

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 878**

51 Int. Cl.:

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2011 PCT/US2011/050612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12033789**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2011 E 11824038 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2613795**

54 Título: **Dicetopiperazinas para tratar la hiperpermeabilidad vascular**

30 Prioridad:

07.09.2010 US 380404 P

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

11.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BAR-OR, DAVID

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 611 878 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

Dicetopiperazinas para tratar la hiperpermeabilidad vascular

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método y a un kit para inhibir la hiperpermeabilidad vascular y el edema y otros efectos adversos que son resultado de ella. La invención también se refiere a un método y a un kit para modular el citoesqueleto de las células endoteliales. Ambos métodos comprenden administrar a un animal una dicetopiperazina (DKP) de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas.

Antecedentes

El endotelio vascular reviste el interior de todos los vasos sanguíneos. Actúa como la superficie de contacto entre la sangre y los tejidos y órganos. El endotelio forma una barrera semipermeable que mantiene la integridad del compartimento de fluido sanguíneo, pero permite el paso del agua, iones, moléculas pequeñas, macromoléculas y células de una manera regulada. La desregulación de este proceso produce la filtración vascular en los tejidos subyacentes. La filtración de líquido en los tejidos que provoca edema puede tener consecuencias graves y potencialmente mortales en una diversidad de enfermedades. En consecuencia, sería muy deseable disponer de un método para reducir el edema, preferentemente en su etapa más temprana, y restaurar la barrera endotelial al estado fisiológico.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un método de este tipo. En particular, la invención se refiere a un método de inhibición de la hiperpermeabilidad vascular y el edema y otros efectos adversos que son resultado de ella. El método comprende administrar a un animal que lo necesite una cantidad eficaz de un principio activo, en el que el principio activo comprende una dicetopiperazina, seleccionada entre DA-DKP, MR-DKP y YE-DKP o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas.

La inhibición de la hiperpermeabilidad vascular de acuerdo con la invención incluye la inhibición de la hiperpermeabilidad provocada por el transporte paracelular y la hiperpermeabilidad provocada por transcitosis. La evidencia reciente indica que la hiperpermeabilidad provocada por transcitosis es la primera etapa de un proceso que, en última instancia, conduce a daño de tejidos y de órganos en muchas enfermedades y afecciones. En consecuencia, la presente invención proporciona un medio de intervención temprana en estas enfermedades y afecciones que puede reducir, retrasar o incluso potencialmente prevenir el daño de tejidos y órganos observado en ellas.

La presente divulgación también se refiere a un método de modulación del citoesqueleto de las células endoteliales en un animal. El método comprende administrar una cantidad eficaz de un principio activo, en el que el principio activo comprende una dicetopiperazina seleccionada entre DA-DKP, MR-DKP y YE-DKP o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, al animal.

La invención se refiere adicionalmente a un kit. El kit comprende las dicetopiperazinas de acuerdo con la reivindicación adjunta 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas al animal.

"Hiperpermeabilidad vascular" se usa en el presente documento para significar la permeabilidad de un endotelio vascular que está aumentada en comparación con los niveles basales. "Hiperpermeabilidad vascular", como se usa en el presente documento, incluye la hiperpermeabilidad provocada por el transporte paracelular y la hiperpermeabilidad provocada por transcitosis.

"Hiperpermeabilidad provocada por el transporte paracelular" se usa en el presente documento para significar la hiperpermeabilidad vascular provocada por el transporte paracelular que está aumentada en comparación con los niveles basales. Otras características de "hiperpermeabilidad provocada por el transporte paracelular" se describen a continuación.

"Transporte paracelular" se usa en el presente documento para significar el movimiento de iones, moléculas y fluidos a través de las uniones interendoteliales (UIE) entre las células endoteliales de un endotelio.

"Hiperpermeabilidad provocada por transcitosis" se usa en el presente documento para significar la hiperpermeabilidad vascular provocada por transcitosis que está aumentada en comparación con los niveles basales.

"Transcitosis" se usa en el presente documento para significar el transporte activo de macromoléculas y componentes del plasma de la fase fluida acompañante a través de las células endoteliales del endotelio. Otras características de la "transcitosis" se describen a continuación.

"Nivel basal" se usa en el presente documento para referirse al nivel encontrado en un tejido u órgano normal.

"Inhibición", "inhibir" y términos similares se usan en el presente documento con el significado de reducir, retrasar o prevenir.

5 Un animal "necesita tratamiento" de acuerdo con la invención si el animal tiene actualmente una enfermedad o afección mediada por la hiperpermeabilidad vascular, presenta signos tempranos de una enfermedad o afección o tiene una predisposición a desarrollar una enfermedad o afección.

10 "Mediado" y términos similares se usan en el presente documento para significar que provoca, que implica o que está exacerbado por la hiperpermeabilidad vascular.

Descripción detallada de las realizaciones actualmente preferidas de la invención

15 El endotelio es un filtro de entrada clave que controla el intercambio de moléculas desde la sangre al parénquima tisular. Controla en gran medida la permeabilidad de un lecho vascular particular a las moléculas incluidas en la sangre. La permeabilidad y la selectividad de la barrera de células endoteliales son fuertemente dependientes de la estructura y el tipo de endotelio que reviste la microvasculatura en diferentes lechos vasculares. Las células endoteliales que revisten los lechos microvasculares de diferentes órganos presentan diferenciaciones estructurales que pueden agruparse en tres categorías morfológicas principales: sinusoidales, fenestradas y continuas.

20 El endotelio sinusoidal (también denominado "endotelio discontinuo") tiene grandes huecos intercelulares e intracelulares y ninguna membrana basal, lo que permite el transporte mínimamente restringido de moléculas desde la luz del capilar al tejido y viceversa. El endotelio sinusoidal se encuentra en el hígado, el bazo y la médula ósea.

25 Los endotelios fenestrados se caracterizan por la presencia de un gran número de aberturas transcelulares circulares llamadas ventanas con un diámetro de 60 a 80 nm. Los endotelios fenestrados se encuentran en tejidos y órganos que requieren un intercambio rápido de moléculas pequeñas, incluyendo el riñón (glomérulos, capilares peritubulares y vasos rectos ascendentes), el páncreas, las glándulas suprarrenales, las glándulas endocrinas y el intestino. Las ventanas están cubiertas por diafragmas delgados, excepto aquellas en los glomérulos maduros y sanos. Véase Ichimura et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 19:1463-1471 (2008).

30 Los endotelios continuos no contienen ventanas o huecos grandes. En su lugar, los endotelios continuos se caracterizan por una monocapa de células endoteliales ininterrumpida. La mayoría de los endotelios del cuerpo son endotelios continuos y el endotelio continuo se encuentra en o alrededor del cerebro (barrera hematoencefálica), el diafragma, la musculatura duodenal, la grasa, el corazón, algunas zonas de los riñones (microvasculatura papilar, vasos rectos descendentes), los grandes vasos sanguíneos, los pulmones, el mesenterio, los nervios, la retina (barrera hematorretiniana), el músculo esquelético, los testículos y otros tejidos y órganos del cuerpo.

35 Puede pensarse, en un sentido general, que el transporte endotelial en el endotelio continuo como se produce mediante las vías paracelular y transcelular. La vía paracelular es la vía entre las células endoteliales, a través de las uniones interendoteliales (UIE). En el endotelio continuo inalterado, el agua, los iones y las moléculas pequeñas son transportados por la vía paracelular por difusión y convección. Una cantidad significativa de agua (hasta el 40 %) también cruza la barrera de células endoteliales por la vía transcelular a través de los canales de membrana que transportan agua llamados acuaporinas. Una diversidad de estímulos puede alterar la organización de las UIE, abriendo de este modo huecos en la barrera endotelial. La formación de estos huecos intercelulares permite el paso de fluidos, iones, macromoléculas (por ejemplo, proteínas) y otros componentes del plasma entre las células endoteliales sin restricciones. Este hiperpermeabilidad provocada por el transporte paracelular produce edema y otros efectos adversos que, con el tiempo, pueden dar como resultado daños a los tejidos y órganos.

40 La vía transcelular es responsable del transporte activo de macromoléculas, tales como la albúmina y otras proteínas plasmáticas, a través de las células endoteliales, un proceso denominado "transcitosis." El transporte de macromoléculas se produce en vesículas llamadas caveolas. Casi todos los endotelios continuos tienen abundantes caveolas, excepto los endotelios continuos situados en el cerebro y los testículos que tienen pocas caveolas. La transcitosis es un proceso de múltiples etapas que implica la sucesiva gemación y fisión de las caveolas desde el plasmalema y la translocación a través de la célula, seguida del acoplamiento y la fusión con el plasmalema opuesto, donde las caveolas liberan su contenido por exocitosis en el intersticio. La transcitosis es selectiva y está estrechamente regulada en condiciones fisiológicas normales.

45 Existe una conciencia creciente de la importancia fundamental de la vía transcelular. La transcitosis de proteínas plasmáticas, especialmente la albúmina, que representa el 65 % de las proteínas plasmáticas, es de particular interés debido a su capacidad para regular el gradiente de presión oncótica transvascular. Como puede apreciarse, entonces, el aumento de la transcitosis de albúmina y otras proteínas plasmáticas por encima de los niveles basales aumentará la concentración proteica tisular de las mismas, lo cual, a su vez, provocará que el agua se mueva a través de la barrera endotelial, produciendo de ese modo un edema.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) también se transportan a través de las células endoteliales por transcitosis. En la hiperlipidemia, se ha detectado un aumento significativo en la transcitosis de LDL como el evento inicial en la aterogénesis. La LDL se acumula en el espacio subendotelial, atrapada dentro de la lámina basal y la matriz extracelular expandidas. A la acumulación subendotelial de lipoproteínas en la hiperlipidemia le sigue una cascada de acontecimientos que dan como resultado la formación de placas de ateroma. Se observa que las lesiones ateroscleróticas avanzadas ocasionalmente van acompañadas de la apertura de las UIE y el paso incontrolado masivo de LDL y albúmina.

