



No. 13-089531- -00000-0000

Fecha: 2013-04-05 14:27:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 118



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD DIVISIONAL
PATENTE DE INVENCION
PCT

EXPEDIENTE No _____

TITULO TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES

CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

SOLICITANTE: DMI ACQUISITION CORP.

DOMICILIO: ENGLEWOOD, COLORADO, ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA

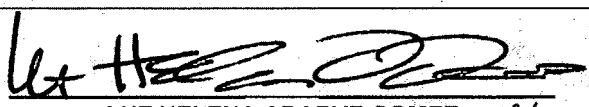
APODERADO LUZ HELENA ADARVE GOMEZ

BOGOTA D.C. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-089531- -00000-0000 Fecha: 2013-04-05 14:27:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 118
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	X X	Patente de invención Capítulo I	Patente de Modelo de Utilidad Capítulo II	
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)				
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/050612		Fecha	07.09.2011
Publicación Internacional No.		WO 2012/033789 A2		Fecha	15.03.2012
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)				
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES					
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP				
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria				
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE		IDENTIFICACIÓN	TIPO
1.	DMI ACQUISITION CORP				
6	DATOS DEL SOLICITANTE				
DIRECCIÓN		The Quadrant, 5445 DTC Parkway, P4, CO 80111		No. TELÉFONO	313 7800
CIUDAD		Greenwood Village		E-MAIL	infopi@cardenasycardenas.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		Colorado		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Estados Unidos de América
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América			
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria				
APELLIDOS		NOMBRE		NACIONALIDAD	
BAR-OR		David		Estadounidense	
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:					
8	DATOS INVENTOR (ES)				
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO	CIUDAD	DIRECCIÓN	
Estados Unidos de América		Colorado	Englewood	900 E. Oxford Lane, 80110	
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)					
Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.					
9	(74)	REPRESENTANTE	X	APODERADO	
APELLIDOS		NOMBRES		IDENTIFICACIÓN	
ADARVE GOMEZ		LUZ HELENA		C.C.41575435 BTA T.P.14.884 CSJ	
DIRECCIÓN		Carrera 7 No 71-52 Torre B Piso 9		No. TELÉFONO	313 7800
CIUDAD		BOGOTA		E-MAIL	infopi@cardenasycardenas.com
PAÍS		COLOMBIA		No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	
10	(30)	DECLARACIONES DE PRIORIDAD	x	SI	NO

(33) PAÍS DE ORIGEN 1.Estados Unidos de América 2. 3.		CÓDIGO PAÍS US	(31) NÚMERO 61/380,404	(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 07.09.2010
11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS				
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES				
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13 REDUCCIÓN DE TASAS				
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas		Entidades sin ánimo de lucro
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.				☐ Hoja de información complementaria.
				☐ Otros, especificar
14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA		SI	☒ NO	
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
14 COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO		N° 13-0030252		Fecha 02.04.2013
15 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>				
 LUZ HELENA ADARVE GOMEZ NW.				
16 ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD				
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios: 40		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones..... N° Reivindicaciones 44		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante		
3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso		13. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☐ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

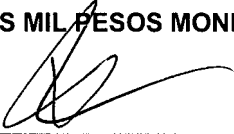
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0030252
		Bogotá D.C., Abril 02 de 2013 - 15:42:38

RECIBIDO DE : CARDENAS & CARDENAS ABOGADOS PI LTDA					NI 830.083.491	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO	
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	189793752	02/04/2013	21.315.000.00	

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
**
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-089531 - 00000-0000

Fecha: 2013-04-05 14:27:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 118

CARDENAS & CARDENAS
ABOGADOS

☐

Patente de Invención

☒

Patente modelo de utilidad

☒

PCT

(21) No De solicitud	(51) int. Cl:
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) DMI ACQUISITION CORP
(30) Prioridad	(72) Inventor (es) David Bar-or
(31) No Prioridad - 61/380,404	
(32) Fecha 07.09.2010	
(33) País US	(74) Apoderado (s) LUZ HELENA ADARVE GOMEZ

(54) Título **TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES**

Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT

(85) Fecha límite de inicio Fase Nacional 07.04.2013	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 07.09.2011 No de Solicitud PCT PCT/US2011/050612	(87) Publicación internacional Fecha 15.03.2010 No Publicación WO 2012/033789 A2

Resumen reivindicación (es):

La invención proporciona un método para inhibir la hiperpermeabilidad vascular en un animal que se encuentre en necesidad de ello. El método comprende administrar al animal una cantidad efectiva de una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula detallada en la descripción.

La invención también proporciona un método para modular el citoesqueleto de una célula endotelial en un animal. El método comprende administrar al animal una cantidad efectiva de una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula detallada en la descripción.

La invención además proporciona un kit. El kit comprende una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula detallada en la descripción.

4

	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO									
	DIVISION DE NUEVAS CREACIONES									
	TARJETA DE ARCHIVO PROPIETARIOS									
	PATENTE DE INVENCION			PCT	X	MODELO DE UTILIDAD			DISEÑO INDUSTRIAL	
(21) No de solicitud:					(22) Fecha de solicitud:					
(51) Clasificación Internacional:										
(71) Solicitante(s) DMI ACQUISITION CORP										
(72) Inventor(es) David Bar-or										
(74) Apoderado: LUZ HELENA ADARVE GOMEZ										
(30) Prioridad		(31) No Prioridad		(32) Fecha			(33) País			
		61/380,404		07.09.2010			US			
(85) Fecha inicio fase nacional: 07.04.2013										
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT										
Fecha de presentación de la solicitud: 07.09.2011										
No de solicitud: PCT/US2011/050612										
(54) Título TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES										

5

	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO									
	DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES									
	TARJETA DE ARCHIVO TEMÁTICO									
	PATENTE DE INVENCION			PCT	X	MODELO DE UTILIDAD			DISEÑO INDUSTRIAL	

(21) No de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:											
(71) Solicitante(s) DMI ACQUISITION CORP													
(72) Inventor (es) David Bar-or													
(74) Apoderado: LUZ HELENA ADARVE GOMEZ													
(30) Prioridad		(31) No Prioridad								(32) Fecha		(33) País	
		61/380,404								07.09.2010		US	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07.04.2013				(87) Publicación internacional:									
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT				Fecha:15.03.2012									
Fecha de presentación de la solicitud:07.09.2011				No Publicación: WO 2012/033789 A2									
No de Solicitud PCT/US2011/050612													
(54) Título: TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES													
(57) Resumen: La invención proporciona un método para inhibir la hiperpermeabilidad vascular en un animal que se encuentre en necesidad de ello. El método comprende administrar al animal una cantidad efectiva de una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula detallada en la descripción. La invención también proporciona un método para modular el citoesqueleto de una célula endotelial en un animal. El método comprende administrar al animal una cantidad efectiva de una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula detallada en la descripción. La invención además proporciona un kit. El kit comprende una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula detallada en la descripción.													

TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES

CAMPO DE LA INVENCION

5

La invención se relaciona con un método y kit para inhibir la hiperpermeabilidad vascular y el edema y otros efectos adversos que se producen a consecuencia de ella. La invención también se relaciona con un método y kit para modular el citoesqueleto de las células endoteliales. Ambos métodos comprenden la administración a un animal de una dicetopiperazina (DKP) de la fórmula I que se muestra a continuación, una prodroga de dicha DKP o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas.

ANTECEDENTES

15

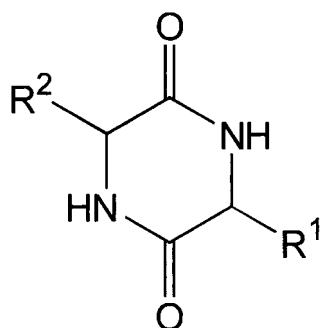
El endotelio vascular recubre el interior de todos los vasos sanguíneos. Actúa como la interfaz entre la sangre y los tejidos y órganos. El endotelio forma una barrera semi-permeable que mantiene la integridad del compartimento del flujo sanguíneo, pero que permite el paso de agua, iones, moléculas pequeñas, macromoléculas y células de una manera regulada. La desregulación de este proceso ocasiona derrame vascular hacia los tejidos subyacentes. El derrame de fluido hacia los tejidos que produce edema puede tener consecuencias serias y potencialmente mortales en una variedad de enfermedades. Consiguientemente, sería bastante deseable tener un método para reducir el edema, preferiblemente en su etapa más temprana, y restaurar la barrera endotelial a su función fisiológica.

25

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona tal método. En especial, la invención proporciona un método para inhibir la hiperpermeabilidad vascular y el edema y otros efectos adversos que se producen a consecuencia de ella. El método comprende administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un ingrediente activo, en donde el ingrediente activo comprende una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula:

35



I

en donde:

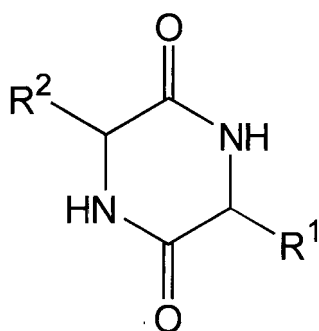
5 R^1 y R^2 , que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es:

- (a) una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina;
- (b) R^1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina y/o R^2 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina; o
- (c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es uno de los mencionados en (a), y la cadena lateral derivada tiene:
 - (i) un grupo $-\text{NH}_2$ reemplazado con un grupo $-\text{NHR}^3$ o $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
 - (ii) un grupo $-\text{OH}$ reemplazado con un grupo $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ o $-\text{OR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
 - (iii) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{COOR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
 - (iv) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$, en donde cada R^4 puede independientemente ser H o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

- (v) un grupo -SH reemplazado con -S-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH o -S-S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH;
- (vi) un grupo -CH₂- reemplazado con un grupo -CH(NH₂)- o -CH(OH)-;
- (vii) un grupo -CH₃ reemplazado con un grupo -CH₂-NH₂ o -CH₂-OH; y/o
- (viii) un H el cual está unido a un átomo de carbono reemplazado con un halógeno.

La inhibición de la hiperpermeabilidad vascular de acuerdo con la invención incluye la inhibición de la hiperpermeabilidad de causa paracelular (*paracellular-caused hyperpermeability*) e hiperpermeabilidad causada por transcitosis (*transcytosis-caused hyperpermeability*). La evidencia reciente muestra que la hiperpermeabilidad causada por transcitosis es el primer paso de un proceso que finalmente conduce al daño de tejidos y órganos en muchas enfermedades y condiciones. Consiguientemente, la presente invención proporciona un medio para la intervención temprana en estas enfermedades y condiciones que puede reducir, retrasar o incluso potencialmente prevenir el daño de tejidos y órganos que se observa en ellas.

La invención también proporciona un método para modular el citoesqueleto de células endoteliales en un animal. El método comprende administrar una cantidad efectiva de un ingrediente activo, en donde el ingrediente activo comprende una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, al animal, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula:



I

en donde:

R¹ y R², que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es:

- (a) una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α-aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina,

fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina;

(b) R^1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina y/o R^2 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina; o

(c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es uno de los mencionados en (a), y la cadena lateral derivada tiene:

(i) un grupo $-\text{NH}_2$ reemplazado con un grupo $-\text{NHR}^3$ o $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(ii) un grupo $-\text{OH}$ reemplazado con un grupo $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ o $-\text{OR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iii) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{COOR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iv) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$, en donde cada R^4 puede independientemente ser H o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

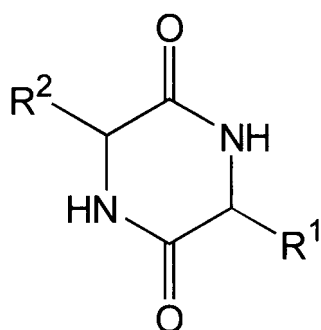
(v) un grupo $-\text{SH}$ reemplazado con $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ o $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$;

(vi) un grupo $-\text{CH}_2-$ reemplazado con un grupo $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ o $-\text{CH}(\text{OH})-$;

(vii) un grupo $-\text{CH}_3$ reemplazado con un grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ o $-\text{CH}_2-\text{OH}$; y/o

(viii) un H el cual está unido a un átomo de carbono reemplazado con un halógeno.

La invención proporciona además un kit. El kit comprende una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula:



I

en donde:

5 R^1 y R^2 , que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es:

- (a) una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina;
- (b) R^1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina y/o R^2 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina; o
- (c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es uno de los mencionados en (a), y la cadena lateral derivada tiene:
 - (i) un grupo $-\text{NH}_2$ reemplazado con un grupo $-\text{NHR}^3$ o $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
 - (ii) un grupo $-\text{OH}$ reemplazado con un grupo $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ o $-\text{OR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
 - (iii) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{COOR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
 - (iv) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$, en donde cada R^4 puede independientemente ser H o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

- (v) un grupo -SH reemplazado con -S-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH o -S-S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH;
- (vi) un grupo -CH₂- reemplazado con un grupo -CH(NH₂)- o -CH(OH)-;
- (vii) un grupo -CH₃ reemplazado con un grupo -CH₂-NH₂ o -CH₂-OH; y/o
- (viii) un H el cual está unido a un átomo de carbono reemplazado con un halógeno.

“Hiperpermeabilidad vascular” se utiliza aquí para referirse a la permeabilidad de un endotelio vascular que se encuentra incrementada en comparación con los niveles basales. La “hiperpermeabilidad vascular”, como se utiliza aquí, incluye la hiperpermeabilidad de causa paracelular y la hiperpermeabilidad causada por transcitosis.

“Hiperpermeabilidad de causa paracelular” se utiliza aquí para referirse a la hiperpermeabilidad vascular causada por transporte paracelular y que se encuentra incrementada en comparación con los niveles basales. Otras características de la “hiperpermeabilidad de causa paracelular” se describen luego.

“Transporte paracelular” se utiliza aquí para referirse al movimiento de iones, moléculas y fluidos a través de las uniones interendoteliales (IEJs) entre las células endoteliales de un endotelio.

“Hiperpermeabilidad causada por transcitosis” se utiliza aquí para referirse a la hiperpermeabilidad vascular causada por transcitosis y que se encuentra incrementada en comparación con los niveles basales.

“Transcitosis” se utiliza aquí para referirse al transporte activo de macromoléculas y componentes plasmáticos en fase de fluido adjuntos a través de las células endoteliales del endotelio. Otras características de la “transcitosis” se describen luego.

“Nivel basal” se utiliza aquí para referirse al nivel encontrado en un tejido u órgano normal.

“Inhibición, inhibir” y términos similares se utilizan aquí para referirse a la reducción, retraso o prevención.

Una animal se encuentra “en necesidad de” tratamiento de acuerdo con la invención si el animal actualmente sufre de una enfermedad o condición mediada por hiperpermeabilidad vascular, presenta síntomas tempranos de dicha enfermedad o condición, o tiene una predisposición para desarrollar dicha enfermedad o condición.

“Mediada” y términos similares se utilizan aquí en el sentido de causada, causante, que involucra o se agrava por hiperpermeabilidad vascular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES ACTUALMENTE PREFERIDAS DE LA INVENCION

El endotelio es un portero clave que controla el intercambio de moléculas desde la sangre hacia el parénquima del tejido. Controla en gran medida la permeabilidad de un particular lecho vascular a las moléculas transportadas por la sangre. La permeabilidad y selectividad de la barrera celular endotelial dependen considerablemente de la estructura y tipo del endotelio que recubre la microvasculatura en lechos vasculares diferentes. Las células endoteliales que recubren el lecho microvascular de diferentes órganos exhiben una diferenciación estructural que puede agruparse en tres categorías morfológicas primarias: sinusoidal, fenestrada y continua.

El endotelio sinusoidal (al que también se refiere como “endotelio discontinuo”) tiene grandes espacios (*gaps*) intercelulares e intracelulares y carece de membrana de base, lo que permite un transporte mínimamente restringido de moléculas desde el lumen capilar hacia el tejido y viceversa. El endotelio sinusoidal se encuentra en el hígado, bazo y médula espinal.

Los endotelios fenestrados se caracterizan por la presencia de una gran cantidad de aberturas transcelulares circulares denominadas fenestraciones con un diámetro de 60 a 80 nm. Los endotelios fenestrados se encuentran en tejidos y órganos que requieren de un intercambio rápido de pequeñas moléculas, que incluyen el riñón (glomérulos, capilaridades peritubulares y vasos rectos ascendentes), páncreas, glándulas adrenales, glándulas endócrinas e intestino. Las fenestraciones se encuentran cubiertas mediante diafragmas delgados, excepto aquellas que se encuentran en glomérulos maduros, saludables. Ver Ichimura et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **19**:1463-1471 (2008).

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

El transporte endotelial en el endotelio continuo puede considerarse de manera general como que ocurre mediante rutas paracelulares y transcelulares. La ruta paracelular es la ruta entre células endoteliales, a través de las uniones interendoteliales (IEJs). En el endotelio continuo sin perturbaciones, el agua, los iones y las moléculas pequeñas se transportan de forma paracelular mediante difusión y convección. Una cantidad significativa de agua (hasta 40%) también cruza la barrera celular endotelial de forma transcelular a través de canales de membrana transportadores de agua denominados acuaporinas. Una serie de estímulos pueden afectar la organización las IEJs, abriendo de esa forma espacios en la barrera endotelial. La formación de estos espacios intercelulares

permite el paso de fluido, iones, macromoléculas (por ejemplo, proteínas) y otros componentes plasmáticos entre las células endoteliales de una manera no restringida. Esta hiperpermeabilidad de causa paracelular produce edema y otros efectos adversos que podrían eventualmente ocasionar daños a los tejidos y órganos.

5 La ruta transcelular es responsable del transporte activo de macromoléculas, tales como albúmina y otras proteínas plasmáticas, a través de las células endoteliales, en un proceso al que se refiere como “transcitosis”. El transporte de macromoléculas se realiza en vesículas llamadas cavéolas. Casi todos los endotelios continuos tienen abundantes cavéolas, excepto los endotelios continuos ubicados en el cerebro y los testículos los cuales

10 tienen pocas cavéolas. La transcitosis es un proceso de múltiples pasos que involucra la gemación y fisión sucesiva de cavéolas desde la plasmalema y la translocación a través de la célula, seguida del adosamiento y fusión con la plasmalema opuesta, donde las cavéolas liberan sus contenidos mediante exocitosis al interior del intersticio. La transcitosis es selectiva y se encuentra firmemente regulada bajo condiciones fisiológicas normales.

15 Existe un entendimiento cada vez mayor de la importancia fundamental de la ruta transcelular. La transcitosis de proteínas plasmáticas, especialmente albúmina la cual representa el 65% de la proteína plasmática, es de especial interés debido a su habilidad para regular el gradiente de presión oncótica transvascular. Como puede apreciarse, en consecuencia, el incremento de la transcitosis de albúmina y otras proteínas plasmáticas por

20 sobre los niveles basales incrementará la concentración proteica de las mismas en el tejido lo cual, a su vez, ocasionará que el agua se mueva a través de la barrera endotelial; produciendo de esa forma edema.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se transportan también a través de las células endoteliales mediante transcitosis. En la hiperlipidemia, se ha detectado un

25 incremento considerable en la transcitosis de LDL como el suceso inicial en la aterogénesis. La LDL se acumula en el espacio subendotelial, atrapada en la lámina basal expandida y la matriz extracelular. A la acumulación lipoproteica subendotelial en la hiperlipidemia sigue una cascada de eventos que producen la formación de placa ateromatosa. Se ha reportado que las lesiones ateroscleróticas avanzadas ocasionalmente se encuentran acompañadas de

30 la apertura de las IEJs y el paso descontrolado masivo de LDL y albúmina.

Las complicaciones vasculares son una característica de la diabetes. Al nivel de vasos grandes, la enfermedad parece expresarse como una aceleración de un proceso aterosclerótico. En relación con la microangiopatía, las alteraciones en la microvasculatura de la retina, glomérulos renales y nervios producen el mayor número de complicaciones

35 clínicas, pero un número creciente de investigaciones demuestra que la diabetes también afecta la microvasculatura de otros órganos, tales como el mesenterio, piel, músculo esquelético, corazón, cerebro y pulmón, ocasionando complicaciones clínicas adicionales.

En todos estos lechos vasculares, los cambios en la permeabilidad vascular parecen representar una característica de la disfunción endotelial diabética.

En el endotelio continuo, la hiperpermeabilidad capilar hacia las macromoléculas plasmáticas en la etapa temprana de la diabetes se explica por una intensificación de transporte vesicular transendotelial (es decir, por transcitosis incrementada) y no por la desestabilización de las IEJs. Además, se ha reportado que las células endoteliales de diabéticos, inclusive aquellas del cerebro, contienen un número incrementado de cavéolas en comparación con sujetos normales, y las proteínas glicadas, en especial albúmina glicada, son tomadas por las células endoteliales y transportadas por transcitosis a tasas sustancialmente mayores que sus formas nativas. Aún más, la transcitosis incrementada de macromoléculas es un proceso que continúa más allá de la etapa temprana de la diabetes y parece ser la causa del edema en tejidos y órganos diabéticos a lo largo de la enfermedad si no se administra tratamiento. Este edema, a su vez, conduce al daño de tejidos y órganos. Se han reportado incrementos similares en el transporte transcelular de macromoléculas en la hipertensión.

La hiperpermeabilidad de causa paracelular también es un factor en la diabetes y las complicaciones vasculares de la diabetes. Las IEJs de la ruta paracelular incluyen uniones adherentes (AJs) y uniones estrechas (TJs). La diabetes altera el contenido, fosforilación y localización de ciertas proteínas tanto en las AJs y las TJs, contribuyendo de esa forma a un incremento de la permeabilidad de la barrera endotelial.

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

El transporte endotelial en el endotelio fenestrado también se realiza mediante la transcitosis y la ruta paracelular. Además, el transporte endotelial se realiza por medio de las fenestraciones. Los endotelios fenestrados exhiben una permeabilidad marcadamente alta al agua y pequeños solutos hidrofílicos debido a la presencia de las fenestraciones.

Las fenestraciones pueden o no estar cubiertas con un diafragma. Los lugares del endotelio con fenestraciones diafragmadas incluyen el tejido endócrino (es decir, islotes pancreáticos y córtex adrenal), mucosa gastrointestinal y capilares peritubulares renales. La permeabilidad a las proteínas plasmáticas del endotelio fenestrado con fenestraciones diafragmadas no excede aquélla del endotelio continuo.

Los lugares del endotelio con fenestraciones no diafragmadas incluyen los glomérulos de los riñones. El endotelio fenestrado glomerular se encuentra cubierto con un glicocáliz que se extiende al interior de las fenestraciones (formando los denominados “coladores” —“*sieve plugs*”—) y con una capa superficial celular endotelial de glicoproteínas que se encuentra asociada más libremente. Los análisis matemáticos de estudios de permselectividad funcional han concluido que el glicocáliz celular endotelial glomerular, inclusive aquel presente en las fenestraciones, y su capa superficial asociada son responsables de la retención de hasta 95% de las proteínas plasmáticas en circulación.

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

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

El transporte endotelial en el endotelio sinusoidal se realiza mediante transcitosis y a través de espacios intercelulares (rendijas interendoteliales) y espacios intracelulares (fenestraciones). El tratamiento del endotelio sinusoidal con fármacos que afectan los filamentos de actina puede inducir un incremento sustancial y rápido en el número de espacios, lo cual indica la regulación de la porosidad del recubrimiento endotelial mediante el citoesqueleto de actina. Se ha reportado que otros fármacos que alteran citoesqueleto cambian los diámetros de las fenestraciones. Por lo tanto, el citoesqueleto asociado a las fenestraciones probablemente controla la importante función de filtración endotelial en el endotelio sinusoidal. En el hígado, la defenestración (pérdida de fenestraciones), que produce una reducción en la permeabilidad del endotelio, se ha asociado con la patogénesis

de varias enfermedades y condiciones, inclusive envejecimiento, aterogénesis, aterosclerosis, cirrosis, fibrosis, insuficiencia hepática y cáncer hepático primario y metastásico. En sustento de lo anterior y para información adicional, ver Yokomori, *Med. Mol. Morphol.*, **41**:1-4 (2008); Stan, "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability," pp. 679-688, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); DeLeve, "The Hepatic Sinusoidal Endothelial Cell," pp. 1226-1238, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); Pries and Kuebler, "Normal Endothelium," pp. 1-40, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada and Higgs, Springer-Verlag, Berlin, 2006); Simionescu and Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies," pp. 42-69, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada and Higgs, Springer-Verlag, Berlin, 2006); Braet and Wisse, *Comparative Hepatology*, **1**:1-17 (2002); Kanai et al., *Anat. Rec.*, **244**:175-181 (1996); Kempka et al., *Exp. Cell Res.*, **176**:38-48 (1988); Kishimoto et al., *Am. J. Anat.*, **178**:241-249 (1987).

La invención proporciona un método para inhibir la hiperpermeabilidad vascular presente en cualquier tejido u órgano que contenga o esté rodeado de endotelio continuo. Como se anotó en precedencia, el endotelio continuo se encuentra presente en, o alrededor de, el cerebro (barrera hematoencefálica), diafragma, musculatura duodenal, grasa, corazón, algunas áreas de los riñones (microvasculatura papilar, vasos rectos descendentes), grandes vasos sanguíneos, pulmones, mesenterio, nervios, retina (barrera hematorretiniana), músculo esquelético, piel, testículo, vena umbilical y otros tejidos y órganos del cuerpo. Preferiblemente, el endotelio continuo es aquel que se encuentra en o alrededor del cerebro, corazón, pulmones, nervios o retina.

La invención también proporciona un método para inhibir la hiperpermeabilidad vascular presente en cualquier tejido u órgano que contenga o esté rodeado de endotelio fenestrado. Como se anotó en precedencia, el endotelio fenestrado se encuentra presente en, o alrededor de, el riñón (glomérulos, capilaridades peritubulares y vasos rectos ascendentes), páncreas, glándulas adrenales, glándulas endócrinas e intestino. Preferiblemente, el endotelio fenestrado es aquel que se encuentra en los riñones, especialmente aquel que se encuentra en los glomérulos de los riñones.

Además, cualquier enfermedad o condición mediada por la hiperpermeabilidad vascular puede tratarse con el método de la invención para inhibir la hiperpermeabilidad vascular. Dichas enfermedades o condiciones incluyen diabetes, hipertensión y aterosclerosis.

En especial, las complicaciones vasculares de la diabetes, inclusive aquellas del cerebro, corazón, riñones, pulmones, mesenterio, nervios, retina, músculo esquelético, piel y otros tejidos y órganos que contienen endotelio continuo o fenestrado, pueden tratarse mediante la presente invención. Estas complicaciones vasculares incluyen edema,

acumulación de LDL en el espacio subendotelial, aterosclerosis acelerada y los siguientes: cerebro (envejecimiento acelerado de las paredes vasculares), corazón (edema del miocardio, fibrosis del miocardio, disfunción diastólica, cardiomiopatía diabética), riñones (nefropatía diabética), pulmón (retardo del desarrollo pulmonar en fetos de madres diabéticas, alteraciones de varios parámetros fisiológicos pulmonares e incremento de susceptibilidad a infecciones), mesenterio (hiperplasia vascular), nervios (neuropatía diabética), retina (edema macular y retinopatía diabética) y piel (enrojecimiento, decoloración, resequedad y ulceraciones). La hiperpermeabilidad vascular tanto en la diabetes Tipo 1 (autoinmune) como Tipo 2 (no dependiente de insulina) puede inhibirse mediante el método de la invención. La Tipo 2 es el tipo más común de diabetes, afectando al 90-95% de diabéticos, y su tratamiento, especialmente el tratamiento de aquellos con signos tempranos de diabetes Tipo 2, o una predisposición a desarrollarla (ver abajo), debería ser especialmente favorable.

