



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 445**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 8/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98962052 .1**

86 Fecha de presentación : **10.12.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1037653**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2000**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para regular la fagocitosis y la expresión de ICAM-1.**

30 Prioridad: **16.12.1997 US 69797 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **JOHNSON & JOHNSON CONSUMER
COMPANIES, Inc.
Grandview Road
Skillman, New Jersey 08558, US**

72 Inventor/es: **Miri, Seiberg;
Shapiro, Stanley, S. y
Eisinger, Magdalena**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Composiciones y procedimientos para regular la fagocitosis y la expresión de ICAM-1.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la prevención y tratamiento de trastornos en mamíferos que mejoran alterando la fagocitosis o la expresión de ICAM-1 en ciertas células. La invención proporciona numerosas composiciones, procedimientos y artículos de fabricación, y aborda un intervalo considerable de trastornos tales como los de la piel y los de los sistemas inmune y nervioso central. Esta invención se base en el descubrimiento de un mecanismo para la regulación de la fagocitosis y la expresión de ICAM-1.

Antecedentes de la invención15 *Fagocitosis y Expresión de ICAM-1 en general*

La fagocitosis es el proceso celular de ingestión, y habitualmente de aislamiento o destrucción, de material en forma de partículas. En vertebrados, es una función característica de diversos leucocitos y células del retículo endotelial. La fagocitosis sirve como un importante mecanismo de defensa del cuerpo contra la infección por microorganismos, y contra la oclusión de superficies y tejidos de la mucosa por partículas extrañas y restos de tejidos. La fagocitosis es distinta de la pinocitosis, que es la captación de fluido por una célula por invaginación y pellizcando la membrana plasmática. En este documento, las expresiones “fagocitosis” e “ingestión celular” se usan de manera intercambiable.

La molécula de adhesión intercelular-1 (“ICAM-1”) es una glicoproteína inducible de la superficie celular que está implicada en la adhesión célula-célula y en la fagocitosis. En particular, la regulación de ICAM-1 juega un papel en situaciones inflamatorias, choque séptico y trastornos neurológicos (revisado en van de Stolpe y van der Saag, J Mol Med 74: 1,13-33,1996). ICAM-1 se eleva en enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide y psoriasis. Se confieren respuestas inflamatorias e inmunes en ratones deficientes en ICAM-1 (Sligh *et al.*, PNAS 90: 8529-33, 1993).

30 *Trastornos en Mamíferos Relacionados con la Fagocitosis y la Expresión de ICAM-1*

Los niveles de fagocitosis y expresión de ICAM-1 en diferentes células tienen importantes implicaciones. Aquí se proporcionan numerosos ejemplos de estas implicaciones.

35 *Trastornos Inmuno-Relacionados e Inflamatorios*

La causa fundamental del enfisema pulmonar es la acumulación de material extraño (por ejemplo, condensados de humo) en el pulmón. Esta acumulación va seguida del reclutamiento de neutrófilos que se desgranulan durante el intento de fagocitosis (Travis, *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. Vol. 150: 5143-5146, 1994).

Los trastornos pulmonares inmunológicos tales como aspergilosis broncopulmonar alérgica provocan taponamiento por mucosidad de las vías respiratorias, neumonía eosinófila y bronquiolitis obliterans. En dichas enfermedades, las inmunoglobulinas escindidas por neutrófilo elastasa y receptores C3b digeridos limitan la fagocitosis de patógenos (Greenberger, JAMA, Vol. 278, N° 22,1997). El aumento de neutrófilo elastasa, cuando se confiere fagocitosis, es beneficioso para luchar contra las infecciones bacterianas persistentes en los pulmones, especialmente en pacientes CF (Doring, *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150: 6 Pt 2, S114-7, 1994).

Las enfermedades periodontales empiezan con la acumulación de placa en la base de los dientes, seguido del crecimiento de bacterias oportunistas por debajo de la línea de las encías. Como en la respuesta inmune a enfisema, los neutrófilos se reclutan al sitio infectado, seguido de su desgranulación durante la fagocitosis frustrada (Travis, *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. Vol. 150: 5143-5146, 1994). Las velocidades de adhesión e ingestión de *Staphylococcus Aureus* opsonizado por células polimorfonucleares (“PMN”) a partir de pacientes periodontales se reduce significativamente en los controles sanos (MacFarlane, *et al.*, J Periodontol 1992; 63: 908-913, 1992).

Los individuos que están genéticamente inmuno-comprometidos, que han adquirido inmuno-supresión (tales como individuos infectados con VIH), o que han adquirido inmuno-supresión temporalmente (tales como después de un trasplante de órganos, implantes extraños, sustitución de válvulas o tratamiento de cáncer, y similares), a menudo padecen infecciones secundarias.

Se demostró que los leucocitos polimorfonucleares pulmonares de pacientes diabéticos habían reducido las actividades fagocíticas, tanto al nivel de ingestión y como de suprimir bacterias, comparado con individuos sanos (por ejemplo, Musclow, *et al.*, Cytobios, 65: 15-24 1991). En particular, las anormalidades diabéticas en la respuesta inmune incluyen quimiotaxis reducida, fagocitosis reducida y adhesión reducida (Grant-Theule, Periodontal Abstracts, Vol. 44, N° 3, 1996). Estos pacientes a menudo padecen infecciones no deseadas.

Trastornos del Sistema Cardiovascular

La formación de placas ateroscleróticas es inducida por el envejecimiento o por la restenosis después de angioplastia con balón. Las lesiones ateroscleróticas contienen partículas ricas en colesterol, muchas de las cuales se agregan y se internalizan de una manera no regulada por fagocitosis de macrófagos. Este procedimiento fagocítico es independiente del LDL o el receptor eliminador. Los macrófagos cargados con lípido, denominados células espumosas, pueden conducir al crecimiento adicional de la placa aterosclerótica (Hoff, *et al.*, European Heart Journal, II (Suppl. E), 105-115, 1990; Robert, *et al.*, Annals New York Acad. de Sciences, 673: 331-341, 1992).

Trastornos del Sistema Nervioso Central

Se ha demostrado que las células microgliales descubiertas en la periferia del núcleo de la placa amiloide contienen fibrillas de placa de beta/A4 amiloide (El Hachimi y Foncin, C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences, 317: 445-451, 1994). La capacidad de las células microgliales para fagocitar y limpiar los núcleos de la placa senil se suprime en presencia de un factor difundible secretado por astrocitos. Este factor evita la eliminación de las placas seniles, permitiéndoles que resistan durante la enfermedad de Alzheimer y otros procedimientos neuropatológicos degenerativos (DeWitt, *et al.*, Experimental Neurology, 149: 329-340, 1998).

Se descubrió que la fagocitosis de neutrófilos se reducía en pacientes deprimidos mentalmente (por ejemplo, McAdams y Leonard, Prog. Neuro-Psychofarmacol. & Biol. Psychiat., Vol. 17: *et al.*, J. Psychiat. Res., Vol. 26, N° 2, 125-134, 1992). Los pacientes con trastornos fóbicos tienen capacidades reducidas de fagocitosis y de supresión celular. Se demostró que los compuestos benzodiazepina, usados en el tratamiento de trastornos neurológicos, reducían o inhibían la fagocitosis (por ejemplo, Covelli *et al.*, Immunofarmacology and Immunotoxicology, 11(4): 701-714, 1989).

Trastornos de la Piel

La elastosis dérmica media, un trastorno de la piel, se caracteriza clínicamente por la aparición de arrugas y aspecto envejecido resultante, en parte, de la fagocitosis de tejido elástico morfológicamente normal (por ejemplo, Fimiani, *et al.*, Arch Dermatol Res., 287: 152-157, 1995).

Existen muchos tipos de trastornos de pigmentación de muchas formas. Estos pueden ser heredados (por ejemplo, vitiligo), adquiridos (por ejemplo, pitiriasis alba post-inflamatoria, hipomelanositis guttate idiopática, melasma), y transmitidos por infección (por ejemplo, tinea versicolor). Estos trastornos pueden ser benignos y auto-limitantes (por ejemplo, manchas aisladas de café con leche, dermatitis de fotocontacto), o un síntoma de una enfermedad subyacente más grave (por ejemplo, múltiples manchas de café con leche, acantosis nigricans maligna) (Hacker, Postgrad Med 99: 177-86, 1996).

Se sabe que la irradiación UV induce un estado inflamatorio y una regulación anormal de la expresión de ICAM-1. Esta inducción se ha documentado en forma de quemaduras por el sol y efectos secundarios de la terapia PUVA. La terapia PUVA se usa para numerosos trastornos de la piel tales como psoriasis, una enfermedad asociada con la regulación positiva de la expresión de ICAM-1 (por ejemplo, Tronnier, *et al.*, J. Cutan Pathol 1997, 24: 278-85; Ahrens, *et al.*, PNAS 6837-41). La diferenciación ha sido descrita recientemente por Derian *et al.*, Cell Growth & Differentiation 8: 743-749, 1997.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al uso de un inhibidor de serina proteasa para la fabricación de un medicamento para tratar a un mamífero que padece un trastorno que mejora con una disminución de la fagocitosis o de la expresión de ICAM-1 en las células apropiadas, siendo dicho trastorno un trastorno del sistema inmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno del sistema nervioso central, un trastorno de la piel, una herida física, un trastorno respiratorio, o restenosis.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona también un inhibidor de tripsina de soja, para el tratamiento de un mamífero que padece un trastorno que mejora con una disminución de la fagocitosis o de la expresión de ICAM-1 en las células apropiadas, siendo dicho trastorno un trastorno del sistema inmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno del sistema nervioso central, un trastorno de la piel, una herida física, un trastorno respiratorio, o restenosis.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra queratinocitos primarios expuestos a microesferas fluorescentes después del tratamiento con el Compuesto I o SLIGRL.

La Figura 2 muestra células de una línea celular de queratinocitos expuestas a microesferas fluorescentes después del tratamiento con el Compuesto I o SLIGRL.

La Figura 3 muestra células de una línea celular de fibroblastos expuestas a microesferas fluorescentes después del tratamiento con inhibidor de tripsina de soja ("STI") o SLIGRL.

La Figura 4A muestra un gráfico dosis-respuesta de macrófagos tratados con STI y expuestos a *E. Coli* fluorescente.

La Figura 4B muestra un gráfico dosis-respuesta de macrófagos tratados con el Compuesto I o SLIGRL y expuestos a *E. Coli* fluorescente.

La Figura 5A muestra la ingestión de melanina por queratinocitos tratados con SLIGRL, STI o Compuesto I.

La Figura 5B muestra los mismos resultados que en la Figura 5A usando melanosomas aislados.

La Figura 6A muestra tinción con ICAM-1 inmuno-fluorescente de queratinocitos tratados.

La Figura 6B muestra una transferencia Western de proteína inmuno-precipitada con ICAM-1 de queratinocitos tratados.

La Figura 7A muestra piel humana, injertada en ratones inmunosuprimidos, y tratada con vehículo o SLIGRL.

La Figura 7B muestra secciones histológicas de piel humana, injertada en ratones inmunosuprimidos, y tratadas con vehículo o SLIGRL.

La Figura 7C muestra secciones histológicas de piel humana, injertada en ratones inmunosuprimidos, y tratada con vehículo o STI.

La Figura 8 muestra imágenes de microscopía de barrido electrónico de queratinocitos tratados.

La Figura 9 muestra la tinción con F-actina de queratinocitos tratados.

La Figura 10 muestra el efecto de anticuerpos anti-ICAM-1 en la fagocitosis de queratinocitos.

La Figura 11 muestra el efecto de los compuestos de esta invención en aclarar las manchas provocadas por la edad en seres humanos.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se basa en el descubrimiento de que la fagocitosis mediada por PAR2 y la expresión de ICAM-1 mediada por PAR-2 pueden alterarse específicamente. Esta capacidad para aumentar y disminuir específicamente estas funciones celulares permite el tratamiento y la prevención de trastornos, que mejorarían con un aumento o una disminución de la fagocitosis y/o expresión de ICAM-1.

En consecuencia, esta invención proporciona el uso de un inhibidor de serina proteasa para la fabricación de un medicamento para tratar a un mamífero que padece un trastorno que mejora con una disminución de la fagocitosis o de la expresión de ICAM-1 en las células apropiadas, siendo dicho trastorno un trastorno del sistema inmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno del sistema nervioso central, un trastorno de la piel, una herida física, un trastorno respiratorio, o restenosis.

En consecuencia, la invención proporciona también un inhibidor de tripsina de soja, para el tratamiento de un mamífero que padece un trastorno que mejora con una disminución de la fagocitosis o de la expresión de ICAM-1 en las células apropiadas, siendo dicho trastorno un trastorno del sistema inmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno del sistema nervioso central, un trastorno de la piel, una herida física, un trastorno respiratorio, o restenosis.

Las composiciones útiles en la práctica de la presente invención pueden ser cualquier forma conocida en la técnica. En una realización, la composición comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y uno o más compuestos farmacéuticos discretos que funcionan como un inhibidor de serina proteasa. En otra realización, la composición de materia comprende una composición de origen natural, o un extracto o componente de la misma, que se considera farmacéuticamente o cosméticamente aceptable. Dichas composiciones de origen natural contienen ciertos componentes que funcionan como un inhibidor de serina proteasa, y numerosos otros que sirven como excipientes farmacéutica o cosméticamente aceptables. Las composiciones pueden ser artificiales, de origen natural, o una combinación de las mismas. Además, las composiciones pueden tener cualquier forma física conocida en la técnica, tal como líquidos (por ejemplo, soluciones, cremas, lociones, geles, inyectables), sólidos (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos), aerosoles, y recubrimientos.

