáticos, grupos fotolábiles tales como nitro veratril oxicarbonilo (Nvoc), y grupos lábiles de fluoruro como trimetilsililetiloxicarbonilo (TEOC).

Ejemplos de grupos protectores de terminal amino (también denominados aquí como grupos protectores de terminal N) incluyen: (1) grupos protectores de tipo acilo, tales como formilo, acrililo (Acr), benzoilo (Bz) y acetilo (Ac); (2) grupos protectores del tipo uretano aromático, tales como benciloxicarbonilo (Z) y Z sustituido, tales como p-clorobenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo; (3) grupos protectores de uretano alifáticos, tales como t-butiloxicarbonilo (BOC), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, aliloxicarbonilo; (4) grupos protectores del tipo cicloalquilo uretano, tales como 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, y ciclohexiloxicarbonilo; y (5) grupos protectores tipo tiouretano, tales como feniltio-carbonilo. Los grupos protectores preferidos incluyen 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), 2-(4-bifenil)-propil(2)oxicarbonilo (Bpoc), 2-fenilpropil(2)-oxicarbonilo (Poc), y t-butiloxicarbonilo (Boc).

Los grupos protectores para el grupo funcional carboxi se ejemplifican por éster de bencilo (OBzl), éster de ciclohexilo (Chx), éster de 4-nitrobencilo (ONb), éster de t-butilo (Obut), y éster de 4-piridilmetil (OPic). A menudo es deseable que los aminoácidos específicos tales como arginina, cisteína, y serina que poseen un grupo funcional distinto de los grupos amino y carboxilo se protejan por un grupo protector adecuado. Por ejemplo, el grupo guanidino de la arginina se puede proteger con nitro, p-toluenosulfonilo, benciloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, p-met-oxibencesulfonilo, 4-metoxi-2,6-dimetilbencenosulfonilo (Nds), y 1,3,5-trimetilfenisul-fonil (Mts). El grupo tiol de la cisteína se puede proteger con, por ejemplo, p-metoxibencilo y tritilo.

Aunque puede ser posible que los compuestos de fórmula I sean administrados como el producto químico bruto, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica. De acuerdo con un aspecto adicional, se proporcionan de acuerdo con las realizaciones de la presente invención una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, junto con uno o más portadores farmacéuticamente de los mismos y opcionalmente uno o más de otros ingredientes terapéuticos. El portador (s) debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de la misma.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, parenteral (que incluyen subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa e intraarticular), rectal y tópica (que incluyen dérmica, bucal, sublingual e intraocular). La ruta más adecuada puede depender de la afección y trastorno del receptor. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Los métodos para preparar dichas formulaciones incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo ("ingrediente activo") con el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan al poner en asociación uniforme e íntimamente el ingrediente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y después, si es necesario, dar forma al producto en la formulación deseada.

Las formulaciones de acuerdo con las realizaciones de la presente invención adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también se puede presentar como un bolo, electuario o pasta.

Un comprimido se puede elaborar mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar al comprimir en una máquina adecuada el ingrediente activo

5 en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, lubricante, agente de superficie activa o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden elaborar al moldear en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos opcionalmente se pueden recubrir o ranurar y se pueden formular con el fin de proporcionar liberación sostenida, retrasada o controlada del ingrediente activo en el mismo.

10 Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor destinado. Las formulaciones para administración parenteral también incluyen suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar dosis unitaria de recipientes de dosis múltiples, por ejemplo ampollas selladas y frascos, y se pueden almacenar en una condición seca por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición de un portador líquido estéril, por ejemplo solución salina o solución salina regulada con fosfato (PBS), inmediatamente antes de uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

15 Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con los portadores habituales tales como manteca de cacao o polietilenglicol.

20 Las formulaciones para administración tópica en la boca, por ejemplo bucal o sublingual, incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base aromatizada tal como sacarosa y acacia o tragacanto, y pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

25 Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis efectiva, como se menciona adelante, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

30 Se debe entender que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de acuerdo con las realizaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellas adecuadas para la administración oral administración puede incluir agentes aromatizantes.

35 Como se indica, de acuerdo con las realizaciones de la invención, los compuestos de acuerdo con las realizaciones de la invención se pueden utilizar para el tratamiento o prevención de ciertas enfermedades o afecciones. El término "prevención" como se utiliza aquí, se refiere a la administración de un medicamento para evitar o prevenir de antemano un ataque. La persona de experiencia normal en la técnica médica (a la que se dirige el presente método de reivindicaciones de uso) reconoce que el término "prevenir" no es un término absoluto. En la técnica médica se entiende que se refiere a la administración profiláctica de un fármaco para disminuir sustancialmente la probabilidad o gravedad de una afección, y este es el sentido previsto en las reivindicaciones de los solicitantes. La atención del lector se dirige a la Physician's Desk Reference, un texto estándar en el campo, en el que el término "prevenir" aparece cientos de veces. 40 La persona sin experiencia en la técnica médica interpreta el término en un sentido absoluto. Del mismo modo, cuando se afirma que los compuestos de acuerdo con las realizaciones de la invención se pueden utilizar para suprimir una respuesta inmunitaria, "suprimir" se entenderá que incluye reducir el grado de respuesta, y no impide necesariamente absolutamente la respuesta.

45 Se puede encontrar luego de examen que los compuestos que no se excluyen actualmente de las reivindicaciones no son patentables para los inventores en esta solicitud. En ese caso, la exclusión de las especies y géneros en las reivindicaciones del solicitante se deben considerar objeto de trámite de patentes y no un reflejo del concepto o descripción de los inventores de su invención. La invención, en un aspecto de composición, es todos los compuestos de fórmulas I y II, excepto aquellas que están en posesión del público.

50 Las realizaciones de la invención se entenderán mejor con referencia a las figuras, en las que:

55 La figura 1 muestra aumento de antígeno específico del grosor de oreja derivado del experimento descrito en el Ejemplo 2;

La figura 2 muestra el número total de células en los ganglios linfáticos de la parótida observados en el experimento descrito en el Ejemplo 2;

60 La figura 3 muestra el contenido de células viables y muertas en los ganglios linfáticos de la parótida descritos en el Ejemplo 2;

La figura 4 presenta el número y la participación de tipos de células en los ganglios linfáticos de drenaje registrados en el experimento descrito en el Ejemplo 2;

65 La figura 5 presenta toxicidad del compuesto de fórmula IA contra las células mononucleares de la sangre humana como se describe en el Ejemplo 3;

La figura 6 presenta efectos de la administración intraperitoneal del compuesto de fórmula IA en la respuesta inmunitaria humoral de ratones a eritrocitos de oveja, como se describe en el Ejemplo 4;

5 La figura 7 muestra los efectos de la administración intraperitoneal del compuesto de fórmula IA en la respuesta inmunitaria celular a la ovoalbúmina como se describe en el Ejemplo 5;

Las Figuras 8A y 8B muestran los efectos de los péptidos de acuerdo con las realizaciones de la invención en la supervivencia PMBC in vitro;

10 Las Figuras 9A y 9B muestran los efectos de los péptidos de acuerdo con las realizaciones de la invención sobre la proliferación de PBMC inducida por PHA in vitro;

15 Las Figuras 10A y 10B muestran los efectos de diversos compuestos sobre los cambios en el grosor de la oreja en respuesta a la exposición antigénica, como se describe en el Ejemplo 7;

La figura 11 muestra la permeabilidad de los vasos sanguíneos capilares en la prueba de azul de Evans, como se describe en el Ejemplo 7;

20 La figura 12 muestra el número total de células en los ganglios linfáticos de drenaje, como se describe en el Ejemplo 7;

La figura 13 muestra los efectos de los compuestos sobre el número de leucocitos circulantes, como se describe en el Ejemplo 7;

25 La figura 14 muestra los tipos de leucocitos presentes en diferentes casos, como se describe en el Ejemplo 7; y

La figura 15 proporciona datos morfométricos sobre el número y la composición de células en aurículas de ratón, como se describe en el Ejemplo 7.

Ejemplo 1 Síntesis de tetrapéptidos cíclicos

30 Los tetrapéptidos cíclicos de acuerdo con las realizaciones de la invención se pueden sintetizar mediante el uso de métodos de síntesis de péptidos conocida, tales como los métodos en fase de solución o en fase sólida. En general, la síntesis implica dos etapas consecutivas: (1) la síntesis de un tetrapéptido lineal y (2) ciclización para producir el tetrapéptido cíclico. El tetrapéptido lineal se puede preparar en forma protegida y luego desproteger antes de ciclización.

35 Para ilustrar, la síntesis de tetrapéptidos lineales sobre un soporte sólido (Fmoc-L-fenilalanina unido a una resina tipo Wang, o ya sea L-beta-3-homofenilalanina o L-prolina adherida a una resina de tritilo 2-cloro) se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

40 1. la resina se infló en dimetilformamida (DMF) (0.25 mmol, 10 ml/g de resina) durante 15 min.

2. El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20% de piperidina en DMF (2 x 20 min).

45 3. La resina se lavó con DMF (3 x 2 min)

4. La resina se lavó con metanol (MeOH) (3 x 2 min)

5. La resina se lavó con diclorometano (DCM) (3 x 2 min)

50 6. Los grupos de aminoácido o amino de péptido en la resina se acilaron al agitar una mezcla de aminoácido protegido de Fmoc (4 eq), HBTU o TBTU (4 eq) y DIPEA (4 eq) disuelto en DMF anhidro (4 ml/mmol), durante 20 horas.

7. La resina se lavó con DCM (3 x 2 min)

55 8. La resina se lavó con MeOH (3 x 2 min)

9. La resina se lavó con DCM (3 x 2 min)

60 10. La prueba de Kaiser (para todos los aminoácidos excepto prolina) se utilizó para estimar si se acilan todos los grupos amino.

Si el resultado de la prueba de Kaiser fue negativo, la resina se lavó con DMF (1 x 2 min) y un nuevo ciclo de acoplamiento se inició desde el punto 2 del protocolo. Si el resultado de la prueba de Kaiser fue positivo, se repitió la acilación con la mitad de la cantidad del reactivo utilizado para el primer acoplamiento. En el caso de acilación de la prolina, la prueba de Kaiser no es lo suficientemente sensible para determinar el grado de acilación, y por esta razón en el caso de la prolina se repitió el procedimiento de acoplamiento con la mitad de la cantidad de reactivos. En el caso de acilación repetida, se llevaron a cabo los siguientes lavados:

- 7A. Lavado con DCM (3 x 2 min).
 8A. Lavado con MeOH (3 x 2 min)
 9A. Lavado con DCM (3 x 2 min)

5

Después del último acoplamiento, la resina se lavó de acuerdo con los puntos 3 a 5 del protocolo. El grupo Fmoc se eliminó del péptido como se describe en el punto 2, y la resina se lavó de nuevo con DMF, MeOH y DCM como en los puntos 3 a 5. Antes de la división del péptido del soporte polimérico, la resina se secó durante la noche en un desecador sobre gránulos de KOH bajo presión reducida a temperatura ambiente.

10

Los péptidos se dividieron de la resina seca tipo Wang con una mezcla de ácido trifluoroacético/agua/triisopropilsilano 95: 2.5: 2.5 (v/v/v; 10 ml/1 g de la peptidil-resina). La solución obtenida se evaporó parcialmente a temperatura ambiente bajo presión reducida y el péptido se precipitó con 10 volúmenes de éter. Después de ser separado por filtración, el péptido crudo se disolvió en HCl acuoso 0.05 M y se evaporó hasta secado. El residuo se disolvió en agua y se liofilizó.

15

Los péptidos se dividieron a partir de resina 2-Cl-tritilo mediante tratamiento con una mezcla 1: 3: 1 de ácido acético /diclorometano/trifluoroetanol (v/v/v; 10 ml/1 g de la peptidil-resina). La solución de división resultante más los lavados recolectados se filtraron, se evaporaron hasta secado a temperatura ambiente y presión reducida, y el residuo se disolvió en un volumen mínimo de DCM, se diluyó con 20 volúmenes de hexano y se volvió a evaporar (dos veces). El péptido separado crudo se disolvió en agua y se liofilizó.

20

Después el péptido liofilizado se secó en un desecador bajo vacío sobre KOH y P₂O₅, está listo para la ciclización.

25

En una síntesis típica siguiendo el protocolo anterior, partiendo con Fmoc-Phe unido a resina de Wang (278 mg, 0.2 mmol, 0.72 mmol/g) y después del acoplamiento secuencial de Fmoc-L-β²-homoPhe-OH, Fmoc -Pro-OH y otra vez Fmoc- Pro-OH, el rendimiento después de liofilización fue 91 mg (82%) de péptido lineal crudo con una pureza de 94% (HPLC).

30

Los péptidos crudos se ciclizan en solución de DCM (concentración de péptido de 2 x 10⁻⁴ milimoles/litro) con la ayuda de PyBOP/HOAt/2,4,6-colidina (3: 3: 5), con desaparición de precursores lineales que se trazan mediante inyección de muestras de soluciones de reacción sobre una columna de HPLC de fase inversa analítica (RP). Al final de la ciclización, la solución se evaporó hasta secado bajo presión reducida y el residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (1000 ml de solvente por 1 milimol de péptido y HCl 0.5 N en agua (100 ml de solución por 1 milimol de péptido). La fase orgánica se lavó consecutivamente con HCl 0.5 N en agua (2x), agua (1x), NaHCO₃ 1 M (3x) y agua (1 x). El solvente orgánico se eliminó a presión reducida y el sólido residual se disolvió en dioxano y se seco por congelación. El producto crudo se purificó en una columna preparativa de fase inversa Vydac C₁₈ o Kromasil C₈ (250 mm/22 mm, 100 a, 10 μm) utilizando un gradiente de elución de solvente B (0.038% de TFA en 82% de acetonitrilo/agua) en solvente a (0.05% de TFA en agua).

