

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 218**

51 Int. Cl.:

A61K 38/13 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2019** **PCT/US2019/047354**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2020** **WO20041378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2019** **E 19853155 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 3840769**

54 Título: **Composiciones de ciclosporina y métodos de uso**

30 Prioridad:

22.08.2018 US 201862721195 P

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

29.11.2024

73 Titular/es:

BACAINN BIOTHERAPEUTICS, LTD. (100.0%)
Cayman Corporate Centre, 27 Hospital Road
George Town, KY1-9008, KY

72 Inventor/es:

MURPHY, CHRIS;
FARQUHAR, RONALD y
DOLLE, ROLAND E.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 990 218 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

Composiciones de ciclosporina y métodos de uso

5 Referencia a solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. N.º 62/721.195, presentada el 22 de agosto de 2018.

10 Campo técnico

La tecnología de la presente divulgación se refiere a métodos, compuestos y composiciones para tratar o prevenir enfermedades asociadas con la inflamación mediada por neutrófilos.

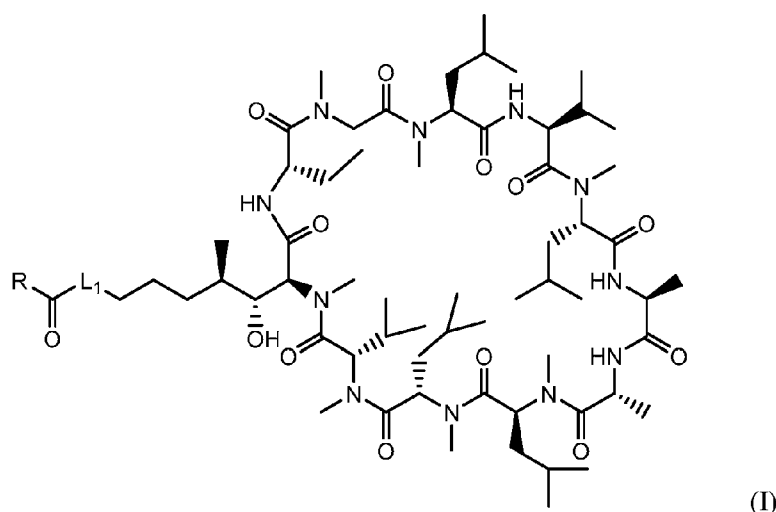
15 Antecedentes

La inflamación, y en particular la enfermedad inflamatoria crónica (EIC), tiene una prevalencia muy alta a nivel mundial y se considera una de las principales causas del desarrollo de diferentes enfermedades como enfermedad cardiovascular, diabetes, obesidad, osteoporosis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, asma y enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central, tales como depresión y enfermedad de Parkinson. Las células epiteliales aumentan drásticamente la expresión superficial de la proteína de resistencia a múltiples fármacos del transportador ABC de membrana 2 (MRP2) en respuesta a la infección con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*) o una variedad de otros patógenos. La vía biosintética intracelular del eicosanoide HXA₃ se regula positivamente de manera simultánea, y el aumento de MRP2 en la superficie sirve para transportar HXA₃ al lumen intestinal. Esto establece un gradiente de concentración de HXA₃ a través del epitelio que dirige la quimiotaxis de los neutrófilos desde el lado basolateral al lumen, lo que da como resultado un proceso inflamatorio crítico. Por lo tanto, la inhibición de MRP2 es una vía para el tratamiento o la prevención de la enfermedad inflamatoria.

Los cereales que contienen gluten, por ejemplo, trigo, centeno y cebada, son una parte importante de la dieta humana. Sin embargo, la gliadina, el componente principal del gluten, se ha visto implicada en una diversidad de trastornos, incluyendo enfermedad celíaca, síndrome de intestino irritable, sensibilidad al gluten no celíaca, diabetes de tipo 1, esquizofrenia y autismo. Se ha demostrado que la gliadina aumenta la permeabilidad epitelial intestinal y actúa como un factor quimioatrayente de neutrófilos de potencia similar a fMet-Leu-Phe a través de la unión a FPR1. Por lo tanto, la inhibición de FPR1 es una vía para el tratamiento o la prevención de afecciones relacionadas con la gliadina.

Sumario

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I,



un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores; en donde L₁ es un grupo alquilo C₀ a C₄ opcionalmente sustituido por uno o más F; R es PEG, en donde el PEG comprende un grupo enlazador, L₂.

En algunas realizaciones, R se selecciona de -NH(CH₂)₂₋₆(CH₂CH₂O)₄₂₋₄₆-O(CH₂)₀₋₅CH₃. En algunas realizaciones, R se selecciona del grupo que consiste en CH₃O-(CH₂CH₂O)₄₄-CH₂CH₂CH₂NH- (BT051), CH₃O-(CH₂CH₂O)₄₄-

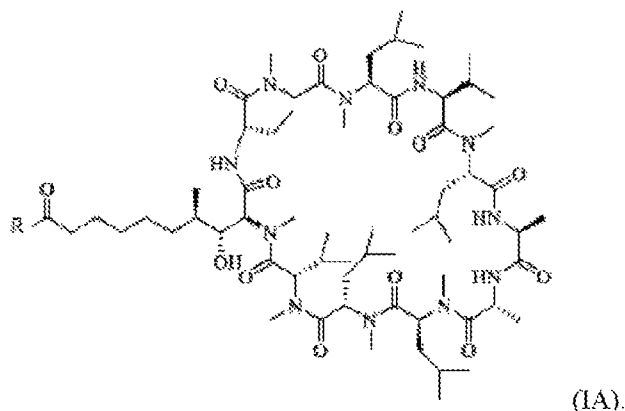
CH₂CH₂NH- (BT090),

En algunas realizaciones, L₁ es un grupo etileno o un grupo propileno.

5 R es un PEG que tiene de 40 a 50 unidades de óxido de etileno.

L₂ es un heteroalquileo C₁₋₆ sin sustituir que tiene uno o dos átomos de nitrógeno.

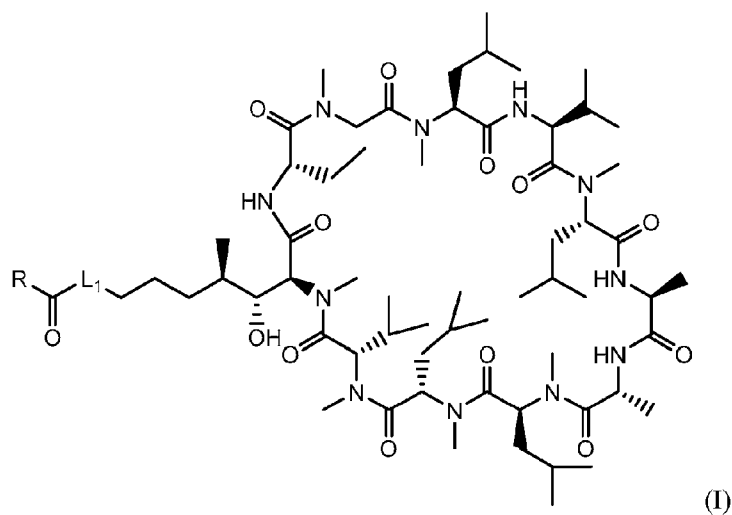
10 En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura de Fórmula IA, un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores:



15 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad asociada con la inflamación mediada por neutrófilos en un tejido diana de un sujeto mamífero que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I:

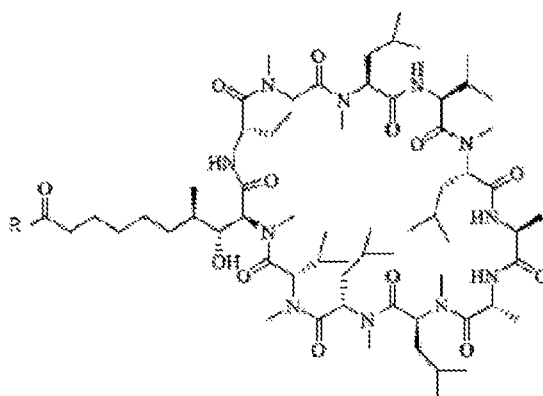
20



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde L₁ es un grupo alquilo C₀ a C₄ opcionalmente sustituido por uno o más F; R es como se ha definido anteriormente.

25

En algunas realizaciones, L₁ puede ser etileno y el compuesto de Fórmula I tiene la Fórmula IA:



(IA).

En algunas realizaciones, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad intestinal, colitis, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedad inflamatoria cutánea, enfermedad ocular, enfermedad urogenital y enfermedades de transmisión sexual.

En algunas realizaciones, la enfermedad intestinal se selecciona del grupo que consiste en proctitis, orquitis, enfermedad de Crohn y enfermedad celíaca.

En algunas realizaciones, la colitis se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa, también conocida como colitis ulcerosa, enterocolitis infecciosa/no infecciosa y enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

En algunas realizaciones, la enfermedad pulmonar inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en infección neumocócica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar.

En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria cutánea se selecciona del grupo que consiste en dermatitis (eccema), rosácea, dermatitis seborreica y psoriasis.

En algunas realizaciones, la enfermedad ocular se selecciona del grupo que consiste en uveítis, retinitis, queratitis y degeneración macular.

En algunas realizaciones, la enfermedad urogenital comprende una infección de las vías urinarias.

En algunas realizaciones, la enfermedad de transmisión sexual se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria pélvica, infección por gonorrea, infección por clamidia, herpes y uretritis.

En algunas realizaciones, la etapa de administración se selecciona del grupo que consiste en administración tópica y administración en una superficie luminal del tejido diana.

En algunas realizaciones, la inflamación es una inflamación no infecciosa. En algunas realizaciones, la inflamación es una inflamación infecciosa.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más segundos compuestos que inhiben uno o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la HXA₃ sintasa, en donde la cantidad terapéutica del segundo compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos que aumentan la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), en donde la cantidad terapéutica del tercer compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar uno o más compuestos que inhiben una o más de las proteínas de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepoxilina A₃ (HXA₃) sintasa, en donde la cantidad terapéutica del segundo compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos que aumentan una o más N-aciletanolaminas (NAE), en donde la cantidad terapéutica del tercer compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

En algunas realizaciones, la inflamación está asociada con la enfermedad de Crohn y el tratamiento o prevención comprende además la administración de uno o más productos de mesalamina, formulaciones de corticosteroides, budesonida de liberación ileal, glucocorticosteroides/inmunomoduladores EEN, incluyendo azatioprina, 6-

mercaptopurina y metotrexato, fármacos anti factor de necrosis tumoral (TNF), incluyendo infliximab, adalimumab y certolizumab, pegol, anticuerpo anti integrina alfa-4 beta-7 vedolizumab, ABT-494 y filgotinib.

5 En algunas realizaciones, la inflamación está asociada con la colitis ulcerosa y el tratamiento o la prevención comprende además la administración de uno o más de 5-aminosalicilatos, mesalamina, corticoesteroides, budesonida multimatriz, azatioprina, 6-mercaptopurina, fármacos anti TNF, incluyendo infliximab, adalimumab y golimumab, vedolizumab, tofacitinib, ABT-494 y filgotinib.

10 En algunas realizaciones, el método comprende además administrar uno o más agentes antibióticos y/o antiinflamatorios seleccionados del grupo que consiste en: dalbavancina, oritavancina, cubicina, tedizolid, veftobiprol, veftobiprol, ceftolozano-tazobactam, mupirocina, sulfato de neomicina bacitracina, polimixina B, 1-ofloxacino, fosfato de clindamicina, sulfato de gentamicina, metronidazol, hexilresorcinol, cloruro de metilbenzetonio, fenol, compuestos de amonio cuaternario, aceite de árbol del té, agentes esteroides, tales como corticosteroides, tales como hidrocortisona, hidroxiltriamicinolona, alfametil dexametasona, fosfato de dexametasona, dipropionato de beclometasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de difluocortolona, fluadrenolona, acetónido de fluciclorolona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónida de fluosinolona, fluocinonida, éster butílico de flucortina, fluocortolona, acetato de flupredniden (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamicinolona, cortisona, cortodoxona, flucetonida, 20 fludrocortisona, diacetato de difluorasona, acetónido de fluradrenalona, medrisona, amciamel, amcinafida, betametasona, clorprednisona, acetato de clorprednisona, clocortelona, clescinolona, diclorisona, difluprednato, fluciclorolona, flunisolida, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, dipropionato de betametasona, triamicinolona, agentes no esteroides, tales como inhibidores de COX, 25 inhibidores de LOX, inhibidores de p38 cinasa, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina e inhibidores de la síntesis de citocinas, tetraciclina, minociclina y doxiciclina, o cualquier combinación de los mismos.

30 En algunas realizaciones, el método comprende además administrar uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en: anticuerpos dirigidos a toxinas de *Clostridium difficile*, anticuerpos dirigidos al factor de necrosis tumoral (TNF), anticuerpos dirigidos a interleucinas y anticuerpos dirigidos a metaloproteinas-9.

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula I reduce la migración de neutrófilos al tejido diana en comparación con el tejido de control no tratado.

35 Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** es un gráfico que muestra la dosis-respuesta de BT051 y BT070 sobre la inhibición de la migración de neutrófilos.

40 **Figuras 2A, 2B y 2C.** La figura 2A es un gráfico que muestra la estabilidad de BT090 en fluido intestinal simulado (FIS). La figura 2B es un gráfico que muestra la estabilidad de BT090 en fluido gástrico simulado (FGS). La figura 2C es un gráfico que muestra la estabilidad de BT090 en las heces.

45 Las **figuras 3A y 3B** son gráficos que muestran la inhibición del receptor 1 del péptido formilo (FPR1) por BT051 (**figura 3A**) y BT051 y BT070 (**figura 3B**) según lo medido por la inhibición de la trans migración/activación de neutrófilos mediada por fMLP.

Descripción detallada

50 I. Definiciones

En el presente documento se usan las siguientes expresiones, cuyas definiciones se proporcionan a modo de orientación.

55 En general, "sustituido" se refiere a un grupo orgánico como se define a continuación (por ejemplo, un grupo alquilo) en el que uno o más enlaces a un átomo de hidrógeno contenido en el mismo se reemplazan por un enlace a átomos distintos de hidrógeno o carbono. Los grupos sustituidos también incluyen grupos en los que uno o más enlaces a uno o más átomos de carbono o hidrógeno se reemplazan por uno o más enlaces, incluyendo dobles o triples enlaces, a un heteroátomo. Por lo tanto, un grupo sustituido está sustituido por uno o más sustituyentes, a menos que se especifique lo contrario. En algunas realizaciones, un grupo sustituido está sustituido por 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituyentes. 60 Los expertos en la técnica entenderán que los grupos sustituidos de la presente tecnología son grupos químicamente estables que permiten el aislamiento de los compuestos en los que aparecen. Los ejemplos de grupos de sustituyentes incluyen: halógenos (es decir, F, Cl, Br e I); hidroxilos; grupos alcoxi, alquenoxi, ariloxi, aralquilo, heterociclilo, heterociclicilalquilo, heterocicliciloxi y heterociclicilalcoxi; carbonilos (oxo); carboxilatos; ésteres; uretanos; oximas; 65 hidroxilaminas; alcóxiaminas; aralcoxiaminas; tioles; sulfuros; sulfóxidos; sulfonas; sulfonilos; sulfonamidas; aminas; N-óxidos; azidas; amidas; ureas; amidinas; guanidinas; grupos nitró; nitrilos (es decir, CN); y similares.

Los grupos alquilo incluyen grupos alquilo de cadena lineal y de cadena ramificada que tienen (a menos que se indique lo contrario) de 1 a 12 átomos de carbono, y típicamente de 1 a 10 carbonos o, en algunas realizaciones, de 1 a 8, de 1 a 6, o de 1 a 4 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos o sin sustituir. Los ejemplos de grupos alquilo de cadena lineal incluyen grupos tales como grupos metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y n-octilo. Los ejemplos de grupos alquilo ramificados incluyen, pero sin limitación, grupos isopropilo, isobutilo, sec-butilo, *tert*-butilo, neopentilo, isopentilo y 2,2-dimetilpropilo. Los grupos alquilo sustituidos representativos pueden estar sustituidos una o más veces por sustituyentes tales como los enumerados anteriormente, e incluyen, sin limitación, haloalquilo (por ejemplo, trifluorometilo), hidroxialquilo, tioalquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, alcoxialquilo, carboxialquilo y similares. En algunas realizaciones, el grupo alquilo está sustituido por 1, 2 o 3 sustituyentes.

Los grupos alqueno incluyen grupos alquilo de cadena lineal y ramificada como se ha definido anteriormente, excepto que existe al menos un doble enlace entre dos átomos de carbono. Los grupos alqueno pueden estar sustituidos o sin sustituir. Los grupos alqueno tienen de 2 a 12 átomos de carbono, y típicamente de 2 a 10 átomos de carbono o, en algunas realizaciones, de 2 a 8, de 2 a 6 o de 2 a 4 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo alqueno tiene uno, dos o tres dobles enlaces carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, vinilo, alilo, $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, entre otros. Los grupos alqueno sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez, tales como, pero sin limitación, monosustituidos, disustituidos o trisustituidos con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

Los grupos heteroalquilo y los grupos heteroalqueno son, respectivamente, grupos alquilo (como se definen en el presente documento) y grupos alqueno (como se definen en el presente documento) que incluyen de 1 a 6 heteroátomos seleccionados de N, O y S. Se entenderá que cada heteroátomo presente está unido al menos a un átomo de carbono dentro del grupo heteroalquilo o heteroalqueno. En algunas realizaciones, los grupos heteroalquilo o heteroalqueno incluyen 1, 2 o 3 heteroátomos. Los grupos heteroalquilo y heteroalqueno pueden estar sustituidos o sin sustituir. Los ejemplos de grupos heteroalquilo incluyen, pero sin limitación, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2$, CH_3NHCH_2 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SCH}_2$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$. Los ejemplos de grupos heteroalqueno incluyen, pero sin limitación, $\text{CH}_2=\text{CHOCH}_2$, $\text{CH}_2=\text{CHN}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ y $\text{CH}_2=\text{CHSCH}_2$. Los grupos heteroalquilo o heteroalqueno sustituidos representativos pueden estar sustituidos una o más veces con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente (por ejemplo, 1, 2 o 3 veces), e incluyen, sin limitación, haloheteroalquilo (por ejemplo, trifluorometiloxietilo), carboxialquilaminoalquilo, acrilato de metilo y similares.

Los grupos cicloalquilo incluyen grupos alquilo monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos que tienen de 3 a 12 átomos de carbono en el uno o más anillos, o, en algunas realizaciones, de 3 a 10, de 3 a 8, o de 3 a 4, 5, o 6 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo pueden estar sustituidos o sin sustituir. Los grupos cicloalquilo monocíclicos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. En algunas realizaciones, el grupo cicloalquilo tiene de 3 a 8 átomos en el anillo, mientras que, en otras realizaciones, el número de átomos de carbono en el anillo puede estar comprendido de 3 a 5, de 3 a 6, o de 3 a 7. Los sistemas anulares bicíclicos y tricíclicos incluyen tanto grupos cicloalquilo puenteados como anillos condensados, tales como, pero sin limitación, biciclo[2.1.1]hexano, adamantilo, decalinilo, y similares. Los grupos cicloalquilo sustituidos pueden estar sustituidos una o más veces con, grupos distintos de hidrógeno y carbono como se ha definido anteriormente. Sin embargo, los grupos cicloalquilo sustituidos también incluyen anillos que están sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal o ramificada como se ha definido anteriormente. Los grupos cicloalquilo sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez, tales como, pero sin limitación, grupos ciclohexilo 2,2-, 2,3-, 2,4-, 2,5- o 2,6-disustituidos, que pueden estar sustituidos con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

Los grupos cicloalquilalquilo son grupos alquilo, como se ha definido anteriormente, en los que un enlace de hidrógeno o carbono de un grupo alquilo se reemplaza por un enlace a un grupo cicloalquilo, como se ha definido anteriormente. Los grupos cicloalquilalquilo pueden estar sustituidos o sin sustituir. En algunas realizaciones, los grupos cicloalquilalquilo tienen de 4 a 16 átomos de carbono, de 4 a 12 átomos de carbono y, típicamente, de 4 a 10 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilalquilo sustituidos pueden estar sustituidos en la porción alquilo, cicloalquilo o tanto en la porción alquilo como cicloalquilo del grupo. Los grupos cicloalquilalquilo sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez, tales como, pero sin limitación, monosustituidos, disustituidos o trisustituidos con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

Los grupos descritos en el presente documento que tienen dos o más puntos de unión (es decir, divalentes, trivalentes o polivalentes) dentro del compuesto de la presente tecnología se designan mediante el uso del sufijo "eno". Por ejemplo, los grupos alquilo divalentes son grupos alquileno, los grupos cicloalquilo divalentes son grupos cicloalquileno, los grupos heteroalquilo divalentes son grupos heteroalquileno, los grupos alqueno divalentes son grupos alquenileno, etc. Los grupos sustituidos que tienen un único punto de unión al compuesto de la presente tecnología no se denominan con la designación "eno". Por lo tanto, por ejemplo, el cloroetilo no se denomina en el presente documento cloroetileno.

El término "administrar" una molécula a un sujeto significa suministrar la molécula al sujeto. "Administrar" incluye la

administración profiláctica de la composición (es decir, antes de que la enfermedad y/o uno o más síntomas de la enfermedad sean detectables) y/o la administración terapéutica de la composición (es decir, después de que la enfermedad y/o uno o más síntomas de la enfermedad sean detectables). Los métodos de la presente tecnología incluyen la administración de uno o más compuestos. Si se va a administrar más de un compuesto, los compuestos

5 pueden administrarse juntos sustancialmente al mismo tiempo y/o administrarse en diferentes momentos en cualquier orden. Además, los compuestos de la presente tecnología pueden administrarse antes, concomitantemente con y/o después de la administración de otro tipo de fármaco o procedimiento terapéutico (por ejemplo, una cirugía).

Los términos "alterar" y "modificar" cuando se refieren al nivel de cualquier molécula (por ejemplo, proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2), proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, *N*-aciletanolamina (NAE), secuencia de aminoácidos, secuencia de ácido nucleico, anticuerpo, etc.), célula y/o fenómeno (por ejemplo, nivel de actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y/o de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1) y/o de la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa y/o *N*-acil etanolamina (NAE), nivel de expresión de un gen, síntoma de una enfermedad, nivel de unión de dos moléculas, tal como la unión de un ligando hormonal a su receptor hormonal, especificidad de unión de dos moléculas, afinidad de unión de dos moléculas, síntoma de una enfermedad, especificidad a la enfermedad, sensibilidad a la enfermedad, afinidad de unión, actividad enzimática, etc.) en una primera muestra (o en un primer sujeto) en relación con una segunda muestra (o en relación con un segundo sujeto), se refieren a un aumento y/o disminución.