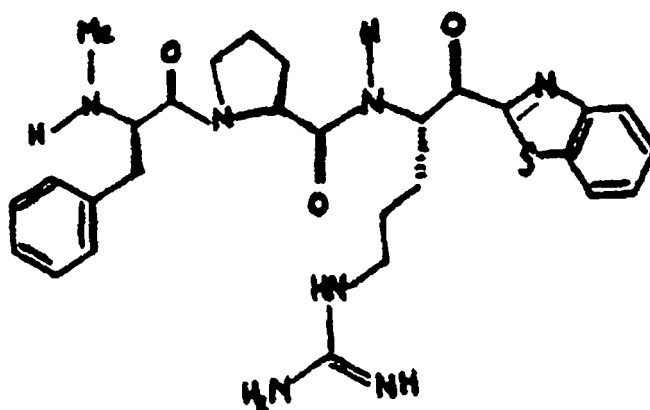
Los compuestos naturales que actúan como inhibidores de serina proteasa, y en particular, el inhibidor de tripsina de soja ("STI"), pueden usarse para esta invención. Los extractos de soja, extractos de judía de media luna y extractos similares, y otros productos naturales hechos de soja y similares, tales como leche de soja, pasta de soja, miso, inhibidor de tripsina de soja o judía de media luna y similares, también pueden reducir la fagocitosis por este mecanismo. En la realización preferida, la composición de origen natural es leche de soja o STI. Las fuentes adicionales de inhibidores de serina proteasa incluyen, por ejemplo, las siguientes familias de plantas: Solanáceas (por ejemplo, patata, tomate, tomatilla, y similares); Gramíneas (por ejemplo, arroz, trigo sarraceno, sorgo, trigo, cebada, avena y simila-

res); Cucurbitáceas (por ejemplo, pepinos, calabaza (variedad squash), calabaza (variedad gourd), lufa y similares); y, preferiblemente, Leguminosas (por ejemplo, judías, guisantes, lentejas, cacahuetes, y similares).

Como ejemplo, las formulaciones pueden contener leche de soja u otras formulaciones líquidas derivadas directamente de legumbres u otras plantas adecuadas. En un ejemplo, dicha formulación contiene una gran proporción de leche de soja, un emulsionante que mantiene la estabilidad física de la leche de soja, y opcionalmente, un agente quelante, conservantes, emolientes, humectantes y/o agentes espesantes o gelificantes.

El inhibidor de serina proteasa puede ser cualquier tipo de compuesto conocido en la técnica.

En la realización preferida para disminuir la fagocitosis, el agente es un derivado de soja (tal como leche de soja, pasta de soja o STI) o el Compuesto I. El Compuesto I tiene la fórmula química (S)-N-Metil-D-fenilalanil-N-[4-[(aminoiminometil) amino]-1-(2-benzotiazolilcarbonil)butil]-L-prolinamida (como se identifica en Chemical Abstracts), y tiene la estructura mostrada a continuación.



Este compuesto se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.523.308, así como en Costanzo, *et al.*, J. Med. Chem., 1996, 39: 3039-3043. La Patente de Estados Unidos N° 5.523.308 describe compuestos relacionados que se comportan como inhibidores de serina proteasa (tales como compuestos con un motivo d-fenilalaninaprolina-arginina), y que pueden usarse por lo tanto para disminuir la fagocitosis y la expresión de ICAM-1. A continuación se describen en detalle compuestos adicionales relacionados con el Compuesto I en los Ejemplos.

Como se usa en este documento, el término “mamífero” significa cualquier miembro de los animales vertebrados superiores incluidos en la clase Mammalia, como se define en Webster’s Medical Desk Dictionary 407 (1986), e incluye, aunque sin limitación a seres humanos, otros primates, cerdos, perros, y roedores (tales como ratones inmunodeprimidos). En la realización preferida de esta invención, el mamífero es un ser humano.

Los trastornos que pueden tratarse o prevenirse usando la presente invención incluyen trastornos inflamatorios, trastornos del sistema nervioso central, trastornos de la piel, heridas físicas, y trastornos respiratorios.

Numerosos trastornos tienen características de más de una categoría de trastorno. Dichos trastornos incluyen, por ejemplo, trastornos de adhesión, que pueden clasificarse como trastornos de la piel y como trastornos del sistema inmune. En consecuencia, una afirmación en este documento de que un trastorno es de una categoría (particular por ejemplo, un trastorno de la piel) significa que, en último término, el trastorno posee rasgos de esa categoría. De nuevo, sin embargo, el trastorno puede poseer adicionalmente rasgos de otra categoría.

Aumentando la capacidad de las células inmunes para ingerir objetos extraños tales como bacterias y virus sería de esperar que potenciara la respuesta inmune. Por ejemplo, los fagocitos mononucleares son inactivo en infecciones microbianas crónicas (Reiner, Immunol Today 15: 8, 374-81, 1994), y sería de esperar que su re-activación tratara la enfermedad. Como alternativa, los trastornos en los que el sistema inmune es demasiado activo mejorarían inhibiendo la fagocitosis.

El sistema inmune y los trastornos inflamatorios tratables en esta invención incluyen, a modo de ejemplo, SIDA, inmunodeficiencia inducida por quimioterapia, asma, lesión debida a exposición a sustancias tóxicas (por ejemplo, amianto o humo), rechazo por el huésped de implantes y tejidos transplantados, trastornos de adhesión, infecciones moderadas (tales como resfriados comunes), infecciones graves (tales como meningitis o “bacteria asesina”), heridas (tales como heridas infectadas, diabéticas, agudas y crónicas), restenosis, fibrosis quística, enfisema pulmonar, enfermedad periodontal, y sarpullido por el uso de pañales.

Los trastornos de la piel incluyen pigmentación no deseada, despigmentación no deseada, psoriasis, sarpullidos, y ciertas imperfecciones físicas de la piel (por ejemplo, arrugas). En un ejemplo específico, los pacientes con vitiligo se tratan con el Compuesto I para aclarar los sitios más oscuros. Los trastornos del sistema nervioso central incluyen, sin

limitación, depresión, trastornos fóbicos, y otros trastornos resultantes de los efectos secundarios del tratamiento con benzodiazepina.

Las células de mamífero tratadas en los presentes procedimientos son preferiblemente células que expresan PAR-2, e incluyen, sin limitación, queratinocitos, fibroblastos, y "fagocitos profesionales" (es decir, células que tiene la fagocitosis como función primaria). Los fagocitos profesionales incluyen, por ejemplo, neutrófilos, macrófagos y células de tipo macrófago (por ejemplo, células de Langerhans y células de Kupfer). En la realización preferida, las células de mamífero son células humanas.

En esta invención, las "células apropiadas" en las que debe alterarse la fagocitosis o expresión de ICAM-1 como respuesta a las presentes composiciones de materia se determinan fácilmente basándose en la naturaleza del trastorno a tratar o prevenir. Por ejemplo, si el trastorno a tratar es un trastorno de la pigmentación, las células apropiadas en las que es necesario alterar la fagocitosis o la expresión de ICAM-1 son queratinocitos.

Los presentes procedimientos se dirigen a la prevención así como a tratar trastornos. Como se usa en este documento, "tratar" un trastorno significa reducir la progresión del trastorno, cesar la progresión del trastorno, cesar o mejorar de otra manera los efectos secundarios del trastorno, invertir la progresión del trastorno, o preferiblemente, curar el trastorno. Como se usa en este documento, "prevenir" un trastorno significa reducir, y preferiblemente eliminar, la probabilidad de existencia del trastorno.

En esta invención, la administración de las presentes composiciones puede realizarse usando cualquiera de los diversos procedimientos y sistemas de suministro conocidos por los especialistas en la técnica. La administración puede realizarse, por ejemplo, por vía intravenosa, oral, mediante implante, por vía transmucosa, tópica, transdérmica, intramuscular, subcutánea, y mediante aerosol. Además, las presentes composiciones contienen idealmente uno o más vehículos farmacéutica o cosméticamente aceptables usados habitualmente. Dichos vehículos los conocen bien los especialistas en la técnica. Los siguientes sistemas de suministro, que emplean numerosos vehículos usados habitualmente, son únicamente representativos de las muchas realizaciones previstas para administrar la presente composición.

Los sistemas de suministros transdérmicos incluyen parches, geles, cintas, lociones, jabones, champús y cremas, y pueden contener excipientes tales como solubilizadores, potenciadores de permeación (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos), polímeros hidrófilos (por ejemplo, poliacarbófilo y polivinilpirrolidona), y adhesivos y pegamentos (por ejemplo, poliisobutilenos, adhesivos basados en silicona, acrilatos y polibuteno).

El suministro tópico de las composiciones de esta invención, particularmente aquellas que comprenden proteínas tales como tripsina, tripsina y STI, puede conseguirse usando liposomas. Los liposomas son preferiblemente no iónicos. En un ejemplo, contienen (a) dilaurato de glicerol; (b) compuestos que tienen la estructura esteroidea basada en colesterol; y (c) éteres de ácido graso que tienen de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 átomos de carbono, en los que los compuestos constituyentes de los liposomas están en una proporción de aproximadamente 37,5: 12,5: 33,3: 16,7. Se prefieren los liposomas que comprenden dilaurato de glicerol/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter/polioxietileno-9-lauril-éter (liposomas "GDL"). En una realización, los liposomas están presentes en una cantidad, basada en el volumen total de la composición, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, y preferiblemente de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. Se prefiere una proporción de aproximadamente 37,5: 12,5: 33,3: 16,7. Los procedimientos de preparación de liposomas se conocen bien en la técnica, tales como los descritos en Niemiec, *et al.*, 12 Pharm. Res. 1184-88 (1995).

También, para administración tópica o transdérmica, las presentes composiciones pueden combinarse con otros componentes tales como cremas hidratantes, adyuvantes cosméticos, anti-oxidantes, agentes blanqueadores, inhibidores de tirosinasa y otros agentes de despigmentación conocidos, alfa-hidroxi ácidos, tensioactivos, agentes de formación de espuma, acondicionadores, humectantes, fragancias, viscosificantes, agentes de tamponación, conservantes, protectores solares y similares. Las composiciones de esta invención pueden contener también cantidades activas de retinoides incluyendo, por ejemplo, tretinoína, retinol, ésteres de tretinoína y/o retinol y similares.

Los sistemas de suministro transmucosa incluyen parches, comprimidos, supositorios, pesarios, geles y cremas, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes y potenciadores (por ejemplo, propilenglicol, sales biliares y aminoácidos), y otros vehículos (por ejemplo, polietilenglicol, ésteres de ácido graso y derivados, y polímeros hidrófilos tales como hidroxipropilmetilcelulosa y ácido hialurónico).

Los sistemas de suministro de fármacos inyectables incluyen soluciones, suspensiones, geles, microesferas e inyectables poliméricos, y pueden comprender excipientes tales como agentes de modificación de la solubilidad (por ejemplo, etanol, propilenglicol y sacarosa) y polímeros (por ejemplo, poliacaprilactonas y PLGA). Los sistemas para suministro al sistema nervioso central incluyen, por ejemplo, un derivado acoplado a lípido para cruzar la barrera hemato-encefálica (por ejemplo, DHA). Los sistemas implantables incluyen varillas y discos, y pueden contener excipientes tales como PLGA y poliacaprilactona.

Los sistemas de suministro oral incluyen comprimidos y cápsulas. Estos pueden contener excipientes tales como aglutinantes (por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, otros materiales celulósicos y almidón), diluyentes (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, almidón, fosfato dicálcico y materiales celulósicos), agentes disgre-

gantes (por ejemplo, polímeros de almidón y materiales celulósicos) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearatos y talco). Dichos sistemas de suministro incluyen también, por ejemplo, pastas de dientes, enjuagues bucales, pastillas y piruletas.

5 Las soluciones, suspensiones y polvos para sistemas de suministro reconstituibles incluyen vehículos tales como agentes de suspensión (por ejemplo, gomas, xantanos, celulósicos y azúcares), humectantes (por ejemplo, sorbitol), solubilizantes (por ejemplo, etanol, agua, PEG y propilenglicol), tensioactivos (por ejemplo, lauril sulfato sódico, Spans, Tweens, y cetil piridina), conservantes y antioxidantes (por ejemplo, parabenos, vitaminas E y C, ácido ascórbico, y extractos naturales), agentes anti-coagulantes, agentes de recubrimiento, y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA). Pueden utilizarse también emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, formulaciones basadas en disolvente y geles acuosos conocidos por los especialistas en la técnica como vehículos para el suministro de las composiciones de esta invención.

15 Los procedimientos para determinar dosis terapéuticamente y profilácticamente eficaces para administrar las presentes composiciones en seres humanos se conocen en la técnica. Por ejemplo, estas dosis eficaces pueden determinarse fácilmente a partir de los resultados de estudios con animales.