Las complicaciones vasculares son un rasgo característico de la diabetes. A nivel de los grandes vasos, la enfermedad parece expresarse como una aceleración de un proceso aterosclerótico. Con respecto a la microangiopatía, las alteraciones en la microvasculatura de la retina, el glomérulo renal y los nervios provocan el mayor número de complicaciones clínicas, pero un número en continuo aumento de investigaciones muestra que la diabetes también afecta la microvasculatura de otros órganos, tales como el mesenterio, la piel, el músculo esquelético, el corazón, el cerebro y el pulmón, provocando complicaciones clínicas adicionales. En todos estos lechos vasculares, los cambios en la permeabilidad vascular parecen representar un rasgo característico de la disfunción endotelial diabética.

En el endotelio continuo, la hiperpermeabilidad capilar a las macromoléculas plasmáticas en la fase temprana de la diabetes se explica por una intensificación del transporte vesicular transendotelial (es decir, por el aumento de la transcitosis) y no por la desestabilización de las UIE. Además, se ha notificado que las células endoteliales de los diabéticos, incluyendo las del cerebro, contienen un mayor número de caveolas en comparación con las personas normales y las proteínas glucosiladas, en particular la albúmina glucosilada, son recogidas por las células endoteliales y transportadas por transcitosis a tasas sustancialmente mayores que sus formas nativas. Adicionalmente, el aumento de la transcitosis de macromoléculas es un proceso que continúa más allá de la fase temprana de la diabetes y parece ser una causa de edema en tejidos y órganos de diabéticos a lo largo de toda la enfermedad si se deja sin tratar. Este edema, a su vez, conduce a daño tisular y de órganos. Se han notificado aumentos similares en el transporte transcelular de macromoléculas en la hipertensión.

La hiperpermeabilidad provocada por transporte paracelular es también un factor en la diabetes y las complicaciones vasculares de la diabetes. Las UIE de la vía paracelular incluyen las uniones adherentes (UA) y las uniones estrechas (UE). La diabetes altera el contenido, la fosforilación y la ubicación de ciertas proteínas, tanto en las UA como en las UE, contribuyendo de este modo a una mayor permeabilidad de la barrera endotelial.

En apoyo del análisis anterior y para obtener información adicional, véanse Frank et al., *Cell Tissue Res.*, 335:41-47 (2009), Simionescu et al., *Cell Tissue Res.*, 335:27-40 (2009); van den Berg et al., *J. Cost. Fibros.*, 7(6): 515-519 (2008); Viazzi et al., *Hypertens. Res.*, 31:873-879 (2008); Antonetti et al., Capítulo 14, páginas 340-342, en *Diabetic Retinopathy* (editado por Elia J. Duh, Humana Press, 2008), Felinski et al., *Current Eye Research*, 30:949-957 (2005), Pascariu et al., *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(1):65-76 (2004); Bouchard et al., *Diabetologia*, 45:1017-1025 (2002); Arshi et al., *Laboratory Investigation*, 80(8):1171-1184 (2000); Vinores et al., *Document Ophthalmologica*, 97:217-228 (1999); Oomen et al., *European Journal of Clinical Investigation*, 29:1035-1040 (1999); Vinores et al., *Pathol. Res. Pract.*, 194:497-505 (1998); Antonetti et al., *Diabetes*, 47:1953-1959 (1998), Popov et al., *Acta Diabetol.*, 34:285-293 (1997); Yamaji et al., *Circulation Research*, 72:947-957 (1993); Vinores et al., *Histochemical Journal*, 25:648-663 (1993); Beals et al., *Microvascular Research*, 45:11-19 (1993); Caldwell et al., *Investigative Ophthalmol. Visual Sci.*, 33(5):1610-1619 (1992).

El transporte endotelial en el endotelio fenestrado también se produce por transcitosis y por la vía paracelular. Además, el transporte endotelial se produce por medio de las ventanas. Los endotelios fenestrados muestran una permeabilidad notablemente alta al agua y solutos hidrófilos pequeños debido a la presencia de las ventanas.

Las ventanas pueden o no estar cubiertas por un diafragma. Las ubicaciones del endotelio con ventanas con diafragma incluyen el tejido endocrino (por ejemplo, los islotes pancreáticos y la corteza suprarrenal), la mucosa gastrointestinal y los capilares peritubulares renales. La permeabilidad a las proteínas plasmáticas del endotelio fenestrado con ventanas con diafragma no supera la de endotelio continuo.

Las ubicaciones del endotelio con ventanas sin diafragma incluyen los glomérulos de los riñones. El endotelio fenestrado glomerular está cubierto por un glucocáliz que se extiende en las ventanas (formando los llamados "tapones tamiz") y por una capa de glicoproteínas de la superficie de las células endoteliales asociada de forma más suelta. Los análisis matemáticos de los estudios funcionales selectividad de la permeabilidad han concluido que el glucocáliz de las células endoteliales glomerulares, incluyendo el presente en las ventanas, y su capa superficial asociada explican la retención de hasta el 95 % de las proteínas plasmáticas dentro de la circulación.

Se ha descubierto que la pérdida de ventanas en el endotelio glomerular se asocia a la proteinuria en varias enfermedades, incluyendo la nefropatía diabética, la glomerulopatía por trasplante, la preeclampsia, la diabetes, la insuficiencia renal, la nefropatía por ciclosporina, la nefritis de la enfermedad del suero y la nefritis por Thy-1. Se ha descubierto que el reordenamiento de actina y, en particular, la despolimerización de las fibras de tensión son importantes para la formación y el mantenimiento de las ventanas.

En apoyo del análisis anterior de los endotelios fenestrados y para obtener información adicional, véanse Satchell et al., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 296:F947-F956 (2009); Haraldsson et al., *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 18:331-335 (2009); Ichimura et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 19:1463-1471 (2008); Ballermann, *Nephron Physiol.*, 106:19-25 (2007); Toyoda et al., *Diabetes*, 56:2155-2160 (2007); Stan, "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability", páginas 679-688, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); Simionescu y Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies", páginas 42-69, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada y Higgs, Springer-Verlag, Berlín, 2006).

El transporte endotelial en el endotelio sinusoidal se produce mediante transcitosis y a través de los huecos intercelulares (hendiduras interendoteliales) y los huecos intracelulares (ventanas). El tratamiento del endotelio sinusoidal con fármacos que alteran los filamentos de actina puede inducir a un aumento sustancial y rápido en el número de huecos, lo que indica la regulación de la porosidad del revestimiento endotelial por el citoesqueleto de actina. Se ha notificado que otros fármacos que alteran el citoesqueleto cambian los diámetros de las ventanas. Por tanto, el citoesqueleto asociado a las ventanas probablemente controla la importante función de la filtración endotelial en el endotelio sinusoidal. En el hígado, la defenestración (pérdida de ventanas), que provoca una reducción en la permeabilidad del endotelio, se ha asociado a la patogenia de varias enfermedades y afecciones, incluyendo el envejecimiento, la aterogénesis, la aterosclerosis, la cirrosis, la fibrosis, la insuficiencia hepática y el cáncer de hígado primario y metastásico. En apoyo de lo anterior y para obtener información adicional, véase Yokomori, *Med. Mol. Morphol.*, 41:1-4 (2008); Stan, "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability", páginas 679-688, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); DeLeve, "The Hepatic Sinusoidal Endothelial Cell", páginas 1226-1238, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); Pries y Kuebler, "Normal Endothelium", páginas 1-40, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada y Higgs, Springer-Verlag, Berlín, 2006); Simionescu y Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies", páginas 42-69, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada y Higgs, Springer-Verlag, Berlín, 2006); Braet y Wisse, *Comparative Hepatology*, 1:1-17 (2002); Kanai et al., *Anat. Rec.*, 244:175-181 (1996); Kempka et al., *Exp. Cell Res.*, 176:38-48 (1988); Kishimoto et al., *Am. J. Anat.*, 178:241-249 (1987).

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La invención se refiere a un método de inhibición de la hiperpermeabilidad vascular presente en cualquier tejido u órgano que contenga o esté rodeado de endotelio continuo. Como se ha señalado anteriormente, el endotelio continuo está presente en o alrededor del cerebro (barrera hematoencefálica), el diafragma, la musculatura duodenal, la grasa, el corazón, algunas zonas de los riñones (microvasculatura papilar, vasos rectos descendentes), los vasos sanguíneos, los pulmones, el mesenterio, los nervios, la retina (barrera hematorretiniana), el músculo esquelético, la piel, los testículos, la vena umbilical y otros tejidos y órganos del cuerpo. Preferentemente, el endotelio continuo es el que se encuentra en o alrededor del cerebro, el corazón, los pulmones, los nervios o la retina.

La invención también se refiere a un método de inhibición de la hiperpermeabilidad vascular presente en cualquier tejido u órgano que contenga o esté rodeado de endotelio fenestrado. Como se ha señalado anteriormente, el endotelio fenestrado está presente en o alrededor del riñón (glomérulos, capilares peritubulares y vasos rectos ascendentes), el páncreas, las glándulas suprarrenales, las glándulas endocrinas y el intestino. Preferentemente, el endotelio fenestrado es el que se encuentra en los riñones, en especial la que se encuentra en los glomérulos de los riñones.

Adicionalmente, cualquier enfermedad o afección mediada por la hiperpermeabilidad vascular puede tratarse mediante el método que se desvela en el presente documento que inhibe la hiperpermeabilidad vascular. Dichas enfermedades y afecciones incluyen la diabetes, la hipertensión y la aterosclerosis.