"Receptor cannabinoide tipo 2" ("CB2") es un receptor acoplado a proteína G de la familia de receptores cannabinoides que en los seres humanos está codificado por el gen CNR2. El ligando endógeno principal para el receptor CB2 es 2-araquidonoilglicerol (2-AG).

El uso de las expresiones "que comprende", "que incluye" o expresiones similares para describir o definir una realización de un compuesto, composición o método que tiene uno o más elementos, se entenderá que también divulga realizaciones "que consisten" o "que consisten esencialmente" en los elementos y viceversa. En otras palabras, la divulgación de realizaciones abiertas a elementos más allá de los enumerados ("que comprende"), también debe entenderse que divulga realizaciones que están cerradas a elementos adicionales ("que consiste") o que solo pueden incluir elementos adicionales que no afectan materialmente a las características de la realización ("que consiste esencialmente"). De manera análoga, se entenderá que las realizaciones que consisten o que consisten esencialmente en los elementos enumerados divulgan realizaciones que comprenden estos elementos.

El término "conjugar", y equivalentes gramaticales, cuando se hace en referencia a conjuguar una molécula de interés y un polímero significa unir covalentemente la molécula de interés al polímero. La unión puede ser directa. Como alternativa, la unión puede ser indirecta a través de un grupo o resto de unión. En la técnica se conocen métodos para la conjugación con polímeros, incluyendo métodos para la conjugación con un polipéptido para producir una proteína de fusión (Pasut, *Polymers* 6:160-178 (2014); Medscape, *Nanomedicine* 5(6):915-935 (2010)). En algunas realizaciones, el conjugado comprende ciclosporina A conjugada con un polímero de PEG. Los precursores de dichos conjugados de ciclosporina A incluyen ciclosporina A modificada, por ejemplo, con un grupo de unión, pero sin el polímero de PEG. El grupo de unión une el polímero a la ciclosporina A.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz", o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que da como resultado la mejora total o parcial de la inflamación (por ejemplo, inflamación asociada con la migración de neutrófilos a un tejido diana) o enfermedad o trastornos o síntomas asociados con la inflamación en un sujeto que lo necesite. En el contexto de aplicaciones terapéuticas o profilácticas, la cantidad de una composición administrada al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a los fármacos. También dependerá del grado, gravedad y tipo de enfermedad. El experto podrá determinar las dosificaciones adecuadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones también pueden administrarse junto con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, se administran múltiples dosis. Adicionalmente, o como alternativa, en algunas realizaciones, se administran múltiples composiciones o compuestos terapéuticos. En los métodos descritos en el presente documento, los compuestos terapéuticos pueden administrarse a un sujeto que presente uno o más signos o síntomas de una enfermedad o trastorno asociado con la inflamación (por ejemplo, inflamación asociada con una mayor migración de neutrófilos a un tejido).

Los "endocannabinoides" ("EC") son compuestos que se unen a los receptores cannabinoides, CB1 y CB2, así como a los receptores atípicos descritos más recientemente, GPR55 y GPR119. Las dos clases principales de EC de tipo eicosanoide son las "*N*-aciletanolaminas" ("NAE") y los monoacilglicerol (MAG), que se metabolizan por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), respectivamente. La "*N*-aciletanolamina" es un endocannabinoide y es un tipo de amida de ácidos grasos que se forma cuando uno de varios tipos de grupo acilo se une al átomo de nitrógeno de la etanolamina. Las *N*-aciletanolaminas se metabolizan por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Los endocannabinoides de *N*-aciletanolamina de ejemplo incluyen etanolamina, anandamida (AEA) (*N*-araquidonoiletanolamina), que es la amida del ácido araquidónico (20:4 ω-6), oleoiletanolamida (OEA) y alfa-linoleniloiletanolamida (α-LEA).

"Amida hidrolasa de ácidos grasos", "FAAH" y "EC 3.5.1.99" se refieren indistintamente a un miembro de la familia de enzimas de serina hidrolasa. Se demostró por primera vez que descompone la anandamida. En los seres humanos, está codificada por el gen FAAH.

- 5 "Hepoxilina A3 sintasa", "HXA₃ sintasa", "ALOX12", "12-lipoxigenasa", "araquidonato 12-lipoxigenasa", "12S-lipoxigenasa" "12-LOX", y "12S-LOX" se refieren indistintamente a una enzima de tipo lipoxigenasa (es decir, una enzima que cataliza la dioxigenación de ácidos grasos poliinsaturados en lípidos que contienen una estructura *cis,cis*-1,4-pentadieno) que en los seres humanos está codificada por el gen ALOX12, que se encuentra junto con otras lipoxigenasas en el cromosoma 17p13.3.

10 El término "aumentar" cuando se refiere a un compuesto, por ejemplo, *N*-aciletanolamina, significa aumentar el nivel y/o la actividad de *N*-aciletanolamina. Los términos "aumentar", "elevar", "subir" y equivalentes gramaticales (incluyendo "más alto", "mayor", etc.) cuando se hace referencia al nivel de cualquier molécula (por ejemplo, proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2), proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, *N*-aciletanolamina (NAE), secuencia de aminoácidos y secuencia de ácido nucleico, anticuerpo, etc.), célula y/o fenómeno (por ejemplo, nivel de actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y/o de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1) y/o de la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa y/o *N*-acil etanolamina (NAE), nivel de expresión de un gen, síntoma de una enfermedad, nivel de unión de dos moléculas, tal como la unión de un ligando hormonal a su receptor hormonal, especificidad de unión de dos moléculas, afinidad de unión de dos moléculas, síntoma de una enfermedad, especificidad a la enfermedad, sensibilidad a la enfermedad, afinidad de unión, actividad enzimática, etc.) en una primera muestra (o en un primer sujeto) en relación con una segunda muestra (o en relación con un segundo sujeto), significa que la cantidad de la molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es mayor que en la segunda muestra (o en el segundo sujeto) en cualquier cantidad que sea estadísticamente significativa usando cualquier método estadístico de análisis aceptado en la técnica. En una realización, la cantidad de la molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es al menos un 10 % mayor que, al menos un 25 % mayor que, al menos un 50 % mayor que, al menos un 75 % mayor que, y/o al menos un 90 % mayor que la cantidad de la misma molécula, célula y/o fenómeno en la segunda muestra (o en el segundo sujeto). Esto incluye, sin limitación, una cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) que es al menos un 10 % mayor que, al menos un 15 % mayor que, al menos un 20 % mayor que, al menos un 25 % mayor que, al menos un 30 % mayor que, al menos un 35 % mayor que, al menos un 40 % mayor que, al menos un 45 % mayor que, al menos un 50 % mayor que, al menos un 55 % mayor que, al menos un 60 % mayor que, al menos un 65 % mayor que, al menos un 70 % mayor que, al menos un 75 % mayor que, al menos un 80 % mayor que, al menos un 85 % mayor que, al menos un 90 % mayor que, y/o al menos un 95 % mayor que la cantidad de la misma molécula, célula y/o fenómeno en la segunda muestra (o en el segundo sujeto). En una realización, la primera muestra (o el primer sujeto) se ilustra mediante, pero sin limitación, una muestra (o sujeto) que ha sido manipulada usando las composiciones y/o métodos de la presente tecnología. En una realización adicional, la segunda muestra (o el segundo sujeto) se ilustra mediante, pero sin limitación, una muestra (o sujeto) que no ha sido manipulada usando las composiciones y/o métodos de la presente tecnología. En una realización alternativa, la segunda muestra (o el segundo sujeto) se ilustra mediante, pero sin limitación, una muestra (o sujeto) que ha sido manipulada, usando las composiciones y/o métodos de la presente tecnología, a una dosis diferente y/o durante una duración diferente y/o a través de una vía de administración diferente en comparación con el primer sujeto. En una realización, la primera y segunda muestras (o sujetos) pueden ser iguales, tal como cuando se busca determinar el efecto de diferentes pautas (por ejemplo, de dosificaciones, duración, vía de administración, etc.) de las composiciones y/o métodos de la presente tecnología en una muestra (o sujeto). En otra realización, la primera y segunda muestras (o sujetos) pueden ser diferentes, tal como cuando se compara el efecto de las composiciones y/o métodos de la presente tecnología en una muestra (sujeto), por ejemplo, un paciente que participa en un ensayo clínico y otro individuo en un hospital.

50 El término "inhibir", cuando se usa en referencia a un compuesto, por ejemplo, proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2), hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, etc., significa inhibir la actividad y/o el nivel de HXA₃. Los términos "inhibir", "reducir", "disminuir", "suprimir", "disminución", y equivalentes gramaticales (incluyendo "inferior", "menor", etc.) cuando se refieren al nivel de cualquier molécula (por ejemplo, proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2), proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, *N*-aciletanolamina (NAE), secuencia de aminoácidos y secuencia de ácido nucleico, anticuerpo, etc.), célula y/o fenómeno (por ejemplo, nivel de actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y/o de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1) y/o de la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa y/o *N*-acil etanolamina (NAE), nivel de expresión de un gen, síntoma de una enfermedad, nivel de unión de dos moléculas, tal como la unión de un ligando hormonal a su receptor hormonal, especificidad de unión de dos moléculas, afinidad de unión de dos moléculas, síntoma de una enfermedad, especificidad a la enfermedad, sensibilidad a la enfermedad, afinidad de unión, actividad enzimática, etc.) en una primera muestra (o en un primer sujeto) en relación con una segunda muestra (o en relación con un segundo sujeto), significa que la cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es menor que en la segunda muestra (o en el segundo sujeto) en cualquier cantidad que sea estadísticamente significativa usando cualquier método estadístico de análisis aceptado en la técnica. En una realización, la cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es al menos un 10 % menor que, al menos un 25 % menor que, al menos un 50 % menor que, al menos un 75 % menor que, y/o al menos un 90 % menor que la cantidad de la misma molécula, célula y/o fenómeno en la segunda muestra (o en el segundo sujeto). En otra realización, la

cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es menor en cualquier porcentaje numérico del 5 % al 100 %, tal como, pero sin limitación, del 10 % al 100 %, del 20 % al 100 %, del 30 % al 100 %, del 40 % al 100 %, del 50 % al 100 %, del 60 % al 100 %, del 70 % al 100 %, del 80 % al 100 %, y del 90 % al 100 % menor que la cantidad de la misma molécula, célula y/o fenómeno en la segunda muestra (o en el segundo sujeto). En una realización, la primera muestra (o el primer sujeto) se ilustra mediante, pero sin limitación, una muestra (o sujeto) que ha sido manipulada usando las composiciones y/o métodos de la presente tecnología. En una realización adicional, la segunda muestra (o el segundo sujeto) se ilustra mediante, pero sin limitación, una muestra (o sujeto) que no ha sido manipulada usando las composiciones y/o métodos de la presente tecnología. En una realización alternativa, la segunda muestra (o el segundo sujeto) se ilustra mediante, pero sin limitación, una muestra (o sujeto) que ha sido manipulada, usando las composiciones y/o métodos de la presente tecnología, a una dosis diferente y/o durante una duración diferente y/o a través de una vía de administración diferente en comparación con el primer sujeto. En una realización, la primera y segunda muestras (o sujetos) pueden ser iguales, tal como cuando se busca determinar el efecto de diferentes pautas (por ejemplo, de dosificaciones, duración, vía de administración, etc.) de las composiciones y/o métodos de la presente tecnología en una muestra (o sujeto). En otra realización, la primera y segunda muestras (o sujetos) pueden ser diferentes, tal como cuando se compara el efecto de las composiciones y/o métodos de la presente tecnología en una muestra (sujeto), por ejemplo, un paciente que participa en un ensayo clínico y otro individuo en un hospital.

La "proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos 2", "proteína de resistencia a múltiples fármacos 2" ("MRP2"), "transportador de aniones orgánicos multiespecíficos canaliculares 1" ("cMOAT"), "miembro 2 de la subfamilia C del casete de unión a ATP" ("ABCC2") se usan indistintamente para referirse a la proteína que en los seres humanos está codificada por el gen ABCC2.

La "proteína de resistencia a múltiples fármacos 1", "MRP1" y "ABCC1" se usan indistintamente para referirse a una proteína transportadora de eflujo unidireccional con una amplia especificidad de sustrato que incluye importantes agentes terapéuticos. Algunas de las funciones principales de este transportador son: (i) eflujo de metabolitos xenobióticos y endógenos; (ii) transporte de mediadores inflamatorios (por ejemplo, LTC₄); y (iii) defensa contra el estrés oxidativo. La MRP1 de 190 kDa tiene una estructura central que consiste en dos dominios transmembrana (TMD), cada uno seguido de un dominio de unión a nucleótidos (NBD). Al igual que MRP2, 3, 6 y 7, MRP1 contiene un tercer TMD (TMD0) con cinco segmentos transmembrana previstos y un extremo NH₂ citosólico adicional conectado a la estructura central por una región de enlace (L0) (Rosenberg *et al.*, J. Biol. Chem. 276(19):13076-16082 (2001)). El TMD0 parece ser importante para el tráfico de MRP1 a la membrana plasmática (Bakos *et al.*, J. Cell Sci. 113(Pt 24):4451-4461 (2000)), y las funciones, mecanismos y dependencias precisos de TMD0 y L0 son objeto de una importante investigación (Westlake *et al.* Mol. Biol. Cell 16(5):2483-2492 (2005)). La MRP1 tiene una amplia especificidad de sustrato, ya que transporta moléculas hidrófobas y aniónicas, conjugados de glucurónido y glutatión, así como glutatión endógeno. Aunque muchos sustratos de la MRP1 están conjugados con glutatión, a menudo se observa el transporte conjunto de glutatión libre, y parece estimular el transporte de, por ejemplo, vincristina y daunorrubicina (Hooijberga *et al.*, FEBS Letters 469:47-51(2000)). El glutatión en sí es un sustrato de baja afinidad de la MRP1 (K_m = 1-5 mM). Se postulan múltiples sitios de unión al sustrato que cooperan alostéricamente y no se superponen, lo que puede explicar por qué varios sustratos inhiben y estimulan de forma cruzada (Bakos *et al.*, Pflugers Arch - Eur J Physiol 453: 621-641(2007)). La citocina inflamatoria LTC₄ y su metabolito principal LTD₄ son algunos de los sustratos de MRP1 con mayor afinidad, lo que sugiere una función clave para la MRP1 en la liberación de citocinas de las células productoras de LTC₄. De hecho, se observó acumulación intracelular de LTC₄ en ratones *mrp1* (-/-) (Robbiani *et al.*, Cell 103: 757-768 (2000)). Adicionalmente, aunque eran viables, sanos y fértiles con fenotipo normal, los ratones inactivados *mrp1* (-/-) fueron hipersensibles a los fármacos citotóxicos (Wijnholds *et al.*, Nat. Med. 3:1275-1279 (1997)). La MRP1 se ilustra por la secuencia de proteína humana Secuencia de referencia del NCBI: NP_004987.2, codificada por la secuencia de ADN Secuencia de referencia del NCBI: NG_028268.1. Existen al menos 15 mutaciones de origen natural identificadas en la MRP1, y se ha encontrado que muchas de ellas afectan a su actividad de transporte *in vitro*. Se han revisado los estudios de polimorfismos y mutagénesis en He *et al.*, Curr. Med. Chem. 18:439-481 (2011). Aunque se conocen muchos SNP de MRP1, se informa que su incidencia en las poblaciones es relativamente baja. En las poblaciones de China continental, las frecuencias alélicas del polimorfismo de MRP1 de Cys43Ser (128G>C), Thr73Ile (218C>T), Arg723Gln (2168G>A) y Arg1058Gln (3173G>A) fueron del 0,5 %, 1,4 %, 5,8 % y el 0,5 %, respectivamente (Ji-Ye Yin *et al.*, Pharmacogenet. Genomics 19(3):206-216 (2009)).

La "glucoproteína P" ("P-gp") es un transportador de membrana de eflujo y es responsable de limitar la captación celular y la distribución de xenobióticos y sustancias tóxicas.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documento se encuentran dentro del alcance de la presente tecnología e incluyen sales de adición de ácidos o bases que conservan la actividad farmacológica deseada y no son biológicamente indeseables (por ejemplo, la sal no es excesivamente tóxica, alergénica o irritante y está biodisponible). Cuando el compuesto de la presente tecnología tiene un grupo básico, tal como, por ejemplo, un grupo amino, se pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos inorgánicos (tales como ácido clorhídrico, ácido borhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico), ácidos orgánicos (por ejemplo, alginato, ácido fórmico, ácido acético, ácido benzoico, ácido glucónico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido naftalenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico) o aminoácidos ácidos (tales como ácido

aspártico y ácido glutámico). Cuando el compuesto de la presente tecnología tiene un grupo ácido, tal como, por ejemplo, un grupo de ácido carboxílico, puede formar sales con metales, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos (por ejemplo, Na^+ , Li^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}), amoníaco o aminas orgánicas (por ejemplo, diciclohexilamina, trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina) o aminoácidos básicos (por ejemplo, arginina, lisina y ornitina). Dichas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación de los compuestos o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre o ácido libre con un ácido o base adecuados, respectivamente, y aislando la sal así formada.

Un "polímero" es una sustancia que tiene una estructura molecular que consiste principal o totalmente en un gran número de unidades similares unidas entre sí. Los polímeros pueden existir de forma natural (por ejemplo, celulosa, polipéptidos, secuencias de nucleótidos, etc.) o ser artificiales (por ejemplo, plásticos, resinas, etc.). Los polímeros pueden usarse como portadores de fármacos a los que están conjugados, y pueden mejorar la solubilidad del fármaco conjugado, mejorar su perfil farmacocinético, proteger el fármaco contra la degradación, liberar el fármaco en determinadas condiciones, tal como un cambio de pH o en presencia de enzimas, tales como esterasas, lipasas o proteasas. Además, también puede introducirse un resto de direccionamiento o un solubilizante en el conjugado para aumentar su índice terapéutico (Medscape, Nanomedicine 5(6):915-935(2010)). Los polímeros también pueden utilizarse para restringir la distribución del fármaco conjugado a ellos, por ejemplo, evitando que el fármaco conjugado pase a compartimentos corporales específicos (por ejemplo, desde el lumen gastrointestinal hasta el tejido subyacente). Los polímeros pueden ser polímeros naturales y/o polímeros lineales sintéticos, e incluyen polietilenglicol (PEG), dextrano, dextrano oxidado con peryodato, ácidos polisilícicos (PSA), ácido hialurónico (HA), dextrina, hidroxietil almidón (HES), poli(2-etil 2-oxazolina) (PEOZ), ácido poliglútamico (PGA), ácido poliláctico (PLA), poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLA/PLGA), poli(hidroxialquilmetaacrilamida), poliglicerol, poliamidoamina (PAMAM), polietilenimina (PEI) y polipéptidos.

"SipA" y "proteína efectora SS T3 de *Salmonella*" se usan indistintamente para referirse a una proteína producida por *Salmonella*, como se ilustra por la secuencia de aminoácidos de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* cepa SL1344 (GenBank: AAA86618.1) codificada por la secuencia de ADN (Locus tag) SL1344_2861 de la *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* cepa SL1344, secuencia genómica completa (Secuencia de referencia del NCBI: NC_016810.1). La secuencia de SipA se proporciona en el documento WO 2015/089268.

El "tejido diana" que puede padecer inflamación incluye, sin limitación, tejido epitelial, tejido mucoso, etc. El tejido epitelial y/o tejido mucoso de ejemplo incluyen gastrointestinal, de pulmón (por ejemplo, tejido bronquial), hígado, estómago, colon, cerebro, vesícula biliar, renal, del tracto genital femenino, ocular, de las vías urinarias, etc., lo que da lugar a "enfermedades inflamatorias", tales como enfermedad intestinal (ilustrada por proctitis, orquitis, enfermedad de Crohn, colitis (tal como colitis ulcerosa), enterocolitis infecciosa/no infecciosa, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), etc.), afecciones inflamatorias pulmonares (tales como infección neumocócica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar), enfermedades inflamatorias cutáneas (tales como dermatitis (eccema), rosácea, dermatitis seborreica y psoriasis), enfermedad ocular (ilustrada por uveítis, retinitis, queratitis, enfermedad macular, etc.), enfermedad urogenital (tal como infección de las vías urinarias), enfermedades de transmisión sexual (tales como enfermedad inflamatoria pélvica que incluye enfermedad inflamatoria ilustrada por infección de gonorrea y/o infección por clamidia, y por enfermedad ulcerosa ilustrada por herpes), uretritis, etc. Como se usa en el presente documento, "tejido diana" también abarca un espacio anatómico, por ejemplo, el lumen intestinal.

"Que trata", "tratar", "tratado", o "tratamiento", como se usan en el presente documento, incluye el tratamiento de una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento (por ejemplo, inflamación), en un sujeto, tal como un ser humano, e incluye: (i) inhibir una enfermedad o trastorno, es decir, detener su desarrollo; (ii) aliviar una enfermedad o trastorno, es decir, producir la regresión del trastorno; (iii) ralentizar la progresión del trastorno; y/o (iv) inhibir, aliviar o ralentizar la progresión de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno. Los síntomas pueden evaluarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, biopsia e histología, y análisis de sangre para determinar los niveles de enzimas, metabolitos o antígenos o anticuerpos circulantes (u otros biomarcadores) relevantes, cuestionarios de calidad de vida, puntuaciones de síntomas informados por el paciente y pruebas de diagnóstico por imagen.

Como se usa en el presente documento, "prevención" o "prevenir" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en relación con una muestra de control, o retrasa la aparición de uno o más síntomas del trastorno o afección en relación con la muestra de control.

También debe apreciarse que los diversos modos de tratamiento o prevención de enfermedades y afecciones médicas que se describen pretenden significar "sustancial", lo que incluye el tratamiento o la prevención total pero también menos que el total, y en donde se logra algún resultado biológico o médicamente relevante.

Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" pueden ser un organismo individual, un vertebrado, un mamífero o un ser humano. "Mamífero" incluye un ser humano, primate no humano, murino (por ejemplo, ratón, rata, conejillo de indias, hámster), ovino, bóvido, rumiante, lagomorfo, porcino, caprino, equino, canino, felino, ave, etc. En algunas realizaciones, el mamífero es murino. En algunas realizaciones, el

mamífero es un ser humano.