20 En un ejemplo, la presente composición se aplica a la superficie cutánea de manera que, basado en un cm cuadrado de superficie cutánea, de aproximadamente $2 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $200 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ de agente de alteración de la fagocitosis está presente cuando se desea un cambio en la fagocitosis. Cuando se usa un inhibidor de trombina y tripsina tal como el Compuesto I o sus análogos, tanto de origen natural como sintético, en una formulación, dicho compuesto activo está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 15% en peso/volumen de la composición. En otra realización, está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,0005% a aproximadamente el 5% de la composición. Preferiblemente, está presente en una cantidad de de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 1% de la composición.

25 En otro ejemplo, se emplean derivados líquidos y extractos naturales hechos directamente a partir de plantas o fuentes botánicas en las presentes composiciones en una concentración (p/v) de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 99%, y preferiblemente de aproximadamente el 75 a aproximadamente el 95%. En otro ejemplo más, las fracciones de extractos naturales e inhibidores de proteasa de origen natural tales como STI tienen un intervalo de concentración de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 20% y, preferiblemente, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10% de la composición.

30 Esta invención proporciona además un artículo de fabricación para administrar a un mamífero la presente composición de materia, que comprende un vehículo de suministro sólido que tiene la composición añadida de manera operable (es decir, suministrable) al mismo. El vehículo de suministro sólido puede ser cualquier dispositivo diseñado para ponerse en contacto temporal o permanente con un cuerpo, esté destinado o no originalmente para usarlo como vehículo de suministro. Los ejemplos del presente artículo incluyen, sin limitación, vendas recubiertas u otros vendajes para heridas para tratar heridas, implantes corporales recubiertos (incluyendo implantes andamiaje interno recubierto) para prevenir o promover el crecimiento de tejidos, y catéteres de balón recubiertos y stents para prevenir la restenosis.

35 Finalmente, esta invención proporciona un procedimiento para administrar un compuesto terapéutico, profiláctico o cosmético a un mamífero, que comprende administrar al mamífero (a) el compuesto y (b) una composición de materia que comprende un excipiente farmacéutico o cosmético y un agente que aumenta específicamente la fagocitosis en una cantidad suficiente para aumentar la fagocitosis en células en las que se desea la captación del, en el que la composición se administra antes de y/o simultáneamente con la administración del compuesto.

40 El compuesto farmacéutico puede ser, por ejemplo, un polipéptido, proteína, o molécula de ácido nucleico. En una realización, el compuesto farmacéutico y la composición se administran juntos mediante perlas biodegradables porosas microscópicas, que liberan después el compuesto farmacéutico después de ser ingeridas mediante fagocitosis por las células apropiadas.

45 Esta invención se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes Ejemplos, aunque los especialistas en la técnica entenderán fácilmente que son sólo ilustrativos de la invención que se describe más ampliamente en las reivindicaciones posteriores.

Ejemplos

Ejemplo 1

50 *SLIGRL, STI y el Compuesto I Afectan a la Fagocitosis de Queratinocitos*

65 Para estudiar el papel de la ruta de PAR-2 en la fagocitosis, se usaron varios sistemas de modelo *in vitro*. Un sistema usado contenía queratinocitos humanos primarios o una línea celular humana de queratinocitos. En este y en numerosos de los siguientes ejemplos, las células se trataron con compuestos de ensayo durante diferentes cantidades de tiempo (de una hora a tres días), y las muestras se incubaron después con microesferas fluorescentes durante dos horas. Las perlas ingeridas por las células se fotografiaron usando microscopía de fluorescencia.

En este ejemplo, queratinocitos humanos primarios o la línea celular humana de queratinocitos HaCaT se usaron como sistemas del modelo *in vitro* para estudiar el efecto de los reguladores PAR-2 sobre la fagocitosis de queratinocitos. Los queratinocitos humanos primarios usados están disponibles en el mercado en Clonetics (San Diego, CA). Las células se colocaron en placas en portaobjetos de cámara, a 2 cámaras/portaobjetos y 60.000 células/cámara. Las células se trataron una vez al día, durante dos o tres días, con el Compuesto I (1 μ M), SLIGRL (10 μ M), o vehículo (solución salina tampona con fosfato, ("PBS") de Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). Después de dos o tres días de exposición a los compuestos de ensayo, las células se expusieron a rojo Nilo o microesferas fluorescentes FITC, de 1 μ m de diámetro, 50 microesferas/célula, durante dos horas a 37°C. Las microesferas eran de Molecular Probes (Eugene, OR), y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de este tratamiento, las células se incubaron con Suero Bovino Fetal al 15% ("FBS", de Gibco-BRL), durante 15 minutos a 37°C y se enjuagaron con PBS. En ese momento, las cámaras se separaron de los portaobjetos, y los portaobjetos se cubrieron con glicerol y cubreobjetos. Se realizó microscopía fluorescente usando un microscopio Zeiss Axiovert 35 o Nikon Optiphot-2.

La Figura 1 muestra tres imágenes de queratinocitos humanos primarios, tratados durante dos días con vehículo (control), Compuesto I o SLIGRL. Como puede observarse en esta Figura, las microesferas fueron ingeridas por los queratinocitos de control, y se distribuyeron alrededor del núcleo de la célula. Se descubrieron también microesferas alrededor de la célula, probablemente debido a que no se unen específicamente a los componentes de la matriz extracelular secretados por la célula. La cantidad de las microesferas ingeridas cambió con los tratamientos. El tratamiento con el Compuesto I, un inhibidor de la activación de PAR-2 da como resultado una reducción drástica en la cantidad de microesferas ingeridas. El tratamiento con SLIGRL, un péptido activador de PAR-2, da como resultado un aumento drástico en la cantidad de microesferas ingeridas.

Se obtuvieron también los mismos resultados cuando se usó la línea celular humana de queratinocitos HaCaT en lugar de los queratinocitos primarios (véase la Figura 2). SLIGRL, STI y el Compuesto I se ensayaron por su efecto sobre la fagocitosis de queratinocitos. En estos experimentos, la acumulación extracelular de microesferas puede eliminarse por lavado. Las únicas partículas visibles eran las microesferas internalizadas por los queratinocitos, que se acumularon alrededor de sus núcleos. Se demostró que el inhibidor de tripsina de soja ("STI"), que es un inhibidor de serina proteasa capaz de afectar a la ruta de PAR 2, reducía la ingestión de microesfera en este experimento, al igual que el Compuesto I. El tratamiento con SLIGRL, por otro lado, dio como resultado un aumento de la ingestión de microesferas. Cada uno de estos experimentos se repitió al menos tres veces. Estos experimentos demuestran, por primera vez, que los queratinocitos tienen capacidad fagocítica mediada por PAR-2. Estos experimentos demuestran también que los compuestos que regulan la ruta de PAR-2 pueden regular el nivel de fagocitosis de queratinocitos.

Cuando estos experimentos se repitieron usando melanocitos, que no expresan PAR-2, SLIGRL no tenía un efecto inducible sobre la ingestión de microesferas. Los melanocitos no ingerían perlas en ninguna de las condiciones anteriores. Como SLIGRL active únicamente PAR-2, y los melanocitos no expresan PAR-2, estas células no responden a la señal de SLIGRL y la fagocitosis no puede verse afectada.

Ejemplo 2

SLIGRL y el Compuesto I Afectan a la Fagocitosis de Fibroblastos

El experimento descrito en el Ejemplo 1 se repitió usando la línea celular de fibroblastos 92-3T3 (obtenida del ATCC en Rockville, MD). Se sabe que los fibroblastos poseen capacidad fagocítica. De hecho, se observó sólo una ingestión de perlas mínima con fibroblastos no tratados. Sin embargo, los fibroblastos tratados con SLIGRL aumentaron el número de perlas ingeridas (Figura 3). La fagocitosis de fibroblastos inducida por SLIGRL fue cuantitativamente diferente de la de queratinocitos, ya que los fibroblastos no realizan las tareas fagocíticas *in vivo*. Este experimento demuestra, por primera vez, que los fibroblastos tienen capacidad fagocítica inducible por PAR-2. En otras palabras, este experimento demuestra que los compuestos que regulan la ruta de PAR-2 pueden regular el nivel de fagocitosis de fibroblastos.

Ejemplo 3

SLIGRL, STI y el Compuesto I Afectan a la Fagocitosis de Macrófagos

El experimento descrito en el Ejemplo 1 se repitió usando la línea celular de macrófago IC-21 (obtenida del ATCC), que comparte características fagocíticas con macrófagos peritoneales. Como se muestra para queratinocitos y fibroblastos, el Compuesto I y STI redujeron, y SLIGRL aumentó, el número de microesferas ingeridas por estos macrófagos que son células "fagocíticas profesionales".

Para cuantificar mejor el nivel de fagocitosis, se usó el kit de ensayo de fagocitosis de Molecular Probes "Vybrant" (Eugene, Oregon), siguiendo las instrucciones del fabricante, con modificación de las condiciones del cultivo celular para la línea celular IC-21. Este kit usa partículas K-12 de *E. Coli* marcadas con fluoresceína, y está diseñado para cuantificar los efectos de los fármacos y otros factores medioambientales en las funciones fagocíticas. Los macrófagos se trataron durante una noche con 100 nM del Compuesto I, 5 μ M de SLIGRL, o 0,1 mg/ml de STI, todos disueltos en PBS. La capacidad de los macrófagos tratados para ingerir el *E. Coli* fluorescente, medido por este kit, se documenta en la Tabla 1. Este experimento se repitió tres veces. La Tabla 1 representa datos de un experimento.

TABLA 1

	Tratamiento	% de efecto (ingestión)
5	Control sin tratar	100
	SLIGRL	331,6 +/- 5,9
	Compuesto I	89,9 +/- 13,6
10	STI	56,06 +/- 12,4

Este experimento demuestra que la fagocitosis de macrófagos puede regularse mediante los moduladores de la ruta de PAR-2. Demuestra también que ambos compuestos sintéticos y compuestos de origen natural pueden modular la fagocitosis mediante la ruta de PAR-2.

15 Ejemplo 4

Relación Dosis-Respuesta entre la Señalización de PAR-2 y la Fagocitosis de Macrófagos

20 Para verificar la naturaleza cuantitativa del ensayo de fagocitosis de macrófagos, se realizó un experimento de dosis-respuesta. Los macrófagos se trataron con 0, 0,01, 0,1 y 1 mg/ml de STI, y el experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 3. Se observó, una dosis-respuesta de disminución de la fagocitosis con el aumento de las concentraciones de STI, como se indica en la Figura 4A. Se obtuvieron resultados similares para el Compuesto I a 0,01, 0,1 y 1 nM, mientras que el tratamiento con SLIGRL dio como resultado un aumento de la fagocitosis (Figura 4B). Cada experimento se repitió tres veces. Este experimento demuestra que el efecto fagocítico de los compuestos 25 que modulan PAR-2 es sensible a la dosis y puede cuantificarse.

Ejemplo 5

Relación Dosis-Respuesta entre la Señalización de PAR-2 y la Fagocitosis de Queratinocitos

30 Se trataron queratinocitos humanos con concentraciones en aumento de SLIGRL, el activador peptídico y agonista de PAR-2, a 0,5 y 10 μ M durante dos días de la misma manera que la indicada en el Ejemplo 1. Aumentando las concentraciones de SLIGRL da como resultado un aumento de la fagocitosis. Los queratinocitos humanos se trataron también con concentraciones en aumento del Compuesto I y STI durante dos días. El tratamiento con concentraciones 35 en aumento de Compuesto I (de 1 pM a 1 μ M) o con STI (de 0,01 a 1 mg/ml), da como resultado una disminución sensible a la dosis en la fagocitosis (véase la Tabla 2).

40 El análisis de las imágenes de las perlas fluorescentes dentro de los queratinocitos se usó como vía alternativa para cuantificar el efecto fagocítico en este sistema. Se usó Empire Imagins Database Versión 1.1 en un ordenador Gateway 2000P5-100 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD) para capturar imágenes. Se usó Image Pro Plus versión 1.3 para las medidas, y se usó Microsoft Excel versión 5.0 para procesar los datos. Los datos obtenidos de este sistema queratinocito-microesfera estaban totalmente de acuerdo con los datos del sistema macrófago/*E. Coli*.

TABLA 2

	Tratamiento	% de Ingestión
45	Sin tratar	100 +/- 12
50	STI, 0,01%	76 +/- 15
	STI, 0,1%	55 +/- 14
	STI, 1%	41,6 +/- 11

55 Ejemplo 6

El Compuesto I, SLIGRL y STI Afectan a la Adquisición de Pigmento por los Queratinocitos

60 Este ejemplo ensaya la capacidad de los queratinocitos para adquirir melanina o melanosomas *in vitro* y, por lo tanto, funcionan como un sistema simplificado para la captación de melanosoma en la piel. Los queratinocitos se colocaron en placas en portaobjetos de cámara de vidrio como se ha descrito anteriormente, y se trataron durante dos días con SLIGRL, Compuesto I o STI. En este momento, melanina en polvo (de Sigma, St. Louis, MO) se mezcló en PBS estéril a 10 μ g/ml, y se añadió al medio de cultivo (dilución 1:10) durante dos horas. Las células se lavaron después con PBS y se tiñeron con tinción Fontana-Mason ("F & M"). F & M tiñe las moléculas reductoras de nitrato 65 de plata, permitiendo de esta manera la identificación de melaninas dentro de los queratinocitos. Como se muestra en la Figura 5A, los queratinocitos no tratados pudieron ingerir melanina del medio de cultivo, y localizar la melanina internalizada alrededor de sus núcleos. Este sistema, por lo tanto, puede mimetizar la transferencia de melanosoma y la

distribución de melanina *in vivo*, ya que los queratinocitos de la piel usan melanina como capa protectora de UV sobre sus núcleos. Este patrón de tapado se observa también con las microesferas ingeridas como se demuestra en el Ejemplo 1, y en las Figuras 1 y 2. La Figura 5A muestra también que el tratamiento con SLIGRL, que pone en marcha la ruta de PAR-2, aumenta drásticamente la internalización de melanina y su deposición alrededor de los núcleos. El Compuesto I y STI, por otro lado, reducen drásticamente la captación de melanina por los queratinocitos. Este ejemplo demuestra que los agentes de modulación de PAR-2, de origen tanto sintético como natural, pueden afectar a la distribución de los pigmentos en células epidérmicas. Se observaron también los mismos resultados usando melanosomas aislados como se describe en S. Orlow, *et al.*, J. I. D. 100: 55-64 (1993) (Figura 5B).