35

40

Como un ejemplo de una reacción de ciclización, una solución de H-Pro-Pro-β³-hPhe-Phe-OH x HCl (55.7 mg, 0.1 mmol) en 500 ml de DCM se trató con PyBOP (157 mg, 0.3 mmol) y HOAt (40 mg, 0.3 mmol) en presencia de 2,4,6-colidina (67.5 μl, 0.5 mmol), produciendo después de tratamiento final y purificación 13.5 mg (27 %) del tetrapéptido cíclico con pureza 99%, determinada mediante HPLC.

45

De esta manera, se sintetizaron los compuestos de las fórmulas IA a IP. La siguiente Tabla 1 proporciona algunos datos para los compuestos de las fórmulas IA a IP.

TABLA 1

No.	MS (MH ⁺)/PM calculado	HPLC(Vydac C ₁₈ 250x4.6mm, 5μm, 300A, 1 mL/min, 45-75% B en 15 min. A:0.05% TFA/agua, B: 0.0038% de TFA/82% de Acetonitrilo/agua)	
		t _R (min)	Pureza (%), λ 214 nm
I-A	503.45/502.6	4.79	99.35
I-B	503.47/502.6	5.96	99.00
I-C	517.49/516.6	5.26	99.00
I-D	503.25/502.6	5.10	98.12
I-E	503.20/502.6	5.83	97.15
I-F	503.25/502.6	6.70	99.08
I-G	503.25/502.6	5.87	98.71
I-H	503.26/502.6	6.23	98.79
I-J	503.30/502.6	4.80	100.0
I-K	503.27/502.6	4.65	97.44
I-L	542.1/541.6	4.72	99.47
I-M	519.3/518.6	5.81	100.0
I-N	575.3/574.7	7.25	98.43
I-O	517.3/516.6	6.52	97.05
I-P	MS+Na ⁺ 541.47,	9.15(col.C-8 Kromasil, gradiente 40-80%)	99.00

	MS+K ⁺ =557.44/ 518.25	B en 15 min)	
--	--------------------------------------	--------------	--

Ejemplo 2. Eficacia terapéutica del péptido como una pomada al 0.1% en el modelo de sensibilidad por contacto a oxazolona en ratones BALB/c

5 El objetivo de este experimento fue verificar la acción terapéutica del compuesto IA y su toxicidad en un modelo animal generalmente aceptado. En el experimento descrito adelante, se aplicó el compuesto de fórmula IA como preparación terapéutica en la forma de pomada al 0.1% peso/peso basada en un portador farmacéutico utilizado comúnmente, es decir, una pomada compuesta por 50% de vaselina y 50% de lanolina. Se estudió la utilidad de la preparación en la reducción de la fase efectora de la sensibilidad por contacto a oxazolona en ratones, en comparación con preparaciones de referencia tales como tacrolimus (Protopic®) y pimecrolimus (Elidel®), utilizadas ampliamente para el tratamiento de enfermedades de la piel.

Materiales y métodos

15 Ratones: ratones Balb/c hembra, de 8 a 10 semanas de edad, suministrados por el Institute of Laboratory Medicine, Lódz, Polonia, se utilizaron para el estudio. Los ratones se alimentaron con comida en gránulos comercial y agua ad libitum. El comité de ética local aprobó el estudio.

20 Reactivos: la crema y pomada agua en aceite fueron suministrados por Nepentes. El tetrapéptido cíclico (compuesto IA) se sintetizó como se describió anteriormente. Protopic® (tacrolimus) se adquirió de Astellas, Irlanda; Elidel® (pimecrolimus) se adquirió de Novartis; Hydrocoitisonum® (hidrocortisona) se adquirió de Aflofarm Farmacja Polska, Polonia. DMSO se obtuvo de Fluka; oxazolona, acetona, azul de Evans, Giemsa, May-Grünwald, y formalina fueron de Sigma.

25 Sensibilidad por contacto a oxazolona: La prueba se realizó de acuerdo con Noonan et al. (Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1978, 56, 523-532), con algunas modificaciones. Los ratones se afeitaron en el abdomen (2 x 2 área cm) y después de 24 h se aplicó 100 µl de oxazolona en acetona al 0.5% al área afeitada. Se obtuvo reacción de sensibilidad por contacto 5 días después mediante aplicación de 50 µl de oxazolona en acetona al 1% en ambos lados de las orejas. El edema de la oreja se midió 48 horas más tarde utilizando un calibrador de resorte. Los resultados se presentan como aumento específico de antígeno del grosor de la oreja (es decir, el grosor de fondo (BG) de la oreja de los ratones se restó del grosor medido).

35 Aplicación de compuestos: En el experimento mostrado, se aplicó el compuesto de fórmula IA por vía tópica como una pomada al 0.1% en ambos lados de las orejas (volumen total de 50 µl por oreja), en 24 h y 26 h después de provocar la reacción con la segunda dosis de oxazolona. Los compuestos de referencia se utilizaron de una manera similar en la forma de preparaciones disponibles comercialmente.

40 Determinación del número de células de ganglios linfáticos: Se aislaron ganglios linfáticos mandibulares, mandibulares accesorios, y de parótida superficial, se homogenizaron presionando contra un tamiz de acero en una solución regulada con fosfato (PBS), se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS que contenía azul de tripano al 0.2%. Se determinó el número total de células no viables utilizando un microscopio de luz y hemocitómetro de Bürker. Los ratones tratados solo con la dosis estimulante de antígeno sirven como control de fondo.

45 Determinación de número de leucocitos de circulación y fórmula sanguínea: Los ratones fueron sometidos a anestesia con halotano y se hicieron sangrar desde el plexo retro-orbital, seguido por dislocación cervical. El número de leucocitos de sangre se determinó por dilución de sangre en solución de Türk y conteo de las células en un hemocitómetro. Las muestras de sangre se prepararon sobre vidrio de microscopio, se secaron y se tiñeron con reactivos Giemsa y May-Grünwald. Las muestras se revisaron posteriormente histológicamente. Los números de leucocitos en circulación se presentaron por 1 mm³ y las composiciones de células sanguíneas como un porcentaje de un tipo de célula dado. Los ratones tratados solo con la dosis estimulante de antígeno sirvieron como control de fondo.

50 Análisis histológico: las aurículas se fijaron en solución de formalina al 4% durante 48 h, se lavaron durante 24 h, se deshidrataron en una serie de alcoholes y se embebieron en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en un microtomo Micron HM310 en secciones de 6 µm. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina y con azul de toluidina. El análisis histológico fue realizado en un microscopio de luz Nikon Eclipse 801. Sobre los cortes histológicos que contenían secciones cruzadas de aurículas, se realizaron las estimaciones morfométricas de los neutrófilos, macrófagos, linfocitos y mastocitos en el tejido conjuntivo perivascular y subepitelial. Las células se contaron en el área de 0.07 mm² en aumento de 400 x. El análisis morfométrico se realizó con la ayuda del software de formación de imagen NIS-Elements (Nikon). Por cada grupo examinado, se llevaron a cabo 25 enumeraciones de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y mastocitos.

65 Estadísticas: Los resultados se presentan como valores promedios ± error estándar (ES). Se utilizó la prueba de Brown-Forsyth para determinar la homogeneidad de la varianza entre los grupos. Cuando la varianza fue homogénea, se aplicó análisis de varianza (ANOVA de una vía), seguido de comparaciones post hoc con prueba de Tukey para estimar la importancia de las diferencias entre los grupos. Se evaluaron los datos no paramétricos con análisis de varianza de

Kruskal-Wallis, como se indica en el texto. La significación se determinó en $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando STATISTICA para 7 Windows. El análisis estadístico se aplica a todos los datos que se muestran en esta descripción.

5 Resultados:

Los datos incluidos en la Figura 1 muestran la eficacia terapéutica del compuesto de fórmula IA (etiquetado como "4B8M" en la figura 1 y figuras posteriores y las preparaciones de referencia en ratones con reacción de sensibilidad por contacto a oxazolona completamente desarrollada. Las preparaciones se aplican por vía tópica como se describe en los métodos. La figura 1 presenta sólo aumentos específicos de antígeno del grosor de la oreja (como resultado de restar los valores de fondo medidos en ratones no sensibilizados que se dieron solo en dosis estimulante de antígeno). El compuesto IA provocó una inhibición de aproximadamente 80% del edema de oreja; Protopic® y Elidel® provocaron respectivamente alrededor de 30% y 50% de inhibición.

La intensidad de los procesos inflamatorios en las orejas debe correlacionarse con el número de células en los ganglios linfáticos de drenaje. Por lo tanto, la inhibición de la inflamación debe estar asociada con una disminución del número de células en los ganglios linfáticos de drenaje. La figura 2 muestra que tanto el compuesto de fórmula IA, así como Elidel® redujo el número de linfocitos en los ganglios linfáticos de drenaje al nivel registrado en los ratones no sensibilizados. Sin embargo, en ratones tratados con Protopic® el número de células de ganglios linfáticos fue similar a aquello de los ratones no tratados.

La figura 3 muestra las proporciones de células viables y muertas en los ganglios linfáticos de drenaje, expresadas en porcentajes. El compuesto de fórmula IA exhibe un efecto tóxico insignificante en comparación con ratones no tratados de control. Un mayor efecto tóxico es provocado por Elidel®, y el Protopic® es excepcionalmente tóxico con respecto a células de ganglios linfáticos.

La información complementaria con respecto a la eficacia terapéutica de las preparaciones se puede derivar de un análisis histológico del número de células y la composición en las aurículas inflamadas. La figura 4 representa los números y la participación de tipos celulares básicos implicados en el proceso inflamatorio local. En la figura 4, Mast = mastocitos, L = linfocitos, MØ = macrófagos, Ne = neutrófilos. Las aurículas de los ratones no tratados (K +) se caracterizan por una alta infiltración de neutrófilos. La aplicación del compuesto de fórmula IA revirtió casi por completo los cambios observados en los ratones de control (normalización del número de neutrófilos con un cierto aumento en el contenido de macrófagos). El Protopic®, a su vez, provocó algunos cambios en la proporción de los respectivos tipos celulares sin reducción del infiltrado celular total. El Elidel® provocó una disminución moderada del número total de células.

Ejemplo 3. La toxicidad del compuesto IA versus aquella del ciclinopéptido contra las células mononucleares de sangre humana

Para la evaluación de la toxicidad del compuesto de fórmula IA, se eligieron las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Esta fracción consiste en aproximadamente 80% de linfocitos y 20% de monocitos. Como compuesto de referencia, se seleccionó ciclinopéptido (CLA) ya que el compuesto de fórmula IA comparte una parte de la secuencia de CLA. El CLA exhibe propiedades inmunosupresoras comparables a aquellas de la ciclosporina A, pero es menos tóxico.

45 Materiales y Métodos

La prueba citotóxica: La sangre venosa de un solo donante se tomó en jeringas heparinizadas, se diluyó dos veces con solución salina regulada con fosfato (PBS) y se aplicó sobre Lymphoprep® (Polfa, Kutno, Polonia) (densidad de 1-077 g/ml). Después de centrifugación a 1200 xg durante 20 min, se recolectaron las células mononucleares de la interfase y se lavaron 3 veces con PBS. Las células se resuspendieron en un medio de cultivo estándar que consiste en medio RPMI-1640, L-glutamina, piruvato de sodio, 2-mercaptoetanol, 100 µg/ml de cada una de estreptomina y penicilina y suero de ternera fetal al 10%. Las células se distribuyeron en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano a una densidad de $2 \times 10^5/100 \mu\text{l}$. Los compuestos (fórmula IA y CLA) se disolvieron inicialmente en DMSO (5 mg/500 µl) y posteriormente en el medio de cultivo. El DMSO, se diluyó apropiadamente con el medio de cultivo, se utilizó como control. Después de 24 h de incubación en una incubadora de cultivo celular, la viabilidad celular se determinó mediante un método colorimétrico (Hansen et al., J Immunol Methods, 1989, 119, 203-210).

Los resultados se muestran en la figura 5, se presentan como valores promedios de densidad óptica de pozos cuadruplicados (cultivos celulares) \pm EE. Como se puede ver en la figura 5, el compuesto de fórmula IA (enumerado como "4B8M") no mostró toxicidad significativa en el rango de concentraciones de 10 a 100 µg/ml. El CLA, por otra parte, mostró un efecto citotóxico estadísticamente significativo en 40 µg/ml.

Ejemplo 4. Efecto del péptido sobre la respuesta inmunitaria humoral a SRBC en vivo

Ratones hembra CBA, de 8 a 12 semanas de edad, fueron suministrados por The Institute of Laboratory Medicine, Łódź, Polonia. Los ratones tuvieron libre acceso a agua y alimento en gránulos. El comité de ética local aprobó el estudio. Los

eritrocitos de oveja (SRBC) se suministraron por la Wroclaw University of Life and Environmental Sciences, Polonia, y se mantuvieron en medio RPMI-1640.

5 Respuesta inmunitaria primaria humoral a SRBC in vivo: Se inmunizaron ratones con 0.2 ml de suspensión de SRBC al 5% (0.5 ml de gránulos de SRBC resuspendidos a un volumen de 10 ml de NaCl al 0.9%), por vía intraperitoneal. Después de 4 días se determinó el número de células formadoras de anticuerpos (AFC) en los bazo utilizando un ensayo de hemólisis local en gel de agar (por Mishell et al., J Exp Med, 1967, 126, 423-442). Los resultados se presentan en la figura 6 como un valor promedio de 5 ratones \pm error estándar y se expresaron como número AFC por 10^6 de esplenocitos viables.