Un sujeto "que necesita" tratamiento de acuerdo con los métodos y/o composiciones de la presente tecnología incluye un sujeto que "padece" inflamación (es decir, un sujeto que experimenta y/o exhibe uno o más síntomas clínicos y/o subclínicos de inflamación) y un sujeto "en riesgo" de inflamación. Un sujeto "que necesita" tratamiento incluye modelos animales de inflamación. Un sujeto "en riesgo" de inflamación se refiere a un sujeto que actualmente no presenta síntomas de inflamación y está predispuesto a expresar uno o más síntomas de la enfermedad. Esta predisposición puede basarse en antecedentes familiares, factores genéticos, factores ambientales, tales como la exposición a compuestos perjudiciales presentes en el medio ambiente, *etc.* No se pretende que la presente tecnología se limite a ningún signo o síntoma en particular. Por lo tanto, se pretende que la presente tecnología abarque sujetos que experimenten cualquier rango de enfermedad, desde síntomas subclínicos hasta una enfermedad inflamatoria en toda regla, en donde el sujeto presente al menos uno de los indicios (por ejemplo, signos y síntomas) asociados con la enfermedad inflamatoria.

"Sustancialmente el mismo", "sin alterar sustancialmente", "sustancialmente inalterado" y equivalentes gramaticales, cuando se hace referencia al nivel de cualquier molécula (por ejemplo, proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2), proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, *N*-aciletanolamina (NAE), secuencia de aminoácidos, secuencia de ácido nucleico, anticuerpo, *etc.*), célula y/o fenómeno (por ejemplo, nivel de actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y/o de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1) y/o de la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa y/o *N*-acil etanolamina (NAE), nivel de expresión de un gen, síntoma de una enfermedad, nivel de unión de dos moléculas, tal como la unión de un ligando hormonal a su receptor hormonal, especificidad de unión de dos moléculas, afinidad de unión de dos moléculas, síntoma de una enfermedad, especificidad a la enfermedad, sensibilidad a la enfermedad, afinidad de unión, actividad enzimática, *etc.*) significa que la cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) no aumenta ni disminuye en una cantidad estadísticamente significativa en relación con la segunda muestra (o en un segundo sujeto). Por lo tanto, en una realización, la cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es del 90 % al 100 % (incluyendo, por ejemplo, del 91 % al 100 %, del 92 % al 100 %, del 93 % al 100 %, del 94 % al 100 %, del 95 % al 100 %, del 96 % al 100 %, del 97 % al 100 %, del 98 % al 100 %, y/o del 99 % al 100 %) de la cantidad en la segunda muestra (o en el segundo sujeto).

Como se usa en el presente documento, "porcentaje en peso" de un componente, a menos que se indique específicamente lo contrario, se basa en el peso total de la formulación o composición en la que se incluye el componente.

II. General

En un aspecto, la presente tecnología proporciona métodos, compuestos y composiciones para inhibir el receptor del péptido formilo 1 (FPR1) y para tratar enfermedades asociadas con la activación de FPR1. En algunas realizaciones, la enfermedad asociada con la activación de FPR1 comprende la enfermedad celíaca.

En un aspecto, la presente tecnología proporciona métodos, compuestos y composiciones para tratar la inflamación mediada por neutrófilos y la enfermedad asociada con la inflamación mediada por neutrófilos. En particular, la presente tecnología proporciona un método para tratar la inflamación mediada por neutrófilos en un tejido diana de un sujeto mamífero que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más primeros compuestos que aumentan el nivel y/o la actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), en donde la cantidad terapéutica del primer compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana, y/o administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más segundos compuestos que inhiben una o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, en donde la cantidad terapéutica del segundo compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana, y/o administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más terceros compuestos que aumentan una o más *N*-aciletanolaminas (NAE), en donde la cantidad terapéutica del tercer compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

En una realización, la presente divulgación proporciona métodos para tratar la inflamación mediada por neutrófilos al dirigirse a la vía proinflamatoria MRP2/HXA₃, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos que inhiben la actividad y/o el nivel de una o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, en donde la cantidad terapéutica del compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

En otra realización, la presente divulgación también proporciona métodos para tratar la inflamación mediada por neutrófilos al dirigirse a la vía antiinflamatoria P-gp/endocannabinoide, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos que aumentan el nivel y/o la actividad de una o más *N*-aciletanolaminas (NAE), en donde la cantidad terapéutica del compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

En una realización adicional, la presente divulgación proporciona además métodos para tratar la inflamación mediada por neutrófilos, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más segundos

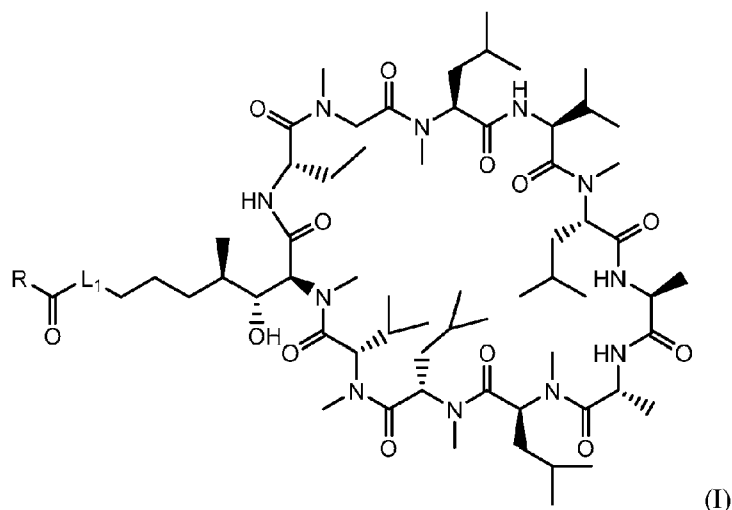
compuestos que aumentan el nivel y/o la actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), en donde la cantidad terapéutica del compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana

Aún en otra realización, la presente divulgación proporciona métodos para tratar la inflamación mediada por neutrófilos dirigiéndose tanto a la vía antiinflamatoria P-gp/endocannabinoide como a la vía proinflamatoria MRP2/HXA₃, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de (A) uno o más primeros compuestos que inhiben la actividad y/o el nivel de una o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, y (B) uno o más segundos compuestos que aumentan el nivel y/o la actividad de una o más *N*-acietanolaminas (NAE), en donde la cantidad terapéutica del primer y segundo compuestos reducen la migración de neutrófilos al tejido diana.

III. Compuestos de la presente tecnología

La presente tecnología proporciona composiciones para tratar la inflamación mediada por neutrófilos y las afecciones asociadas con la misma. En algunas realizaciones, la presente tecnología proporciona composiciones que comprenden uno o más de un primer compuesto que aumenta el nivel y/o la actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), un segundo compuesto que inhibe una o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, y/o un tercer compuesto que aumenta una o más *N*-acietanolaminas (NAE).

En algunas realizaciones, la presente tecnología divulga un conjugado de ciclosporina A-polímero y un precursor del mismo definido por la Fórmula I:



un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores. En la Fórmula I, L₁ puede ser un grupo alquilo C₀ a C₄ opcionalmente sustituido con uno o más F. Por ejemplo, en algunas realizaciones, L₁ puede ser metileno, etileno, propileno o butileno. En algunas realizaciones, L₁ puede ser C₀. En algunas realizaciones, L₁ puede ser fluoroalquilo C1-C4. El fluoroalquilo puede tener 1, 2, 3, 4 o más F y/o puede estar perfluorado. En la Fórmula I, R es como se ha definido anteriormente.

Como se ha indicado anteriormente, el grupo R en el compuesto de Fórmula I (o IA) incluye un enlazador, L₂.

En algunas realizaciones, L₂ puede ser un heteroalquileo que contiene uno o dos grupos NH, incluyendo, pero sin limitación, CH₂CH₂NH, CH₂CH₂CH₂NH, CH₂CH₂CH₂CH₂NH, CH₂CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂NH,

algunas realizaciones, R es -NH(CH₂)₂₋₆(CH₂CH₂O)₄₂₋₄₆-O(CH₂)₀₋₅CH₃. En algunas realizaciones, R se selecciona del grupo que consiste en CH₃O-(CH₂CH₂O)₄₄-CH₂CH₂CH₂NH- (BT051), CH₃O-(CH₂CH₂O)₄₄-CH₂CH₂NH- (BT090),

Los conjugados de ciclosporina A-polímero y precursores pueden prepararse usando técnicas estándar conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, un enlazador difuncional que contiene al menos dos grupos funcionales que contienen heteroátomos seleccionados de N, O y S en los que uno de los grupos funcionales que está protegido puede conjugarse usando tecnología estándar de formación de enlaces de éster, tioéster y amida. Por ejemplo, un enlazador de diamino-alquileo en el que uno de los grupos amino está protegido por un grupo protector de uretano (por ejemplo, Boc, Cbz, etc.) puede acoplarse a ciclosporina A en presencia de un agente de acoplamiento (por ejemplo, DCC, EDC/HOBt, etc.). Como alternativa, puede prepararse un éster activo, un anhídrido mixto o un derivado de haluro de ácido de ciclosporina A y hacerlo reaccionar con la diamina monoprotectada. (Véase, por ejemplo, Bodansky, M. y Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Nueva York, 1984). El grupo protector puede

eliminarse y la amina libre puede reaccionar con un derivado de aldehído del polímero en condiciones reductoras para proporcionar el conjugado. De manera similar, un enlazador con un aldehído protegido (por ejemplo, 1,1-dimetoxi) y una amina pueden acoplarse a la ciclosporina A, desprotegerse para formar el aldehído y someterse a aminación reductora con un polímero que contiene amino para formar el conjugado. Los expertos en la técnica comprenderán fácilmente las variaciones de estos esquemas usando α,ω -carboxiaminas, α,ω -aminoalcoholes, α,ω -carboxialcoholes, α,ω -aminotioles y similares para unir la ciclosporina A y el polímero.

En algunas realizaciones, los compuestos de ciclosporina A de la presente tecnología se usan junto con uno o más compuestos que aumentan la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1) para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

En algunas realizaciones, Los compuestos de ciclosporina A de la presente tecnología se utilizan en combinación con uno o más inhibidores de la MRP2 (proteína de resistencia a múltiples fármacos 2) para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. En algunas realizaciones, el inhibidor de MRP2 se selecciona del grupo que consiste en ARNi de MRP2; ácido 3-([3-(2-[7-cloro-2-quinolinil]etenil)fenil-(3-dimetilamino-3-oxopropil)-tio-metil]tio)propanoico (también conocido como "MK571" y agonista inverso del receptor de leucotrienos CysLT1 (LTD₄)) (Tocris, Minneapolis, EE. UU.) (Genuuso *et al.* (2004) PNAS 101:2470-2475); Probenecid (también conocido como "PROBALANTM"), ilustrado por la inhibición de MRP2 por probenecid; FUROSEMIDE[®]; RITONAVIR[®]; SAQUINAVIR[®]; LAMIVUDINE[®]; ABACAVIR[®]; EMTRICITABINE[®]; EFAVIRENZ[®]; DELAVIRDINE[®]; NEVIRAPINE[®]; CIDOFOVIR[®]; ADEFOVIR[®]; y TENOFOVIR[®]. En algunas realizaciones, el compuesto está conjugado con un polímero.

En algunas realizaciones, el compuesto que inhibe la MRP2 comprende uno o más de un compuesto que inhibe la hepoxilina A3 sintasa, tal como el ARNi de la hepoxilina A3 sintasa. En algunas realizaciones, el compuesto está conjugado con un polímero.

En algunas realizaciones, el compuesto que inhibe la MRP2 comprende uno o más compuestos que inhiben la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), tal como ARNi de FAAH; inhibidor de FAAH I (CID de PubChem: 295380) 4-fenilmetoxifenil) *N*-butilcarbamato); URB597 (PubChem CID: 1383884) ciclohexilcarbamato de 3'-carbamoil-[1,1'-bifenil]-3-ilo; inhibidor de FAAH 1 (CID de PubChem: 1190414) *N*-(4-(6-metilbenzo[d]tiazol-2-il)fenil)-1-(tiofen-2-ilsulfonil)piperidin-4-carboxamida; inhibidor de FAAH, 2l (CID de PubChem: 71699786); inhibidor de FAAH, 2i (CID de PubChem: 71699785) 4-(Dimetilamino)-3-fenilfenil éster del ácido *N*-ciclohexilcarbámico; inhibidor de FAAH, 2h (CID de PubChem: 71699784) 4-(hidroximetil)-3-fenilfenil éster del ácido *N*-ciclohexilcarbámico; inhibidor de FAAH, 2j (CID de PubChem: 58801136); inhibidor de FAAH, 2e (CID de PubChem: 58801135); inhibidor de FAAH, 2a (CID de PubChem: 58801134); inhibidor de FAAH, 2b (CID de PubChem: 58801129); inhibidor de FAAH, 2f (CID de PubChem: 58801126) Ácido carbámico, ciclohexil-, 6-metil[1,1'-bifenil]-3-il éster; inhibidor de FAAH, 2k (CID de PubChem: 58801125); inhibidor de FAAH, 2c (CID de PubChem: 57582480); inhibidor de FAAH, 2g (CID de PubChem: 44626363); inhibidor de FAAH, 2d (CID de PubChem: 44626362); AM374, fluoruro de palmitilsulfonilo; ARN2508, derivado de flurbiprofeno; BIA 10-2474; BMS-469908; CAY-10402; JNJ-245; JNJ-1661010; JNJ-28833155; JNJ-40413269; JNJ-42119779; JNJ-42165279; LY-2183240; Cannabidiol; MK-3168; MK-4409; MM-433593; OL-92; OL-135; PF-622; PF-750; PF-3845; PF-04457845; PF-04862853; RN-450; SA-47; SA-73; SSR-411298; ST-4068; TK-25; URB524; URB597 (KDS-4103, Kadmus Pharmaceuticals); URB694; URB937; VER-156084; V-158866; y múltiples inhibidores de FAAH de ChemCruz[®] Biochemicals, Dallas, Texas). En algunas realizaciones, el compuesto está conjugado con un polímero.

En algunas realizaciones, el compuesto que inhibe la MRP2 comprende uno o más compuestos que inhiben la P-glucoproteína (P-gp), tal como ARNi de P-gp; SipA; y moléculas pequeñas (por ejemplo, triclóhidrato de zosuquidar (LY335979); VALSPODAR[®] (PSC833) (inhibidor de la MDR mediada por P-gp); CP 100356 clorhidrato (Sigma-Aldrich); y clorhidrato de Elacridar (R&D Systems). Véanse también los documentos WO 2004071498 A1; WO 2014106021 A1; WO 2005033101 A1; WO 2004009584 A1; WO 2002030915 A2; US 20100029755 A1; y US 20060073196 A1). En algunas realizaciones, el compuesto está conjugado con un polímero.

En algunas realizaciones, los compuestos de ciclosporina A de la presente tecnología (incluyendo, pero sin limitación, los compuestos de Fórmulas I y IA) se usan junto con uno o más compuestos que aumentan las *N*-aciletanolaminas (NAE) para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. En algunas realizaciones, el compuesto que aumenta las NAE es un "agonista" del receptor cannabinoide tipo 2 (CB2) (es decir, un compuesto que se une específicamente a CB2 y lo activa). Los agonistas de CB2 ilustrativos incluyen GW-405.833; AM-1241; HU-308; JWH-015; JWH-133; L-759.633; L-759.656; beta-cariofileno; araquidonilciclopropilamida; y araquidonil-2'-cloroetilamida. En algunas realizaciones, el compuesto está conjugado con un polímero.

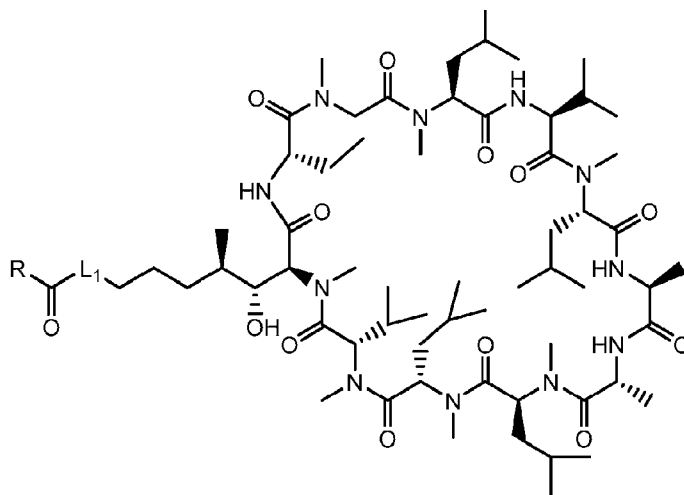
IV. Uso de las composiciones de la presente tecnología

La presente tecnología proporciona métodos para tratar, prevenir o mejorar la inflamación mediada por neutrófilos en un tejido diana de un sujeto mamífero que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más primeros compuestos que inhiben una o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del primer compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana. En algunas realizaciones, el primer compuesto es

un conjugado de ciclosporina A o un precursor del mismo, tal como, por ejemplo, compuestos de las Fórmulas I o IA. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más segundos compuestos que aumentan una o más N-aciletanolaminas (NAE), en donde la cantidad terapéutica del segundo compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana. En una realización adicional, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más segundos y/o terceros compuestos que aumentan el nivel y/o la actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), en donde la cantidad terapéutica de uno o más segundos y/o terceros compuestos reduce la migración de neutrófilos al tejido diana. En otra realización, los compuestos de la presente tecnología se administran individualmente o en combinación a una superficie tópica del tejido diana y/o en una superficie luminal del tejido diana. En una realización adicional, el primer compuesto que reduce la migración de neutrófilos al tejido diana está conjugado con un polímero. En otra realización, la inflamación es una inflamación no infecciosa y/o infecciosa.

La presente tecnología también proporciona métodos para tratar, mejorar o prevenir la inflamación mediada por neutrófilos en un tejido diana de un sujeto mamífero que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más primeros compuestos que aumentan una o más *N*-acil-etanolaminas (NAE), en donde la cantidad terapéutica del primer compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana. En una realización, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más segundos compuestos que inhiben uno o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la HXA₃ sintasa, en donde la cantidad terapéutica del segundo compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana. En algunas realizaciones, el segundo compuesto es un conjugado de ciclosporina A o un precursor del mismo, tal como, por ejemplo, compuestos de las Fórmulas I o IA. En otra realización, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más segundos y/o terceros compuestos que aumentan el nivel y/o la actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), en donde la cantidad terapéutica del uno o más segundos y/o terceros reduce la migración de neutrófilos al tejido diana. En una realización adicional, el uno o más primeros compuestos que aumentan la una o más NAE es un agonista del receptor cannabinoide tipo 2 (CB2). En otra realización, el primer compuesto que reduce la migración de neutrófilos al tejido diana está conjugado con un polímero.

En un aspecto, los métodos, compuestos y composiciones de la presente tecnología se refieren a conjugados de ciclosporina A-polímero y precursores definidos por la Fórmula I, así como con estereoisómeros de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores:



donde L₁ y R pueden ser como se definen en el presente documento, así como el uso de uno o más de estos compuestos (incluyendo, pero sin limitación, los de Fórmula IA, BT-051, BT-090, BT 123 y BT126) para tratar, mejorar o prevenir la inflamación mediada por neutrófilos en un tejido diana en un sujeto que lo necesite. En otras realizaciones, los compuestos de las Fórmulas I e IA, junto con uno o más compuestos (por ejemplo, un compuesto que aumenta el nivel y/o la actividad de MRP1, o un compuesto que aumenta las NAE) mostrarán un efecto sinérgico a este respecto.

En algunas realizaciones, los métodos, compuestos y composiciones de la presente tecnología se refieren al uso de uno o más de los compuestos de ciclosporina A de Fórmula I y IA para tratar, mejorar o prevenir la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), tal como colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC) y enterocolitis infecciosa/no infecciosa. En otras realizaciones, los compuestos de Fórmula I (incluyendo, pero sin limitación, la Fórmula IA, BT-051, BT-090, BT 123 y BT126) junto con uno o más compuestos (por ejemplo, un compuesto que aumenta el nivel y/o la actividad de MRP1, o un compuesto que aumenta las NAE) mostrarán un efecto sinérgico a este respecto.

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones de la presente tecnología se refieren al uso de uno o más de los compuestos de Fórmula I para tratar, mejorar o prevenir afecciones pulmonares inflamatorias infecciosas y no

infecciosas, incluyendo, pero sin limitación, infección neumocócica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar. En otras realizaciones, los compuestos de ciclosporina A junto con uno o más compuestos (por ejemplo, un compuesto que aumenta el nivel y/o la actividad de MRP1, o un compuesto que aumenta las NAE) mostrarán un efecto sinérgico a este respecto.

En algunas realizaciones, los métodos, compuestos y composiciones de la presente tecnología se refieren al uso de uno o más de los compuestos de ciclosporina A de Fórmula I para tratar, mejorar o prevenir enfermedades inflamatorias cutáneas, incluyendo, pero sin limitación, dermatitis (eccema), rosácea, dermatitis seborreica y psoriasis. En otras realizaciones, los compuestos de ciclosporina A junto con uno o más compuestos (por ejemplo, un compuesto que aumenta el nivel y/o la actividad de MRP1, o un compuesto que aumenta las NAE) mostrarán un efecto sinérgico a este respecto.

Los métodos de la presente tecnología son útiles para tratar la "inflamación", que es una afección física localizada en la que una parte del cuerpo reacciona a una lesión y/o infección. Los síntomas clásicos de la inflamación son calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor y/o pérdida de la función. Estas son manifestaciones de los cambios fisiológicos que se producen durante el proceso inflamatorio. Los tres componentes principales de este proceso son: (1) cambios en el calibre de los vasos sanguíneos y la velocidad del flujo sanguíneo a través de ellos (cambios hemodinámicos); (2) aumento de la permeabilidad capilar; y (3) exudación leucocítica. La "inflamación mediada por neutrófilos" se refiere a la exudación leucocítica y la etapa de inflamación, en la que los neutrófilos se desplazan hacia el revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos pequeños (marginación) y revisten el endotelio en una formación compacta (pavimentación). Finalmente, estos neutrófilos se desplazan a través de los espacios endoteliales y escapan al espacio extravascular (emigración). Una vez que están fuera de los vasos sanguíneos, pueden moverse libremente y, por quimiotaxis, son atraídos al lugar de la lesión. Las acumulaciones de neutrófilos (y macrófagos) en el área de inflamación actúan para neutralizar las partículas extrañas mediante fagocitosis.