Ejemplo 7

Se Requiere Contacto Célula-Célula para que el Compuesto I ejerza su Efecto sobre la Transferencia de Pigmentos de Melanocitos a Queratinocitos

Como PAR-2 se expresa en queratinocitos, pero no en melanocitos, se ensayó la posible necesidad de contacto queratinocito-melanocito para que ejerzan su efecto el Compuesto I y SLIGRL sobre la fagocitosis de melanosomas por los queratinocitos. Cultivos de melanocito primarios (disponibles en el mercado en Clonetics, San Diego) se colocaron en placas bajo equivalentes epidérmicos (EpiDerm, de MatTek, Ashland, MA) para crear un co-cultivo monocapa equivalente sin contacto entre queratinocitos y melanocitos. Estos co-cultivos se compararon con equivalentes MelanoDerm (de MatTek), donde los melanocitos están presentes en la capa basal del equivalente. Los cultivos se trataron con el Compuesto I, con el agonista de PAR-2 TFLLRNPNDK, y con el agonista de PAR-2 SLIGRL. Como se muestra en la Tabla 3, los queratinocitos se indican mediante "Q", los melanocitos se indican mediante "M", y la ausencia de contacto queratinocito-melanocito se indican mediante "no cont Q-M". Como se muestra en la Tabla 3, no se observó un efecto sobre la transferencia de melanosomas en co-cultivos monocapa equivalentes (que no tenían contacto queratinocito/melanocito) tratados con estos agentes, cuando se midió como el nivel de pigmentación. En los equivalentes que contenían melanocito, el Compuesto I redujo y SLIGRL indujo la pigmentación afectando a la transferencia de melanosomas. Se observó también el mismo resultado con co-cultivos monocapa queratinocito/melanocito que tenían contacto queratinocito/melanocito. Estos resultados demuestran que el contacto queratinocito-melanocito es necesario para que PAR-2 ejerza su efecto sobre la fagocitosis de melanosomas.

TABLA 3

<u>Tratamiento</u>	<u>Co-Cultivos</u> <u>Monocapa</u> (cont. Q-M)	<u>Equivalentes de</u> <u>Co-Cultivos</u> <u>Monocapa</u> (no cont. Q-M)	<u>Equivalentes</u> <u>Epidérmicos</u> (cont. Q-M)
Compuesto I	aclaramiento	sin efecto	aclaramiento
SLIGRL	oscurecimiento	sin efecto	oscurecimiento
TFLLRNPNDK	sin efecto	sin efecto	sin efecto

Ejemplo 8

Temporización del Efecto del Compuesto I y SLIGRL sobre la Fagocitosis

Queratinocitos humanos se trataron con el Compuesto I o SLIGRL durante periodos de tiempo que variaban de una hora a dos días. Al final del periodo de tratamiento, las células se trataron con microesferas como se ha descrito en el Ejemplo 1. La Tabla 4 muestra el tiempo necesario para que estos compuestos afecten a la fagocitosis. Los signos positivos indican un efecto sobre la fagocitosis, los signos negativos indican que no hay efecto sobre la fagocitosis, y los signos más/menos indican un efecto marginal sobre la fagocitosis. Los efectos medidos fueron una disminución para el Compuesto I y un aumento para SLIGRL. Este experimento demuestra que después de la activación o la inhibición de la ruta de señalización de PAR-2, se necesitan al menos ocho horas para alterar la capacidad fagocítica de los queratinocitos. Esto implica que la señalización de PAR-2 de cómo resultado la síntesis de nuevas proteínas, una reducción en la síntesis de proteínas cuando se necesita un tiempo de renovación para eliminar la proteína o proteínas relevantes existentes, o una redistribución de las proteínas (como ocurre en la reorganización de los componentes citoesqueléticos).

TABLA 4

	Tiempo de Tratamiento	Compuesto I	SLIGRL
5	1 hora	-	-
	2 horas	-	-
	4 horas	-	-
	6 horas	-	-
10	8 horas	-/+	-/+
	16 horas	+	+
	24 horas	+	+
	48 horas	+	+

Ejemplo 9

El Compuesto I, STI y SLIGRL Afectan a la Expresión y Localización Intracelular de ICAM-1

La molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1) es una glicoproteína inducible de la superficie celular que está implicada en la adhesión célula-célula, el sorteo de la membrana celular y en la fagocitosis. Por lo tanto, se ensayó el efecto de la modulación de PAR-2 sobre ICAM-1. Se cultivaron queratinocitos en portaobjetos de cámara y se trataron con SLIGRL, Compuesto I y STI como se ha descrito, seguido de tinción inmunofluorescente para ICAM-1 usando procedimientos convencionales. Se obtuvo suero de burro normal, (usado a dilución 1:5), de Jackson Immunoresearch Laboratory (Westgrove, PA). Se obtuvo un anticuerpo ICAM-1 policlonal cabra antihumano, (usado a dilución 1:200), de R & D Systems (Minneapolis, MN), y se obtuvo anticuerpo de burro anti-cabra conjugado con FITC de Jackson Immunoresearch Laboratory. Como se muestra en la Figura 6A, la localización intracelular de ICAM-1 puede modularse mediante la ruta de PAR-2. En queratinocitos no tratados, ICAM-1 se localizó principalmente en la membrana plasmática, con alguna tinción en la membrana nuclear. Después del tratamiento con el Compuesto I o STI, se observó menos tinción en la membrana citoplásmica, y más en la membrana nuclear. El tratamiento con SLIGRL tuvo el efecto opuesto, dando como resultado una mayor tinción y más difundida en la membrana citoplásmica, y una tinción reducida de la membrana nuclear.

Se realizaron experimentos de inmuno-precipitación y transferencia de Western, de acuerdo con procedimientos conocidos, para evaluar el nivel de la proteína ICAM-1 en queratinocitos tratados. Como se muestra en la Figura 6B, SLIGRL aumentó el nivel de expresión de ICAM-1 en estas células, mientras que el Compuesto I disminuyó el nivel de expresión de ICAM-1.

Ejemplo 10

STI y el Compuesto I Afectan a la Migración de Células Quimiotácticas

Como ICAM-1 está implicado en la migración celular, se estudió la migración celular hacia un péptido quimiotáctico en células tratadas con el Compuesto I y STI. Células PMN humanas se pusieron en un lado de una cámara Boyden, usando técnicas convencionales, y un péptido quimiotáctico (FMLP) se puso en la otra cámara. Se permitió que las células migraran hacia la segunda cámara, y se calculó el número de células que migraron por campo y distancia de migración. El experimento se repitió con células PMN pretratadas con uno de los siguientes: 5 o 0,5 mg/ml de STI, 1 o 0,1 μ M de Compuesto I, un vehículo tampón, y con y sin péptido quimiotáctico. Se midió el número de células por campo que migraron la misma distancia que el control se tratar. Estos datos se resumen en la Tabla 5. Sin el péptido y sin tratamiento, una media de 19 células/campo migró una distancia de 80 micrómetros. La adición del péptido quimiotáctico dio como resultado que 41 células/campo migraron 115 micrómetros. Ambos compuestos inhibieron completamente la migración de células hacia este péptido. En otras palabras, no se identificaron células (o menos de 5/campo) a 115 micrómetros. Esto indica que estos inhibidores no solo afectan a la fagocitosis, sino también a la migración celular. La capacidad para inhibir la migración de PMN es un constituyente importante de los compuestos anti-inflamatorios.

TABLA 5

	Tratamiento	Células/Campo	Migración
60	Tampón	19	80 μ
	FMLP	41	115
	FMLP + Comp. I	<5	115
65	FMLP+ STI	<5	115

Ejemplo 11

SLIGRL y STI Afectan a la Pigmentación de la Piel Humana

5 Se injertaron muestras de piel facial humana blanca en ratones inmuno-deprimidos usando técnicas convencionales. Aproximadamente seis semanas después injertos del mismo individuo, injertados en diferentes ratones, se trataron con vehículo (etanol:propilenglicol 70:30), o con SLIGRL 50 μ M. El tratamiento se realizó a diario, 5 días/semana. El oscurecimiento de los injertos tratados con SLIGRL se observó visualmente durante las últimas semanas de tratamiento (véase la Figura 7A). En el día 66, los animales se sacrificaron y sus pieles se analizaron histológicamente. Las secciones teñidas con F & M pusieron de manifiesto un aumento en la melanina en los injertos tratados con SLIGRL, como se muestra en la Figura 7B. Este experimento demuestra la capacidad para usar SLIGRL en la piel humana para inducir el bronceado sin sol.

15 Se repitió el mismo experimento con muestras de piel del pecho humano blanco en ratones inmuno-deprimidos. Los injertos del mismo individuo se trataron con vehículo (liposomas GDL) o con STI al 1%. Los liposomas GDL se prepararon como se indica en Niemiec, *et al.*, con la excepción de los siguientes cambios: la formulación liposomal no iónica que contenía dilaurato de glicerol (Emulsynt GDL, ISP Van Dyk)/colesterol (Croda)/polioxietilen-10-estearil éter (Brij76, ICI)/polioxietilen-9-lauril éter, una proporción de 37,5: 12,5: 33,3: 16,7. Se usó tampón Hepes, 0,05 M, pH 7,4 (Gibco BRL de Gaithersburg, MD) como la fase acuosa en la preparación de los liposomas. La Figura 7C muestra secciones de piel teñidas con F & M de estos injertos. Esta Figura demuestra claramente la capacidad de STI para reducir la pigmentación en la piel humana.

Ejemplo 12

El Efecto de PAR-2 en la Fagocitosis y Migración está Relacionado con Cambios en la Forma Celular

Tanto la fagocitosis y como la migración celular implican cambios en la forma celular. Por lo tanto, se estudió el efecto de los reactivos de la ruta de PAR-2 sobre podios celulares usando microscopía de barrido electrónico. Los queratinocitos se trataron con el Compuesto I (identificados como "SH00230"), SLIGRL y un vehículo tampón durante dos días, y después se procesaron para SEM usando técnicas convencionales. Como se muestra en la Figura 8, se observa un cambio drástico en la forma de podios celulares. Respecto a los controles tratados con vehículo, las células tratadas con el Compuesto I tienen podios drásticamente menores. En otras palabras, los "dedos" celulares son más cortos y con malformaciones, de manera que no pueden asir objetos tan bien como las células de control. Las muestras tratadas con SLIGRL demostraron el efecto opuesto. Sus podios aumentaron en número, eran algo más largos, y eran mucho más finos. En otras palabras, estas células tienen una mayor probabilidad de interacción productiva con las partículas. Comparando estas imágenes SEM en la Figura 8, está claro que las células tratadas con SLIGRL tienen una mayor capacidad para interactuar con las partículas, mientras que las células tratadas con el Compuesto I son menos adecuadas para dicha tarea.

Ejemplo 13

PAR-2 Afecta a la Organización Citoesquelética

Los cambios en la forma celular demostrados en la Figura 8 requieren la reorganización de los componentes citoesqueléticos. Por lo tanto, se ensayó la organización de filamentos de F-actina después de la modulación de PAR-2. Los queratinocitos se trataron con el Compuesto I (10 nM), STI (0,1 mg/ml), o con SLIGRL (5 μ M) como se ha descrito en el Ejemplo 1, y se tiñeron para F-actina usando técnicas convencionales. La Figura 9 muestra cambios drásticos en la organización de los filamentos de actina después de estos tratamientos. El tratamiento con SLIGRL indujo la polimerización de actina alrededor de la corteza celular, un área importante en el control del movimiento de la célula y de la fagocitosis. STI y Compuesto I, por el contrario, redujeron la organización ordenada de la corteza celular, reduciendo de esta manera capacidad de las células para regular su movimiento y sus podios.

Ejemplo 14

La Modulación de ICAM-1 Afecta a la Fagocitosis de Queratinocitos

Los queratinocitos se expusieron a microesferas fluorescentes (es decir, perlas) como se ha descrito en el Ejemplo 1. Estas células se pretrataron con 50 pg/ml de anticuerpos ICAM-1 de ratón antihumanos (de R & D Systems) durante 16 horas, y después se estimularon de nuevo durante cuatro horas antes de incubarlos con las perlas. Como se muestra en la Figura 10, el bloqueo de la superficie de moléculas ICAM-1 sobre los queratinocitos dio como resultado una reducción de la ingestión de perlas. Este experimento, por lo tanto, establece una relación entre ICAM-1 y la fagocitosis de queratinocitos.