La retinopatía diabética es una de las principales causas de ceguera que afecta aproximadamente al 25% de los 21 millones de ciudadanos norteamericanos que se estima sufren de diabetes. A pesar de que su incidencia y progreso pueden reducirse mediante un control glucémico y de presión sanguínea intensivo, casi la totalidad de pacientes con diabetes mellitus Tipo 1 y alrededor del 60% de aquellos con diabetes mellitus Tipo 2 desarrollan eventualmente retinopatía diabética. Existen dos etapas de la retinopatía diabética. La primera, retinopatía no proliferativa, es la etapa más temprana de la enfermedad y se caracteriza por un incremento de la permeabilidad vascular, microaneurismas, edema y eventualmente obstrucciones vasculares. La neovascularización no es un componente de la fase no proliferativa. La mayor parte de la pérdida visual durante esta etapa se debe al fluido que se acumula en la mácula, el área central de la retina. Esta acumulación de fluido se denomina edema macular y puede ser la causa de visión reducida temporal o permanente. La segunda etapa de la retinopatía diabética se denomina retinopatía proliferativa y se caracteriza por la formación anormal de nuevos vasos. Desafortunadamente, esta neovascularización anormal puede ser muy dañina porque puede producir sangrado en el ojo, tejido cicatricial retinal, desprendimientos de la retina por diabetes o glaucoma, cualquiera de los cuales puede ocasionar visión reducida o ceguera. El edema macular puede también presentarse en la fase proliferativa.

La neuropatía diabética es una complicación seria que es común en la diabetes. Existen cuatro tipos principales de neuropatía diabética: neuropatía periférica, neuropatía autonómica, neurorradiculoplexopatía y mononeuropatía. Los signos y síntomas de la neuropatía periférica, el tipo más común de neuropatía diabética, incluyen entumecimiento o capacidad reducida para sentir dolor o cambios en la temperatura (especialmente en los pies y dedos del pie), un sentimiento de hormigueo o ardor, dolor agudo, dolor al caminar, sensibilidad extrema al más ligero golpe, debilidad muscular, dificultad para caminar, y

problemas serios en el pie (tales como úlceras, infecciones, deformidades y dolor en los huesos y articulaciones). La neuropatía autonómica afecta el sistema nervioso autónomo que controla el corazón, vejiga, pulmones, estómago, intestinos, órganos sexuales y ojos, y pueden presentarse problemas en cualquiera de estas áreas. La neurorradiculoplexopatía (también denominada amiotropía diabética, neuropatía femoral o neuropatía proximal) por lo general afecta los nervios en la cadera, hombros o abdomen, por lo general en un lado del cuerpo. La mononeuropatía significa daño un solo nervio, normalmente en un brazo, pierna o la cara. Las complicaciones comunes de la neuropatía diabética incluyen pérdida de extremidades (por ejemplo, dedos del pie, pies o piernas), articulaciones de Charcot, infecciones del tracto urinario, incontinencia urinaria, hipoglucemia asintomática (que puede inclusive ser fatal), baja presión sanguínea, problemas digestivos (por ejemplo, constipación, diarrea, náusea y vómito), disfunción sexual (por ejemplo, disfunción eréctil) y sudoración incrementada o reducida. Como puede verse, los síntomas pueden ir de leves a dolorosos, incapacitantes e inclusive fatales.

La nefropatía diabética es la causa más común de la enfermedad renal en etapa terminal en los Estados Unidos. Se trata de una complicación vascular de la diabetes que afecta los capilares glomerulares del riñón y reduce la capacidad de filtración del riñón. La nefropatía se muestra primero por el apareamiento de hiperfiltración y entonces microalbuminuria. Una proteinuria intensa y un declive progresivo en la función renal preceden a la enfermedad renal en etapa terminal. Normalmente, antes de que cualquier síntoma de neuropatía aparezca, por lo general se ha diagnosticado retinopatía. Se recomienda por lo general el trasplante renal a pacientes con enfermedad renal en etapa terminal por causa de diabetes. La tasa de supervivencia a 5 años para los pacientes que reciben un trasplante es de alrededor del 60% en comparación con solamente 2% para aquellos en diálisis.

La hipertensión normalmente se desarrolla durante varios años, y eventualmente afecta a casi todos. La hipertensión no controlada incrementa el riesgo de problemas cardíacos graves, inclusive ataque cardíaco, insuficiencia cardíaca congestiva, apoplejía, enfermedad arterial periférica, insuficiencia renal, aneurismas, daño ocular, e inclusive problemas de memoria y comprensión.

La aterosclerosis también se desarrolla de forma gradual. La aterosclerosis puede afectar las arterias coronarias, la arteria carótida, las arterias periféricas o la microvasculatura, y las complicaciones de la aterosclerosis incluyen enfermedad arterial coronaria (que puede ocasionar angina o ataque cardíaco), enfermedad microvascular coronaria, enfermedad arterial carotídea (que puede ocasionar un ataque isquémico transitorio o apoplejía), enfermedad arterial periférica (que puede ocasionar pérdida de la sensibilidad al calor y frío o inclusive muerte de los tejidos), y aneurismas.

Entre las enfermedades y condiciones adicionales que pueden tratarse de acuerdo con la invención, se incluyen lesión pulmonar aguda, degeneración macular relacionada con la edad, edema coroideo, coroiditis, enfermedad microvascular coronaria, enfermedad microvascular cerebral, enfermedad de Eales, edema producido por lesión (por ejemplo, trauma o quemaduras), edema asociado con hipertensión, derrame vascular glomerular, shock hemorrágico, Síndrome de Irvine-Gass, edema causado por isquemia, edema macular (por ejemplo, causado por oclusiones vasculares, post-cirugía intraocular (por ejemplo, cirugía de las cataratas), uveítis o retinitis pigmentosa, además del causado por diabetes), nefritis (por ejemplo, glomerulonefritis, nefritis por enfermedad del suero y nefritis Thy-1), nefropatías, edema nefrótico, síndrome nefrótico, neuropatías, falla orgánica debida a edema tisular (por ejemplo, en sepsis o debido a trauma), preeclampsia, edema pulmonar, hipertensión pulmonar, insuficiencia renal, edema retinal, hemorragia retinal, oclusiones venosas retinales (por ejemplo, oclusiones de rama venosa o de vena central), retinitis, retinopatías (por ejemplo, retinopatía arterosclerótica, retinopatía hipertensiva, retinopatía por radiación, retinopatía por anemia deprimada y retinopatía de prematuridad, además de retinopatía diabética), infarto cerebral silencioso, síndromes de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), glomerulopatía de transplante, uveítis, síndrome de derrame vascular, hemorragia vítrea y la enfermedad de Von Hippel Lindau. Además, se conoce que ciertos fármacos, inclusive aquellos utilizados para tratar la esclerosis múltiple, producen hiperpermeabilidad vascular, y una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, se puede utilizar para reducir este efecto adverso no deseado al administrar dichos fármacos.

“Tratar” o “tratamiento” se utiliza aquí para referirse a la reducción (total o parcialmente) de los síntomas, la duración o la gravedad de una enfermedad o condición, inclusive la curación de la enfermedad, o la prevención de la enfermedad o condición.

La evidencia reciente muestra que la hiperpermeabilidad causada por transcitosis es el primer paso de un proceso que finalmente conduce al daño de tejidos y órganos en muchas enfermedades y condiciones. Consiguientemente, la presente invención proporciona un medio para la intervención temprana en estas enfermedades y condiciones que puede reducir, retrasar o incluso potencialmente prevenir el daño de tejidos y órganos que se observa en ellas. Por ejemplo, un animal puede ser tratado inmediatamente luego del diagnóstico de una de estas enfermedades o condiciones que son tratables de acuerdo con la invención (aquellas enfermedades y condiciones descritas en precedencia).

Alternativamente, se prefiere el tratamiento de animales que presentan signos tempranos de dicha enfermedad o condición, o una predisposición a desarrollarla, antes de la existencia de síntomas. Son bien conocidos los signos tempranos, y factores de riesgo, de diabetes, hipertensión y aterosclerosis, y el tratamiento de un animal que exhibe estos

signos tempranos o factores de riesgo puede empezar antes de la presencia de los síntomas de la enfermedad o condición (es decir, profilácticamente).

Por ejemplo, el tratamiento de un paciente a quien se ha diagnosticado diabetes puede empezar inmediatamente luego del diagnóstico. En especial, los pacientes diabéticos deberían ser preferiblemente tratados con una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal de cualquiera de ellas antes de que se presente cualquiera de los síntomas de una complicación vascular, a pesar de que esto no es normalmente posible, debido a que la mayoría de pacientes diabéticos muestran tales síntomas cuando se los diagnostica (ver abajo). Alternativamente, los pacientes diabéticos deberían ser tratados mientras la retinopatía diabética no proliferativa es leve (es decir, niveles leves de microaneurismas y hemorragia intraretinal). Ver *Diabetic Retinopathy*, p. 9 (Ed. Elia Duh, M.D., Human Press, 2008). Este tratamiento temprano ofrecerá la mejor oportunidad de prevenir el edema macular y la progresión de la retinopatía hacia retinopatía diabética proliferativa. Además, se considera que la presencia de retinopatía diabética es un signo de que existen o se desarrollarán otras complicaciones microvasculares de la diabetes (ver *Id.*, pp. 474-477), y el tratamiento temprano también prevendrá o reducirá estas complicaciones adicionales. Desde luego, también se pueden tratar con resultados favorables enfermedades o condiciones más avanzadas que son complicaciones vasculares de la diabetes.

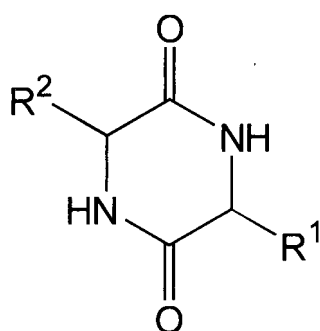
Sin embargo, como se anota en precedencia, las complicaciones vasculares se encuentran a menudo ya presentes al tiempo en que se diagnostica la diabetes. Consiguientemente, es preferible tratar profilácticamente a un paciente que tiene signos tempranos de diabetes o una predisposición a desarrollarla. Los signos tempranos y factores de riesgo de la diabetes Tipo 2 incluyen glucemia en ayunas que se encuentra alta, pero no lo suficientemente alta como para ser clasificada como diabetes ("prediabetes"), hiperinsulinemia, hipertensión, dislipidemia (colesterol alto, triglicéridos altos, alta lipoproteína de baja densidad, y/o bajo nivel de lipoproteína de alta densidad), obesidad (índice de masa corporal superior a 25), inactividad, más de 45 años de edad, sueño inadecuado, antecedentes familiares de diabetes, minorías étnicas, antecedentes de diabetes gestacional, antecedentes de síndrome de ovario poliquístico y diagnóstico de síndrome metabólico. Consiguientemente, los pacientes con signos tempranos de diabetes Tipo 2, o una predisposición a desarrollarla, pueden ser tratados inmediatamente de manera profiláctica.

De forma similar, el tratamiento de un paciente a quien se ha diagnosticado hipertensión puede empezar inmediatamente luego del diagnóstico. La hipertensión normalmente no produce ningún síntoma, pero el tratamiento profiláctico puede empezar para un paciente que tiene una predisposición a desarrollar hipertensión. Los factores de riesgo para la hipertensión incluyen la edad, etnia (la hipertensión es más común en la raza negra), antecedentes familiares (la hipertensión se presenta en familias), sobrepeso u

obesidad, falta de actividad, fumar tabaco, demasiada sal en la dieta, muy poco potasio en la dieta, muy poca vitamina D en la dieta, beber demasiado alcohol, altos niveles de estrés, ciertas condiciones crónicas (por ejemplo, colesterol alto, diabetes, enfermedad renal y apnea del sueño) y el uso de ciertos fármacos (por ejemplo, anticonceptivos orales, anfetaminas, píldoras de dieta, y algunas medicaciones para el resfrío y la alergia).

El tratamiento de un paciente a quien se ha diagnosticado aterosclerosis puede empezar inmediatamente luego del diagnóstico. Sin embargo, es preferible tratar profilácticamente al paciente que muestra signos tempranos de aterosclerosis o una predisposición a desarrollarla. Los signos tempranos y factores de riesgo para la aterosclerosis incluyen la edad, antecedentes familiares de aneurisma o enfermedad cardíaca temprana, hipertensión, colesterol alto, triglicéridos altos, resistencia a la insulina, diabetes, obesidad, tabaquismo, falta de actividad física, dieta no saludable, y alto nivel de proteína C reactiva.

El método de la invención para inhibir la hiperpermeabilidad vascular comprende administrar una cantidad efectiva de un ingrediente activo, en donde el ingrediente activo comprende una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, a un animal que se encuentre en necesidad de ella para inhibir la hiperpermeabilidad vascular. Las dicetopiperazinas de la invención tienen la siguiente fórmula:



I

en donde:

R^1 y R^2 , que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es:

- (a) una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina;

(b) R^1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina y/o R^2 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina; o

(c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es uno de los mencionados en (a), y la cadena lateral derivada tiene:

(i) un grupo $-\text{NH}_2$ reemplazado con un grupo $-\text{NHR}^3$ o $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(ii) un grupo $-\text{OH}$ reemplazado con un grupo $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ o $-\text{OR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iii) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{COOR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iv) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$, en donde cada R^4 puede independientemente ser H o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(v) un grupo $-\text{SH}$ reemplazado con $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ o $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$;

(vi) un grupo $-\text{CH}_2-$ reemplazado con un grupo $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ o $-\text{CH}(\text{OH})-$;

(vii) un grupo $-\text{CH}_3$ reemplazado con un grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ o $-\text{CH}_2-\text{OH}$; y/o

(viii) un H el cual está unido a un átomo de carbono reemplazado con un halógeno.

Las dicetopiperazinas más preferidas son aquellas en donde R^1 , R^2 o ambos son la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico o un derivado de dicha cadena lateral en donde el grupo $-\text{COOH}$ está reemplazado con un grupo $-\text{COOR}^3$ o un grupo $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$, en donde R^3 y R^4 son como se definió en precedencia. De este grupo de compuestos, se prefieren las dicetopiperazinas que comprenden las cadenas laterales de ácido aspártico y alanina (Asp-Ala DKP o DA-DKP), las cadenas laterales de ácido glutámico y alanina (Glu-Ala DKP o EA-DKP), las cadenas laterales de tirosina y ácido aspártico (Tyr-Asp DKP o YD-DKP), las cadenas laterales de tirosina y ácido glutámico (Tyr-Glu DKP o YE-DKP) y derivados de las cadenas laterales de ácido aspártico y ácido glutámico de estas

cuatro dicetopiperazinas en donde el grupo -COOH está reemplazado con un grupo -COOR³ o un grupo -CON(R⁴)₂, en donde R³ y R⁴ son como se definió en precedencia.

La más preferida es DA-DKP.

5 También se prefieren las dicetopiperazinas en donde R¹, R² o ambos son cadenas laterales hidrofóbicas o derivados de cadenas laterales hidrofóbicos. Por “derivado de cadena lateral hidrofóbico” se entiende que la cadena lateral derivada es hidrofóbica. En especial, se prefieren las dicetopiperazinas en donde R¹ y/o R², que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es la cadena lateral de glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α-aminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, metionina, fenilalanina, triptófano o tirosina, y/o R¹ y/o R² es -CH₂-CH₂-CH₂- y junto con el(los) átomo(s) de nitrógeno adyacente(s) forman prolina. De este grupo, se prefieren las dicetopiperazinas en donde R¹ y/o R², que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es la cadena lateral de glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α-aminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, metionina o tirosina, más preferiblemente alanina, valina, norvalina, ácido α-aminobutírico, leucina, isoleucina o norleucina.

15 Dicetopiperazinas preferidas adicionales son aquellas en las que R¹, R² o ambas cadenas laterales neutras o derivados de cadenas laterales neutros. Por “derivado de cadena lateral neutro” se entiende que la cadena lateral derivada es neutra. En especial, se prefieren las dicetopiperazinas en donde R¹ y/o R², que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es la cadena lateral de asparagina, glutamina, serina, homoserina, treonina, tirosina, cisteína o metionina. De este grupo, se prefieren las dicetopiperazinas en donde R¹ y/o R², que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es la cadena lateral de asparagina, glutamina, serina o treonina.

25 También se prefieren las dicetopiperazinas en donde R¹, R² o ambos son cadenas laterales básicas o derivados de cadenas laterales básicos. Por “derivado de cadena lateral básico” se entiende que la cadena lateral derivada es básica. En especial, se prefieren las dicetopiperazinas en donde R¹ y/o R², que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es la cadena lateral de citrulina, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, *p*-aminofenilalanina, u ornitina. De este grupo, se prefieren las dicetopiperazinas en donde R¹ y/o R², que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es la cadena lateral de citrulina, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, lisina, arginina, homoarginina o *p*-aminofenilalanina.

30 Dicetopiperazinas preferidas adicionales son aquellas en donde R¹, R² o ambos son la cadena lateral de metionina, la cadena lateral de arginina o un derivado de estas cadenas laterales. La más preferida de este grupo es una dicetopiperazina en donde R¹ es la cadena lateral de metionina y R² es la cadena lateral de arginina (Met-Arg DKP o MR-DKP).

Por “reemplazado” se entiende que, con referencia a la fórmula de una cadena lateral de aminoácido, el grupo especificado está reemplazado con el otro grupo

especificado. Por ejemplo, la fórmula de la cadena lateral de la isoleucina es $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$. Si el grupo $-\text{CH}_3$ terminal se reemplaza con un grupo $-\text{CH}_2-\text{OH}$, entonces, la fórmula de la cadena lateral derivada de isoleucina sería $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$. Como otro ejemplo, la fórmula de la cadena lateral de alanina es $-\text{CH}_3$. Si alguno de los átomos de hidrógeno se reemplaza con un átomo de cloro, entonces la cadena lateral derivada de alanina sería $-\text{CH}_2-\text{Cl}$. Nótese que la cadena lateral de glicina es $-\text{H}$ y, si este H se reemplaza con un átomo de cloro (u otro halógeno), la cadena lateral será $-\text{Cl}$, con el átomo de cloro unido al carbono del anillo (por ejemplo, $\text{R}^1 = -\text{Cl}$).

Por “cadena lateral” de un aminoácido se entiende la porción del aminoácido unida al esqueleto común $\text{NH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ de todos los aminoácidos enlistados en precedencia. Por ejemplo, la cadena lateral de glicina es $-\text{H}$, la cadena lateral de alanina es $-\text{CH}_3$, y la cadena lateral de serina es $-\text{CH}_2\text{OH}$.

Por “hidrofóbica” se entiende una cadena lateral o derivado de cadena lateral que no tiene carga a pH fisiológico y que es repelido por una solución acuosa.

Por “neutra” se entiende una cadena lateral o derivado de cadena lateral que no tiene carga a pH fisiológico.

Por “básica” se entiende una cadena lateral o derivado de cadena lateral que tiene carga positiva a pH fisiológico.

Por “ácida” se entiende una cadena lateral o derivado de cadena lateral que tiene carga negativa a pH fisiológico.

Por “alquilo” se entiende un hidrocarburo saturado de cadena recta o ramificado que contiene de 1-10 átomos de carbono, preferiblemente 1-6 átomos de carbono. “Alquilo inferior” significa un hidrocarburo saturado de cadena recta o ramificado que contiene 1-6 átomos de carbono.

Por “cicloalquilo” se entiende un hidrocarburo saturado cíclico que contiene por lo menos un anillo, conteniendo cada anillo por lo menos tres átomos de carbono. Preferiblemente, el cicloalquilo contiene un anillo de 4-8 átomos de carbono.

Por “heterocicloalquilo” se entiende un cicloalquilo que tiene uno o más de los átomos de carbono del anillo de por lo menos uno de los anillos reemplazado con un O, S y/o N.

Por “arilo” se entiende un grupo aromático que tiene por lo menos un anillo aromático (por ejemplo, fenilo).

Por “alquilarilo” se entiende un alquilo inferior que tiene un H reemplazado con un arilo (por ejemplo, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ o $-\text{CH}_3\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_3$).

Por “arilalquilo” se entiende un arilo que tiene un H reemplazado con un alquilo inferior (por ejemplo, $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$).

Por “heteroarilo” se entiende un arilo que tiene uno o más de los átomos de carbono del anillo de al menos uno de los anillos reemplazado con un O, S y/o N.

Por "sustituido" se entiende que la porción se encuentra sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del siguiente grupo: -OH, NH₂, -SH, -COOH y/o un átomo de halógeno.

Por "halógeno" se entiende cloro, flúor, bromo o yodo. Se prefiere cloro o bromo.

5 Son bien conocidos en el estado de la técnica los métodos para preparar dicetopiperazinas, y dichos métodos se pueden utilizar para sintetizar las dicetopiperazinas de la invención. Ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,694,081, 5,817,751, 5,990,112, 5,932,579 y 6,555,543, la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada con el número 2004/0024180, las solicitudes PCT WO 96/00391 y WO
10 97/48685, y Smith et al., *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **8**, 2369-2374 (1998), cuyos contenidos se incorporan aquí por referencia.

Por ejemplo, se pueden preparar las dicetopiperazinas sintetizando primero dipéptidos. Se pueden sintetizar los dipéptidos a través de métodos bien conocidos en el estado de la técnica utilizando L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de D- y
15 L-aminoácidos. Se prefieren los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Desde luego, los péptidos se encuentran también disponibles en el mercado a través de varias fuentes, entre las que se encuentra Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (principalmente síntesis bajo pedido), Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA (síntesis bajo pedido), Fisher Scientific (síntesis bajo pedido) y Advanced ChemTech, Louisville, KY.

20 Una vez que el dipéptido se sintetiza o se adquiere, se lo somete a una reacción de ciclación para formar una dicetopiperazina. Esto se puede conseguir mediante varias técnicas.

Por ejemplo, la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada con el número 2004/0024180 describe un método para ciclar dipéptidos. En resumen, se calienta el
25 dipéptido en un solvente orgánico mientras se remueve el agua por destilación. Preferiblemente, el solvente orgánico es un azeótropo de bajo punto de ebullición con agua, como acetonitrilo, alcohol alílico, benceno, alcohol bencílico, *n*-butanol, 2-butanol, *t*-butanol, éster butílico del ácido acético, tetracloruro de carbono, clorobenceno, cloroformo, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, dietil acetal, dimetil acetal, éster etílico del ácido acético,
30 heptano, metil isobutil cetona, 3-pentanol, tolueno y xileno. La temperatura depende de la velocidad de reacción a la cual se lleva a cabo la ciclación y en el tipo de agente azeotropizante utilizado. La reacción se lleva a cabo preferiblemente a 50-200°C, más preferiblemente 80-150°C. Un experto en el arte puede fácilmente determinar el rango de pH en el cual se realiza la ciclación. Podría ser de 2-9, preferiblemente 3-7.

35 Cuando uno o ambos de los aminoácidos del dipéptido tiene un grupo carboxilo en su cadena lateral (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico), o se lo deriva para que lo tenga, preferiblemente se cicla el dipéptido como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6,555,543. En resumen, el dipéptido, con la cadena lateral carboxílica todavía

protegida, se calienta bajo condiciones neutras. Ordinariamente, el dipéptido se calentará a una temperatura de alrededor de 80°C a alrededor de 180°C, preferiblemente a alrededor de 120°C. El solvente será un solvente neutro. Por ejemplo, el solvente puede comprender un alcohol (como butanol, metanol, etanol, y alcoholes superiores, pero no fenol) y un cosolvente azeotrópico (como tolueno, benceno o xileno). Preferiblemente, el alcohol es butan-2-ol, y el cosolvente azeotrópico es tolueno. Se continúa el calentamiento hasta que la reacción se complete, y los tiempos pueden determinarse empíricamente. Ordinariamente, el dipéptido se ciclará refluéndolo por alrededor de 8-24 horas, preferiblemente 18 horas. Por último, se remueve el grupo protector de la dicetopiperazina. Al hacerlo, se debería evitar el uso de ácidos fuertes (ácidos minerales, como ácido sulfúrico o clorhídrico), bases fuertes (bases alcalinas, como hidróxido de potasio o de sodio), y agentes reductores fuertes (por ejemplo, hidruro de litio y aluminio), a fin de mantener la quiralidad del compuesto final.

Los dipéptidos hechos sobre resinas en fase sólida pueden ciclarse y liberarse de la resina en un solo paso. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,817,751. Por ejemplo, la resina que tiene un dipéptido N-alquilado unido se suspende en tolueno o tolueno/etanol en la presencia de ácido acético (por ejemplo, 1%) o trietilamina (por ejemplo, 4%). Ordinariamente, se prefieren las condiciones de ciclación básicas debido a sus tiempos de ciclación más veloces.

Para preparar dicetopiperazinas en donde las cadenas laterales de aminoácido son derivadas, se pueden utilizar derivados de aminoácidos en la síntesis de los dipéptidos, se pueden derivar los dipéptidos y/o se pueden derivar las dicetopiperazinas, como se conoce en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, las referencias citadas en precedencia.

Se conocen en la técnica otros métodos para ciclar dipéptidos y para preparar dicetopiperazinas y se pueden utilizar para preparar las dicetopiperazinas útiles en la práctica de la invención. Ver, por ejemplo, aquellas referencias mencionadas en precedencia. Además, muchas dicetopiperazinas apropiadas para la presente invención pueden ser preparadas a partir de proteínas y péptidos como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 7,732,403, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia. Además, las dicetopiperazinas para la práctica de la presente invención se pueden obtener en el mercado en, por ejemplo, Syngene, India o Hemmo Pharmaceuticals Pvt. Ltd., India (ambas síntesis bajo pedido).

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

“Prodroga” significa cualquier compuesto que libera un fármaco activo original (una dicetopiperazina en este caso) *in vivo* cuando dicha prodroga se administra a un

animal. Las prodrogas de las dicetopiperazinas incluyen dicetopiperazinas derivadas con cualquier grupo que puede ser escindido *in vivo* para generar la dicetopiperazina. Entre los ejemplos de prodrogas, se incluyen los ésteres.

Se pueden también utilizar las sales fisiológicamente aceptables de las dicetopiperazinas y prodrogas de la invención. Las sales fisiológicamente aceptables incluyen sales no tóxicas convencionales, tales como sales derivadas de ácidos inorgánicos (como el ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y similares), ácidos orgánicos (como el ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, glutámico, aspártico, benzoico, salicílico, oxálico, ascórbico y similares) o bases (como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico o cationes orgánicos farmacéuticamente aceptables derivados de N,N-dibenziletilediamina, D-glucosamina, o etilenediamina). Se preparan las sales de una manera convencional, por ejemplo, neutralizando la forma de base libre del compuesto con un ácido.