10 Los ratones se inmunizaron con SRBC como se describió anteriormente y después de 2 h se les dio 10 o 100 μ g del compuesto de fórmula IA. La ciclosporina A (CsA) sirvió como un fármaco de referencia. Se midió el número de células formadoras de anticuerpos en SRBC después de 4 días. Como se muestra en la figura 6, el compuesto de fórmula IA fue más inhibitorio en ambas dosis que CsA.

15 Ejemplo 5. Efecto del péptido sobre la respuesta inmunitaria celular in vivo para ovoalbúmina

20 Los ratones machos CBA de 8 a 12 semanas de edad fueron suministrados por el The Institute of Laboratory Medicine, Łódź, Polonia. Los ratones tenían libre acceso a agua y alimento en gránulos. La ovoalbúmina era de Sigma y los adyuvantes de Difco.

25 Prueba de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH): Se sensibilizaron ratones por vía subcutánea con 5 μ g de ovoalbúmina (OVA) emulsionada en adyuvante completo de Freund en la base de la cola. Después de 4 días los ratones se inocularon con 50 μ g de OVA en adyuvante incompleto de Freund en las almohadillas de las patas traseras. Después de las siguientes 24 horas, el grosor de la almohadilla de las patas traseras se midió utilizando un calibre. Los controles (ratones de respuesta de fondo) no fueron sensibilizados, sino que recibieron la dosis de inoculación de OVA. El compuesto de fórmula IA y el compuesto de referencia se administraron a ratones en dos 100 μ g de dosis intraperitoneales, 2 h antes y 24 h después de la dosis de sensibilización de antígeno. Los resultados, presentados en la figura 7 como un valor promedio de aumento específico de antígeno de grosor de la almohadilla de las patas medido en 5 ratones y expresado en unidades de DTH (una unidad DTH = 10^{-2} cm) \pm error estándar, mostraron que el compuesto de fórmula IA, administrado en dos dosis, 2 h y 24 h después de inmunización, inhibió la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado a OVA. Esa acción supresora era más fuerte que aquella del CLA y CsA.

35 Ejemplo 6

40 Se probaron los tetrapéptidos cíclicos in vitro por sus efectos sobre proliferación inducida por fitohemaglutinina A (PHA) de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y para la producción inducida por lipopolisacárido (LPS) de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en cultivos celulares de sangre humana completa en un rango de concentración de 1-100 μ g/ml. Los compuestos también se probaron para toxicidad celular en el rango de concentración de 1 a 100 μ g/l contra PBMC humano.

Materiales y Métodos:

45 Reactivos: medio RPMI-1640 (Cibi/Life Technologies, Reino Unido), suero de ternera fetal (FCS, Gibco), DMSO, fitohemaglutinina A (PHA), lipopolisacárido (LPS) cepa O111: B de E. coli (Sigma), bromuro de 93-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), SDS y DMF (Sigma). El medio de cultivo consistió en RPMI-1640, 10% de adición de FCS, L-glutamina, piruvato de sodio, 2-mercaptoetanol y antibióticos (estreptomycin y penicilina). Los tetrapéptidos cíclicos se disolvieron inicialmente en DMSO (5 mg/ml), lo disuelto en el medio de cultivo a la concentración deseada.

50 Aislamiento de PBMC: La sangre venosa se tomó de un único donante (un varón, de 62 años de edad) en jeringas heparinizadas, y se diluyó dos veces con solución salina regulada con fosfato (PBS). El PBMC se aisló por centrifugación en gradiente de Ficoll-uropolina (1.077 g densidad/ml) (Lymphoprep; PAA Laboratories), a 800xg durante 20 min a 4°C. Las células en interfase, que consisten de linfocitos (20%) y monocitos (80%) luego se lavaron tres veces con medio de Hanks y se resuspendieron en el medio de cultivo a una densidad de 2×10^6 células/ml.

55 La respuesta proliferativa de PBMC a PHA: El PBMC aislado se distribuyó en placas de 96 pozos de fondo plano en alícuotas de 100 μ l (2×10^5 células/pozo). Se utilizó PHA a una concentración de 5 μ g/ml. Los compuestos se ensayaron a concentraciones de 1, 10 y 100 μ g/ml. El DMSO a diluciones apropiadas sirvió como control. Después de una incubación de cuatro días en un incubador de cultivo celular, la respuesta proliferativa de las células se determinó por el método MTT colorimétrico (Hansen et al., J. Immunol. Methods, 1989, pp. 203-210). Los datos se presentan como un valor OD promedio de los pozos cuadruplicados \pm error estándar (EE). Los cultivos de control “(-)” no contenían mitógeno (PHA). Los cultivos de control “(PHA)” contenían PHA pero no tetrapéptidos cíclicos.

65 Prueba de toxicidad: PBMC, a una densidad de $2 \times 10^5/100$ μ l/pozo, se resuspendieron en medio de cultivo, se cultivaron durante 24 h en un incubador de cultivo celular con los tetrapéptidos cíclicos a concentraciones de 1, 10 y 100 μ g/ml. La supervivencia celular se determinó por el método colorimétrico MTT (Hansen et al., J. Immunol. Methods, 1989, pp. 203-

210). Los datos se presentan como un valor OD promedio de los pozos cuadruplicados \pm error estándar (EE). Los cultivos de control “(-)” sólo contenían células en el medio de cultivo.

5 La determinación de la actividad de TNF alfa (por Espevik et al., J. Immunol. Methods, 95 (1986): 99 a 103): Se diluyó sangre entera humana 10 veces con medio RPMI-1640 y se distribuyó a 24- placas de cultivo en alícuotas de 1 ml. El LPS se agregó al cultivo a una concentración de 1 μ g/ml. Los péptidos estudiados se utilizaron a concentraciones de 1, 10 y 100 μ g/ml. Después de incubación durante la noche, los sobrenadantes se recolectaron y se congelaron a -20°C hasta la determinación de citoquinas. Se determinó la actividad de TNF- α utilizando un bioensayo. Brevemente, las células WEHI 164.13 (ATCC CRL 1751) se sembraron a una concentración de 2×10^4 células/pozo en cuadruplicado. El aumento de diluciones del sobrenadante ensayado se mezcló con las células efectoras en presencia de actinomicina D (1 μ g/ml). Después de 20 h de incubación, se agregó MTT en los pozos, y los cultivos se incubaron durante 4 h adicionales. A continuación, se agregó un regulador de lisis (SDS al 20% con DMF al 50%, pH 4.7) y se midió la densidad óptica a 550 nm con la longitud de onda de referencia de 630 nm en un espectrofotómetro Dynatech 5000 después de 24 h. El límite de detección del ensayo fue de 2.5 pg/ml. Una unidad de actividad TNF- α se definió como una inversa de la dilución de sobrenadante donde tuvo lugar 50% de muerte celular. Los cultivos marcados “de control (-)” no contenían LPS. Los cultivos marcados “Control (LPS)” contenían LPS y ninguno de los compuestos estudiados. El análisis estadístico no se aplicó ya que los datos se derivan de los cultivos individuales (pozos).

20 Ensayo MTT colorimétrico para crecimiento y muerte celular: El ensayo se realizó por Hansen et al., J. Immunol. Methods, 1989, 119 pp. 203-210. Brevemente, se agregaron 25 μ l de MTT (5 mg/ml) de solución madre por pozo al final de la incubación de células y las placas se incubaron durante 3 h en una incubadora de cultivo celular. Después, se agregaron 100 μ l de regulador de extracción (SDS al 20% con DMF al 50%, pH 4.7). Después de incubación adicional durante la noche, se midió la densidad óptica a 550 nm (Dynatech 5000).

25 Cuando sea aplicable, los resultados se presentan como valores promedios \pm error estándar (EE). Se utilizó la prueba de Brown-Forsyth para determinar la homogeneidad de la varianza entre los grupos. Cuando la varianza fue homogénea, se aplicó análisis de varianza (ANOVA de una vía), seguido de comparaciones post hoc con prueba de Tukey para estimar la significación de las diferencias entre los grupos. La significación se determinó a $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando STATISTICA 6.1 para Windows.

30 Resultados

35 Efectos de los compuestos sobre la supervivencia de PBMC: Los efectos de los péptidos sobre la supervivencia e PBMC en cultivos de 24h se presentan en las figuras 8A y 8B. Se incluye el Péptido 4B8M (compuesto IA) como un compuesto de referencia. Se agregaron diluciones apropiadas de DMSO a los cultivos de control. Los resultados no mostraron signos de toxicidad de los compuestos en el rango de concentración estudiado. En las figuras, P01 = compuesto ID, P02 = compuesto IE, P03 = compuesto IF, P04 = compuesto IG, P05 = compuesto IH, P06 = compuesto IJ, P07 = compuesto IK, P08 = compuesto IL, P10a = compuesto IM, P10b = compuesto IN, y P11 = compuesto IO.

40 Las figuras 8A y 8B muestran los efectos de los péptidos ensayados sobre la supervivencia del PBMS. Figura 8A: Estadísticas (Todas las comparaciones vs. DMSO en diluciones apropiadas): 100 μ g/ml: 4B8M NS ($P = 0.9999$); P01 NS ($P=1.0000$); P02 NS ($P=1.0000$); P03 NS ($P=1.0000$); P04 NS ($P = 0.9047$); P05 NS ($P=1.0000$); P06 NS ($P=0.9999$); P07 NS ($P=1.0000$); 10 μ g/ml: 4B8M NS ($P = 1.0000$); P01 NS ($P=1.0000$); P02 NS ($P=1.0000$); P03 NS ($P=1.0000$); P04 NS ($P = 0.9999$); P05 NS ($P=1.0000$); P06 NS ($P=1.0000$); P07 NS ($P=1.0000$); 1 μ g/ml: 4B8M NS ($P = 1.0000$); P01 NS ($P=1.0000$); P02 NS ($P=1.0000$); P03 NS ($P=1.0000$); P04 NS ($P=1.0000$); P05 NS ($P = 1.0000$); P06 NS ($P=0.8253$); P07 NS ($P=1.0000$) (ANOVA). Figura 8B: Estadísticas (Todas las comparaciones vs. DMSO en diluciones apropiadas): 100 μ g/ml: 4B8M NS ($P=0.0669$); P08 NS ($P = 0.9957$); P10b NS ($P=1.0000$); 10 μ g/ml: 4B8M NS ($P=0.9999$); P08 NS ($P=1.0000$); P10b NS ($P = 1.0000$); 1 μ g/ml: 4B8M NS ($P=0.3176$); P08 NS ($P=0.9999$); P10b NS ($P = 1.0000$) (ANOVA).

50 Efectos de los péptidos sobre proliferación de PMBC inducida por PHA: En las figuras 9A y 9B se presentan los efectos de los péptidos sobre la respuesta proliferativa de PMBC. Se incluyó el péptido 4B8M fue incluido como un compuesto de referencia. Se agregaron diluciones adecuadas de DMSO a los cultivos de control.

55 Figura 9A: Efectos de los péptidos sobre la proliferación de PBMC inducida por PHA: Estadísticas (todas las comparaciones vs DMSO en diluciones apropiadas): 1 μ g/ml: 4B8M NS ($P = 0.9995$); P01 NS ($P = 1,0000$); P02 NS ($P = 1,0000$); P03 NS ($P = 1,0000$); P04 NS ($P = 0,9047$); P05 NS ($P = 0.5198$); P06 NS ($P = 1,0000$); P07 NS ($P = 0.1445$); 10 μ g/ml: 4B8M NS ($P = 1,0000$); P01 NS ($P = 0,9999$); P02 NS ($P = 1,0000$); P03 NS ($P = 0.9930$); P04 NS ($P = 0,4297$); P05 NS ($P = 1,0000$); P06 NS ($P = 1,0000$); P07 NS ($P = 0,8647$); 100 μ g/ml: 4B8M NS ($P = 1,0000$); P01 NS ($P = 1,0000$); P02 NS ($P = 0,9982$); P03 P = 0.0001; P04 NS ($P = 0.9970$); P05 NS ($P = 0.2037$); P06 NS ($P = 0.1257$); P07 NS ($P = 1,0000$) (ANOVA).

65 Figura 9B: Efectos de los péptidos sobre la proliferación de PBMC inducida por PHA: Estadísticas (todas las comparaciones vs DMSO en diluciones apropiadas): 1 μ g/ml: 4B8M NS ($P = 0.9919$); P08 NS ($P = 0,9999$); P10b NS ($P = 1,0000$); 10 μ g/ml: 4B8M NS ($P = 1,0000$); P08 NS ($P = 1,0000$); P10b NS ($P = 0.2763$); 100 μ g/ml: 4B8M NS ($P = 0,4941$); P08 NS ($P = 1,0000$); P10b NS ($P = 0,9933$) (ANOVA).

Efectos de los péptidos sobre la producción de TNF- α inducida por LPS en cultivos de células sanguíneas completas: Los efectos de los péptidos sobre la producción de TNF- α inducida por LPS en cultivos de células sanguíneas completas se presentan en las Tablas 2A y 2B. Se incluyó el péptido 4B8M como compuesto de referencia. Se agregaron diluciones apropiadas de DMSO a los cultivos de control.