Ejemplo 15

La Formulación STI/Liposoma puede Aclarar las Manchas provocadas por la Edad en Seres Humanos

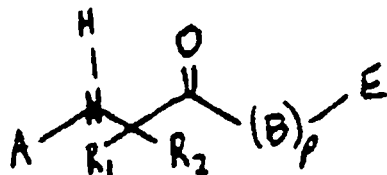
Un individuo con tres manchas provocadas por la edad en el dorso de la mano fue tratado durante ocho semanas, dos veces al día, de la siguiente manera. La mancha provocada por la edad proximal se trató con placebo, que contenía 20 mg/ml de liposomas. La mancha provocada por la edad media no se trató. La mancha provocada por la edad distal se trató con STI al 1%, en liposomas (20 mg/ml). Se prepararon liposomas GDL como se indica en Niemiec, *et al.*, con la excepción de los siguientes cambios. La formulación liposomal no iónica que contenía dilaurato de glicerol (Emulsynt GDL, ISP Van Dyk)/colesterol (Croda)/polioxietilen-10-estearil éter (Brij76, ICI)/polioxietilen-9-lauril éter, como una proporción de 37,5: 12,5: 33,3: 16,7. Se usó tampón Hepes, 0,05 M, pH 7,4 (Gibco-BRL de Gaithersburg, MD) como fase acuosa en la preparación de los liposomas. Se tomaron imágenes digitales de luz UV y luz visible en los momentos de 0,4 y 8 semanas de tratamiento. Los valores de L* (brillo) se calcularon a partir de las imágenes usando Adobe Photoshop.

Como se muestra en la Figura 11, la mancha provocada por la edad tratada con STI se aclaró después de 8 semanas de tratamiento. La Figura 11 está compuesta por cuatro imágenes. El panel izquierdo es una imagen de luz visible de la mano, antes (superior) y después (inferior) de 8 semanas de tratamiento. En esta orientación, la mancha provocada por la edad proximal se trata con placebo, la mancha provocada por la edad media no se trata, y la mancha provocada por la edad distal se trata con STI. El panel derecho muestra la misma mano en los mismos instantes, usando fotografía UV. La luz UV permite la visualización del pigmento más profunda en la piel, demostrando que el efecto blanqueador de STI no es superficial. La Figura 11 demuestra claramente que la formulación STI aclaró la mancha provocada por la edad distal. Se calculó un aumento de 15 unidades L* para esta mancha tratada con STI, demostrando además la capacidad de este tratamiento para aclarar las manchas provocadas por la edad.

Ejemplo 16

Compuestos Reductores de la Fagocitosis Análogos al Compuesto I

Ciertos compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Costanzo, *et al.*, "Potent Thrombin Inhibitors That Probe the S₁' Subsite: Tripeptide Transition State Analogues Based on a Heterocycle-Activated Carbonyl Group", J. Med. Chem., 1996, Vol. 39, pág. 3039-3043, se comportan como inhibidores de serina proteasa (es decir, como inhibidores de la fagocitosis), y tienen la siguiente fórmula estructural:



en la que:

A se selecciona entre el grupo constituido por alquilo C₁₋₈, carboxi alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄ carbonil alquilo C₁₋₄, fenil alquilo C₁₋₄, fenil alquilo C₁₋₄ sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de, alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxi, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), formilo, alcoxi C₁₋₄ carbonilo, alquil C₁₋₂ carbonilo, fenil alcoxi C₁₋₄ carbonilo, cicloalquil C₃₋₇ carbonilo, fenilcarbonilo, fenilcarbonilo sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxi, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), alquil C₁₋₄ sulfonilo, alcoxi C₁₋₄ sulfonilo, perfluoro C₁₋₄ alquil-sulfonilo, fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxi, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 10-alcanforsulfonilo, fenil alquil C₁₋₄ sulfonilo, fenil alquil C₁₋₄ sulfonilo sustituido, alquil C₁₋₄ sulfonilo, perfluoro alquil C₁₋₄ sulfonilo, fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxi, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), fenil alquil C₁₋₄ sulfonilo, fenil alquil C₁₋₄ sulfonilo sustituido; 1-naftilsulfonilo, 2-naftilsulfonilo o naftilsulfonilo sustituido (donde los sustituyentes naftilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxi, halo, amido, nitro, amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 1-naftilsulfonilo, 2-naftilsulfonilo o naftilsulfonilo sustituido (donde los sustituyentes naftilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxi, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo);

un aminoácido D o L que se acopla en su extremo carboxi al nitrógeno representado en la estructura anterior y se selecciona entre el grupo constituido por alanina, asparagina, ácido 2-azetidincarboxílico, glicina, N-alquil C₁₋₈ glicina, prolina, ácido 1-amino-1-cicloalquil C₃₋₈ carboxílico, ácido tiazolidin-4-carboxílico, ácido 5,5-dimetiltiazolidin-

4-carboxílico, ácido oxazolidin-4-carboxílico, ácido pipercolínico, valina, metionina, cisteína, serina, treonina, norleucina, leucina, *terc*-leucina, isoleucina, fenilalanina, 1-naftalanina, 2-naftalanina, 2-tienilalanina, 3-tienilalanina, ácido [1,2,3,4]-tetrahydroisoquinolin-1-carboxílico y ácido [1,2,3,4]-tetrahydroisoquinolin-2-carboxílico

5 donde el extremo amino de dicho aminoácido está conectado a un miembro seleccionado entre el grupo constituido por alquilo C₁₋₄, tetrazol-5-il-alquilo C₁₋₂, carboxi alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄ carbonil alquilo C₁₋₄, fenil alquilo C₁₋₄,
 10 fenil alquilo C₁₋₄ sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxilo o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 1,1-difenil alquilo C₁₋₄, 3-fenil-2-hidroxipropionilo, 2,2-difenil-1-hidroxietilcarbonilo, [1,2,3,4]-tetrahydroisoquinolin-1-carbonilo, [1,2,3,4]-tetrahydroisoquinolin-3-carbonilo, 1-metilamino-1-ciclohexanocarbonilo, 1-hidroxil-1-ciclohexanocarbonilo, 1-hidroxil-1-fenilacetilo, 1-ciclohexil-1-hidroxiacetilo, 3-fenil-2-hidroxipropionilo, 3,3-difenil-2-hidroxipropionilo, 3-ciclohexil-2-hidroxipropionilo, formilo, alquil C₁₋₄ carbonilo, perfluoro alquilo C₁₋₄, alquil C₁₋₄ carbonilo, fenil alquil C₁₋₄ carbonilo, fenil alquil C₁₋₄ carbonilo sustituido
 15 (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 1,1-difenilalquil C₁₋₄ carbonilo, 1,1-difenilalquil C₁₋₄ carbonilo sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), perfluoro alquil C₁₋₄ sulfonilo, alquil C₁₋₄ sulfonilo, alcoxi C₁₋₄ sulfonilo, fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido (donde los sustituyentes
 20 fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoroalquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxilo o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 10-alcansulfonilo, fenil alquil C₁₋₄ sulfonilo, fenil alquil C₁₋₄ sulfonilo sustituido, perfluoro alquil C₁₋₄ sulfonilo, alquil C₁₋₄ sulfonilo, fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 1-naftilsulfonilo, 1,2-naftilsulfonilo, naftilsulfonilo sustituido (donde los sustituyentes naftilo se seleccionan indepen-
 25 dientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 1-naftilsulfonilo sustituido (donde los sustituyentes naftilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo);

o un polipéptido que comprende dos aminoácidos,

35 en el que el primer aminoácido es un aminoácido D o L, unido mediante su extremo carboxi al nitrógeno representado en la Fórmula I y seleccionado entre el grupo constituido por glicina, N-alquil C₁₋₈ glicina, alanina, ácido 2-azetidincarboxílico, prolina, ácido tiazolidin-4-carboxílico, ácido 5,5-dimetiltiazolidin-4-carboxílico, ácido oxazolidin-4-carboxílico, ácido 1-amino-1-cicloalquil C₃₋₈ carboxílico, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, 3-(alcoxi C₁₋₄) prolina, 4-(alcoxi C₁₋₄) prolina, 3,4-deshidroprolina, ácido 2,2-dimetil-4-tiazolidincarboxílico, ácido 2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico, ácido pipercolínico, valina, metionina, cisteína, asparagina, serina, treonina, leucina, *terc*-leucina, isoleucina, fenilalanina, 1-naftalanina, 2-naftalanina, 2-tienilalanina, 3-tienilalanina, ácido [1,2,3,4]-tetrahydroisoquinolin-2-carboxílico, 4-alquil C₁₋₄ éster del ácido aspártico y 5-alquil C₁₋₄ éster del ácido glutámico y

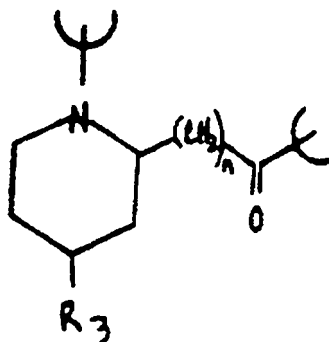
en el que el segundo aminoácido D o L, se une al extremo amino de dicho primer aminoácido, y se selecciona entre el grupo constituido por fenilalanina, 4-benzoilfenilalanina, 4-carboxifenilalanina, 4 (carboxi alquil C₁₋₂) fenilalanina, 45 fenilalanina sustituida (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 3-benzotienilalanina, 4-bifenilalanina, homofenilalanina, ácido octahidroindol-2-carboxílico, 2-piridilalanina, 3-piridilalanina, 4-tiazolilalanina, 2-tienilalanina, 3-(3-benzotienil) alanina, 3-tienilalanina, triptófano, tirosina, asparagina, 3-tri-alquil C₁₋₄ sililalanina, ciclohexilglicina, difenilglicina, fenilglicina, sulfóxido de metionina, metionina sulfona, 2,2-diciclohexilalanina, 2-(1-naftilalanina), 2-(2-naftilalanina), fenilalanina sustituida con fenilo (donde los sustituyentes se seleccionan entre alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), ácido aspártico, 4-alquil C₁₋₄ éster del ácido aspártico, ácido glutámico, 5-alquil C₁₋₄ éster del ácido glutámico, cicloalquil C₃₋₈ alanina, cicloalquil C₃₋₈ alanina sustituida (donde los sustituyentes del anillo son carboxi, alquil C₁₋₄ éster, cicloalquil 55 C₃₋₈ alanina, cicloalquil C₃₋₈ alanina sustituida (donde los sustituyentes del anillo son carboxi, alcoxi C₁₋₄ carbonilo o aminocarbonilo), 2,2-difenilalanina y todos los alfa-alquil C₁₋₅ de todos los derivados aminoacídicos de los mismos, y

en el que el extremo amino de dicho segundo aminoácido está no sustituido o monosustituido con un miembro del grupo constituido por formilo, alquilo C₁₋₁₂, tetrazol-5-il alquilo C₁₋₂, carboxi alquilo C₁₋₈, carboalcoxi alquilo C₁₋₄, 60 fenil alquilo C₁₋₄, fenil alquilo C₁₋₄ sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de, alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 1,1-difenil alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₆ carbonilo, fenil alcoxi C₁₋₆ carbonilo, alquil C₁₋₂ carbonilo, perfluoro alquil C₁₋₄ carbonilo, alquil C₁₋₄ carbonilo, fenilalquil C₁₋₄ carbonilo, fenilalquil C₁₋₄ carbonilo sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente entre uno o más de alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C₁₋₄ amino, dialquil C₁₋₄ amino, carboxi o alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 1,1-difenil alquilo C₁₋₄, perfluoro alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄ carbonilo), 10-alcansulfonilo, fenil alquil C₁₋₄ sulfonilo, fenil alquil C₁₋₄ sulfonilo sustituido, alquil C₁₋₄ sulfonilo, perfluoro alquil C₁₋₄ sulfonilo, fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido (donde los sustituyentes fenilo se seleccionan independientemente)

te entre uno o más de alquilo C_{1-4} , perfluoro alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} , hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C_{1-4} amino, dialquil C_{1-4} amino, carboxilo o alcoxi C_{1-4} carbonilo), fenilalquil C_{1-4} sulfinilo, fenilalquil C_{1-4} sulfinilo sustituido, 1-naftilsulfonilo, 2-naftilsulfonilo, naftilsulfonilo sustituido (donde el sustituyente naftilo se selecciona entre alquilo C_{1-4} , perfluoro alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} , hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C_{1-4} amino, dialquil C_{1-4} amino, carboxilo o alcoxi C_{1-4} carbonilo), 1-naftil-sulfinilo, 2-naftilsulfinilo y naftilsulfinilo sustituido (donde el sustituyente naftilo se selecciona entre alquilo C_{1-4} , perfluoro alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} , hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C_{1-4} amino, dialquil C_{1-4} amino, carboxilo o alcoxi C_{1-4} carbonilo); R_1 se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno y alquilo; R_2 se selecciona entre el grupo constituido por amino alquilo C_{2-5} , guanidino alquilo C_{2-5} , alquil C_{1-4} guanidinoalquilo C_{2-5} , dialquil C_{1-4} guanidinoalquilo C_{2-5} , amidinoalquilo C_{2-5} , alquil C_{1-4} amidinoalquilo C_{2-5} , dialquil C_{1-4} amidinoalquilo C_{2-5} , alcoxi C_{1-3} alquilo C_{2-5} , fenilo, fenilo sustituido (donde los sustituyentes se seleccionan independientemente entre uno o más de amino, amidino, guanidino, alquil C_{1-4} amino, dialquil C_{1-4} amino, halógeno, perfluoro alquilo C_{1-4} , alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-3} o nitro), bencilo, bencilo sustituido con fenilo (donde los sustituyentes se seleccionan independientemente entre uno o más de amino, amidino, guanidino, alquil C_{1-4} amino, dialquil C_{1-4} amino, halógeno, perfluoroalquilo C_{1-4} , alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-3} , o nitro), hidroxialquilo C_{2-5} , alquil C_{1-5} aminoalquilo C_{2-5} , dialquil C_{1-5} aminoalquilo C_{2-5} , 4-aminociclohexil alquilo C_{0-2} y alquilo C_{1-5} ;

p es 0 o 1;