En particular, las complicaciones vasculares de la diabetes, incluyendo las del cerebro, el corazón, los riñones, el pulmón, el mesenterio, los nervios, la retina, el músculo esquelético, la piel y otros tejidos y órganos que contienen endotelio continuo o fenestrado, pueden tratarse mediante la presente invención. Estas complicaciones vasculares incluyen el edema, la acumulación de LDL en el espacio subendotelial, la aterosclerosis acelerada y las siguientes: cerebro (envejecimiento acelerado de las paredes de los vasos), corazón (edema miocárdico, fibrosis miocárdica, disfunción diastólica, miocardiopatía diabética), riñones (nefropatía diabética), pulmón (retraso del desarrollo de los pulmones en los fetos de madres diabéticas, alteraciones de varios parámetros fisiológicos pulmonares y aumento de la susceptibilidad a infecciones), mesenterio (hiperplasia vascular), nervios (neuropatía diabética), retina (edema macular y retinopatía diabética) y piel (enrojecimiento, decoloración, sequedad y ulceraciones). La hiperpermeabilidad vascular tanto en la diabetes de tipo 1 (autoinmune) como en la de tipo 2 (no insulino dependiente) puede inhibirse mediante el método de la invención. El tipo 2 es el tipo más común de diabetes, que afecta al 90-95 % de los diabéticos y su tratamiento, en especial el tratamiento de aquellos con signos tempranos de, o una predisposición a desarrollar, diabetes de tipo 2 (véase a continuación) debería ser particularmente beneficioso.

La retinopatía diabética es una de las principales causas de ceguera que afecta aproximadamente al 25 % de los aproximadamente 21 millones de estadounidenses con diabetes. Aunque su incidencia y su progresión pueden reducirse mediante un control intensivo de la glucemia y de la presión arterial, casi todos los pacientes con diabetes

mellitus de tipo 1 y más del 60 % de aquellos con diabetes mellitus de tipo 2, con el tiempo desarrollan retinopatía diabética. Existen dos etapas de la retinopatía diabética. La primera retinopatía, no proliferativa, es la etapa más temprana de la enfermedad y se caracteriza por un aumento de la permeabilidad vascular, microaneurismas, edema y, con el tiempo, el cierre de los vasos. La neovascularización no es un componente de la fase no proliferativa. La mayor parte de la pérdida visual durante esta etapa se debe a la acumulación de fluido en la mácula, la zona central de la retina. Esta acumulación de fluido se llama edema macular y puede provocar una disminución de la visión temporal o permanente. La segunda etapa de la retinopatía diabética se llama retinopatía proliferativa y se caracteriza por la formación anormal de nuevos vasos. Desafortunadamente, esta neovascularización anormal puede ser muy perjudicial porque puede provocar sangrado en el ojo, tejido cicatricial retiniano, desprendimientos de retina o glaucoma diabéticos, cualquiera de los cuales puede provocar una disminución de la visión o ceguera. El edema macular también puede producirse en la fase proliferativa.

La neuropatía diabética es una complicación grave frecuente de la diabetes. Existen cuatro tipos principales de neuropatía diabética: la neuropatía periférica, la neuropatía autónoma, la neuropatía del plexo radicular y la mononeuropatía. Los signos y síntomas de la neuropatía periférica, el tipo más común de neuropatía diabética, incluyen el entumecimiento o la disminución de la capacidad de sentir dolor o cambios en la temperatura (especialmente en los pies y dedos de los pies), una sensación de hormigueo o quemazón, dolor agudo, dolor al caminar, sensibilidad extrema al tacto ligero, debilidad muscular, dificultad para caminar y problemas graves en los pies (tales como úlceras, infecciones, deformidades y dolor óseo y articular). La neuropatía autónoma afecta el sistema nervioso autónomo, que controla el corazón, los pulmones, la vejiga, el estómago, los intestinos, los órganos sexuales y los ojos y pueden producirse problemas en cualquiera de estas zonas. La neuropatía del plexo radicular (también llamada amiotrofia diabética, neuropatía femoral o neuropatía proximal) por lo general afecta a los nervios en las caderas, los hombros o el abdomen, por lo general en un lado del cuerpo. Mononeuropatía significa el daño a un solo nervio, normalmente en un brazo, una pierna o la cara. Las complicaciones más comunes de la neuropatía diabética incluyen la pérdida de extremidades (por ejemplo, dedos de los pies, los pies o las piernas), las articulaciones de Charcot, las infecciones de las vías urinarias, la incontinencia urinaria, la insensibilidad a la hipoglucemia (puede incluso ser mortal), la presión arterial baja, los problemas digestivos (por ejemplo, estreñimiento, diarrea, náuseas y vómitos), la disfunción sexual (por ejemplo, disfunción eréctil) y el aumento o la disminución de la sudoración. Como puede observarse, los síntomas pueden variar de leves a dolorosos, incapacitantes e incluso mortales.

La nefropatía diabética es la causa más frecuente de enfermedad renal en fase terminal en los Estados Unidos. Es una complicación vascular de la diabetes que afecta a los capilares glomerulares del riñón y reduce la capacidad de filtración de los riñones. La nefropatía se señala primero por la aparición de hiperfiltración y después de microalbuminuria. La proteinuria grave y una disminución progresiva de la función renal preceden a la enfermedad renal en etapa terminal. Normalmente, antes de que aparezca cualquier síntoma de la nefropatía, por lo general se ha diagnosticado la retinopatía. Por lo general se recomienda el trasplante renal a los pacientes con enfermedad renal en fase terminal debida a la diabetes. La tasa de supervivencia a los 5 años para los pacientes que reciben un trasplante es de aproximadamente el 60 % en comparación con solo el 2 % para los pacientes en diálisis.

La hipertensión se desarrolla normalmente a lo largo de muchos años y afecta casi a todos con el tiempo. La hipertensión no controlada aumenta el riesgo de problemas de salud graves, incluyendo el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca congestiva, el ictus, la arteriopatía periférica, la insuficiencia renal, los aneurismas, las lesiones oculares y los problemas de la memoria o la comprensión.

La aterosclerosis también se desarrolla gradualmente. La aterosclerosis puede afectar a las arterias coronarias, la arteria carótida, las arterias periféricas o la microvasculatura y las complicaciones de la aterosclerosis incluyen la arteriopatía coronaria (que puede provocar angina de pecho o un ataque al corazón), la enfermedad microvascular coronaria, la arteriopatía carótida (que puede provocar un ataque isquémico transitorio o ictus), la arteriopatía periférica (que puede provocar la pérdida de la sensibilidad al calor y al frío o incluso la muerte del tejido) y los aneurismas.

Las enfermedades y afecciones adicionales que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen la lesión pulmonar aguda, la degeneración macular relacionada con la edad, el edema coroideo, la coroiditis, la enfermedad microvascular coronaria, la enfermedad microvascular cerebral, la enfermedad de Eales, el edema provocado por una lesión (por ejemplo, los traumatismos o las quemaduras), el edema asociado a la hipertensión, la filtración vascular glomerular, el choque hemorrágico, el síndrome de Irvine Gass, el edema provocado por la isquemia, el edema macular (por ejemplo, provocado por las oclusiones vasculares, la cirugía post-intraocular (por ejemplo, la cirugía de cataratas), la uveítis o la retinitis pigmentosa, además del provocado por la diabetes), la nefritis (por ejemplo, la glomerulonefritis, la nefritis por enfermedad del suero y la nefritis por Thy-1), las nefropatías, el edema nefrótico, el síndrome nefrótico, las neuropatías, la insuficiencia orgánica debido al edema tislular (por ejemplo, en la sepsis o debido a un traumatismo), la preeclampsia, el edema pulmonar, la hipertensión pulmonar, la insuficiencia renal, el edema retiniano, la hemorragia retiniana, la oclusión de la vena retiniana (por ejemplo, las oclusiones de la vena ramificada o central), la retinitis, las retinopatías (por ejemplo, la retinopatía arterioesclerótica, la retinopatía hipertensiva, la retinopatía por radiación, la retinopatía de células falciformes y la retinopatía del prematuro, además de la retinopatía diabética), el infarto cerebral silencioso, los síndromes de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS),

la glomerulopatía por trasplante, la uveítis, el síndrome de filtración vascular, la hemorragia vítrea y la enfermedad de Von Hippel-Lindau. Además, se sabe que ciertos fármacos, incluyendo los utilizados para tratar la esclerosis múltiple, provocan la hiperpermeabilidad vascular, y una dicetopiperazina, un profármaco de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las mismas, pueden utilizarse para reducir este efecto secundario cuando se utilizan estos fármacos.

"Trata", "tratar" o "tratamiento" se usan en el presente documento con el significado de reducir (total o parcialmente) los síntomas, la duración o la gravedad de una enfermedad o afección, incluyendo la curación de la enfermedad, o de prevenir la enfermedad o afección.

La evidencia reciente indica que la hiperpermeabilidad provocada por transcitosis es la primera etapa de un proceso que, en última instancia, conduce al daño de tejidos y de órganos en muchas enfermedades y afecciones. En consecuencia, la presente invención proporciona un medio de intervención temprana en estas enfermedades y afecciones que puede reducir, retrasar o incluso potencialmente prevenir el daño de tejidos y órganos visto en ellas. Por ejemplo, puede tratarse un animal inmediatamente después del diagnóstico de una de las enfermedades o afecciones que pueden tratarse de acuerdo con la invención (las enfermedades y afecciones descritas anteriormente).

Como alternativa, se prefiere el tratamiento de animales que tienen signos tempranos de, o una predisposición a desarrollar, una enfermedad o afección de este tipo antes de la existencia de síntomas. Los signos tempranos y los factores de riesgo para la diabetes, la hipertensión y la aterosclerosis son bien conocidos y el tratamiento de un animal que presenta estos signos tempranos o factores de riesgo pueden iniciarse con anterioridad a la presencia de síntomas de la enfermedad o afección (es decir, profilácticamente).

