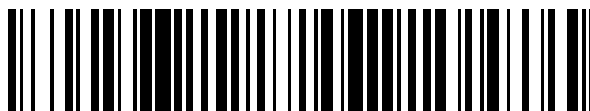


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 198**

51 Int. Cl.:

C07K 5/09 (2006.01)

C07K 5/083 (2006.01)

C07K 5/087 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2014** **PCT/EP2014/070201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015** **WO15040235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2014** **E 14771588 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 3049428**

54 Título: **Tripéptidos antiinflamatorios**

30 Prioridad:

23.09.2013 EP 13185543

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2019

73 Titular/es:

DR. AUGUST WOLFF GMBH & CO. KG
ARZNEIMITTEL (100.0%)
Sudbrackstrasse 56
33611 Bielefeld, DE

72 Inventor/es:

SOEBERDT, MICHAEL;
KNIE, ULRICH y
ABELS, CHRISTOPH

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 710 198 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

Tripéptidos antiinflamatorios

5 **[0001]** La presente invención se refiere a compuestos tripeptídicos y a su uso como medicamento, en particular como agentes antiinflamatorios.

[0002] El tratamiento de la inflamación es de gran importancia en medicina. Los tratamientos existentes, sin embargo, son insuficientes o problemáticos. La inflamación transitoria es un mecanismo beneficioso que protege a los
10 mamíferos de los patógenos invasores. La inflamación incontrolada causada por respuestas inmunitarias innatas o bien adaptativas, sin embargo, puede conducir a daño de tejido y dolor y es la causa subyacente de muchas dolencias, incluyendo asma así como otras enfermedades alérgicas, infecciosas, autoinmunitarias, degenerativas e idiopáticas. Los tratamientos existentes a menudo exhiben una eficacia baja, retardada o solo temporal, efectos secundarios indeseables y/o falta de selectividad.

15 **[0003]** En vista del gran número de tipos de inflamación y enfermedades asociadas con inflamación y las deficiencias de los fármacos actualmente disponibles, existe una gran necesidad de nuevos agentes activos para tratar eficazmente estas enfermedades y sus síntomas sin efectos inmunosupresores adversos.

20 **[0004]** El documento WO88/00833 divulga el uso del tripéptido Lys-Pro-Val para la preparación de un medicamento para tratar la inflamación.

[0005] El documento WO02/064131 describe compuestos inhibidores de la inflamación como Lys-Pro-Thr.

25 **[0006]** El documento WO02/094856 se refiere a análogos y peptidomiméticos de glicil-L-prolil-L-ácido glutámico (GPE).

[0007] El documento WO03/002593 divulga inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (DPP IV).

30 **[0008]** El documento WO2007/080194 describe el uso de inhibidores de tripeptidil peptidasa II (TPP II) para potenciar la eficacia de la terapia del cáncer por irradiación gamma.

[0009] El documento WO2007/088099 divulga el uso de inhibidores de TPP II en el tratamiento de isquemia y neurodegeneración.

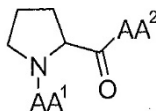
35 **[0010]** El documento WO2009/000296 describe el uso de inhibidores de TPP II en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias y el rechazo de trasplantes.

[0011] El documento WO2009/000297 divulga el uso de inhibidores de TPP II para uso en combinación con
40 quimioterapia para el tratamiento del cáncer.

[0012] El documento WO2012/102832 describe el tratamiento de trastornos del espectro del autismo usando glicil-L-2-metilpropil-L-ácido glutámico.

45 **[0013]** La invención estaba basada en el objeto de proporcionar compuestos novedosos que puedan usarse como compuestos activos farmacéuticos, en particular para combatir la inflamación. Es otro objeto de la presente invención la provisión de tales compuestos con una estabilidad aumentada y una biodisponibilidad mejorada, siendo al mismo tiempo seguros y fiables para los pacientes.

50 **[0014]** Estos objetos se consiguen mediante la provisión de compuestos tripeptídicos (de aquí en adelante también "compuestos") según la fórmula general (I) como se muestra a continuación o un solvato o hidrato de los mismos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:



(1)

55

en la que:

AA¹ y AA² son como se definen en la reivindicación 1.

[0015] Se ha encontrado sorprendentemente que estos compuestos novedosos de la invención pueden usarse
60 eficazmente como compuestos farmacéuticos activos en medicamentos, en particular para tratar enfermedades

inflamatorias, mientras que al mismo tiempo tienen una estabilidad aumentada y biodisponibilidad mejorada en comparación con los compuestos conocidos en la técnica anterior. Además, están libres de efectos secundarios indeseables y son seguros para los pacientes al no mostrar toxicidad.

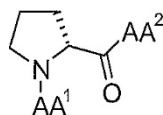
5 **[0016]** Según la presente invención, el término “amida” incluye $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR$ y $-C(O)NR_2$ en los que R es alquilo C_1-C_6 . Preferiblemente, el término amida significa $-C(O)NH_2$.

[0017] Además, según la presente invención, el término alquilo C_1-C_6 comprende metilo, etilo, n-propilo e isopropilo, n-butilo e isobutilo, n-pentilo e isopentilo y n-hexilo e isohexilo. Halógeno comprende preferiblemente Cl, Br e I.

[0018] Además, según la invención se usan las siguientes definiciones:

1-Nal	1-naftilalanina
15 2-Nal	2-naftilalanina
Abu	ácido α -aminobutírico
Aib	ácido α -aminoisobutírico
Ala	alanina
Arg	arginina
20 Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
Cha	ciclohexilalanina
Cit	citrulina
Cys	cisteína
25 Dab	ácido α,γ -diaminobutírico
Dap	ácido α,β -diaminopropiónico
Gly	glicina
His	histidina
Hle	homoleucina
30 Homophe	homofenilalanina
Ile	isoleucina
Leu	leucina
Lys	lisina
Met	metionina
35 Nle	norleucina
Nva	norvalina
Orn	ornitina
Phe	fenilalanina
Phg	fenilglicina
40 Pro	prolina
Sar	sarcosina
Ser	serina
<i>t</i> -butil-Gly	terc-butilglicina
Tic	ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico
45 Thr	treonina
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
Val	valina

50 **[0019]** Son más preferidos según la invención los compuestos tripeptídicos (de aquí en adelante también “compuestos”) según la fórmula general (2):



(2)

55 En la que AA^1 y AA^2 son como se definen en la reivindicación 1.

[0020] Estos compuestos proporcionan una eficacia mejorada adicional, particularmente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, y una estabilidad y biodisponibilidad aumentadas.

60 **[0021]** Los N^α -metilaminoácidos y N^α,N^α -dimetilaminoácidos en la definición de AA^1 según la invención son

N^α,N^α-dimetil-Lys, N^α,N^α-dimetil-Nle, N^α-metil-Phe y N^α,N^α-dimetil-Phe. La Phe puede sustituirse por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo de -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NH(alquilo C₁-C₆), -CH₂N(alquilo C₁-C₆)₂, OH, halógeno, -CN, CF₃, -NHC(O)CH₃, -C(O)CH₃, -O-alquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂ y alquilo C₁-C₆.

5

[0022] Los N^α-metilaminoácidos y amidas de N^α-metilaminoácidos en la definición de AA² según la invención son are N^α-metil-Thr-OH, N^α-metil-Val-OH y N^α-metil-Thr-NH₂.

[0023] En la definición de AA¹ según la invención, los α-aminoácidos se seleccionan del grupo consistente en

10 Lys, Nle, Orn y Phe. La Phe puede sustituirse por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo de -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NH(alquilo C₁-C₆), -CH₂N(alquilo C₁-C₆)₂, OH, halógeno, -CN, CF₃, -NHC(O)CH₃, -C(O)CH₃, -O-alquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂ y -alquilo C₁-C₆. Los compuestos tripeptídicos preferidos según la presente invención son aquellos en los que en la fórmula general (1) AA¹ se selecciona de Lys, Orn, Nle, Phe, N^α-metil-Phe, N^α,N^α-dimetil-Nle y N^α,N^α-dimetil-Phe y AA² es ácido α-aminoisobutírico, *t*-butilglicina y amida de

15 ácido α-aminoisobutírico.

[0024] Los compuestos tripeptídicos particularmente preferidos según la presente invención se seleccionan del grupo consistente en H-(L)-Lys-(D)-Pro-Aib-OH, H-(L)-Lys-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-OH, H-(L)-Lys-(L)-Pro-Aib-OH, H-

20 (L)-Lys-(L)-Pro-(L)-*t*-butil-Gly-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Lys-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-OH, H-(L)-Lys-(L)-Pro-Aib-NH₂, H-(L)-Orn-(L)-Pro-Aib-OH, H-(L)-Nle-(L)-Pro-Aib-OH, H-(L)-Phe-(L)-Pro-Aib-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Lys-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-NH₂, N^α,N^α-dimetil-(L)-Lys-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Val-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Nle-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-OH, N^α-metil-(D)-Phe-(L)-Pro-Aib-OH, H-(D)-Phe-(L)-Pro-Aib-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Phe-(L)-Pro-Aib-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Nle-(L)-Pro-Aib-OH o N^α,N^α-dimetil-(L)-Phe-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-OH, o un solvato o hidrato de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

25

[0025] Los compuestos según la invención pueden usarse además en forma de sus ácidos o sus bases o en forma de sus sales, en particular las sales fisiológicamente aceptables, o en forma de sus solvatos, en particular sus hidratos.

30 **[0026]** Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser sales de adición de base. Estas incluyen sales de los compuestos según la invención con bases inorgánicas, tales como hidróxidos de metal alcalino, hidróxidos de metal alcalinotérreo o con bases orgánicas tales como monoetanolamina, dietanolamina o trietanolamina.

[0027] Las sales de adición de ácido, en particular con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido

35 sulfúrico o ácido fosfórico, o con ácidos carboxílicos o sulfónicos orgánicos adecuados, o con aminoácidos, pueden usarse además ventajosamente.

[0028] Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos según la invención se eligen, por ejemplo,

40 del grupo que comprende cloruros, bromuros, yoduros, clorhidratos, bromhidratos, sulfonatos, metanosulfonatos, sulfatos, hidrogenosulfatos, sulfitos, hidrogenosulfitos, fosfatos, nitratos, metanoatos, acetatos, propionatos, lactatos, citratos, glutaratos, maleatos, malonatos, malatos, succinatos, tartratos, oxalatos, fumaratos, benzoatos, *p*-toluenosulfonatos y/o sales de aminoácidos, preferiblemente los aminoácidos proteinogénicos.

[0029] Los compuestos según la invención son adecuados para uso como medicamentos. Son capaces de

45 tener una acción analgésica, antipirética, antiprurítica, antiinflamatoria y/o espasmolítica. Según la invención, los compuestos y los medicamentos que contienen los compuestos se usan preferiblemente en un procedimiento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades elegidas del grupo que comprende enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, dolor agudo y crónico, prurito, hiponatremia, edema, íleo, toserina y glaucoma. Enfermedades adicionales que pueden tratarse según la invención son EM (esclerosis múltiple), enfermedad de

50 Parkinson y enfermedad de Alzheimer.

[0030] En realizaciones ventajosas, los compuestos según la invención pueden usarse en particular para tratamiento terapéutico y/o profiláctico, diagnóstico y/o terapia de enfermedades inflamatorias.

55 **[0031]** La invención proporciona también el uso de compuestos según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades inflamatorias.

[0032] Según la invención, las enfermedades relacionadas con el dolor son particularmente aquellas que

60 implican dolor debido a reacciones inflamatorias (también llamadas enfermedades inflamatorias relacionadas con el dolor y dolor inflamatorio).

[0033] Además, según la invención, las enfermedades inflamatorias se eligen del grupo que comprende

inflamación cardiovascular, inflamación neurológica, inflamación esquelética, inflamación cutánea, inflamación muscular, inflamación gastrointestinal, inflamación ocular, inflamación ótica, inflamación debida a mordeduras de

65 insectos e inflamación debida a la curación de heridas; aterosclerosis, isquemia, reestenosis y vasculitis; asma,

síndrome de Sjogren, inflamación pulmonar, inflamación crónica de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), alergia, psoriasis, artritis psoriásica, eccema, escleroderma, dermatitis atópica y lupus eritematoso sistémico, artritis, sinovitis, osteomielitis, artritis reumatoide, artrosis y espondilitis anquilosante; septicemia y choque séptico, diabetes, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y obesidad, colitis, colitis
5 ulcerosa, enfermedad de Crohn, EII y SII, y las enfermedades y afecciones inflamatorias debidas a proliferación tumoral, metástasis tumoral o rechazo de trasplante (enfermedad del injerto contra el hospedador; EICH).

[0034] En particular, las enfermedades inflamatorias se eligen del grupo que comprende enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, en particular enfermedades inflamatorias intestinales tales como enfermedad
10 de Crohn y/o colitis ulcerosa, cambios inflamatorios agudos o crónicos con inflamación de la vesícula biliar, pseudopólipos inflamatorios, colitis quística profunda, neumatosi quística intestinal, pancreatitis, apendicitis, inflamación cardiovascular debida a arteriosclerosis, isquemia, reestenosis y/o vasculitis, sepsis, septicemia, alergias, asma, síndrome de Sjogren, inflamación pulmonar, inflamación crónica de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), proliferación tumoral, metástasis tumoral, rechazo de trasplante, enfermedades
15 inflamatorias de las articulaciones tales como artritis reumatoide, vulvovaginitis y/o enfermedades inflamatorias del cerebro, piel, folículo piloso, tracto urogenital y los ojos, sinusitis, tenosinovitis, bursitis, tendinitis, epicondilitis lateral, capsulitis adhesiva, osteomielitis, inflamación osteoartrítica, inflamación ocular, inflamación otítica y/o inflamación autoinmunitaria, psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis de contacto, eccema atópico, escleroderma y otras enfermedades fibróticas, lupus eritematoso sistémico, urticaria, liquen plano, linfoma y/o enfermedades alérgicas o
20 caracterizadas por la implicación de mastocitos.