Como señaló en precedencia, se puede utilizar una dicetopiperazina de fórmula I, una prodroga de una dicetopiperazina de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas para inhibir la hiperpermeabilidad vascular y para tratar una enfermedad o condición mediada por hiperpermeabilidad vascular. Para hacerlo, la dicetopiperazina, prodroga o sal farmacéuticamente aceptable se administra a un animal en necesidad de tratamiento. Preferiblemente, el animal es un mamífero, como un conejo, cabra, perro, gato, caballo o ser humano. Más preferiblemente, el animal es un ser humano.

En la presente invención, se utiliza como ingrediente activo una dicetopiperazina de fórmula I, una prodroga de una dicetopiperazina de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas. "Ingrediente activo" se utiliza aquí para referirse a un compuesto que tiene actividad terapéutica, farmacéutica o farmacológica, y en especial la actividad terapéutica, farmacéutica o farmacológica aquí descrita. En la presente invención, no se utiliza la dicetopiperazina, prodroga o sal como un vehículo o como parte de un sistema de vehículo de una composición farmacéutica como se describe en, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,976,569, 6,099,856, 7,276,534 y las solicitudes PCT WO 96/10396, WO 2006/023943, WO 2007/098500, WO 2007/121411 y WO 2010/102148.

Utilizando las directrices aquí proporcionadas, se pueden determinar empíricamente las formas de dosificación, modos de administración y cantidades de dosificación efectivas para los compuestos de la invención (es decir, una dicetopiperazina de fórmula I, una prodroga de una dicetopiperazina de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas). Los técnicos en la materia comprenden que la cantidad de dosificación variará con la particular enfermedad o condición a tratarse, la gravedad de la enfermedad o condición, la(s) ruta(s) de administración, la duración del tratamiento, la identidad de

cualesquier otros fármacos que se estén administrando al animal, la edad, tamaño y especie del animal, y factores similares conocidos en medicina y veterinaria. En general, una dosis diaria apropiada de un compuesto de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que es la dosis efectiva más baja para producir un efecto terapéutico. Sin embargo, la dosis diaria será determinada por un médico o veterinario tratante en el marco de un juicio médico fundamentado. Si se desea, se puede administrar la dosis diaria efectiva como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas separadamente a intervalos apropiados durante el día. Se debería continuar la administración del compuesto hasta que se alcance una respuesta aceptable.

En especial, una cantidad de dosificación efectiva de un compuesto de la invención para inhibir la hiperpermeabilidad vascular será de 10 ng/kg/día a 225 mg/kg/día, preferiblemente de 500 ng/kg/día a 150 mg/kg/día, más preferiblemente de 1 mg/kg/día a 30 mg/kg/día. Al administrarse oralmente a un ser humano adulto, la dosis será preferiblemente de alrededor de 1 mg/día a alrededor de 10 g/día, más preferiblemente la dosis será de alrededor de 60 mg/día a alrededor de 6 g/día, más preferiblemente la dosis será de alrededor de 100 mg/día a alrededor de 1200 mg/día, preferiblemente administrada en varias dosis.

La invención también proporciona un método para modular el citoesqueleto de células endoteliales en un animal. La modulación del citoesqueleto puede reducir la hiperpermeabilidad vascular e incrementar la hipopermeabilidad vascular (es decir, permeabilidad por debajo de los niveles basales), devolviendo de esa forma el endotelio a la homeostasis. Consiguientemente, se pueden tratar aquellas enfermedades o condiciones mediadas por hiperpermeabilidad vascular (ver la descripción anterior) y también se pueden tratar aquellas enfermedades o condiciones mediadas por hipopermeabilidad vascular. Este segundo tipo de enfermedades o condiciones incluye envejecimiento hepático, aterogénesis, aterosclerosis, cirrosis, fibrosis del hígado, insuficiencia hepática y cáncer hepático primario y metastásico.

El método para modular el citoesqueleto de células endoteliales comprende administrar al animal una cantidad efectiva de una dicetopiperazina de fórmula I, una prodroga de una dicetopiperazina de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas. Las dicetopiperazinas son las mismas que las descritas en precedencia para inhibir la hiperpermeabilidad vascular, y "animal" tiene el mismo significado que el dado antes.

Utilizando las directrices aquí proporcionadas, se pueden determinar empíricamente las formas de dosificación, modos de administración y cantidades de dosificación efectivas para los compuestos de la invención (es decir, una dicetopiperazina de fórmula I, una prodroga de una dicetopiperazina de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas) para modular el citoesqueleto. Los técnicos en la materia comprenden

que la cantidad de dosificación variará con la particular enfermedad o condición a tratarse, la gravedad de la enfermedad o condición, la(s) ruta(s) de administración, la duración del tratamiento, la identidad de cualesquier otros fármacos que se estén administrando al animal, la edad, tamaño y especie del animal, y factores similares conocidos en medicina y veterinaria. En general, una dosis diaria apropiada de un compuesto de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que es la dosis efectiva más baja para producir un efecto terapéutico. Sin embargo, la dosis diaria será determinada por un médico o veterinario tratante en el marco de un juicio médico fundamentado. Si se desea, se puede administrar la dosis diaria efectiva como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas separadamente a intervalos apropiados durante el día. Se debería continuar la administración del compuesto hasta que se alcance una respuesta aceptable.

En especial, una cantidad de dosificación efectiva de un compuesto de la invención para modular el citoesqueleto de células endoteliales será de 10 ng/kg/día a 225 mg/kg/día, preferiblemente de 500 ng/kg/día a 150 mg/kg/día, más preferiblemente de 1 mg/kg/día a 30 mg/kg/día. Al administrarse oralmente a un ser humano adulto, la dosis será preferiblemente de alrededor de 1 mg/día a alrededor de 10000 mg/día, más preferiblemente la dosis será de alrededor de 60 mg/día a alrededor de 6000 mg/día, más preferiblemente la dosis será de alrededor de 100 mg/día a alrededor de 1200 mg/día, preferiblemente administrada en varias dosis.

Los compuestos de la presente invención (es decir, dicetopiperazinas de fórmula I, prodrogas de las mismas y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de ellas) se pueden administrar a un paciente animal para fines terapéuticos mediante cualquier ruta de administración adecuada, incluyendo vía oral, nasal, parenteral (es decir, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular), transdérmica, intraocular y tópica (incluyendo bucal y sublingual). En general, se prefiere la administración oral para cualquier enfermedad o condición tratable de acuerdo con la invención. Las rutas de administración preferidas para el tratamiento de enfermedades y condiciones del ojo son las vías oral, intraocular y tópica. La más preferida es la oral. Las rutas de administración preferidas para el tratamiento de enfermedades y condiciones del cerebro son las vías oral y parenteral. La más preferida es la oral.

Aunque es posible administrar solo un compuesto de la presente invención, es preferible administrar el compuesto como una formulación (composición) farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un compuesto o compuestos de la presente invención como un ingrediente activo en mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con uno o más compuestos, fármacos o materiales adicionales. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el animal. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Con

independencia de la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables a través de métodos convencionales conocidos para los expertos en el arte. Ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

5 Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, *cachets*, píldoras, tabletas, polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tales como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica), y similares, que contienen cada
10 uno una cantidad predeterminada de un compuesto o compuestos de la presente invención como un ingrediente activo. Un compuesto o compuestos de la presente invención también pueden administrarse como un bolo, un electuario o una pasta.

En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el ingrediente activo (es decir, una
15 dicetopiperazina de fórmula I, una prodroga de una dicetopiperazina de fórmula I, una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, o combinaciones de las anteriores) se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales
20 como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes que retardan la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes
25 humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonítica; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes
30 tamponantes. También se pueden emplear como cargas composiciones sólidas de un tipo similar en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas, usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de peso molecular elevado, y similares.

Una tableta se puede elaborar mediante compresión o moldeado, opcionalmente con
35 uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar utilizando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio con enlaces cruzados), agente tensoactivo o dispersante. Las

tabletas moldeadas se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Las tabletas y otras formas de dosificación sólida de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, se pueden opcionalmente ranurar o preparar con recubrimientos y capas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También se pueden formular de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana. Opcionalmente, estas composiciones también pueden contener agentes de opacidad y pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente activo sólo, o preferentemente, en una determinada porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de las composiciones embebidas que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo también puede estar en forma microencapsulada.

Las formas de dosificación líquida para la administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles, ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos.

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

Las suspensiones, además del ingrediente activo, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de los mismos.

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

Las formulaciones (composiciones) farmacéuticas para inyección intraocular de un compuesto o compuestos de la invención al interior del globo ocular incluyen soluciones,

emulsiones, suspensiones, partículas, cápsulas, microesferas, liposomas, matrices, etc. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6,060,463, la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2005/0101582, y la solicitud PCT WO 2004/043480, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia. Por ejemplo, una composición farmacéutica para inyección intraocular puede comprender uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes mejoradores de viscosidad (tales como polímero de ácido hialurónico). Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos apropiados incluyen agua, solución salina (preferiblemente 0.9%), dextrosa en agua (preferiblemente 5%), tampones, dimetilsulfóxido, alcoholes y polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares). Estas composiciones pueden también contener adyuvantes tales como agentes humectantes y agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Además, se puede conseguir la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como polímeros y gelatinas. Las formas de depósito inyectables pueden realizarse incorporando el fármaco en el interior de microcápsulas o microesferas hechas de polímeros biodegradables tales como polilactido-poligrlicolido. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poliortoésteres, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, policaprolactona y polianhídridos. Las formulaciones de depósito inyectables se pueden también preparar colocando el fármaco en liposomas (compuestos de los ingredientes ordinarios, tales como dipalmitoilfosfatidilcolina) o microemulsiones que son compatibles con el tejido ocular. Dependiendo de la proporción del fármaco en relación con el polímero o lípido, se pueden controlar la naturaleza de los componentes poliméricos o lipídicos particulares, el tipo de liposoma utilizado, y si las microcápsulas o microesferas son recubiertas o carecen de recubrimiento, la tasa de la liberación del fármaco desde las microcápsulas, microesferas y liposomas.

Los compuestos de la invención pueden administrarse quirúrgicamente como un implante ocular. Por ejemplo, puede implantarse en o sobre la esclerótica un depósito con una pared de difusión de alcohol polivinílico o acetato de polivinilo y que contenga un compuesto o compuestos de la invención. Como otro ejemplo, un compuesto o compuestos de la invención puede incorporarse en una matriz polimérica hecha de un polímero, tal como policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polianhídrido o un lípido, como ácido sebácico, y puede implantarse en la esclerótica o en el ojo. Normalmente esto se realiza en un animal que recibe ya sea anestesia tópica o local y utilizando una pequeña incisión hecha detrás de la córnea. La matriz se inserta entonces a través de la incisión y se sutura a la esclerótica.

Los compuestos de la invención pueden administrarse también de forma tópica al ojo, y una modalidad preferida de la invención es una composición farmacéutica tópica apropiada para aplicación al ojo. Las composiciones farmacéuticas tópicas apropiadas para aplicación al ojo incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, gotas, geles, hidrogeles y ungüentos. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,407,926 y las solicitudes PCT WO 2004/058289, WO 01/30337 y WO 01/68053, cuyos contenidos se incorporan aquí por referencia.

Las formulaciones tópicas apropiadas para aplicación al ojo comprenden uno o más compuestos de la invención en una base acuosa o no acuosa. Las formulaciones tópicas pueden también incluir mejoradores de la absorción, mejoradores de la permeación, agentes espesantes, mejoradores de la viscosidad, agentes para ajustar y/o mantener el pH, agentes para ajustar la presión osmótica, conservantes, surfactantes, tampones, sales (preferiblemente cloruro de sodio), agentes de suspensión, agentes dispersantes, agentes solubilizantes, estabilizadores y/o agentes de tonicidad. Las formulaciones tópicas apropiadas para la aplicación al ojo preferiblemente comprenden un mejorador de absorción o permeación para promover la absorción o permeación del compuesto o compuestos de la invención al interior del ojo y/o un agente espesante o mejorador de la viscosidad que es capaz de incrementar el tiempo de residente de un compuesto o compuestos de la invención en el ojo. Ver, las solicitudes PCT WO 2004/058289, WO 01/30337 y WO 01/68053. Los ejemplos de mejoradores de la absorción/permeación incluyen metilsulfonilmetano, solo o en combinación con dimetilsulfóxido, ácidos carboxílicos y surfactantes. Los ejemplos de agentes espesantes y mejoradores de la viscosidad incluyen dextranos, polietilenglicoles, polivinilpirrolidona, geles de polisacáridos, Gelrite®, polímeros celulósicos (tales como hidroxipropilmetilcelulosa), polímeros que contienen carboxilos (tales como polímeros o copolímeros de ácido acrílico), alcohol polivinílico y ácido hialurónico o una sal del mismo.

Las formas de dosificación líquidas (por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones y gotas) apropiadas para el tratamiento del ojo se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, dispersando, suspendiendo, etc., un compuesto o compuestos de la invención en un vehículo, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución, dispersión o suspensión. Si se desea, la formulación puede también contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores y similares, por ejemplo acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, trietanolamina-acetato de sodio, oleato de trietanolamina, etc.

Las soluciones y suspensiones acuosas apropiadas para el tratamiento del ojo pueden incluir, además de un compuesto o compuestos de la invención, conservantes, surfactantes, tampones, sales (preferiblemente cloruro de sodio), agentes de tonicidad y

agua. Si se utilizan suspensiones, los tamaños de partículas deberían ser menores a 10 μm para minimizar la irritación del ojo. Si se utilizan soluciones o suspensiones, la cantidad a ser administrada al ojo no debería exceder de 50 μl para evitar el derrame excesivo desde el ojo.

5 Las suspensiones coloidales apropiadas para el tratamiento del ojo se forman por lo general de micropartículas (es decir, microesferas, nanoesferas, microcápsulas o nanocápsulas, donde las microesferas y nanoesferas son por lo general partículas monolíticas de una matriz polimérica en la cual la formulación se encuentra atrapada, adsorbida o de otra forma contenida, mientras que con las microcápsulas o nanocápsulas la
10 formulación se encuentra de hecho encapsulada). El límite superior para el tamaño de estas micropartículas es de alrededor de 5 μm a alrededor de 10 μm .

Los ungüentos oftálmicos apropiados para el tratamiento del ojo incluyen un compuesto o compuestos de la invención en una base apropiada, tal como un aceite mineral, lanolina líquida, petrolato blanco, una combinación de dos de los tres anteriores, o
15 gel de aceite mineral-polietileno. Opcionalmente, se puede incluir un conservante.

Los geles oftálmicos apropiados para el tratamiento del ojo incluyen un compuesto o compuestos de la invención suspendidos en una base hidrofílica, tal como Carbopol-940 o una combinación de etanol, agua y propilenglicol (por ejemplo, en una proporción de 40:40:20). Se utiliza un agente gelificante, tal como hidroxietilcelulosa,
20 hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o glicirricinato de amonio. Opcionalmente, se puede incluir un conservante y/o un agente de tonicidad.

Los hidrogeles apropiados para el tratamiento del ojo se forman incorporando un polímero hinchable, formador de gel, tal como aquellos mencionados en precedencia como agentes espesantes o mejoradores de la viscosidad, excepto que una formulación referida en
25 la técnica como un "hidrogel" ordinariamente tiene una viscosidad mayor que una formulación referida en la técnica como solución o suspensión "espesada". En contraste con dichos hidrogeles preformados, también se puede preparar una formulación para que se forme un hidrogel *in situ* luego de la aplicación al ojo. Dichos geles son líquidos a temperatura ambiente pero geles a temperaturas más elevadas (y por lo tanto se los
30 denomina hidrogeles "termorreversibles"), como cuando se los coloca en contacto con fluidos corporales. Los polímeros biocompatibles que imparten esta propiedad incluyen polímeros y copolímeros derivados de ácido acrílico, derivados de N-isopropilacrilamida y copolímeros de bloque ABA de óxido de etileno y óxido de propileno (a los que convencionalmente se refiere como "poloxámeros" y que están disponibles bajo la marca
35 Pluronic® de BASF-Wayndotte).

Las dispersiones preferidas son liposomales, en cuyo caso la formulación se encierra dentro de liposomas (vesículas microscópicas compuestas de compartimentos acuosos y bicapas lipídicas alternantes).

Las gotas oculares se pueden formular con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Las gotas pueden administrarse mediante un frasco gotero ocular o mediante una botella plástica adaptada para administrar contenidos líquidos en forma de gotas a través de un cierre especialmente diseñado.

Los compuestos de la invención también se pueden administrar tópicamente por medio de un vehículo sólido impregnado con el fármaco que se inserta en el ojo. La liberación del fármaco por lo general se realiza por disolución o bioerosión del polímero, ósmosis o combinaciones de las mismas. Se pueden utilizar varios sistemas de administración tipo matriz. Dichos sistemas incluyen lentes de contacto suaves e hidrofílicos impregnados o empapados con el compuesto deseado de la invención, así como también aparatos biodegradables o solubles que no necesitan ser removidos luego de colocarse en el ojo. Estos insertos oculares solubles pueden estar compuestos de cualquier sustancia degradable que pueda ser tolerada por el ojo y que sea compatible con el compuesto de la invención a ser administrado. Dichas sustancias incluyen, de manera no taxativa, alcohol polivinílico, polímeros y copolímeros de poliacrilamida, etilacrilato y vinilpirrolidona, así como también polipéptidos o polisacáridos con enlaces cruzados, tales como quitina.

Las formas de dosificación para otros tipos de administración tópica (es decir, no al ojo) o administración transdérmica de compuestos de la invención incluyen polvos, pulverizaciones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas e inhalantes. El ingrediente activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualesquier tampones o propelentes que puedan ser necesarios. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además del ingrediente activo, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc o mezclas de los mismos. Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además del ingrediente activo, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones adicionalmente pueden contener propelentes convencionales tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano. Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la entrega controlada de los compuestos de la invención al organismo. Tales formas de dosificación se pueden preparar disolviendo, dispersando o de otra forma incorporando uno o más compuestos de la invención en un medio apropiado, tales como material de matriz elastomérica. También se pueden usar mejoradores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de tal flujo se puede controlar sea proporcionando una membrana de control de velocidad o dispersando el

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

Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas apropiadas para la administración mediante inhalación o insuflación o para la administración nasal. Para la administración al tracto respiratorio inferior o superior (nasal) mediante inhalación, los compuestos de la invención convenientemente se administran desde un insuflador, nebulizador o un paquete (*pack*) presurizado u otro medio conveniente para administrar una pulverización en aerosol. Los paquetes presurizados pueden comprender un propelente apropiado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse mediante la provisión de una válvula para administrar una cantidad medida.

Alternativamente, para la administración mediante inhalación o insuflación, la composición puede tomar la forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo de uno o más compuestos de la invención y una base en polvo apropiada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosificación unitaria en, por ejemplo, cápsulas o cartuchos, o, por ejemplo, gelatina o paquetes blíster de los que el polvo puede administrarse con la ayuda de un inhalador, insuflador o un inhalador de dosis medida.

Para la administración intranasal, los compuestos de la invención pueden administrarse mediante gotas nasales o una pulverización líquida, tales como mediante un atomizador de botella de plástico o inhalador de dosis medida. Las presurizaciones líquidas son administradas convenientemente desde paquetes presurizados. Los atomizadores típicos son Mistometer (Wintrop) y Medihaler (Riker).

Las gotas nasales pueden formularse con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Las gotas pueden administrarse mediante un frasco gotero ocular o mediante una botella plástica adaptada para administrar contenidos líquidos en forma de gotas a través de un cierre especialmente diseñado.

Las composiciones farmacéuticas de la invención apropiadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles farmacéuticamente aceptables que pueden reconstituirse en soluciones inyectables estériles o dispersiones justo antes del uso, las cuales pueden contener antioxidantes, tampones, solutos que hacen que la formulación sea isotónica en relación con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Además, se pueden utilizar *estents* recubiertos con fármaco.

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

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

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es deseable disminuir la velocidad de la absorción del fármaco a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tenga poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco entonces depende de su velocidad de disolución la cual, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de un fármaco administrado por vía parenteral se logra mediante la disolución o suspensión del fármaco en un vehículo aceitoso.

Las formas de depósito inyectables se realizan mediante la formación de matrices de microcápsula del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción del fármaco en relación con el polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación del fármaco puede controlarse. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poliortoésteres y polianhídridos. También se pueden preparar las formulaciones de depósito inyectable colocando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal. Se pueden esterilizar los materiales inyectables, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana.

Se pueden presentar las formulaciones en contenedores sellados de dosis unitarias o múltiples, por ejemplo, ampollas y ampolletas, y se pueden almacenar en una condición liofilizada que requiere únicamente la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo agua, para su inyección, inmediatamente antes del uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito en precedencia.

Para tratar una enfermedad o condición que involucre hiperpermeabilidad vascular o disfunción del citoesqueleto, se puede administrar sola una dicetopiperazina de fórmula I,

una prodroga de una dicetopiperazina de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas. Alternativamente, se puede administrar la dicetopiperazina, prodroga o sal en combinación entre ellas y/o en combinación con uno o más tratamientos o fármacos adicionales que sean apropiados para tratar la enfermedad o condición. Por ejemplo, la dicetopiperazina, prodroga o sal puede administrarse antes de, en conjunto con (inclusive de forma simultánea), o después del otro tratamiento o fármaco. En el caso de otro fármaco, dicho fármaco y la dicetopiperizina, prodroga o sal, puede administrarse en composiciones farmacéuticas separadas o como parte de la misma composición farmacéutica.

La invención también proporciona kits. Los kits comprenden un recipiente que contiene una dicetopiperazina de fórmula I, una prodroga de la misma o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas. Los kits pueden además comprender uno o más recipientes adicionales cada uno de ellos conteniendo uno o más fármacos adicionales apropiados para su utilización en los métodos de la invención. Los recipientes apropiados incluyen ampollas, botellas (incluyendo una botella con un gotero o una botella exprimible), paquetes de blíster, inhaladores, frascos, nebulizadores, paquetes (por ejemplo, hechos de papel aluminio, plástico, papel, celofán u otro material), jeringuillas y tubos. El kit también contendrá instrucciones para la administración de la dicetopiperazina, prodroga o sal y, opcionalmente, del uno o más fármacos apropiados para ser utilizados en los métodos de la presente invención. Las instrucciones pueden, por ejemplo, encontrarse impresas sobre el empaque del(los) recipiente(s), impresas en una etiqueta adjunta al kit o el(los) recipiente(s), o impresas en una hoja de papel separada que se incluye en o con el kit. El empaque del(los) recipiente(s) puede ser, por ejemplo, una caja, o el(los) recipiente(s) pueden estar envueltos en, por ejemplo, una envoltura plástica termoencogible. El kit puede también contener otros materiales que son conocidos en la técnica y que pueden ser atractivos desde un punto de vista de mercado y del usuario. Por ejemplo, el kit puede contener instrucciones para ayudar a que un paciente maneje su diabetes o hipertensión.

Como se utiliza aquí, “un” o “uno” significa uno o más.

Como se utiliza aquí, “comprende” y “que comprende” incluyen dentro de su ámbito todos los términos de menor alcance, tales como “que consiste esencialmente de” y “que consiste de” como modalidades alternativas de la presente invención aquí caracterizadas mediante “comprende” o “que comprende”. En relación con el uso de “que consiste esencialmente de”, esta frase limita el ámbito de una reivindicación a los pasos y materiales especificados y aquellos que no afectan sustancialmente las características básicas y novedosas de la invención aquí divulgada. Las características básicas y novedosas de la invención pueden ser la inhibición de la hiperpermeabilidad vascular, la modulación del citoesqueleto de una célula endotelial, o ambas, en un animal.

Otros objetos, ventajas y características novedosas de la presente invención serán apreciadas por aquellos expertos en la materia en consideración de los siguientes ejemplos no limitativos.

5 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Efecto de la DA-DKP en la ECIS

Se llevaron a cabo ensayos para determinar el efecto de la DA-DKP en la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de células endoteliales microvasculares glomerulares renales humanas (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo para Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Se midió la resistencia eléctrica utilizando el sistema para detectar la impedancia eléctrica de los sustratos de células (ECIS) (ECISZ0, obtenido de Applied Biophysics) con placas de electrodos múltiples de 8 pocillos (8W10E). Cada pocillo de las placas se recubrió con 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibronectina en HBSS
10 añadiendo la fibronectina en un volumen de 100 μl por pocillo e incubando las placas durante 30 minutos en una incubadora de 37 °C con 5% de CO₂. Se removió la solución de fibronectina, y se añadieron 400 μl de medio de cultivo EGM-2 (Lonza) a cada pocillo. Las placas se conectaron al sistema ECISZ0 y se estabilizaron eléctricamente. Se aspiró el medio EGM-2 y se lo reemplazó con 200 μl de medio de cultivo EGM-2 que contenía
15 100,000 células por pocillo. Las placas se reconectaron al sistema ECISZ0 y se incubaron durante 24 horas en una incubadora de 37 °C con 5% de CO₂. Se aspiró el medio EGM-2 y se lo reemplazó con 400 μl de medio de cultivo EGM-2 fresco por pocillo. Las placas se reconectaron al sistema ECISZ0 y se incubaron durante 6 horas en una incubadora de 37 °C con 5% de CO₂. Se prepararon soluciones de los compuestos de prueba en HBSS y se
20 colocaron en la incubadora para equilibrar. Entonces se añadieron los compuestos de prueba a los pocillos apropiados en las siguientes concentraciones finales: DA-DKP (100 μM) (Sigma) y TNF α (1 ng/ml) (Sigma). Se monitoreó la ECIS (resistencia) durante 90 horas.

En las células endoteliales glomerulares, 100 μM de DA-DKP sola mostró un
30 incremento de la ECIS en comparación con células sin tratar empezando alrededor de las 5.0 horas, alcanzando importancia a las 12 horas, y persistiendo durante 35 horas, luego del tratamiento. A pesar de no ser significativo, la DA-DKP demostró una capacidad para prevenir parte del descenso inducido por TNF α en la ECIS.

35 **Ejemplo 2: Efecto de la DA-DKP en la ECIS**

Se realizaron ensayos para determinar el efecto de la DA-DKP en la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo para Applied Cell Biology Research

Institute), Kirkland, WA). Se midió la resistencia eléctrica utilizando el sistema para detectar la impedancia eléctrica de los sustratos de células (ECIS) (ECISZ0, obtenido de Applied Biophysics) descrito en el Ejemplo 1, pero utilizando placas de electrodos múltiples de 96 pocillos (8W10E). Además, se utilizaron varias dosis de DA-DKP (0.5 μ M, 5.0 μ M, 50 μ M y 100 μ M). La DA-DKP produjo un incremento dependiente de la dosis en la ECIS (TER), donde 100 μ M produjeron el mayor incremento.