Por ejemplo, el tratamiento de un paciente al que se le diagnostica diabetes puede iniciarse inmediatamente tras el diagnóstico. En particular, los diabéticos han de ser tratados con una dicetopiperazina, seleccionada entre DA-DKOP, MR-DKP y YE-DKP o una sal de cualquiera de ellas antes de que esté presente cualquier síntoma de una complicación vascular, aunque esto generalmente no sea posible, puesto que la mayoría de los diabéticos muestran estos síntomas cuando son diagnosticados (véase a continuación). Como alternativa, los diabéticos deben ser tratados mientras la retinopatía diabética no proliferativa sea leve (es decir, niveles leves de microaneurismas y hemorragias intrarretinianas). Véase *Diabetic Retinopathy*, página 9 (Ed. Elia Duh, M.D., Human Press, 2008). Dicho tratamiento temprano proporciona la mejor oportunidad de prevenir el edema macular y la progresión de la retinopatía a retinopatía diabética proliferativa. Además, la presencia de retinopatía diabética se considera una señal de que existen o se desarrollarán otras complicaciones microvasculares de la diabetes (véase ídem, páginas 474-477), y el tratamiento temprano también pueden prevenir o reducir estas complicaciones adicionales. Por supuesto, las enfermedades y afecciones más avanzadas que son complicaciones vasculares de la diabetes también pueden tratarse con resultados beneficiosos.

Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, las complicaciones vasculares con frecuencia ya están presentes para cuando se diagnostica la diabetes. En consecuencia, es preferible tratar profilácticamente a un paciente que tenga signos tempranos de, o una predisposición a desarrollar, diabetes. Los signos tempranos y los factores de riesgo de la diabetes de tipo 2 incluyen: glucosa en ayunas que está alta, pero no lo suficientemente alta como para clasificarse como diabetes ("prediabetes"), hiperinsulinemia, hipertensión, dislipidemia (colesterol alto, triglicéridos altos, lipoproteínas de baja densidad altas y/o lipoproteínas de alta densidad bajas), obesidad (índice de masa corporal superior a 25), inactividad, más de 45 años de edad, falta de sueño, antecedentes familiares de diabetes, raza minoritaria, historia de la diabetes gestacional, historia de síndrome de ovario poliquístico y diagnóstico de síndrome metabólico. En consecuencia, los pacientes con signos tempranos de, o una predisposición a desarrollar, diabetes de tipo 2 pueden fácilmente ser tratados profilácticamente.

De forma similar, el tratamiento de un paciente al que se le diagnostica hipertensión puede iniciarse inmediatamente tras el diagnóstico. La hipertensión normalmente no causa ningún síntoma, pero puede iniciarse el tratamiento profiláctico en un paciente que tiene predisposición a desarrollar hipertensión. Los factores de riesgo para la hipertensión incluyen la edad, la raza (la hipertensión es más frecuente en negros), los antecedentes familiares (la hipertensión es hereditaria), el sobrepeso o la obesidad, la falta de actividad, el consumo de tabaco, el exceso de sal en la dieta, muy poco potasio en la dieta, muy poca vitamina D en la dieta, beber demasiado alcohol, altos niveles de estrés, ciertas enfermedades crónicas (por ejemplo, el colesterol alto, la diabetes, la enfermedad renal y la apnea del sueño) y el uso de ciertos medicamentos (por ejemplo, anticonceptivos orales, anfetaminas, píldoras para adelgazar y algunos medicamentos para el resfriado y la alergia).

El tratamiento de un paciente al que se le diagnostica aterosclerosis puede iniciarse inmediatamente tras el diagnóstico. Sin embargo, se prefiere tratar profilácticamente a un paciente que tenga signos tempranos de, o una predisposición a desarrollar, aterosclerosis. Los signos tempranos y factores de riesgo para la aterosclerosis incluyen la edad, los antecedentes familiares de aneurisma o de cardiopatía precoz, la hipertensión, el colesterol alto, los triglicéridos altos, la resistencia a la insulina, la diabetes, la obesidad, el tabaquismo, la falta de actividad física, la dieta poco saludable y el alto nivel de proteína C reactiva.

El método desvelado en el presente documento para inhibir la hiperpermeabilidad vascular comprende administrar una cantidad eficaz de un principio activo, en el que el principio activo comprende una dicetopiperazina, seleccionada entre DA-DKP, MR-DKP y YE-DKP o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, a un animal que lo necesite para inhibir la hiperpermeabilidad vascular.

5 Los métodos de fabricación de dicetopiperazinas son bien conocidos en la técnica y estos métodos pueden emplearse para sintetizar las dicetopiperazinas de la invención. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 4.694.081, 5.817.751, 5.990.112, 5.932.579 y 6.555.543, la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. número 2004/0024180, las solicitudes PCT WO 96/00391 y WO97/48685 y Smith et al., *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 8, 2369-2374 (1998).

15 Por ejemplo, pueden prepararse dicetopiperazinas sintetizando primeros dipéptidos. Los dipéptidos pueden sintetizarse mediante métodos bien conocidos en la técnica usando aminoácidos L, aminoácidos D o una combinación de aminoácidos D y L. Se prefieren métodos de síntesis en fase sólida. Por supuesto, hay dipéptidos disponibles en el mercado de numerosas fuentes, incluyendo Sigma-Aldrich, San Luis, MO (síntesis a petición del cliente principalmente), Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA (síntesis a petición del cliente), Fisher Scientific (síntesis a petición del cliente) y Advanced ChemTech, Louisville, KY.

20 Una vez que el dipéptido se sintetiza o se adquiere, se cicla para formar una dicetopiperazina. Esto puede conseguirse mediante una diversidad de técnicas.

25 Por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Número 2004/0024180 describe un método de ciclación de dipéptidos. Brevemente, el dipéptido se calienta en un disolvente orgánico mientras se retira el agua por destilación. Preferentemente, el disolvente orgánico es un azeótropo de bajo punto de ebullición con agua, tal como acetonitrilo, alcohol alílico, benceno, alcohol bencílico, n-butanol, 2-butanol, t-butanol, butiléster de ácido acético, tetracloruro de carbono, clorobenceno cloroformo, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, dietilacetato, dimetilacetato, éster etílico del ácido acético, heptano, metilisobutilcetona, 3-pentanol, tolueno y xileno. La temperatura depende de la velocidad de reacción a la que se realiza la ciclación y del tipo de agente de separación azeotrópica utilizado. La reacción se realiza preferentemente a 50-200 °C, más preferentemente a 80-150 °C. El intervalo de pH al que la ciclación se realiza puede determinarse fácilmente por el experto en la materia. Ventajosamente será de 2-9, preferentemente de 3-7.

35 Cuando uno o ambos aminoácidos del dipéptido tienen, o se derivatizan para que tengan, un grupo carboxilo en su cadena lateral (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico), el dipéptido se cicla preferentemente como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 6.555.543. Brevemente, el dipéptido, con el carboxilo de la cadena lateral todavía protegido, se calienta en condiciones neutras. Normalmente, el dipéptido se calienta de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 180 °C, preferentemente a aproximadamente 120 °C. El disolvente será un disolvente neutro. Por ejemplo, el disolvente puede comprender un alcohol (por ejemplo, butanol, metanol, etanol y alcoholes superiores, pero no fenol) y un cosolvente azeotrópico (tal como tolueno, benceno o xileno). Preferentemente, el alcohol es butan-2-ol y el cosolvente azeotrópico es tolueno. El calentamiento continúa hasta que la reacción es completa y ese momento puede determinarse empíricamente. Normalmente, el dipéptido se cicla por calentamiento a reflujo durante aproximadamente 8 a 24 horas, preferentemente aproximadamente 18 horas. Por último, el grupo protector se retira de la dicetopiperazina. De este modo, debe evitarse el uso de ácidos fuertes (ácidos minerales, tales como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico), bases fuertes (bases alcalinas, tales como hidróxido de potasio o hidróxido de sodio) y agentes reductores fuertes (por ejemplo, hidruro de litio y aluminio), con el fin de mantener la quiralidad del compuesto final.

50 Los dipéptidos hechos en resinas en fase sólida pueden ciclarse y liberarse de la resina en una etapa. Véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. N.º 5.817.751. Por ejemplo, la resina que tiene un dipéptido N-alquilado unido se suspende en tolueno o tolueno/etanol en presencia de ácido acético (por ejemplo, al 1 %) o trietilamina (por ejemplo, al 4 %). Normalmente, se prefieren las condiciones básicas de ciclación por sus tiempos de ciclación más rápidos.

55 Para preparar dicetopiperazinas en las que las cadenas laterales de los aminoácidos se derivatizan, pueden utilizarse derivados de aminoácidos en la síntesis de los dipéptidos, los dipéptidos pueden derivatizarse y/o las dicetopiperazinas pueden derivatizarse, como se sabe en la técnica. Véanse, por ejemplo, las referencias citadas anteriormente.

60 Se conocen en la técnica otros métodos de ciclación de dipéptidos y de hacer dicetopiperazinas y pueden utilizarse en la preparación de dicetopiperazinas útiles en la práctica de la invención. Véanse, por ejemplo, las referencias enumeradas anteriormente. Además, pueden hacerse muchas dicetopiperazinas a partir de proteínas y péptidos como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 7.732.403. Además, pueden obtenerse dicetopiperazinas para su uso en la práctica de la invención en el mercado de, por ejemplo, Syngene, India o Hemmo Pharmaceuticals Pvt. Ltd., India (ambos por síntesis a petición del cliente).

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

5 "Profármaco" significa cualquier compuesto que libera un fármaco parental activo (una dicetopiperazina en el presente documento) *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un animal. Los profármacos de dicetopiperazinas incluyen las dicetopiperazinas derivatizadas con cualquier grupo que pueda escindirarse *in vivo* para generar la dicetopiperazina. Los ejemplos de profármacos incluyen los ésteres.