[0035] El purito (picor), en particular prurito pruritoceptivo, es un síntoma frecuente en enfermedades cutáneas experimentado convencionalmente como un tipo de estímulo doloroso. La sensación de picor desencadena el deseo de rascar el área afectada. La piel dañada por el rascado a menudo ofrece a los patógenos infecciosos un buen medio
25 nutriente y las inflamaciones de áreas abiertas rascadas de la piel no son infrecuentes. Además, el picor y rascado mismos pueden desencadenar una reacción inflamatoria. Las enfermedades pruríticas de piel y cabello se eligen del grupo que comprende prurito, psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis de contacto, eccema atópico, alopecia areata, escleroderma y otras enfermedades fibróticas, lupus eritematoso sistémico, urticaria, liquen plano, linfoma y/o
30 enfermedades alérgicas o caracterizadas por la implicación de mastocitos.

[0036] Las enfermedades en el sentido de la presente invención comprenden también otras enfermedades tales como hiponatremia, edema, íleo, tos ferina, glaucoma, ES (esclerosis múltiple), enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer.

[0037] Los órganos implicados en las enfermedades para tratar por los compuestos según la invención son en particular los denominados órganos de barrera, a saber tracto gastrointestinal, piel, pulmón, tracto urogenital, cerebro, tracto aerodigestivo, dientes, huesos, hígado y cabello. Realizaciones particularmente preferidas de la invención se refieren al tratamiento de las enfermedades de los órganos de barrera.

[0038] Las enfermedades del tracto gastrointestinal se eligen del grupo que comprende síndrome del intestino irritable, lesiones gástricas, ulceraciones gastrointestinales, daño exógeno y endógeno de la mucosa gastrointestinal, disfunciones del tracto gastrointestinal, adenomas, en particular en el intestino, y/o pólipos juveniles.

[0039] Las enfermedades del pulmón (enfermedades respiratorias) incluyen enfermedad pulmonar
45 inflamatoria, enfermedades pulmonares obstructivas tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades pulmonares restrictivas, infecciones del tracto respiratorio tales como infección del tracto respiratorio superior, infección del tracto respiratorio inferior, tumores malignos y tumores benignos, enfermedades de la cavidad pleural, enfermedades vasculares pulmonares y enfermedades neonatales.

[0040] Las enfermedades del tracto urogenital incluyen nefropatía analgésica, cáncer de vejiga, cistocele (vejiga caída), enfermedad renal en etapa terminal (ERET), glomerulonefritis, glomeruloesclerosis, síndrome de Goodpasture, hematuria (sangre en la orina), síndrome urémico hemolítico, nefropatía de inmunoglobulina A (IgA), impotencia/disfunción eréctil, cistitis intersticial, cáncer de riñón, piedras en el riñón, trasplante de riñón, infertilidad por factor masculino, síndrome nefrótico, vejiga neurogénica, enfermedad de Peyronie y enfermedad poliquística renal.

[0041] Se describen enfermedades adicionales que pueden tratarse con los compuestos de la presente invención en el documento US 2011/0212882 A1.

[0042] Preferiblemente, los tripéptidos y medicamentos que contienen tripéptidos se usan para el tratamiento
60 y/o la profilaxis de enfermedades inflamatorias de la piel, de enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, de enfermedades inflamatorias de los vasos (sanguíneos), de inflamación autoinmunitaria, reacciones alérgicas y/o rechazos de trasplante.

[0043] Es conocido que los péptidos en general, e incluso dipéptidos pequeños como carnosina, exhiben una
65 inestabilidad inherente (Goebel, ASB et al., Dermal Peptide Delivery Using Enhancer Molecules and Colloidal Carrier

Systems - Part I: Carnosine, Skin Pharmacology & Physiology (2012), 25, 281-287). Además, H-Lys-Pro-Val-OH (KPV) es altamente inestable y se degrada fácilmente con formación de una dicetopiperazina de lisina-prolina. Resulta una ventaja adicional de los compuestos según la invención del hecho de que no se observa degradación o se observa reducida en solución acuosa y en presencia de tejido homogeneizado.

[0044] Otra ventaja de los compuestos de la presente invención es la hidrofobia disminuida en comparación con H-Lys-(D)-Pro-Thr-OH (K(D)PT). Por tanto, los compuestos muestran una penetración mejorada de las barreras biológicas. Además, los compuestos de la presente invención son seguros y fiables para los pacientes. En particular, no pudo observarse toxicidad. Por tanto, los compuestos de la invención muestran un perfil de seguridad mejorado.

[0045] Los compuestos según la invención o composiciones/medicamentos que contienen estos pueden administrarse por vía sistémica o tópica. Preferiblemente, los compuestos o composiciones/medicamentos según la invención se administran por vía tópica, en particular en forma de cremas, pomadas, emplastos o tinturas.

[0046] En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento profiláctico" se entiende que significa en particular que los compuestos según la invención pueden administrarse antes de que aparezcan los síntomas de una enfermedad o exista el riesgo de una enfermedad.

[0047] Los compuestos según la invención pueden administrarse según procedimientos convencionales, por ejemplo por vía oral, dérmica, intranasal, transmucosa, pulmonar, entérica, bucal, rectal, intrauretral, ótica, por inhalación, por medio de inyección, por ejemplo intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea y/o intramuscular y/o local, por ejemplo en áreas doloridas del cuerpo. La administración oral se prefiere particularmente.

[0048] Los compuestos según la invención pueden usarse en particular para la preparación de medicamentos llevándolos a una forma de dosificación adecuada junto con al menos una sustancia portadora o sustancia auxiliar, por ejemplo en forma de soluciones de inyección, gotas, zumos, jarabes, pulverizadores, suspensiones, comprimidos, parches, cápsulas, emplastos, supositorios, pomadas, cremas, lociones, geles, emulsiones, aerosoles o en forma multiparticulada, por ejemplo en forma de aglomerados o gránulos.

[0049] Las formas de dosificación farmacéutica con liberación retardada (formulación de liberación mantenida) son además preferidas para administración oral de los compuestos según la invención. Los ejemplos de formulaciones con liberación retardada son comprimidos de matriz de liberación mantenida, comprimidos multicapa cuyo recubrimiento puede construirse, por ejemplo, para ser resistente a jugos gástricos, tales como recubrimientos basados en goma laca, cápsulas de liberación mantenida o formulaciones que usan polímeros biodegradables, por ejemplo polímeros de poli(ácido láctico).

[0050] Pueden usarse sustancias auxiliares farmacéuticas fisiológicamente aceptables convencionales, elegidas preferiblemente del grupo que comprende materiales portadores, cargas, disolventes, diluyentes, agentes humectantes, emulsionantes, tintes, conservantes, agentes disgregantes, lubricantes, sales para influir en la presión osmótica, sustancias tamponadoras, aromas y/o aglutinantes para la preparación de los medicamentos.

[0051] Los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) según la presente invención pueden prepararse usando procedimientos generales de síntesis peptídica en fase sólida conocidos por el especialista. Se proporciona una descripción más detallada en la sección de Ejemplos siguiente.

[0052] Como alternativa, los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) según la presente invención pueden prepararse también en solución.

Breve descripción de los dibujos

[0053]

La Figura 1 es un diagrama que muestra el análisis de expresión génica de citocinas proinflamatorias en linfocitos T humanos primarios. Las células se activaban con PMA/Ionomicina y se trataban con PBS, α -MSH, K(D)PT y los Ejemplos 3, 8 y 9, respectivamente, a una concentración de 10^{-9} M. Se normalizan los valores a β -actina y se muestran respecto a la expresión génica en células estimuladas con PBS.

La Figura 2 es un diagrama que muestra el análisis de expresión génica de citocinas proinflamatorias en queratinocitos humanos (HaCaT). Las células se activaban con PMA/Ionomicina y se trataban con PBS, α -MSH, K(D)PT y los Ejemplos 3, 8 y 9, respectivamente, a una concentración de 10^{-9} M. Se normalizan los valores a β -actina y se muestran respecto a la expresión génica en células estimuladas con PBS.

La Figura 3 es un diagrama que muestra el análisis de expresión génica de citocinas proinflamatorias en linfocitos T de murino primarios. Las células se activaban con PMA/Ionomicina y se trataban con PBS, α -MSH, K(D)PT y los Ejemplos 3, 8 y 9, respectivamente, a una concentración de 10^{-9} M. Se normalizan los valores a β -actina y se muestran respecto a la expresión génica en células estimuladas con PBS.

La Figura 4 es un diagrama que muestra el análisis de expresión génica de citocinas proinflamatorias en linfocitos T

humanos primarios. Las células se activaban con PMA/Ionomicina y se trataban con PBS, α -MSH, K(D)PT, micofenolato de mofetilo (MMF), dexametasona y los Ejemplos 5, 7, 12 y 13, respectivamente, a una concentración de 10^{-9} M. Se normalizan los valores a β -actina y se muestran respecto a la expresión génica en células estimuladas con PBS.

- 5 La Figura 5 es un diagrama que muestra el análisis de expresión génica de citocinas proinflamatorias en queratinocitos humanos (HaCaT). Las células se activaban con PMA/Ionomicina y se trataban con PBS, α -MSH, K(D)PT, micofenolato de mofetilo (MMF), dexametasona y los Ejemplos 5, 7, 12 y 13, respectivamente, a una concentración de 10^{-9} M. Se normalizan los valores a β -actina y se muestran respecto a la expresión génica en células estimuladas con PBS.
- 10 La Figura 6 es un diagrama que muestra el análisis de expresión génica de citocinas proinflamatorias en linfocitos T de murino primarios. Las células se activaban con PMA/Ionomicina y se trataban con PBS, α -MSH, K(D)PT, micofenolato de mofetilo (MMF), dexametasona y los Ejemplos 5, 7, 12 y 13, respectivamente, a una concentración de 10^{-9} M. Se normalizan los valores a β -actina y se muestran respecto a la expresión génica en células estimuladas con PBS.

15

EJEMPLOS

[0054] A continuación se describen ejemplos detallados de la invención. En ellos, diversos símbolos y abreviaturas de reactivos tienen los siguientes significados:

20

Boc	terc-butoxicarbonilo
BTC	carbonato de bis(triclorometilo)
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	etil-diisopropilamina
25 DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
eq.	equivalentes
ESI-MS	electropulverización-espectrometría de masas
Fmoc	9-H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
30 h	hora(s)
HATU	hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio-metanaminio
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HOAc	ácido acético
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
35 m/z	relación de masa a carga
min	minuto(s)
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
PM	peso molecular
40 TA	temperatura ambiente
T	temperatura
tBu	butilo terciario
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	triisopropilsilano
45 t_R (min)	tiempo de retención de HPLC

Procedimientos analíticos

HPLC

50

[0055] Las separaciones de HPLC analíticas se efectuaron en un HPLC Abimed (D-Langenfeld) Gilson (concentración de muestra 1 mg/ml en H₂O) con una columna analítica Reprospher C18-DE (5 μ m, 50x4,6 mm) fabricada por Dr. Maisch (D-Ammerbuch). Se usó un gradiente de agua/0,1 % de ácido trifluoroacético (v/v) (eluyente A) y acetonitrilo/0,1 % de ácido trifluoroacético (v/v) (eluyente B) con un caudal de 1 ml/min (procedimiento de 10 min).

55

[0056] Se asignó la pureza de los productos basándose en las áreas de pico determinadas a $\lambda = 214$ nm.

ESI-MS

60

[0057] Se efectuó el análisis de fracciones de ESI-MS en un espectrómetro de masas Waters-Micromass (D-Eschborn) ZQ.

Síntesis de péptidos, procedimientos generales

65

Carga de resina

[0058] Se prepararon todos los péptidos por síntesis peptídica en fase sólida usando la estrategia de Fmoc/tBu, que usa CITCP (resina de cloro-(2'-cloro)tritolpoliestireno H100 33, Rapp Polymere, Tübingen, Alemania). Se sintetizaron las amidas peptídicas en resina de poliestireno de amida Rink (H100 23, Rapp).

[0059] Se equilibró la resina CITCP (capacidad 1,48 mmol/g) con DMF durante 10 min y se lavó con DMF. Se añadió una solución de 1 eq. de Fmoc-aminoácido (respecto a la carga de la resina) y 4 eq. de DIPEA en DMF a la resina y se agitó durante 120 minutos. Se filtró la resina y se lavó con DMF. Se taponó la resina con 10 eq. de metanol y 5 eq. de DIPEA en DMF y se lavó con DMF, DCM y dietiléter.

[0060] Se desprotegió la resina Rink (capacidad 0,67 mmol/g) usando piperidina al 30 % en DMF (2 x 15 min). Después de lavar con DMF, se añadió una solución de 3 eq. de Fmoc-aminoácido, 3 eq. de TBTU y 6 eq. de DIPEA en DMF. Se agitó la mezcla durante 180 minutos. Se filtró la resina y se lavó con DMF, DCM y dietiléter. Se comprobó la completitud por el ensayo de ninhidrina.