Ejemplo 3: Efecto de la DA-DKP en la Formación de Fibras de Tensión de Actina

Células endoteliales retinianas humanas de pase (*passage*) 12 (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo para Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) se sembraron en portaobjetos de 16 cámaras recubiertos con 5 μ g/cm² de fibronectina a 5000 células por pocillo en un volumen total de 200 μ l de medio EGM-2 (Lonza). Los portaobjetos se cultivaron en una incubadora de 37°C con 5% de CO₂ durante 48 horas con cambios diarios de medio. Entonces, se añadieron los compuestos de prueba (DA-DKP, S1P y TNF α), diluidos en solución salina balanceada de Hank (HBSS; Lonza), para obtener las siguientes concentraciones finales: DA-DKP (100 μ M) (Sigma), TNF α (1 ng/ml) (Sigma), y S1P (1 μ M) (Sigma). Los portaobjetos se incubaron con los compuestos de prueba durante 15 minutos o 3 horas en una incubadora de 37°C con 5% de CO₂. Luego de esta incubación se aspiró el medio, y se fijaron las células utilizando 3.6% de formaldehído en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante diez minutos a temperatura ambiente. Entonces se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 μ l de PBS. Las células se permeabilizaron utilizando 0.1% Triton X-100 en PBS durante 5 minutos. Entonces se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 μ l de PBS, y se añadieron 50 μ l de una dilución 1:40 de rodamina-faloidina (Invitrogen) en PBS a las células para coloración para actina F y se dejaron en las células durante 20 minutos a temperatura ambiente. Entonces se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 μ l de PBS. Entonces se añadieron 100 μ l de PBS a cada pocillo y se observaron y fotografiaron las células utilizando un microscopio invertido utilizando un filtro de rodamina (ex530/em590).

Las células endoteliales retinianas tratadas con la DA-DKP sola mostraron coloración para actina F difusa en la membrana a los 15 minutos y a las 3 horas. Con el TNF α solo, las fibras de tensión se vieron a todo momento, incrementándose el número de células que presentaban fibras de tensión y el grosor de las fibras desde los 15 minutos a las 3 horas. La DA-DKP redujo la formación de fibras de tensión y/o el grosor de las fibras causados por TNF α en las dos ocasiones. Las células tratadas con S1P sola mostraron anillos corticales de actina, a los 15 minutos y las 3 horas. La DA-DKP pareció potenciar los anillos corticales a los 15 minutos y las 3 horas.

La S1P (esfingosina-1-fosfato) desempeña una función muy importante en la formación y mantenimiento del endotelio vascular. La S1P es un señalizador que facilita la

WA

organización y función de barrera del endotelio vascular a través de sus efectos sobre el citoesqueleto de actina. En especial, la S1P se encuentra involucrada en la formación de fibras corticales de actina y la organización de las uniones adherentes. El agotamiento de la S1P conduce a la filtración vascular y al edema, y la S1P puede revertir la disfunción endotelial y restaurar la función de barrera.

En este experimento, la DA-DKP demostró una capacidad para fortalecer los efectos protectores de la S1P en células endoteliales retinianas. La DA-DKP también revirtió la formación de fibras de tensión inducida por $\text{TNF}\alpha$. En las células tratadas con DA-DKP sola, se observa coloración perinuclear difusa.

Ejemplo 4: Efecto de la DA-DKP en la RhoA

El remodelamiento del citoesqueleto celular endotelial es primordial para muchas funciones del endotelio. Se ha identificado a la familia Rho de pequeñas proteínas de unión a GTP como reguladores clave de la dinámica del citoesqueleto de actina F. La familia Rho consiste de tres isoformas, RhoA, RhoB y RhoC. La activación de la actividad de RhoA trae consigo la formación prominente de fibras de tensión en las células endoteliales. La estimulación de las células endoteliales con trombina incrementa Rho GTP y la fosforilación de miosina, lo que es consistente con un incremento de contractilidad celular. La inhibición de RhoA bloquea esta respuesta y la pérdida de la función de barrera, demostrando un papel crítico para la Rho en la permeabilidad vascular.

El experimento se llevó a cabo utilizando un ensayo de activación de Rho (GLISA) disponible en el mercado y adquirido de Cytoskeleton, Denver, Colorado, siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, células endoteliales retinianas humanas de pase 8 y 12 (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) se cultivaron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertas con fibronectina ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) utilizando medio de cultivo EGM-2 (Lonza) durante 24 horas en una incubadora de 37°C con 5% de CO_2 (30,000 células/pocillo en volumen total de 3 ml). Entonces, se aspiró el medio de cultivo y se lo reemplazó con medio Ultraculture suplementado con 0.1% de suero fetal bovino, L-glutamina, piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina e ITSS (insulina, transferrina sodio selenio) (todos de Lonza) para privar a las células de suero y reducir el nivel de fondo de RhoA. Se cultivaron las células durante 24 horas en una incubadora de 37°C con 5% de CO_2 . Los compuestos de prueba diluidos en HBSS se colocaron en la incubadora para equilibrar antes de la adición a las células. Entonces, se añadieron 150 μl de cada compuesto de prueba a los pocillos de cultivo apropiados, y las placas se incubaron en la incubadora durante 15 minutos adicionales. Entonces, se añadió trombina a los pocillos apropiados. Luego de 1 minuto, se lavaron las células una vez con 1.5 ml de solución tamponada con fosfato y entonces se lisaron (rompieron) con 100 μl de tampón de lisis GLISA suplementado con inhibidores de la proteasa. Los extractos se fragmentaron, se

transfirieron a tubos para microcentrífuga y se transfirieron a hielo para conservar la forma activa de la RhoA. Entonces, todos los extractos se libraron de desechos girando a 10,000 rpms durante 2 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos y se colocaron nuevamente en hielo. Se removieron alícuotas de cada extracto para el ensayo GLISA y para determinaciones de proteínas. Todas las concentraciones proteicas estaban dentro del 10%, y se utilizaron los extractos a las concentraciones alcanzadas (igual a 15 µg de proteína total por pocillo). El ensayo GLISA fue realizado utilizando los reactivos proporcionados en el kit.

Los resultados para las células endoteliales retinianas de pase 12 se presentan en la Tabla 1 a continuación. Según se esperaba, los niveles de RhoA activa inducida por trombina fueron bastante altos. Todos los compuestos de prueba inhibieron la activación de RhoA inducida por trombina.

Los resultados para las células endoteliales retinianas de pase 8 se presentan en la Tabla 2 a continuación. Según se esperaba, los niveles de RhoA activa inducida por trombina fueron bastante altos. Todos los compuestos de prueba inhibieron la activación de RhoA inducida por trombina.

TABLA 1

Tratamiento	OD Media	Inhibición porcentual vs. Control sin Tratar	Inhibición porcentual vs. Trombina
Sin tratar	0.455	---	---
100 µM DA-DKP	0.389	14.52	---
1.0 µM Dexametasona	0.428	5.83	---
10.0 µM PI3 inhibidor de cinasa LY 294002	0.370	18.70	---
1.0 µM Src-1 Inhibidor*	0.349	23.21	---
0.1 U/ml Trombina	1.013	---	---
0.1 U/ml Trombina + 100 µM DA-DKP	0.752	---	46.82
0.1 U/ml Trombina + 1.0 µM Dexametasona	0.826	---	33.48
0.1 U/ml Trombina + 10.0 µM PI3 inhibidor de cinasa LY294002	0.685	---	58.73
0.1 U/ml Trombina + 1.0 µM Src-1 Inhibidor	0.534	---	85.85

* Adquirido de Sigma.

TABLA 2

Tratamiento	OD Media	Inhibición porcentual vs. Control sin Tratar	Inhibición porcentual vs. Trombina
Sin tratar	0.102	---	---
100 µM DA-DKP	0.110	-7.88	---
10.0 µM PI3 inhibidor de cinasa LY 294002	0.056	45.32	---
0.1 U/ml Trombina	0.561	---	---
0.1 U/ml Trombina + 100 µM DA-DKP	0.377	---	40.04
0.1 U/ml Trombina + 10.0 µM PI3 inhibidor de cinasa LY294002	0.433	---	27.86

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

Se llevaron a cabo ensayos para determinar el efecto de la MR-DKP (una dicetopiperazina en donde R¹ en la fórmula I es la cadena lateral de metionina y R² es la cadena lateral de arginina) en la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de células endoteliales retinianas humanas de pase 6 (Applied Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo para Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Se midió la resistencia eléctrica utilizando el sistema para detectar la impedancia eléctrica de los sustratos de células (ECIS) (ECISZ0, obtenido de Applied Biophysics) con placas de electrodos múltiples de 8 pocillos (8W10E). Cada uno de los pocillos de las placas se estabilizó añadiendo 250 µl de 10 mM de cisteína (Sigma) en agua estéril a cada pocillo e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se lavaron los pocillos dos veces con 150 µl de agua estéril para remover la cisteína. Entonces se recubrieron todos los pocillos con 10 µg/cm² de colágeno diluyendo la solución stock (0.5 mg/ml colagenina Tipo IV 0.25% ácido acético (Sigma)) en agua estéril y añadiendo 150 µl de la solución obtenida a cada pocillo. Se incubó la solución de colágeno en las placas a 37°C durante 120 minutos y entonces se removió. Se lavaron los pocillos dos veces con 400 µl de agua estéril para remover el colágeno. A continuación, se añadieron 400 µl de medio de cultivo EGM-2 (Lonza) a cada pocillo. Se conectaron las placas al sistema ECISZ0 y se estabilizaron eléctricamente. Se aspiró el medio EGM-2 se reemplazó con 400 µl de medio de cultivo EGM-2 que contenía 100,000 células por pocillo. Se reconectaron las placas al sistema ECISZ0 y se incubó durante 24 horas en una incubadora de 37°C con 5% de CO₂. Se aspiró el medio EGM-2 y se reemplazó con 400 µl de medio de cultivo EGM-2. Se reconectaron

las placas al sistema ECISZ0 y se incubó durante 2 horas en una incubadora de 37°C con 5% de CO₂. Se prepararon soluciones de los compuestos de prueba en HBSS y se colocaron en la incubadora para equilibrar. Entonces se añadió el compuesto de prueba a los pocillos apropiados a las siguientes concentraciones finales: MR-DKP (50µM y 100 µM). Se observó la ECIS (resistencia) durante 50 horas.

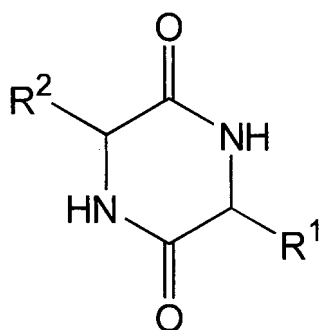
En las células endoteliales retinianas, tanto la MR-DKP a 50 µM como a 100 µM mostraron un incremento en la ECIS en comparación con células sin tratar empezando a alrededor de las 15 horas, volviéndose importante a alrededor de las 18 horas. El incremento fue de alrededor de 20% en su punto máximo. Para el grupo 100 µM, el incremento persistió durante el resto del experimento, alcanzando importancia nuevamente a alrededor de las 33 horas. Para el grupo 50 µM, a alrededor de las 28-29 horas, la resistencia volvió a los niveles del control, pero se incrementó nuevamente empezando a alrededor de las 30 horas, alcanzando importancia a alrededor de las 33 horas, y el incremento persistió durante el resto del experimento. Además, el grupo 50 µM mostró una breve elevación en la resistencia desde las 2-5 horas.

Ejemplo 6: Efecto de la YE-DKP en la ECIS

Se repitió el Ejemplo 5, excepto que la dicetopiperazina utilizada fue YE-DKP (una dicetopiperazina en donde R¹ en la fórmula I es la cadena lateral de ácido glutámico y R² es la cadena lateral de tirosina). En las células endoteliales retinianas, 50 µM de YE-DKP no mostró un incremento importante en la ECIS, pero 100 µM de YE-DKP mostró un incremento en la ECIS en comparación con células sin tratar empezando a alrededor de 6 horas, volviéndose importante a alrededor de 12 horas. El incremento fue de alrededor de 20% en su punto máximo. A alrededor de las 28 horas, la resistencia volvió a los niveles del control, pero se incrementó nuevamente empezando a alrededor de las 29 horas, alcanzando importancia a alrededor de las 33 horas, y el incremento persistió durante el resto del experimento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para inhibir la hiperpermeabilidad vascular en un animal que se encuentra en necesidad de ello, que comprende administrar al animal una cantidad efectiva de un ingrediente activo, en donde el ingrediente activo comprende una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la siguiente fórmula:



I

en donde:

R¹ y R², que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es:

- (a) una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina;
- (b) R¹ es -CH₂-CH₂-CH₂- o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina y/o R² es -CH₂-CH₂-CH₂- o -CH₂-CH(OH)-CH₂- y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina; o
- (c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es uno de los mencionados en (a), y la cadena lateral derivada tiene:
- (i) un grupo -NH₂ reemplazado con un grupo -NHR³ o -N(R³)₂, en donde cada R³ puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo,

heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(ii) un grupo -OH reemplazado con un grupo -O-PO₃H₂ o -OR³, en donde cada R³ puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iii) un grupo -COOH reemplazado con un grupo -COOR³, en donde cada R³ puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iv) un grupo -COOH reemplazado con un grupo -CON(R⁴)₂, en donde cada R⁴ puede independientemente ser H o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(v) un grupo -SH reemplazado con -S-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH o -S-S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH;

(vi) un grupo -CH₂- reemplazado con un grupo -CH(NH₂)- o -CH(OH)-;

(vii) un grupo -CH₃ reemplazado con un grupo -CH₂-NH₂ o -CH₂-OH; y/o

(viii) un H el cual está unido a un átomo de carbono reemplazado con un halógeno.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el animal se encuentra en necesidad de la dicetopiperazina, prodroga o sal debido a la presencia de una enfermedad o condición mediada por hiperpermeabilidad vascular.

3. El método de la reivindicación 2, en donde la administración de la dicetopiperazina, prodroga o sal comienza inmediatamente luego del diagnóstico de la enfermedad o condición.

4. El método de la reivindicación 2, en donde la enfermedad o condición es una complicación vascular de la diabetes.

5. El método de la reivindicación 4, en donde la complicación vascular es edema, acumulación de lipoproteínas en el espacio subendotelial, aterosclerosis acelerada, envejecimiento acelerado de las paredes vasculares en el cerebro, edema del miocardio, fibrosis del miocardio, disfunción diastólica, cardiomiopatía diabética,

retardo del desarrollo pulmonar en fetos de madres diabéticas, alteraciones de uno o más parámetros fisiológicos pulmonares, incremento de susceptibilidad a infecciones, hiperplasia vascular en el mesenterio, neuropatía diabética, edema macular diabético, nefropatía diabética, retinopatía diabética, o enrojecimiento, decoloración, resequedad y ulceraciones de la piel.

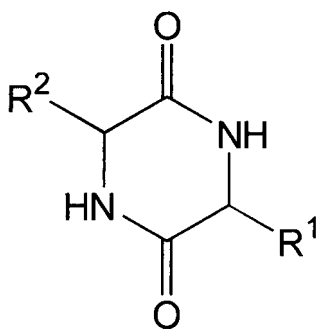
6. El método de la reivindicación 5, en donde la complicación vascular es edema.
7. El método de la reivindicación 5, en donde la complicación vascular es cardiomiopatía diabética.
8. El método de la reivindicación 5, en donde la complicación vascular es neuropatía diabética.
9. El método de la reivindicación 5, en donde la complicación vascular es edema macular diabético.
10. El método de la reivindicación 5, en donde la complicación vascular es retinopatía diabética.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la retinopatía diabética es retinopatía diabética no proliferativa.
12. El método de la reivindicación 5, en donde la complicación vascular es nefropatía diabética.
13. El método de la reivindicación 2, en donde la enfermedad o condición es lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, degeneración macular relacionada con la edad, aterosclerosis, edema coroideo, coroiditis, enfermedad microvascular coronaria, enfermedad microvascular cerebral, diabetes, enfermedad de Eales, edema producido por lesión, edema asociado con hipertensión, derrame vascular glomerular, shock hemorrágico, hipertensión, Síndrome de Irvine-Gass, isquemia, edema macular, nefritis, nefropatías, edema nefrótico, síndrome nefrótico, neuropatía, falla de órgano debida a edema, preeclampsia, edema pulmonar, hipertensión pulmonar, insuficiencia renal, edema retinal, hemorragia retinal, oclusiones venosas retinales, retinitis, retinopatía, infarto cerebral silencioso, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, glomerulopatía de transplante, uveítis,

síndrome de derrame vascular, hemorragia vítrea y enfermedad de Von Hippel Lindau

- 5 14. El método de la reivindicación 13, en donde la enfermedad o condición es edema macular.
15. El método de la reivindicación 13, en donde la enfermedad o condición es neuropatía.
- 10 16. El método de la reivindicación 13, en donde la enfermedad o condición es retinopatía.
- 15 17. El método de la reivindicación 1, en donde el animal se encuentra en necesidad de la dicetopiperazina, prodroga o sal debido a uno o más signos tempranos de una enfermedad o condición mediada por hiperpermeabilidad vascular o una predisposición a desarrollarla.
- 20 18. El método de la reivindicación 17, en donde la enfermedad o condición es diabetes, hipertensión o aterosclerosis.
- 25 19. El método de la reivindicación 1, en donde la hiperpermeabilidad vascular es hiperpermeabilidad vascular de un endotelio continuo que se encuentra en, o alrededor de, un cerebro, diafragma, musculatura duodenal, grasa, corazón, riñón, grandes vasos sanguíneos, pulmón, mesenterio, nervio, retina, músculo esquelético, piel o testículo.
- 30 20. El método de la reivindicación 19, en donde el endotelio continuo se encuentra en, o alrededor de, un cerebro, corazón, pulmón, nervio o retina.
- 35 21. El método de la reivindicación 1, en donde la hiperpermeabilidad vascular es hiperpermeabilidad vascular de un endotelio fenestrado que se encuentra en, o alrededor de, un riñón, páncreas, glándula adrenal, glándula endócrina o intestino.
22. El método de la reivindicación 21, en donde el endotelio fenestrado se encuentra en un riñón.
23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde R^1 , R^2 o ambos son la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico o un derivado de dicha cadena

lateral en donde el grupo -COOH está reemplazado con un grupo -COOR³ o un grupo -CON(R⁴)₂, en donde R³ y R⁴ son como se definió en la reivindicación 1.

24. El método de la reivindicación 23, en donde R¹ es la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico, y R² es la cadena lateral de alanina o tirosina.
25. El método de la reivindicación 24, en donde R¹ es la cadena lateral de ácido aspártico y R² es la cadena lateral de alanina.
26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde R¹, R² o ambos son la cadena lateral de metionina o arginina.
27. El método de la reivindicación 26, en donde R¹ es la cadena lateral de metionina y R² es la cadena lateral de arginina.
28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en donde la dicetopiperazina, prodroga o sal se administra oralmente.
29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en donde el animal es un ser humano.
30. Un método para modular un citoesqueleto de una célula endotelial en un animal que comprende administrar al animal una cantidad efectiva de un ingrediente activo, en donde el ingrediente activo comprende una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula:



I

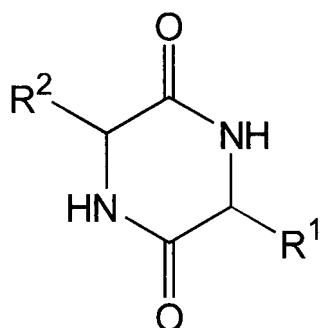
en donde:

R¹ y R², que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es:

- 5 (a) una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina;
- 10 (b) R^1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina y/o R^2 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina; o
- 15 (c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es uno de los mencionados en (a), y la cadena lateral derivada tiene:
- (i) un grupo $-\text{NH}_2$ reemplazado con un grupo $-\text{NHR}^3$ o $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- 20 (ii) un grupo $-\text{OH}$ reemplazado con un grupo $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ o $-\text{OR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- 25 (iii) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{COOR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- 30 (iv) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$, en donde cada R^4 puede independientemente ser H o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- (v) un grupo $-\text{SH}$ reemplazado con $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ o $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$;
- 35 (vi) un grupo $-\text{CH}_2-$ reemplazado con un grupo $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ o $-\text{CH}(\text{OH})-$;
- (vii) un grupo $-\text{CH}_3$ reemplazado con un grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ o $-\text{CH}_2-\text{OH}$; y/o

(viii) un H el cual está unido a un átomo de carbono reemplazado con un halógeno.

- 5 31. El método de la reivindicación 30, en donde la modulación del citoesqueleto incluye la inhibición de la formación de fibras de tensión de actina.
32. El método de la reivindicación 30, en donde la modulación del citoesqueleto incluye ocasionar, incrementar o prolongar la formación de anillos corticales de actina.
- 10 33. El método de la reivindicación 30, en donde la modulación del citoesqueleto incluye la inhibición de RhoA.
- 15 34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 30-33, en donde R^1 , R^2 o ambos son la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico o un derivado de dicha cadena lateral en donde el grupo $-COOH$ está reemplazado con un grupo $-COOR^3$ o un grupo $-CON(R^4)_2$, en donde R^3 y R^4 son como se definió en la reivindicación 30.
- 20 35. El método de la reivindicación 34, en donde R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico, y R^2 es la cadena lateral de alanina o tirosina.
36. El método de la reivindicación 35, en donde R^1 es la cadena lateral de ácido aspártico y R^2 es la cadena lateral de alanina.
- 25 37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 30-33, en donde R^1 , R^2 o ambos son la cadena lateral de metionina o arginina.
38. El método de la reivindicación 37, en donde R^1 es la cadena lateral de metionina y R^2 es la cadena lateral de arginina.
- 30 39. Un kit que comprende:
- (a) un recipiente que contiene una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas; y,
- 35 (b) instrucciones para la administración de la dicetopiperazina, la prodroga o la sal farmacéuticamente aceptable para llevar a cabo un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula:



I

en donde:

5

R^1 y R^2 , que pueden ser iguales o diferentes, cada uno es:

10

(a) una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es glicina, alanina, valina, norvalina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminobutírico, leucina, isoleucina, norleucina, serina, homoserina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, homoarginina, citrulina, fenilalanina, *p*-aminofenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina, cisteína, homocisteína, metionina, penicilamina u ornitina;

15

(b) R^1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina y/o R^2 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ y junto con el nitrógeno adyacente del anillo forma prolina o hidroxiprolina; o

20

(c) un derivado de una cadena lateral de un aminoácido, en donde el aminoácido es uno de los mencionados en (a), y la cadena lateral derivada tiene:

25

(i) un grupo $-\text{NH}_2$ reemplazado con un grupo $-\text{NHR}^3$ o $-\text{N}(\text{R}^3)_2$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

30

(ii) un grupo $-\text{OH}$ reemplazado con un grupo $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ o $-\text{OR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

(iii) un grupo $-\text{COOH}$ reemplazado con un grupo $-\text{COOR}^3$, en donde cada R^3 puede independientemente ser un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

- (iv) un grupo -COOH reemplazado con un grupo -CON(R⁴)₂, en donde cada R⁴ puede independientemente ser H o un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- 5 (v) un grupo -SH reemplazado con -S-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH o -S-S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH;
- (vi) un grupo -CH₂- reemplazado con un grupo -CH(NH₂)- o -CH(OH)-;
- 10 (vii) un grupo -CH₃ reemplazado con un grupo -CH₂-NH₂ o -CH₂-OH; y/o
- (viii) un H el cual está unido a un átomo de carbono reemplazado con un halógeno.
40. El kit de la reivindicación 39, en donde R¹, R² o ambos son la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico o un derivado de dicha cadena lateral en donde el
- 15 grupo -COOH está reemplazado con un grupo -COOR³ o un grupo -CON(R⁴)₂, en donde R³ y R⁴ son como se definió en la reivindicación 39.
41. El kit de la reivindicación 40, en donde R¹ es la cadena lateral de ácido aspártico o ácido glutámico, y R² es la cadena lateral de alanina o tirosina.
- 20 42. El kit de la reivindicación 41, en donde R¹ es la cadena lateral de ácido aspártico y R² es la cadena lateral de alanina.
- 25 43. El kit de la reivindicación 39, en donde R¹, R² o ambos son la cadena lateral de metionina o arginina.
44. El kit de la reivindicación 43, en donde R¹ es la cadena lateral de metionina y R² es la cadena lateral de arginina.
- 30

RESUMEN

5 La invención proporciona un método para inhibir la hiperpermeabilidad vascular en un animal que se encuentre en necesidad de ello. El método comprende administrar al animal una cantidad efectiva de una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula detallada en la descripción.

10 La invención también proporciona un método para modular el citoesqueleto de una célula endotelial en un animal. El método comprende administrar al animal una cantidad efectiva de una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula detallada en la descripción.

15 La invención además proporciona un kit. El kit comprende una dicetopiperazina, una prodroga de una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellas, en donde la dicetopiperazina tiene la fórmula detallada en la descripción.

TREATMENT OF DISEASES

FIELD OF THE INVENTION

5 The invention relates to a method and kit for inhibiting vascular hyperpermeability and the edema and other adverse effects that result from it. The invention also relates to a method and kit for modulating the cytoskeleton of endothelial cells. Both methods comprise administering to an animal a diketopiperazine (DKP) of formula I below, a prodrug of such a DKP or a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them.

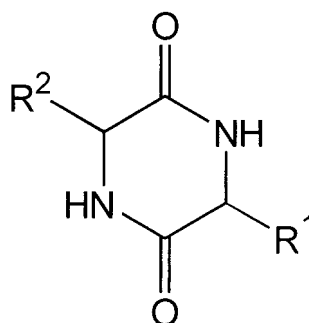
BACKGROUND

10 The vascular endothelium lines the inside of all blood vessels. It acts as the interface between the blood and the tissues and organs. The endothelium forms a semi-permeable barrier that maintains the integrity of the blood fluid compartment, but permits passage of water, ions, small molecules, macromolecules and cells in a regulated manner.

15 Dysregulation of this process produces vascular leakage into underlying tissues. Leakage of fluid into tissues causing edema can have serious and life threatening consequences in a variety of diseases. Accordingly, it would be highly desirable to have a method for reducing edema, preferably at its earliest stage, and restoring the endothelial barrier to physiological.