B es



en la que n es 0-3, R_3 es H o C alquilo C_{1-5} y el resto carbonilo de B está unido a E; E es un heterociclo seleccionado entre el grupo constituido por oxazolin-2-ilo, oxazol-2-ilo, tiazol-2-ilo, tiazol-5-ilo, tiazol-4-ilo, tiazolin-2-ilo, imidazol-2-ilo, 4-oxo-2-quinoxalin-2-ilo, 2-piridilo, 3-piridilo, benzo[b]tiofen-2-ilo, triazol-4-il triazol-6-ilo, pirazol-2-ilo, 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazol-2-ilo, nafto[2,1-d]tiazol-2-ilo, nafto[1-2-d]tiazol-2-il quinoxalin-2-ilo, isoquinolin-1-ilo, isoquinolin-3-ilo, benzo[b]furan-2-ilo, pirazin-2-ilo, quinazolin-2-ilo, isotiazol-5-ilo, isotiazol-3-ilo, purin-8-il y un heterociclo sustituido donde los sustituyentes se seleccionan entre alquilo C_{1-4} , perfluoro alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} , hidroxilo, halo, amido, nitro, amino, alquil C_{1-4} amino, dialquil C_{1-4} amino, carboxilo, alcoxi C_{1-4} carbonilo, hidroxilo o fenilalquil C_{1-4} aminocarbonilo, indol-2-ilo, benzoxazol-2-ilo, benzimidazol-2-il y benzotiazol-2-ilo.

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de un inhibidor de serina proteasa para la fabricación de un medicamento para tratar a un mamífero que padece un trastorno que mejora con una disminución de la fagocitosis o de la expresión de ICAM-1 en las células apropiadas, siendo dicho trastorno un trastorno del sistema inmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno del sistema nervioso central, un trastorno de la piel, una herida física, un trastorno respiratorio, o restenosis.

10 2. El uso de la reivindicación 1 en el que dicho trastorno es un trastorno del sistema inmune o un trastorno inflamatorio.

3. El uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 en el que dicho inhibidor de serina proteasa es un inhibidor de tripsina.

15 4. El uso de la reivindicación 3 en el que dicho inhibidor de tripsina es inhibidor de tripsina de soja.

20 5. Inhibidor de tripsina de soja, para el tratamiento de un mamífero que padece un trastorno que mejora con una disminución de la fagocitosis o de la expresión de ICAM-1 en las células apropiadas, siendo dicho trastorno un trastorno del sistema inmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno del sistema nervioso central, un trastorno de la piel, una herida física, un trastorno respiratorio, o restenosis.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