10 Las sales fisiológicamente aceptables de las dicetopiperazinas de la invención también pueden usarse en la práctica de la invención. Las sales fisiológicamente aceptables incluyen sales atóxicas convencionales, tales como las sales derivadas de ácidos inorgánicos (tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y similares), ácidos orgánicos (tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, glutámico, aspártico, benzoico, salicílico, oxálico, ascórbico y similares) o bases (tales como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o cationes orgánicos derivados de N,N-dibenciletilendiamina, D-glucosamina o etilendiamina). Las sales se preparan de una manera convencional, por ejemplo, mediante la neutralización de la forma de base libre del compuesto con un ácido.

20 Como se ha señalado anteriormente, puede utilizarse una dicetopiperazina de acuerdo con las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas para inhibir la hiperpermeabilidad vascular y para tratar una enfermedad o afección mediada por hiperpermeabilidad vascular. Para ello, la dicetopiperazina o la sal farmacéuticamente aceptable se administran a un animal que necesita tratamiento. Preferentemente, el animal es un mamífero, tal como un conejo, cabra, perro, gato, caballo o ser humano. Mucho más preferentemente, el animal es un ser humano.

25 Una dicetopiperazina de acuerdo con las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas se usan en la presente invención como principio activo. "Principio activo" se usa en el presente documento para significar un compuesto que tiene actividad farmacológica terapéutica, farmacéutica o farmacológica y, en particular, la actividad terapéutica, farmacéutica o farmacológica que se describe en el presente documento. La dicetopiperazina o sal no se utilizan en la presente invención como vehículo o como parte de un sistema de vehículo de una composición farmacéutica como se describe en, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.976.569, 6.099.856, 7.276.534 y las solicitudes PCT WO 96/10396, WO2006/023943, WO2007/098500, WO 2007/121411 y WO2010/102148.

35 Pueden determinarse formas de dosificación, modos de administración y cantidades de dosificación eficaces para los compuestos de la invención (es decir, una dicetopiperazina de acuerdo con las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas) empíricamente usando las directrices proporcionadas en el presente documento. Se entiende por los expertos en la materia que la cantidad de dosificación variará con la enfermedad o afección particular que se trata, la gravedad de la enfermedad o afección, la vía o vías de administración, la duración del tratamiento, la identidad de otros fármacos que se administran al animal, la edad, el tamaño y la especie del animal y factores similares conocidos en las técnicas médicas y veterinarias. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que es la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Sin embargo, la dosis diaria será determinada por un médico o veterinario especialista dentro del alcance del criterio médico razonable. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día. La administración del compuesto debe continuarse hasta que se consiga una respuesta aceptable.

50 En particular, una cantidad de dosificación eficaz de un compuesto de la invención para inhibir la hiperpermeabilidad vascular será de 10 ng/kg/día a 225 mg/kg/día, preferentemente de 500 ng/kg/día a 150 mg/kg/día, lo más preferentemente de 1 mg/kg/día a 30 mg/kg/día. Cuando se proporciona por vía oral a un ser humano adulto, la dosis será preferentemente de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 10 g/día, más preferentemente la dosis será de aproximadamente 60 mg/día a aproximadamente 6 g/día, mucho más preferentemente la dosis será de aproximadamente 100 mg/día a aproximadamente 1200 mg/día, preferentemente proporcionada en varias dosis.

55 La presente divulgación también se refiere a un método de modulación del citoesqueleto de las células endoteliales en un animal. La modulación del citoesqueleto puede reducir la hiperpermeabilidad vascular y aumentar la hipopermeabilidad vascular (es decir, la permeabilidad inferior a los niveles basales), devolviendo de este modo el endotelio a la homeostasis. En consecuencia, pueden tratarse las enfermedades y afecciones mediadas por la hiperpermeabilidad vascular (véase anteriormente) y también pueden tratarse las enfermedades y afecciones mediadas por la hipopermeabilidad vascular. Este último tipo de enfermedades y afecciones incluyen el hígado envejecido, la aterogénesis, la aterosclerosis, la cirrosis, la fibrosis del hígado, la insuficiencia hepática y el cáncer de hígado primario y metastásico.

65 El método de modulación del citoesqueleto de las células endoteliales comprende administrar una cantidad eficaz de una dicetopiperazina de acuerdo con las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de

ellas, al animal. Las dicetopiperazinas son las mismas que las descritas anteriormente para la inhibición de la hiperpermeabilidad vascular y "animal" tiene el mismo significado que se ha expuesto anteriormente.

Las formas de dosificación, los modos de administración y las cantidades de dosificación eficaces para los compuestos de la invención para modular el citoesqueleto pueden determinarse empíricamente usando las directrices proporcionadas en el presente documento. Se entiende por los expertos en la materia que la cantidad de dosis variará con la enfermedad o afección particular que se trata, la gravedad de la enfermedad o afección, la vía o vías de administración, la duración del tratamiento, la identidad de otros fármacos que se administran al animal, la edad, el tamaño y la especie del animal y factores similares conocidos en las técnicas médicas y veterinarias. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que es la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Sin embargo, la dosis diaria será determinada por un médico o veterinario especialista dentro del alcance del criterio médico razonable. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día. La administración del compuesto debe continuarse hasta que se consiga una respuesta aceptable.

En particular, una cantidad de dosificación eficaz de un compuesto de la invención para modular el citoesqueleto de las células endoteliales será de 10 ng/kg/día a 225 mg/kg/día, preferentemente de 500 ng/kg/día a 150 mg/kg/día, lo más preferentemente de 1 mg/kg/día a 30 mg/kg/día. Cuando se proporciona por vía oral a un ser humano adulto, la dosis será preferentemente de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 10000 mg/día, más preferentemente la dosis será de aproximadamente 60 mg/día a aproximadamente 6000 mg/día, mucho más preferentemente la dosis será de aproximadamente 100 mg/día a aproximadamente 1200 mg/día, preferentemente proporcionada en varias dosis.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse a un paciente animal para la terapia por cualquier vía de administración adecuada, incluyendo la vía oral, nasal, parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular), transdérmica, intraocular y tópica (incluyendo la vía bucal y sublingual). Se prefiere en general la administración oral para cualquier enfermedad o afección tratable de acuerdo con la invención. Las vías preferidas de administración para el tratamiento de enfermedades y afecciones de los ojos son por vía oral, intraocular y tópica. La más preferida es por vía oral. Las vías preferidas de administración para el tratamiento de enfermedades y afecciones del cerebro son por vía oral y parenteral. La más preferida es por vía oral.

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

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

En las formas de dosificación sólidas de la invención para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el principio activos (es decir, una dicetopiperazina de acuerdo con las reivindicaciones, una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas o combinaciones de lo anterior) se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes en solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura rellenas, usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido puede fabricarse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos de compresión pueden prepararse usando un agente aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato de sodio de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

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

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio o principios activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, acetato de etilo, alcohol de butilo, benzoato de bencilo, propilenglicol, glicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol amílico, tetrahidrofuril polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano y mezclas de los mismos.

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

Las suspensiones, además del principio activo, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y sus mezclas.

La invención también proporciona productos farmacéuticos adecuados para el tratamiento del ojo. Dichos productos farmacéuticos incluyen composiciones farmacéuticas, dispositivos e implantes (que pueden ser composiciones o dispositivos).

Las formulaciones farmacéuticas (composiciones) para la inyección intraocular de un compuesto o compuestos de la invención en el globo ocular incluyen soluciones, emulsiones, suspensiones, partículas, cápsulas, microesferas, liposomas, matrices, etc. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.060.463, la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2005/0101582 y la solicitud PCT WO2004/043480. Por ejemplo, una formulación farmacéutica para la inyección intraocular puede comprender uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes que potencian la viscosidad (tales como un polímero de ácido hialurónico). Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, solución salina (preferentemente al 0,9 %), dextrosa en agua (preferentemente al 5 %), tampones, dimetilsulfóxido, alcoholes y polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares). Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes humectantes y agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como polímeros y gelatina. Las formas de depósito inyectables pueden hacerse mediante la incorporación del fármaco en microcápsulas o microesferas hechas de polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres), ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), policaprolactona y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas (compuestos de los ingredientes habituales, tales como dipalmitoil fosfatidilcolina) o microemulsiones que son compatibles con el tejido ocular. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero o lípido, de la naturaleza de los componentes poliméricos o lipídicos particulares, del tipo de liposoma empleado y de si las microcápsulas o microesferas están recubiertas o sin recubrir, la velocidad de liberación del fármaco desde las microcápsulas, microesferas y liposomas puede controlarse.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía quirúrgica como un implante ocular. Por ejemplo, un recipiente de depósito que tiene una pared difusible de alcohol polivinílico o acetato de polivinilo y que contiene un compuesto o compuestos de la invención puede implantarse en o sobre la esclerótica. Como otro

ejemplo, un compuesto o compuestos de la invención pueden incorporarse en una matriz polimérica hecha de un polímero, tal como policaprolactona, ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), poli(anhídrido) o un lípido, tal como ácido sebácico, y puede implantarse en la esclerótica o en el ojo. Esto por lo general se consigue recibiendo el animal una anestesia tópica o local y mediante una pequeña incisión detrás de la córnea. Después la matriz se inserta a través de la incisión y se sutura a la esclerótica.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía tópica en el ojo y una realización preferida de la invención es una composición farmacéutica tópica adecuada para su aplicación en el ojo. Las composiciones farmacéuticas tópicas adecuadas para aplicación en el ojo incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, gotas, geles, hidrogeles y pomadas. Véase, por ejemplo., la Patente de los EE.UU. N.º 5.407.926 y las solicitudes PCT WO 2004/058289, WO 01/30337 y WO 01/68053.