SUMMARY OF THE INVENTION

20 The invention provides such a method. In particular, the invention provides a method of inhibiting vascular hyperpermeability and the edema and other adverse effects that result from it. The method comprises administering to an animal in need thereof an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of
25 either one of them, wherein the diketopiperazine has the formula:



I

wherein:

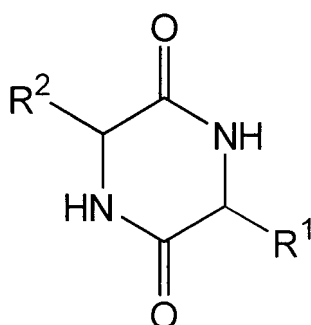
R^1 and R^2 , which may be the same or different, each is:

- (a) a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is glycine, alanine, valine, norvaline, α -aminoisobutyric acid, 2,4-diaminobutyric acid, 2,3-diaminobutyric acid, leucine, isoleucine, norleucine, serine, homoserine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, homoarginine, citrulline, phenylalanine, *p*-aminophenylalanine, tyrosine, tryptophan, thyroxine, cysteine, homocysteine, methionine, penicillamine or ornithine;
- (b) R^1 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline and/or R^2 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline; or
- (c) a derivative of a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is one of those recited in (a), and the derivatized side chain has:
 - (i) an $-\text{NH}_2$ group replaced by an $-\text{NHR}^3$ or $-\text{N}(\text{R}^3)_2$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (ii) an $-\text{OH}$ group replaced by an $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ or $-\text{OR}^3$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (iii) a $-\text{COOH}$ group replaced by a $-\text{COOR}^3$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (iv) a $-\text{COOH}$ group replaced by a $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$ group, wherein each R^4 may independently be H or a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (v) an $-\text{SH}$ group replaced by $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ or $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$;
 - (vi) a $-\text{CH}_2-$ group replaced by a $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ or a $-\text{CH}(\text{OH})-$ group;
 - (vii) a $-\text{CH}_3$ group replaced by a $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ or a $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group; and/or
 - (viii) an H which is attached to a carbon atom replaced by a halogen.

Inhibition of vascular hyperpermeability according to the invention includes inhibition of paracellular-caused hyperpermeability and transcytosis-caused

hyperpermeability. Recent evidence indicates that transcytosis-caused hyperpermeability is the first step of a process that ultimately leads to tissue and organ damage in many diseases and conditions. Accordingly, the present invention provides a means of early intervention in these diseases and conditions which can reduce, delay or even potentially prevent the tissue and organ damage seen in them.

The invention also provides a method of modulating the cytoskeleton of endothelial cells in an animal. The method comprises administering an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them, to the animal, wherein the diketopiperazine has the formula:



I

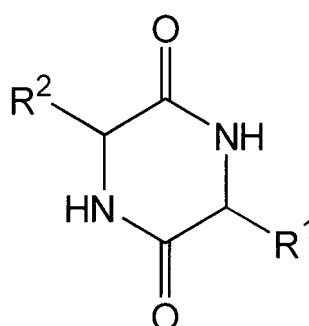
wherein:

R^1 and R^2 , which may be the same or different, each is:

- (a) a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is glycine, alanine, valine, norvaline, α -aminoisobutyric acid, 2,4-diaminobutyric acid, 2,3-diaminobutyric acid, leucine, isoleucine, norleucine, serine, homoserine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, homoarginine, citrulline, phenylalanine, *p*-aminophenylalanine, tyrosine, tryptophan, thyroxine, cysteine, homocysteine, methionine, penicillamine or ornithine;
- (b) R^1 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline and/or R^2 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline; or
- (c) a derivative of a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is one of those recited in (a), and the derivatized side chain has:

- (i) an -NH_2 group replaced by an -NHR^3 or $\text{-N(R}^3)_2$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (ii) an -OH group replaced by an $\text{-O-PO}_3\text{H}_2$ or -OR^3 group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (iii) a -COOH group replaced by a -COOR^3 group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (iv) a -COOH group replaced by a $\text{-CON(R}^4)_2$ group, wherein each R^4 may independently be H or a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (v) an -SH group replaced by $\text{-S-S-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ or $\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$;
- (vi) a $\text{-CH}_2\text{-}$ group replaced by a $\text{-CH(NH}_2\text{)-}$ or a -CH(OH)- group;
- (vii) a -CH_3 group replaced by a $\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ or a $\text{-CH}_2\text{-OH}$ group; and/or
- (viii) an H which is attached to a carbon atom replaced by a halogen.

The invention further provides a kit. The kit comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them to the animal, wherein the diketopiperazine has the formula:



I

wherein:

R^1 and R^2 , which may be the same or different, each is:

- (a) a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is glycine, alanine, valine, norvaline, α -aminoisobutyric acid, 2,4-diaminobutyric acid, 2,3-diaminobutyric acid, leucine, isoleucine, norleucine, serine, homoserine,

threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, homoarginine, citrulline, phenylalanine, *p*-aminophenylalanine, tyrosine, tryptophan, thyroxine, cysteine, homocysteine, methionine, penicillamine or ornithine;

- 5 (b) R^1 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline and/or R^2 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline; or
- (c) a derivative of a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is one of those recited in (a), and the derivatized side chain has:
- 10 (i) an $-\text{NH}_2$ group replaced by an $-\text{NHR}^3$ or $-\text{N}(\text{R}^3)_2$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (ii) an $-\text{OH}$ group replaced by an $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ or $-\text{OR}^3$ group, wherein each
- 15 R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (iii) a $-\text{COOH}$ group replaced by a $-\text{COOR}^3$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- 20 (iv) a $-\text{COOH}$ group replaced by a $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$ group, wherein each R^4 may independently be H or a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (v) an $-\text{SH}$ group replaced by $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ or $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$;
- 25 (vi) a $-\text{CH}_2-$ group replaced by a $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ or a $-\text{CH}(\text{OH})-$ group;
- (vii) a $-\text{CH}_3$ group replaced by a $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ or a $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group; and/or
- (viii) an H which is attached to a carbon atom replaced by a halogen.

"Vascular hyperpermeability" is used herein to mean permeability of a vascular endothelium that is increased as compared to basal levels. "Vascular hyperpermeability,"

30 as used herein, includes paracellular-caused hyperpermeability and transcytosis-caused hyperpermeability.

"Paracellular-caused hyperpermeability" is used herein to mean vascular hyperpermeability caused by paracellular transport that is increased as compared to basal levels. Other features of "paracellular-caused hyperpermeability" are described below.

"Paracellular transport" is used herein to mean the movement of ions, molecules and fluids through the interendothelial junctions (IEJs) between the endothelial cells of an endothelium.

5 "Transcytosis-caused hyperpermeability" is used herein to mean vascular hyperpermeability caused by transcytosis that is increased as compared to basal levels.

"Transcytosis" is used herein to mean the active transport of macromolecules and accompanying fluid-phase plasma constituents across the endothelial cells of the endothelium. Other features of "transcytosis" are described below.

10 "Basal level" is used herein to refer to the level found in a normal tissue or organ. "Inhibiting, "inhibit" and similar terms are used herein to mean to reduce, delay or prevent.

An animal is "in need of" treatment according to the invention if the animal presently has a disease or condition mediated by vascular hyperpermeability, exhibits early signs of such a disease or condition, or has a predisposition to develop such a disease or condition.

"Mediated" and similar terms are used here to mean caused by, causing, involving or exacerbated by, vascular hyperpermeability.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PRESENTLY- PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

20 The endothelium is a key gatekeeper controlling the exchange of molecules from the blood to the tissue parenchyma. It largely controls the permeability of a particular vascular bed to blood-borne molecules. The permeability and selectivity of the endothelial cell barrier is strongly dependent on the structure and type of endothelium lining the microvasculature in different vascular beds. Endothelial cells lining the microvascular
25 beds of different organs exhibit structural differentiation that can be grouped into three primary morphologic categories: sinusoidal, fenestrated and continuous.

Sinusoidal endothelium (also referred to as "discontinuous endothelium") has large intercellular and intracellular gaps and no basement membrane, allowing for minimally restricted transport of molecules from the capillary lumen into the tissue and vice versa.
30 Sinusoidal endothelium is found in liver, spleen and bone marrow.

Fenestrated endothelia are characterized by the presence of a large number of circular transcellular openings called fenestrae with a diameter of 60 to 80 nm. Fenestrated endothelia are found in tissues and organs that require rapid exchange of small molecules, including kidney (glomeruli, peritubular capillaries and ascending vasa recta),

pancreas, adrenal glands, endocrine glands and intestine. The fenestrae are covered by thin diaphragms, except for those in mature, healthy glomeruli. See Ichimura et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **19**:1463-1471 (2008).

Continuous endothelia do not contain fenestrae or large gaps. Instead, continuous
 5 endothelia are characterized by an uninterrupted endothelial cell monolayer. Most
 endothelia in the body are continuous endothelia, and continuous endothelium is found in,
 or around, the brain (blood brain barrier), diaphragm, duodenal musculature, fat, heart,
 some areas of the kidneys (papillary microvasculature, descending vasa recta), large blood
 vessels, lungs, mesentery, nerves, retina (blood retinal barrier), skeletal muscle, testis and
 10 other tissues and organs of the body.

Endothelial transport in continuous endothelium can be thought of in a general
 sense as occurring by paracellular and transcellular pathways. The paracellular pathway is
 the pathway between endothelial cells, through the interendothelial junctions (IEJs). In
 unperturbed continuous endothelium, water, ions and small molecules are transported
 15 paracellularly by diffusion and convection. A significant amount of water (up to 40%)
 also crosses the endothelial cell barrier transcellularly through water-transporting
 membrane channels called aquaporins. A variety of stimuli can disrupt the organization of
 the IEJs, thereby opening gaps in the endothelial barrier. The formation of these
 intercellular gaps allows passage of fluid, ions, macromolecules (*e.g.*, proteins) and other
 20 plasma constituents between the endothelial cells in an unrestricted manner. This
 paracellular-caused hyperpermeability produces edema and other adverse effects that can
 eventually result in damage to tissues and organs.

The transcellular pathway is responsible for the active transport of
 macromolecules, such as albumin and other plasma proteins, across the endothelial cells, a
 25 process referred to as "transcytosis." The transport of macromolecules occurs in vesicles
 called caveolae. Almost all continuous endothelia have abundant caveolae, except for
 continuous endothelia located in brain and testes which have few caveolae. Transcytosis
 is a multi-step process that involves successive caveolae budding and fission from the
 plasmalemma and translocation across the cell, followed by docking and fusion with the
 30 opposite plasmalemma, where the caveolae release their contents by exocytosis into the
 interstitium. Transcytosis is selective and tightly regulated under normal physiological
 conditions.

There is a growing realization of the fundamental importance of the transcellular
 pathway. Transcytosis of plasma proteins, especially albumin which represents 65% of

plasma protein, is of particular interest because of its ability to regulate the transvascular oncotic pressure gradient. As can be appreciated, then, increased transcytosis of albumin and other plasma proteins above basal levels will increase the tissue protein concentration of them which, in turn, will cause water to move across the endothelial barrier, thereby
 5 producing edema.

Low density lipoproteins (LDL) are also transported across endothelial cells by transcytosis. In hyperlipidemia, a significant increase in transcytosis of LDL has been detected as the initial event in atherogenesis. The LDL accumulates in the subendothelial space, trapped within the expanded basal lamina and extracellular matrix. The
 10 subendothelial lipoprotein accumulation in hyperlipidemia is followed by a cascade of events resulting in atheromatous plaque formation. Advanced atherosclerotic lesions are reported to be occasionally accompanied by the opening of IEJs and massive uncontrolled passage of LDL and albumin.

Vascular complications are a hallmark of diabetes. At the level of large vessels,
 15 the disease appears to be expressed as an acceleration of an atherosclerotic process. With respect to microangiopathy, alterations in the microvasculature of the retina, renal glomerulus and nerves cause the greatest number of clinical complications, but a continuously increasing number of investigations show that diabetes also affects the microvasculature of other organs, such as the mesentery, skin, skeletal muscle, heart, brain
 20 and lung, causing additional clinical complications. In all of these vascular beds, changes in vascular permeability appear to represent a hallmark of the diabetic endothelial dysfunction.

In continuous endothelium, capillary hyperpermeability to plasma macromolecules in the early phase of diabetes is explained by an intensification of transendothelial
 25 vesicular transport (*i.e.*, by increased transcytosis) and not by the destabilization of the IEJs. In addition, the endothelial cells of diabetics, including those of the brain, have been reported to contain an increased number of caveolae as compared to normals, and glycated proteins, particularly glycated albumin, are taken up by endothelial cells and transcytosed at substantially greater rates than their native forms. Further, increased transcytosis of
 30 macromolecules is a process that continues beyond the early phase of diabetes and appears to be a cause of edema in diabetic tissues and organs throughout the disease if left untreated. This edema, in turn, leads to tissue and organ damage. Similar increases in transcellular transport of macromolecules have been reported in hypertension.

Paracellular-caused hyperpermeability is also a factor in diabetes and the vascular complications of diabetes. The IEJs of the paracellular pathway include the adherens junctions (AJs) and tight junctions (TJs). Diabetes alters the content, phosphorylation and localization of certain proteins in both the AJs and TJs, thereby contributing to increased endothelial barrier permeability.

In support of the foregoing discussion and for further information, see Frank et al., *Cell Tissue Res.*, **335**:41-47 (2009), Simionescu et al., *Cell Tissue Res.*, **335**:27-40 (2009); van den Berg et al., *J. Cyst. Fibros.*, **7(6)**: 515-519 (2008); Viazzi et al., *Hypertens. Res.*, **31**:873-879 (2008); Antonetti et al., Chapter 14, pages 340-342, in *Diabetic Retinopathy* (edited by Elia J. Duh, Humana Press, 2008), Felinski et al., *Current Eye Research*, **30**:949-957 (2005), Pascariu et al., *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **52(1)**:65-76 (2004); Bouchard et al., *Diabetologia*, **45**:1017-1025 (2002); Arshi et al., *Laboratory Investigation*, **80(8)**:1171-1184 (2000); Viores et al., *Documenta Ophthalmologica*, **97**:217-228 (1999); Oomen et al., *European Journal of Clinical Investigation*, **29**:1035-1040 (1999); Viores et al., *Pathol. Res. Pract.*, **194**:497-505 (1998); Antonetti et al., *Diabetes*, **47**:1953-1959 (1998), Popov et al., *Acta Diabetol.*, **34**:285-293 (1997); Yamaji et al., *Circulation Research*, **72**:947-957 (1993); Viores et al., *Histochemical Journal*, **25**:648-663 (1993); Beals et al., *Microvascular Research*, **45**:11-19 (1993); Caldwell et al., *Investigative Ophthalmol. Visual Sci.*, **33(5)**:1610-1619 (1992).

Endothelial transport in fenestrated endothelium also occurs by transcytosis and the paracellular pathway. In addition, endothelial transport occurs by means of the fenestrae. Fenestrated endothelia show a remarkably high permeability to water and small hydrophilic solutes due to the presence of the fenestrae.

The fenestrae may or may not be covered by a diaphragm. The locations of endothelium with diaphragmed fenestrae include endocrine tissue (e.g., pancreatic islets and adrenal cortex), gastrointestinal mucosa and renal peritubular capillaries. The permeability to plasma proteins of fenestrated endothelium with diaphragmed fenestrae does not exceed that of continuous endothelium.

The locations of endothelium with nondiaphragmed fenestrae include the glomeruli of the kidneys. The glomerular fenestrated endothelium is covered by a glycocalyx that extends into the fenestrae (forming so-called "seive plugs") and by a more loosely associated endothelial cell surface layer of glycoproteins. Mathematical analyses of functional permselectivity studies have concluded that the glomerular endothelial cell

glycocalyx, including that present in the fenestrae, and its associated surface layer account for the retention of up to 95% of plasma proteins within the circulation.

Loss of fenestrae in the glomerular endothelium has been found to be associated with proteinuria in several diseases, including diabetic nephropathy, transplant
 5 glomerulopathy, pre-eclampsia, diabetes, renal failure, cyclosporine nephropathy, serum sickness nephritis and Thy-1 nephritis. Actin rearrangement and, in particular, depolymerization of stress fibers have been found to be important for the formation and maintenance of fenestrae.

In support of the foregoing discussion of fenestrated endothelia and for additional
 10 information, see Satchell et al., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **296**:F947-F956 (2009); Haraldsson et al., *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **18**:331-335 (2009); Ichimura et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **19**:1463-1471 (2008); Ballermann, *Nephron Physiol.*, **106**:19-25 (2007); Toyoda et al., *Diabetes*, **56**:2155-2160 (2007); Stan, "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability," pages 679-688, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird,
 15 Cambridge University Press, Cambridge, 2007); Simionescu and Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies," pages 42-69, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada and Higgs, Springer-Verlag, Berlin, 2006).

Endothelial transport in sinusoidal endothelium occurs by transcytosis and through the intercellular gaps (interendothelial slits) and intracellular gaps (fenestrae). Treatment
 20 of sinusoidal endothelium with actin filament-disrupting drugs can induce a substantial and rapid increase in the number of gaps, indicating regulation of the porosity of the endothelial lining by the actin cytoskeleton. Other cytoskeleton altering drugs have been reported to change the diameters of fenestrae. Therefore, the fenestrae-associated cytoskeleton probably controls the important function of endothelial filtration in sinusoidal
 25 endothelium. In liver, defenestration (loss of fenestrae), which causes a reduction in permeability of the endothelium, has been associated with the pathogenesis of several diseases and conditions, including aging, atherogenesis, atherosclerosis, cirrhosis, fibrosis, liver failure and primary and metastatic liver cancers. In support of the foregoing and for additional information, see Yokomori, *Med. Mol. Morphol.*, **41**:1-4 (2008); Stan,
 30 "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability," pages 679-688, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); DeLeve, "The Hepatic Sinusoidal Endothelial Cell," pages 1226-1238, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); Pries and Kuebler, "Normal Endothelium," pages 1-40, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada and Higgs,

- Springer-Verlag, Berlin, 2006); Simionescu and Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies," pages 42-69, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada and Higgs, Springer-Verlag, Berlin, 2006); Braet and Wisse, *Comparative Hepatology*, **1**:1-17 (2002); Kanai et al., *Anat. Rec.*, **244**:175-181 (1996);
- 5 Kempka et al., *Exp. Cell Res.*, **176**:38-48 (1988); Kishimoto et al., *Am. J. Anat.*, **178**:241-249 (1987).

The invention provides a method of inhibiting vascular hyperpermeability present in any tissue or organ containing or surrounded by continuous endothelium. As noted above, continuous endothelium is present in, or around, the brain (blood brain barrier),

10 diaphragm, duodenal musculature, fat, heart, some areas of the kidneys (papillary microvasculature, descending vasa recta), large blood vessels, lungs, mesentery, nerves, retina (blood retinal barrier), skeletal muscle, skin, testis, umbilical vein and other tissues and organs of the body. Preferably, the continuous endothelium is that found in or around the brain, heart, lungs, nerves or retina.

15 The invention also provides a method of inhibiting vascular hyperpermeability present in any tissue or organ containing or surrounded by fenestrated endothelium. As noted above, fenestrated endothelium is present in, or around, the kidney (glomeruli, peritubular capillaries and ascending vasa recta), pancreas, adrenal glands, endocrine glands and intestine. Preferably, the fenestrated endothelium is that found in the kidneys,

20 especially that found in the glomeruli of the kidneys.

Further, any disease or condition mediated by vascular hyperpermeability can be treated by the method of the invention to inhibit the vascular hyperpermeability. Such diseases and conditions include diabetes, hypertension and atherosclerosis.

In particular, the vascular complications of diabetes, including those of the brain,

25 heart, kidneys, lung, mesentery, nerves, retina, skeletal muscle, skin and other tissues and organs containing continuous or fenestrated endothelium, can be treated by the present invention. These vascular complications include edema, accumulation of LDL in the subendothelial space, accelerated atherosclerosis, and the following: brain (accelerated aging of vessel walls), heart (myocardial edema, myocardial fibrosis, diastolic

30 dysfunction, diabetic cardiomyopathy), kidneys (diabetic nephropathy), lung (retardation of lung development in the fetuses of diabetic mothers, alterations of several pulmonary physiological parameters and increased susceptibility to infections), mesentery (vascular hyperplasy), nerves (diabetic neuropathy), retina (macular edema and diabetic retinopathy) and skin (redness, discoloration, dryness and ulcerations). Vascular hyperpermeability in

both Type 1 (autoimmune) and Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes can be inhibited by the method of the invention. Type 2 is the most common type of diabetes, affecting 90-95% of diabetics, and its treatment, especially the treatment of those with early signs of, or a predisposition to develop, Type 2 diabetes (see below), should be particularly beneficial.

5 Diabetic retinopathy is a leading cause of blindness that affects approximately 25% of the estimated 21 million Americans with diabetes. Although its incidence and progression can be reduced by intensive glycemic and blood pressure control, nearly all patients with type 1 diabetes mellitus and over 60% of those with type 2 diabetes mellitus eventually develop diabetic retinopathy. There are two stages of diabetic retinopathy. The
10 first, non-proliferative retinopathy, is the earlier stage of the disease and is characterized by increased vascular permeability, microaneurysms, edema and eventually vessel closures. Neovascularization is not a component of the nonproliferative phase. Most visual loss during this stage is due to the fluid accumulating in the macula, the central area of the retina. This accumulation of fluid is called macular edema and can cause temporary
15 or permanent decreased vision. The second stage of diabetic retinopathy is called proliferative retinopathy and is characterized by abnormal new vessel formation. Unfortunately, this abnormal neovascularization can be very damaging because it can cause bleeding in the eye, retinal scar tissue, diabetic retinal detachments or glaucoma, any of which can cause decreased vision or blindness. Macular edema can also occur in the
20 proliferative phase.

 Diabetic neuropathy is a common serious complication of diabetes. There are four main types of diabetic neuropathy: peripheral neuropathy, autonomic neuropathy, radiculoplexus neuropathy and mononeuropathy. The signs and symptoms of peripheral neuropathy, the most common type of diabetic neuropathy, include numbness or reduced
25 ability to feel pain or changes in temperature (especially in the feet and toes), a tingling or burning feeling, sharp pain, pain when walking, extreme sensitivity to the lightest touch, muscle weakness, difficulty walking, and serious foot problems (such as ulcers, infections, deformities and bone and joint pain). Autonomic neuropathy affects the autonomic nervous system that controls the heart, bladder, lungs, stomach, intestines, sex organs and
30 eyes, and problems in any of these areas can occur. Radiculoplexus neuropathy (also called diabetic amyotrophy, femoral neuropathy or proximal neuropathy) usually affects nerves in the hips, shoulders or abdomen, usually on one side of the body. Mononeuropathy means damage to just one nerve, typically in an arm, leg or the face. Common complications of diabetic neuropathy include loss of limbs (*e.g.*, toes, feet or

legs), charcot joints, urinary tract infections, urinary incontinence, hypoglycemia
unawareness (may even be fatal), low blood pressure, digestive problems (*e.g.*,
constipation, diarrhea, nausea and vomiting), sexual dysfunction (*e.g.*, erectile
dysfunction), and increased or decreased sweating. As can be seen, symptoms can range
5 from mild to painful, disabling and even fatal.

Diabetic nephropathy is the most common cause of end-stage renal disease in the
United States. It is a vascular complication of diabetes that affects the glomerular
capillaries of the kidney and reduces the kidney's filtration ability. Nephropathy is first
indicated by the appearance of hyperfiltration and then microalbuminuria. Heavy
10 proteinuria and a progressive decline in renal function precede end-stage renal disease.
Typically, before any signs of nephropathy appear, retinopathy has usually been
diagnosed. Renal transplant is usually recommended to patients with end-stage renal
disease due to diabetes. Survival rate at 5 years for patients receiving a transplant is about
60% compared with only 2% for those on dialysis.

15 Hypertension typically develops over many years, and it affects nearly everyone
eventually. Uncontrolled hypertension increases the risk of serious health problems,
including heart attack, congestive heart failure, stroke, peripheral artery disease, kidney
failure, aneurysms, eye damage, and problems with memory or understanding.

Atherosclerosis also develops gradually. Atherosclerosis can affect the coronary
20 arteries, the carotid artery, the peripheral arteries or the microvasculature, and
complications of atherosclerosis include coronary artery disease (which can cause angina
or a heart attack), coronary microvascular disease, carotid artery disease (which can cause
a transient ischemic attack or stroke), peripheral artery disease (which can cause loss of
sensitivity to heat and cold or even tissue death), and aneurysms.

25 Additional diseases and conditions that can be treated according to the invention
include acute lung injury, age-related macular degeneration, choroidal edema, choroiditis,
coronary microvascular disease, cerebral microvascular disease, Eals disease, edema
caused by injury (*e.g.*, trauma or burns), edema associated with hypertension, glomerular
vascular leakage, hemorrhagic shock, Irvine Gass Syndrome, edema caused by ischemia,
30 macular edema (*e.g.*, caused by vascular occlusions, post-intraocular surgery (*e.g.*, cataract
surgery), uveitis or retinitis pigmentosa, in addition to that caused by diabetes), nephritis
(*e.g.*, glomerulonephritis, serum sickness nephritis and Thy-1 nephritis), nephropathies,
nephrotic edema, nephrotic syndrome, neuropathies, organ failure due to tissue edema
(*e.g.*, in sepsis or due to trauma), pre-eclampsia, pulmonary edema, pulmonary

hypertension, renal failure, retinal edema, retinal hemorrhage, retinal vein occlusions (*e.g.*, branch or central vein occlusions), retinitis, retinopathies (*e.g.*, arteriosclerotic retinopathy, hypertensive retinopathy, radiation retinopathy, sickle cell retinopathy and retinopathy of prematurity, in addition to diabetic retinopathy), silent cerebral infarction, systemic inflammatory response syndromes (SIRS), transplant glomerulopathy, uveitis, vascular leakage syndrome, vitreous hemorrhage and Von Hippel Lindau disease. In addition, certain drugs, including those used to treat multiple sclerosis, are known to cause vascular hyperpermeability, and a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them, can be used to reduce this unwanted side effect when using these drugs.

“Treat,” “treating” or “treatment” is used herein to mean to reduce (wholly or partially) the symptoms, duration or severity of a disease or condition, including curing the disease, or to prevent the disease or condition.

Recent evidence indicates that transcytosis-caused hyperpermeability is the first step of a process that ultimately leads to tissue and organ damage in many diseases and conditions. Accordingly, the present invention provides a means of early intervention in these diseases and conditions which can reduce, delay or even potentially prevent the tissue and organ damage seen in them. For instance, an animal can be treated immediately upon diagnosis of one of the diseases or conditions treatable according to the invention (those diseases and conditions described above).

Alternatively, preferred is the treatment of animals who have early signs of, or a predisposition to develop, such a disease or condition prior to the existence of symptoms. Early signs of, and risk factors for, diabetes, hypertension and atherosclerosis are well known, and treatment of an animal exhibiting these early signs or risk factors can be started prior to the presence of symptoms of the disease or condition (*i.e.*, prophylactically).

For instance, treatment of a patient who is diagnosed with diabetes can be started immediately upon diagnosis. In particular, diabetics should preferably be treated with a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a salt of either of them prior to any symptoms of a vascular complication being present, although this is not usually possible, since most diabetics show such symptoms when they are diagnosed (see below). Alternatively, diabetics should be treated while nonproliferative diabetic retinopathy is mild (*i.e.*, mild levels of microaneurysms and intraretinal hemorrhage). See *Diabetic Retinopathy*, page 9 (Ed. Elia Duh, M.D., Human Press, 2008). Such early treatment will

provide the best chance of preventing macular edema and progression of the retinopathy to proliferative diabetic retinopathy. Also, the presence of diabetic retinopathy is considered a sign that other microvascular complications of diabetes exist or will develop (see *Id.*, pages 474-477), and early treatment may also prevent or reduce these additional
5 complications. Of course, more advanced diseases and conditions that are vascular complications of diabetes can also be treated with beneficial results.