[0061] Después de la carga de resina, se estimó la densidad de carga mediante medida de la absorbancia UV. Se detectó la absorción de la especie de Fmoc-dibenzofulveno escindida a 292 nm. Las cargas de resina para todos los Fmoc-aminoácidos eran de 0,5 mmol/g, excluyendo los N-Me-aminoácidos N-Me-Thr(tBu), *terc*-butilglicina y N-Me-Val, que dieron como resultado una sustitución de aproximadamente 0,4 mmol/g.

Procedimiento para los acoplamiento

[0062] Se añadió una solución de piperidina al 30 % en DMF a la resina y se incubó la mezcla durante 5 min. Se filtró la resina y se repitió el procedimiento durante 15 min. Se filtró la resina y se lavó con DMF.

[0063] Se disolvieron los Fmoc-aminoácidos (3 eq.) con HOBt (3 eq.) en DMF. Se añadieron los reactivos de acoplamiento DIC (3 eq.) o TBTU (3 eq.) con DIPEA (6 eq.) y Fmoc-aminoácidos a la resina. Después de 180 min (DIC) o 120 min (TBTU) de tiempo de acoplamiento, se filtraron los reactivos de acoplamiento y se lavó la resina con DMF, DCM y dietiléter.

Acoplamiento de Fmoc-aminoácidos después de N-Me-aminoácidos:

[0064] Se lavó la resina con THF seco y se incubó con DIPEA (14 eq.) en THF seco durante 1-2 min. Se filtró la resina. Se disolvieron Fmoc-aminoácidos (3,5 eq.) en una solución de BTC en THF seco (68 mM). Se añadió 2,4,6-colidina (10 eq.) y se añadió la suspensión a la resina. Después de 180 minutos, se filtró la resina y se lavó con DCM, THF y DMF. Se monitorizó la completitud del acoplamiento con la prueba de cloranilo.

Acoplamiento N-terminal de Me₂-aminoácidos:

[0065] Se disolvieron Me₂-aminoácidos (3 eq.) en DMF con HOBt (3 eq.), 3 eq. de HATU y DIPEA (6 eq.). Se añadió la solución a la resina y se agitó durante 2 horas. Se filtró la resina y se lavó con DMF, DCM y dietiléter.

Escisión

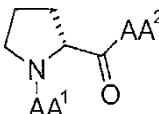
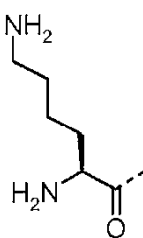
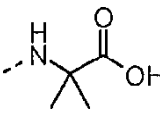
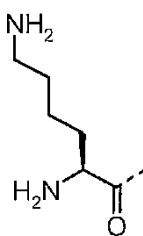
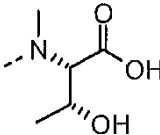
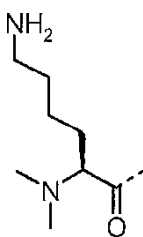
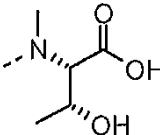
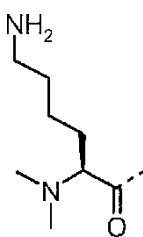
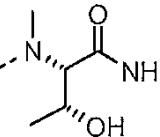
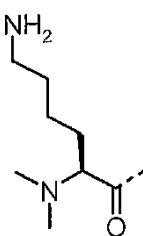
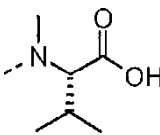
[0066] Se escindieron los péptidos de la resina y se desprotegió la cadena lateral con ácido trifluoroacético/TIS/agua (92,5/5/2,5) durante 3 horas. Se evaporó el disolvente a vacío. Se trató el aceite con dietiléter para precipitar y se lavó dos veces con dietiléter. Se disolvieron los péptidos en alcohol *terc*-butílico/agua (80/20) por sonicación y se liofilizaron. Para intercambiar el contraión, se disolvieron los péptidos en ácido acético (100 mg en 5 ml) y se sonicaron durante 1 h. Se precipitaron los péptidos con dietiléter, se decantaron, se disolvieron en alcohol *terc*-butílico por sonicación y se liofilizaron.

[0067] Todos los Fmoc-aminoácidos, grupos protectores de cadena lateral estándar: tBu (Thr) y Boc (Lys, Orn, Dab).

[0068] Los N^q,N^q-dimetilaminoácidos pueden sintetizarse como se describe en García-López, MT et al., Archiv der Pharmazie (1989), 322, 145-152.

[0069] Los compuestos obtenidos según la presente invención se resumen en las Tablas 1 y 2 siguientes.

Tabla 1:

 x HOAc					
No,	AA ¹	AA ²	HPLC t _R (min)	MS	
				PM (calc.) de base libre	[M+H ⁺] (encontrado)
1			3,91	328,41	329
2			3,48	358,44	359
3			3,97	386,50	387
4			3,19	385,51	386
5			3,95	384,52	385
6			4,05	371,48	372

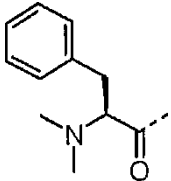
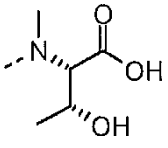
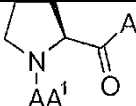
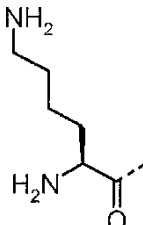
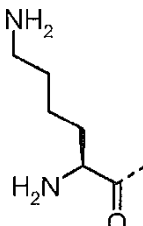
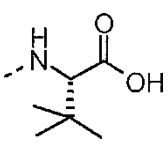
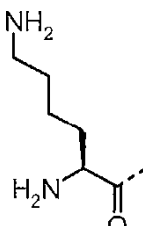
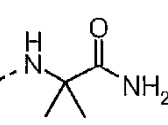
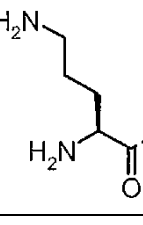
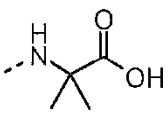
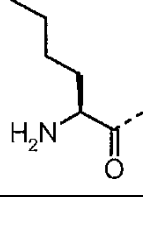
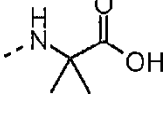
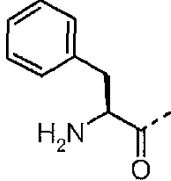
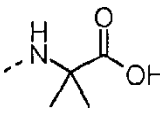
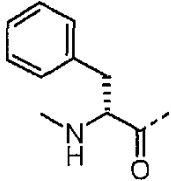
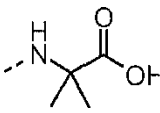
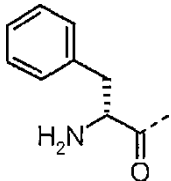
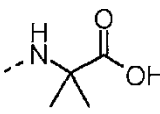
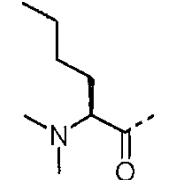
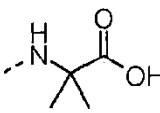
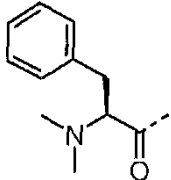
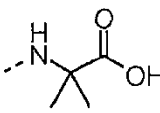
7			4,11	405,50	406
---	---	---	------	--------	-----

Tabla 2:

 x HOAc					
No,	AA ¹	AA ²	HPLC t _R (min)	MS	
				PM (calc.) de base libre	[M+H ⁺] (encontrado)
8			3,28	328,41	329
9			3,59	356,47	357
10			3,28	327,43	328
11			3,39	314,39	315
12			3,90	313,40	314

13			3,98	347,42	348
14			3,33	361,44	362
15			3,56	347,42	348
16			3,23	341,45	342
17			3,30	375,47	376

ENSAYOS BIOLÓGICOS

A. Secreción de citocina a nivel de proteína y expresión génica

5

[0070] Se aislaron linfocitos T primarios de sangre periférica de voluntarios sanos y de órganos linfáticos secundarios de ratones C57BL/6 no infectados, respectivamente. Se estimularon las células con 12-miristato-13 acetato de forbol (PMA)/Ionomicina e interferón gamma (IFN- γ), respectivamente, durante 48 h para activar las células. Las células activadas liberan citocinas proinflamatorias. En paralelo, se activó una línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT) con PMA/Ionomicina e IFN- γ , respectivamente, también. Es conocido que el tratamiento con PMA/Ionomicina e IFN- γ , respectivamente, daba como resultado una liberación aumentada de las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ o TNF- α . Al mismo tiempo, se inhibía la liberación de IL-10 antiinflamatoria. Dos días después de la adición de PMA/Ionomicina e IFN- γ , respectivamente, se determinó la inducción de la secreción de IL-1 en el sobrenadante para probar que las células están activadas. Después de esto,

10 se trataron las células con diferentes dosis (10^{-7} M, 10^{-9} M y 10^{-11} M) de los tripéptidos, PBS (control negativo) y hormona estimulante de alfa-melanocitos (α -MSH), K(D)PT, micofenolato de mofetilo (MMF) y dexametasona, respectivamente, como controles positivos. Se determinaron las propiedades antiinflamatorias de los tripéptidos 48 h y 72 h después de la estimulación. Se usó un análisis FACS basado en un sistema 13-plexado para mostrar la secreción reducida de citocinas proinflamatorias en el sobrenadante. Los datos de IL-1, IL-2, IL-6, IL-12p70, IL-17,

15 IFN- γ y TNF- α se consideran los más relevantes. Por tanto, el análisis de las propiedades antiinflamatorias de los tripéptidos se basa preferiblemente en los resultados obtenidos para estos analitos. Además, estos resultados se verificaron mediante la preparación de ARNm y el posterior análisis de RT-qPCR. Usando este procedimiento, se determinó la expresión génica de marcadores proinflamatorios como IL-6, IL-17, IFN- γ y TNF- α .

25 **[0071]** En un primer experimento, se mostró que especialmente los Ejemplos 3, 8 y 9 se caracterizan por mostrar efectos antiinflamatorios más fuertes en comparación con el control positivo K(D)PT. Eran capaces de reducir

la secreción de citocinas proinflamatorias en linfocitos T de murino y humanos primarios activados, así como en queratinocitos humanos, más eficazmente. Todos los tripéptidos mencionados anteriormente inhibían la secreción de al menos tres de las citocinas proinflamatorias analizadas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ o TNF- α) en una mayor medida que el control positivo K(D)PT. Además, se observó una inducción de la secreción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en queratinocitos (Tablas 3-5). El tratamiento con los Ejemplos 1 y 2 dio como resultado una secreción disminuida de citocinas proinflamatorias en queratinocitos.

[0072] Los resultados obtenidos determinando los datos de citocinas de los sobrenadantes se confirmaron por el nivel de expresión génica para los Ejemplos 3, 8 y 9. Los experimentos de RT-qPCR revelaron actividades inmunomoduladoras de los Ejemplos 3 y 8 comparables a K(D)PT, que servía como control positivo. La expresión de ARNm de IL-6, IL-17, IFN- γ y TNF- α se reducía en linfocitos T humanos y de murino después de la estimulación con los compuestos. Además, el tratamiento con los Ejemplos 3, 8 y 9 estaba asociado a la reducción de la expresión génica de citocinas proinflamatorias en queratinocitos HaCaT (Figuras 1-3).

[0073] En un segundo experimento, se mostró que el Ejemplo 12 era capaz de reducir la expresión de citocinas proinflamatorias en los tres modelos celulares. La actividad era comparable con la de K(D)PT. El tratamiento con los Ejemplos 6 y 13 dio como resultado una expresión disminuida de citocinas proinflamatorias en linfocitos T humanos y queratinocitos. Para los Ejemplos 5 y 7, se vieron efectos inmunomoduladores en linfocitos T humanos y de murino (Tablas 6-8).

[0074] Se determinó la expresión de genes que codifican marcadores proinflamatorios como IL-6, IL-17, IFN- γ y TNF- α como se describe anteriormente. Se mostró que la estimulación con el Ejemplo 13 daba como resultado una expresión reducida de marcadores proinflamatorios en todas las células estimuladas (Figuras 4-6).

[0075] En un tercer experimento, se estimularon linfocitos T y células HaCaT de murino y humanos con PMA/Ionomicina y se trataron con los Ejemplos 14, 15, 16 y 17 at 10^{-7} M, 10^{-9} M y 10^{-11} M. Se valoraron las concentraciones de citocinas (IFN- γ , IL-17 e IL-10 para linfocitos T e IFN- γ para HaCat) en los sobrenadantes usando la tecnología Luminex. Se determinó la expresión de genes que codifican IL-1 β , IL-6 y TNF- α . El tratamiento con los Ejemplos 14, 15, 16 y 17 dio como resultado una expresión reducida de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α a nivel de ARNm en todos los tipos celulares y a todas las concentraciones ensayadas. Además, la concentración de las citocinas proinflamatorias IFN- γ e IL-17 se redujo en los sobrenadantes, mientras que la concentración de la citocina antiinflamatoria IL-10 aumentó. De nuevo, esto se observó para todas las concentraciones ensayadas.