La inflamación incluye la inflamación aguda, que normalmente es de aparición repentina, marcada por los signos clásicos de calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor y pérdida de función, y en la que predominan los procesos vasculares y exudativos; inflamación catarral, que es una forma que afecta principalmente a una superficie mucosa, marcada por una descarga copiosa de moco y restos epiteliales; inflamación crónica, que es una inflamación prolongada y persistente marcada principalmente por la formación de nuevo tejido conectivo; puede ser una continuación de una forma aguda o una forma prolongada de bajo grado; inflamación intersticial, que es una inflamación que afecta principalmente al estroma de un órgano; inflamación traumática, que es la que sigue a una herida o lesión; inflamación ulcerosa, en la que la necrosis en o cerca de la superficie conduce a la pérdida de tejido y la creación de un defecto local (úlceras).

La inflamación puede ser infecciosa y/o no infecciosa. La inflamación "infecciosa" se refiere a la inflamación que está asociada con y/o es provocada por la invasión y multiplicación de microorganismos tales como bacterias, virus y parásitos que normalmente no están presentes dentro del cuerpo. En cambio, la inflamación "no infecciosa" se refiere a la inflamación que no está asociada con y/o no es causada por la invasión y multiplicación de microorganismos tales como bacterias, virus y parásitos que normalmente no están presentes dentro del cuerpo.

En otra realización, la presente tecnología proporciona un método para tratar la inflamación mediada por neutrófilos al dirigirse a la vía proinflamatoria MRP2/HXA₃. En una realización particular, este método para tratar la inflamación mediada por neutrófilos en un tejido diana de un sujeto mamífero que lo necesita, comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más primeros compuestos que inhiben la actividad y/o el nivel de una o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepoxilina A₃ (HXA₃) sintasa, en donde la cantidad terapéutica del primer compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana. En algunas realizaciones, el compuesto es un conjugado o precursor de ciclosporina A, tal como un compuesto de Fórmula I (incluyendo, pero sin limitación, Fórmula IA, BT-051, BT-090, BT123 y BT126).

En diversas realizaciones, se realizan ensayos *in vitro* o *in vivo* adecuados para determinar el efecto de una composición específica de la presente tecnología y si su administración está indicada para el tratamiento. En diversas realizaciones, se pueden realizar ensayos *in vitro* con ensayos representativos basados en células, tal como el ensayo de migración de neutrófilos. En otras realizaciones, se pueden usar modelos *in vivo*, tipificados por modelos animales, para determinar si un conjugado (o precursor) de ciclosporina A determinado solo o junto con uno o más compuestos adicionales (por ejemplo, un compuesto adicional que inhibe una o más de MRP2 y HXA₃ sintasa, un compuesto que aumenta el nivel y/o la actividad de MRP1 o un compuesto que aumenta las NAE), ejerce el efecto deseado en el tratamiento de una enfermedad o afección. Los compuestos para su uso en terapia se pueden ensayar en sistemas de modelos animales adecuados incluyendo, pero sin limitación, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, conejos y similares, antes de ensayarlos en sujetos humanos. De manera similar, para las pruebas *in vivo*, se puede usar cualquiera de los sistemas de modelos animales conocidos en la técnica antes de la administración a sujetos humanos.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente tecnología comprenden además la administración de uno o más agentes antibióticos y/o antiinflamatorios. Los ejemplos de agentes antibióticos/antiinflamatorios usados individualmente o en combinación en los métodos de la presente tecnología incluyen, pero sin limitación, dalbavancina (DALVANCE[®], XYDALBA[®]), oritavancina (ORBACTIVE[®]) daptomicina (Cubicin[®]), tedizolid (SIVEXTRO[®]), ceftobiprol

(ZEVTERA®, MABELIO®), Ceftolozano-tazobactam (ZERBAXA®) mupirocina, sulfato de neomicina bacitracina, polimixina B, 1-ofloxacino, fosfato de clindamicina, sulfato de gentamicina, metronidazol, hexilresorcinol, cloruro de metilbenzetonio, fenol, compuestos de amonio cuaternario, aceite de árbol del té, agentes esteroides, tales como corticosteroides, tales como hidrocortisona, hidroxiltriamicinolona, alfametil dexametasona, fosfato de dexametasona, dipropionato de beclometasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetónido de flucloclorona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónido de fluosinolona, fluocinonida, éster butílico de flucortona, flucortolona, acetato de fluprednido (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamicinolona, cortisona, cortodoxona, flucetonida, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, acetónido de fluradrenolona, medrisona, amciafel, amcinafida, betametasona, clorprednisona, acetato de clorprednisona, clocortelona, clescilonona, diclorisona, difluprednato, flucloclorona, flunisolida, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisolona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, dipropionato de betametasona, triamicinolona, agentes no esteroides, tales como inhibidores de COX, inhibidores de LOX, inhibidores de p38 cinasa, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina e inhibidores de la síntesis de citocinas, tetraciclina, minociclina y doxiciclina, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente tecnología comprenden además administrar uno o más anticuerpos, estando dichos anticuerpos dirigidos a una o más toxinas de *Clostridium difficile*, factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas, metaloproteína-9 (tal como el anticuerpo GS-5745, Gilead).

Por ejemplo, en la enfermedad de Crohn, puede ser deseable que uno cualquiera de los métodos de la presente tecnología comprenda además administrar uno o más productos de mesalamina, formulaciones de corticosteroides, tanto corticosteroides convencionales como budesonida de liberación ileal, glucocorticosteroides/inmunomoduladores EEN (tales como azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato), fármacos anti factor de necrosis tumoral (TNF) (tales como infliximab (Remicade, Janssen), adalimumab (Humira, AbbVie) y certolizumab pegol (Cimzia, UCB)), el anticuerpo anti integrina alfa-4 beta-7 vedolizumab (Entyvio, Takeda), inhibidores de JAK ABT-494 (AbbVie) y filgotinib (GLPG0634, Galapagos y Gilead) (Sandborn, The Present and Future of Inflammatory Bowel Disease Treatment Gastroenterology & Hepatology, Volumen 12, número 7, julio de 2016).

Para la colitis ulcerosa, puede ser deseable que uno cualquiera de los métodos de la presente tecnología comprenda además la administración de uno o más de 5-aminosalicilatos, mesalamina, corticosteroides convencionales o budesonida multimatriz (Uceris, Salix), que suministra el fármaco al colon, azatioprina, 6-mercaptopurina, fármacos anti TNF (tales como infliximab, adalimumab y golimumab (Simponi, Janssen)), vedolizumab, inhibidores de la cinasa Janus (JAK) (por ejemplo, tofacitinib (Xeljanz, Pfizer), ABT-494 (AbbVie) y filgotinib (GLPG0634, Galapagos y Gilead)) (Sandborn 2016).

V. Terapias combinadas

En algunas realizaciones, los compuestos de ciclosporina A de la presente tecnología pueden combinarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales para la prevención, mejora o tratamiento de una enfermedad o afección.

En una realización, se administra un agente terapéutico adicional a un sujeto junto con un conjugado o precursor de ciclosporina A de la presente tecnología (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I, incluyendo, pero sin limitación, Fórmula IA, BT-051, BT-090, BT 123 y BT126) de modo que se produzca un efecto terapéutico sinérgico.

En algunas realizaciones, los compuestos de ciclosporina A de la presente tecnología (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I, incluyendo, pero sin limitación, Fórmula IA, BT-051, BT-090, BT 123 y BT126) se combinan con uno o más métodos o compuestos para el tratamiento o la prevención de la enfermedad celíaca o los síntomas asociados con la enfermedad celíaca. En algunas realizaciones, el uno o más compuestos comprenden un agente antiinflamatorio. En algunas realizaciones, el uno o más compuestos comprenden infliximab. En algunas realizaciones, uno o más métodos comprenden una dieta sin gluten.

En algunas realizaciones, los compuestos de ciclosporina A de la presente tecnología (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I, incluyendo, pero sin limitación, Fórmula IA, BT-051, BT-090, BT 123 y BT126) se combinan con uno o más compuestos que aumentan los niveles de proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1) descrita anteriormente.

En algunas realizaciones, los compuestos de ciclosporina A de la presente tecnología (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I, incluyendo, pero sin limitación, Fórmula IA, BT-051, BT-090, BT 123 y BT126) se combinan con uno o más compuestos adicionales que inhiben una o más de las proteínas de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa descritas anteriormente.

En algunas realizaciones, los compuestos de ciclosporina A de la presente tecnología (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I, incluyendo, pero sin limitación, Fórmula IA, BT-051, BT-090, BT 123 y BT126) se combinan con uno o más compuestos adicionales que aumentan las N-aciletanolaminas (NAE) descritas anteriormente.

En algunas realizaciones, los compuestos de ciclosporina A de la presente tecnología (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I, incluyendo, pero sin limitación, Fórmula IA, BT-051, BT-090, BT 123 y BT126) se combinan con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar la inflamación mediada por neutrófilos y las afecciones asociadas con la misma, incluyendo, pero sin limitación, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. En algunas realizaciones, la presente tecnología proporciona composiciones que comprenden uno o más de un primer compuesto que aumenta el nivel y/o la actividad de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), un segundo compuesto, tal como un conjugado de ciclosporina A, que inhibe una o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepoxilina A3 (HXA₃) sintasa, y/o un tercer compuesto que aumenta una o más *N*-acil-etanolaminas (NAE).

Los agentes terapéuticos múltiples (por ejemplo, conjugados de ciclosporina A, compuestos que aumentan el nivel y/o la actividad de MRP1, inhibidores adicionales de la MRP2 y HXA₃ sintasa y/o compuestos que aumentan los NAE) pueden administrarse en cualquier orden o incluso simultáneamente. Si se administran simultáneamente, los agentes terapéuticos múltiples pueden proporcionarse en una única forma unificada o en múltiples formas (solo a modo de ejemplo, ya sea como una única formulación o como dos formulaciones separadas). Uno de los agentes terapéuticos se puede administrar en dosis múltiples, o ambos se pueden administrar en dosis múltiples. Si no se administran simultáneamente, el tiempo entre las múltiples dosis puede variar desde más de cero semanas hasta menos de cuatro semanas. Además, los métodos de combinación, las composiciones y las formulaciones no se deben limitar al uso de solo dos agentes.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente tecnología comprenden además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto que aumenta el nivel y/o la actividad de una o más *N*-acil-etanolaminas (NAE), en donde la cantidad terapéutica del compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

En algunas realizaciones, el compuesto que aumenta las NAE es un "agonista" del receptor cannabinoide tipo 2 (CB2) (es decir, un compuesto que se une específicamente a CB2 y lo activa). Los agonistas de CB2 se ilustran por GW-405.833; AM-1241; HU-308; JWH-015; JWH-133; L-759.633; L-759.656; beta-cariofileno; araquidonilciclopropilamida; y araquidonil-2'-cloroetilamida.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente tecnología pueden comprender además la administración de uno o más agentes antibióticos y/o antiinflamatorios. Los ejemplos de agentes antibióticos/antiinflamatorios usados individualmente o en combinación en los métodos de la presente tecnología incluyen, pero sin limitación, dalbavancina (DALVANCE[®], XYDALBA[®]), oritavancina (ORBACTIVE[®]) daptomicina (Cubicin[®]), tedizolid (SIVEXTRO[®]), ceftobiprol (ZEVTERA[®], MABELIO[®]), ceftobiprol (ZEVTERA[®], MABELIO[®]), Ceftolozano-tazobactam (ZERBAXA[®]) mupirocina, sulfato de neomicina baci-tracina, polimixina B, 1-ofloxacin, fosfato de clindamicina, sulfato de gentamicina, metronidazol, hexilresorcinol, cloruro de metilbenzetonio, fenol, compuestos de amonio cuaternario, aceite de árbol del té, agentes esteroideos, tales como corticosteroides, tales como hidrocortisona, hidroxil-triamcinolona, alfametil dexametasona, fosfato de dexametasona, dipropionato de beclometasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetónido de flucarolona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónida de fluosinolona, fluocinonida, éster butílico de flucortina, fluocortolona, acetato de fluprednidenol (fluprednilideno), fluradrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamcinolona, cortisona, cortodoxona, flucetonida, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, acetónido de fluradrenolona, medrisolona, amciafel, amcinafida, betametasona, clorprednisona, acetato de clorprednisona, clocortelona, clescínolona, diclorisona, difluprednato, fluclo-ronida, flunisolida, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisolona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, dipropionato de betametasona, triamcinolona, agentes no esteroideos, tales como inhibidores de COX, inhibidores de LOX, inhibidores de p38 cinasa, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina e inhibidores de la síntesis de citocinas, tetraciclina, minociclina y doxiciclina, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente tecnología pueden comprender además administrar uno o más anticuerpos, tales como anticuerpos dirigidos a una o más toxinas de *Clostridium difficile*, factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas, metaloproteína-9 (tal como el anticuerpo GS-5745, Gilead).

En algunas realizaciones, la presente divulgación abarca métodos para el tratamiento, mejora o prevención de la enfermedad de Crohn, que comprenden administrar uno o más compuestos de la presente tecnología junto con al menos uno o más productos de mesalamina, formulaciones de corticosteroides, tanto corticosteroides convencionales como budesonida de liberación ileal, glucocorticosteroides/inmunomoduladores EEN (tales como azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato), fármacos anti factor de necrosis tumoral (TNF) (tales como infliximab (Remicade, Janssen), adalimumab (Humira, AbbVie) y certolizumab pegol (Cimzia, UCB)), el anticuerpo anti integrina alfa-4 beta-7 vedolizumab (Entyvio, Takeda), los inhibidores de JAK ABT-494 (AbbVie), y filgotinib (GLPG0634, Galapagos y Gilead) (Sandborn, Gastroenterology & Hepatology 12(7) (2016)).

En algunas realizaciones, la presente divulgación abarca métodos para el tratamiento, mejora o prevención de la colitis

ulcerosa, que comprenden administrar uno o más compuestos de la presente tecnología junto con al menos uno o más de 5-aminosalicilatos, mesalamina, corticosteroides convencionales o budesonida multimatriz (Uceris, Salix), que suministra el fármaco al colon, azatioprina, 6-mercaptopurina, fármacos anti TNF (tales como infliximab, adalimumab y golimumab (Simponi, Janssen)), vedolizumab, inhibidores de la cinasa Janus (JAK) (por ejemplo, tofacitinib (Xeljanz, Pfizer), ABT-494 (AbbVie) y filgotinib (GLPG0634, Galapagos y Gilead)) (Sandborn, 2016).

VI. Modos de administración

Puede emplearse cualquier método conocido por los expertos en la técnica para poner en contacto una célula, un órgano o un tejido con compuestos de la presente tecnología. Los métodos adecuados incluyen métodos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

Los métodos *in vitro* incluyen típicamente muestras cultivadas. Por ejemplo, una célula se puede colocar en un depósito (por ejemplo, una placa de cultivo tisular) e incubarse con un compuesto en condiciones apropiadas adecuadas para obtener el resultado deseado. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las condiciones de incubación adecuadas.

Los métodos *ex vivo* incluyen típicamente células, órganos o tejidos extraídos de un mamífero, tal como un ser humano. Las células, órganos o tejidos se pueden incubar, por ejemplo, con el compuesto en condiciones apropiadas. Las células, órganos o tejidos en contacto se devuelven típicamente al donante, se colocan en un recipiente o se almacenan para su uso futuro. Por lo tanto, el compuesto está generalmente en un portador farmacéuticamente aceptable.

Los métodos *in vivo* incluyen típicamente la administración de un compuesto de la presente tecnología a un mamífero, tal como un ser humano. Cuando se usa *in vivo* para terapia, un compuesto de la presente tecnología se administra a un mamífero en una cantidad eficaz para obtener el resultado deseado, por ejemplo, tratar al mamífero. La cantidad eficaz se determina durante los ensayos preclínicos y los ensayos clínicos mediante métodos familiares para médicos y clínicos. La dosis y la pauta posológica dependerán del grado de la enfermedad o afección en el sujeto, las características del compuesto particular de la presente tecnología usado, por ejemplo, su índice terapéutico, el sujeto y los antecedentes del sujeto.

Una cantidad eficaz de un compuesto de la presente tecnología útil en los presentes métodos, tal como en una composición farmacéutica o medicamento, puede administrarse a un mamífero que lo necesite mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos para administrar composiciones farmacéuticas o medicamentos. Los compuestos de la presente tecnología pueden administrarse sistémica o localmente.

Los compuestos de la presente tecnología descrita en el presente documento se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas para su administración, por separado o en combinación, a un sujeto para el tratamiento o prevención de un trastorno descrito en el presente documento. Dichas composiciones incluyen típicamente el agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación contienen un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para hacer que el compuesto o la mezcla se puedan administrar por vía oral en forma de un comprimido, una cápsula o una píldora, o por vía parenteral, intravenosa, intradérmica, intramuscular o subcutánea, o transdérmica.

Las composiciones farmacéuticas se formulan típicamente para que sean compatibles con la vía de administración prevista. La administración de la composición farmacéutica de la presente divulgación puede realizarse por cualquier medio conocido por el experto en la técnica. Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, administración parenteral, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intratraqueal, subcutánea, oral, intranasal/respiratoria (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), sublingual, ocular, vaginal, rectal y transmucosa. Las vías sistémicas incluyen oral y parenteral. Varios tipos de dispositivos se usan regularmente para administración por inhalación. Estos tipos de dispositivos incluyen inhaladores dosificadores (MDI, por sus siglas en inglés), MDI accionado por la respiración, inhalador de polvo seco (DPI, por sus siglas en inglés), cámaras espaciadoras/de retención en combinación con MDI y nebulizadores.

Para administración oral, el compuesto se puede formular fácilmente combinando el uno o más compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos portadores permiten formular los compuestos de la divulgación como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para su ingestión oral por un sujeto que se va a tratar. Pueden obtenerse preparaciones farmacéuticas para su uso oral como excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de

grageas. Son excipientes adecuados, en particular, cargas, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en solución salina o tampones para neutralizar las condiciones ácidas internas o se pueden administrar sin ningún portador.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los principios activos mezclados con una carga, tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. También pueden usarse microesferas formuladas para administración oral. Dichas microesferas han sido bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para tal administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

Para administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol en envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los compuestos, cuando es deseable suministrarlos de manera sistémica, pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección intravenosa rápida o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden comprender agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de su uso.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan bases para supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

En algunas realizaciones, la administración es tópica y/o en la superficie luminal del tejido a tratar. La administración "tópica" de una composición significa poner en contacto la composición con la piel. "Superficie luminal" se refiere al espacio abierto interior o cavidad de un órgano tubular, tal como el espacio central interior en una arteria o vena a través del cual fluye la sangre; el interior del tubo gastrointestinal; las vías de los bronquios en los pulmones; el interior de los túbulos renales y conductos colectores urinarios; las vías del tracto genital femenino, comenzando con una única vía de la vagina, dividiéndose en dos lúmenes en el útero, los cuales continúan a través de las trompas de Falopio.

En algunas realizaciones, los compuestos de la presente tecnología se administran por vía tópica y/o en una superficie luminal del tejido diana. Esto es ventajoso para reducir los posibles efectos secundarios tóxicos sistémicos de los compuestos.

Otros sistemas de suministro pueden incluir sistemas de suministro de liberación prolongada, liberación retardada o liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de los compuestos, aumentando la

comodidad para el sujeto y el médico. Hay disponibles muchos tipos de sistemas de suministro de liberación y se conocen por los expertos en la técnica. Incluyen sistemas a base de polímero tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Se describen microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos en, por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 5.075.109. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos, incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas a base de péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos con aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación: (a) sistemas erosivos en los que un agente de la divulgación está contenido en una forma dentro de una matriz tal como las descritas en las Pat. de EE. UU. N.º 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152, y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo se infiltra a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las Pat. de EE. UU. N.º 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden usar sistemas de suministro de hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

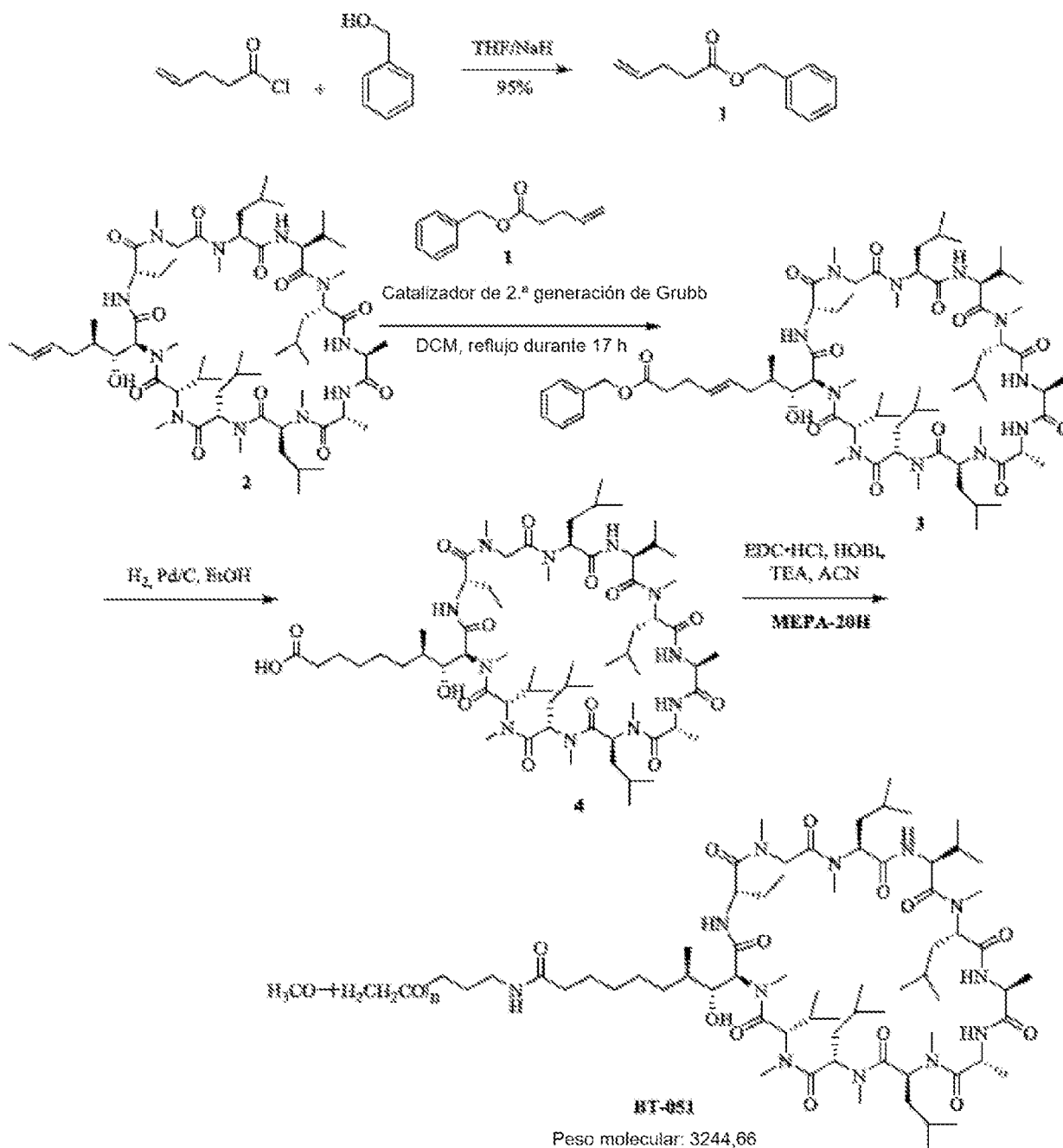
EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La presente tecnología se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

Ejemplo 1: Síntesis de conjugados de PEG-ciclosporina A.