5

TABLA 2A			
Efectos de péptidos sobre Producción de TNF- α inducida por LPS			
Compuesto	Concentración de compuestos (μ g/ml)	TNF- α (pg/ml)	% de inhibición vs. DMSO
Control (-)	-	92	-
Control (LPS)	-	6668	-
Solo DMSO	1	8167	-
	10	8006	-
	100	196	-
4B8M (compuesto I-A)	1	7364	9.8
	10	7176	10.4
	100	178	9.2
P01 (compuesto I-D)	1	7016	14.1
	10	5757	28.1
	100	141	28.1
P02 (compuesto I-E)	1	6614	19.0
	10	6346	20.7
	100	176	10.2
P03 (compuesto I-F)	1	6052	25.9
	10	5222	34.8
	100	76	61.2
P04 (compuesto I-G)	1	5463	33.1
	10	5302	33.8
	100	58	70.4
P05 (compuesto I-H)	1	7123	12.8
	10	7203	10.0
	100	110	43.9
P06 (compuesto I-J)	1	8033	1.6
	10	7658	4.4
	100	203	0.0
P07 (compuesto I-L)	1	6453	21.0
	10	7284	9.0
	100	163	16.8

TABLA 2B			
Efectos de péptidos sobre Producción de TNF- α inducida por LPS			
compuesto	Concentración de compuestos (μ g/ml)	TNF- α (pg/ml)	% de inhibición vs. DMSO
Control (-)	-	223	-
Control (LPS)	-	4260	-
Solo DMSO	1	4550	-
	10	4351	-
	100	854	-
4B8M (compuesto I-A)	1	4097	10.0
	10	4416	-
	100	979	-
P08 (compuesto I-M)	1	4039	11.2
	10	3363	22.7
	100	269	68.5
P10b (compuesto I-O)	1	3792	16.7
	10	3739	14.0
	100	282	67.0

10

Ejemplo 7: Efecto inhibitor del compuesto I-A sobre la inflamación de la oreja inducida por diisocianato de tolueno en ratones

la eficacia del compuesto IA en la supresión de la inflamación de la oreja en ratones BALB/c que se indujo con diisocianato de tolueno (TDI). Disponible comercialmente Protopic® (tacrolimus) y Elidel® (pimecrolimus) servido como fármaco de referencia.

15

Materiales y métodos

- Ratones: ratones hembra Balb/c, de 8-10 semanas de edad, fueron entregados por el Instituto de Medicina de Laboratorio, Łódź, Polonia. Los ratones se alimentaron con alimento granulado comercial y agua ad libitum. El comité de ética local aprobó el estudio.
- 5 Reactivos: Compuesto IA se sintetizó como se ha descrito anteriormente; Protopic® (tacrolimus) fue de Astellas, Irlanda; Elidel® (pimecrolimus) de Novartis; DMSO de Fluka; TDI, acetona, azul Evans, azul tripan, Giemsa, May-Grünwald, hematoxilina, eosina, azul de toluidina y formalina fueron de Sigma.
- 10 Respuesta inmunitaria al TDI. El ensayo se realizó de acuerdo con Yamamoto, Eur. J. Pharmacol., 2006, 550, 166-172, con modificaciones menores. Los ratones se afeitaron en el abdomen (zona de 2x2 cm) y después de 24 h se aplicó 100 ml TDI al 3% en acetona durante 3 días consecutivos. Después de 14 días la reacción se obtuvo mediante la aplicación de 50 µl de TDI al 0.3% en ambos lados de las orejas. El procedimiento se repitió 5 veces cada 3 días. El grosor de la oreja se midió utilizando un calibre de resorte (Mitutoyo) 5 h y 24 h después de cada inoculación con TDI.
- 15 Aplicación de los compuestos. El compuesto IA se aplicó por vía tópica en forma pomada al 0.1% en ambos lados de las orejas (volumen total de 100 µl-50 µl por oreja), una hora después de cada inoculación con TDI. Los fármacos de referencia se aplicaron de una manera similar.
- 20 Determinación del número de células de ganglios linfáticos. Se aislaron ganglios linfáticos superficiales mandibulares, mandibulares accesorios y de parótida, homogeneizados al presionar un tamiz de acero en PBS, lavado 2x con PBS y resuspendido en PBS que contiene azul Trypan al 0.2%. Se contó el número de células totales y no viables utilizando un microscopio de luz y hemocitómetro Bürker.
- 25 Determinación del número de leucocitos en circulación e imagen de sangre. Se someten ratones a anestesia con halotano y se extrae sangre del plexo retroorbital, seguido por dislocación cervical. Se determinó el número de leucocitos en sangre mediante dilución de sangre en solución de Türk y se cuentan las células en un hemocitómetro. Las muestras de sangre se prepararon en el vidrio de microscopio, se secan y se tiñeron con reactivos Giemsa y May-Grünwald. Las muestras se revisaron histológicamente y posteriormente. Los números de células se presentan por 1µl y las composiciones de células de sangre como un porcentaje de un tipo de célula dado.
- 30 Prueba Azul Evans. Los ratones recibieron 1 mg de azul de Evans en 0.2 ml de NaCl al 0.9%, por vía intravenosa. Después de 30 min se sacrificaron los ratones, se cortaron las orejas, se pesaron y se sumergieron en 50 µl de KOH 1M durante 18 h a 37 °C. El tinte se extrajo de las orejas utilizando 450 µl de ácido fosfato 0.2 M y acetona (proporción 5:13). Las muestras se centrifugan a 3000 rpm durante 15 min. Las densidades ópticas (OD) de los sobrenadantes se midieron a 630 nm. La cantidad de azul Evans (µg/ml) se determinó en función de la curva estándar. Los resultados se presentaron como la cantidad de azul Evans por 100 mg de tejido húmedo. Los ratones se trataron solo con la dosis de antígeno que sirve como control de fondo.
- 35 Análisis histológico. Se fijaron las aurículas en solución de formalina al 4% durante 48 h, se lavaron durante 24 h, se deshidrataron en serie de alcohol y se incorporaron en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en un microtomo Micron HM310 en secciones de 6 µm. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina y con azul de toluidina. Se realizó análisis histológico utilizando un microscopio de luz Nikon eclipse 801. Se realizaron estimaciones morfológicas de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y mastocitos en el tejido conjuntivo subepitelial y perivascular en los portaobjetos histológicos que contienen secciones transversales de aurículas. Se contaron las células en un área de 0.07 mm² en magnificación de 400x. se realizaron análisis morfológicos utilizando un software de imágenes NIS-Elements (Nikon). Para cada preparación examinada, se llevaron a cabo 25 enumeraciones de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y mastocitos.
- 40 Estadísticas. Los resultados en las figuras 10A y 10B se presentan como valores más o menos error estándar (EE). Se utilizó la prueba de Brown-Forsyth para determinar la homogeneidad de la varianza entre los grupos. Cuando la varianza fue homogénea, se aplicó análisis de varianza (ANOVA de una vía), seguido de comparaciones post hoc con prueba de Tukey para estimar la significancia de las diferencias entre grupos. Se evaluaron datos no paramétricos con análisis de varianza de Kruskal-Wallis, como se indicó en el texto. Se determinó la significancia en P <0.05. Se realizó análisis estadístico utilizando STATISTICA 7 para Windows.
- 55

Resultados

- 60 Efectos de los compuestos en el grosor de las orejas. Se provoca la respuesta humoral a TDI como se describió en los Métodos. Los ratones se trataron tópicamente con el tetrapéptido (fórmula IA, etiquetado 4B8M en las figuras 10A y 10B) y los compuestos de referencia una hora después de cada exposición al antígeno. Los efectos de los tratamientos se presentan en las figuras 10A y 10B, que muestran la medición del grosor de la oreja 5 h (figura 10A) y 24 h (figura 10B) después de la administración en el día de la prueba indicado en la figura. Las respuestas de control para TDI se elevaron gradualmente después de cada exposición a antígeno (se ve mejor en la medición 5 h). Los resultados mostraron la eficacia diferenciada de los compuestos en la reducción de la hinchazón de la oreja.
- 65

Figura 10A: Día 14: Control vs 4B8M P=0.0005; Control vs Protopic® P=0.0002; Control vs Elidel® P=0.0152; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® NS; día 17: Control vs 4B8M P=0.0001; Control vs Protopic® P=0.0001; Control vs Elidel® P=0.0377; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® P=0.0002; día 20: Control vs 4B8M P=0.0001; Control vs Protopic® P=0.0001; Control vs Elidel® NS; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® P=0.0001; día 23: Control vs 4B8M P=0.0001; Control vs Protopic® P=0.0001; Control vs Elidel® NS; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® P=0.0001; día 27: Control vs 4B8M P=0.0001; Control vs Protopic® P=0.0001; Control vs Elidel® P=0.0001; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® P=0.0001 (ANOVA). Fig. 10B: día 14: Control vs 4B8M P=0.0001; Control vs Protopic® P=0.0001; Control vs Elidel® P=0.0004; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® NS; día 17: Control vs 4B8M P=0.0001; Control vs Protopic® P=0.0023; Control vs Elidel® P=0.0004; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® NS; día 20: Control vs 4B8M P=0.0006; Control vs Protopic® P=0.0003; Control vs Elidel® P=0.0156; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® NS; día 23: Control vs 4B8M P=0.0001; Control vs Protopic® P=0.0001; Control vs Elidel® P=0.0039; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® P=0.0027; día 27: Control vs 4B8M P=0.0001; Control vs Protopic® P=0.0001; Control vs Elidel® P=0.0023; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® P=0.0016 (ANOVA).

15 Efectos de los compuestos sobre la permeabilidad de los vasos de la piel: La permeabilidad de los vasos sanguíneos capilares se presenta en la figura 11, que muestra la permeabilidad de los vasos sanguíneos capilares en la prueba de azul de Evans. El procedimiento, como se describe anteriormente, se realizó 24 h después de la quinta exposición con TDI (día 28). Como se muestra en la figura 11, las tasas de permeabilidad de los vasos sanguíneos fueron estrictamente relacionadas con los efectos de los compuestos sobre el grosor de la oreja en los respectivos grupos de ratones. Estadísticas: BG vs Control P = 0.0248; Control vs 4B8M (I-A) P = 0.030; Control vs Protopic® NS; Control vs Elidel® NS; 4B8M (I-A) vs Protopic® NS; 4B8M (I-A) vs Elidel® NS (ANOVA).

25 Efectos de los compuestos sobre el número de células en drenaje de ganglios linfáticos: la figura 12 muestra el número total de células en el drenaje de ganglios linfáticos. Como se muestra en la figura 12, el tratamiento de ratones con el compuesto IA resultó en una reducción de los números de células de ganglios linfáticos casi a los niveles de fondo (ratones no sensibilizados). Estadísticas: BG vs Control P = 0.0001; Control vs 4B8M (I-A) P = 0.0001; Control vs Protopic® NS; Control vs Elidel® NS; 4B8M (I-A) vs Protopic® P = 0.0183; 4B8M (I-A) vs Elidel® P = 0.0001 (ANOVA de Kruskal-Wallis).

30 Efectos de los compuestos sobre el número de leucocitos en circulación La figura 13 muestra los efectos de los compuestos sobre el número de leucocitos en circulación; la aplicación de las preparaciones estudiadas redujo el número de leucocitos en circulación a los niveles observados en ratones no sensibilizados, de control. Estadísticas: BG vs Control P = 0.0001; Control vs 4B8M (I-A) P = 0.0001; Control vs Protopic® P = 0.0001; Control vs Elidel® P = 0.0001; 4B8M (I-A) vs Protopic® NS; 4B8M (I-A) vs Elidel® NS (ANOVA).

35 Efectos de los compuestos sobre la composición de células sanguíneas: La composición de la sangre en los ratones de control con una reacción completamente desarrollado al TDI se caracterizó por un aumento del contenido de los neutrófilos y eosinófilos en comparación con ratones base, de control (figura 14, que muestra un desglose de los tipos de leucocitos en cada caso). La imagen de la sangre se normalizó después de la aplicación de 4B8M (IA) (una reducción de contenido de neutrófilos y eosinófilos), pero no después de la administración de Protopic® o Elidel®. Estadísticas: Bandas (B): BG vs Control NS; Control vs 4B8M (I-A) NS; Control vs Protopic® P = 0.0500; Control vs Elidel® P = 0.0500; 4B8M (I-A) vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® NS (ANOVA de Kruskal-Wallis); Segmentos (S): BG vs Control P = 0.0131; Control vs 4B8M (I-A) NS; Control vs Protopic® NS; Control vs Elidel® NS; 4B8M (I-A) vs Protopic® P = 0.0163; 4B8M (I-A) vs Elidel® NS (ANOVA de Kruskal-Wallis); Eosinófilos (E): BG vs Control P = 0.0001; Control vs 4B8M (I-A) P = 0.0001; Control vs Protopic® NS; Control vs Elidel® NS; 4B8M (I-A) vs Protopic® NS; 4B8M vs Elidel® P = 0.0146 (ANOVA de Kruskal-Wallis); Linfocitos (L): BG vs Control P = 0.0001; Control vs 4B8M (I-A) P = 0.0043; Control vs Protopic® NS; Control vs Elidel® NS; 4B8M (I-A) vs Protopic® P = 0.0345; 4B8M (I-A) vs Elidel® NS (ANOVA de Kruskal-Wallis).