[0076] Se compararon los efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores de los ejemplos seleccionados de la presente invención con inmunosupresores comunes. Por tanto, se estimularon células activadas con PMA/Ionomicina e IFN- γ , respectivamente, con MMF o dexametasona. Después de la estimulación, se analizó la secreción de citocinas proinflamatorias a nivel de proteína y gen (Tabla 9 y Figuras 4-6). Sorprendentemente, se encontró que el Ejemplo 13 mostraba una actividad inmunomoduladora mayor que la observada para MMF.

[0077] Para el ensayo biológico, se eligieron dos líneas celulares humanas de diferente origen para permitir la traducción de los resultados obtenidos. Una célula HaCaT es un tipo celular perteneciente a una línea de queratinocitos humanos inmortales usada en investigación científica. Su uso en investigación permite la caracterización de queratinocitos humanos usando un modelo que es reproducible y representa una línea de células epiteliales humanas.

En contraposición, los linfocitos T humanos (linfocitos T) son un tipo de linfocito (en sí un tipo de glóbulo blanco) que desempeñan un papel principal en la inflamación/inmunidad mediada por células.

Tabla 3: Expresión de citocinas en linfocitos T primarios después de activación con PMA/Ionimicina e IFN- γ , respectivamente, y estimulación con los Ejemplos 1-3, 8 y 9 (concentración: 10^{-9} M)

linfocitos T humanos primarios estimulados con PBS, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-9	IL-6	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	95,32	339,39	2219,03	643,96	45,25	138,06	137,97	102,88	192,2	918,8	233,5	156,14	269,73
α -MSH	74,71	233,71	2258,05	166,83	26,63	93,72	103,97	154,89	100,99	584,13	127,96	158,58	123,27
K(D)PT	80,48	268,37	0	435,34	0	102,2	92,39	126,13	114,67	610,05	160,25	136,29	182,45
Ejemplo 1	77,6	398,01	2227,62	545,22	275,55	131,69	85,95	107,07	223,67	634,2	203,95	198,06	295,13
Ejemplo 2	90,3	305,62	2242,06	985,16	310,87	116,55	84,38	253,29	226,23	0	211,85	151,33	238,4
Ejemplo 8	67,68	253,83	2211,56	237,8	61,66	93,72	72,63	114,3	94,18	0	132,37	117,83	116,91
Ejemplo 9	91,02	398,01	2258,05	298,65	68,35	93,72	98,42	210,15	210,63	1111,58	258,09	151,99	253,52
Ejemplo 3	88,14	233,69	2185,25	317,62	42,46	111,16	61,21	47,15	103,5	450,32	190,58	161,66	153,86

linfocitos T humanos primarios estimulados con PMA/Ionimicina, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-9	IL-6	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	821,24	22302,1	23424,4	12000	376,68	148,81	1641,55	4620,87	1717	3585,27	3600	232,58	2391,49
α -MSH	462,62	69689,2	24400,4	12000	145,89	187,5	1542,01	4311,06	1161,04	1049,41	3600	200,9	2836,14
K(D)PT	944,87	69689,2	24079	12000	173,34	162,4	2058,24	4936,79	1703,5	1854,29	3600	235,78	3116,43
Ejemplo 1	398,98	11244,1	24324,9	12000	204,84	159,86	1868,8	3032,66	925,71	2516,08	3600	209,61	2443,34
Ejemplo 2	760,63	69689,2	24128,2	12000	325,76	142,93	1533,99	3938,15	1413,17	2726,77	3600	239,02	3476,92
Ejemplo 8	475,53	69689,2	24669,3	12000	215,28	183,92	2131,81	4027,17	867,26	1774,79	3600	204,5	2943,03
Ejemplo 9	827	1331,79	24198	12000	114,01	157,98	1759,4	4514,53	822,84	3589,9	3600	236,59	2531,57
Ejemplo 3	400,36	69689,2	24185,6	12000	234,91	166,27	1965,67	3588,06	766,66	1182,71	3600	237,39	2796,62

linfocitos T humanos primarios estimulados con IFN- γ , concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-9	IL-6	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	107,38	595,78	0	809,25	222,07	121,11	130,74	86,19	1973,85		337,28	205,22	298,66
α -MSH	59,46	229	0	0	145,89	90,3	70,19	109,15	727,17		155,15	136,29	125,8
K(D)PT	72,09	335,73	22747,7	79,24	249,7	93,74	93,02	169,54	895,95		178,65	184,31	204,05
Ejemplo 1	82,57	296,42	21389,5	515,89	112,65	111,14	131,33	164,32	945,16		230,57	180,24	234,65
Ejemplo 2	97,39	314,88	21970,6	740,3	177,72	106,37	97,68	146,79	804,93		188,29	116,26	168,9
Ejemplo 8	75,98	277,33	22151,4	199,66	91,09	88,6	95,92	106,23	688,46		171,54	117,31	118,21
Ejemplo 9	79,89	363,19	0	164,47	52,14	97,68	90,63	154,92	704,53		178,78	141,97	184,81
Ejemplo 3	75,98	191,46	0	144,56	95,22	103,58	65,54	87,89	687,61		180,13	132,38	110,07

Los ensayos en que la concentración de citocina en el sobrenadante estaba por debajo del límite de detección se marcan en gris. Las celdas rayadas en gris indicaban ensayos en que la cuantificación de citocina se compromete debido al estimulante.

Tabla 4: Expresión de citocinas en una línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT) después de activación con PMA/Ionomicina e IFN- γ , respectivamente, y estimulación con los Ejemplos 1-3, 8 y 9 (concentración: 10^{-9} M)

HaCaT estimuladas con PBS, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-9	IL-6	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	91,64	381,59	12968,62	524,07	343,72	126,98	179,5	124,72	1910,23	728,9	228,16	87,68	817,55
α -MSH	65,47	271,66	9847,56	251,78	150,8	124,69	76,75	107,72	0	365,47	97,16	56,84	544,96
K(D)PT	60,72	228,99	10982,2	201,9	201,01	132,74	72,95	125,52	0	395,55	90,41	85,48	618,22
Ejemplo 1	64,17	224,9	18087,5	87,98	181,61	112,82	77,53	166,47	1881,61	373,53	87,84	85,92	562,61
Ejemplo 2	69,36	251,25	14446,9	177,85	189,12	139,65	75,53	151,26	1864,02	397,45	84,84	90,8	569,9
Ejemplo 8	75,26	227,07	17754,7	194,17	191,65	83,09	69,88	104,27	0	319,39	78,12	62,6	627,77
Ejemplo 9	56,83	232,45	15532,1	188,4	132,61	121,47	81,84	177,02	1914,52	330,74	91,82	82,9	605,66
Ejemplo 3	56,84	228,09	16936,8	163,98	154,73	130,34	85,65	46,71	1910,22	389,43	74,7	71,68	585,63

HaCaT estimuladas con PMA/Ionomicina, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-9	IL-6	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	108,92	458,36	18106,9	505,37	330,93	152,65	198,42	217,92	1879,36	1420,36	155,44	99,96	774,54
α -MSH	55,34	143,16	9995,76	98,72	131,91	105,55	113,54	111,19	0	617,26	103,98	72,6	338,9
K(D)PT	62,95	212,49	10698,1	179,25	157,36	147,79	130,87	84,32	0	736,13	116,88	70,92	487,56
Ejemplo 1	49,03	118,79	8956,12	184,58	141,02	108,97	131,98	48,13	0	531	77,12	78,12	449,68
Ejemplo 2	69,36	204,23	14806,4	130,08	129,65	104,14	129,99	97,55	0	704,33	62,15	58,48	369,01
Ejemplo 8	53,79	190,71	12874,7	49,76	157,68	124,07	120,62	42,93	0	642,47	67,78	76,85	457,23
Ejemplo 9	65,15	208,59	17795	113,83	162,04	129,3	131,98	153,24	0	738,89	89,8	57,66	446,55
Ejemplo 3	61,45	197,77	17177,7	65,83	150,8	144,76	128,88	187,91	0	720,85	88,62	60,13	397,57

HaCaT estimuladas con IFN- γ , concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-9	IL-6	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	87,68	392,3	18326,9	301,9	252,26	102,27	1030,02	57,84	1987,25		215,66	103,92	899,01
α -MSH	55,34	238,96	0	119,87	184,1	83,5	750,84	82,71	0		67,75	70,08	598,13
K(D)PT	59,62	257,77	0	129,65	166,92	83,09	728,31	73,19	0		100,07	84,61	664,43
Ejemplo 1	57,99	251,36	18014,5	95,81	156,74	96,1	704,01	107,72	1872,11		101,29	88,93	612,41
Ejemplo 2	61,18	265,46	0	96,34	109,73	104,08	641,89	129,2	1904,09		79,97	71,76	629,16
Ejemplo 8	51,17	245,46	17253,8	111,78	159,55	98,35	633,6	102,56	1789,21		92,08	84,09	592,65
Ejemplo 9	54,12	245,47	18682,2	108,74	121,18	108,39	630,85	156,25	1806,39		86,98	79,04	661,44
Ejemplo 3	58,79	239,94	19411	130,32	111,33	98,44	606,47	107,71	1843,69		100,94	80,39	642,41

Los ensayos en que la concentración de citocina en el sobrenadante estaba por debajo del límite de detección se marcan en gris.
 Las celdas rayadas en gris indicaban ensayos en que la cuantificación de citocina se compromete debido al estimulante. Los valores para IL-22 e IL-12p70 se excluyeron de la valoración final de actividad antiinflamatoria.

Tabla 5: Expresión de citocinas en linfocitos T de murino primarios después de activación con PMA/Ionomicina e IFN γ , respectivamente, y estimulación con los Ejemplos 1-3, 8 y 9 (concentración: 10⁻⁹ M)

linfocitos T de murino primarios estimulados con PBS, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-21	IL-6	IL-10	IL-27	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS		0	0	115,05	0	0	33,87	19,11	127,16	0	0	0	29,47
α -MSH		0	0	0	0	0	16,44	55,47	0	0	0	0	0
K(D)PT		0	0	0	0	0	27,81	64,53	25,93	0	0	0	16,26
Ejemplo 1		53,09	0	0	0	0	0	110,76	379,78	0	0	0	0
Ejemplo 2		36,6	0	138,15	45,71	0	0	0	0	2375,02	0	0	0
Ejemplo 8		0	0	0	0	0	14,65	68,32	881,79	0	0	0	0
Ejemplo 9		0	0	0	10,13	0	14,65	0	727,44	0	0	0	0
Ejemplo 3		14,89	0	0	0	0	0	40,84	268,47	0	0	0	0

linfocitos T de murino primarios estimulados con PMA/Ionomicina, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2*	IL-5	IL-21	IL-6	IL-10	IL-27	IFN- γ *	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	4162,87	70,12	630,86	3133,92	370,79	0	273,3	189,43	280,91	4397,44	520,47	71,79	596,87
α -MSH	3966,69	28,92	356,41	849,44	262,76	0	114,47	276,08	0	0	535,51	0	311,07
K(D)PT	4314,15	30,27	333,4	1288,92	280,87	0	140,97	188,56	99,7	712,81	515,54	71,79	423,67
Ejemplo 1	3898,42	60,61	526,42	1354,76	292,17	0	239,47	145,26	426,79	0	535,51	0	459,99
Ejemplo 2	4703,82	0	670,15	744,58	350,49	0	338,28	155,42	778,4	0	628,15	129,47	649,14
Ejemplo 8	5324,44	0	550,32	1576,19	225,53	0	283,79	230,31	226,79	0	598,72	86	511,02
Ejemplo 9	6704,42	0	571,55	1958,61	281,76	0	276,29	332,03	368,78	4197,73	590,89	120,33	547,87
Ejemplo 3	6629,52	49,31	554,05	3973,68	377	0	218,74	270,65	0	4716,4	544,83	82,28	535,72

linfocitos T de murino primarios estimulados con IFN- γ , concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-21	IL-6	IL-10	IL-27	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	0	62,92	0	0	86,8	0	0	0	504,57		10,29	0	0
α -MSH	0	14,89	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
K(D)PT	0	26,6	0	0	0	0	0	0	209,12		0	0	0
Ejemplo 1	0	0	0	0	0	0	6,51	0	179,72		0	0	10,81
Ejemplo 2	0	22,78	8,52	0	72,11	0	23,14	72,95	1234,48		0	0	0
Ejemplo 8	84,63	47,84	0	0	72,14	0	29,32	59,11	404,38		0	0	0
Ejemplo 9	0	73,28	0	0	0	0	16,44	0	99,7		0	0	0
Ejemplo 3	0	0	0	0	0	0	0	68,31	555,75		0	0	0

Los ensayos en que la concentración de citocina en el sobrenadante estaba por debajo del límite de detección se marcan en gris. Las celdas rayadas en gris indicaban ensayos en que la cuantificación de citocina se compromete debido al estimulante.

*Los valores para IL-2 e IFN- γ estaban por encima de 20.000 pg/ml en los sobrenadantes después de la activación con PMA/Ionomicina. Por tanto, se preparó una dilución de 1:10 de los sobrenadantes para estos ensayos.