En los Esquemas 1 y 2 se muestran ejemplos ilustrativos de la síntesis general de conjugados de PEG-ciclosporina A. Como entenderán los expertos en la técnica, la cadena lateral a la que se une el PEG puede variar en longitud usando homólogos adecuados de éster olefínico, 1. Por ejemplo, el pent-4-enoato de bencilo puede sustituirse por prop-2-enoato de bencilo (acrilato de bencilo), but-3-enoato de bencilo, hex-5-enoato de bencilo o hept-6-enoato de bencilo para proporcionar una cadena lateral más corta o más larga. El uso de dichos homólogos está dentro de la experiencia en la técnica.

Esquema 1



Síntesis del intermedio 1. Un matraz de fondo redondo de 2 l equipado con un agitador mecánico y un termopar se purgó con nitrógeno. Se añadió hidruro de sodio (18,9 g, 1,05 equiv., dispersión al 60 % en aceite mineral, Sigma) seguido de THF anhidro (540 ml, 10 vol., Sigma). La mezcla se enfrió a <10 °C en un baño de hielo-agua. A continuación, se añadió gota a gota alcohol bencílico (50,9 ml, 0,473 mol, 1,05 equiv., Sigma) durante un período de 45 min. La temperatura interna se mantuvo a <10 °C durante la adición. El baño de hielo se retiró y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 15 min. La mezcla se enfrió de nuevo a <10 °C. Se añadió gota a gota cloruro de 4-pentenóilo (50 ml, 1 equiv., 0,450 mol, Sigma) durante un período de 60 min (la temperatura interna pasó de 5 a 15 °C durante la adición). La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 20 h. La reacción se interrumpió con 30 ml de NH₄Cl sat. y se añadió EtOAc (250 ml). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ sat. (200 ml) y a continuación con salmuera (200 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el filtrado se concentró por evaporación rotatoria para obtener el producto en bruto **1** en forma de un aceite. El producto en bruto se purificó por cromatografía (SiO₂, 1 kg, 25 cm x 10 cm, EtOAc al 10 %/heptanos) para dar el intermedio **1** (81,9 g, 95 % de rendimiento) en forma de un líquido transparente. La ¹H RMN fue consistente con la estructura asignada y la pureza por HPLC fue del 98,9 %.

Síntesis del intermedio 3. Un matraz de fondo redondo de 25 ml equipado con una barra agitadora magnética se colocó

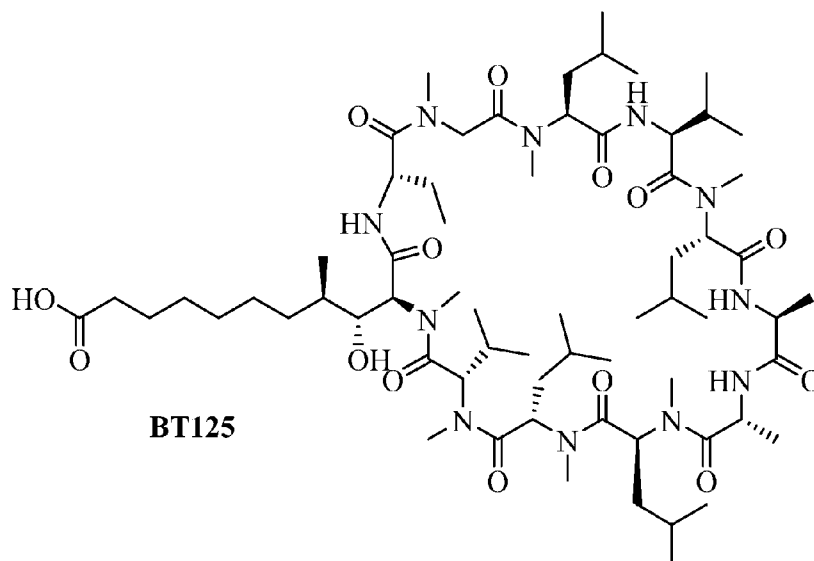
bajo una manta de nitrógeno. Se añadió el compuesto **2** (1,40 g, 1,16 mmol, 1,0 equiv.) seguido de DCM (35 ml, desgasificado mediante purga de nitrógeno) dando como resultado una solución. A esto se le añadió el intermedio **1** (1,87 g, 9,84 mmol, 8,5 equiv.). Esta mezcla se desgasificó mediante purga de nitrógeno durante 5 min. A continuación, el matraz se cargó con el catalizador de 2.^a generación de Grubb (0,11 g, 0,13 mmol, 0,13 equiv., Sigma-Aldrich) y la mezcla se desgasificó de nuevo con purga de nitrógeno durante 5 min. La mezcla se llevó a reflujo en una atmósfera de argón con agitación vigorosa durante 17 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía (ISCO, SiO₂, MeOH al 0-10 %/DCM) para dar el intermedio **3** (1,1 g) en forma de un sólido de color amarillo claro, que contiene el 7,3 % del compuesto **2** según se determinó mediante análisis por HPLC.

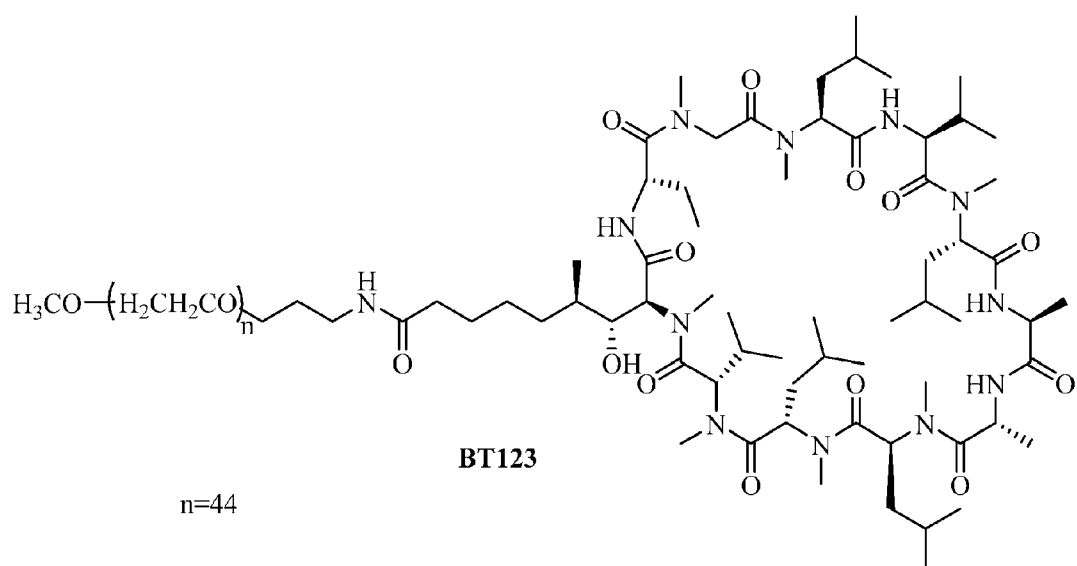
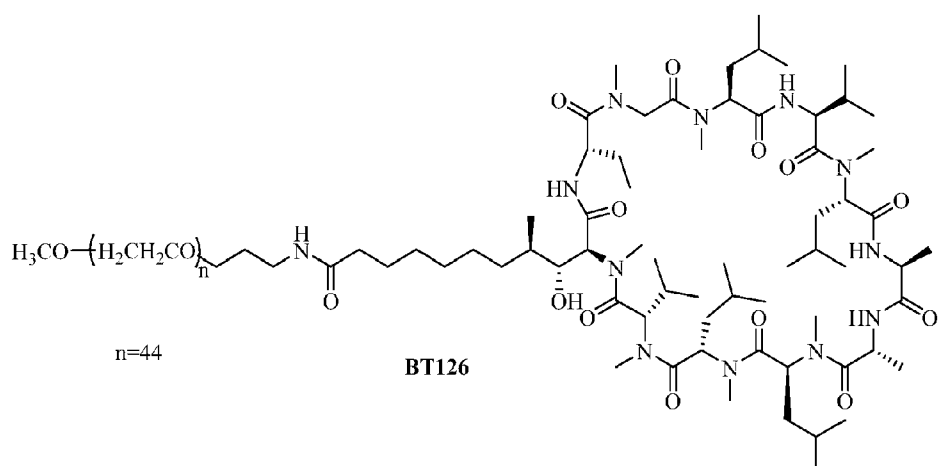
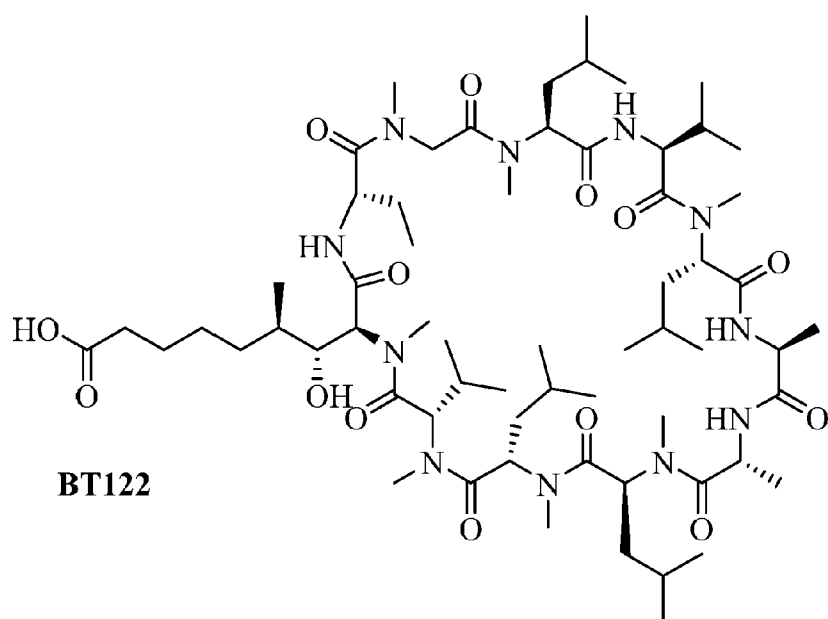
La reacción se repitió en una escala de 5 g (compuesto **2**) en las mismas condiciones. El producto en bruto que se obtuvo se purificará por cromatografía en columna.

Síntesis del intermedio 4 (BT-070). Un frasco Fisher Porter de 150 ml se cargó con el intermedio **3** (1,0 g, 0,74 mmol, 1,0 equiv.), Pd al 10 %/C (0,40 g, agua al 50 %, Johnson Matthey) y EtOH (20 ml). El matraz se evacuó al vacío y se relleno con H₂ tres veces y se agitó a una presión de hidrógeno de 344,74 kPa (50 psi) durante 23 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y el lecho se lavó con metanol (2 x 10 ml). El filtrado combinado se concentró por evaporación rotatoria para dar el intermedio **4** en forma de un sólido (0,95 g). Como se usa en el presente documento, el intermedio **4** del Esquema 1 también se refiere a BT-070.

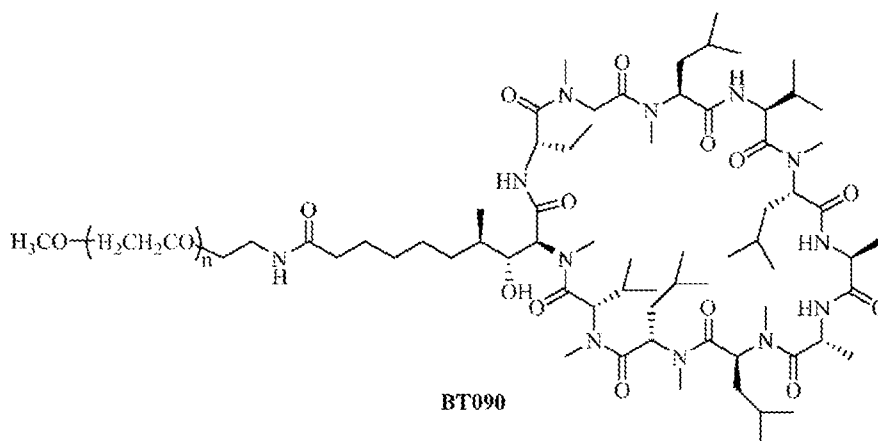
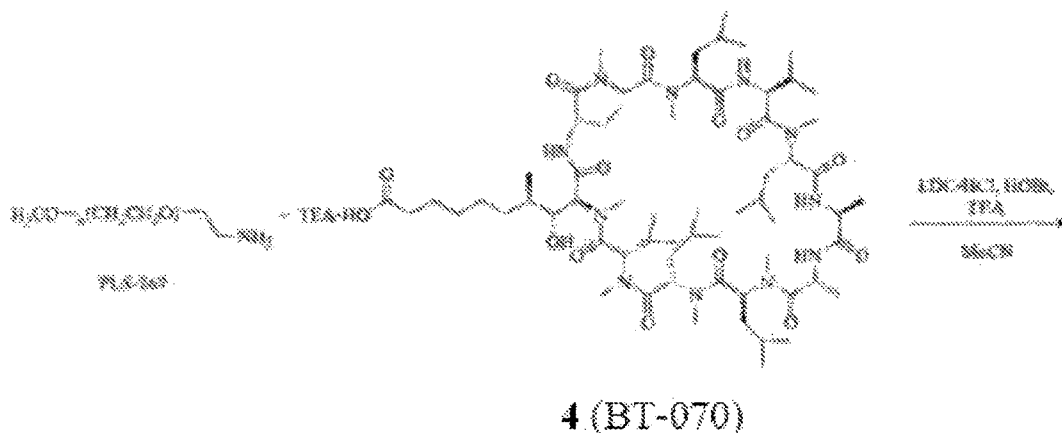
Síntesis de BT-051. Un matraz de F.R. de 50 ml lavado abundantemente con nitrógeno equipado con una barra de agitación magnética se cargó con el intermedio en bruto **4** (0,57, AMRI, JWU-B-5-1), MEPA-20H (1,00 g, NOF), HOBT·H₂O (0,096 g, Aldrich). La mezcla se colocó bajo una manta de N₂ y se disolvió en acetonitrilo (10 ml, Sigma Aldrich). Se añadió TEA (0,18 ml) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo-agua. Se añadió en una sola porción EDC·HCl (0,104 g, Sigma-Aldrich), y la reacción se retiró del baño de hielo y se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente. La reacción se determinó que estaba completa mediante análisis por HPLC después de 21 h. La reacción se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó con H₂O DI (2 x 20 ml) y salmuera (20 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía (SiO₂, MeOH al 5-15 %/DCM) para dar **BT-051** en forma de un sólido de color blanco (0,40 g, 27 % de rendimiento). La ¹H RMN fue consistente con la estructura asignada y la pureza por HPLC fue del 98,2 %.

La síntesis general de conjugados de PEG-ciclosporina A como se muestra en el Esquema 1 también condujo a la producción de derivados +/- CH₂ de BT-070 y BT-051, que se muestran a continuación. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que los derivados +/- CH₂ se generaron mediante el Esquema 1 debido al uso del catalizador de Grubb en la primera etapa de la síntesis, que fomenta la migración del doble enlace. El derivado de BT-070 que tiene un carbono adicional en el enlazador (L₁ = -CH₂CH₂CH₂-) es BT125. El derivado de BT-070 que tiene un carbono menos en el enlazador (L₁ = -CH₂-) es BT122. El derivado de BT-051 que tiene un carbono adicional en el enlazador (L₁ = -CH₂CH₂CH₂-) es BT126. El derivado que tiene un carbono menos en el enlazador (L₁ = -CH₂-) es BT123.





Esquema 2



Síntesis de BT-090. Condiciones de reacción: 1,0 equiv. de ácido CsA (BT070, también conocido como intermedio 4), 1,25 equiv. de PLS-269, 1,4 equiv. de EDC·HCl, 1,25 equiv. de HOBT, 1 equiv. de TEA, MeCN (4 ml, 31,7 vol), 0 °C-ta, 28,5 h (Esquema 2). En un M.F.R. de 100 ml que contenía HOU-E-63-3 (0,126 g, AMRI) se cargaron MEPA-20H (0,230 g, NOF), HOBT·H₂O (0,019 g, Aldrich) y una barra de agitación. Los reactivos se colocaron bajo una manta de N₂, se disolvieron en acetonitrilo (3,2 ml, Sigma Aldrich) y a continuación en TEA (0,013 ml, Aldrich), y se colocaron en un baño de hielo con agitación durante 10 min. Se añadió en una sola porción EDC·HCl (0,027 g, Sigma-Aldrich), y la reacción se retiró del baño de hielo y se dejó calentar gradualmente hasta temperatura ambiente. Después de 21 h, la reacción se diluyó con DCM (50 ml, Pride) y se extrajo con H₂O DI (2 x 20 ml), salmuera (20 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía (SiO₂, MeOH al 5-15 %/DCM) para dar el producto (0,181 g, 61 %). El material se disolvió en una cantidad mínima de agua, se congeló uniformemente en un baño de hielo seco/acetona y se liofilizó hasta secarse para dar un sólido de color blanco.

Ejemplo 2: Inhibición de la migración de neutrófilos por compuestos de la presente tecnología.

Este ejemplo demuestra la eficacia de los compuestos de la presente tecnología para inhibir la migración de neutrófilos *in vitro*, y que los compuestos de la presente tecnología exhiben una inhibición dependiente de la dosis de la migración de neutrófilos.

Ensayo de transmigración de PMN. Se cultivaron células de cáncer colorrectal T84 hasta la confluencia en el lado inferior de insertos de membrana de policarbonato de 12 pocillos de una placa Transwell® de 24 pocillos. El crecimiento confluyente de estas células epiteliales da como resultado superficies apicales (luminales) y basolaterales fisiológicamente relevantes en los transpocillos.

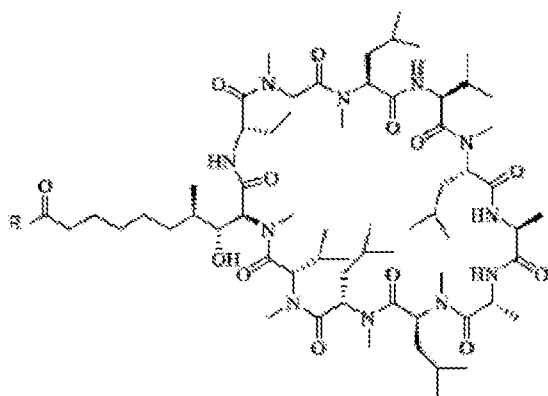
La superficie apical de la monocapa se trató con BT051, BT070, BT090, BT122, BT123, BT125 o BT126 en un intervalo de dosis durante 1 hora. A continuación, la monocapa se infectó en la superficie apical con *Salmonella typhimurium* durante 2 horas para inducir el eflujo de heparina A₃ (HXA₃) a través de la proteína de membrana MRP2 y hacia la cámara apical.

Las bacterias se lavaron de la monocapa y la superficie apical se volvió a exponer a BT051, BT070, BT090, BT122,

BT123, BT125 o BT126. A continuación, se añadieron neutrófilos humanos recién aislados y preparados al lado basolateral y se les permitió transmigrar a través de la monocapa durante 2 horas. A continuación, el número de neutrófilos migrados a la cámara apical (debido al gradiente de HXA₃) se ensayó mediante la determinación de la actividad de mieloperoxidasa (un biomarcador de neutrófilos). La inhibición de la trans migración se indica mediante una menor actividad de MPO en la cámara apical.

Resultados. Como se muestra en la **figura 1**, BT051 y BT070 exhiben una inhibición dependiente de la dosis de la migración de neutrófilos. Se observó una inhibición del 50 % a concentraciones de compuesto de 31,25 nM.

Como se muestra en la **Tabla A**, BT051 y BT070 exhiben inhibición de la migración de neutrófilos a una dosis de 100 nM. Sin embargo, BT090 no exhibe inhibición de la migración de neutrófilos a una dosis de 100 nM. Para el propósito de la **Tabla A**, el conjugado/precursor de PEG-ciclosporina A se representa por el compuesto que tiene la siguiente fórmula:

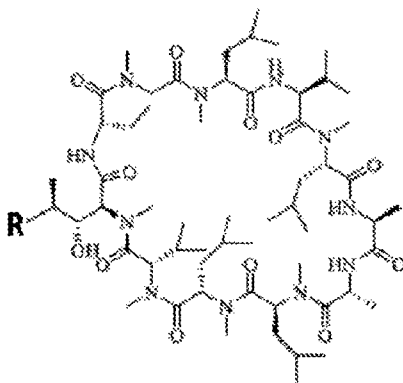


(IA)

Tabla A. Actividad inhibidora de los conjugados y precursores de PEG-ciclosporina A en el ensayo de trans migración de neutrófilos (compuestos ensayados a 100 nM).

Compuesto	R =	% de inhibición
BT051	CH ₃ O-(CH ₂ CH ₂ O) ₄₄ -CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-	50
BT090	CH ₃ O-(CH ₂ CH ₂ O) ₄₄ -CH ₂ CH ₂ NH-	0
BT070	HO-	50

Como se muestra en la **Tabla B**, los derivados de BT051 que tienen un carbono adicional en el enlazador (BT126) o un carbono menos en el enlazador (BT123), y los derivados de BT070 que tienen un carbono adicional en el enlazador (BT125) o un carbono menos en el enlazador (BT122) exhiben inhibición de la migración de neutrófilos a una dosis de 100 nM. Para el propósito de la **Tabla B**, el conjugado/precursor de PEG-ciclosporina A se representa por el compuesto que tiene la siguiente fórmula:



(IB)

Tabla B. Actividad inhibidora de los conjugados y precursores de PEG-ciclosporina A en el ensayo de trans migración de neutrófilos (compuestos ensayados a 100 nM).