50 Los efectos de los compuestos sobre la composición de las células en las aurículas: la figura 15 proporciona datos morfométricos sobre el número y la composición de las células en las aurículas. La composición de tipos de células dentro de las aurículas difiere entre los grupos de ratones estudiados y se presenta en la figura 15. Los tipos de células residentes, predominantes en ratones no sensibilizados de control son mastocitos y neutrófilos (10 y 5 células por zona analizada, respectivamente). En ratones sensibilizados de control, sin tratar con agentes terapéuticos, se incrementó dos veces el número de mastocitos y los neutrófilos casi 5 veces (20 y 23 células, respectivamente). Protopic® y el Compuesto IA fueron eficaces para reducir el número de células a 14 y 14.8. Estadísticas: Ne (neutrófilos): BG vs Control P = 0.0001; Control vs 4B8M (I-A) P = 0.0151; Control vs Protopic® P = 0.0001; Control vs Elidel® NS; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M (I-A) vs Elidel® P = 0.0003 (ANOVA de Kruskal-Wallis); MØ (macrófagos): BG vs Control P = 0.0144; Control vs 4B8M (I-A) NS; Control vs Protopic® NS; Control vs Elidel® P=0.0255; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M (I-A) vs Elidel® P = 0.0031 (ANOVA de Kruskal-Wallis); L (linfocitos): BG vs Control NS; Control vs 4B8M (I-A) NS; Control vs Protopic® NS; Control vs Elidel® P = 0.0023; 4B8M vs Protopic® NS; 4B8M (I-A) vs Elidel® P = 0.0001 (ANOVA de Kruskal-Wallis); Mast (mastocitos): BG vs Control P = 0.0001; Control vs 4B8M (I-A) NS; Control vs Protopic® P = 0.0001; Control vs Elidel® NS; 4B8M (I-A) vs Protopic® NS; 4B8M (I-A) vs Elidel® P = 0.0001 (ANOVA de Kruskal-Wallis).

65 Ejemplo 8: Pruebas in vitro de compuestos IB y IC

Métodos

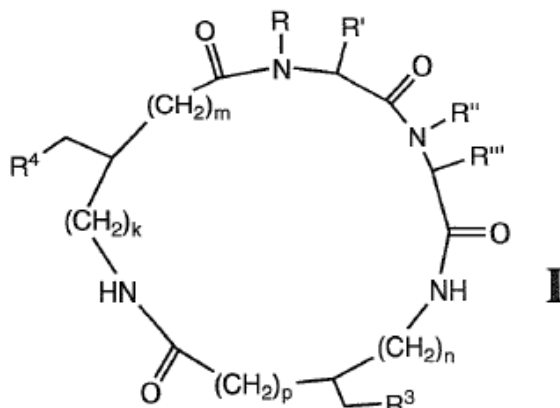
- 5 Respuesta proliferativa de esplenocitos a concanavalina A (ConA): Los bazos se presionan contra un tamiz plástico en una solución de NH_4Cl al 03% para lisar los eritrocitos (5 min de incubación a temperatura ambiente). Después, las células se lavaron dos veces con medio de Hanks, pasado a través de la columna de lana de vidrio para eliminar los residuos, y se resuspendieron en el medio de cultivo, denominado adelante como "medio de cultivo", que consiste en RPMI-1640 complementado con 10% de suero fetal de becerro, Lglutamina, piruvato de sodio, 2-mercaptoetanol, estreptomicina y penicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Luego las células se distribuyen en placas cultivo de tejido de fondo plano de 96 pozos (Nunc) a una densidad de 2×10^5 células/100 $\mu\text{l}/\text{pozo}$. Se agrega con A (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para inducir proliferación celular. Los compuestos se agregaron a los cultivos, en dosis de 1- 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después de una incubación de tres días, la proliferación celular se determinó utilizando el método colorimétrico MTT (Hansen MB, J Immunol Methods, 1989, 119, 203-210). Los resultados se presentan como la densidad media óptica (OD) a 550 nm \pm EE de las determinaciones por cuadruplicado (pozos).
- 10
- 15 En segundo lugar la respuesta inmunitaria humoral in vitro a eritrocitos de oveja (SRBC): Se sensibilizaron ratones por vía intraperitoneal con 0.2 ml de suspensión SRBC al 5% (v/v). Después de cuatro días se aislaron los bazos de estos ratones y se prepararon suspensiones de células individuales mediante homogeneización en solución de PBS. Después de lavar las células en PBS mediante centrifugación, las células se resuspendieron en el medio de cultivo a una densidad de 5×10^6 células/ml. Las células se distribuyen posteriormente a placas de cultivo de 24 pozos en alícuotas de 1 ml y se agregó 0.05 ml de SRBC al 0.005% como antígeno a cada pozo. Los compuestos se agregaron a los cultivos al comienzo del período de incubación de cuatro días en rangos de concentración de 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se determinó el número de células formadoras de anticuerpos (AFC) en los cultivos utilizando un método de hemólisis local en gel de agar de acuerdo con Mishell et al., J Exp Med, 1967, 126, 423-442.
- 20
- 25 Ensayo de toxicidad: esplenocitos, a una densidad de 2×10^5 células/100 $\mu\text{l}/\text{pozo}$, resuspendidos en el medio de cultivo, se cultivaron durante 24 h en un incubador de cultivo celular con los compuestos (1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La supervivencia celular se determinó por el método colorimétrico MTT. Los resultados se presentaron como la densidad óptica media (OD) a 550 nm a partir de 4 pozos. La viabilidad de las células en respectivas concentraciones de compuesto se comparó con grupos apropiados de control de DMSO (100% de supervivencia), que corresponde a las respectivas concentraciones de compuesto.
- 30

Resultados

- 35 En concentraciones de 50- 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el compuesto IC mostro un fuerte efecto inhibitor sobre la proliferación de esplenocitos de ratón inducidos por concanavalina A. En 100 $\mu\text{g}/\text{m}$, este compuesto mostró 70% de toxicidad para esplenocitos. En 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{m}$, el compuesto IC mostró 33% y 80% de supresión, respectivamente, en el modelo de la respuesta inmunitaria humoral in vitro a SRBC en cultivos de esplenocitos de ratón. En el modelo de hipersensibilidad de tipo retardado a la ovoalbúmina, el compuesto IC mostró 26.9% de inhibición en la dosis de 100 μg , en comparación con 72.7% de inhibición por el compuesto IA.
- 40
- En una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el compuesto IB demostró un débil efecto antiproliferativo en la proliferación de esplenocitos inducidos por concanavalina A; No se observó ningún efecto en concentraciones más bajas. El compuesto IB tenía 30% de toxicidad a esta concentración.
- 45 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle para fines de ilustración, será fácilmente evidente para un experto en la técnica que se pueden hacer modificaciones y cambios.

Reivindicaciones

1. Un compuesto que tiene la fórmula I:



5

en la que

k, m, n y p son cada uno independientemente 0, 1 o 2, siempre que por lo menos uno de k, m, n y p no sea 0;

R y R' son cada uno independientemente seleccionados de H y alquilo C₁₋₃, o, cuando se toman juntos, R y R' son -CR¹R^{1'}-XCH₂-, en la que CR¹R^{1'} se adhiere al nitrógeno de la estructura principal, R¹ y R^{1'} son cada uno independientemente seleccionados de H y alquilo C₁₋₃, y X se selecciona de -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH(OH)-, -O-, -S- y -NH-; R'' y R''' son cada uno independientemente seleccionados de H y alquilo C₁₋₃, o, cuando se toman juntos, R'' y R''' son -CR²R^{2'}-X'-CH₂-, en la que CR²R^{2'} se adhiere al nitrógeno de la estructura principal, R² y R^{2'} son cada uno independientemente seleccionados de H y alquilo C₁₋₃, y X' se selecciona de -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH(OH)-, -O-, -S- y -NH-; y

15 R³ y R⁴ son cada uno independientemente seleccionados de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

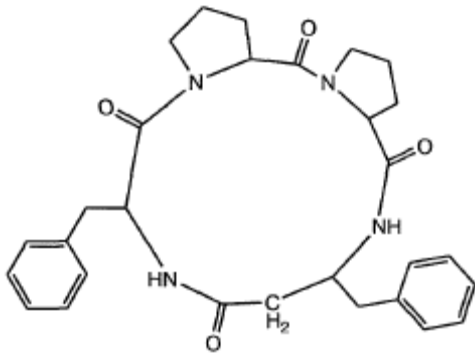
20 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que por lo menos uno de R³ y R⁴ se selecciona del grupo que consiste de fenilo, 4-hidroxifenilo, 4-t-butoxifenilo y 2-indolilo.

25 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que uno de R³ y R⁴ es fenilo y el otro de R³ y R⁴ se selecciona del grupo que consiste de fenilo, 4-hidroxifenilo, 4-t-butoxifenilo, y 2-indolilo.

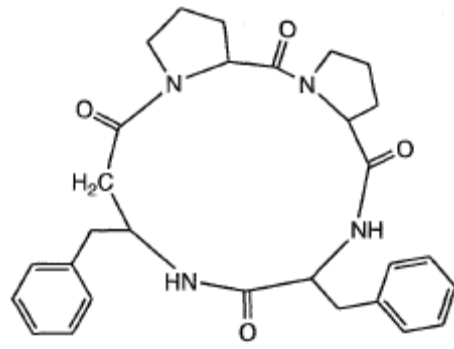
30 4. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que por lo menos uno de los siguientes es verdadero: (a) uno de k, m, n y p es 1, y el resto de k, m, n y p son 0; (b) dos de k, m, n y p son 1, y el resto de k, m, n y p son 0; (c) por lo menos uno de k y m no es 0; (d) por lo menos uno de n y p no es 0; (e) por lo menos uno de k y m no es 0 y por lo menos uno de n y p no es 0; (f) ambos de k y n son 0; (g) ambos de k y n son 0, uno de m y p es 0, y el otro de m y p es 1; (h) ambos de k y n son 0 y ambos m y p son 1.

35 5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que por lo menos uno de los siguientes es verdadero: (a) R y R' se toman juntos para formar -(CH₂)₃-; (b) R'' y R''' se toman juntos para formar -(CH₂)₃-; (c) R y R' se toman juntos para formar -(CH₂)₄-; (d) R'' y R''' se toman juntos para formar -(CH₂)₄-; (e) R y R' se toman juntos para formar -CH₂-CH(OH)-CH₂- (f) R'' y R''' se toman juntos para formar -CH₂-CH(OH)-CH₂-.

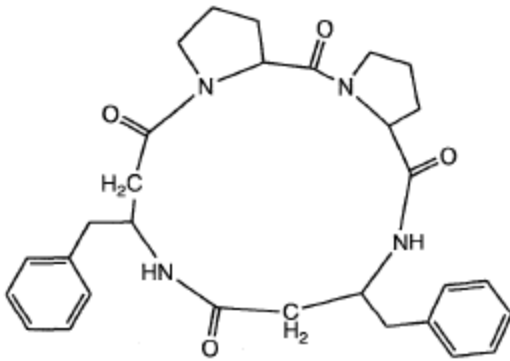
40 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste de:



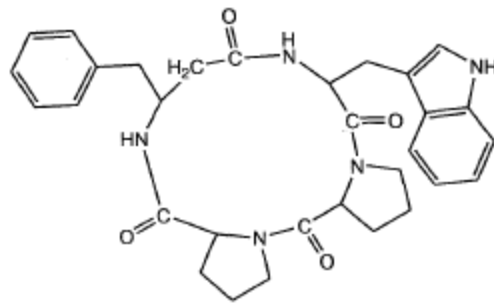
I-1,



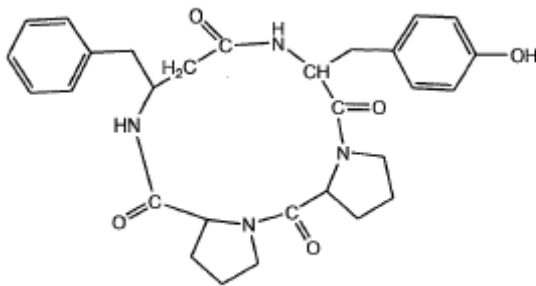
I-2,



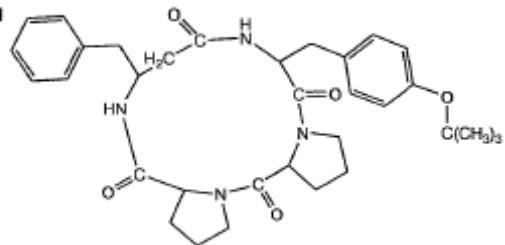
I-3,



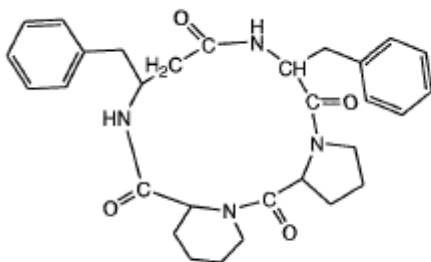
I-4,



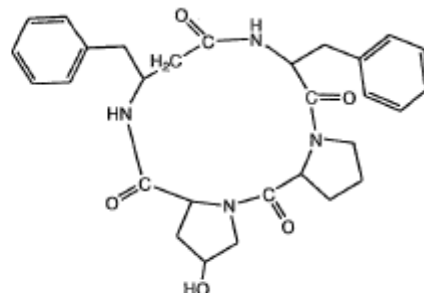
I-5,



I-6,



I-7 y

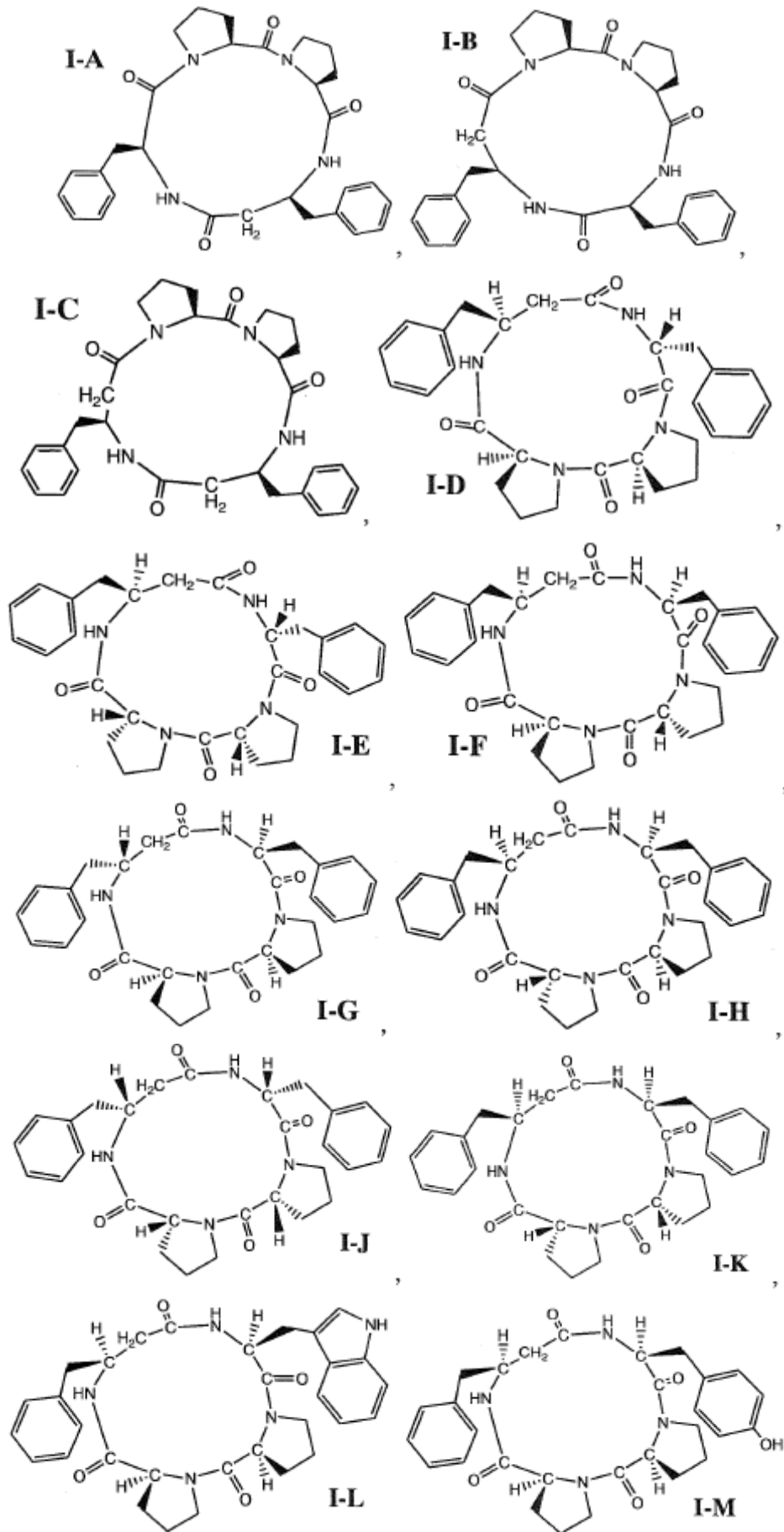


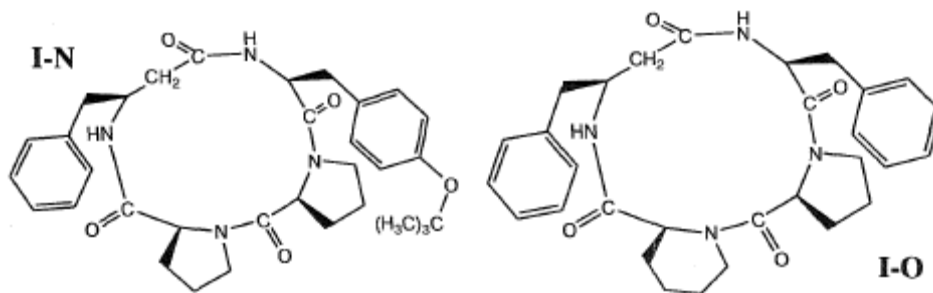
I-8,

5

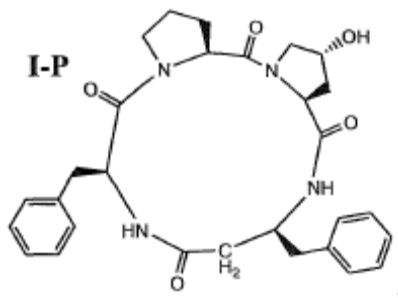
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se selecciona del grupo que consiste de:





y



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es un compuesto de la fórmula I-A o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 en la que el compuesto se selecciona del grupo que consiste de (a) el grupo que consiste de un compuesto de la fórmula 1-1, un compuesto de la fórmula 1-2, un compuesto de la fórmula 1-3, un compuesto de la fórmula 1-4, un compuesto de la fórmula 1-5, un compuesto de la fórmula 1-6, un compuesto de la fórmula 1-7, y un compuesto de la fórmula 1-8; y (b) el grupo que consiste de un compuesto de la fórmula I-A, un compuesto de la fórmula IB, un compuesto de la fórmula I-C, un compuesto de la fórmula I-D, un compuesto de la fórmula I-E, un compuesto de la fórmula I-F, un compuesto de la fórmula I-G, un compuesto de la fórmula I-H, un compuesto de la fórmula I-I, un compuesto de la fórmula I-J, un compuesto de la fórmula I-K, un compuesto de la fórmula I-L, un compuesto de la fórmula I-M, un compuesto de la fórmula I-N, un compuesto de la fórmula I-O, y un compuesto de la fórmula I-P, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto.

25

11. Un compuesto de la fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en (a) suprimir la respuesta inmunitaria en un paciente, o tratar o prevenir una enfermedad o afección inmunitaria en un paciente, o (b) reducir el perfil de toxicidad de un fármaco.

30

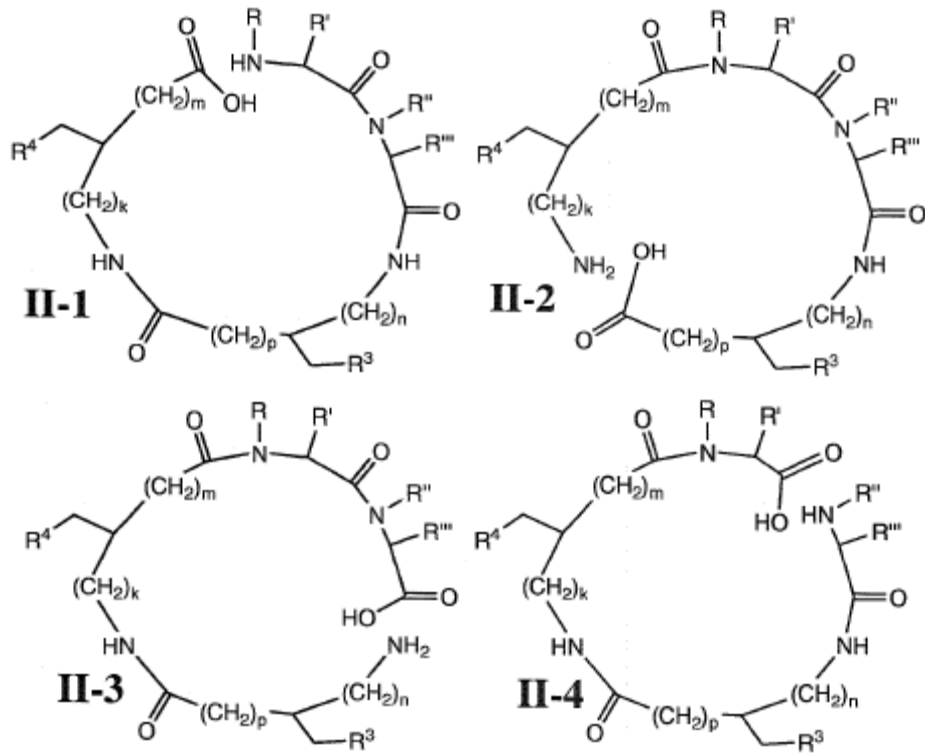
12. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que la enfermedad o afección inmunitaria se selecciona del grupo que consiste de (a) el grupo que consiste de enfermedades autoinmunitarias, procesos de inflamación, rechazo de trasplante, y reacciones alérgicas, (b) el grupo que consiste de Psoriasis, liquen plano y otros trastornos papuloescamosos, (c) el grupo que consiste de eczema y dermatitis (que incluye eczema, eczema atópico, dermatitis seborreica, y pomfóliz), (d) una reacción de la piel a la luz, (e) el grupo que consiste de irritación de piel no específica y picadura de insecto, (f) una urticaria, y (g) el grupo que consiste de, artritis reumatoide (autoinmunitaria y provocada por infección), enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo esclerosis múltiple), reacción del injerto versus anfitrión, psoriasis grave y dermatitis atópica.

40

13. Un kit, que comprende un compuesto de la fórmula I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 e instrucciones para utilizar el compuesto (a) suprimir una respuesta inmunitaria en un paciente, (b) tratar o evitar una enfermedad o afección inmunitaria en un paciente, o (c) reducir el perfil de toxicidad de un segundo fármaco.

45

14. Un método para elaborar un compuesto de la fórmula I como se define en la reivindicación 1, que comprende ciclizar un compuesto que tiene la fórmula II-1, II-2, II-3 o 11-4 (colectivamente mencionados adelante como compuestos de la fórmula II):



5 al compuesto correspondiente de la fórmula I, en la que R, R', R'', R''', R³, R⁴, k, m, n, y p son como se define en la reivindicación 1.

15. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de las fórmulas II-1, II-2, II-3 y II-4 como se define en la reivindicación 14.