Tabla 6: Expresión de citocinas en linfocitos T humanos primarios después de activación con PMA/Ionomicina e IFN- γ , respectivamente, y estimulación con los Ejemplos 4-7 y 10-13 (concentración: 10^{-9} M)

linfocitos T humanos primarios estimulados con PBS, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12p70	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0	558,41	268,55	302,37	123,94	95,58	0	198,34	285,36	186,54	164,77	433,48	113,92
α -MSH	0	0	139,74	139,68	164,01	34,99	0	117,88	185,71	72,42	14,37	0	59,06
K(D)PT	0	0	127,21	0	159,09	0	0	109,89	172,66	0	0	147,97	65,47
Ejemplo 10	0	0	0	0	48,86	23,18	0	216,7	0	0	0	0	21,65
Ejemplo 11	0	505,68	0	0	0	10,84	0	172,14	187,86	121,69	0	0	52,55
Ejemplo 12	0	0	104,68	0	189,65	0	0	91,86	0	0	0	0	41,38
Ejemplo 13	0	0	65,17	115,73	147,54	10,84	0	113,86	0	73,19	0	0	50,36
Ejemplo 4	0	0	0	0	0	3,71	0	226,2	0	60,49	0	122,89	0
Ejemplo 5	0	0	0	0	119,04	6,74	0	94,11	35,75	0	0	0	0
Ejemplo 6	0	0	113,52	114,93	92,62	8,15	0	105,53	0	0	12,74	107,12	28,11
Ejemplo 7	0	69,17	95,69	126,59	121,25	13,42	0	122,64	0	0	8,58	154,31	51,46

linfocitos T humanos primarios estimulados con PMA/Ionomicina, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12p70	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0	20668,73	3370,25	10549,5	802,68	767,48	0	2981,92	1864,96	112,94	506,89	985,31	8233,81
α -MSH	0	10814,35	1660,92	2307,5	977,83	264,59	0	1241,17	1065,69	70,32	278,92	530,55	3346,46
K(D)PT	0	12070,42	1808,01	3486,84	877,54	332,07	0	1535,49	1158,74	41,83	379,39	594,38	3998,01
Ejemplo 10	0	11538,53	2234,39	5107,74	729,43	461,98	0	1255,58	1183,46	179,62	416,25	878,53	4132,03
Ejemplo 11	0	9554,27	3306,09	3920,52	563,89	380,3	0	1474,06	1258,74	112,94	525,15	677,32	2209,22
Ejemplo 12	0	9454,26	1355,07	2751,28	992,02	286,89	0	1046,79	1026,08	73,38	328,24	548,85	2985,72
Ejemplo 13	0	7456,27	1069,51	2092,22	872,88	248,66	0	1185,87	1081,09	0	354,06	558,46	2706,11
Ejemplo 4	0	5384,11	1356,78	1227,93	417,95	239,43	0	1280	1081,09	239,37	473,23	689,99	4112,99
Ejemplo 5	0	8770,62	1164,75	4369,09	789,38	193,58	0	1051,51	912,49	92,43	392,66	748	2187,46
Ejemplo 6	0	7597,87	1388,88	2005,81	999,32	238,28	0	1194,58	1050,19	87,24	312,5	533,57	2638,52
Ejemplo 7	0	6989,26	2611,96	1657,58	842,93	263,36	0	1100,07	991,61	72,07	357,88	508,96	2062,57

linfocitos T humanos primarios estimulados con IFN- α , concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12p70	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0		120,31	178,78	0	15,92	0	104,38	187,86	134,71	117,9	79,74	73,01
α -MSH	0		0	0	43,9	5,27	0	64,54	0	60,49	0	0	18,85
K(D)PT	0		0	0	33,21	9,51	0	58,47	0	0	0	0	0
Ejemplo 10	0		250,1	231,83	0	0	0	105,21	162,81	160,97	0	139,49	0
Ejemplo 11	0		0	212,98	50,11	8,15	0	108,08	180,41	0	83,3	0	52,55
Ejemplo 12	0		0	0	84,25	7,67	0	60,44	0	0	0	44,77	41,38
Ejemplo 13	0		81,59	187,16	0	0	0	60,51	0	0	15,32	162,75	0
Ejemplo 4	0		162,73	326,11	75,72	10,84	0	180,43	212,64	176,6	27,34	366,09	103,24
Ejemplo 5	0		26,44	0	61	5,56	0	42,52	29,25	78,18	0	0	12,52
Ejemplo 6	0		36,76	0	51,86	0	0	45,83	46,95	76,04	0	0	17,44
Ejemplo 7	0		0	0	69,21	0	0	56,38	59,7	83,34	0	0	0

Los ensayos en que la concentración de citocina en el sobrenadante estaba por debajo del límite de detección se marcan en gris. Las celdas rayadas en gris indicaban ensayos en que la cuantificación de citocina se compromete debido al estimulante.

Tabla 7: Expresión de citocinas en una línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT) después de activación con PMA/Ionomicina e IFN- γ , respectivamente, y estimulación con los Ejemplos 4-7 y 10-13 (concentración: 10^{-9} M)

HaCaT estimuladas con PBS, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12p70	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0	391,65	45,41	233,68	32,84	18,84	0	182,52	1910,23	229,6	51,29	195,08	38,87
α -MSH	0	0	0	0	39,54	9,51	0	15,22	0	118,52	0	0	0
K(D)PT	0	99,65	0	0	31,43	5,27	0	78,34	0	144,86	0	65,11	9,34
Ejemplo 10	0	469,17	230,84	0	0	5,28	0	125,38	1864,02	218,04	0	170,16	0
Ejemplo 11	0	0	0	0	43,56	1,97	0	42,94	0	99,64	0	0	0
Ejemplo 12	0	0	0	0	69,45	4,96	0	56,87	193,75	0	0	0	5,55
Ejemplo 13	0	0	0	14,24	74,67	0	0	74,11	1948,04	132,37	0	17,16	6,94
Ejemplo 4	0	0	12,85	18,85	61,87	2,87	0	80,55	123,68	109,04	0	0	0
Ejemplo 5	0	0	18,83	149,51	89,86	28,51	0	218,63	0	152,8	133,49	0	0
Ejemplo 6	0	0	26,72	0	57,95	0	0	52,48	0	91,99	0	25,45	8,21
Ejemplo 7	0	0	0	180,91	0	0	0	119,59	1910,22	0	113,28	181,03	21,66

HaCaT estimuladas con PMA/Ionomicina, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12p70	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0	109,28	101,48	172,29	78,59	14,7	0	422,8	1879,36	235,96	71,04	162,79	83,03
α -MSH	0	0	0	0	93,2	0	0	179,03	0	113,12	0	0	0
K(D)PT	0	0	0	0	118,77	0	0	282,85	0	129,6	0	0	0
Ejemplo 10	0	327,78	45,41	189,17	34,84	14,67	0	315,82	0	0	0	251,13	53,5
Ejemplo 11	0	57,58	0	19,32	87,41	0	0	207,76	0	0	0	0	0
Ejemplo 12	0	22,77	25,98	0	86,04	0	0	158,45	0	0	0	0	0
Ejemplo 13	0	0	21,33	0	41,86	0	0	216,69	0	91,99	0	0	0
Ejemplo 4	0	39,23	28,83	0	97,56	0	0	225,53	0	0	16,77	0	3,93
Ejemplo 5	0	199,65	95,44	145,65	59,49	0	0	379,04	0	168,7	1,93	104,98	27,45
Ejemplo 6	0	0	21,52	16,53	64,03	3,71	0	248,33	0	0	0	62,07	5,37
Ejemplo 7	0	450,42	209,12	218,82	64,01	14,57	0	359,17	1877,03	112,94	88,67	0	0

HaCaT estimuladas con IFN- γ , concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12p70	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0		196,73	263,44	43,65	18,37	0	386,69	1987,25	176,06	115,61	177,43	148,14
α -MSH	0		95,44	0	0	0	0	202,37	0	0	0	0	45,91
K(D)PT	0		112,82	131,59	0	0	0	238,12	0	52,4	0	0	50,44
Ejemplo 10	0		189,1	0	0	0	0	346,73	1904,09	183,12	88,64	0	0
Ejemplo 11	0		0	0	0	0	0	265,29	989,21	0	0	31,54	0
Ejemplo 12	0		56,13	0	0	0	0	297,09	195,68	69,91	0	9,31	0
Ejemplo 13	0		34,2	0	7,59	0	0	255,5	0	76,13	0	0	0
Ejemplo 4	0		13,16	0	0	0	0	224,07	0	0	0	0	0
Ejemplo 5	0		0	0	41,86	0	0	415,82	1974,31	0	0	0	0
Ejemplo 6	0		0	17,47	0	0	0	202,37	1872,11	0	0	0	0
Ejemplo 7	0		202,45	267,78	0	14,88	0	470,44	1843,69	0	0	109,65	0

Los ensayos en que la concentración de citocina en el sobrenadante estaba por debajo del límite de detección se marcan en gris. Las celdas rayadas en gris indicaban ensayos en que la cuantificación de citocina se compromete debido al estimulante.

Tabla 8: Expresión de citocinas en linfocitos T de murino primarios después de la activación con PMA/Ionomicina e IFN γ , respectivamente, y estimulación con los Ejemplos 4-7 y 10-13 (concentración: 10⁻⁹ M)

linfocitos T de murino primarios estimulados con PBS, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-21	IL-6	IL-10	IL-27	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	0	97,92	91,09	248,08	440,16	275,49	214,22	843,73	117,28	4267,72	185,09	174,31	65,48
α -MSH	0	58,5	72,14	105,75	281,14	0	96,88	1157,87	77,41	0	106,1	62,93	0
K(D)PT	0	60,41	78,32	124,13	373,93	0	124	1039,39	87,48	0	77,74	71,69	0
Ejemplo 10	0	66,84	71,47	132,67	229,8	0	177,95	923,65	0	0	77,08	65,63	0
Ejemplo 11	0	75,71	66,43	204,62	459,03	0	172,33	905,76	141,82	8321,6	0	0	0
Ejemplo 12	0	61,52	76,71	189,72	331,87	69,64	223,98	872,36	71,85	0	74,9	32,24	0
Ejemplo 13	0	64,4	0	173,84	401,21	0	168,6	829,52	302,6	5058,59	62,22	25,55	0
Ejemplo 4	0	78,5	84,16	147,3	377,16	330,42	189,26	1006,65	329,85	2456,98	18,91	119,19	0
Ejemplo 5	0	56,42	27,66	151,25	209,32	13,71	117,95	1311,94	81,64	232,8	32,89	53,6	0
Ejemplo 6	0	106,27	16,55	204,71	407,29	0	170,46	1391,3	108,06	546,71	0	39,23	0
Ejemplo 7	0	62,38	15,86	137,05	317,47	0	129,26	1283,71	61,43	0	53,67	60,56	0

linfocitos T de murino primarios estimulados con PMA/Ionomicina, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-21	IL-6	IL-10	IL-27	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	28,32	394,58	637,02	478,56	473,93	112,39	310,34	920,36	276,49	10860,7	162,21	142,94	307,43
α -MSH	0	217,32	143,37	163,19	215,44	0	174,22	1250,21	104,52	1458,12	77,76	91,65	29,47
K(D)PT	0	175,59	90,3	152,69	238,08	0	201,87	1133,29	126,71	2117,29	49,63	72,07	70,93
Ejemplo 10	0	173,61	44,47	179,75	267,52	0	164,16	1182,68	8,48	2377,98	33,37	56,84	86,12
Ejemplo 11	0	178,78	94,31	261,53	513,39	0	333,86	1302,16	99,05	2756,75	86,61	117,11	244,88
Ejemplo 12	0	167,79	57,07	98,57	242,24	0	116,16	1255,25	80,09	1298,02	50,73	90,14	79,1
Ejemplo 13	0	329,99	111,64	260,49	452,71	432,64	404,54	1267,4	387,94	8109,91	69,4	135,41	0
Ejemplo 4	0	196,76	48,93	292,52	465,44	987,02	245,96	1383,24	80,01	3234,33	62,85	123,15	391,98
Ejemplo 5	0	178,79	29,38	112,62	246,42	67,28	189,2	1233,45	51,58	2075,42	29,15	81,4	0
Ejemplo 6	0	486,85	85,67	218,69	380,37	470,65	237,95	988,64	95,51	8164,35	72,81	164,69	200,32
Ejemplo 7	0	154,26	71,09	99,71	246,42	0	184,98	1233,22	90,15	1946,21	40,87	99,12	67,92

Linfocitos T de murino primarios estimulados con IFN- γ , concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-21	IL-6	IL-10	IL-27	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	0	159,07	75,55	163,26	452,71	41,32	266,16	867,48	282,91		75,69	195,06	154,59
α -MSH	0	88,22	50,6	96,1	220,39	0	133,9	1117,07	104,04		36,8	20,56	55,11
K(D)PT	0	93,77	48,13	98,22	271,81	0	144,97	1061	0		34,84	85,32	88,84
Ejemplo 10	0	77,81	57,35	93,19	238,38	0	139,83	2024,06	1,29		32,42	81,11	0
Ejemplo 11	0	100,08	31,59	208,9	531,87	263,02	193,06	1383,43	42,99		19,71	53,65	39,84
Ejemplo 12	0	86,08	42,98	88,9	221,57	40,2	110,7	1130,01	12,5		31,88	34,22	72,21
Ejemplo 13	0	82,68	334,1	237,05	342,32	0	220,06	968,94	151,6		52,48	0	26,88
Ejemplo 4	0	100,01	114,68	206,76	486,86	814,33	235,86	1250,21	138,81		47,36	0	92,71
Ejemplo 5	0	49,65	32,03	89,76	263,27	0	127,92	1359,92	20,07		24,23	47,55	97,22
Ejemplo 6	0	95,15	73,27	181,25	517,47	251,06	223,98	1782,7	0		40,87	156,84	189,88
Ejemplo 7	0	88,23	50,37	98,22	265,4	0	123,98	1199,53	0		25,58	40,87	84,26

Los ensayos en que la concentración de citocina en el sobrenadante estaba por debajo del límite de detección se marcan en gris. Las celdas rayadas en gris indicaban ensayos en que la cuantificación de citocina se compromete debido al estimulante.