Compuesto	R =	% de inhibición
BT122	COOH-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	25

(continuación)

Tabla B. Actividad inhibidora de los conjugados y precursores de PEG-ciclosporina A en el ensayo de trans migración de neutrófilos (compuestos ensayados a 100 nM).		
BT123	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{44}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$	50
BT125	$\text{COOH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$	95
BT126	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{44}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$	50

Estos resultados demuestran la sorprendente e inesperada capacidad de determinados conjugados/precursores de PEG-ciclosporina A para inhibir la migración de neutrófilos. Por consiguiente, estos resultados demuestran que los compuestos de la tecnología actual son útiles en métodos para inhibir la migración de neutrófilos, tales como métodos para la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones causadas por, que dan como resultado, o de otro modo están asociados con la migración de neutrófilos.

Ejemplo 3: Estabilidad de los compuestos de PEG-ciclosporina A en fluido intestinal simulado, fluido gástrico simulado y heces.

Este ejemplo demuestra que los compuestos de PEG-ciclosporina A (incluidos los conjugados) de la presente tecnología son estables en fluido intestinal simulado, fluido gástrico simulado y heces.

A. BT090

Estabilidad en las heces. Inmediatamente antes del estudio, se recogieron heces de ratas Sprague-Dawley macho durante una noche sobre una mezcla de hielo seco y húmedo. A continuación, las heces se homogeneizaron en tampón de fosfato a pH 6,5 y se filtraron para eliminar las partículas. BT090 (10 µM) se incubó por duplicado a 37 °C durante un total de 24 horas en el homogeneizado de heces de rata recién preparado. En los puntos temporales seleccionados (0,5, 2, 6 y 24 horas), se tomó una alícuota de 25 µl de las mezclas de incubación y se inactivó con 225 µl de acetonitrilo que contenía los patrones internos (IS, por sus siglas en inglés). A continuación, las muestras se centrifugaron para sedimentar las proteínas precipitadas y los sobrenadantes se diluyeron 5 veces. Las muestras de la hora 0 se prepararon en homogeneizado de heces inactivado previamente hacia el final del período de incubación. A continuación, todas las muestras inactivadas se sometieron a bioanálisis para la cuantificación por LC-MS/MS.

Procedimiento de estabilidad en FGS/FISEP. BT090 (10 µM) se incubó por duplicado a 37 °C durante un total de 6 horas en fluido gástrico simulado (FGS) (Ricca, Arlington, TX) y fluido intestinal simulado en estado postprandial (FISEP) (Biorelevant, Londres, Reino Unido). Las reacciones se iniciaron añadiendo los artículos de prueba (soluciones madre de agua 1 mM) a sus respectivos tampones. En los puntos temporales seleccionados (0, 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas), se tomó una alícuota de 50 µl de las mezclas de incubación y se congeló a -80 °C. Al final del período de incubación, a cada tubo se le añadieron 200 µl de 50:50 de acetonitrilo:agua que contenían los patrones internos (IS) y se agitaron vorticialmente a fondo. Las muestras de la hora 0 se prepararon en FGS o FISEP inactivados previamente. A continuación, todas las muestras inactivadas se sometieron a bioanálisis para la cuantificación por LC-MS/MS.

Bioanálisis. Las muestras de BT090 se analizaron mediante LC-MS/MS usando una UPLC Thermo Accela y un espectrómetro de masas Thermo Q-Exactive. Los aductos $[\text{M}+\text{H}]^+$ de los compuestos y los patrones internos se monitorizaron usando ionización por electronebulización en modo positivo en modo de masa exacta. Los analitos se inyectaron en una columna C18 y se sometieron a cromatografía usando un gradiente de fase inversa con ácido fórmico al 0,1 % en agua y ácido fórmico al 0,1 % en fases móviles de 20/80 de alcohol isopropílico/acetonitrilo. Dado que hay varias especies en la mezcla polimérica, se integraron los 5 picos más prominentes (masas rastreadas: 768,8, 779,8, 792,0, 801,8, 813,0; todos con estado de carga 4+)

Resultados. Como se muestra en la **figura 2A**, BT090 es estable en fluido intestinal simulado. El compuesto se incubó durante más de 6 horas en FISEP y se ensayó para determinar el compuesto restante en los puntos temporales indicados. Como se muestra en la **figura 2B**, BT090 es estable en fluido gástrico simulado. El compuesto se incubó durante 6 horas en FGS y se ensayó para determinar el compuesto restante en los puntos temporales indicados. Como se muestra en la **figura 2C**, BT090 es estable en homogeneizado fecal de rata fresco. El compuesto se incubó durante 24 horas en heces y se ensayó para determinar el compuesto restante en los puntos temporales indicados.

B. BT051 y BT070

Estabilidad en las heces. Inmediatamente antes del estudio, se recogen heces de ratas Sprague-Dawley macho durante una noche sobre una mezcla de hielo seco y húmedo. A continuación, las heces se homogeneizan en tampón de fosfato a pH 6,5 y se filtran para eliminar las partículas. BT051 y BT070 (10 µM) se incuban por duplicado a 37 °C durante un total de 24 horas en el homogeneizado de heces de rata recién preparado. En los puntos temporales seleccionados (0,5, 2, 6 y 24 horas), se toma una alícuota de 25 µl de las mezclas de incubación y se inactivó con 225 µl de acetonitrilo que contenía los patrones internos (IS, por sus siglas en inglés). A continuación, las muestras se

centrifugan para sedimentar las proteínas precipitadas y los sobrenadantes se diluyen 5 veces. Las muestras de la hora 0 se preparan en homogeneizado de heces inactivado previamente hacia el final del período de incubación. A continuación, todas las muestras inactivadas se someten a bioanálisis para la cuantificación por LC-MS/MS.

- 5 *Procedimiento de estabilidad en FGS/FISEP.* BT051 y BT070 (10 µM) se incuban por duplicado a 37 °C durante un total de 6 horas en fluido gástrico simulado (FGS) (Ricca, Arlington, TX) y fluido intestinal simulado en estado postprandial (FISEP) (Biorelevant, Londres, Reino Unido). Las reacciones se inician añadiendo los artículos de prueba (soluciones madre de agua 1 mM) a sus respectivos tampones. En los puntos temporales seleccionados (0, 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas), se toma una alícuota de 50 µl de las mezclas de incubación y se congela a -80 °C. Al final del período de incubación, a cada tubo se le añaden 200 µl de 50:50 de acetonitrilo:agua que contienen los patrones internos (IS) y se agitan vorticialmente a fondo. Las muestras de la hora 0 se preparan en FGS o FISEP inactivados previamente. A continuación, todas las muestras inactivadas se someten a bioanálisis para la cuantificación por LC-MS/MS.

- 15 *Bioanálisis.* Las muestras de BT051 y BT070 se analizan mediante LC-MS/MS usando una UPLC Thermo Accela y un espectrómetro de masas Thermo Q-Exactive. Los aductos [M+H]⁺ de los compuestos y los patrones internos se monitorizan usando ionización por electronebulización en modo positivo en modo de masa exacta. Los analitos se inyectan en una columna C18 y se someten a cromatografía usando un gradiente de fase inversa con ácido fórmico al 0,1 % en agua y ácido fórmico al 0,1 % en fases móviles de 20/80 de alcohol isopropílico/acetonitrilo. Dado que hay varias especies en la mezcla polimérica, se integran los 5 picos más prominentes (masas rastreadas: 768,8, 779,8, 792,0, 801,8, 813,0; todos con estado de carga 4+)

Resultados. Se predice que BT051 y BT070 serán estables en fluido intestinal simulado, fluido gástrico simulado y homogeneizado fecal de rata fresco.

- 25 Estos resultados muestran que los compuestos de la presente tecnología son útiles para métodos que comprenden la exposición de los compuestos al fluido intestinal, fluido gástrico y material fecal, tales como métodos para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

Ejemplo 4: Farmacocinética de los compuestos de PEG-ciclosporina A de la presente tecnología.

- 30 Este ejemplo demuestra la farmacocinética de los compuestos de la presente tecnología.

A tres ratas Sprague-Dawley macho canuladas y en ayunas se les administraron por vía oral 10 mg/kg de BT090, BT051 o BT070 a un índice de dosis de 10 ml/kg en t = 0 h. Se extrajeron muestras de sangre en los puntos temporales indicados y se procesaron en plasma. Las concentraciones plasmáticas de BT090 se ensayaron mediante LC-MS/MS. Se recogieron heces durante t = 0 a 4 h, 4-8 h y 8-24 h, se homogeneizaron en tampón y se analizaron para determinar las concentraciones de BT090 mediante LC-MS/MS. Se registró el peso total de las heces recogidas para cada intervalo de tiempo. BT090 se formuló en NMP al 1 %, Tween-80 al 0,3 % en metilcelulosa al 0,5 %.

- 40 Las **Tablas 1-4** muestran, respectivamente, la biodisponibilidad oral de los compuestos BT090, BT051, BT070 (el producto de descomposición de BT051 administrado por vía oral) y BT070 (administrado por separado). Como se muestra en la **Tabla 1**, BT090 no está biodisponible por vía oral. BT090, cuando se administró por vía oral en ratas a razón de 10 mg/kg, no fue detectable en el plasma desde los 15 minutos hasta las 24 horas. Solo la rata "C" mostró algún nivel detectable a los 15 minutos, y este nivel estaba cerca del límite de detección del ensayo (25 ng/ml). NQ: Por debajo del límite de detección del ensayo bioanalítico. NC: No calculado debido a la falta de datos. Como se muestra en la **Tabla 2**, BT051 está biodisponible por vía oral. BT051, cuando se administró por vía oral en ratas a razón de 10 mg/kg, fue detectable en el plasma a los 15 minutos en cada una de las ratas participantes (A-E). Como se muestra en la **Tabla 3**, el producto de descomposición de BT051 (es decir, el BT070) no está biodisponible por vía oral después de la administración oral de BT051 a ratas a razón de 10 mg/kg. Como se muestra en la **Tabla 4**, BT070, cuando se dosifica por separado a razón de 10 mg/kg por vía oral en ratas, está presente en el plasma de todas las ratas participantes desde los 15 minutos hasta las 24 horas.

Tabla 1. PK de BT090 en ratas.

Tiempo (h)	ID del animal			Media (ng/ml)	D.E. (ng/ml)	% de VC
	A	B	C			
0,25	NQ	NQ	27,0	27,0	-	-
0,5	NQ	NQ	NQ	-	-	-
1	NQ	NQ	NQ	-	-	-
2	NQ	NQ	NQ	-	-	-

(continuación)

Tiempo (h)	ID del animal			Media (ng/ml)	D.E. (ng/ml)	% de VC
	A	B	C			
4	NQ	NQ	NQ	-	-	-
6	NQ	NQ	NQ	-	-	-
8	NQ	NQ	NQ	-	-	-
24	NQ	NQ	NQ	-	-	-
$C_{\max}$ (ng/ml)	NC	NC	27,0	27,0	-	-
$t_{\max}$ (h)	NC	NC	0,25	0,25	-	-
$AUC_{\text{último}}$ (ng/ml*h)	NC	NC	NC	-	-	-
AUC_{inf} (ng/ml*h)	NC	NC	NC	-	-	-
% de extrapolación	NC	NC	NC	-	-	-
CL_F (ml/min/kg)	NC	NC	NC	-	-	-
M.R.T. po (h)	NC	NC	NC	-	-	-

NQ: No cuantificable. Sin pico o por debajo del límite de cuantificación (LOQ = 25,0 ng/ml)

NC: No calculado.

5 **Tabla 2. PK de BT051 en ratas.**

Tiempo (h)	ID del animal					Media (ng/ml)	D.E. (ng/ml)	% de VC
	A	B	C	D	E			
0,25	22,5	35,2	35,7	42,5	23,1	31,8	8,7	27,4
0,5	28,3	56,2	38,1	14,4	26,6	32,7	15,6	47,6
1	16,0	51,5	28,4	13,3	18,9	25,6	15,5	60,6
2	11,1	34,1	12,8	10,7	11,3	16,0	10,2	63,5
4	9,2	17,3	10,2	24,5	NQ	15,3	7,1	46,4
6	NQ	7,7	8,7	21,6	NQ	12,7	7,7	60,9
8	NQ	7,0	7,4	8,4	62,7	21,4	27,5	128,8
24	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ		-	-
$C_{\max}$ (ng/ml)	28,3	56,2	38,1	42,5	62,7	45,6	13,8	30,4
$t_{\max}$ (h)	0,50	0,50	0,50	0,25	8,00	1,95	3,38	173,53
$AUC_{\text{último}}$ (ng/ml*h)	54,2	176,8	109,0	142,6	257,3	148,0	76,1	51,4
AUC_{inf} (ng/ml*h)	108,5*	208,2	201,7*	174,3	368,1*	212,1	95,7	45,1
Extrapolación	50,0	15,1	46,0	18,1	30,1	31,9	15,8	49,7
CL_F (ml/min/kg)	1535,8*	800,5	826,4*	956,4	452,8*	914,4	394,2	43,1
M.R.T. po (h)	5,8*	4,0	11,0*	5,4	7,3*	6,69	2,68	40,08

NQ: No cuantificable. Sin pico o por debajo del límite de cuantificación (LOQ = 5,0 ng/ml)

NC: No calculado.

Tabla 3. PK de BT070 (producto de descomposición de BT051) en ratas.

Tiempo (h)	ID del animal					Media (ng/ml)	D.E. (ng/ml)	% de VC
	A	B	C	D	E			
0,25	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-	-	-

(continuación)

Tiempo (h)	ID del animal					Media (ng/ml)	D.E. (ng/ml)	% de VC
0,5	3,3	NQ	NQ	NQ	NQ	3,3	-	-
1	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-	-	-
2	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-	-	-
4	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-	-	-
5	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-	-	-
8	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-	-	-
24	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-	-	-
C _{max} (ng/ml)	3,3	NC	NC	NC	NC	3,3	-	-
t _{max} (h)	NC	NC	NC	NC	NC	-	-	-
AUC _{último} (ng/ml*h)	NC	NC	NC	NC	NC	-	-	-
AUC _{inf} (ng/ml*h)	NC	NC	NC	NC	NC	-	-	-
Extrapolación	NC	NC	NC	NC	NC	-	-	-
M.R.T. po (h)	NC	NC	NC	NC	NC	-	-	-

NQ: No cuantificable. Sin pico o por debajo del límite de cuantificación (LOQ = 2,5 ng/ml)

NC: No calculado.

5 **Tabla 4. PK de BT070 en ratas.**

Tiempo (h)	ID del animal			Media (ng/ml)	D.E. (ng/ml)	% de VC
	A	B	C			
0,25	6273,9	1109,8	1684,1	3022,6	2830,3	93,6
0,5	7472,5	746,7	2546,3	3588,6	3482,1	97,0
1	4382,8	725,2	1796,5	2301,5	1880,4	81,7
2	2238,3	1114,4	1215,5	1522,8	621,7	40,8
4	1178,8	861,5	448,5	829,6	366,2	44,1
6	641,5	543,6	280,0	488,3	187,0	38,3
8	312,1	451,6	118,1	293,9	167,4	57,0
24	12,0	268,9	22,8	101,2	145,3	143,5
C _{max} (ng/ml)	7472,8	1114,4	2546,3	3711,2	3335,4	89,3
t _{max} (h)	0,50	2,00	0,50	1,0	0,9	86,6
AUC _{último} (ng/ml*h)	17560,9	11798,3	7249,5	12202,9	5167,6	42,3
AUC _{inf} (ng/ml*h)	17616,8	19158,4*	7432,0	14735,7	6372,0	43,2
Extrapolación	0,3	38,42	2,46	13,7	21,4	155,3
CL _F (ml/min/kg)	9,5	8,7*	22,43	13,5	7,7	57,0
M.R.T. po (h)	3,1	25,0	4,2	10,8	12,3	114,4

NQ: No cuantificable. Sin pico o por debajo del límite de cuantificación (LOQ = 10 ng/ml)

NC: No calculado.

10 **Las Tablas 5-8**, muestran, respectivamente, la cantidad de BT090, BT051, BT070 (el producto de descomposición de BT051) y BT070 (dosificado por separado) presente en las heces de ratas Sprague Dawley dosificadas por vía oral. La cantidad supone que 1 gramo de heces equivale a 1 ml.

Tabla 5. Cantidad excretada de BT090 sin cambios en las heces después de la administración oral de una

dosis de 10 mg/kg.

Tiempo	Animal A 255 g			Animal B 239 g			Animal C 233 g		
	Conc. * (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad (µg)	Conc.* (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad (µg)	Conc.* (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad (µg)
0-4 h	0,34	0,32	0,68	1,44	0,11	0,16	1,48	0,50	0,7
4-8 h	1103,2	1,10	1214,5	1132,6	0,56	632,8	1,88	1,53	2,9
8-24 h	406,6	4,07	1653,5	1035,3	1,34	1458,4	443,0	5,24	2323,1
Total (µg)			2868,7			2091,4			2326,7
% de dosis			112,5			87,5			82,2

*Concentración corregida por el factor de dilución (10 veces para 0-4 h; 50 veces para 4-24 h)

Tabla 6. Cantidad excretada de BT051 sin cambios en las heces después de la administración oral de una dosis de 10 mg/kg.

Intervalo de tiempo	Animal A 237 g			Animal B 257 g			Animal C 243 g		
	Conc.* (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad* (µg)	Conc.* (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad* (µg)	Conc.* (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad* (µg)
0-4 h	NQ	0,95	NC	NC	NS	NC	NQ	0,60	NC
4-8 h	27,1	0,97	26,3	NQ	0,30	NC	102,5	0,73	74,8
8-24 h	578,4	1,12	650,1	663,2	1,77	1175,6	321,6	3,38	1087,7
24-48 h	199,3	469	934,4	223,1	3,83	853,7	5,8	6,40	37,0
Total (µg)			1610,7			2029,4			1199,6
% de dosis			68,0			79,0			49,4

*Concentración corregida por el factor de dilución.

NS: Sin muestra

NC: No calculado

NQ: No cuantificable. Sin pico o por debajo del límite de cuantificación (LOQ = 0,5 µg/ml)

Tabla 7. Cantidad de BT070 (producto de descomposición de BT051) excretada en heces sin cambios después de la administración oral de una dosis de 10 mg/kg de BT051.

Intervalo de tiempo	Animal A 237 g			Animal B 257 g			Animal C 243 g			Animal D 240 g		
	Conc.* (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad* (µg)	Conc.* (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad* (µg)	Conc.* (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad* (µg)	Conc.* (µg/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad* (µg)
0-4 h	NQ	0,95	NC	NC	NS	NC	NQ	0,60	NC	NQ	1,09	NC
4-8 h	NQ	0,97	NC	NQ	0,30	NC	NQ	0,73	NC	NS	NS	NC
8-24 h	12,7	1,12	14,3	6,0	1,77	10,6	10,3	3,38	34,8	8,7	3,58	31,2
24-48 h	4,08	4,69	19,1	8,1	3,83	30,8	0,6	6,40	3,7	0,8	7,27	5,7
Total (µg)			33,4			41,4			38,5			36,9
% de dosis parental			3,6			4,1			4,1			4,0

*Concentración corregida por el factor de dilución.

NS: Sin muestra

NC: No calculado

NQ: No cuantificable. Sin pico o por debajo del límite de cuantificación (LOQ = 0,5 µg/ml)

Tabla 8. Cantidad excretada de BT070 sin cambios en las heces después de la administración oral de una dosis de 10 mg/kg.

Intervalo de tiempo	Animal A 272 g		Animal B 280 g			Animal C 262 g		
	Conc.* (ng/ml)	Cantidad* (ng)	Conc.* (ng/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad* (ng)	Conc.* (ng/ml)	Muestra de heces (g)	Cantidad* (ng)
0-4 h	NQ	-	1417,4	0,40	561,4	NQ	1,63	-
4-8 h	155322,5	181805,0	NQ	0,24	-	366163,0	2,39	875239,4
8-24 h	333649,7	1030677,2	314317,5	0,30	252114,1	153005,0	6,64	1016595,6
Total (µg)		1212482,2			252675,5			1891835,1
% de dosis		44,6			9,0			72,2

*Concentración corregida por el factor de dilución 1:9.

NQ: No cuantificable. Sin pico o por debajo del límite de cuantificación (LOQ = 1000 ng/ml)

Ejemplo 5: Inhibición de FPR1 por compuestos de la presente tecnología.

Este ejemplo demuestra el uso de compuestos de la presente tecnología para la inhibición de FPR1, según lo medido por la inhibición de la migración de neutrófilos inducida por fMLP.

A. BT051

Se cultivaron células de cáncer colorrectal T84 hasta la confluencia en el lado inferior de insertos de membrana de policarbonato de 12 pocillos de una placa Transwell® de 24 pocillos. El crecimiento confluyente de estas células epiteliales da como resultado superficies apicales (luminales) y basolaterales fisiológicamente relevantes en los transpocillos. Los neutrófilos humanos recién aislados y preparados se trataron previamente en el compuesto (BT051 o ciclosporina A) durante 1 hora en hielo.

Se añadió BT051 o ciclosporina A a la superficie apical de la monocapa. El potente quimioatrayente de neutrófilos, N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (100 nM), que activa la migración de neutrófilos a través de su interacción con la proteína FPR1 en los neutrófilos, también se añadió al lado apical de la monocapa. A continuación, los neutrófilos tratados con compuesto se añadieron al lado basolateral y se les permitió transmigrar a través de la monocapa durante 2 horas. A continuación, el número de neutrófilos migrados a la cámara apical (debido al gradiente de fMLP) se ensayó mediante la determinación de la actividad de mieloperoxidasa (un biomarcador de neutrófilos). La inhibición de la trans migración se indica mediante una menor actividad de MPO en la cámara apical.

Resultados. Como se muestra en la **figura 3A**, BT051 inhibe la trans migración/activación de células polimorfonucleares (PMN) mediada por fMLP. Las PMN humanas se trataron previamente con BT051 y se añadieron al lado "basolateral" de una monocapa epitelial en un sistema transpocillo. La fMLP estaba presente en el lado "apical" del transpocillo como un activador de neutrófilos/quimioatrayente. BT051 bloqueó la trans migración al lado apical y la activación de las PMN de manera significativa a concentraciones de 10 µM y 1 µM, de manera similar al inhibidor conocido de FPR1, ciclosporina A (CsA).

Estos resultados muestran que las composiciones de la presente tecnología inhiben la FPR1. Por consiguiente, los compuestos son útiles en métodos que comprenden la inhibición de la FPR1, tal como en el tratamiento de enfermedades mediadas por la FPR1, tal como enfermedad celíaca.