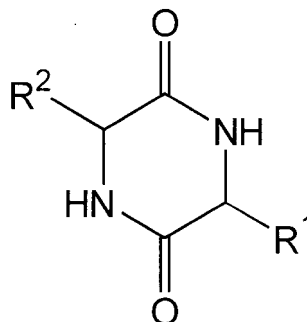
However, as noted above, vascular complications are often already present by the time diabetes is diagnosed. Accordingly, it is preferable to prophylactically treat a patient who has early signs of, or a predisposition to develop, diabetes. The early signs and risk
10 factors of Type 2 diabetes include fasting glucose that is high, but not high enough to be classified as diabetes ("prediabetes"), hyperinsulinemia, hypertension, dyslipidemia (high cholesterol, high triglycerides, high low-density lipoprotein, and/or low level of high-density lipoprotein), obesity (body mass index above 25), inactivity, over 45 years of age, inadequate sleep, family history of diabetes, minority race, history of gestational diabetes,
15 history of polycystic ovary syndrome and diagnosis of metabolic syndrome. Accordingly, patients with early signs of, or a predisposition to develop, Type 2 diabetes can readily be treated prophylactically.

Similarly, treatment of a patient who is diagnosed with hypertension can be started immediately upon diagnosis. Hypertension typically does not cause any symptoms, but
20 prophylactic treatment can be started in a patient who has a predisposition to develop hypertension. Risk factors for hypertension include age, race (hypertension is more common blacks), family history (hypertension runs in families), overweight or obesity, lack of activity, smoking tobacco, too much salt in the diet, too little potassium in the diet, too little vitamin D in the diet, drinking too much alcohol, high levels of stress, certain
25 chronic conditions (*e.g.*, high cholesterol, diabetes, kidney disease and sleep apnea) and use of certain drugs (*e.g.*, oral contraceptives, amphetamines, diet pills, and some cold and allergy medications).

Treatment of a patient who is diagnosed with atherosclerosis can be started immediately upon diagnosis. However, it is preferable to prophylactically treat a patient
30 who has early signs of, or a predisposition to develop, atherosclerosis. Early signs and risk factors for atherosclerosis include age, a family history of aneurysm or early heart disease, hypertension, high cholesterol, high triglycerides, insulin resistance, diabetes, obesity, smoking, lack of physical activity, unhealthy diet, and high level of C-reactive protein.

The method of the invention for inhibiting vascular hyperpermeability comprises administering an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them, to an animal in need thereof to inhibit the vascular

5 hyperpermeability. The diketopiperazines of the invention have the following formula:



I

wherein:

R^1 and R^2 , which may be the same or different, each is:

- (a) a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is glycine, alanine, valine, norvaline, α -aminoisobutyric acid, 2,4-diaminobutyric acid, 2,3-diaminobutyric acid, leucine, isoleucine, norleucine, serine, homoserine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, homoarginine, citrulline, phenylalanine, *p*-aminophenylalanine, tyrosine, tryptophan, thyroxine, cysteine, homocysteine, methionine, penicillamine or ornithine; or
- (b) R^1 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline and/or R^2 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline; or
- (c) a derivative of a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is one of those recited in (a), and the derivatized side chain has:
 - (i) an $-\text{NH}_2$ group replaced by an $-\text{NHR}^3$ or $-\text{N}(\text{R}^3)_2$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;

- (ii) an -OH group replaced by an -O-PO₃H₂ or -OR³ group, wherein each R³ may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (iii) a -COOH group replaced by a -COOR³ group, wherein each R³ may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (iv) a -COOH group replaced by a -CON(R⁴)₂ group, wherein each R⁴ may independently be H or a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (v) an -SH group replaced by -S-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH or -S-S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH ;
- (vi) a -CH₂- group replaced by a -CH(NH₂)- or a -CH(OH)- group;
- (vii) a -CH₃ group replaced by a -CH₂-NH₂ or a -CH₂-OH group; and/or
- (viii) an H which is attached to a carbon atom replaced by a halogen.
- Most preferred are diketopiperazines wherein R¹, R² or both is the side chain of aspartic acid or glutamic acid or a derivative of such a side chain wherein the -COOH group is replaced by a -COOR³ group or a -CON(R⁴)₂ group, wherein R³ and R⁴ are defined above. Of this group of compounds, preferred are diketopiperazines comprising the side chains of aspartic acid and alanine (Asp-Ala DKP or DA-DKP), the side chains of glutamic acid and alanine (Glu-Ala DKP or EA-DKP), the side chains of tyrosine and aspartic acid (Tyr-Asp DKP or YD-DKP), the side chains of tyrosine and glutamic acid (Tyr-Glu DKP or YE-DKP) and derivatives of the aspartic acid or glutamic acid side chains of these four diketopiperazines wherein the -COOH group is replaced by a -COOR³ group or a -CON(R⁴)₂ group, wherein R³ and R⁴ are defined above.
- Most preferred is DA-DKP.

Also preferred are diketopiperazines wherein R¹, R² or both are hydrophobic side chains or hydrophobic side chain derivatives. By "hydrophobic side chain derivative" is meant that the derivatized side chain is hydrophobic. In particular, preferred are diketopiperazines wherein R¹ and/or R², which may be the same or different, each is the side chain of glycine, alanine, valine, norvaline, α-aminobutyric acid, leucine, isoleucine, norleucine, methionine, phenylalanine, tryptophan or tyrosine, and/or R¹ and/or R² is -CH₂-CH₂-CH₂- and together with the adjacent nitrogen atom(s) form proline. Of this group, preferred are diketopiperazines wherein R¹ and/or R², which may be the same or different, each is the side chain of glycine, alanine, valine, norvaline, α-aminobutyric acid,

leucine, isoleucine, norleucine, methionine or tyrosine, more preferably alanine, valine, norvaline, α -aminobutyric acid, leucine, isoleucine or norleucine.

Additional preferred diketopiperazines are those wherein R^1 , R^2 or both side chains are neutral side chains or neutral side chain derivatives. By "neutral side chain derivative" is meant that the derivatized side chain is neutral. In particular, preferred are diketopiperazines wherein R^1 and/or R^2 , which may be the same or different, each is the side chain of asparagine, glutamine, serine, homoserine, threonine, tyrosine, cysteine or methionine. Of this group, preferred are diketopiperazines wherein R^1 and/or R^2 , which may be the same or different, each is the side chain of asparagine, glutamine, serine or threonine.

Also preferred are diketopiperazines wherein R^1 , R^2 or both are basic side chains or basic side chain derivatives. By "basic side chain derivative" is meant that the derivatized side chain is basic. In particular, preferred are diketopiperazines wherein R^1 and/or R^2 , which may be the same or different, each is the side chain of citrulline, 2,4-diaminobutyric acid, 2,3-diaminobutyric acid, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, homoarginine, p-aminophenylalanine, or ornithine. Of this group, preferred are diketopiperazines wherein R^1 and/or R^2 , which may be the same or different, each is the side chain of citrulline, 2,4-diaminobutyric acid, 2,3-diaminobutyric acid, lysine, arginine, homoarginine or p-aminophenylalanine.

Further preferred diketopiperazines are those wherein R^1 , R^2 or both is the side chain of methionine, the side chain of arginine or a derivative of these side chains. Most preferred of this group is a diketopiperazine wherein R^1 is the side chain of methionine and R^2 is the side chain of arginine (Met-Arg DKP or MR-DKP).

By "replaced" is meant that, with reference to the formula of an amino acid side chain, the specified group is replaced by the other specified group. For instance, the formula of the isoleucine side chain is $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$. If the terminal $-\text{CH}_3$ group is replaced with a $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group, then the formula of the resulting derivatized isoleucine side chain would be $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$. As another example, the formula of the alanine side chain is $-\text{CH}_3$. If one of the hydrogen atoms is replaced by a chlorine atom, then the resulting derivatized alanine side chain would be $-\text{CH}_2-\text{Cl}$. Note that the side chain of glycine is $-\text{H}$ and, if this H is replaced by a chlorine (or other halogen) atom, the resulting side chain will $-\text{Cl}$, with the chlorine atom attached to the ring carbon (e.g., $R^1 = -\text{Cl}$).

By "side chain" of an amino acid is meant that portion of the amino acid attached to

|

the common $\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$ backbone of all of the amino acids listed above. For instance, the side chain of glycine is -H , the side chain of alanine is -CH_3 , and the side chain of serine is $\text{-CH}_2\text{OH}$.

By "hydrophobic" is meant a side chain or side chain derivative that is uncharged at physiological pH and is repelled by an aqueous solution.

By "neutral" is meant a side chain or side chain derivative that is uncharged at physiological pH.

By "basic" is meant a side chain or side chain derivative that is positively charged at physiological pH.

By "acidic" is meant a side chain or side chain derivative that is negatively charged at physiological pH.

By "alkyl" is meant a saturated straight-chain or branched hydrocarbon containing 1-10 carbon atoms, preferably 1-6, carbon atoms. "Lower alkyl" means a saturated straight-chain or branched hydrocarbon containing 1-6 carbon atoms.

By "cycloalkyl" is meant a saturated cyclic hydrocarbon containing at least one ring, each ring containing at least three carbon atoms. Preferably, the cycloalkyl contains one ring of 4-8 carbon atoms.

By "heterocycloalkyl" is meant a cycloalkyl having one or more of the ring carbon atoms of at least one of the rings replaced by an O, S and/or N.

By "aryl" is meant an aromatic group having at least one aromatic ring (*e.g.*, phenyl).

By "alkylaryl" is meant a lower alkyl having an H replaced by an aryl (*e.g.*, $\text{-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$ or $\text{-CH}_3\text{CH(C}_6\text{H}_5\text{)CH}_3$).

By "arylalkyl" is meant an aryl having an H replaced by a lower alkyl (*e.g.*, $\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_3$).

By "heteroaryl" is meant an aryl having one or more of the ring carbon atoms of at least one of the rings replaced by an O, S and/or N.

By "substituted" is meant that the moiety is substituted with one or more substituents selected from the following group: -OH, NH₂, -SH, -COOH and/or a halogen atom.

By "halogen" is meant chlorine, fluorine, bromine or iodine. Preferred is chlorine or bromine.

Methods of making diketopiperazines are well known in the art, and these methods may be employed to synthesize the diketopiperazines of the invention. See, e.g., U.S. Patents Nos. 4,694,081, 5,817,751, 5,990,112, 5,932,579 and 6,555,543, US Patent Application Publication Number 2004/0024180, PCT applications WO 96/00391 and WO 97/48685, and Smith et al., *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **8**, 2369-2374 (1998), the complete disclosures of which are incorporated herein by reference.

For instance, diketopiperazines can be prepared by first synthesizing dipeptides. The dipeptides can be synthesized by methods well known in the art using L-amino acids, D-amino acids or a combination of D- and L-amino acids. Preferred are solid-phase peptide synthetic methods. Of course, dipeptides are also available commercially from numerous sources, including Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (primarily custom synthesis), Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA (custom synthesis), Fisher Scientific (custom synthesis) and Advanced ChemTech, Louisville, KY.

Once the dipeptide is synthesized or purchased, it is cyclized to form a diketopiperazine. This can be accomplished by a variety of techniques.

For example, U.S. Patent Application Publication Number 2004/0024180 describes a method of cyclizing dipeptides. Briefly, the dipeptide is heated in an organic solvent while removing water by distillation. Preferably, the organic solvent is a low-boiling azeotrope with water, such as acetonitrile, allyl alcohol, benzene, benzyl alcohol, n-butanol, 2-butanol, t-butanol, acetic acid butylester, carbon tetrachloride, chlorobenzene, chloroform, cyclohexane, 1,2-dichlorethane, diethylacetal, dimethylacetal, acetic acid ethylester, heptane, methylisobutylketone, 3-pentanol, toluene and xylene. The temperature depends on the reaction speed at which the cyclization takes place and on the type of azeotroping agent used. The reaction is preferably carried out at 50-200°C, more preferably 80-150°C. The pH range in which cyclization takes place can be easily determine by the person skilled in the art. It will advantageously be 2-9, preferably 3-7.

When one or both of the amino acids of the dipeptide has, or is derivatized to have, a carboxyl group on its side chain (e.g., aspartic acid or glutamic acid), the dipeptide is preferably cyclized as described in U.S. Patent No. 6,555,543. Briefly, the dipeptide, with

the side-chain carboxyl still protected, is heated under neutral conditions. Typically, the dipeptide will be heated at from about 80°C to about 180°C, preferably at about 120°C.

The solvent will be a neutral solvent. For instance, the solvent may comprise an alcohol (such as butanol, methanol, ethanol, and higher alcohols, but not phenol) and an azeotropic
5 co-solvent (such as toluene, benzene, or xylene). Preferably, the alcohol is butan-2-ol, and the azeotropic co-solvent is toluene. The heating is continued until the reaction is complete, and such times can be determined empirically. Typically, the dipeptide will be cyclized by refluxing it for about 8-24 hours, preferably about 18 hours. Finally, the protecting group is removed from the diketopiperazine. In doing so, the use of strong
10 acids (mineral acids, such as sulfuric or hydrochloric acids), strong bases (alkaline bases, such as potassium hydroxide or sodium hydroxide), and strong reducing agents (*e.g.*, lithium aluminum hydride) should be avoided, in order to maintain the chirality of the final compound.

Dipeptides made on solid phase resins can be cyclized and released from the resin
15 in one step. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,817,751. For instance, the resin having an N-alkylated dipeptide attached is suspended in toluene or toluene/ethanol in the presence of acetic acid (*e.g.*, 1%) or triethylamine (*e.g.*, 4%). Typically, basic cyclization conditions are preferred for their faster cyclization times.

To prepare diketopiperazines wherein the amino acid side chains are derivatized,
20 amino acid derivatives can be used in the synthesis of the dipeptides, the dipeptides can be derivatized and/or the diketopiperazines can be derivatized, as is known in the art. See, *e.g.*, those references cited above.

Other methods of cyclizing dipeptides and of making diketopiperazines are known
in the art and can be used in the preparation of diketopiperazines useful in the practice of
25 the invention. See, *e.g.*, those references listed above. In addition, many diketopiperazines suitable for use in the present invention can be made from proteins and peptides as described in U.S. Patent No. 7,732,403, the complete disclosure of which is incorporated herein by reference. Further, diketopiperazines for use in the practice of the invention can be obtained commercially from, *e.g.*, Syngene, India or Hemmo
30 Pharmaceuticals Pvt. Ltd., India (both custom synthesis).

The diketopiperazines include all possible stereoisomers that can be obtained by varying the configuration of the individual chiral centers, axes or surfaces. In other words, the diketopiperazines include all possible diastereomers, as well as all optical isomers (enantiomers).

“Prodrug” means any compound which releases an active parent drug (a diketopiperazine in this case) *in vivo* when such prodrug is administered to an animal. Prodrugs of diketopiperazines include diketopiperazines derivativatized with any group that may be cleaved *in vivo* to generate the diketopiperazine. Examples of prodrugs
5 include esters.

The physiologically-acceptable salts of the diketopiperazines and prodrugs of the invention may also be used in the practice of the invention. Physiologically-acceptable salts include conventional non-toxic salts, such as salts derived from inorganic acids (such as hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, phosphoric, nitric, and the like), organic acids
10 (such as acetic, propionic, succinic, glycolic, stearic, lactic, malic, tartaric, citric, glutamic, aspartic, benzoic, salicylic, oxalic, ascorbic acid, and the like) or bases (such as the hydroxide, carbonate or bicarbonate of a pharmaceutically-acceptable metal cation or organic cations derived from N,N-dibenzylethylenediamine, D-glucosamine, or ethylenediamine). The salts are prepared in a conventional manner, *e.g.*, by neutralizing
15 the free base form of the compound with an acid.

As noted above, a diketopiperazine of formula I, a prodrug of a diketopiperazine of formula I or a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them can be used to inhibit vascular hyperpermeability and to treat a disease or condition mediated by vascular hyperpermeability. To do so, the diketopiperazine, prodrug or pharmaceutically-
20 acceptable salt is administered to an animal in need of treatment. Preferably, the animal is a mammal, such as a rabbit, goat, dog, cat, horse or human. Most preferably, the animal is a human.

A diketopiperazine of formula I, a prodrug of a diketopiperazine of formula I or a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them is used in the present invention as an active ingredient. “Active ingredient” is used herein to mean a compound having
25 therapeutic, pharmaceutical or pharmacological activity, and particularly, the therapeutic, pharmaceutical or pharmacological activity described herein. The diketopiperazine, prodrug or salt is not used in the present invention as a carrier or as part of a carrier system of a pharmaceutical composition as described in, *e.g.*, U.S. Patents Nos. 5,976,569,
30 6,099,856, 7,276,534 and PCT applications WO 96/10396, WO 2006/023943, WO 2007/098500, WO 2007/121411 and WO 2010/102148.

Effective dosage forms, modes of administration and dosage amounts for the compounds of the invention (*i.e.*, a diketopiperazine of formula I, a prodrug of a diketopiperazine of formula I or a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them)

may be determined empirically using the guidance provided herein. It is understood by those skilled in the art that the dosage amount will vary with the particular disease or condition to be treated, the severity of the disease or condition, the route(s) of administration, the duration of the treatment, the identity of any other drugs being administered to the animal, the age, size and species of the animal, and like factors known in the medical and veterinary arts. In general, a suitable daily dose of a compound of the present invention will be that amount of the compound which is the lowest dose effective to produce a therapeutic effect. However, the daily dosage will be determined by an attending physician or veterinarian within the scope of sound medical judgment. If desired, the effective daily dose may be administered as two, three, four, five, six or more sub-doses, administered separately at appropriate intervals throughout the day. Administration of the compound should be continued until an acceptable response is achieved.

In particular, an effective dosage amount of a compound of the invention for inhibiting vascular hyperpermeability will be from 10 ng/kg/day to 225 mg/kg/day, preferably from 500 ng/kg/day to 150 mg/kg/day, most preferably from 1 mg/kg/day to 30 mg/kg/day. When given orally to an adult human, the dose will preferably be from about 1 mg/day to about 10 g/day, more preferably the dose will be from about 60 mg/day to about 6 g/day, most preferably the dose will be from about 100 mg/day to about 1200 mg/day, preferably given in several doses.

The invention also provides a method of modulating the cytoskeleton of endothelial cells in an animal. Modulation of the cytoskeleton can reduce vascular hyperpermeability and increase vascular hypopermeability (*i.e.*, permeability below basal levels), thereby returning the endothelium to homeostasis. Accordingly, those diseases and conditions mediated by vascular hyperpermeability can be treated (see above) and those diseases and conditions mediated by vascular hypopermeability can also be treated. The latter type of diseases and conditions include aging liver, atherogenesis, atherosclerosis, cirrhosis, fibrosis of the liver, liver failure and primary and metastatic liver cancers.

The method of modulating the cytoskeleton of endothelial cells comprises administering an effective amount of a diketopiperazine of formula I, a prodrug of a diketopiperazine of formula I or a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them, to the animal. The diketopiperazines are the same as those described above for inhibiting vascular hyperpermeability, and "animal" has the same meaning as set forth above.

Effective dosage forms, modes of administration and dosage amounts for the compounds of the invention (*i.e.*, a diketopiperazine of formula I, a prodrug of a diketopiperazine of formula I or a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them) for modulating the cytoskeleton may be determined empirically using the guidance
5 provided herein. It is understood by those skilled in the art that the dosage amount will vary with the particular disease or condition to be treated, the severity of the disease or condition, the route(s) of administration, the duration of the treatment, the identity of any other drugs being administered to the animal, the age, size and species of the animal, and like factors known in the medical and veterinary arts. In general, a suitable daily dose of a
10 compound of the present invention will be that amount of the compound which is the lowest dose effective to produce a therapeutic effect. However, the daily dosage will be determined by an attending physician or veterinarian within the scope of sound medical judgment. If desired, the effective daily dose may be administered as two, three, four, five, six or more sub-doses, administered separately at appropriate intervals throughout the
15 day. Administration of the compound should be continued until an acceptable response is achieved.

In particular, an effective dosage amount of a compound of the invention for modulating the cytoskeleton of endothelial cells will be from 10 ng/kg/day to 225 mg/kg/day, preferably from 500 ng/kg/day to 150 mg/kg/day, most preferably from 1
20 mg/kg/day to 30 mg/kg/day. When given orally to an adult human, the dose will preferably be from about 1 mg/day to about 10000 mg/day, more preferably the dose will be from about 60 mg/day to about 6000 mg/day, most preferably the dose will be from about 100 mg/day to about 1200 mg/day, preferably given in several doses.

The compounds of the present invention (*i.e.*, diketopiperazines of formula I, prodrugs thereof and pharmaceutically-acceptable salts of either of them) may be
25 administered to an animal patient for therapy by any suitable route of administration, including orally, nasally, parenterally (*e.g.*, intravenously, intraperitoneally, subcutaneously or intramuscularly), transdermally, intraocularly and topically (including buccally and sublingually). Generally preferred is oral administration for any disease or
30 condition treatable according to the invention. The preferred routes of administration for treatment of diseases and conditions of the eye are orally, intraocularly and topically. Most preferred is orally. The preferred routes of administration for treatment of diseases and conditions of the brain are orally and parenterally. Most preferred is orally.

While it is possible for a compound of the present invention to be administered alone, it is preferable to administer the compound as a pharmaceutical formulation (composition). The pharmaceutical compositions of the invention comprise a compound or compounds of the invention as an active ingredient in admixture with one or more
 5 pharmaceutically-acceptable carriers and, optionally, with one or more other compounds, drugs or other materials. Each carrier must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation and not injurious to the animal. Pharmaceutically-acceptable carriers are well known in the art. Regardless of the route of administration selected, the compounds of the present invention are formulated into
 10 pharmaceutically-acceptable dosage forms by conventional methods known to those of skill in the art. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Formulations of the invention suitable for oral administration may be in the form of capsules, cachets, pills, tablets, powders, granules or as a solution or a suspension in an aqueous or non-aqueous liquid, or an oil-in-water or water-in-oil liquid emulsions, or as an
 15 elixir or syrup, or as pastilles (using an inert base, such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia), and the like, each containing a predetermined amount of a compound or compounds of the present invention as an active ingredient. A compound or compounds of the present invention may also be administered as bolus, electuary or paste.

In solid dosage forms of the invention for oral administration (capsules, tablets,
 20 pills, dragees, powders, granules and the like), the active ingredient (*i.e.*, a diketopiperazine of formula I, a prodrug of a diketopiperazine of formula I, a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them, or combinations of the foregoing) is mixed with one or more pharmaceutically acceptable carriers, such as sodium citrate or dicalcium phosphate, and/or any of the following: (1) fillers or extenders, such as starches,
 25 lactose, sucrose, glucose, mannitol, and/or silicic acid; (2) binders, such as, for example, carboxymethylcellulose, alginates, gelatin, polyvinyl pyrrolidone, sucrose and/or acacia; (3) humectants, such as glycerol; (4) disintegrating agents, such as agar-agar, calcium carbonate, potato or tapioca starch, alginic acid, certain silicates, and sodium carbonate; (5) solution retarding agents, such as paraffin; (6) absorption accelerators, such as
 30 quaternary ammonium compounds; (7) wetting agents, such as, for example, cetyl alcohol and glycerol monostearate; (8) absorbents, such as kaolin and bentonite clay; (9) lubricants, such as talc, calcium stearate, magnesium stearate, solid polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate, and mixtures thereof; and (10) coloring agents. In the case of capsules, tablets and pills, the pharmaceutical compositions may also comprise buffering agents.

Solid compositions of a similar type may be employed as fillers in soft and hard-filled gelatin capsules using such excipients as lactose or milk sugars, as well as high molecular weight polyethylene glycols and the like.

5 A tablet may be made by compression or molding optionally with one or more accessory ingredients. Compressed tablets may be prepared using binder (for example, gelatin or hydroxypropylmethyl cellulose), lubricant, inert diluent, preservative, disintegrant (for example, sodium starch glycolate or cross-linked sodium carboxymethyl cellulose), surface-active or dispersing agent. Molded tablets may be made by molding in a suitable machine a mixture of the powdered compound moistened with an inert liquid
10 diluent.

The tablets, and other solid dosage forms of the pharmaceutical compositions of the present invention, such as dragees, capsules, pills and granules, may optionally be scored or prepared with coatings and shells, such as enteric coatings and other coatings well known in the pharmaceutical-formulating art. They may also be formulated so as to
15 provide slow or controlled release of the active ingredient therein using, for example, hydroxypropylmethyl cellulose in varying proportions to provide the desired release profile, other polymer matrices, liposomes and/or microspheres. They may be sterilized by, for example, filtration through a bacteria-retaining filter. These compositions may also optionally contain opacifying agents and may be of a composition that they release the
20 active ingredient only, or preferentially, in a certain portion of the gastrointestinal tract, optionally, in a delayed manner. Examples of embedding compositions which can be used include polymeric substances and waxes. The active ingredient can also be in microencapsulated form.

Liquid dosage forms for oral administration of the compounds of the invention
25 include pharmaceutically-acceptable emulsions, microemulsions, solutions, suspensions, syrups and elixirs. In addition to the active ingredient, the liquid dosage forms may contain inert diluents commonly used in the art, such as, for example, water or other solvents, solubilizing agents and emulsifiers, such as ethyl alcohol, isopropyl alcohol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, benzyl benzoate, propylene glycol, 1,3-
30 butylene glycol, oils (in particular, cottonseed, groundnut, corn, germ, olive, castor and sesame oils), glycerol, tetrahydrofuryl alcohol, polyethylene glycols and fatty acid esters of sorbitan, and mixtures thereof.

Besides inert diluents, the oral compositions can also include adjuvants such as wetting agents, emulsifying and suspending agents, sweetening, flavoring, coloring, perfuming and preservative agents.

5 Suspensions, in addition to the active ingredient, may contain suspending agents as, for example, ethoxylated isostearyl alcohols, polyoxyethylene sorbitol and sorbitan esters, microcrystalline cellulose, aluminum metahydroxide, bentonite, agar-agar and tragacanth, and mixtures thereof.

10 The invention also provides pharmaceutical products suitable for treatment of the eye. Such pharmaceutical products include pharmaceutical compositions, devices and implants (which may be compositions or devices).