Tabla 9: Expresión de citocinas en células de murino y humanas después de activación con PMA/Ionomicina e IFN- γ , respectivamente, y estimulación con control negativo (PBS) y α -MSH, K(D)PT, MMF y dexametasona (concentración: 10^{-9} M)

linfocitos T de murino primarios estimulados con PBS, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-21	IL-6	IL-10	IL-27	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	0	97,92	91,09	248,08	440,16	275,49	214,22	843,73	117,28	4267,72	185,09	174,31	65,48
α -MSH	0	58,5	72,14	105,75	281,14	0	96,88	1157,87	77,41	0	106,1	62,93	0
K(D)PT	0	60,41	78,32	124,13	373,93	0	124	1039,39	87,48	0	77,74	71,69	0
MMF	0	62,31	90,45	100,77	337,89	0	90,56	745,12	80,11	0	88,47	61,12	0
Dexametasona	0	50,19	69,18	98,48	249,8	0	88,47	586,12	84,69	0	67,18	64,23	0

linfocitos T de murino primarios estimulados con PMA/Ionomicina, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-21	IL-6	IL-10	IL-27	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	28,32	394,58	637,02	478,56	473,93	112,39	310,34	920,36	276,49	10860,7	162,21	142,94	307,43
α -MSH	0	217,32	143,37	163,19	215,44	0	174,22	1250,21	104,52	1458,12	77,76	91,65	29,47
K(D)PT	0	175,59	90,3	152,69	238,08	0	201,87	1133,29	126,71	2117,29	49,63	72,07	70,93
MMF	0	158,59	111,98	109,88	200,98	0	169,84	995,6	102,96	1808,99	50,14	64,89	67
Dexametasona	0	160,95	97,01	97,41	198,45	0	144,26	899,74	94,12	1777,98	36,25	57,84	76,12

linfocitos T de murino primarios estimulados con IFN- γ , concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-13	IL-1	IL-22	IL-2	IL-5	IL-21	IL-6	IL-10	IL-27	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
PBS	0	159,07	75,55	163,26	452,71	41,32	266,16	867,48	282,91		75,69	195,06	154,59
α -MSH	0	88,22	50,6	96,1	220,39	0	133,9	1117,07	104,04		36,8	20,56	55,11
K(D)PT	0	93,77	48,13	98,22	271,81	0	144,97	1061	0		34,84	85,32	88,84
MMF	0	100,02	55,98	79,63	254,61	0	111,95	936,45	40,8		33,64	59,48	61,58
Dexametasona	0	64,89	37,13	70,49	208,28	0	108,76	905,55	21,29		32,32	61,11	52,48

linfocitos T humanos primarios estimulados con PBS, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0	558,41	268,55	302,37	123,94	95,58	0	198,34	285,36	186,54	164,77	433,48	113,92
α -MSH	0	0	139,74	139,68	164,01	34,99	0	117,88	185,71	72,42	14,37	0	59,06
K(D)PT	0	0	127,21	0	159,09	0	0	109,89	172,66	0	0	147,97	65,47
MMF	0	0	71,42	39,68	79,26	28,13	0	94,62	79,09	0	0	0	53,91
Dexametasona	0	0	69,45	0	45,66	13,05	0	80,63	55,12	0	0	0	41,45

linfocitos T humanos primarios estimulados con PMA/Ionomicina, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0	20668,7	3370,25	10549,5	802,68	767,48	0	2981,92	1864,96	112,94	506,89	985,31	8233,81
α -MSH	0	10814,4	1660,92	2307,5	977,83	264,59	0	1241,17	1065,69	70,32	278,92	530,55	3346,46
K(D)PT	0	12070,4	1808,01	3486,84	877,54	332,07	0	1535,49	1158,74	41,83	379,39	594,38	3998,01
MMF	0	9491,25	1097,19	1498,52	814,79	339,89	0	1198,6	1072,09	29,49	309,88	505,05	3987,21
Dexametasona	0	888,61	1134,18	2198,45	799,85	392,74	0	1078,6	1099,59	79,02	297,13	448,69	3264,56

linfocitos T humanos primarios estimulados con IFN- γ , concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0		120,31	178,78	0	15,92	0	104,38	187,86	134,71	117,9	79,74	73,01
α -MSH	0		0	0	43,9	5,27	0	64,54	0	60,49	0	0	18,85
K(D)PT	0		0	0	33,21	9,51	0	58,47	0	0	0	0	0
MMF	0		0	0	0	0	0	62,15	0	0	0	0	0
Dexametasona	0		0	0	0	0	0	56,47	0	0	0	0	0

HaCaT estimuladas con PBS, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0	391,65	45,41	233,68	32,84	18,84	0	182,52	1910,23	229,6	51,29	195,08	38,87
α -MSH	0	0	0	0	39,54	9,51	0	15,22	0	118,52	0	0	0
K(D)PT	0	99,65	0	0	31,43	5,27	0	78,34	0	144,86	0	65,11	9,34
MMF	0	0	0	0	33,26	0	0	39,58	0	120,89	0	0	0
Dexametasona	0	12,98	0	0	30,89	0	0	44,79	0	133,98	0	0	0

HaCaT estimuladas con PMA/Ionomicina, concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0	109,28	101,48	172,29	78,59	14,7	0	422,8	1879,36	235,96	71,04	162,79	83,03
α -MSH	0	0	0	0	93,2	0	0	179,03	0	113,12	0	0	0
K(D)PT	0	0	0	0	118,77	0	0	282,85	0	129,6	0	0	0
MMF	0	0	0	0	66,23	0	0	116,51	0	98,71	0	0	0
Dexametasona	0	0	0	0	54,1	0	0	124,98	0	91,48	0	0	0

HaCaT estimuladas con IFN- γ , concentración de citocina [pg/ml]

Sustancia	IL-12	IFN- γ	IL-17	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1	TNF- α
PBS	0		196,73	263,44	43,65	18,37	0	386,69	1987,25	176,06	115,61	177,43	148,14
α -MSH	0		95,44	0	0	0	0	202,37	0	0	0	0	45,91
K(D)PT	0		112,82	131,59	0	0	0	238,12	0	52,4	0	0	50,44
MMF	0		58,48	0	0	0	0	239,05	0	33,01	0	0	0
Dexametasona	0		69,14	0	0	0	0	204,99	0	39,78	0	0	0

Los ensayos en que la concentración de citocina en el sobrenadante estaba por debajo del límite de detección se marcan en gris. Las celdas rayadas en gris indicaban ensayos en que la cuantificación de citocina se compromete debido al estimulante.

B. Modelo de vasculitis en ratones

[0078] Ratones C57BL/6 reciben una inyección intradérmica de LPS. El día siguiente, se induce vasculitis por inyección intradérmica de TNF- α . Además, se inyecta azul de Evan. 24 horas después de la inyección de TNF- α , se escarifican los ratones. Se mide el grosor de la oreja y se valora el grado de vasculitis contando las petequias. El contenido de azul de Evan en el tejido de la oreja es un marcador de la permeabilidad vascular. Se analizan las orejas por histología, FACS y RT-qPCR. El tratamiento con el Ejemplo 13 (s.c.) dio como resultado la reducción del grosor de la oreja y un número reducido de petequias. En histología, se veía un infiltrado inflamatorio reducido.

10 C. Psoriasis inducida por imiquimod en ratones

[0079] Se induce psoriasis en ratones Balb/c por la aplicación diaria de imiquimod tópico durante 8 días. Se tratan los animales con los artículos de prueba (por vía tópica o sistémica). El día 9, se caracteriza el fenotipo cutáneo usando un sistema de puntuación clínica (0= piel normal de ratón; 1= enrojecimiento leve; 2= eritema; 3= eritema hinchazón; 4= eritema, hinchazón y escamación; 5= eritema, hinchazón, escamación, lesiones (con sangre)). Se analiza histológicamente la piel. Se analizan los nódulos linfáticos por citometría de flujo y RT-qPCR. Se analiza la expresión de ARNm en piel lesionada por RT-qPCR. Se valoran las concentraciones de citocina en el suero usando la tecnología Luminex.

20 [0080] El tratamiento con el Ejemplo 13 (i.v.) dio como resultado un tamaño disminuido de las crestas interpapilares en comparación con control de vehículo. Se redujo la puntuación clínica. Se redujo la expresión de ARNm de IL-17, IFN- γ , IL-23, IL-36 e IL-22 en piel lesionada. Se redujeron las concentraciones de TNF- α e IL-17 en el suero de ratones tratados.

25 [0081] El tratamiento con los Ejemplos 14, 15, 16 y 17 (i.v.) dio como resultado una puntuación clínica reducida y un grosor epidérmico reducido. Se redujeron las concentraciones de TNF- α e IL-17 en el suero de ratones tratados. Se redujo la expresión de ARNm de IFN- γ e IL-36 en piel lesionada en comparación con el control de vehículo.

D. Colitis inducida por DSS en ratones

30

[0082] Se induce la colitis por tratamiento de ratones C57BL/6 con sulfato de dextrano (DSS) al 2,5 % en el agua de bebida durante 7 días. Se tratan los ratones con el artículo de prueba. Se monitoriza el peso diariamente. El día 8, se escarifican los ratones. Se efectúa una prueba de hemocultivo. Se mide el tamaño del colon. Se determina la colitis usando un sistema de puntuación en tinciones con H y E. Se analiza la expresión de ARNm en muestras de colon por RT-qPCR.

35

[0083] El tratamiento con el Ejemplo 13 (i.p.) dio como resultado una pérdida de peso disminuida en comparación con el control de vehículo. El tamaño de colon se normalizó parcialmente. Se observó una mejora de la enfermedad en histología. Se observó en comparación con el control de vehículo una expresión reducida de ARNm de LY-6G, MPO, IFN- γ , IL-6 y TNF- α .

40

E. Estudios de penetración cutánea

[0084] Se efectúan estudios de penetración cutánea con piel humana extirpada. Se lavan las muestras de tejido con solución salina posoperatoriamente y se retira la capa de grasa subcutánea. Se toman biopsias de punción (20 mm de diámetro, 3,14 cm²) y se almacenan a -20 °C. Al inicio del estudio de penetración, se descongela la muestra de piel de grosor completo y se seca con una torunda. Se efectúan los estudios de penetración aplicando celdas de difusión de Franz. Se aplica base de crema que contiene el compuesto peptídico sobre la piel y se distribuye igualmente. Se coloca la muestra de piel sobre gasa sobre la celda de difusión, que se atempera a 32 °C antes. Después de 30, 100 y 300 min, respectivamente, se retira la formulación restante con una torunda. Después de la retirada de la celda de difusión, se toman tres biopsias de punción (6 mm de diámetro). Se preparan secciones horizontales de las que se extrae el compuesto tripeptídico. Se analiza el contenido de péptido en todos los extractos y el medio aceptor con HPLC-MS.

55 F. Estabilidad acuosa

[0085] Se incubaba una solución acuosa del compuesto tripeptídico (1500 μ l) con o sin azida de sodio al 0,02 % (C_{peptido}= 160 μ g/ml) a 32 °C y 8 °C, respectivamente. Se toman muestras a los 0, 30, 100, 300 and 1000 minutos. Se diluye una muestra de 100 μ l con 1900 μ l de metanol que contiene un patrón interno y se analiza por HPLC-MS. Todos los análisis se efectúan por triplicado.

60

[0086] No se observó degradación para los Ejemplos 3, 8 y 9 incluso después de 1000 minutos.

G. Estabilidad en presencia de piel humana homogeneizada

65

[0087] Se combinan muestras de piel humana (piel de oreja, piel umbilical y prepucio juvenil), se congelan en nitrógeno líquido y se homogeneizan. Se transfiere el homogeneizado de piel humana resultante en porciones (50-70 mg) a tubos Protein LoBind (2 ml) y se almacenan a -32 °C hasta el uso. Al inicio del estudio de estabilidad, se descongela el homogeneizado de piel humana. Se añade una solución acuosa del compuesto tripeptídico (1500 µl) con o sin azida de sodio al 0,02 % ($C_{\text{péptido}} = 160 \mu\text{g/ml}$) y se incuba la mezcla a 32 °C. Se tomaron muestras a los 0, 30, 100, 300 y 1000 minutos. Se diluye una muestra de 100 µl con 1900 µl de metanol que contiene un patrón interno y se analiza por HPLC-MS. Se efectúan todos los análisis por triplicado.

[0088] Después de 30 y 100 minutos, respectivamente, la solución de prueba contenía aún 94-95 % de la concentración de partida del Ejemplo 8. Se observó una disminución a 77-80 % (300 min) y 40 % (libre de azida) y 47 % (con azida de sodio), respectivamente, después de 1000 min.

[0089] La cantidad del Ejemplo 9 en la solución disminuyó al 58 % (libre de azida) y al 63 % (con azida de sodio), respectivamente, después de 300 minutos.