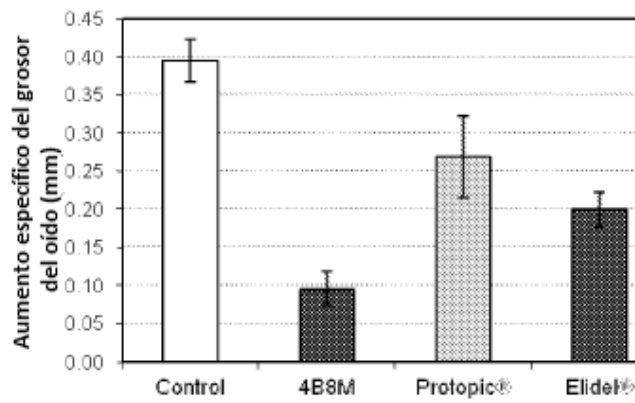


FIG. 1

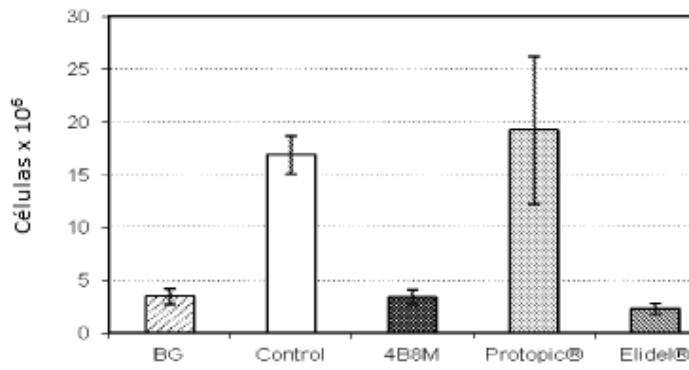


FIG. 2

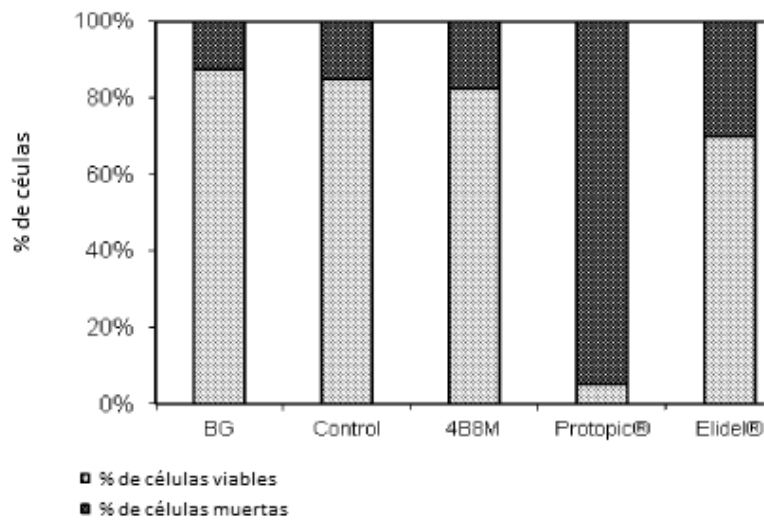


Fig. 3

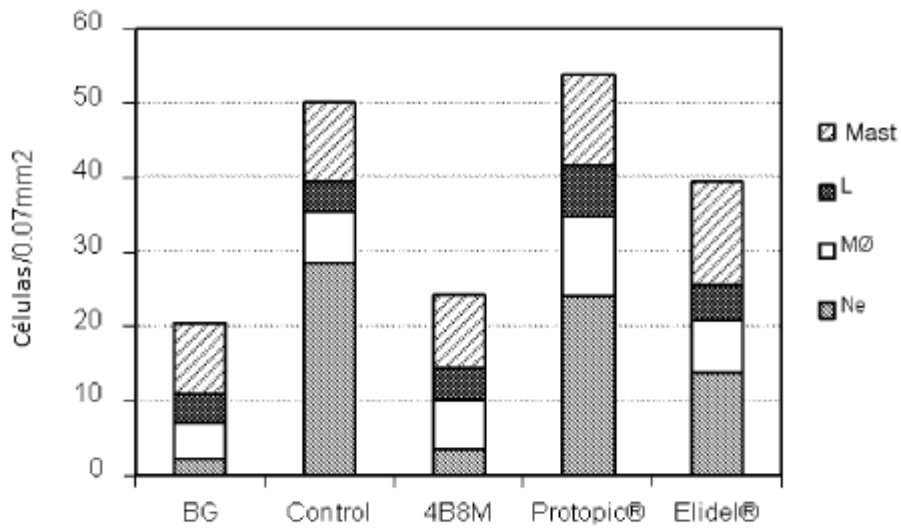


Fig. 4

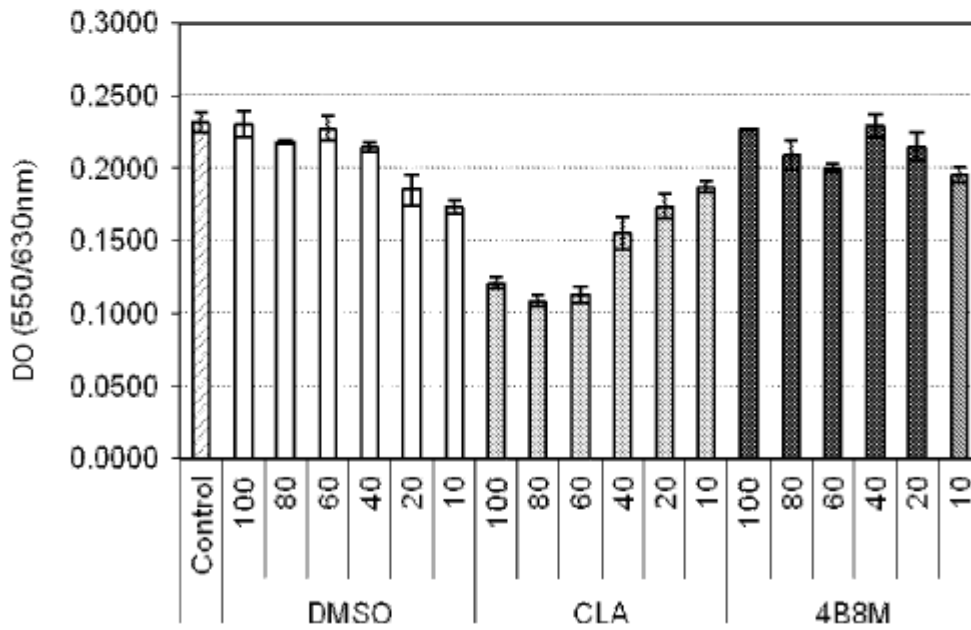


Fig 5.

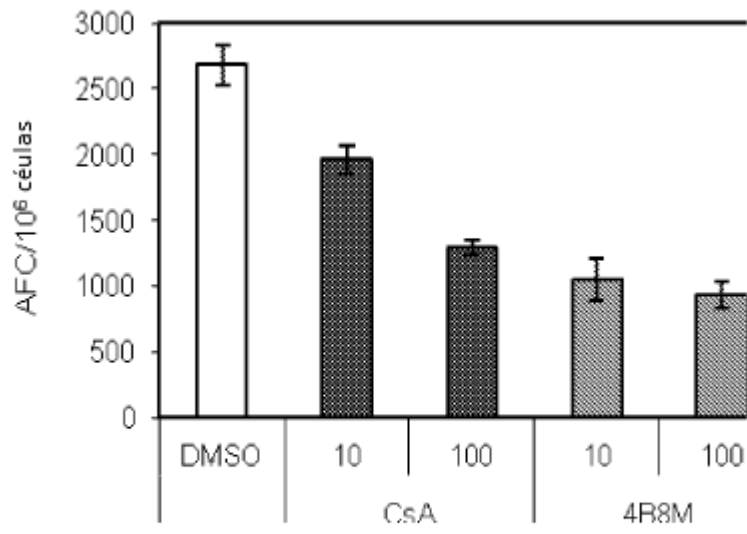


Fig. 6.

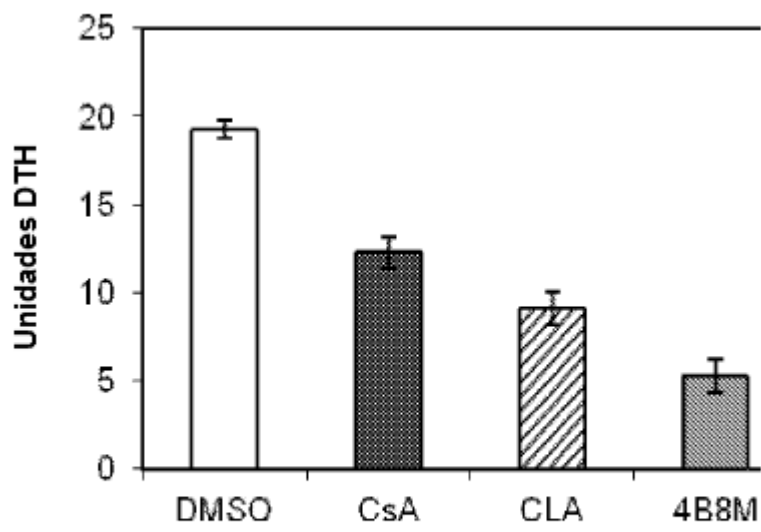


Fig. 7.