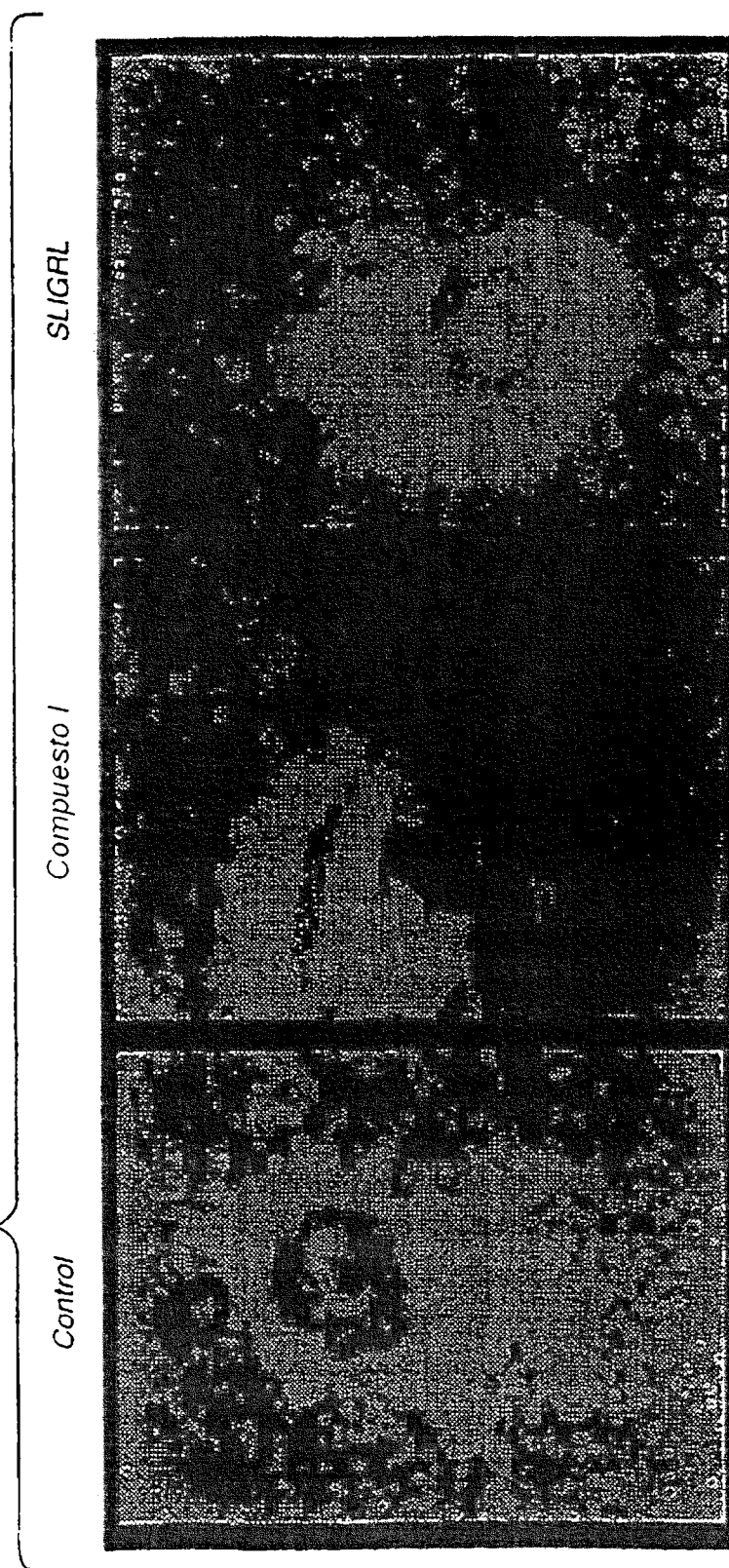


FIG. 2

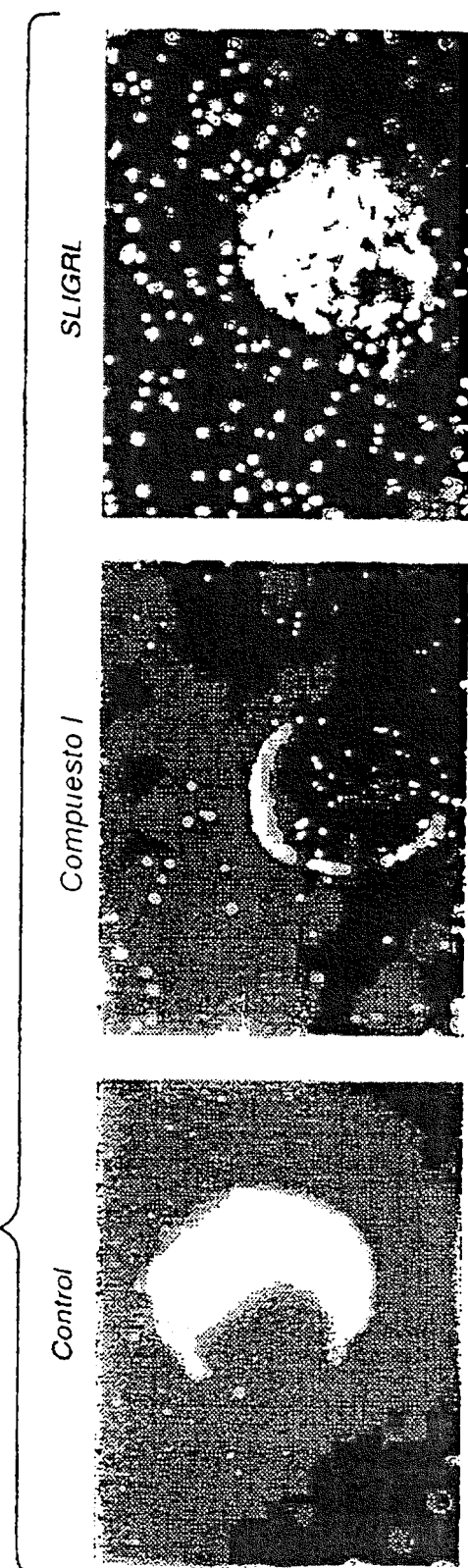


FIG. 3

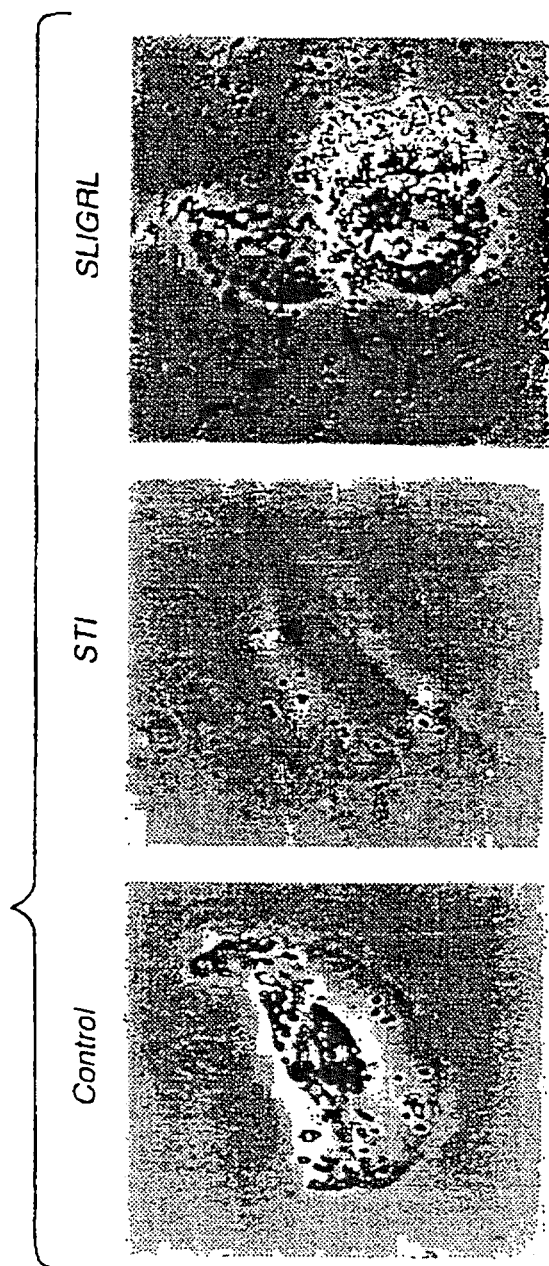


FIG. 4A

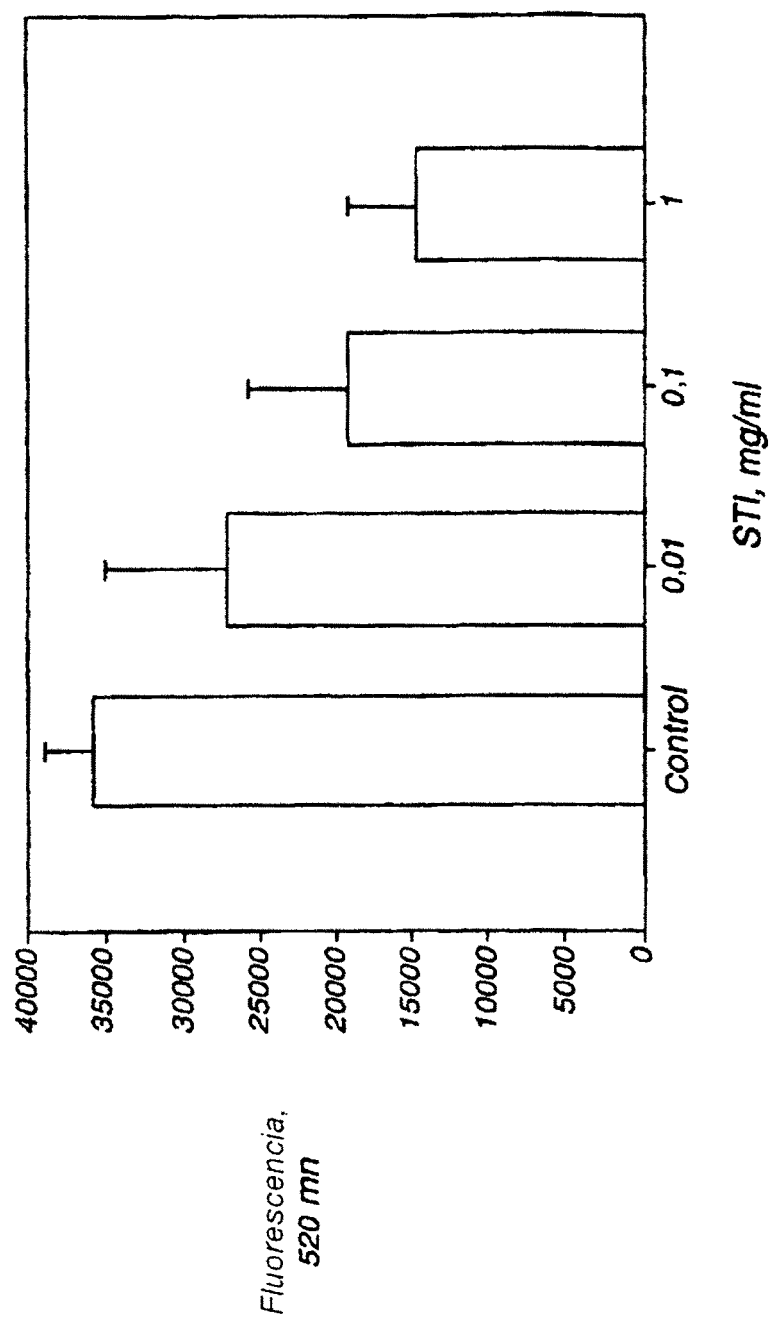
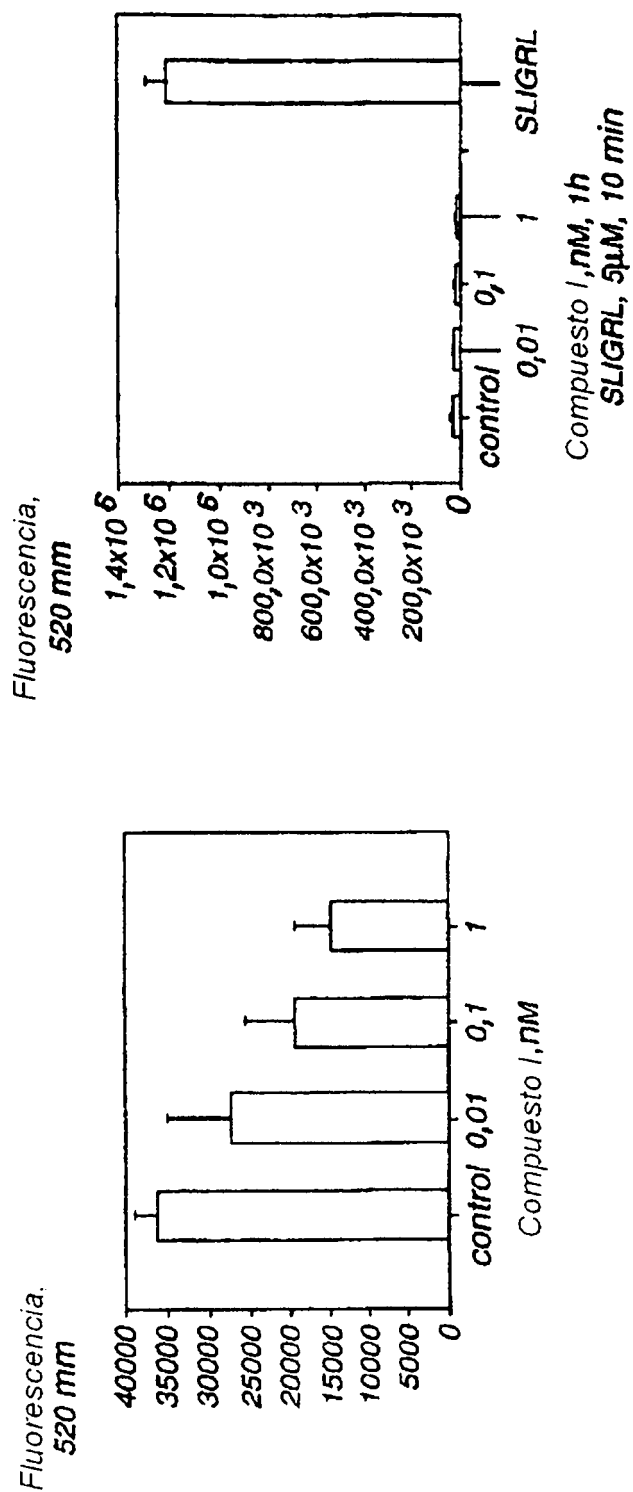


FIG. 4B



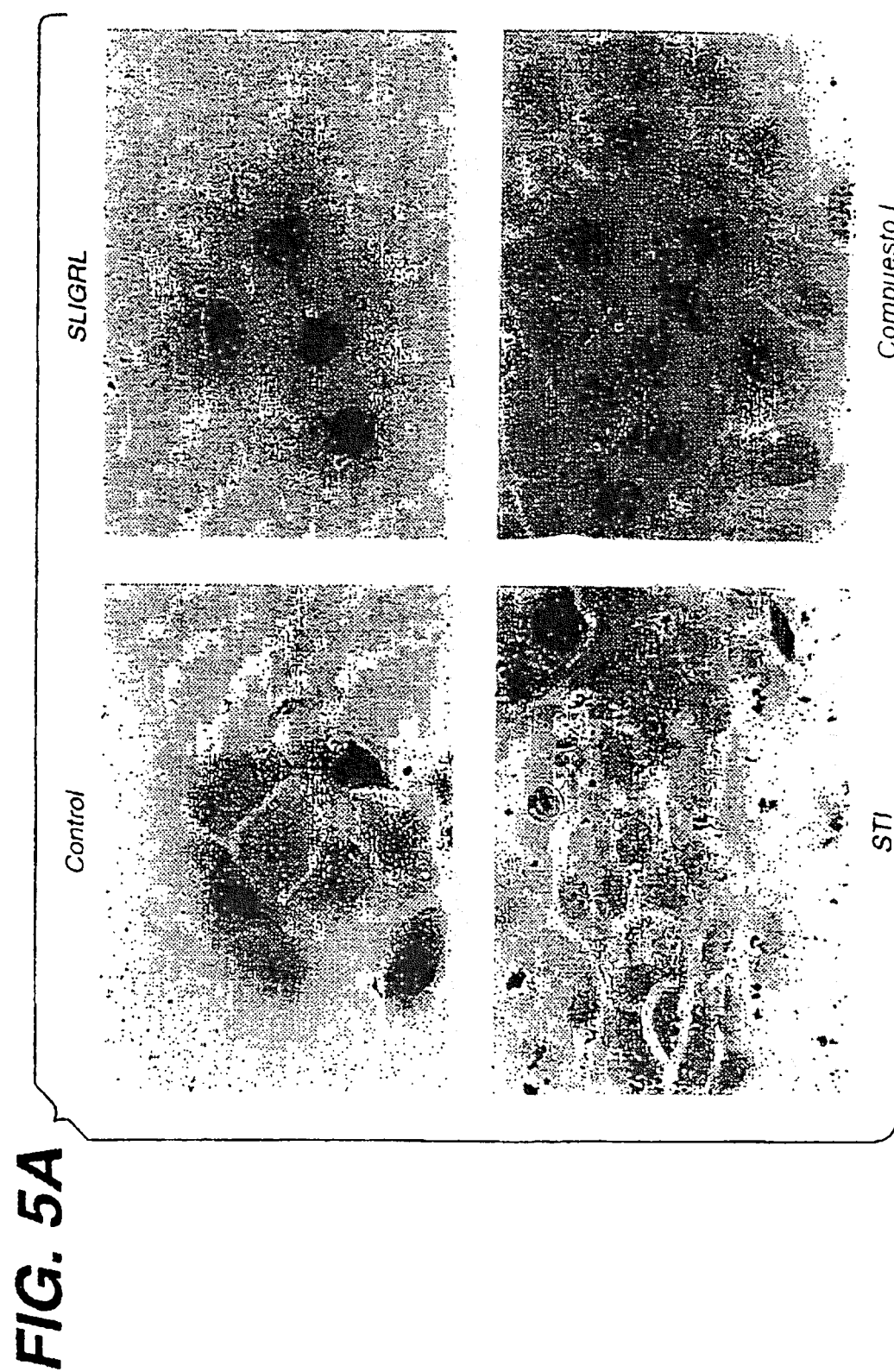
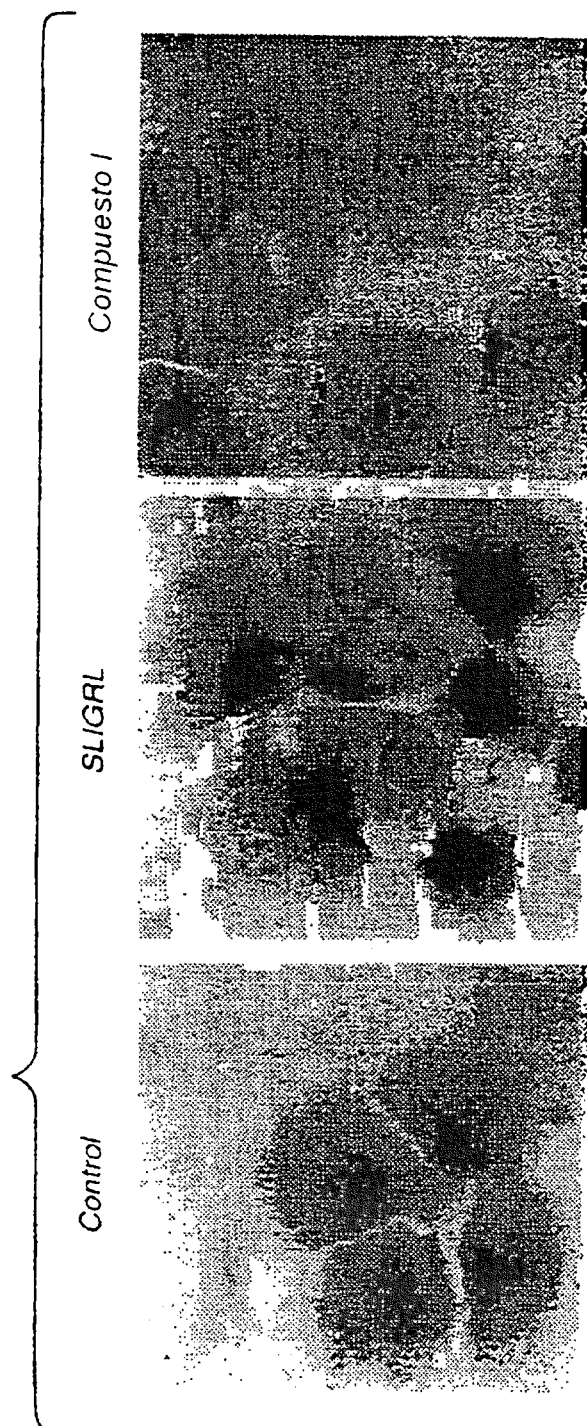