[0090] No se observó degradación para el Ejemplo 3. Todas las muestras en todos los puntos temporales contenían un 80-90 % de la concentración de partida.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas

Composición para el Ejemplo 3:

[0091]

Crema	
Ejemplo 3	1,00
Alcohol cetosteárfico	7,00
Macrogol-6-cetosteárfiléter	1,50
Macrogol-25-cetosteárfiléter	1,50
Parafina líquida	12,00
Propilenglicol	8,00
Metilparabeno	0,15
Etilparabeno	0,08
Butilhidroxitolueno	0,04
Edetato de disodio	0,05
Agua	68,68

Composición para el Ejemplo 8:

[0092]

Gel	
Ejemplo 8	0,50
Etanol	15,00
Polioxil 40-aceite de ricino hidrogenado	1,00
Butilhidroxitolueno	0,04
Edetato de disodio	0,05
Carbómero	0,50
Trietanolamina	0,70
Agua	82,21

Composición para el Ejemplo 3:

[0093] Como realización específica de una composición oral de un compuesto de la presente invención, se formulan 21 g de Ejemplo 3 con suficiente lactosa finamente dividida para proporcionar una cantidad total de 580 a 590 mg para rellenar una cápsula de gelatina dura de tamaño 0.

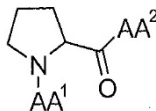
Composición para el Ejemplo 9:

[0094] Como otra realización específica de una composición oral de un compuesto de la presente invención, se formulan 17 mg de Ejemplo 9 con suficiente lactosa finamente dividida para proporcionar una cantidad total de 580 a 590 mg para rellenar una cápsula de gelatina dura de tamaño 0.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto tripeptídico según la fórmula general (1) como se muestra a continuación o un solvato o hidrato del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

5



(1)

en la que

AA¹ se selecciona de Lys, Orn, Nle, Phe, N^α-metil-Phe, N^α,N^α-dimetil-Nle, N^α,N^α-dimetil-Phe y N^α,N^α-dimetil-Lys; y

- 10 AA² se selecciona de ácido α-aminoisobutírico, *t*-butilglicina, amida del ácido α-aminoisobutírico, N^α-metil-Thr-OH, N^α-metil-Thr-NH₂ y N^α-metil-Val-OH.

2. El compuesto tripeptídico, según la reivindicación 1, en el que en la fórmula general (1):

AA¹ se selecciona de Lys, Orn, Nle, Phe, N^α-metil-Phe, N^α,N^α-dimetil-Nle y N^α,N^α-dimetil-Phe; y

- 15 AA² es ácido α-aminoisobutírico, *t*-butilglicina y amida del ácido α-aminoisobutírico.

3. El compuesto tripeptídico, según la reivindicación 1, seleccionado del grupo consistente en H-(L)-Lys-(D)-Pro-Aib-OH, H-(L)-Lys-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-OH, H-(L)-Lys-(L)-Pro-Aib-OH, H-(L)-Lys-(L)-Pro-(L)-*t*-butil-Gly-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Lys-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-OH, H-(L)-Lys-(L)-Pro-Aib-NH₂, H-(L)-Orn-(L)-Pro-Aib-OH, H-(L)-Nle-(L)-Pro-Aib-OH, H-(L)-Phe-(L)-Pro-Aib-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Lys-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-NH₂, N^α,N^α-dimetil-(L)-Lys-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Val-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Nle-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-OH, N^α-metil-(D)-Phe-(L)-Pro-Aib-OH, H-(D)-Phe-(L)-Pro-Aib-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Phe-(L)-Pro-Aib-OH, N^α,N^α-dimetil-(L)-Nle-(L)-Pro-Aib-OH o N^α,N^α-dimetil-(L)-Phe-(D)-Pro-N^α-metil-(L)-Thr-OH o un solvato o hidrato del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25

4. El compuesto tripeptídico, según una de las reivindicaciones anteriores, para uso como medicamento.

5. El compuesto tripeptídico para uso como medicamento, según la reivindicación 4, para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades elegidas del grupo que comprende enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, dolor agudo y crónico, prurito, hiponatremia, edema, íleo, tosferina y glaucoma.

30

6. El compuesto tripeptídico para uso como medicamento, según la reivindicación 5, en el que las enfermedades inflamatorias se eligen del grupo que comprende inflamación cardiovascular, inflamación neurológica, inflamación esquelética, inflamación cutánea, inflamación muscular, inflamación gastrointestinal, inflamación ocular, inflamación ótica, inflamación debida a mordeduras de insectos e inflamación debida a la curación de heridas; aterosclerosis, isquemia, reestenosis y vasculitis; asma, síndrome de Sjogren, inflamación pulmonar, inflamación crónica de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), alergia, psoriasis, artritis psoriásica, eccema, escleroderma, dermatitis atópica y lupus eritematoso sistémico, artritis, sinovitis, osteomielitis, artritis reumatoide, artrosis y espondilitis anquilosante; septicemia y choque séptico, diabetes, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y obesidad, colitis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, EII y SII, y las enfermedades y afecciones inflamatorias debidas a proliferación tumoral, metástasis tumoral o rechazo de trasplante.

40

7. El compuesto tripeptídico para uso como medicamento, según la reivindicación 5 y/o la reivindicación 6, en el que las enfermedades inflamatorias se eligen del grupo que comprende enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, en particular enfermedades inflamatorias intestinales, tales como enfermedad de Crohn y/o colitis ulcerosa, cambios inflamatorios agudos o crónicos con inflamación de la vesícula biliar, pseudopólipos inflamatorios, colitis quística profunda, neumatosis quística intestinal, pancreatitis, apendicitis, inflamación cardiovascular debida a arteriosclerosis, isquemia, reestenosis y/o vasculitis, sepsis, septicemia, alergias, asma, síndrome de Sjogren, inflamación pulmonar, inflamación crónica de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), proliferación tumoral, metástasis tumoral, rechazo de trasplante, enfermedades inflamatorias de las articulaciones, tales como artritis reumatoide, vulvovaginitis y/o enfermedades inflamatorias del cerebro, piel, folículo piloso, tracto urogenital y los ojos, sinusitis, tenosinovitis, bursitis, tendinitis, epicondilitis lateral, capsulitis adhesiva, osteomielitis, inflamación osteoartrítica, inflamación ocular, inflamación otítica y/o inflamación autoinmunitaria, psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis de contacto, eccema atópico, alopecia areata, escleroderma y otras enfermedades fibróticas, lupus eritematoso sistémico, urticaria, liquen plano, linfoma y/o enfermedades alérgicas o **caracterizadas por la implicación de mastocitos**

55

8. Un medicamento que comprende al menos un compuesto tripeptídico, según una de las reivindicaciones 1 a 3, o un solvato o hidrato del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

60

Figuras 1-6:

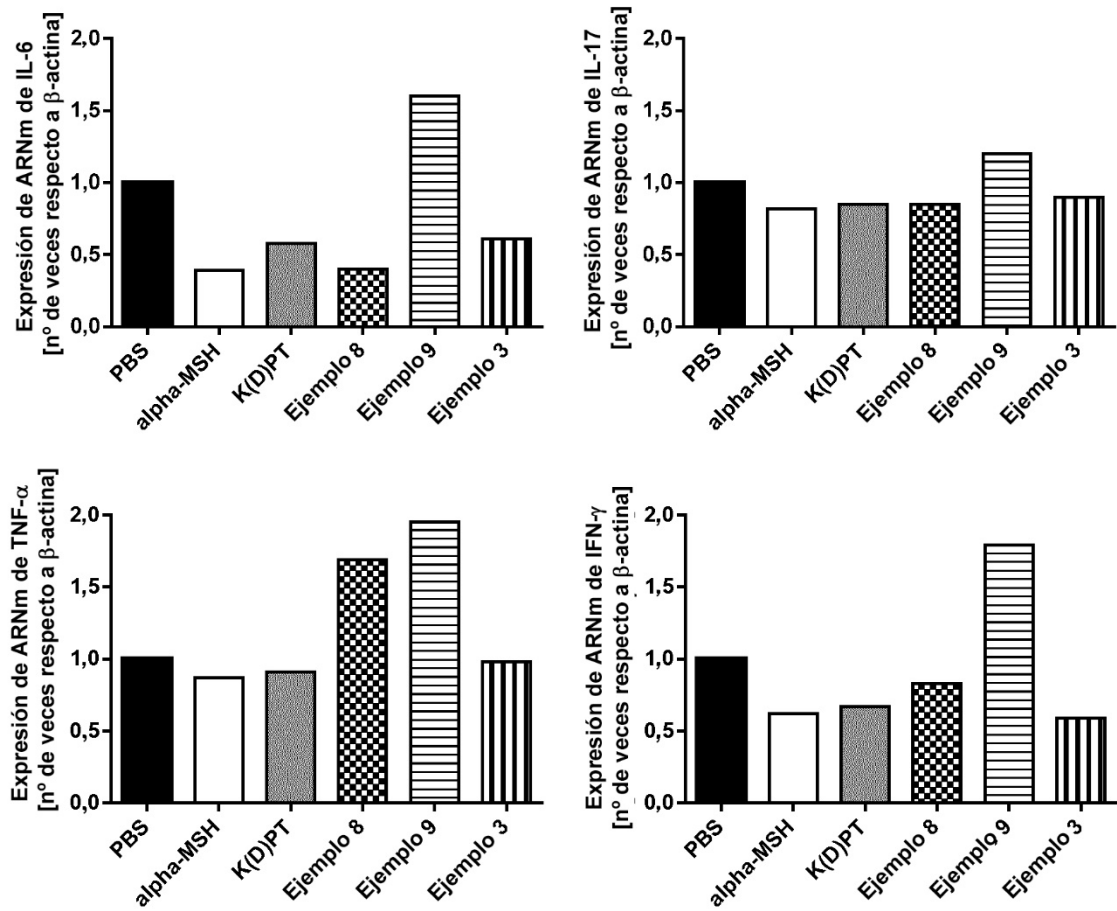


Figura 1: Análisis de expresión génica: linfocitos T humanos primarios

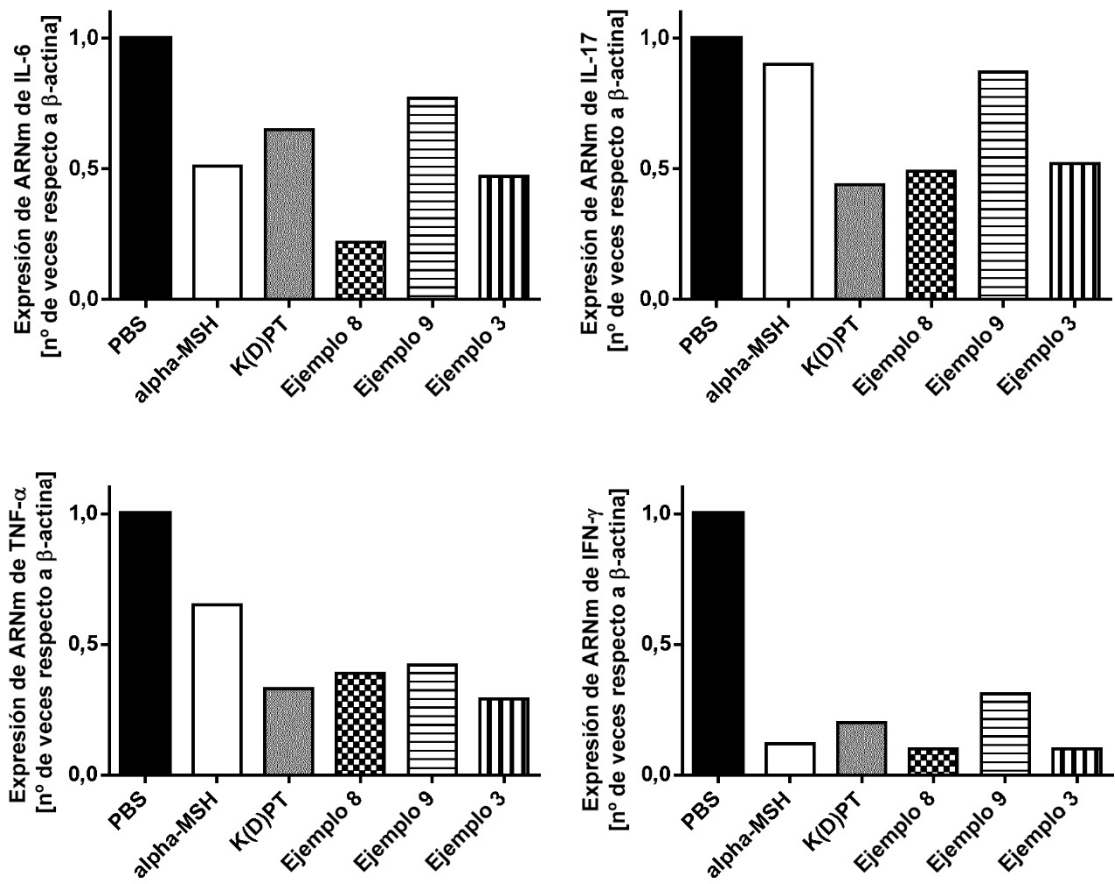


Figura 2: Análisis de expresión génica: HaCaT

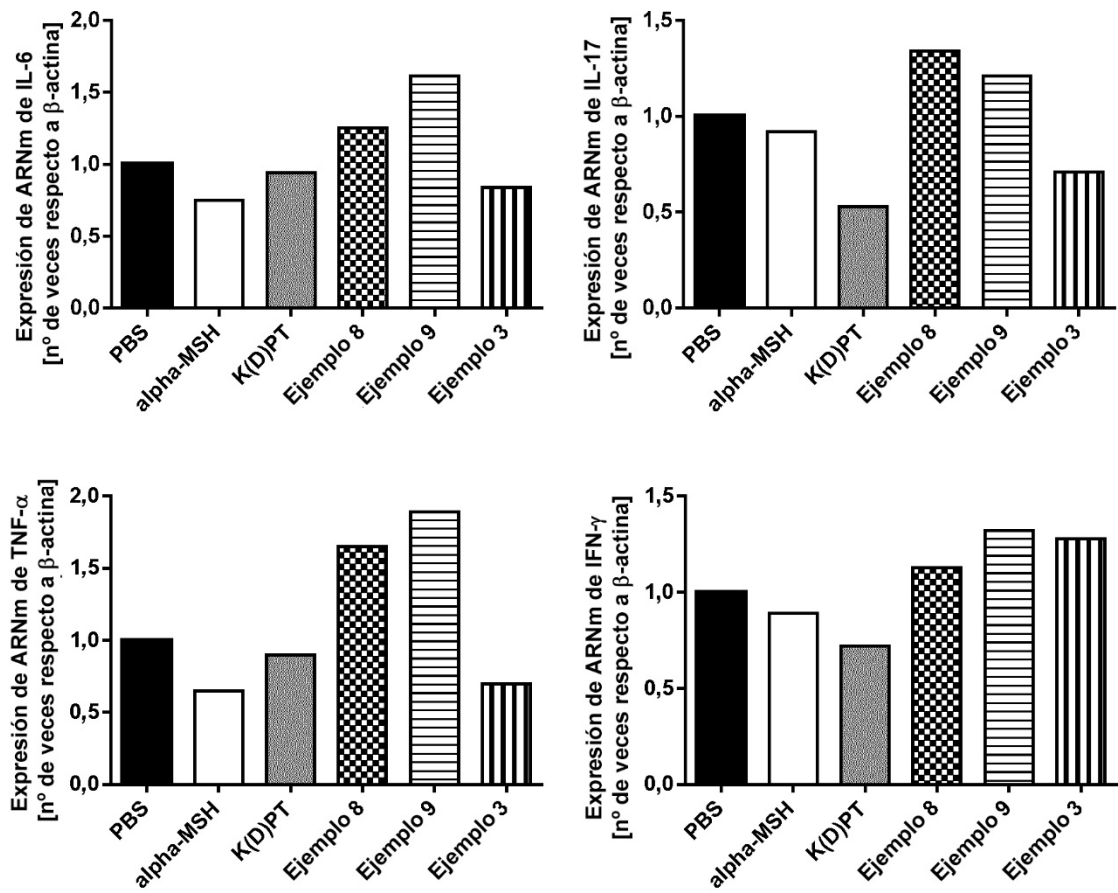


Figura 3: Análisis de expresión génica: linfocitos T de murino primarios

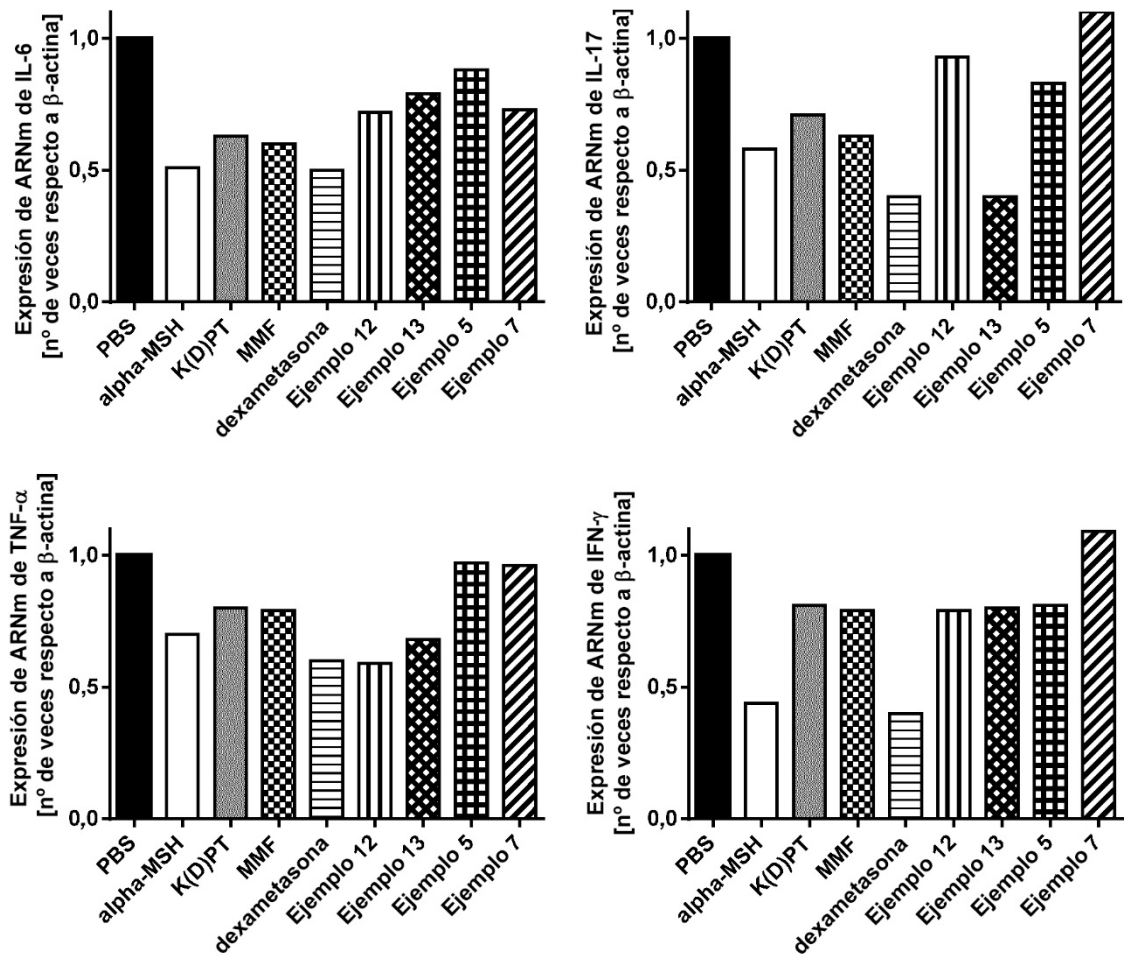


Figura 4: Análisis de expresión génica: linfocitos T humanos primarios

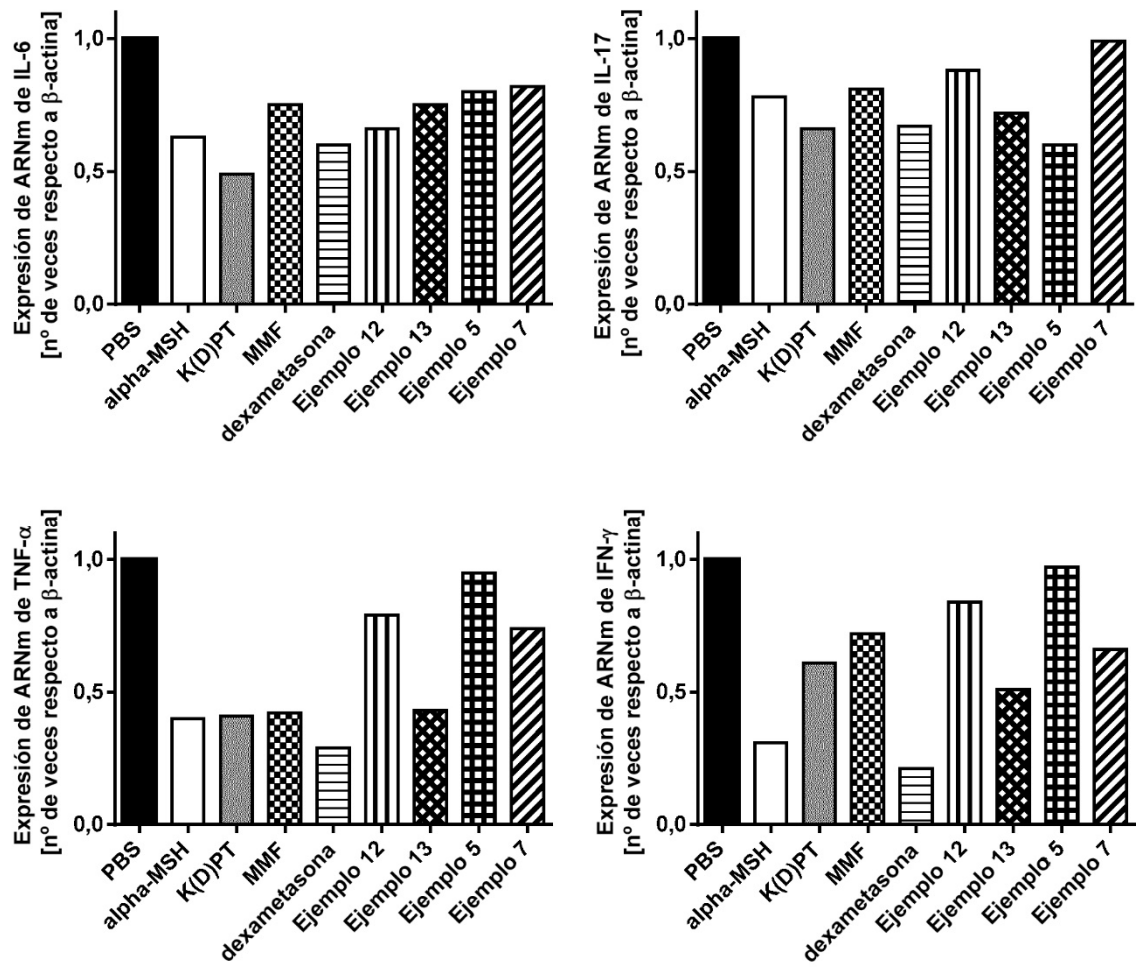


Figura 5: Análisis de expresión génica: HaCaT

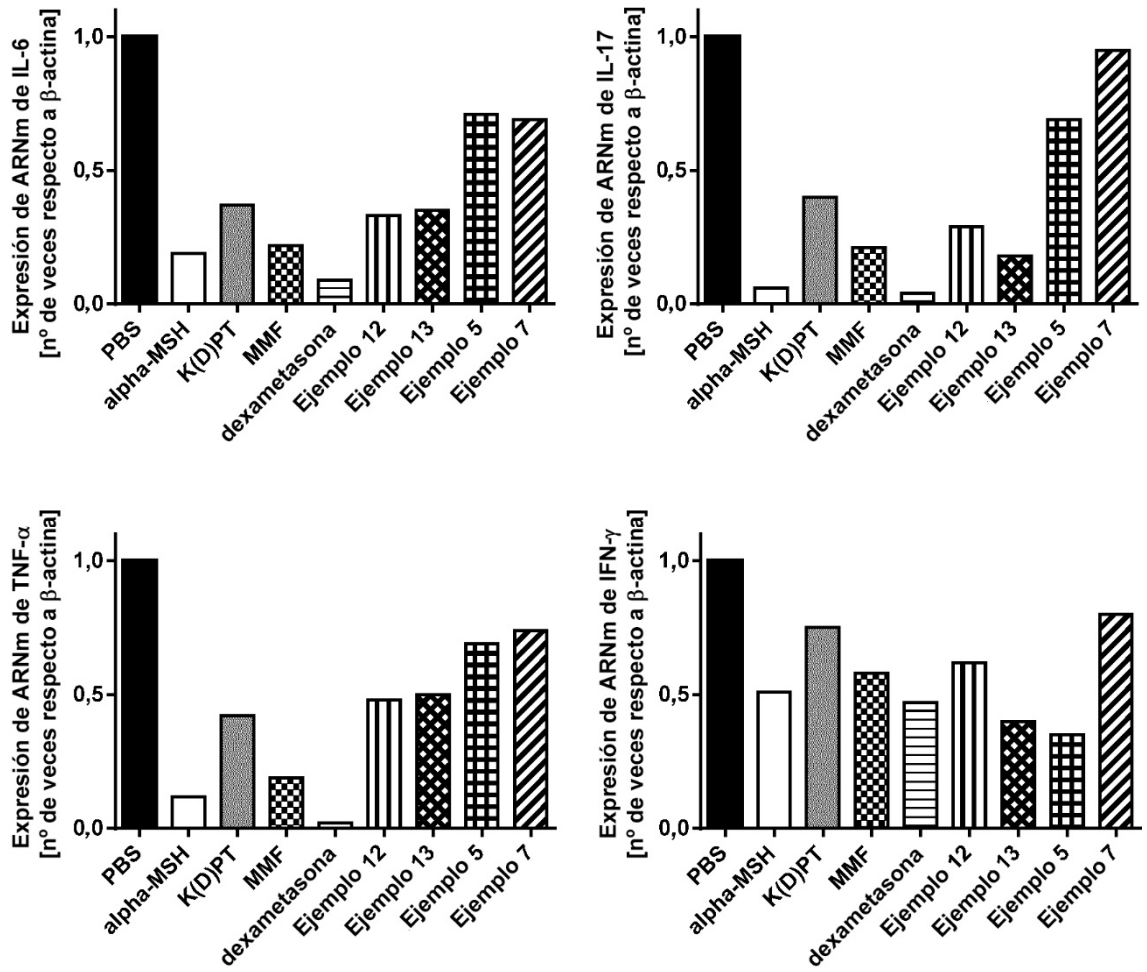


Figura 6: Análisis de expresión génica: linfocitos T de murino