Las formulaciones tópicas adecuadas para la aplicación en el ojo comprenden uno o más compuestos de la invención en una base acuosa o no acuosa. Las formulaciones tópicas pueden incluir también potenciadores de la absorción, potenciadores de la penetración, agentes espesantes, potenciadores de la viscosidad, agentes para ajustar y/o mantener el pH, agentes para ajustar la presión osmótica, conservantes, agentes tensioactivos, tampones, sales (preferentemente cloruro de sodio), agentes de suspensión, agentes dispersantes, agentes solubilizantes, estabilizantes y/o agentes de tonicidad. Las formulaciones tópicas adecuadas para aplicación en el ojo comprenderán preferentemente un potenciador de la absorción o la penetración para promover la absorción o penetración del compuesto o compuestos de la invención en el ojo y/o un agente espesante o potenciador de la viscosidad que sea capaz de aumentar el tiempo de residencia de un compuesto o compuestos de la invención en el ojo. Véanse las solicitudes PCT WO 2004/058289, WO 01/30337 y WO 01/68053. Los potenciadores de la absorción/penetración de ejemplo incluyen metilsulfonilmetano, solo o en combinación con dimetilsulfóxido, ácidos carboxílicos y tensioactivos. Los agentes espesantes y potenciadores de la viscosidad de ejemplo incluyen dextranos, polietilenglicoles, polivinilpirrolidona, geles de polisacáridos, GelRite®, polímeros celulósicos (tales como hidroxipropilmetilcelulosa), polímeros que contienen carboxilo (tales como polímeros o copolímeros de ácido acrílico), alcohol polivinílico y ácido hialurónico o una sal de los mismos.

Pueden prepararse formas de dosificación líquidas (por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones y gotas) adecuadas para el tratamiento del ojo, por ejemplo, mediante la disolución, dispersión, suspensión, etc. de un compuesto o compuestos de la invención en un vehículo, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución, dispersión o suspensión. Si se desea, la formulación farmacéutica también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares atóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo acetato de sodio, monolaurato de sorbitano, acetato de sodio de trietanolamina, oleato de trietanolamina, etc.

Las soluciones y suspensiones acuosas adecuadas para el tratamiento del ojo pueden incluir, además de un compuesto o compuestos de la invención, conservantes, tensioactivos, tampones, sales (preferentemente cloruro de sodio), agentes de tonicidad y agua. Si se utilizan suspensiones, los tamaños de partícula deben ser inferiores a 10 µm para minimizar la irritación de los ojos. Si se utilizan soluciones o suspensiones, la cantidad entregada al ojo no debe exceder de 50 µl para evitar el vertido excesivo desde el ojo.

Las suspensiones coloidales adecuadas para el tratamiento del ojo se forman en general a partir de micropartículas (es decir, microesferas, nanoesferas, microcápsulas o nanocápsulas, donde microesferas y nanoesferas en general son partículas monolíticas de una matriz polimérica en la que la formulación está atrapada, adsorbida o contenida de otra manera, mientras que con las microcápsulas y nanocápsulas la formulación en realidad está encapsulada). El límite superior para el tamaño de estas micropartículas es de aproximadamente 5 µ a aproximadamente 10 µ.

Las pomadas oftálmicas adecuadas para el tratamiento del ojo incluyen un compuesto o compuestos de la invención en una base apropiada, tales como aceite mineral, lanolina líquida, vaselina blanca, una combinación de dos o los tres de los anteriores o gel de polietileno-aceite mineral. Opcionalmente puede incluirse un conservante.

Los geles oftálmicos adecuados para el tratamiento del ojo incluyen un compuesto o compuestos de la invención suspendidos en una base hidrófila, tal como Carbopol-940 o una combinación de etanol, agua y propilenglicol (por ejemplo, en una proporción de 40:40:20). Se utiliza un agente gelificante, tal como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o glicirricinato amoniacal. Un conservante y/o un agente de tonicidad pueden incluirse opcionalmente.

Los hidrogeles adecuados para el tratamiento del ojo se forman mediante la incorporación de un polímero hinchable, formador de gel, tal como los enumerados anteriormente como agentes espesantes o potenciadores de la viscosidad, excepto por que una formulación denominada como "hidrogel" en la técnica normalmente tiene una mayor viscosidad que una formulación denominada como una solución o suspensión "espesada". Al contrario que dichos hidrogeles preformados, también puede prepararse una formulación de manera que forme un hidrogel *in situ* después de la aplicación en el ojo. Dichos geles son líquidos a temperatura ambiente, pero geles a temperaturas más elevadas (y por tanto se denominan hidrogeles "termorreversibles"), tal como cuando se ponen en contacto con fluidos corporales. Los polímeros biocompatibles que transmiten esta propiedad incluyen polímeros y copolímeros de

ácido acrílico, derivados de N-isopropilacrilamida y copolímeros de bloque ABA de óxido de etileno y óxido de propileno (denominados convencionalmente "poloxámeros" y disponibles con el nombre comercial Pluronic® de BASF-Wayndotte).

- 5 Se prefieren las dispersiones liposómicas, en cuyo caso la formulación está encerrada dentro de liposomas (vesículas microscópicas compuestas de compartimentos acuosos y bicapas lipídicas alternantes).

10 Pueden formularse gotas para los ojos con una base acuosa o no acuosa comprendiendo también uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Las gotas pueden administrarse por medio de un frasco cuentagotas para los ojos dotado de una tapa simple o por medio de un frasco de plástico adaptado para administrar contenido líquido gota a gota por medio de un cierre de una forma especial.

15 Los compuestos de la invención también pueden aplicarse por vía tópica por medio de un vehículo sólido impregnado de fármaco que se inserta en el ojo. La liberación del fármaco se efectúa generalmente mediante la disolución o bioerosión del polímero, ósmosis o combinaciones de los mismos. Pueden utilizarse varios sistemas de entrega de tipo matricial. Dichos sistemas incluyen lentillas blandas hidrófilas impregnadas o empapadas con el compuesto deseado de la invención, así como dispositivos biodegradables o solubles que no necesitan ser retirados después de la colocación en el ojo. Estos insertos oculares solubles pueden estar compuestos de cualquier sustancia degradable que pueda ser tolerado por el ojo y que sea compatible con el compuesto de la invención que se va a administrar. Dichas sustancias incluyen, pero no se limitan a, poli(alcohol vinílico), polímeros y copolímeros de poli(acrilamida, acrilato de etilo y vinilpirrolidona, así como polipéptidos o polisacáridos reticulados, tales como la quitina.

25 Las formas de dosificación para los otros tipos de administración tópica (es decir, no en el ojo) o para la administración transdérmica de compuestos de la invención incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas e inhaladores. El principio activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualesquier tampones o propulsores que puedan ser necesarios. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además del principio activo, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc o mezclas de los mismos. Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además del principio activo, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propulsores habituales tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles sin sustituir, tales como butano y propano. Los parches transdérmicos tienen la ventaja

35 añadida de proporcionar una entrega controlada de los compuestos de la invención en el cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden hacerse disolviendo, dispersando o incorporando de otra manera uno o más compuestos de la invención en un medio adecuado, tal como un material de matriz elastomérica. También pueden utilizarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse ya sea proporcionando una membrana controladora de la velocidad o dispersando el compuesto

40 en una matriz polimérica o gel. También puede utilizarse un vehículo sólido impregnado con fármaco (por ejemplo, un apósito) para la administración tópica.

45 Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para la administración por inhalación o insuflación o para la administración nasal. Para la administración a las vías respiratorias superiores (nasal) o inferiores por inhalación, los compuestos de la invención se administran convenientemente desde un insuflador, nebulizador o un envase presurizado u otros medios convenientes de administración de una pulverización en aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propulsor adecuado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida.

50 Como alternativa, para la administración por inhalación o insuflación, la composición puede tomar la forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo de uno o más compuestos de la invención y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosificación unitaria en, por ejemplo, cápsulas o cartuchos, o, por ejemplo, gelatina o envases blíster desde los que el polvo puede

55 administrarse con la ayuda de un inhalador, insuflador o un inhalador de dosis medida.

60 Para la administración intranasal, los compuestos de la invención pueden administrarse por medio de gotas nasales o una pulverización líquida, tal como por medio de un atomizador de frasco de plástico o un inhalador de dosis medida. Las pulverizaciones líquidas se entregan convenientemente desde envases presurizados. Los pulverizadores típicos son el Mistometer (Wintrop) y el Medihaler (Riker).

65 Las gotas nasales pueden formularse con una base acuosa o no acuosa comprendiendo además uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Las gotas pueden administrarse por medio de un frasco cuentagotas para los ojos dotado de una tapa simple o por medio de un frasco de plástico adaptado para administrar contenido líquido gota a gota por medio de un cierre de una forma especial.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que
5 pueden contener antioxidantes, tampones, solutos que hacen convertir la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. Además, pueden utilizarse endoprótesis vasculares recubiertas con fármaco.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.
10

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.
15

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco desde la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede conseguirse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tenga poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de un fármaco administrado por vía parenteral se consigue disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.
20

Las formas inyectables de depósito se fabrican formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables pueden esterilizarse por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias.
25

Las formulaciones pueden presentarse en recipientes cerrados herméticamente de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales y pueden almacenarse en un estado liofilizado que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.
30

La dicetopiperazina de acuerdo con las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, pueden administrarse solas para el tratamiento de una enfermedad o afección que implica la hiperpermeabilidad vascular o la disfunción del citoesqueleto. Como alternativa, la dicetopiperazina o la sal pueden proporcionarse en combinación entre sí y/o en combinación con uno o más de otros tratamientos o fármacos adecuados para el tratamiento de la enfermedad o afección. Por ejemplo, la dicetopiperazina o la sal pueden administrarse antes de, conjuntamente con (incluyendo simultáneamente con) o después del otro tratamiento o fármaco. En el caso de otro fármaco, el fármaco y la dicetopiperazina o la sal, pueden administrarse en composiciones farmacéuticas separadas o como parte de la misma composición farmacéutica.
35

La invención también proporciona kits. Los kits comprenden un recipiente que contiene una dicetopiperazina de acuerdo con las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas. Los kits pueden comprender además uno o más recipientes adicionales cada uno conteniendo uno o más de otros fármacos adecuados para su uso en los métodos de la invención. Los recipientes adecuados incluyen viales, frascos (incluyendo un frasco con un cuentagotas o un frasco que puede apretarse), envases blíster, inhaladores, tarros, nebulizadores, paquetes (por ejemplo, hechos de papel de aluminio, plástico, papel, celofán o de otro material), jeringuillas y tubos. El kit también contendrá instrucciones para la administración de la dicetopiperazina, el profármaco o la sal y, opcionalmente, el uno o más de otros fármacos adecuados para su uso en los métodos de la invención. Las instrucciones pueden, por ejemplo, imprimirse en el embalaje que contiene el recipiente o recipientes, puede imprimirse en una etiqueta adjunta al kit o al recipiente o recipientes, o puede imprimirse en una hoja de papel separada que se incluye en o con el kit. El embalaje que contiene el recipiente o recipientes puede ser, por ejemplo, una caja o el recipiente o recipientes pueden envolverse en, por ejemplo, recubrimiento plástico retráctil. El kit también puede contener otros materiales que son conocidos en la técnica y que pueden ser deseables desde un punto de vista comercial y del usuario. Por ejemplo, el kit puede contener instrucciones para ayudar a un paciente a controlar su diabetes o hipertensión.
40

Como se usa en el presente documento, "un" o "una" significa uno o más.