15 Pharmaceutical formulations (compositions) for intraocular injection of a compound or compounds of the invention into the eyeball include solutions, emulsions, suspensions, particles, capsules, microspheres, liposomes, matrices, etc. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 6,060,463, U.S. Patent Application Publication No. 2005/0101582, and PCT application WO 2004/043480, the complete disclosures of which are incorporated herein by reference. For instance, a pharmaceutical formulation for intraocular injection may comprise one or more compounds of the invention in combination with one or more pharmaceutically-acceptable sterile isotonic aqueous or non-aqueous solutions, suspensions or emulsions, which may contain antioxidants, buffers, suspending agents, thickening agents or viscosity-enhancing agents (such as a hyaluronic acid polymer). Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers include water, saline (preferably 0.9%), dextrose in water (preferably 5%), buffers, dimethylsulfoxide, alcohols and polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like). These compositions may also contain adjuvants such as wetting agents and emulsifying agents and dispersing agents. In addition, prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as polymers and gelatin. Injectable depot forms can be made by incorporating the drug into microcapsules or microspheres made of biodegradable polymers such as polylactide-polyglycolide. Examples of other biodegradable polymers include poly(orthoesters), poly(glycolic) acid, poly(lactic) acid, polycaprolactone and poly(anhydrides). Depot injectable formulations are also prepared by entrapping the drug in liposomes (composed of the usual ingredients, such as dipalmitoyl phosphatidylcholine) or microemulsions which are compatible with eye tissue. Depending on the ratio of drug to polymer or lipid, the nature of the particular polymer or lipid components, the type of liposome employed,

25
30

and whether the microcapsules or microspheres are coated or uncoated, the rate of drug release from microcapsules, microspheres and liposomes can be controlled.

The compounds of the invention can also be administered surgically as an ocular implant. For instance, a reservoir container having a diffusible wall of polyvinyl alcohol or polyvinyl acetate and containing a compound or compounds of the invention can be implanted in or on the sclera. As another example, a compound or compounds of the invention can be incorporated into a polymeric matrix made of a polymer, such as polycaprolactone, poly(glycolic) acid, poly(lactic) acid, poly(anhydride), or a lipid, such as sebacic acid, and may be implanted on the sclera or in the eye. This is usually accomplished with the animal receiving a topical or local anesthetic and using a small incision made behind the cornea. The matrix is then inserted through the incision and sutured to the sclera.

The compounds of the invention can also be administered topically to the eye, and a preferred embodiment of the invention is a topical pharmaceutical composition suitable for application to the eye. Topical pharmaceutical compositions suitable for application to the eye include solutions, suspensions, dispersions, drops, gels, hydrogels and ointments. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,407,926 and PCT applications WO 2004/058289, WO 01/30337 and WO 01/68053, the complete disclosures of all of which are incorporated herein by reference.

Topical formulations suitable for application to the eye comprise one or more compounds of the invention in an aqueous or nonaqueous base. The topical formulations can also include absorption enhancers, permeation enhancers, thickening agents, viscosity enhancers, agents for adjusting and/or maintaining the pH, agents to adjust the osmotic pressure, preservatives, surfactants, buffers, salts (preferably sodium chloride), suspending agents, dispersing agents, solubilizing agents, stabilizers and/or tonicity agents. Topical formulations suitable for application to the eye will preferably comprise an absorption or permeation enhancer to promote absorption or permeation of the compound or compounds of the invention into the eye and/or a thickening agent or viscosity enhancer that is capable of increasing the residence time of a compound or compounds of the invention in the eye. See PCT applications WO 2004/058289, WO 01/30337 and WO 01/68053. Exemplary absorption/permeation enhancers include methanesulfonylmethane, alone or in combination with dimethylsulfoxide, carboxylic acids and surfactants. Exemplary thickening agents and viscosity enhancers include dextrans, polyethylene glycols, polyvinylpyrrolidone, polysaccharide gels, Gelrite®, cellulosic polymers (such as hydroxypropyl

methylcellulose), carboxyl-containing polymers (such as polymers or copolymers of acrylic acid), polyvinyl alcohol and hyaluronic acid or a salt thereof.

Liquid dosage forms (*e.g.*, solutions, suspensions, dispersions and drops) suitable for treatment of the eye can be prepared, for example, by dissolving, dispersing,
 5 suspending, etc. a compound or compounds of the invention in a vehicle, such as, for example, water, saline, aqueous dextrose, glycerol, ethanol and the like, to form a solution, dispersion or suspension. If desired, the pharmaceutical formulation may also contain minor amounts of non-toxic auxillary substances, such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents and the like, for example sodium acetate, sorbitan monolaurate,
 10 triethanolamine sodium acetate, triethanolamine oleate, etc.

Aqueous solutions and suspensions suitable for treatment of the eye can include, in addition to a compound or compounds of the invention, preservatives, surfactants, buffers, salts (preferably sodium chloride), tonicity agents and water. If suspensions are used, the particle sizes should be less than 10 μm to minimize eye irritation. If solutions or
 15 suspensions are used, the amount delivered to the eye should not exceed 50 μl to avoid excessive spillage from the eye.

Colloidal suspensions suitable for treatment of the eye are generally formed from microparticles (*i.e.*, microspheres, nanospheres, microcapsules or nanocapsules, where microspheres and nanospheres are generally monolithic particles of a polymer matrix in
 20 which the formulation is trapped, adsorbed, or otherwise contained, while with microcapsules and nanocapsules the formulation is actually encapsulated). The upper limit for the size of these microparticles is about 5 μ to about 10 μ .

Ophthalmic ointments suitable for treatment of the eye include a compound or compounds of the invention in an appropriate base, such as mineral oil, liquid lanolin,
 25 white petrolatum, a combination of two or all three of the foregoing, or polyethylene-mineral oil gel. A preservative may optionally be included.

Ophthalmic gels suitable for treatment of the eye include a compound or compounds of the invention suspended in a hydrophilic base, such as Carbopol-940 or a combination of ethanol, water and propylene glycol (*e.g.*, in a ratio of 40:40:20). A
 30 gelling agent, such as hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose or ammoniated glycyrrhizinate, is used. A preservative and/or a tonicity agent may optionally be included.

Hydrogels suitable for treatment of the eye are formed by incorporation of a swellable, gel-forming polymer, such as those listed above as thickening agents or

viscosity enhancers, except that a formulation referred to in the art as a "hydrogel" typically has a higher viscosity than a formulation referred to as a "thickened" solution or suspension. In contrast to such preformed hydrogels, a formulation may also be prepared so to form a hydrogel *in situ* following application to the eye. Such gels are liquid at room
5 temperature but gel at higher temperatures (and thus are termed "thermoreversible" hydrogels), such as when placed in contact with body fluids. Biocompatible polymers that impart this property include acrylic acid polymers and copolymers, N-isopropylacrylamide derivatives and ABA block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide (conventionally referred to as "poloxamers" and available under the Pluronic® tradename
10 from BASF-Wayndotte).

Preferred dispersions are liposomal, in which case the formulation is enclosed within liposomes (microscopic vesicles composed of alternating aqueous compartments and lipid bilayers).

Eye drops can be formulated with an aqueous or nonaqueous base also comprising
15 one or more dispersing agents, solubilizing agents or suspending agents. Drops can be delivered by means of a simple eye dropper-capped bottle or by means of a plastic bottle adapted to deliver liquid contents dropwise by means of a specially shaped closure.

The compounds of the invention can also be applied topically by means of drug-impregnated solid carrier that is inserted into the eye. Drug release is generally effected
20 by dissolution or bioerosion of the polymer, osmosis, or combinations thereof. Several matrix-type delivery systems can be used. Such systems include hydrophilic soft contact lenses impregnated or soaked with the desired compound of the invention, as well as biodegradable or soluble devices that need not be removed after placement in the eye. These soluble ocular inserts can be composed of any degradable substance that can be
25 tolerated by the eye and that is compatible with the compound of the invention that is to be administered. Such substances include, but are not limited to, poly(vinyl alcohol), polymers and copolymers of polyacrylamide, ethylacrylate and vinylpyrrolidone, as well as cross-linked polypeptides or polysaccharides, such as chitin.

Dosage forms for the other types of topical administration (*i.e.*, not to the eye) or
30 for transdermal administration of compounds of the invention include powders, sprays, ointments, pastes, creams, lotions, gels, solutions, patches, drops and inhalants. The active ingredient may be mixed under sterile conditions with a pharmaceutically-acceptable carrier, and with any buffers, or propellants which may be required. The ointments, pastes, creams and gels may contain, in addition to the active ingredient, excipients, such

as animal and vegetable fats, oils, waxes, paraffins, starch, tragacanth, cellulose derivatives, polyethylene glycols, silicones, bentonites, silicic acid, talc and zinc oxide, or mixtures thereof. Powders and sprays can contain, in addition to the active ingredient, excipients such as lactose, talc, silicic acid, aluminum hydroxide, calcium silicates and polyamide powder or mixtures of these substances. Sprays can additionally contain customary propellants such as chlorofluorohydrocarbons and volatile unsubstituted hydrocarbons, such as butane and propane. Transdermal patches have the added advantage of providing controlled delivery of compounds of the invention to the body. Such dosage forms can be made by dissolving, dispersing or otherwise incorporating one or more compounds of the invention in a proper medium, such as an elastomeric matrix material. Absorption enhancers can also be used to increase the flux of the compound across the skin. The rate of such flux can be controlled by either providing a rate-controlling membrane or dispersing the compound in a polymer matrix or gel. A drug-impregnated solid carrier (*e.g.*, a dressing) can also be used for topical administration.

Pharmaceutical formulations include those suitable for administration by inhalation or insufflation or for nasal administration. For administration to the upper (nasal) or lower respiratory tract by inhalation, the compounds of the invention are conveniently delivered from an insufflator, nebulizer or a pressurized pack or other convenient means of delivering an aerosol spray. Pressurized packs may comprise a suitable propellant such as dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide, or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount.

Alternatively, for administration by inhalation or insufflation, the composition may take the form of a dry powder, for example, a powder mix of one or more compounds of the invention and a suitable powder base, such as lactose or starch. The powder composition may be presented in unit dosage form in, for example, capsules or cartridges, or, *e.g.*, gelatin or blister packs from which the powder may be administered with the aid of an inhalator, insufflator or a metered-dose inhaler.

For intranasal administration, compounds of the invention may be administered by means of nose drops or a liquid spray, such as by means of a plastic bottle atomizer or metered-dose inhaler. Liquid sprays are conveniently delivered from pressurized packs. Typical of atomizers are the Mistometer (Wintrop) and Medihaler (Riker).

Nose drops may be formulated with an aqueous or nonaqueous base also comprising one or more dispersing agents, solubilizing agents or suspending agents.

Drops can be delivered by means of a simple eye dropper-capped bottle or by means of a plastic bottle adapted to deliver liquid contents dropwise by means of a specially shaped closure.

Pharmaceutical compositions of this invention suitable for parenteral
5 administrations comprise one or more compounds of the invention in combination with one or more pharmaceutically-acceptable sterile isotonic aqueous or non-aqueous solutions, dispersions, suspensions or emulsions, or sterile powders which may be reconstituted into sterile injectable solutions or dispersions just prior to use, which may contain antioxidants, buffers, solutes which render the formulation isotonic with the blood
10 of the intended recipient or suspending or thickening agents. Also, drug-coated stents may be used.

Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers which may be employed in the pharmaceutical compositions of the invention include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures
15 thereof, vegetable oils, such as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

These compositions may also contain adjuvants such as wetting agents,
20 emulsifying agents and dispersing agents. It may also be desirable to include isotonic agents, such as sugars, sodium chloride, and the like in the compositions. In addition, prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as aluminum monostearate and gelatin.

In some cases, in order to prolong the effect of a drug, it is desirable to slow the
25 absorption of the drug from subcutaneous or intramuscular injection. This may be accomplished by the use of a liquid suspension of crystalline or amorphous material having poor water solubility. The rate of absorption of the drug then depends upon its rate of dissolution which, in turn, may depend upon crystal size and crystalline form. Alternatively, delayed absorption of a parenterally-administered drug is accomplished by
30 dissolving or suspending the drug in an oil vehicle.

Injectable depot forms are made by forming microencapsule matrices of the drug in biodegradable polymers such as polylactide-polyglycolide. Depending on the ratio of drug to polymer, and the nature of the particular polymer employed, the rate of drug release can be controlled. Examples of other biodegradable polymers include

poly(orthoesters) and poly(anhydrides). Depot injectable formulations are also prepared by entrapping the drug in liposomes or microemulsions which are compatible with body tissue. The injectable materials can be sterilized for example, by filtration through a bacterial-retaining filter.

5 The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, for example, ampules and vials, and may be stored in a lyophilized condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier, for example water for injection, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions may be prepared from sterile powders, granules and tablets of the type described above.

10 A diketopiperazine of formula I, a prodrug of a diketopiperazine of formula I or a pharmaceutically-acceptable salt of either one of them, may be given alone to treat a disease or condition involving vascular hyperpermeability or dysfunction of the cytoskeleton. Alternatively, the diketopiperazine, prodrug or salt may be given in combination with each other and/or in combination with one or more other treatments or
15 drugs suitable for treating the disease or condition. For instance, the diketopiperazine, prodrug or the salt can be administered prior to, in conjunction with (including simultaneously with), or after the other treatment or drug. In the case of another drug, the drug and the diketopiperazine, prodrug or salt, may be administered in separate pharmaceutical compositions or as part of the same pharmaceutical composition.

20 The invention also provides kits. The kits comprise a container holding a diketopiperazine of formula I, a prodrug thereof or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them. The kits may further comprise one or more additional containers each holding one or more other drugs suitable for use in the methods of the invention. Suitable
25 containers include vials, bottles (including with a bottle with a dropper or a squeeze bottle), blister packs, inhalers, jars, nebulizers, packets (e.g., made of foil, plastic, paper, cellophane or another material), syringes and tubes. The kit will also contain instructions for administration of the diketopiperazine, prodrug or salt and, optionally, the one or more other drugs suitable for use in the methods of the invention. The instructions may, for
30 instance, be printed on the packaging holding the container(s), may be printed on a label attached to the kit or the container(s), or may be printed on a separate sheet of paper that is included in or with the kit. The packaging holding the container(s) may be, for instance, a box, or the container(s) may be wrapped in, for instance, plastic shrink wrap. The kit may also contain other materials which are known in the art and which may be desirable from a

commercial and user standpoint. For instance, the kit may contain instructions to help a patient manage his/her diabetes or hypertension.

As used herein, "a" or "an" means one or more.

As used herein, "comprises" and "comprising" include within their scope all
5 narrower terms, such as "consisting essentially of" and "consisting of" as alternative
embodiments of the present invention characterized herein by "comprises" or
"comprising". In regard to use of "consisting essentially of", this phrase limits the scope
of a claim to the specified steps and materials and those that do not materially affect the
basic and novel characteristics of the invention disclosed herein. The basic and novel
10 characteristics of the invention can be inhibition of vascular hyperpermeability,
modulation of a cytoskeleton of an endothelial cell, or both, in an animal.

Additional objects, advantages and novel features of the present invention will
become apparent to those skilled in the art by consideration of the following non-limiting
examples.

15 EXAMPLES

Example 1: Effect of DA-DKP on ECIS

Assays were performed to determine the effect of DA-DKP on transendothelial
electrical resistance (TER) of human renal glomerular microvascular endothelial cells
(ACBRI 128, Cell Systems Corporation (exclusive distributor for Applied Cell Biology
20 Research Institute), Kirkland, WA). Electrical resistance was measured using the electric
cell-substrate impedance sensing (ECIS) system (ECISZ0, obtained from Applied
Biophysics) with 8-well multiple electrode plates (8W10E). Each well of the plates was
coated with 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin in HBSS by adding the fibronectin in a volume of 100 μl
per well and incubating the plates for 30 minutes in a 37° C incubator with 5% CO₂. The
25 fibronectin solution was removed, and 400 μl of EGM-2 culture medium (Lonza) was
added to each well. The plates were connected to the ECISZ0 system and were
electrically stabilized. The EGM-2 medium was aspirated and replaced with 200 μl of
EGM-2 culture medium containing 100,000 cells per well. The plates were reconnected to
the ECISZ0 system and incubated for 24 hours in a 37° C incubator with 5% CO₂. The
30 EGM-2 medium was aspirated and replaced with 400 μl of fresh EGM-2 culture medium
per well. The plates were reconnected to the ECISZ0 system and incubated for 6 hours in
a 37° C incubator with 5% CO₂. Solutions of the test compounds in HBSS were prepared
and placed in the incubator to equilibrate. The test compounds were then added to

appropriate wells at the following final concentrations: DA-DKP (100 μ M) (Sigma) and TNF α (1 ng/ml) (Sigma). ECIS (resistance) was monitored for 90 hours.

In the glomerular endothelial cells, 100 μ M DA-DKP alone showed an increase of ECIS as compared to untreated cells starting about 5.0 hours, reaching significance at 12 hours, and persisting for 35 hours, after treatment. While not significant, DA-DKP showed an ability to prevent some of the TNF α -induced drop in ECIS.

Example 2: Effect of DA-DKP on ECIS

Assays were performed to determine the effect of DA-DKP on transendothelial electrical resistance (TER) of human retinal endothelial cells (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (exclusive distributor for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Electrical resistance was measured using the electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) system (ECISZ0, obtained from Applied Biophysics) as described in Example 1, but using 96-well multiple electrode plates (8W10E). Also, several doses of DA-DKP were used (0.5 μ M, 5.0 μ M, 50 μ M and 100 μ M). DA-DKP gave a dose-dependent increase in ECIS (TER), with 100 μ M giving the greatest increase.

Example 3: Effect of DA-DKP on Actin Stress Fiber Formation

Passage 12 human retinal endothelial cells (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (exclusive distributor for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) were seeded into 16-chamber glass slides coated with 5 μ g/cm² fibronectin at 5000 cells per well in a total volume of 200 μ l of EGM-2 medium (Lonza). The slides were cultured in a 37 C incubator with 5% CO₂ for 48 hours with daily medium changes. Then, the test compounds (DA-DKP, S1P and TNF α), diluted in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Lonza), were added to give the following final concentrations: DA-DKP (100 μ M) (Sigma), TNF α (1 ng/ml) (Sigma), and S1P (1 μ M) (Sigma). The slides were incubated with the test compounds for 15 minutes or 3 hours in a 37 C incubator with 5% CO₂. After this incubation, the medium was aspirated, and the cells were fixed using 3.6% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for ten minutes at room temperature. All wells were then washed two times with 100 μ l PBS. The cells were permeabilized using a 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 minutes. All wells were then washed two times with 100 μ l PBS, and 50 μ l of a 1:40 dilution of rhodamine-phalloidin (Invitrogen) in PBS was added to the cells to stain for F-actin and left on the cells for 20 minutes at room temperature. All wells were then washed two times with 100 μ l PBS. Then 100 μ l PBS was added to each well and the cells were observed and photographed using an inverted microscope using a rhodamine (ex530/em590) filter.

The retinal endothelial cells treated with DA-DKP alone showed diffuse membrane f-actin staining at 15 minute and at 3 hours. With TNF α alone, stress fibers were seen at all times, with the number of cells exhibiting stress fibers and the thickness of the fibers increasing from 15 minutes to 3 hours. DA-DKP decreased the stress fiber formation and/or the thickness of the fibers caused by TNF α at both times. Cells treated with S1P alone showed actin cortical rings, at 15 minutes and 3 hours. DA-DKP seemed to enhance the cortical rings at 15 minutes and 3 hours.

S1P (sphingosine-1 phosphate) plays a very important function in the formation and maintenance of vascular endothelium. S1P is a constitutive signaling input that facilitates the organization and barrier function of the vascular endothelium through its effects on the actin cytoskeleton. In particular, S1P is involved in the formation of cortical actin fibers and organization of the adherens junctions. Depletion of S1P leads to vascular leak and edema, and S1P can reverse endothelial dysfunction and restore barrier function.

In this experiment, DA-DKP exhibited an ability to strengthen the protective effects of S1P in retinal endothelial cells. DA-DKP also reversed the formation of stress fibers induced by TNF α . Diffuse perinuclear staining is seen in cells treated with DA-DKP alone.

Example 4: Effect of DA-DKP on RhoA

Remodeling of the endothelial cell cytoskeleton is central to many functions of the endothelium. The Rho family of small GTP-binding proteins have been identified as key regulators of F-actin cytoskeletal dynamics. The Rho family consists of three isoforms, RhoA, RhoB and RhoC. The activation of RhoA activity leads to prominent stress fiber formation in endothelial cells. Stimulation of endothelial cells with thrombin increases Rho GTP and myosin phosphorylation, consistent with increased cell contractility. Inhibition of RhoA blocks this response and the loss of barrier function, demonstrating a critical role for Rho in vascular permeability.

This experiment was performed using a commercially-available Rho activation assay (GLISA) purchased from Cytoskeleton, Denver, Colorado, following the manufacturer's protocol. Briefly, passage 8 or 12 human retinal endothelial cells (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) were cultured on fibronectin-coated (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 6-well tissue culture plates using EGM-2 culture medium (Lonza) for 24 hours in a 37°C incubator with 5% CO₂ (30,000 cells /well in total volume of 3 ml). Then, the medium was aspirated and replaced with Ultraculture medium

supplemented with 0.1% fetal bovine serum, L-glutamine, sodium pyruvate, penicillin/streptomycin and ITSS (insulin, transferrin sodium selenium) (all from Lonza) to serum starve the cells and reduce the background level of RhoA. The cells were cultured for 24 hours in a 37°C incubator with 5% CO₂. Test compounds diluted in HBSS were placed in the incubator to equilibrate before addition to the cells. Then, 150 µl of each test compound was added to the appropriate culture wells, and the plates were incubated in the incubator for an additional 15 minutes. Then, thrombin was added to appropriate wells. After 1 minute, the cells were washed one time with 1.5 ml phosphate buffered saline and were then lysed with 100 µl GLISA lysis buffer supplemented with protease inhibitors. The extracts were scraped, transferred to microcentrifuge tubes and transferred to ice to preserve the active form of RhoA. All extracts were then cleared of debris by spinning at 10,000 rpms for 2 minutes at 4°C. The supernatants were transferred to new tubes and placed back on ice. Aliquots of each extract were removed for the GLISA assay and for protein determinations. All protein concentrations were within 10%, and the extracts were used at the achieved concentrations (equates to 15 µg total protein per well). The GLISA assay was performed using the reagents supplied in the kit.

The results for the passage 12 retinal endothelial cells are presented in Table 1 below. As expected, the active Rho A levels induced by thrombin were very high. All of the test compounds inhibited the thrombin-induced activation of Rho A.

The results for the passage 8 retinal endothelial cells are presented in Table 2 below. As expected, the active Rho A levels induced by thrombin were very high. All of the test compounds inhibited the thrombin-induced activation of Rho A.

TABLE 1

Treatment	Mean OD	Percent Inhibition vs. Untreated Control	Percent Inhibition vs. Thrombin
Untreated	0.455	---	---
100 µM DA-DKP	0.389	14.52	---
1.0 µM Dexamethasone	0.428	5.83	---
10.0 µM PI3 kinase inhibitor LY 294002	0.370	18.70	---
1.0 µM Src-1 Inhibitor*	0.349	23.21	---
0.1 U/ml Thrombin	1.013	---	---
0.1 U/ml Thrombin + 100 µM DA-DKP	0.752	---	46.82
0.1 U/ml Thrombin + 1.0 µM Dexamethasone	0.826	---	33.48
0.1 U/ml Thrombin + 10.0 µM PI3 kinase inhibitor LY294002	0.685	---	58.73
0.1 U/ml Thrombin + 1.0 µM Src-1 Inhibitor	0.534	---	85.85

* Obtained from Sigma.

TABLE 2

Treatment	Mean OD	Percent Inhibition vs. Untreated Control	Percent Inhibition vs. Thrombin
Untreated	0.102	---	---
100 μ M DA-DKP	0.110	-7.88	---
10.0 μ M PI3 kinase inhibitor LY 294002	0.056	45.32	---
0.1 U/ml Thrombin	0.561	---	---
0.1 U/ml Thrombin + 100 μ M DA-DKP	0.377	---	40.04
0.1 U/ml Thrombin + 10.0 μ M PI3 kinase inhibitor LY294002	0.433	---	27.86

Example 5: Effect of MR-DKP on ECIS

Assays were performed to determine the effect of MR-DKP (a diketopiperazine wherein R¹ in formula I is the side chain of methionine and R² is side chain of arginine) on transendothelial electrical resistance (TER) of passage 6 human retinal endothelial cells (Applied Cell Systems Corporation (exclusive distributor for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Electrical resistance was measured using the electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) system (ECISZ0, obtained from Applied Biophysics) with 8-well multiple electrode plates (8W10E). Each well of the plates was stabilized by adding 250 μ l of 10 mM cysteine (Sigma) in sterile water to each well and incubating for 30 minutes at room temperature. The wells were then washed two times with 150 μ l of sterile water to remove the cysteine. All wells were then coated with 10 μ g/cm² collagen by diluting the stock solution (0.5 mg/ml Type IV collagenin 0.25% acetic acid (Sigma) in sterile water and adding 150 μ l of the resulting solution to each well. The collagen solution was incubated on the plates at 37°C for 120 minutes and then removed. The wells were washed two times with 400 μ l sterile water to remove the collagen. Next, 400 μ l of EGM-2 culture medium (Lonza) was added to each well. The

85

plates were connected to the ECISZ0 system and were electrically stabilized. The EGM-2 medium was aspirated and replaced with 400 μ l of EGM-2 culture medium containing 100,000 cells per well. The plates were reconnected to the ECISZ0 system and incubated for 24 hours in a 37 C incubator with 5% CO₂. The EGM-2 medium was aspirated and replaced with 400 μ l of EGM-2 culture medium. The plates were reconnected to the ECISZ0 system and incubated for 2 hours in a 37 C incubator with 5% CO₂. Solutions of the test compound in HBSS were prepared and placed in the incubator to equilibrate. The test compound was then added to appropriate wells at the following final concentrations: MR-DKP (50 μ M and 100 μ M). ECIS (resistance) was monitored for 50 hours.

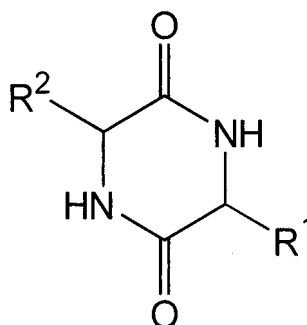
In the retinal endothelial cells, both 50 μ M and 100 μ M MR-DKP showed an increase in ECIS as compared to untreated cells starting at about 15 hours, becoming significant at about 18 hours. The increase was around 20% at its maximum. For the 100 μ M group, the increase persisted for the remainder of the experiment, reaching significance again at about 33 hours. For the 50 μ M group, at around 28-29 hours, the resistance returned to the levels of the control, but increased again beginning at about 30 hours, reaching significance at about 33 hours, and the increase persisted for the remainder of the experiment. In addition, the 50 μ M group showed a brief elevation in resistance from 2-5 hours.

Example 6: Effect of YE-DKP on ECIS

Example 5 was repeated, except that the diketopiperazine used was YE-DKP (a diketopiperazine wherein R¹ in formula I is the side chain of glutamic acid and R² is the side chain of tyrosine). In the retinal endothelial cells, 50 μ M YE-DKP did not show a significant increase in ECIS, but 100 μ M YE-DKP showed an increase in ECIS as compared to untreated cells starting at about 6 hours, becoming significant at about 12 hours. The increase was about 20% at its maximum. At around 28 hours, the resistance returned to the levels of the control, but increased again beginning at about 29 hours, reaching significance at about 33 hours, and the increase persisted for the remainder of the experiment.