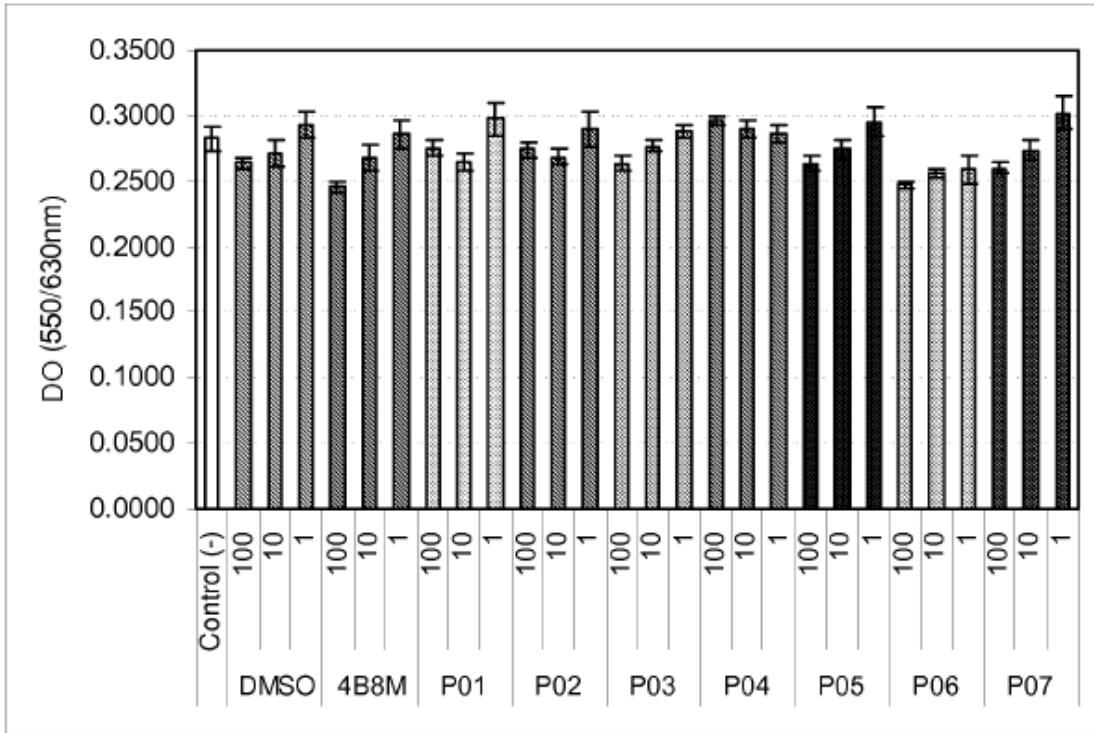


Fig. 8A

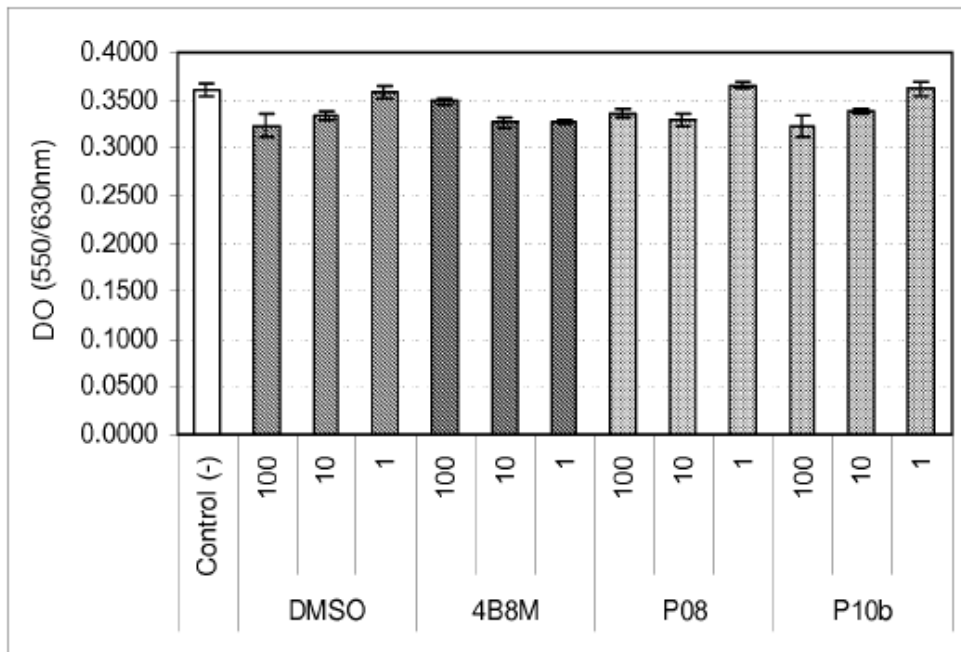


Fig. 8B

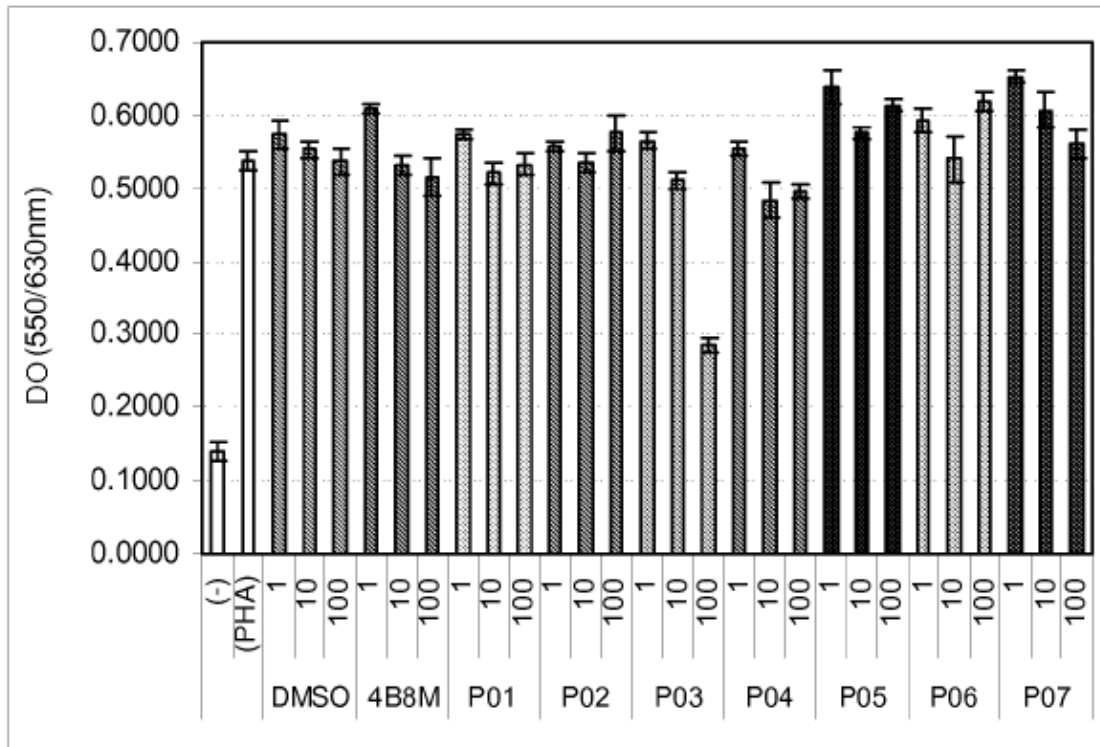


Fig. 9A

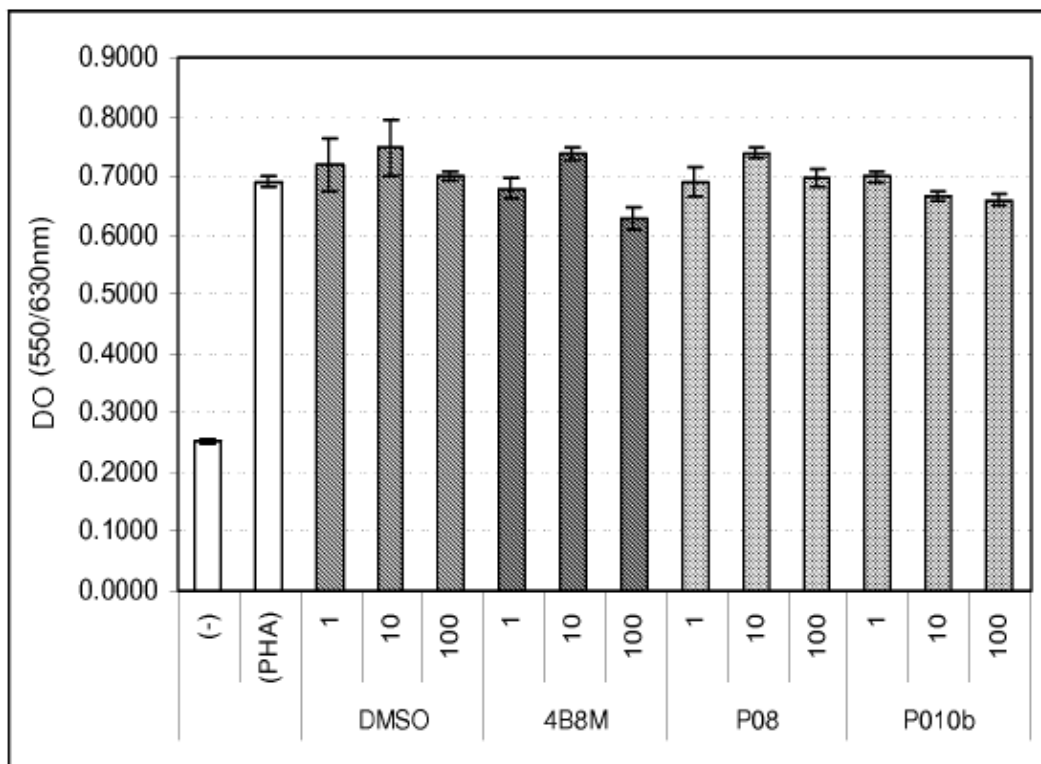


Fig. 9b

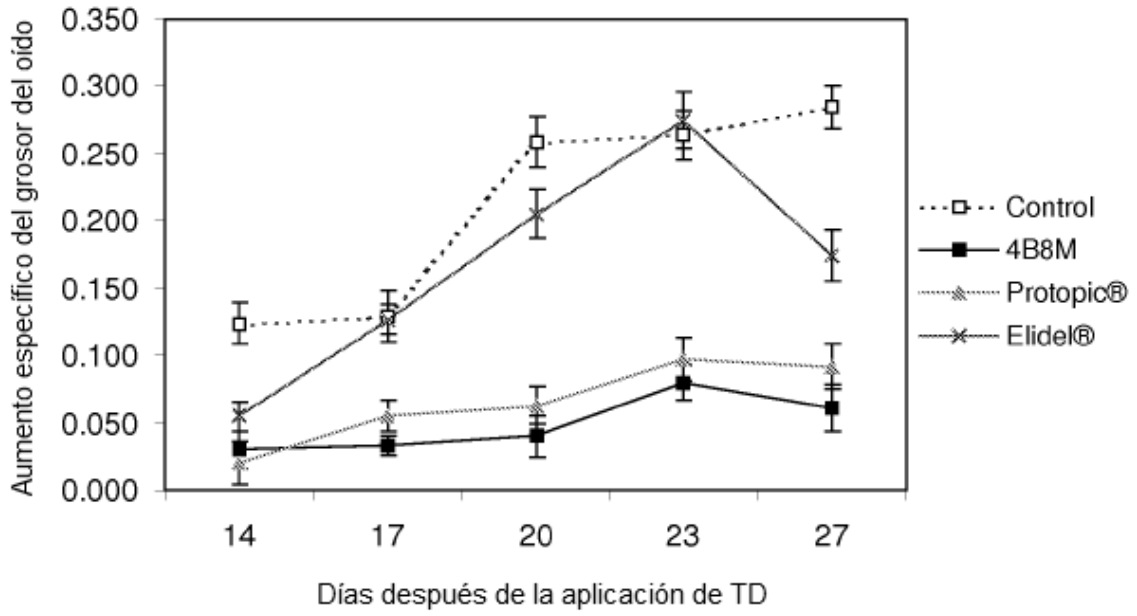


Fig. 10A

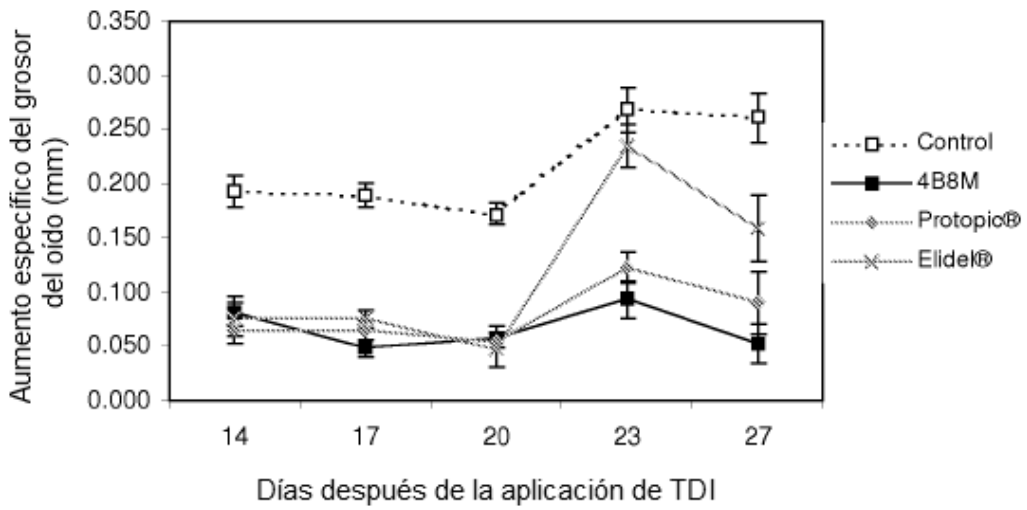


Fig. 10B

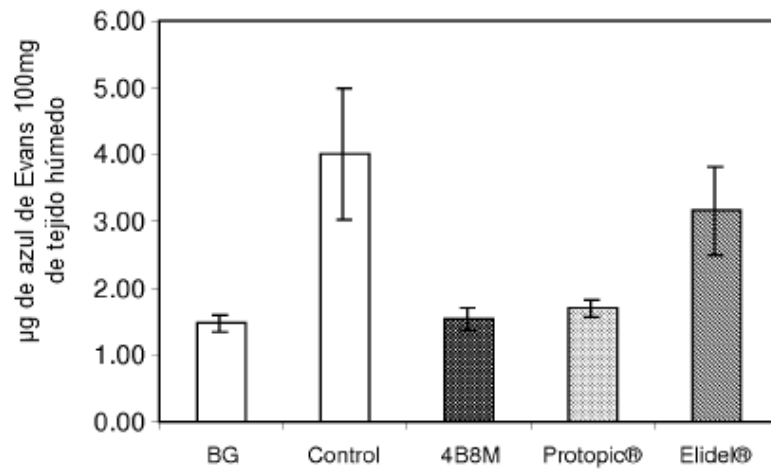


Fig. 11

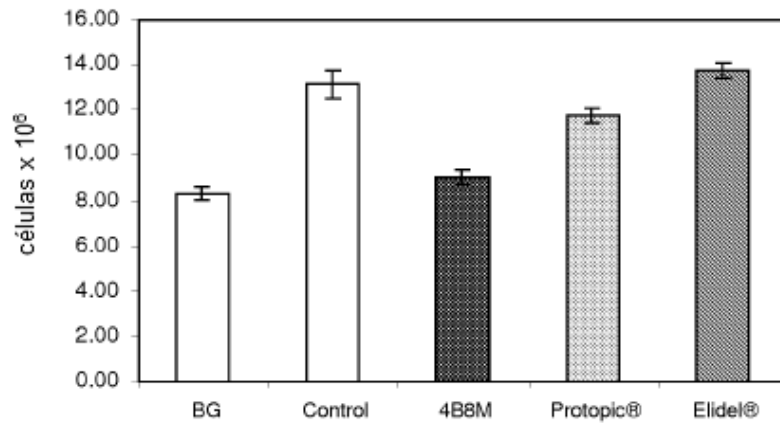


Fig. 12

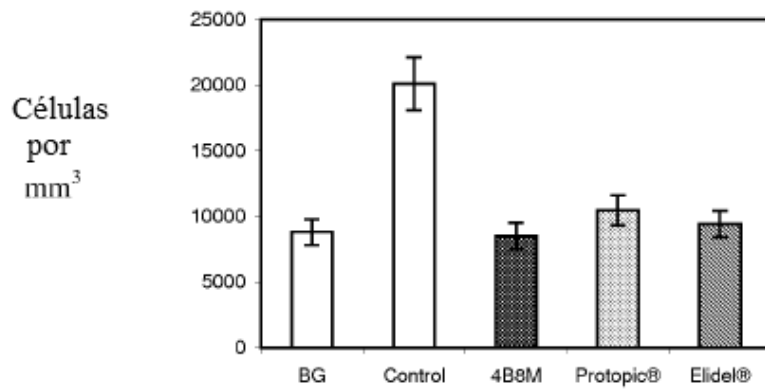


Fig. 13

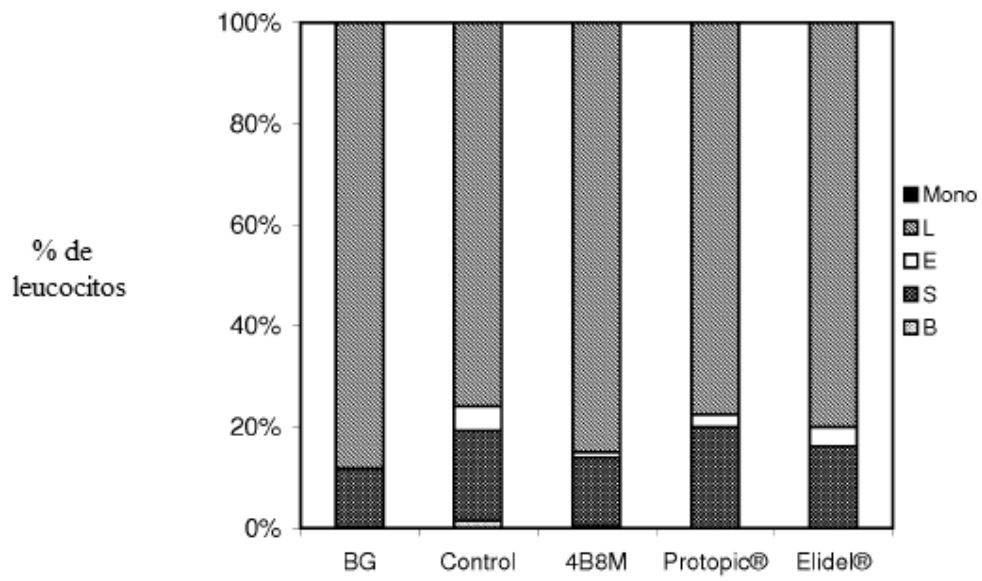


Fig. 14

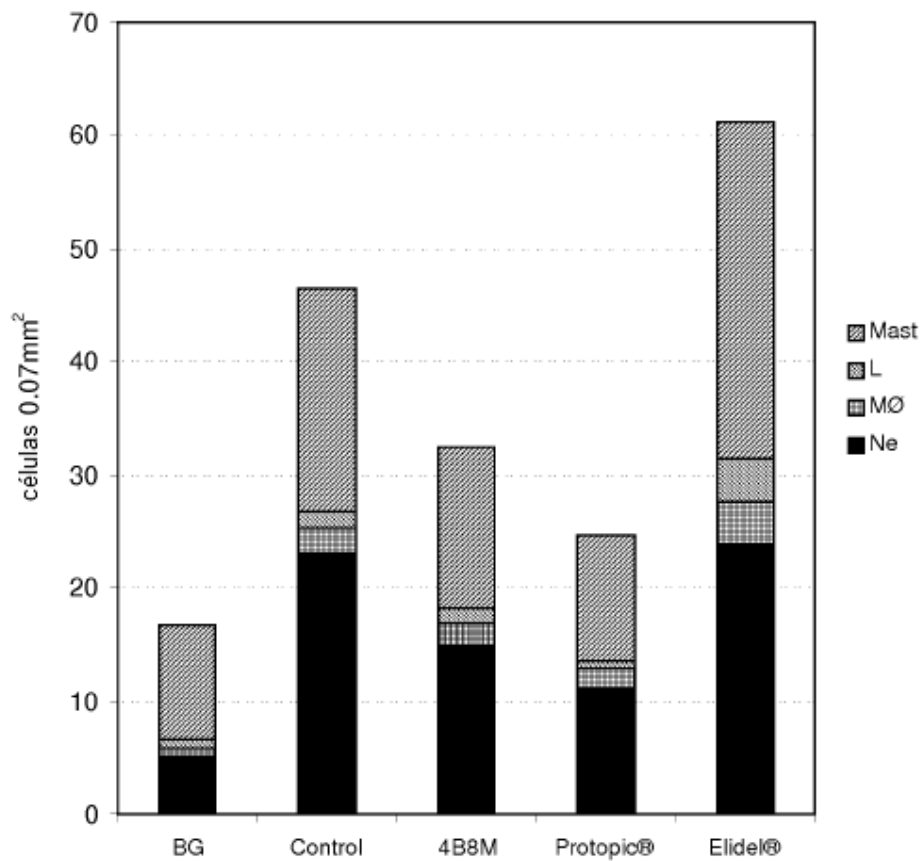


Fig. 15