Como se usa en el presente documento, "comprende" y "que comprende" incluyen dentro de su alcance todas las expresiones más estrechas, tales como "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" como realizaciones alternativas de la presente invención caracterizada en el presente documento como "comprende" o "que comprende". Con respecto al uso de "consiste esencialmente en", esta frase limita el alcance de una reivindicación a las etapas y materiales especificados y a aquellos que no afectan materialmente a las características básicas y nuevas de la invención desvelada en el presente documento. Las características básicas y nuevas de la invención pueden ser la inhibición de la hiperpermeabilidad vascular, la modulación de un citoesqueleto de una célula endotelial o ambas, en un animal.

Los objetos adicionales, ventajas y características nuevas de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia considerando los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de DA-DKP sobre la ECIS

Se realizaron ensayos para determinar el efecto de DA-DKP sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TER, del inglés *transendothelial electrical resistance*) de células endoteliales microvasculares glomerulares renales humanas (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo para el Instituto de Investigación de Biología Celular Aplicada), Kirkland, WA). La resistencia eléctrica se midió utilizando el sistema de detección de impedancia eléctrica en sustrato celular (ECIS, del inglés *electric cell-substrate impedance sensing*) (ECISZ0, obtenido de Applied Biophysics) con placas de electrodos múltiples de 8 pocillos (8W10E). Cada pocillo de las placas se recubrió con 5 µg/cm² de fibronectina en HBSS mediante la adición de la fibronectina en un volumen de 100 µl por pocillo e incubando las placas durante 30 minutos en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 %. La solución de fibronectina se retiró y se añadieron 400 µl de medio de cultivo EGM-2 (Lonza) a cada pocillo. Las placas se conectaron al sistema ECISZ0 y se estabilizaron eléctricamente. El medio EGM-2 se aspiró y se reemplazó por 200 µl de medio de cultivo EGM-2 que contenía 100.000 células por pocillo. Las placas se volvieron a conectar al sistema de ECISZ0 y se incubaron durante 24 horas en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 %. El medio EGM-2 se aspiró y se reemplazó por 400 µl de medio de cultivo EGM-2 recién preparado por pocillo. Las placas se volvieron a conectar al sistema ECISZ0 y se incubaron durante 6 horas en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se prepararon soluciones de los compuestos de ensayo en HBSS y se colocaron en la incubadora para equilibrar. Después, los compuestos de ensayo se añadieron a los pocillos apropiados a las siguientes concentraciones finales: DA-DKP (100 µM) (Sigma) y TNFα (1 ng/ml) (Sigma). La ECIS (resistencia) se controló durante 90 horas.

En las células endoteliales glomerulares, la DA-DKP 100 µM sola mostró un aumento de la ECIS en comparación con las células sin tratar a partir de aproximadamente 5,0 horas, alcanzando significación a las 12 horas y persistiendo durante 35 horas, después del tratamiento. Si bien no fue significativa, la DA-DKP mostró una capacidad para evitar algo de la caída de la ECIS inducida por TNFα.

Ejemplo 2: Efecto de DA-DKP sobre la ECIS

Se realizaron ensayos para determinar el efecto de DA-DKP sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (para el Instituto de Investigación de Biología Celular Aplicada), Kirkland, WA). La resistencia eléctrica se midió utilizando el sistema de detección de impedancia eléctrica en sustrato celular (ECIS) (ECISZ0, obtenido de Applied Biophysics) tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero usando placas de electrodos múltiples de 96 pocillos (8W10E). Además, se utilizaron varias dosis de DA-DKP (0,5 µM, 5,0 µM, 50 µM y 100 µM). La DA-DKP proporcionó un aumento dependiente de la dosis de la ECIS (TER), proporcionando 100 µM el mayor aumento.

Ejemplo 3: Efecto de DA-DKP sobre la formación de fibras de tensión de actina

Se sembraron células endoteliales retinianas humanas de pase 12 (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (para el Instituto de Investigación de Biología Celular Aplicada), Kirkland, WA) en portaobjetos de vidrio de 16 cámaras recubiertos con 5 µg/cm² de fibronectina a 5000 células por pocillo en un volumen total de 200 µl de medio EGM-2 (Lonza). Los portaobjetos se cultivaron en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 48 horas con cambios de medio a diario. Después, se añadieron compuestos de ensayo (DA-DKP, S1P y TNFα), diluidos en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS; Lonza), para proporcionar las siguientes concentraciones finales: DA-DKP (100 µM) (Sigma), TNFα (1 ng/ml) (Sigma) y S1P (1 µM) (Sigma). Los portaobjetos se incubaron con los compuestos de ensayo durante 15 minutos o 3 horas en una incubadora a 37 °C con de CO₂ al 5 %. Después de esta incubación, se aspiró el medio y las células se fijaron con formaldehído al 3,6 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante diez minutos a temperatura ambiente. Después, todos los pocillos se lavaron dos veces con 100 µl de PBS. Las células se permeabilizaron usando un Triton X-100 al 0,1 % en PBS durante 5 minutos. Después, todos los pocillos se lavaron dos veces con 100 µl de PBS y se añadieron 50 µl de una dilución 1:40 de rodamina-faloidina (Invitrogen) en PBS a las células para la tinción y obtención de F-actina y se dejó sobre las células durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, todos los pocillos se lavaron dos veces con 100 µl de PBS. Después, se

añadieron 100 µl de PBS a cada pocillo y se observaron y fotografiaron las células usando un microscopio invertido usando un filtro de rodamina (ex530/em590).

Las células endoteliales de retina tratadas con DA-DKP sola mostraron una tinción de F-actina de membrana difusa a los 15 minutos y a las 3 horas. Con TNF α solo, las fibras de estrés se observaron en todo momento, presentando el número de células fibras de tensión y aumentando el espesor de las fibras de 15 minutos a 3 horas. La DA-DKP disminuyó la formación de fibras de tensión y/o el espesor de las fibras provocado por TNF α en ambos momentos. Las células tratadas con S1P sola mostraron actina corticales de anillos, a los 15 minutos y las 3 horas. La DA-DKP parecía potenciar los anillos corticales a los 15 minutos y las 3 horas.

La S1P (esfingosina-1 fosfato) desempeña un papel muy importante en la formación y el mantenimiento del endotelio vascular. La S1P es una entrada de la señalización constitutiva que facilita la organización y la función de barrera del endotelio vascular a través de sus efectos sobre el citoesqueleto de actina. En particular, la S1P está implicada en la formación de fibras de actina corticales y la organización de las uniones adherentes. El agotamiento de S1P conduce a la filtración vascular y el edema, y la S1P puede invertir la disfunción endotelial y restaurar la función de barrera.

En este experimento, la DA-DKP presentó una capacidad de fortalecer los efectos protectores de S1P en las células endoteliales de la retina. La DA-DKP también invirtió la formación de fibras de tensión inducidas por TNF α . Se observa una tinción perinuclear difusa en las células tratadas con DA-DKP sola.

Ejemplo 4: Efecto de DA-DKP sobre RhoA

La remodelación del citoesqueleto de las células endoteliales es fundamental para muchas funciones del endotelio. Se ha identificado a la familia Rho de proteínas pequeñas de unión a GTP como reguladores claves de la dinámica del citoesqueleto de F-actina. La familia Rho consiste en tres isoformas, RhoA, RhoB y RhoC. La activación de la actividad de RhoA conduce a la formación prominente de fibras de tensión en las células endoteliales. La estimulación de células endoteliales con trombina aumenta Rho GTP y la fosforilación de miosina, coherente con el aumento de la contractilidad celular. La inhibición de RhoA bloquea esta respuesta y la pérdida de la función de barrera, lo que demuestra un papel crítico para Rho en la permeabilidad vascular.