B. BT070 y BT090

Se cultivan células de cáncer colorrectal T84 hasta la confluencia en el lado inferior de insertos de membrana de policarbonato de 12 pocillos de una placa Transwell® de 24 pocillos. El crecimiento confluyente de estas células epiteliales da como resultado superficies apicales (luminales) y basolaterales fisiológicamente relevantes en los transpocillos. Los neutrófilos humanos recién aislados y preparados se tratan previamente en BT070, BT090 o ciclosporina A durante 1 hora en hielo.

BT070, Se añade BT090 o ciclosporina A a la superficie apical de la monocapa. El potente quimioatrayente de neutrófilos, N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), que activa la migración de neutrófilos, también se añade al lado apical de la monocapa. A continuación, los neutrófilos tratados con compuesto se añaden al lado basolateral y se les permite transmigrar a través de la monocapa durante 2 horas. A continuación, el número de neutrófilos migrados a la cámara apical (debido al gradiente de fMLP) se ensaya mediante la determinación de la actividad de mieloperoxidasa (un biomarcador de neutrófilos). La inhibición de la trans migración se indica mediante una menor actividad de MPO en la cámara apical.

Resultados. Como se muestra en la **figura 3B**, BT070 y BT051 inhiben la trans migración/activación de células

polimorfonucleares (PMN) mediada por fMLP. Se predice que BT090 también inhibirá la trans migración/activación de PMN mediada por fMLP. BT070 inhibió la trans migración/activación de PMN en aproximadamente un 50 %. En este experimento, BT051 inhibió la trans migración/activación de PMN en un 50 % a una concentración de 10 μ M.

- 5 Estos resultados muestran (o mostrarán) que las composiciones de la presente tecnología inhiben FPR1. Por consiguiente, los compuestos son útiles en métodos que comprenden la inhibición de la FPR1, tal como en el tratamiento de enfermedades mediadas por la FPR1, tal como enfermedad celíaca.

Ejemplo 6: Compuestos de la presente tecnología para la prevención y el tratamiento de la colitis

- 10 Este ejemplo demuestra el uso de compuestos de la presente tecnología para la prevención y el tratamiento de la colitis en modelos animales y sujetos humanos.

Modelos animales

- 15 Los modelos animales adecuados para su uso en este ejemplo incluyen, pero sin limitación, animales que tienen colitis, tales como los descritos en el presente documento. Un experto en la técnica entenderá que la siguiente descripción es ilustrativa y puede aplicarse según corresponda a otros modelos animales.

- 20 *General.* Se adquirirán ratones C57BL/6 y *cnr2*^{-/-} en Jackson Laboratories; se adquirirán ratones FVB wt y *mdr1a*^{-/-} en Taconic. Se usan ratones hembra a la edad de 6-12 semanas, y se mezclan los genotipos 2-4 semanas antes de los experimentos para igualar la microbiota. Los ratones se tratan con DSS al 3 % (peso molecular 36.000-50.000, MP Biomedicals) en el agua de bebida durante 7 días, a continuación se vuelve a poner agua normal y se sacrifican el día 9, que representa el pico de la enfermedad. Las muestras del colon medio y distal se fijan en formalina al 10 %, se incluyen en parafina, se seccionan y se tiñen para el análisis histopatológico con hematoxilina y eosina. Cada muestra se clasifica de forma semicuantitativa de 0 a 3 según cuatro criterios: (1) grado de hiperplasia epitelial y depleción de células caliciformes; (2) infiltración de leucocitos en la lámina propia; (3) área de tejido afectada; y (4) presencia de marcadores de inflamación grave, tales como abscesos de criptas, inflamación submucosa y úlceras. Las muestras son puntuadas por un investigador capacitado que desconoce la identidad de la muestra, y los valores medios y distales se promedian para dar una puntuación de histopatología del colon.

- A los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, tal como por administración intrarrectal. En algunas realizaciones, el compuesto se administra una vez al día, una vez a la semana o una vez al mes. En algunas realizaciones, los compuestos se administran varias veces al día, varias veces a la semana o varias veces al mes. A los sujetos de control se les administra solo el vehículo.

- 40 *Aislamiento de leucocitos de la lámina propia y citometría de flujo.* Las suspensiones celulares de la lámina propia se preparan como se ha descrito anteriormente (Buonocore *et al.*, 2010). El tejido intestinal se corta en trozos pequeños, se trata con RPMI con FBS al 10 % y EDTA 5 mM para eliminar las células epiteliales y a continuación se incuba con 100 U/ml de collagenasa tipo VIII (Sigma-Aldrich) durante dos periodos de 1 hora. A continuación, las células se aplican a un gradiente discontinuo del 30/40/75 % de Percoll (GE Healthsciences) y se recogen de la interfaz del 40/70 %. Las células se lavan en PBS/BSA al 0,1 %, se incuban con un receptor anti Fc (α CD16/32, eBioscience) y se tiñen con el tinte infrarrojo Zombie Live/Dead (eBioscience); a continuación, la superficie se tiñe con anticuerpos contra CD45, CD11b, Ly6G y Ly6C o Gr1. Las muestras se procesan en un analizador MACSquant 10 (Miltenyi Bioscience) y se analizan usando el software Flowjo versión 10 (Treestar).

- 50 *Análisis del contenido de mieloperoxidasa en muestras de ratón.* Las muestras se ensayan para determinar la actividad de mieloperoxidasa como se describe. Las secciones tisulares del colon se congelan en N₂ líquido y se almacenan a -80 °C hasta su uso. Las secciones se colocan en un tampón de bromuro de hexadecil trimetil amonio (HTAB, Sigma) con matriz de lisis D (MP Biomedicals) y se homogeneizan con un homogeneizador FastPrep-24 a nivel 6 durante 40 s. Las muestras se combinan con ABTS y se lee la fluorescencia durante 8 min. Las pendientes se calculan mediante regresión lineal usando Graphpad Prism y se normalizan con respecto al contenido de proteínas de las muestras individuales, según lo medido mediante el ensayo de ácido bicínico (BioRad). Para el análisis de muestras fecales, se pesa el contenido fecal y se añade tampón HTAB en una relación de 10 μ l/mg, y las pendientes calculadas se usan directamente.

- 60 *Análisis espectrométrico de masas de HXA₃ en la mucosa colónica.* A los ratones se les administra DSS al 5 % en el agua de bebida y se sacrifican el día 7. Se extirpa el colon proximal de ratones no tratados o tratados con DSS (9 ratones/cohorte) y se agrupan tres segmentos intestinales. Los raspados mucosos se recogen raspando las superficies intestinales con una espátula de goma en PBS, y el contenido de HXA₃ se analiza como se ha descrito previamente (Mumy, K. L. *et al.*, Infect. Immun. 76:3614-3627 (2008)).

- 65 *Resultados.* Se espera que la administración intrarrectal de compuestos de la presente tecnología reduzca significativamente la patología intestinal y el acortamiento del colon inducido por DSS en comparación con los animales de control. El análisis de la histopatología del colon mostrará que los ratones tratados con los compuestos han reducido la infiltración de neutrófilos en el lumen colónico, lo que se confirmará mediante una reducción significativa de la

mieloperoxidasa en muestras fecales.

Por consiguiente, se espera que estos resultados muestren que los compuestos de la presente tecnología son útiles en métodos de reducción de la infiltración de neutrófilos *in vivo*, tal como en la prevención y el tratamiento de una afección inflamatoria asociada con la migración de neutrófilos, tal como colitis.

Sujetos humanos

Se incluyen sujetos humanos diagnosticados o con sospecha de tener colitis o un trastorno relacionado y que actualmente presentan uno o más síntomas y/o patologías de colitis o un trastorno relacionado, usando criterios de selección conocidos y aceptados en la técnica.

Métodos de prevención y tratamiento: A los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología en una dosis y frecuencia acorde con el estadio y la gravedad de la enfermedad. En algunas realizaciones, un compuesto se administra una vez al día, una vez a la semana o una vez al mes. En algunas realizaciones, un compuesto se administra varias veces al día, a la semana o al mes.

Para demostrar métodos de prevención y tratamiento en seres humanos, a los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología antes o después del desarrollo de síntomas y/o patologías de colitis o trastornos relacionados y se evalúa la reversión de síntomas/patologías o la atenuación de síntomas/patologías esperados usando métodos conocidos en la técnica.

Resultados: Se espera que los compuestos de la presente tecnología induzcan la reversión de síntomas y/o patologías de colitis y trastornos relacionados en sujetos humanos. Estos resultados mostrarán que los compuestos de la presente tecnología son útiles y eficaces para la prevención y el tratamiento de dichos trastornos.

Ejemplo 7: Compuestos de la presente tecnología para la prevención y el tratamiento de trastornos cutáneos mediados por neutrófilos

Este ejemplo demuestra el uso de compuestos de la presente tecnología para la prevención y el tratamiento de trastornos cutáneos mediados por neutrófilos, tales como dermatitis (eccema), rosácea, dermatitis seborreica y psoriasis en modelos animales y sujetos humanos. Un experto en la técnica entenderá que el ejemplo expuesto a continuación relacionado con la psoriasis es ilustrativo de trastornos cutáneos mediados por neutrófilos, con métodos generalmente aplicables a cualquier trastorno cutáneo mediado por neutrófilos.

Modelos animales

Los modelos animales adecuados para este ejemplo incluyen cualquier modelo de psoriasis aceptado, incluyendo, pero sin limitación, modelos que tienen mutaciones espontáneas, animales modificados genéticamente, modelos inmunitarios y modelos farmacológicos. Los modelos de mutación espontánea incluyen, pero sin limitación, ratones homocigotos para las mutaciones de asebia (*Scd1^{ab}/Scd1^{ab}*), dermatitis proliferativa crónica (*Sharpin^{cpdm}/Sharpin^{cpdm}*), piel escamosa (*Ttc7^{tsn}/Ttc7^{tsn}*). Los modelos modificados genéticamente incluyen animales que expresan ectópicamente moléculas reguladoras clave o que carecen de moléculas reguladoras clave, como se conoce en la técnica. Los modelos inmunitarios incluyen sujetos animales sometidos a transferencia adoptiva o métodos relacionados, como se conoce en la técnica. Los modelos farmacológicos incluyen sujetos a los que se les administran agentes que inducen psoriasis o afecciones relacionadas con la psoriasis. Por ejemplo, sujetos a los que se les administra por vía tópica imiquimod (IMQ), un agonista del receptor tipo Toll (TLR)-7 y TLR-8.

Un experto en la técnica entenderá que la siguiente descripción es ilustrativa y puede aplicarse según corresponda a otros modelos animales.

Materiales. Se adquiere Imiquimod (IMQ, crema al 5 %, Beselna®) en Mochida Pharmaceutical (Tokio, Japón). Se adquiere butirato de propionato de betametasona (ungüento al 0,05 %, Antebate®) en Torii Pharmaceutical (Tokio, Japón). Las sondas de PCR en tiempo real y los agentes relacionados se adquieren en Applied Biosystems (Massachusetts, EE. UU.).

Animales. Ratones BALB/c hembra y ratones CB-17 scid macho de 7-12 semanas de edad se alojan en condiciones específicas libres de patógenos a una temperatura ambiente de 23 ± 3 °C y una humedad del aire del 55 ± 15 % en un entorno con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, y se les proporciona comida y agua a voluntad.

Inducción de inflamación de la piel. Se aplica la crema al 5 % de IMQ en los lados interno y/o externo de la piel de la oreja izquierda una vez al día. La dosis de IMQ es de 250 ug en el lado externo, 500 ug en el lado externo o 250 ug en ambos lados interno y externo de la oreja. Se aplica ungüento de betametasona o una base de ungüento relevante dos veces al día en la oreja izquierda, en un volumen de 5 ul en ambos lados interno y/o externo. El grosor de la oreja izquierda se mide como un índice cuantitativo de inflamación de la piel utilizando un medidor de grosor (IDA-112M, Mitutoyo, Kawasaki, Japón) una vez al día antes de la aplicación de IMQ. A los sujetos de control se les administra

solo el vehículo.

Para los métodos de prevención, los sujetos se tratan previamente con compuestos de la presente tecnología mediante aplicación tópica durante un período predeterminado antes de la exposición a IMQ.

Para los métodos de tratamiento, a los sujetos se les administran por vía tópica compuestos de la presente tecnología durante un período predeterminado después de la confirmación de la inflamación inducida por IMQ usando métodos conocidos en la técnica.

Los sujetos son sacrificados con gas de dióxido de carbono y se les extirpa la oreja izquierda después de examinar la morfología macroscópica para determinar la presencia de eritema y descamación. Se corta una porción del tejido extirpado, se fija con una solución de formalina tamponada al 10 % y se procesa para la preparación de secciones histológicas en parafina. Las secciones se tiñen con hematoxilina y eosina y se someten a un examen con microscopio óptico. El tejido restante se almacena a -80 °C para el análisis del ARNm mediante PCR en tiempo real.

Ensayos de PCR en tiempo real. Las muestras de ARN total en los tejidos de la oreja se obtienen con el minikit de tejido lipídico RNeasy® (QIAGEN, Venlo, Países Bajos), siguiendo las instrucciones del fabricante. El nivel de transcripciones que codifican citocinas de interés en el presente estudio se mide mediante los ensayos de expresión génica TaqMan usando el kit de 1 etapa RNA-to-Ct™.

Las dianas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, IFN- γ , IL-13, IL-17, IL-22, IL-23, TNF- α e IL-1 β . Los niveles de transcripción objetivo se normalizan a los niveles de transcripción de GAPDH.

Análisis estadístico. Los valores del grosor de la oreja se muestran como aumentos a partir de los valores previos al tratamiento medidos en el día 1 y se expresan como media $\pm$ desviación estándar (D.E.). La significación estadística se analiza mediante la prueba F seguida de la prueba de la t de Aspin-Welch y la prueba de Bartlett seguida de la prueba de Dunnett o la prueba de Steel en el caso del grosor de las orejas, y mediante la prueba de Bartlett seguida de la prueba de Tukey o la prueba de Steel-Dwass en el caso de los niveles de transcripción de ARNm. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados. Se predice que la administración de compuestos de la presente tecnología evitará o reducirá la inflamación inducida por IMQ, según lo medido por el grosor del tejido, la expresión de genes inflamatorios y la infiltración dérmica de neutrófilos. Estos resultados demostrarán que los compuestos de la presente tecnología son útiles en la prevención y el tratamiento de afecciones asociadas con la inflamación y la infiltración dérmica de neutrófilos, incluyendo, pero sin limitación, dermatitis (eccema), rosácea, dermatitis seborreica y psoriasis.

Sujetos humanos

Se incluyen sujetos humanos diagnosticados o con sospecha de tener un trastorno cutáneo mediado por neutrófilos, tal como dermatitis (eccema), rosácea, dermatitis seborreica o psoriasis, y que actualmente presentan uno o más síntomas y/o patologías del trastorno, usando criterios de selección conocidos y aceptados en la técnica.

Métodos de prevención y tratamiento. A los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología en una dosis y frecuencia acorde con el estadio y la gravedad de la enfermedad. En algunas realizaciones, un compuesto se administra una vez al día, una vez a la semana o una vez al mes. En algunas realizaciones, un compuesto se administra varias veces al día, a la semana o al mes.

Para demostrar métodos de prevención y tratamiento en seres humanos, a los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología antes o después del desarrollo de síntomas y/o patologías de trastorno cutáneo mediado por neutrófilos y se evalúa la reversión de síntomas/patologías o la atenuación de síntomas/patologías esperados usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, a los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología antes o después del desarrollo de un trastorno cutáneo mediado por neutrófilos o de los síntomas del mismo. A continuación, se evalúa a los sujetos para determinar la prevención, reversión o atenuación del trastorno o síntoma usando métodos conocidos en la técnica.

Resultados. Se espera que los compuestos de la presente tecnología induzcan la reversión de los síntomas y/o patologías de los trastornos cutáneos mediados por neutrófilos, tales como dermatitis (eccema), rosácea, dermatitis seborreica y psoriasis. Estos resultados mostrarán que los compuestos de la presente tecnología son útiles y eficaces para la prevención y el tratamiento de los trastornos cutáneos mediados por neutrófilos en sujetos humanos.

Ejemplo 8: Compuestos de la presente tecnología para la prevención y el tratamiento de la enfermedad celíaca

Este ejemplo demuestra el uso de compuestos de la presente tecnología para la prevención y el tratamiento de la enfermedad celíaca. Un experto en la técnica entenderá que el ejemplo que se expone a continuación es ilustrativo de los trastornos de intolerancia al gluten en general, con métodos generalmente aplicables a la enfermedad celíaca y trastornos relacionados.

Modelos animales

Los modelos animales adecuados para este ejemplo incluyen cualquier modelo celiaco aceptado, incluyendo, pero sin limitación, modelos espontáneos tales como modelos de perros y monos conocidos en la técnica, modelos inducidos, tales como ratas Wistar AVN sin gérmenes a las que se les administró gliadina inmediatamente después del nacimiento, y modelos transgénicos, tales como animales que sobreexpresan IL-15. Un experto en la técnica entenderá que la siguiente descripción es ilustrativa y puede aplicarse según corresponda a otros modelos animales.

General. Los modelos animales se seleccionan y mantienen de acuerdo con los estándares relevantes conocidos en la técnica. A los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, tal como por administración oral. En algunas realizaciones, el compuesto se administra una vez al día, una vez a la semana o una vez al mes. En algunas realizaciones, los compuestos se administran varias veces al día, varias veces a la semana o varias veces al mes. A los sujetos de control se les administra solo el vehículo.

Para los métodos de prevención, a los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología antes o después del desarrollo de síntomas y/o patologías de enfermedad celiaca o trastornos relacionados y se evalúa la reversión de síntomas/patologías o la atenuación de síntomas/patologías esperados usando métodos conocidos en la técnica.

Resultados: Se espera que los compuestos de la presente tecnología induzcan la reversión de síntomas y/o patologías de enfermedad celiaca y trastornos relacionados en modelos animales. Estos resultados mostrarán que los compuestos de la presente tecnología son útiles y eficaces para la prevención y el tratamiento de la enfermedad celiaca y trastornos relacionados.

Sujetos humanos

Se incluyen sujetos humanos diagnosticados o con sospecha de tener enfermedad celiaca o un trastorno relacionado y que actualmente presentan uno o más síntomas y/o patologías de enfermedad celiaca o un trastorno relacionado, usando criterios de selección conocidos y aceptados en la técnica.

Métodos de prevención y tratamiento: A los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología en una dosis y frecuencia acorde con el estadio y la gravedad de la enfermedad. En algunas realizaciones, un compuesto se administra una vez al día, una vez a la semana o una vez al mes. En algunas realizaciones, un compuesto se administra varias veces al día, a la semana o al mes.

Para los métodos de prevención, a los sujetos se les administran compuestos de la presente tecnología antes o después del desarrollo de síntomas y/o patologías de enfermedad celiaca o trastornos relacionados y se evalúa la reversión de síntomas/patologías o la atenuación de síntomas/patologías esperados usando métodos conocidos en la técnica.

Resultados: Se espera que los compuestos de la presente tecnología induzcan la reversión de síntomas y/o patologías de enfermedad celiaca y trastornos relacionados en sujetos humanos. Estos resultados mostrarán que los compuestos de la presente tecnología son útiles y eficaces para la prevención y el tratamiento de la enfermedad celiaca y trastornos relacionados.

EQUIVALENTES

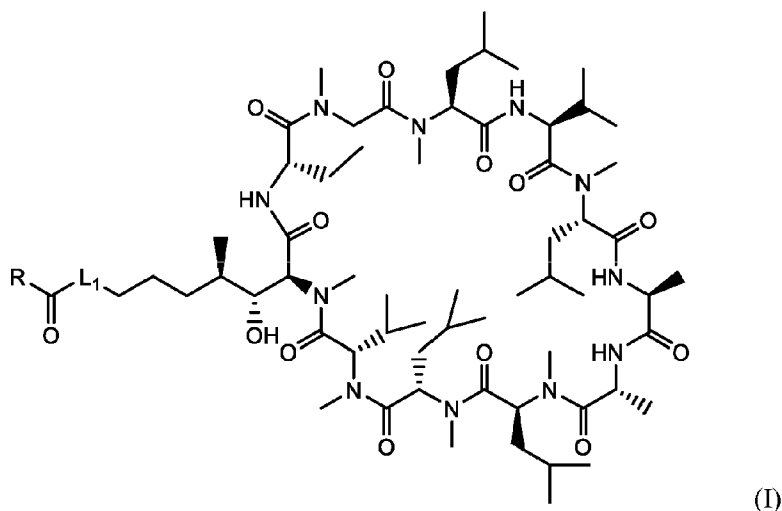
La presente tecnología no está limitada en términos de las realizaciones particulares descritas en la presente solicitud, que pretenden ser meras ilustraciones de aspectos individuales de la presente tecnología. Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones de la presente tecnología, como resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los métodos y aparatos funcionalmente equivalentes comprendidos en alcance de la presente tecnología, además de los citados en el presente documento, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de las descripciones anteriores. Dichas modificaciones y variaciones pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La presente tecnología está limitada solo por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes a los que tienen derecho dichas reivindicaciones. Debe entenderse que la presente tecnología no se limita a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante.

Resultarán evidentes para los expertos en la técnica diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la presente tecnología. Aunque la presente tecnología se ha descrito en relación con realizaciones específicas, la presente tecnología tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para realizar la presente tecnología que son obvias para los expertos en la técnica y en los campos relacionados con la misma estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I,



un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores; en donde L_1 es un grupo alquilo C_0 a C_4 opcionalmente sustituido por uno o más F; R es un PEG que tiene de 40 a 50 unidades de óxido de etileno, en donde el PEG comprende un grupo enlazador, L_2 , en donde L_2 es un heteroalquileo C_{1-6} sin sustituir que tiene uno o dos átomos de nitrógeno.

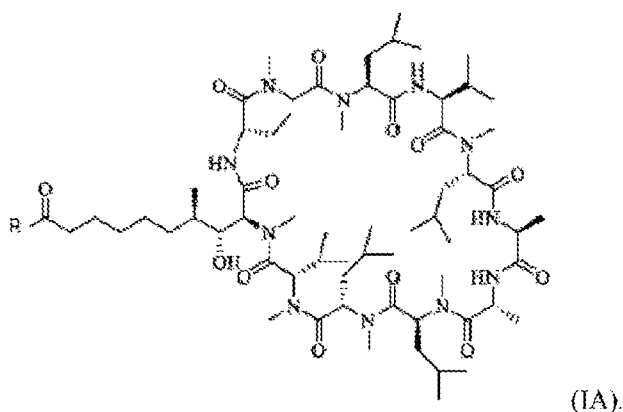
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R es $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{2-6}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{42-46}-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-5}\text{CH}_3$.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R se selecciona del grupo que consiste en $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{44}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ y $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{44}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde L_2 es $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde L_1 es un grupo etileno o un grupo propileno.

6. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la estructura de Fórmula IA, un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores:



7. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un portador farmacéuticamente aceptable.

8. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 7, para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con inflamación mediada por neutrófilos en un tejido diana de un sujeto mamífero que lo necesita, en donde:

- la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad intestinal, colitis, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedad inflamatoria cutánea, enfermedad ocular, enfermedad urogenital y enfermedades de transmisión sexual; o

- la enfermedad es una enfermedad intestinal seleccionada del grupo que consiste en proctitis, orquitis, enfermedad de Crohn y enfermedad celíaca; o
- la enfermedad es colitis seleccionada del grupo que consiste en colitis ulcerosa, también conocida como colitis ulcerosa, enterocolitis infecciosa/no infecciosa y enfermedad inflamatoria intestinal (EII); o
- 5 - la enfermedad es una enfermedad pulmonar inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en infección neumocócica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar; o
- la enfermedad es una enfermedad inflamatoria cutánea seleccionada del grupo que consiste en dermatitis (eccema), rosácea, dermatitis seborreica y psoriasis; o
- 10 - la enfermedad es una enfermedad ocular seleccionada del grupo que consiste en uveítis, retinitis, queratitis y degeneración macular; o
- la enfermedad es una enfermedad urogenital que comprende una infección de las vías urinarias; o
- la enfermedad es una enfermedad de transmisión sexual seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria pélvica, infección por gonorrea, infección por clamidia, herpes y uretritis; o
- 15 - la inflamación es una inflamación no infecciosa; o
- la inflamación es una inflamación infecciosa.

9. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 8, en donde el método comprende una etapa de administración seleccionada del grupo que consiste en administración tópica y administración en una superficie luminal del tejido diana.

10. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 8 o 9, en donde:

- el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más segundos compuestos que inhiben uno o más de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la HXA₃ sintasa, en donde la cantidad terapéutica del segundo compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana; o
- 25 - el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más terceros compuestos que aumentan la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1), en donde la cantidad terapéutica del tercer compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

11. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde:

- dicho método comprende además administrar uno o más segundos compuestos que inhiben una o más de las proteínas de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la hepxilina A3 (HXA₃) sintasa, en donde la cantidad terapéutica del segundo compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana; o
- 35 - el método comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más terceros compuestos que aumentan una o más *N*-acilretanolaminas (NAE), en donde la cantidad terapéutica del tercer compuesto reduce la migración de neutrófilos al tejido diana.

12. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 8, en donde:

- la inflamación está asociada con la enfermedad de Crohn y el tratamiento o prevención comprende además la administración de uno o más productos de mesalamina, formulaciones de corticosteroides, budesonida de liberación ileal, glucocorticosteroides/inmunomoduladores EEN, incluyendo azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato, fármacos anti factor de necrosis tumoral (TNF), incluyendo infliximab, adalimumab y certolizumab, pegol, anticuerpo anti integrina alfa-4 beta-7 vedolizumab, ABT-494 y filgotinib; o
- 45 - la inflamación está asociada con la colitis ulcerosa y el tratamiento o la prevención comprende además la administración de uno o más de 5-aminosalicilatos, mesalamina, corticosteroides, budesonida multimatriz, azatioprina, 6-mercaptopurina, fármacos anti TNF, incluyendo infliximab, adalimumab y golimumab, vedolizumab, tofacitinib, ABT-494 y filgotinib.

13. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde:

- el método comprende además administrar uno o más agentes antibióticos y/o antiinflamatorios seleccionados del grupo que consiste en: dalbavancina, oritavancina, cubicina, tedizolid, veftobiprol, veftobiprol, ceftolozano-tazobactam, mupirocina, sulfato de neomicina bacitracina, polimixina B, 1-ofloxacina, fosfato de clindamicina, sulfato de gentamicina, metronidazol, hexilresorcinol, cloruro de metilbenzetonio, fenol, compuestos de amonio cuaternario, aceite de árbol del té, agentes esteroides, tales como corticosteroides, tales como hidrocortisona, hidroxiltriamicinolona, alfametil dexametasona, fosfato de dexametasona, dipropionato de beclometasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de difluocortolona, fludrenolona, acetónido de fluciclorolona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónido de fluosinolona, fluocinonida, éster butílico de flucortina, fluocortolona, acetato de fluprednidenol (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamicinolona, cortisona, cortodoxona, flucetonida, fludrocortisona, diacetato de difluorisona, acetónido de fluradrenolona, medrisona, amciafel, amcinafida, betametasona, clorprednisona,

- acetato de clorprednisona, clorcortelona, clescinolona, diclorisona, difluprednato, fluccloronida, flunisolido, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, dipropionato de betametasona, triamcinolona, agentes no esteroides, tales como inhibidores de COX, inhibidores de LOX, inhibidores de p38 cinasa, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina e inhibidores de la síntesis de citocinas, tetraciclina, minociclina y doxiciclina, o cualquier combinación de los mismos; y/o
- 5 - el método comprende además administrar uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en: anticuerpos dirigidos a toxinas de *Clostridium difficile*, anticuerpos dirigidos al factor de necrosis tumoral (TNF), anticuerpos dirigidos a interleucinas y anticuerpos dirigidos a metaloproteinasa-9; y/o
- 10 - el compuesto de Fórmula I reduce la migración de neutrófilos al tejido diana en comparación con el tejido de control no tratado.

FIGURA 1

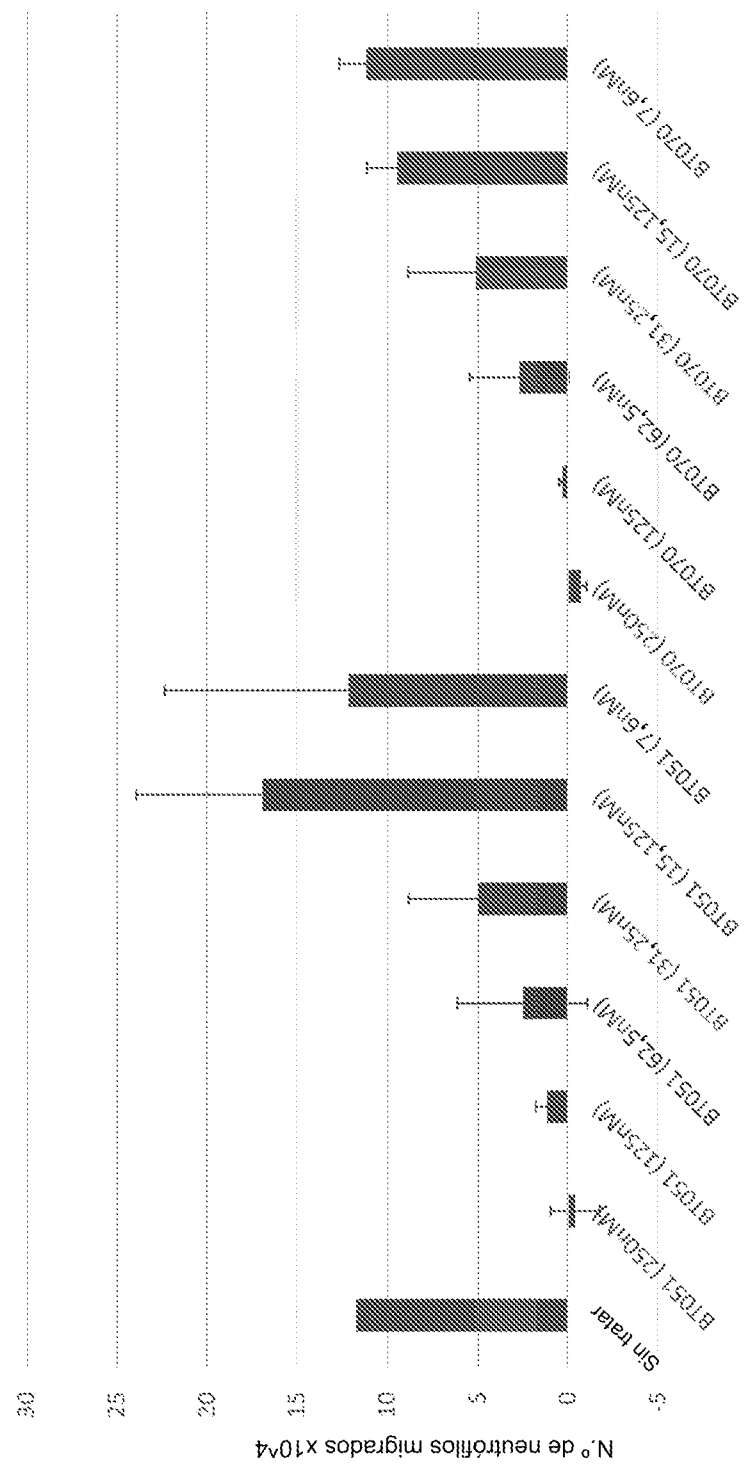


FIGURA 2A

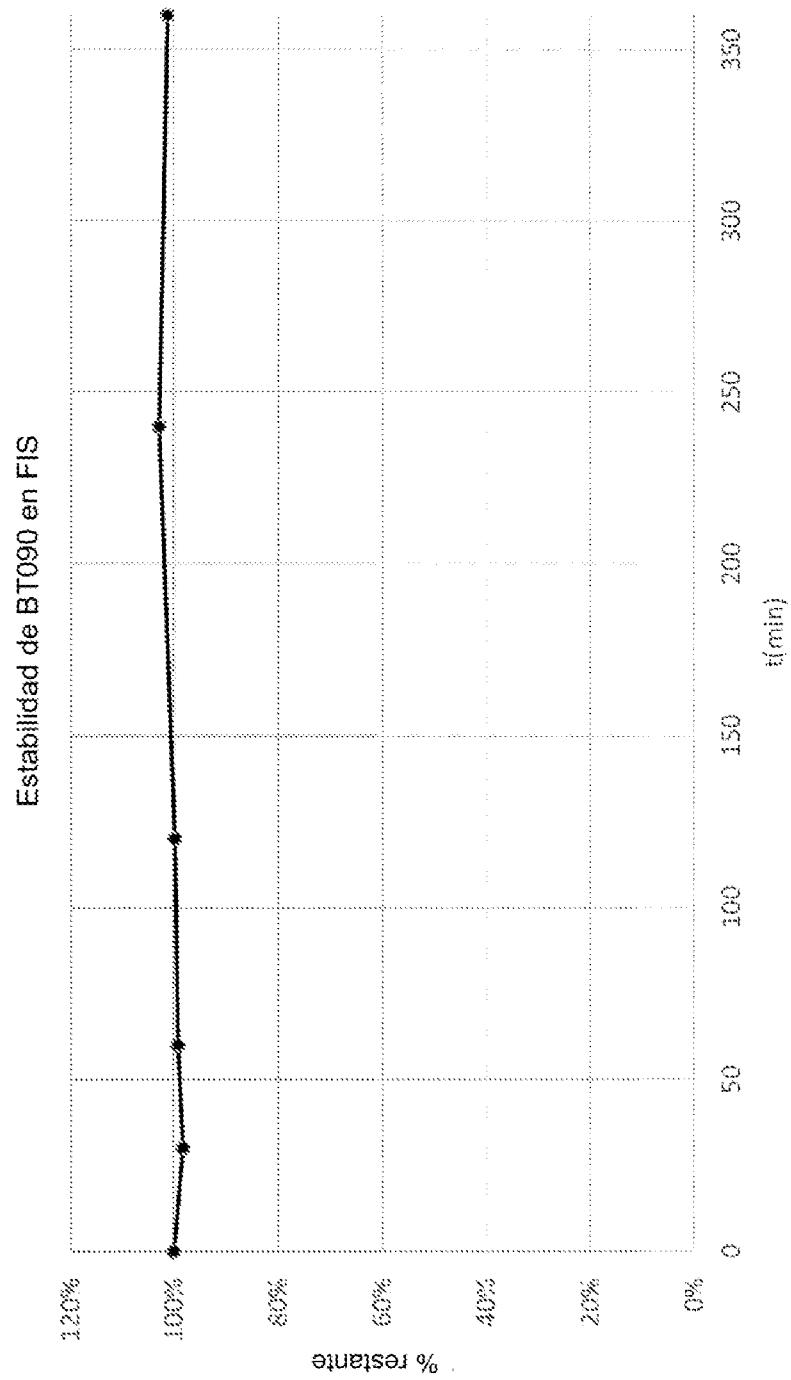


FIGURA 2B

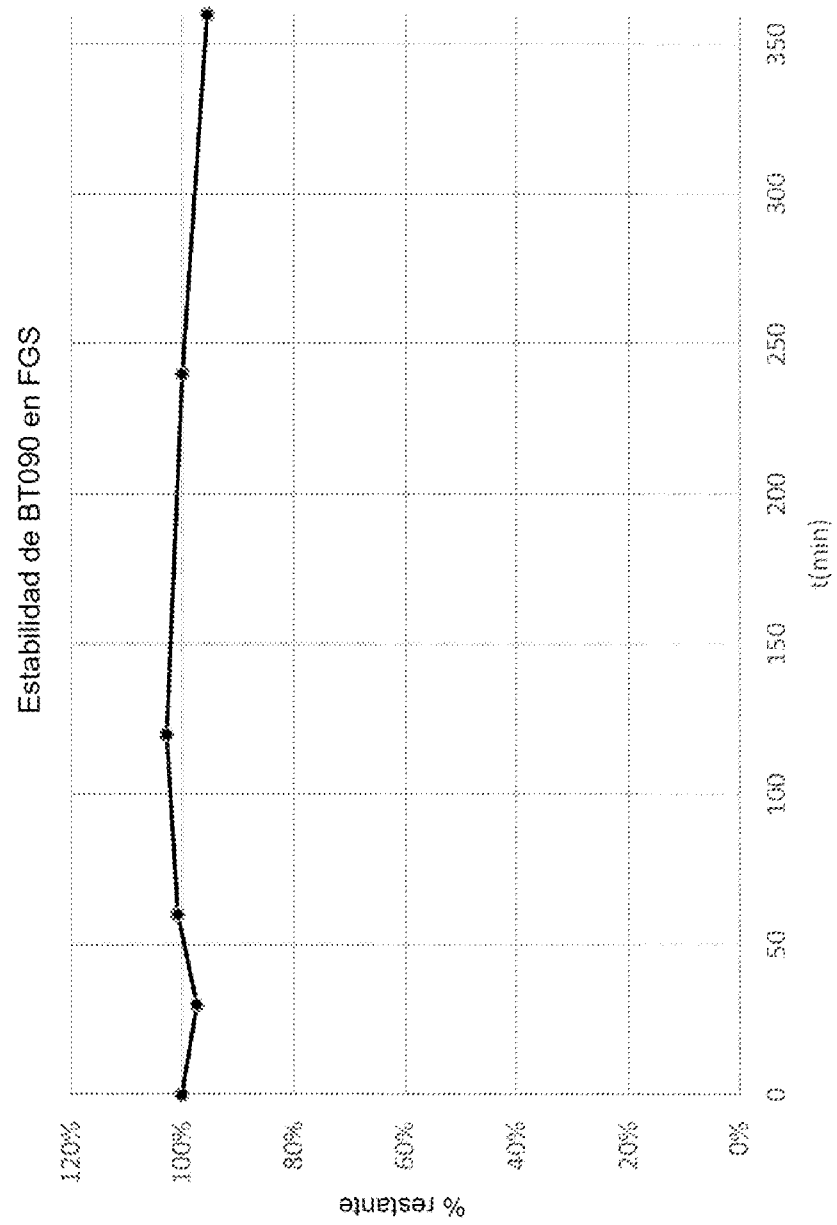


FIGURA 2C

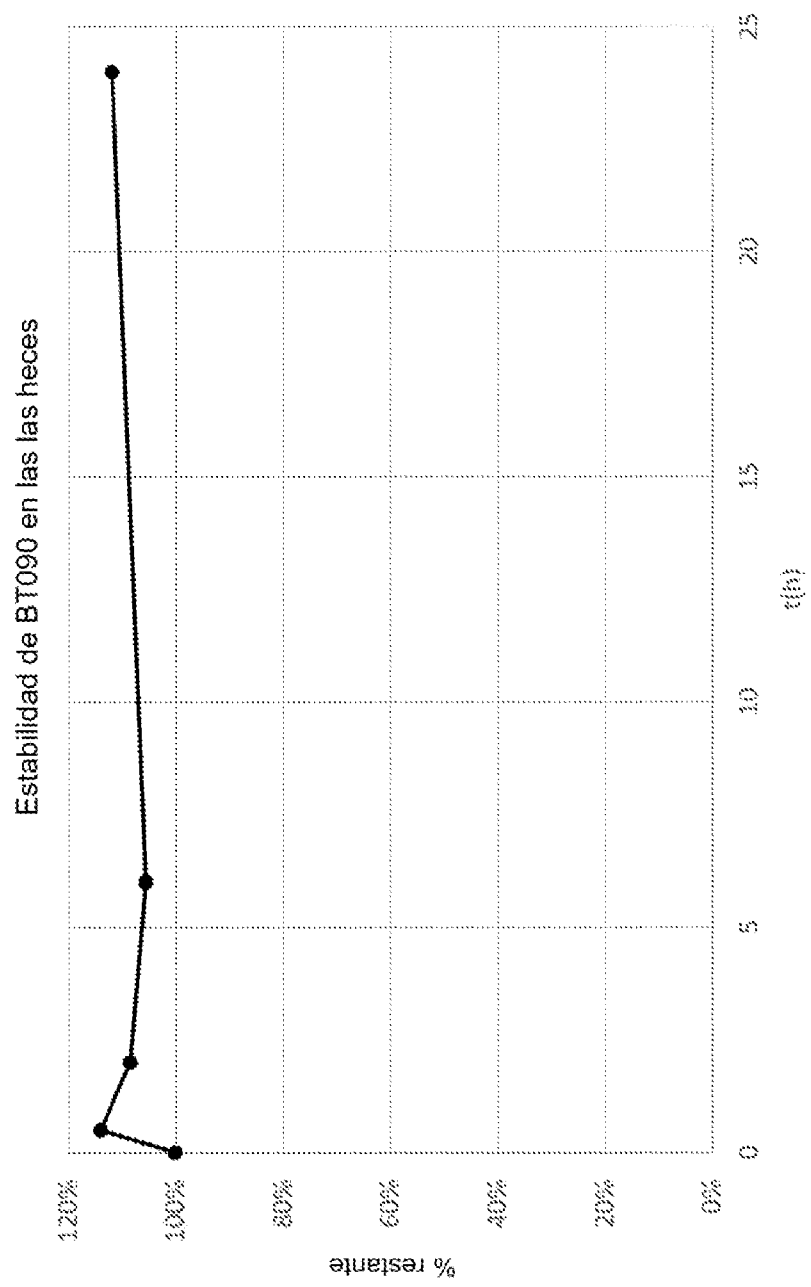


FIGURA 3A

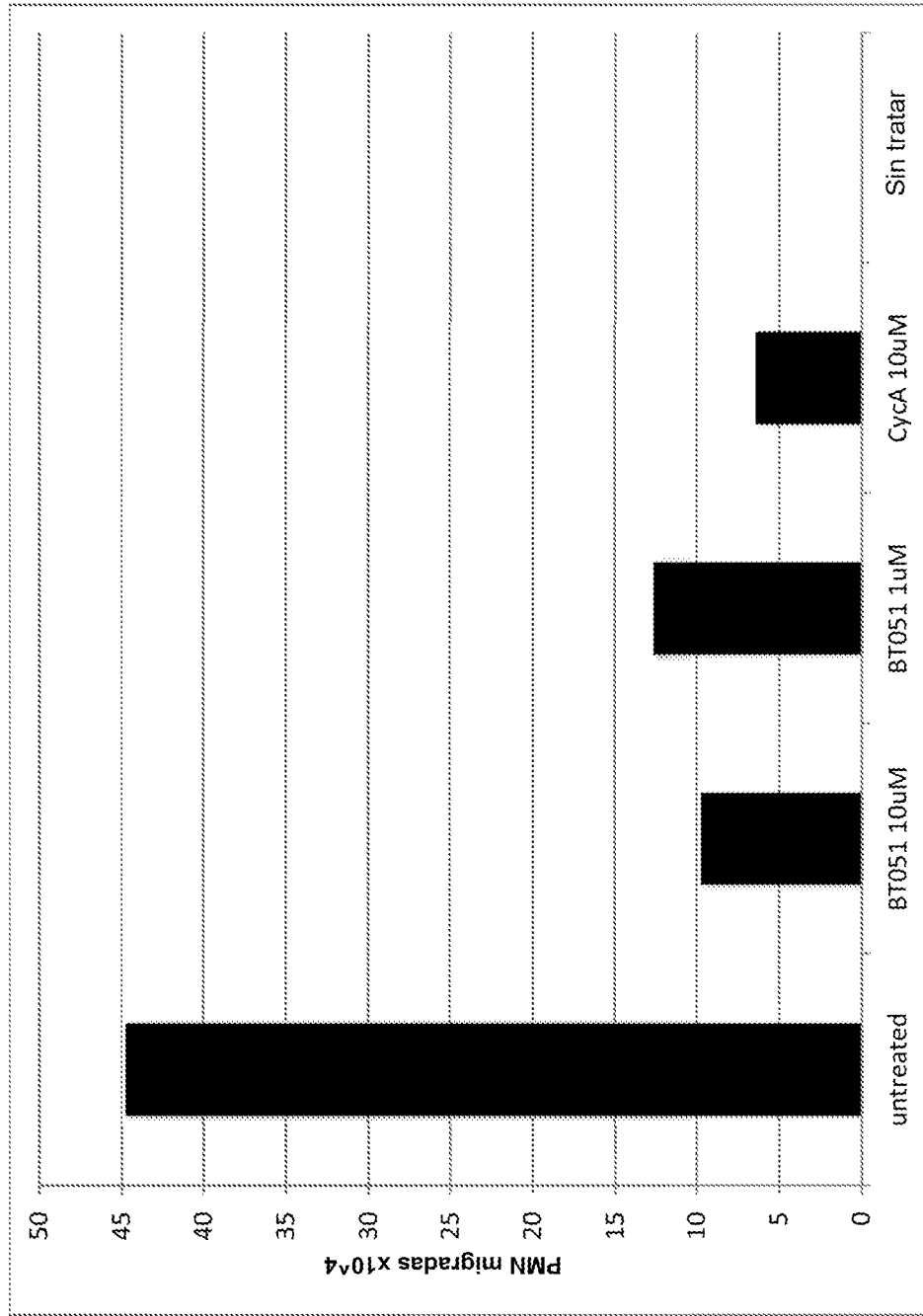


FIGURA 3B