FIG. 5B



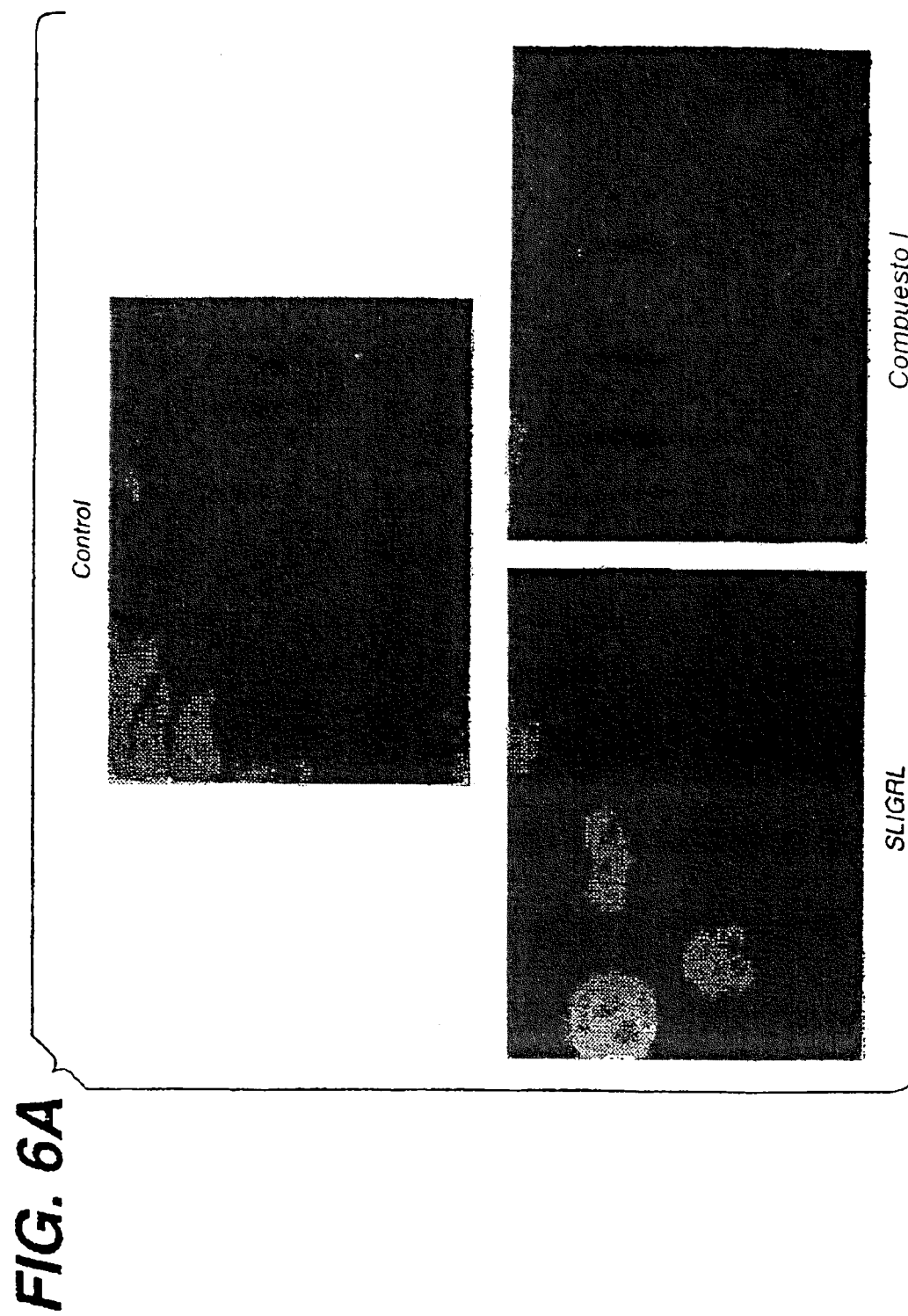


FIG. 6B

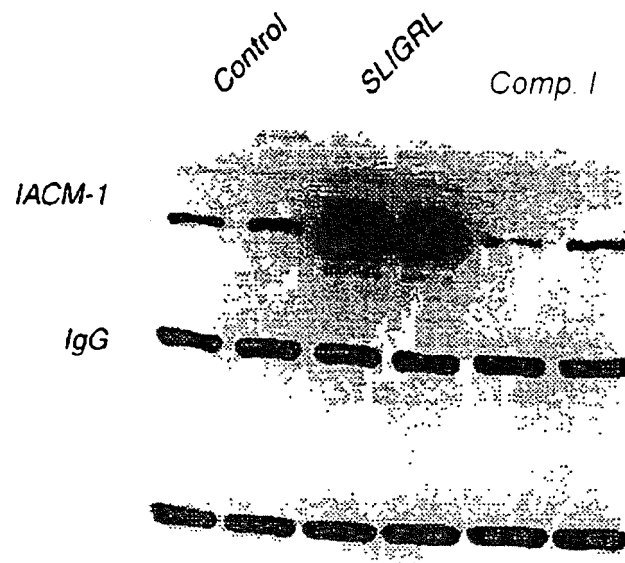


FIG. 7A

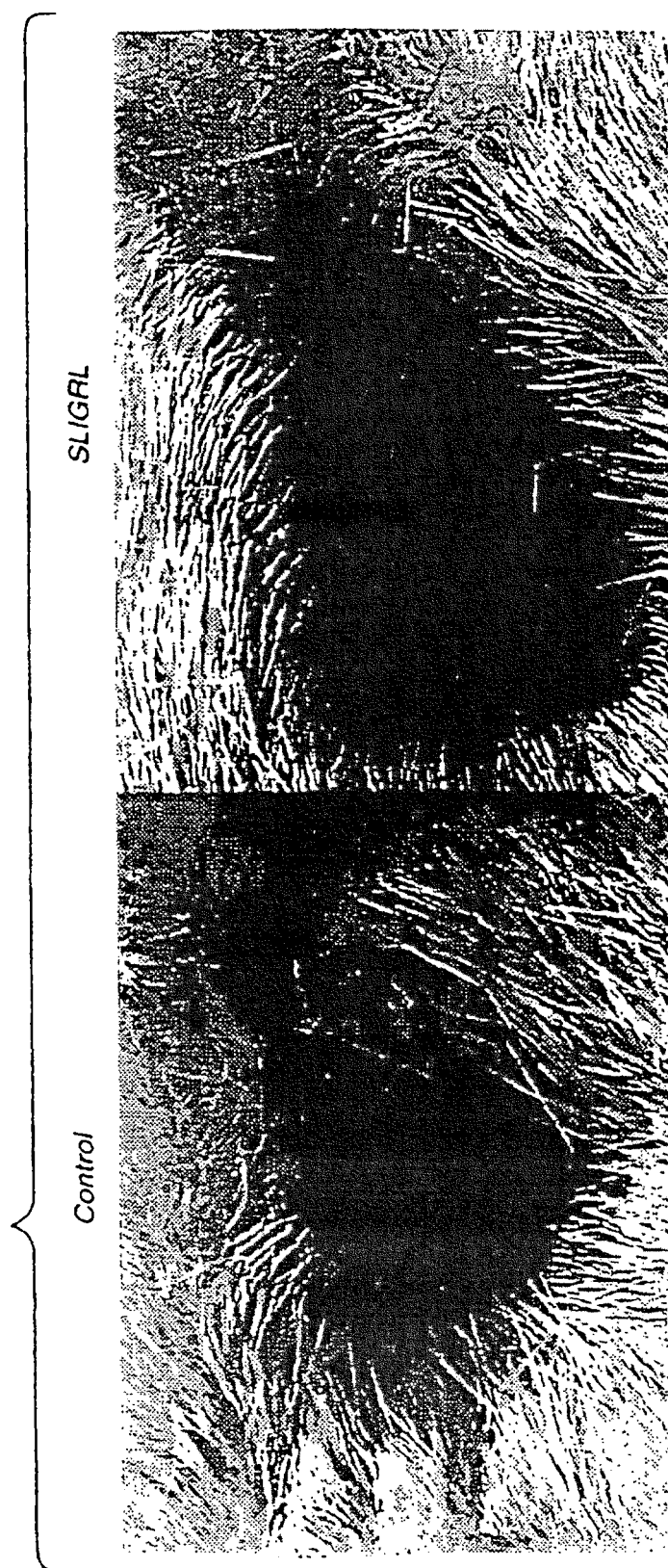


FIG. 7B



FIG. 7C



FIG. 8

Control



SH00230



SLIGRL



FIG. 9

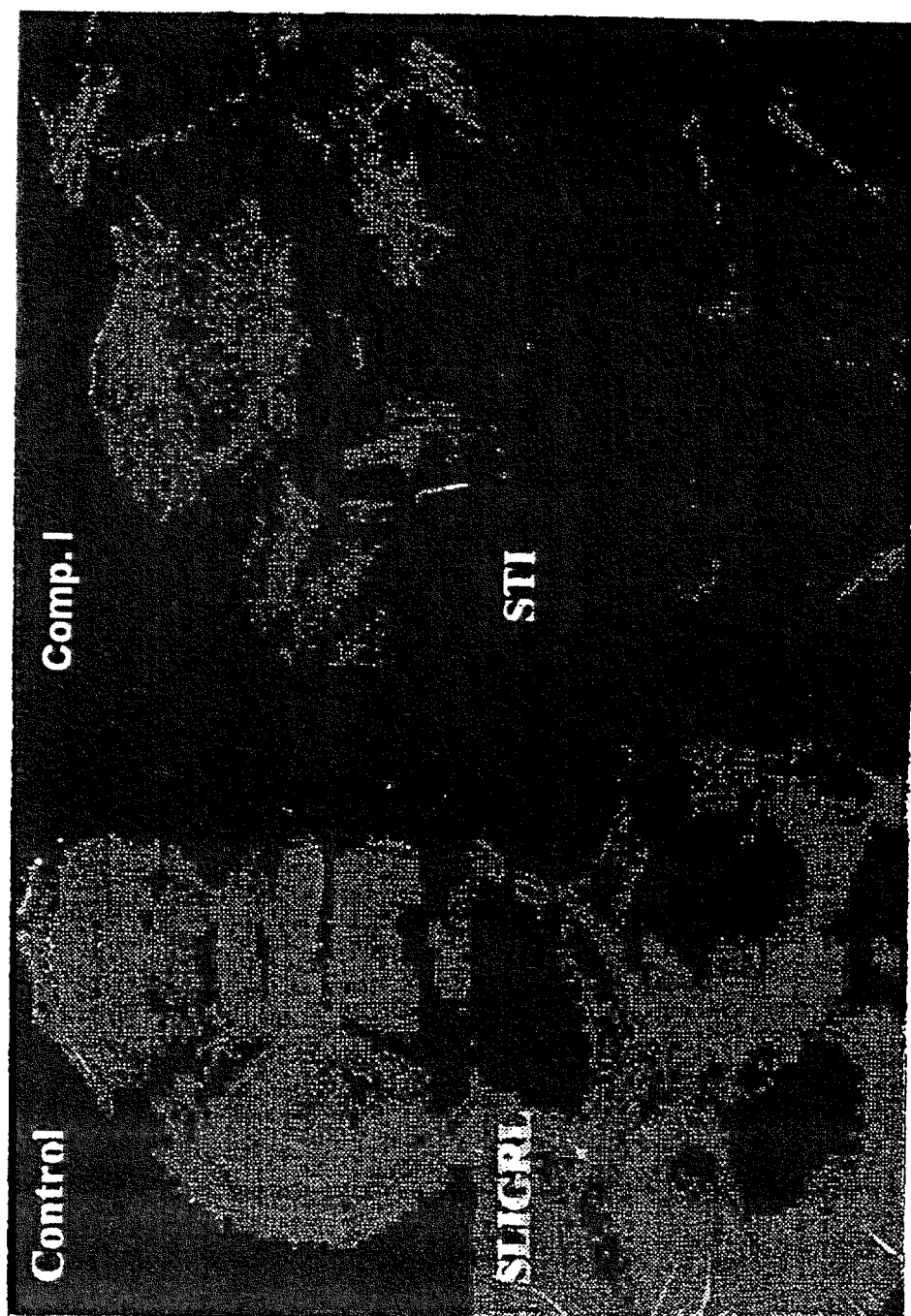


FIG. 10

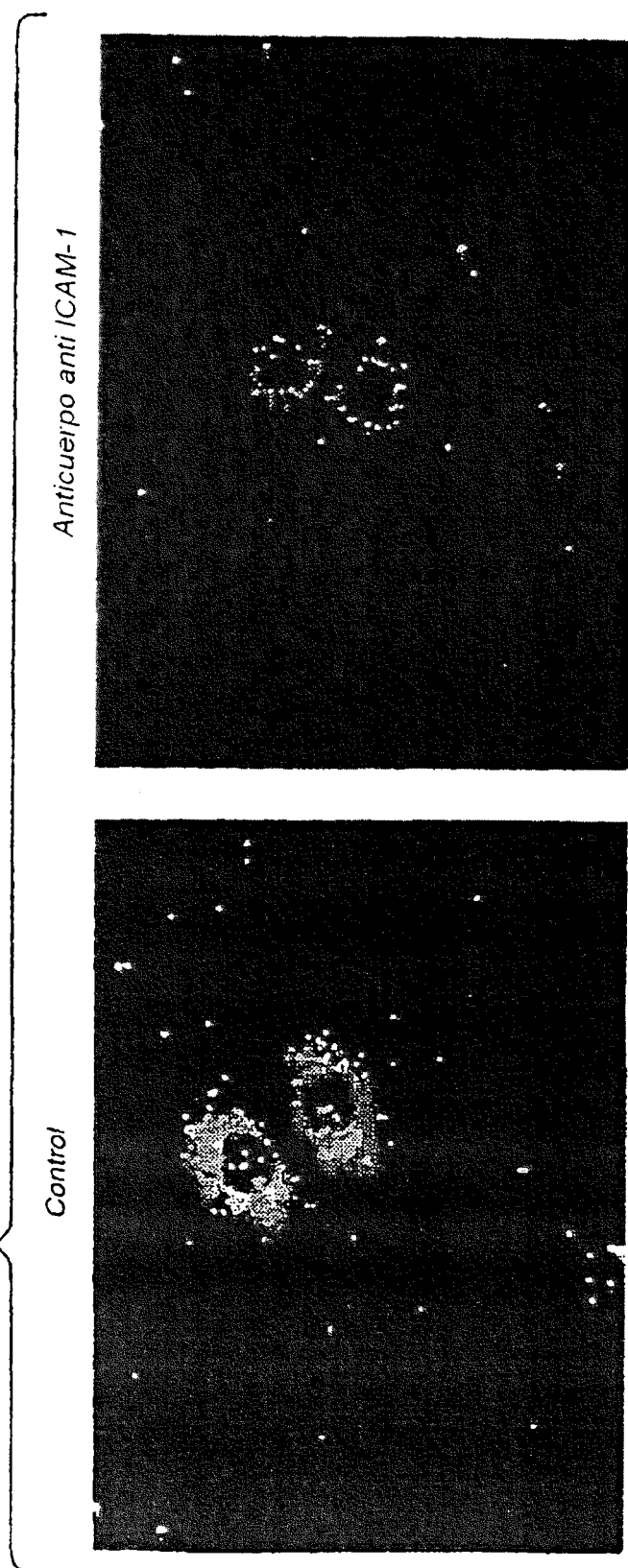


FIG. 11