Este experimento se realizó utilizando un ensayo de activación de Rho disponible en el mercado (GLISA) adquirido de Cytoskeleton, Denver, Colorado, siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, se cultivaron células endoteliales retinianas humanas de pase 8 o 12 (ACBRI 181, Instituto de Investigación de Biología Celular Aplicada, Kirkland, WA) en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos recubiertas con fibronectina (1 µg/cm²) usando medio de cultivo EGM-2 (Lonza) durante 24 horas en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 % (30.000 células/pocillo en un volumen total de 3 ml). Después, el medio se aspiró y se reemplazó por medio Ultraculture complementado con suero fetal bovino al 0,1 %, L-glutamina, piruvato de sodio, penicilina/estreptomina e ITSS (insulina, transferrina sodio selenio) (todos de Lonza) para privar de suero a las células y reducir el nivel de fondo de RhoA. Las células se cultivaron durante 24 horas en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 %. Los compuestos de ensayo diluidos en HBSS se colocaron en la incubadora para equilibrar antes de la adición a las células. Después, se añadieron 150 µl de cada compuesto de ensayo a los pocillos de cultivo apropiados y las placas se incubaron en la incubadora durante 15 minutos adicionales. Después, se añadió trombina a los pocillos apropiados. Después de 1 minuto, las células se lavaron una vez con 1,5 ml de solución salina tamponada con fosfato y después se lisaron con 100 µl de tampón de lisis GLISA complementado con inhibidores de proteasa. Los extractos se rasparon, se transfirieron a tubos de microcentrífuga y se transfirieron a hielo para conservar la forma activa de RhoA. Después, todos los extractos se aclararon de residuos mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y se colocaron de nuevo en hielo. Las alícuotas de cada extracto se retiraron para el ensayo GLISA y para las determinaciones de proteínas. Todas las concentraciones de proteína estaban dentro del 10 % y los extractos se utilizaron a las concentraciones conseguidas (equivalente a 15 µg de proteína total por pocillo). El ensayo GLISA se realizó utilizando los reactivos suministrados en el kit.

Los resultados para las células endoteliales retinianas de pase 12 se presentan en la Tabla 1 a continuación. Como era de esperar, los niveles de Rho A activa inducida por trombina eran muy altos. Todos los compuestos de ensayo inhibieron la activación de Rho A inducida por trombina.

Los resultados para las células endoteliales retinianas de pase 8 se presentan en la Tabla 2 a continuación. Como era de esperar, los niveles de Rho A activa inducida por trombina eran muy altos. Todos los compuestos de ensayo inhibieron la activación de Rho A inducida por trombina.

TABLA 1

Tratamiento	DO media	Porcentaje de inhibición frente a control sin tratar	Porcentaje de inhibición frente a trombina
Sin tratar	0,455	---	---
DA-DKP 100 μ M	0,389	14,52	---
Dexametasona 1,0 μ M	0,428	5,83	---
Inhibidor de PI3 cinasa LY 294002 10,0 μ M	0,370	18,70	- -
Inhibidor de Src-1 1,0 μ M *	0,349	23,21	---
Trombina 0,1 U/ml	1,013	---	---
Trombina 0,1 U/ml + DA-DKP 100 μ M	0,752	---	46,82
Trombina 0,1 U/ml + dexametasona 1,0 μ M	0,826	---	33,48
Trombina 0,1 U/ml + Inhibidor de PI3 cinasa LY 294002 10,0 μ M	0,685	---	58,73
Trombina 0,1 U/ml + Inhibidor de Src-1 1,0 μ M	0,534	---	85,85

* Obtenido de Sigma.

TABLA 2

Tratamiento	DO media	Porcentaje de inhibición frente a control sin tratar	Porcentaje de inhibición frente a trombina
Sin tratar	0,102	---	---
DA-DKP 100 μ M	0,110	-7,88	---
Inhibidor de PI3 cinasa LY 294002 10,0 μ M	0,056	45,32	---
Trombina 0,1 U/ml	0,561	---	---
Trombina 0,1 U/ml + DA-DKP 100 μ M	0,377	---	40,04
Trombina 0,1 U/ml + Inhibidor de PI3 cinasa LY 294002 10,0 μ M	0,433	---	27,86

5 Ejemplo 5: Efecto de MR-DKP sobre la ECIS

Se realizaron ensayos para determinar el efecto de MR-DKP (una dicetopiperazina en la que R¹ en la fórmula I es la cadena lateral de metionina y R² es la cadena lateral de arginina) sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de células endoteliales retinianas humanas de pase 6 (Cell Applied Systems Corporation (distribuidor exclusivo para el Instituto de Investigación de Biología Celular Aplicada), Kirkland, WA). La resistencia eléctrica se midió utilizando el sistema de detección de impedancia eléctrica en sustrato celular (ECIS) (ECISZ θ , obtenido de Applied Biophysics) con placas de electrodos múltiples de 8 pocillos (8W10E). Cada pocillo de las placas se estabilizó mediante la adición de 250 μ l de cisteína 10 mM (Sigma) en agua estéril a cada pocillo e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron dos veces con 150 μ l de agua estéril para retirar la cisteína. Todos los pocillos se recubrieron con 10 μ g/cm² de colágeno mediante la dilución de la solución madre (colagenina de Tipo IV 0,5 mg/ml ácido acético al 0,25 % (Sigma) en agua estéril y la adición de 150 μ l de la solución resultante a cada pocillo. La solución de colágeno se incubó en las placas a 37 °C durante 120 minutos y después se retiró. Los pocillos se lavaron dos veces con 400 μ l de agua estéril para retirar el colágeno. A continuación, se añadieron 400 μ l de medio de cultivo EGM-2 (Lonza) a cada pocillo. Las placas se conectaron al sistema ECISZ θ y se estabilizaron eléctricamente. El medio EGM-2 se aspiró y se reemplazó por 400 μ l de medio de cultivo EGM-2 que contenía 100.000 células por pocillo. Las placas se volvieron a conectar al sistema ECISZ θ y se incubaron durante 24 horas en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 %. El medio EGM-2 se aspiró y se reemplazó por 400 μ l de medio de cultivo EGM-2. Las placas se volvieron a conectar al sistema ECISZ θ y se incubaron durante 2 horas en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se prepararon soluciones del compuesto de ensayo en HBSS y se colocaron en la incubadora para equilibrar. Después, se añadió el compuesto de ensayo a los pocillos apropiados en las siguientes concentraciones finales: MR-DKP (50 μ M y 100 μ M). La ECIS (resistencia) se controló durante 50 horas.

En las células endoteliales retinianas, la MR-DKP tanto 50 μ M como 100 μ M mostró un aumento en la ECIS en comparación con las células sin tratar a partir de aproximadamente 15 horas, convirtiéndose en significativo

aproximadamente a las 18 horas. El aumento fue del 20 % en su máximo. Para el grupo de 100 μM , el aumento persistió durante el resto del experimento, alcanzando significación de nuevo aproximadamente a las 33 horas. Para el grupo de 50 μM , aproximadamente a las 28 a 29 horas, la resistencia volvió a los niveles del control, pero aumentó de nuevo comenzando aproximadamente a las 30 horas, alcanzando significación aproximadamente a las 33 horas y el aumento persistió durante el resto del experimento. Además, el grupo de 50 μM mostró una breve elevación de la resistencia a partir de 2-5 horas.

Ejemplo 6: Efecto de YE-DKP sobre la ECIS

10 El Ejemplo 5 se repitió, excepto por que la utilizada dicetopiperazina fue YE-DKP (una dicetopiperazina en la que R^1 en la fórmula I es la cadena lateral del ácido glutámico y R^2 es la cadena lateral de tirosina). En las células endoteliales retinianas, la YE-DKP 50 μM no mostró un aumento significativo en la ECIS, pero la YE-DKP 100 μM mostró un aumento en la ECIS en comparación con las células sin tratar que comenzó aproximadamente a las 6 horas, convirtiéndose en significativo aproximadamente a las 12 horas. El aumento fue de aproximadamente el 20 % en su máximo. En aproximadamente 28 horas, la resistencia volvió a los niveles del control, pero aumentó de nuevo comenzando aproximadamente a las 29 horas, alcanzando significación aproximadamente a las 33 horas y el aumento persistió durante el resto del experimento.

REIVINDICACIONES

1. Un principio activo que comprende una dicetopiperazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de la hiperpermeabilidad vascular en un animal que tiene una enfermedad o afección mediada por la hiperpermeabilidad vascular seleccionada entre el grupo que consiste en edema macular diabético, degeneración macular relacionada con la edad, edema miocárdico, fibrosis miocárdica, disfunción diastólica, miocardiopatía diabética, retraso del desarrollo de los pulmones en los fetos de madres diabéticas, hiperplasia vascular en el mesenterio, neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, aterosclerosis, edema coroideo, coroiditis, enfermedad microvascular coronaria, enfermedad microvascular cerebral, enfermedad de Eales, edema provocado por lesión, edema asociado a la hipertensión, choque hemorrágico, hipertensión, síndrome de Gass Irvine, isquemia, edema macular, nefritis, nefropatías, edema nefrótico, síndrome nefrótico, neuropatía, insuficiencia de órganos debida a edema, preeclampsia, edema pulmonar, hipertensión pulmonar, insuficiencia renal, edema retiniano, hemorragia retiniana, oclusión venosa retiniana, retinitis, retinopatía, infarto cerebral silencioso, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, glomerulopatía por trasplante, síndrome de filtración vascular, hemorragia vítrea y enfermedad de Von Hippel-Lindau, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz del principio activo, en el que la dicetopiperazina se selecciona entre el grupo que consiste en DA-DKP, MR-DKP y YE-DKP.
2. El principio activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la administración de la dicetopiperazina o sal se inicia inmediatamente tras el diagnóstico de la enfermedad o afección.
3. El principio activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el animal necesita la dicetopiperazina o sal debido a uno o más signos tempranos de, o una predisposición a desarrollar, una enfermedad o afección mediada por la hiperpermeabilidad vascular.
4. El principio activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 en el que la enfermedad o afección es el edema macular diabético o la degeneración macular relacionada con la edad.
5. El principio activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la hiperpermeabilidad vascular es la hiperpermeabilidad vascular de un endotelio continuo que se encuentra en, o alrededor de, un cerebro, diafragma, musculatura duodenal, grasa, corazón, riñón, vaso sanguíneo grande, pulmón, mesenterio, nervio, retina, músculo esquelético, piel o testículo.
6. El principio activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la hiperpermeabilidad vascular es la hiperpermeabilidad vascular de un endotelio fenestrado que se encuentra en, o alrededor de, un riñón, un páncreas, una glándula suprarrenal, una endocrina o un intestino.
7. El principio activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la dicetopiperazina o sal se administra por vía oral.
8. El principio activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el animal es un ser humano.