WHAT IS CLAIMED:

1. A method of inhibiting vascular hyperpermeability in an animal in need thereof comprising administering to the animal an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them, wherein the
- 5 diketopiperazine has the following formula:



I

wherein:

R^1 and R^2 , which may be the same or different, each is:

- 10 (a) a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is glycine, alanine, valine, norvaline, α -aminoisobutyric acid, 2,4-diaminobutyric acid, 2,3-diaminobutyric acid, leucine, isoleucine, norleucine, serine, homoserine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, homoarginine, citrulline, phenylalanine,
- 15 *p*-aminophenylalanine, tyrosine, tryptophan, thyroxine, cysteine, homocysteine, methionine, penicillamine or ornithine;
- (b) R^1 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline and/or R^2 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring
- 20 nitrogen forms proline or hydroxyproline; or
- (c) a derivative of a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is one of those recited in (a), and the derivatized side chain has:
- (i) an $-\text{NH}_2$ group replaced by an $-\text{NHR}^3$ or $-\text{N}(\text{R}^3)_2$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl,
- 25 heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;

- (ii) an -OH group replaced by an -O-PO₃H₂ or -OR³ group, wherein each R³ may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (iii) a -COOH group replaced by a -COOR³ group, wherein each R³ may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (iv) a -COOH group replaced by a -CON(R⁴)₂ group, wherein each R⁴ may independently be H or a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (v) an -SH group replaced by -S-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH or -S-S-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH ;
 - (vi) a -CH₂- group replaced by a -CH(NH₂)- or a -CH(OH)- group;
 - (vii) a -CH₃ group replaced by a -CH₂-NH₂ or a -CH₂-OH group; and/or
 - (viii) an H which is attached to a carbon atom replaced by a halogen.
2. The method of Claim 1 wherein the animal is in need of the diketopiperazine, prodrug or salt because of the presence of a disease or condition mediated by vascular hyperpermeability.
3. The method of Claim 2 wherein administration of the diketopiperazine, prodrug or salt is commenced immediately upon diagnosis of the disease or condition.
4. The method of Claim 2 wherein the disease or condition is a vascular complication of diabetes.
5. The method of Claim 4 wherein the vascular complication is edema, accumulation of low density lipoproteins in subendothelial space, accelerated atherosclerosis, accelerated aging of vessel walls in the brain, myocardial edema, myocardial fibrosis, diastolic dysfunction, diabetic cardiomyopathy, retardation of lung development in the fetuses of diabetic mothers, alterations of one or more pulmonary physiological parameters, increased susceptibility to infections, vascular hyperplasy in the mesentery, diabetic neuropathy, diabetic macular edema, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, or redness, discoloration, dryness and ulcerations of the skin.
6. The method of Claim 5 wherein the vascular complication is edema.
7. The method of Claim 5 wherein the vascular complication is diabetic cardiomyopathy.
8. The method of Claim 5 wherein the vascular complication is diabetic neuropathy.

9. The method of Claim 5 wherein the vascular complication is diabetic macular edema.
10. The method of Claim 5 wherein the vascular complication is diabetic retinopathy.
- 5 11. The method of Claim 10 wherein the diabetic retinopathy is nonproliferative diabetic retinopathy.
12. The method of Claim 5 wherein the vascular complication is diabetic nephropathy.
13. The method of Claim 2 wherein the disease or condition is an acute lung
10 injury, acute respiratory distress syndrome, age-related macular degeneration, atherosclerosis, choroidal edema, choroiditis, coronary microvascular disease, cerebral microvascular disease, diabetes, Eals disease, edema caused by injury, edema associated with hypertension, glomerular vascular leakage, hemorrhagic shock, hypertension, Irvine Gass Syndrome, ischemia, macular edema, nephritis, nephropathies, nephrotic edema,
15 nephrotic syndrome, neuropathy, organ failure due to edema, pre-eclampsia, pulmonary edema, pulmonary hypertension, renal failure, retinal edema, retinal hemorrhage, retinal vein occlusion, retinitis, retinopathy, silent cerebral infarction, systemic inflammatory response syndrome, transplant glomerulopathy, uveitis, vascular leakage syndrome, vitreous hemorrhage or Von Hippel Lindau disease.
- 20 14. The method of Claim 13 wherein the disease or condition is a macular edema.
15. The method of Claim 13 wherein the disease or condition is a neuropathy.
16. The method of Claim 13 wherein the disease or condition is a retinopathy.
17. The method of Claim 1 wherein the animal is in need of the
25 diketopiperazine, prodrug or salt because of one or more early signs of, or a predisposition to develop, a disease or condition mediated by vascular hyperpermeability.
18. The method of Claim 17 wherein the disease or condition is diabetes, hypertension or atherosclerosis.
19. The method of Claim 1 wherein the vascular hyperpermeability is vascular
30 hyperpermeability of a continuous endothelium found in, or around, a brain, diaphragm, duodenal musculature, fat, heart, kidney, large blood vessel, lung, mesentery, nerve, retina, skeletal muscle, skin or testis.
20. The method of Claim 19 wherein the continuous endothelium is found in, or around, a brain, heart, lung, nerve or retina.

21. The method of Claim 1 wherein the vascular hyperpermeability is vascular hyperpermeability of a fenestrated endothelium found in, or around, a kidney, a pancreas, an adrenal, an endocrine gland or an intestine.

22. The method of Claim 21 wherein the fenestrated endothelium is found in a kidney.

23. The method of any one of Claims 1-22 wherein R^1 , R^2 or both is the side chain of aspartic acid or glutamic acid or a derivative of such a side chain wherein the -COOH group is replaced by a $-COOR^3$ group or a $-CON(R^4)_2$ group, wherein R^3 and R^4 are defined as in Claim 1.

24. The method of Claim 23 wherein R^1 is the side chain of aspartic acid or glutamic acid, and R^2 is the side chain of alanine or tyrosine.

25. The method of Claim 24 wherein R^1 is the side chain of aspartic acid, and R^2 is the side chain of alanine.

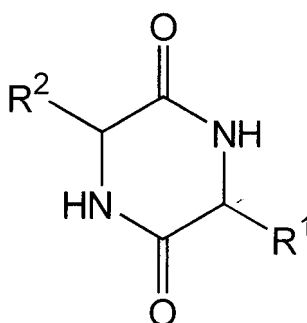
26. The method of any one of Claims 1-22 wherein R^1 , R^2 or both is the side chain of methionine or arginine.

27. The method of Claim 26 wherein R^1 is the side chain of methionine, and R^2 is the side chain of arginine.

28. The method of any one of Claims 1-27 wherein the diketopiperazine, prodrug or salt is administered orally.

29. The method of any one of Claims 1-28 wherein the animal is a human.

30. A method of modulating a cytoskeleton of an endothelial cell in an animal comprising administering an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them to the animal, wherein the diketopiperazine has the formula:



I

wherein:

R^1 and R^2 , which may be the same or different, each is:

- (a) a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is glycine, alanine, valine, norvaline, α -aminoisobutyric acid, 2,4-diaminobutyric acid, 2,3-diaminobutyric acid, leucine, isoleucine, norleucine, serine, homoserine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, homoarginine, citrulline, phenylalanine, *p*-aminophenylalanine, tyrosine, tryptophan, thyroxine, cysteine, homocysteine, methionine, penicillamine or ornithine;
- (b) R^1 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline and/or R^2 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline; or
- (c) a derivative of a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is one of those recited in (a), and the derivatized side chain has:
 - (i) an $-\text{NH}_2$ group replaced by an $-\text{NHR}^3$ or $-\text{N}(\text{R}^3)_2$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (ii) an $-\text{OH}$ group replaced by an $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ or $-\text{OR}^3$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (iii) a $-\text{COOH}$ group replaced by a $-\text{COOR}^3$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (iv) a $-\text{COOH}$ group replaced by a $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$ group, wherein each R^4 may independently be H or a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
 - (v) an $-\text{SH}$ group replaced by $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ or $-\text{S}-\text{S}-\dot{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$;
 - (vi) a $-\text{CH}_2-$ group replaced by a $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ or a $-\text{CH}(\text{OH})-$ group;
 - (vii) a $-\text{CH}_3$ group replaced by a $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ or a $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group; and/or
 - (viii) an H which is attached to a carbon atom replaced by a halogen.

31. The method of Claim 30 wherein the modulation of the cytoskeleton includes inhibition of actin stress fiber formation.

32. The method of Claim 30 wherein the modulation of the cytoskeleton includes causing, increasing or prolonging the formation of cortical actin rings.

33. The method of Claim 30 wherein the modulation of the cytoskeleton includes inhibition of RhoA.

5 34. The method of any one of Claims 30-33 wherein R^1 , R^2 or both is the side chain of aspartic acid or glutamic acid or a derivative of such a side chain wherein the -COOH group is replaced by a -COOR³ group or a -CON(R⁴)₂ group, wherein R^3 and R^4 are defined as in Claim 30.

10 35. The method of Claim 34 wherein R^1 is the side chain of aspartic acid or glutamic acid, and R^2 is the side chain of alanine or tyrosine.

36. The method of Claim 35 wherein R^1 is the side chain of aspartic acid, and R^2 is the side chain of alanine.

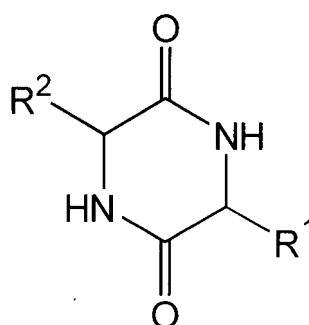
37. The method of any one of Claims 30-33 wherein R^1 , R^2 or both is the side chain of methionine or arginine.

15 38. The method of Claim 37 wherein R^1 is the side chain of methionine, and R^2 is the side chain of arginine.

39. A kit comprising:

(a) a container holding a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them; and

20 (b) instructions for administration of the diketopiperazine, the prodrug or the pharmaceutically-acceptable salt to perform a method according to any one of Claims 1-34, wherein the diketopiperazine has the formula:



I

wherein:

25 R^1 and R^2 , which may be the same or different, each is:

- (a) a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is glycine, alanine, valine, norvaline, α -aminoisobutyric acid, 2,4-diaminobutyric acid, 2,3-diaminobutyric acid, leucine, isoleucine, norleucine, serine, homoserine, threonine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, lysine, hydroxylysine, histidine, arginine, homoarginine, citrulline, phenylalanine, *p*-aminophenylalanine, tyrosine, tryptophan, thyroxine, cysteine, homocysteine, methionine, penicillamine or ornithine;
- (b) R^1 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline and/or R^2 is $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ or $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ and together with the adjacent ring nitrogen forms proline or hydroxyproline; or
- (c) a derivative of a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is one of those recited in (a), and the derivatized side chain has:
- (i) an $-\text{NH}_2$ group replaced by an $-\text{NHR}^3$ or $-\text{N}(\text{R}^3)_2$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (ii) an $-\text{OH}$ group replaced by an $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ or $-\text{OR}^3$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (iii) a $-\text{COOH}$ group replaced by a $-\text{COOR}^3$ group, wherein each R^3 may independently be a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (iv) a $-\text{COOH}$ group replaced by a $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$ group, wherein each R^4 may independently be H or a substituted or unsubstituted alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl or heteroaryl;
- (v) an $-\text{SH}$ group replaced by $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ or $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$;
- (vi) a $-\text{CH}_2-$ group replaced by a $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ or a $-\text{CH}(\text{OH})-$ group;
- (vii) a $-\text{CH}_3$ group replaced by a $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ or a $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group; and/or
- (viii) an H which is attached to a carbon atom replaced by a halogen.

40. The kit of Claim 39 wherein R^1 , R^2 or both is the side chain of aspartic acid or glutamic acid or a derivative of such a side chain wherein the $-\text{COOH}$ group is replaced by a $-\text{COOR}^3$ group or a $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$ group, wherein R^3 and R^4 are defined as in Claim 39.

41. The kit of Claim 40 wherein R^1 is the side chain of aspartic acid or glutamic acid, and R^2 is the side chain of alanine or tyrosine.

42. The method of Claim 41 wherein R^1 is the side chain of aspartic acid, and R^2 is the side chain of alanine.

5 43. The kit of Claim 39 wherein R^1 , R^2 or both is the side chain of methionine or arginine.

44. The kit of Claim 43 wherein R^1 is the side chain of methionine, and R^2 is the side chain of arginine.

ABSTRACT

The invention provides a method of inhibiting vascular hyperpermeability in an animal in need thereof. The method comprises administering an effective amount of a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of
5 either of them to the animal, wherein the diketopiperazine has the formula set forth in the specification.

The invention also provides a method of modulating the cytoskeleton of an endothelial cell in an animal. The method comprises administering an effective amount of a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt
10 of either of them to the animal, wherein the diketopiperazine has the formula set forth in the specification.

The invention further provides a kit. The kit comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them to the animal, wherein the diketopiperazine has the formula set forth in the specification.

DOC.
PRESENTACION
SOLICITUD
INTERNACIONAL

3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 March 2012 (15.03.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/033789 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 38/12 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) B65D 69/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2011/050612

(22) International Filing Date:

7 September 2011 (07.09.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/380,404 7 September 2010 (07.09.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **DMI ACQUISITION CORP.** [US/US]; The Quadrant, 5445 DTC Parkway, P4, Greenwood Village, CO 80111 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **BAR-OR, David** [US/US]; 900 E. Oxford Lane, Englewood, CO 80110 (US).

(74) Agents: **CONNELL, Gary, J.** et al.; Sheridan Ross P.C., 1560 Broadway, Suite 1200, Denver, CO 80202 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))



WO 2012/033789 A2

(54) Title: TREATMENT OF DISEASES

(57) Abstract: The invention provides a method of inhibiting vascular hyperpermeability in an animal in need thereof. The method comprises administering an effective amount of a diketopiperazme, a prodrug of a diketopiperazme or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them to the animal, wherein the diketopiperazme has the formula set forth in the specification. The invention also provides a method of modulating the cytoskeleton of an endothelial cell in an animal. The method comprises administering an effective amount of a diketopiperazme, a prodrug of a diketopiperazme or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them to the animal, wherein the diketopiperazme has the formula set forth in the specification. The invention further provides a kit. The kit comprises a diketopiperazme, a prodrug of a diketopiperazme or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them to the animal, wherein the diketopiperazme has the formula set forth in the specification.

AMD/SAC
PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: GARY J. CONNELL SHERIDAN ROSS P.C. 1560 BROADWAY SUITE 1200 DENVER, CO 80202	NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION (PCT Rule 44.1)
RECEIVED APR 16 2012 SHERIDAN ROSS, P.C. DOCKETING DEPT.	Date of mailing (day month year) 11 APR 2012
Applicant's or agent's file reference 6134-109-PCT	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US 11/50612	International filing date (day month year) 07 September 2011 (07.09.2011)
Applicant DMI ACQUISITION CORP.	

1.	☒	The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith. Filing of amendments and statement under Article 19: The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46): When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report. Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland. Facsimile No.: +41 22 338 82 70 For more detailed instructions, see PCT Applicant's Guide, International Phase, paragraphs 9.004 – 9.011.
2.	☐	The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3.	☐	With regard to any protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that: ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with any request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices. ☐ no decision has been made yet on the protest: the applicant will be notified as soon as a decision is made.
4.		Reminders The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. Following the expiration of 30 months from the priority date, these comments will also be made available to the public. Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau before the completion of the technical preparations for international publication (Rules 90bis.1 and 90bis.3). Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices. In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months. For details about the applicable time limits, Office by Office, see www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html and the <i>PCT Applicant's Guide, National Chapters</i> .

Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 Telephone No. PCT OSP: 571-272-7774
---	---

Form PCT/ISA/220 (July 2010)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 6134-109-PCT	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 11/50612	International filing date (day/month/year) 07 September 2011 (07.09.2011)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 07 September 2010 (07.09.2010)
Applicant DMI ACQUISITION CORP.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/50612

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 28-29 and 39-44
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I: claims 1-27, drawn to a method of inhibiting vascular hyperpermeability in an animal in need thereof comprising administering to the animal an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them, wherein the diketopiperazine is represented by formula I.

Group II: claims 30-38, drawn to a method of modulating a cytoskeleton of an endothelial cell in an animal comprising administering an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them to the animal, wherein the diketopiperazine is represented by formula I.

- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
group I: claims 1-27

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/50612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/497; A61K 31/4965 (2011.01) USPC - 514/254.05 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 514/254.05 (see search terms below) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 514/254.09; 514/255.02 (see search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO-WEST - PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB keywords: diketopiperazines, PAF antagonists, amino acid, side chain, alanine, aspartic acid, inhibit, vascular hyperpermeability, edema, diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, neuropathy, cardiomyopathy, macular edema, continuous endothelium, fenestrations, retinal endothelial cells, kidney. INTERNET sear														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	US 2002/0052381 A1 (BAR-OR et al.) 02 May 2002 (02.05.2002), para [0007] - [0015]; [0018]; [0020].	1-27												
Y	WO 2009/042193 A1 (GEORGE et al.) 02 April 2009 (02.04.2009), pg 5, ln 7 - pg 9, ln 37; pg 10, ln 24 - pg 11, ln 1; pg 35, ln 20-26, 28-30; pg 36, ln 5-6, 9-12.	1-27												
Y	SCHLINGEMANN et al., Role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in eye disease, Br J Ophthalmol 81, pp 501-512, 1997, pg 502, col 2, para 2; pg 503, col 2, para 1; pg 505, col 1, para 4; pg 505, col 1, para 6 - pg 505, col 2, para 1. Downloaded at http://bjo.bmj.com/content/81/6/501.full	19-22, 23-25/19-22												
Y	SAMANTA et al., Crystal Structure of Human Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase, Journal of Biological Chemistry Vol 283(46), pp 31617-31624, 14 November 2008, pg 31618 - pg 31621.	27												
X,P	WO 2012/033789 A2 (BAR-OR) 15 March 2012 (15.03.2012), pg 1, ln 21 - pg 3, ln 5; pg 6, ln 19 - pg 20, ln 5.	1-27												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐														
<table border="0"><tr><td>* Special categories of cited documents:</td><td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td></tr><tr><td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td></tr><tr><td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td><td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td></tr><tr><td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td><td>"&" document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td></td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 25 March 2012 (25.03.2012)		Date of mailing of the international search report 11 APR 2012												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774												

110

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/50612

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group II do not include the inventive concept of modulating a cytoskeleton of an endothelial cell in an animal, as required by Group II.

The inventions of Group I do not include the inventive concept of inhibiting vascular hyperpermeability in an animal in need thereof, as required by Group I.

The inventions of Groups I-II share the technical feature of an animal in need thereof comprising administering to the animal an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them, wherein the diketopiperazine is represented by formula I. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2002/0052381 A1 to Bar-Or et al. (hereinafter 'Bar-Or'). Bar-Or discloses a method of treating an animal in need thereof comprising administering to the animal an effective amount of an active ingredient (para [0015]), wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine (para [0008]), or a pharmaceutically-acceptable salt thereof (para [0018]), wherein the diketopiperazine is represented by formula I, wherein R1 and R2, which may be the same or different, each is: (a) a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is alanine and aspartic acid (para [0007], 3-methyl-2,5-diketopiperazine-6-acetic acid, DA-DKP). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Continuation of Section 4:

Claims 28-29 and 39-44 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

111

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To: GARY J. CONNELL
SHERIDAN ROSS P.C.
1560 BROADWAY
SUITE 1200
DENVER, CO 80202

Date of mailing
(day/month/year)

11 APR 2012

Applicant's or agent's file reference
6134-109-PCT

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US 11/50612

International filing date (day/month/year)

07 September 2011 (07.09.2011)

Priority date (day/month/year)

07 September 2010 (07.09.2010)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(8) - A61K 31/497; A61K 31/4965 (2011.01)

USPC - 514/254.05

Applicant DMI ACQUISITION CORP.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

25 March 2012 (25.03.2012)

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 11/50612

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 11/50612

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 28-29 and 39-44

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 28-29 and 39-44 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

Claims 28-29 and 39-44 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 28-29 and 39-44

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13~~ter~~. 1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

114

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 11/50612

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:

- ☐ paid additional fees
- ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
- ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
- ☒ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with
- ☒ not complied with for the following reasons:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1-27, drawn to a method of inhibiting vascular hyperpermeability in an animal in need thereof comprising administering to the animal an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them, wherein the diketopiperazine is represented by formula I.

Group II: claims 30-38, drawn to a method of modulating a cytoskeleton of an endothelial cell in an animal comprising administering an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them to the animal, wherein the diketopiperazine is represented by formula I.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group I do not include the inventive concept of modulating a cytoskeleton of an endothelial cell in an animal, as required by Group II.

The inventions of Group II do not include the inventive concept of inhibiting vascular hyperpermeability in an animal in need thereof, as required by Group I.

The inventions of Groups I-II share the technical feature of an animal in need thereof comprising administering to the animal an effective amount of an active ingredient, wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine, a prodrug of a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt of either of them, wherein the diketopiperazine is represented by formula I. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2002/0052381 A1 to Bar-Or et al. (hereinafter 'Bar-Or'). Bar-Or discloses a method of treating an animal in need thereof comprising administering to the animal an effective amount of an active ingredient (para [0015]), wherein the active ingredient comprises a diketopiperazine (para [0008]), or a pharmaceutically-acceptable salt thereof (para [0018]), wherein the diketopiperazine is represented by formula I, wherein R1 and R2, which may be the same or different, each is: (a) a side chain of an amino acid, wherein the amino acid is alanine and aspartic acid (para [0007], 3-methyl-2,5-diketopiperazine-6-acetic acid, DA-DKP). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

The applicant has elected NOT to pay for the additional invention, so only claim group I: claims 1-27 on the 206 should be searched.

Continuation of Section 4:

Claims 28-29 and 39-44 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

- ☐ all parts
- ☒ the parts relating to claims Nos. group I: claims 1-27

MS

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 11/50612

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

I. Statement

Novelty (N)	Claims	1-27	YES
	Claims	NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims	NONE	YES
	Claims	1-27	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-18, 23-25/1-18 and 26 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2002/0052381 A1 to Bar-Or et al. (hereinafter 'Bar-Or') in view of WO 2009/042193 A1 to George et al. (hereinafter 'George').

Regarding claim 1, Bar-Or discloses a method of inhibiting inflammation in an animal in need thereof comprising administering to the animal an effective amount of (para [0015]) an active ingredient, where the active ingredient i.e., a PAF inhibitor (para [0018]) comprises a diketopiperazine or a pharmaceutically-acceptable salt thereof (para [0015]), where the diketopiperazine has the formula I (para [0007] - [0014]; [0020]), where R1 and R2 are different (para [0010] - [0011]) and R1 is a side chain of an amino acid, where the amino acid is aspartic acid (para [0010]; [0012], Bar-Or's R1 is -CH2-C(O)-R3 and R3 is -OH); and R2 is a side chain of an amino acid, where the amino acid is alanine, arginine or methionine (para [0011]).

Bar-Or does not expressly disclose where such a method of inhibiting inflammation is also a method of inhibiting vascular hyperpermeability.

George discloses administering CCR2 antagonist compounds (pg 10, ln 24 - pg 11, ln 1) in combination with another therapeutic agent i.e., a PAF-antagonist (pg 35, ln 28-30) that can inhibit vascular hyperpermeability or edema (pg 35, ln 20-26) utilized for the treatment (pg 35, ln 22) of diseases (pg 5, ln 7 - pg 9, ln 37) such as cardiomyopathy (pg 6, ln 1), a diabetic condition such as diabetic retinopathy (pg 6, ln 36-37), chronic inflammation (pg 6, ln 37), diabetes (pg 7, ln 16), macular edema (pg 8, ln 33), diabetic nephropathy (pg 8, ln 35), neuropathy (pg 9, ln 25) or vascular hyperpermeability (pg 36, ln 5-6).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to add the teachings of George concerning utilizing a PAF-antagonist in combination therapy for inhibiting vascular hyperpermeability or edema and treating diseases such as a diabetic condition such as diabetic retinopathy, chronic inflammation, diabetes, macular edema, diabetic nephropathy or vascular hyperpermeability, to the teachings of Bar-Or concerning a method of inhibiting inflammation utilizing a PAF inhibitor diketopiperazine compound of formula I, as the technology is so similar (i.e., both teach utilizing PAF inhibitors/ antagonists in the inflammation therapeutic area); in order to practice the claim as described without undue experimentation. This would have provided for variation of the PAF inhibitor/antagonist therapeutic indication in order to have optimized the scope of the resultant treatment; given such practice in the art.

Regarding claim 2, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 1, as above, where the animal is in need of the diketopiperazine i.e., a PAF inhibitor (Bar-Or - para [0018]) or salt thereof (Bar-Or - para [0008]) because of the presence of a disease or condition e.g., diabetic cardiomyopathy (George - pg 6, ln 1, 36-37; pg 7, ln 16), diabetic retinopathy (George - pg 6, ln 36-37), diabetes (George - pg 7, ln 16), diabetic macular edema (George - pg 6, ln 36-37; pg 7, ln 16; pg 8, ln 33), diabetic nephropathy (George - pg 8, ln 35), or diabetic neuropathy (George - pg 6, ln 36-37; pg 7, ln 16; pg 9, ln 25), mediated by vascular hyperpermeability (George - pg 35, ln 20-26; pg 36, ln 5-6).

Regarding claim 3, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 2, as above, that provides a method of treating vascular hyperpermeability which comprises administration of a therapeutically effective amount of the diketopiperazine i.e., a PAF inhibitor (Bar-Or - para [0018]) or salt thereof of formula I (Bar-Or - para [0007] - [0014]; [0020]) to a mammal in need thereof (George - pg 36, ln 9-12). The combination of Bar-Or and George does not expressly disclose where such administration of the diketopiperazine is commenced immediately upon diagnosis of the disease or condition. This would have been encompassed within the knowledge level of one of ordinary skill.

Regarding claims 4-5, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 2, as above, where the disease or condition is a vascular complication of diabetes i.e., diabetic cardiomyopathy (George - pg 6, ln 1, 36-37; pg 7, ln 16), diabetic neuropathy (George - pg 6, ln 36-37; pg 7, ln 16; pg 9, ln 25), diabetic macular edema (George - pg 6, ln 36-37; pg 7, ln 16; pg 8, ln 33), diabetic nephropathy (George - pg 8, ln 35), or diabetic retinopathy (George - pg 6, ln 36-37).

Regarding claim 6, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 5, as above, where the vascular complication is diabetic macular edema (George - pg 6, ln 36-37; pg 7, ln 16; pg 8, ln 33).

-- see supplemental box --

116

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 11/50612

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

-- Box No. V(2) -- Citations and explanations:

Regarding claim 7, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 5, as above, where the vascular complication is diabetic cardiomyopathy (George - pg 6, ln 1, 36-37; pg 7, ln 16).

Regarding claim 8, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 5, as above, where the vascular complication is diabetic neuropathy (George - pg 6, ln 36-37; pg 7, ln 16; pg 9, ln 25).

Regarding claim 9, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 5, as above, where the vascular complication is diabetic macular edema (George - pg 6, ln 36-37; pg 7, ln 16; pg 8, ln 33).

Regarding claim 10, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 5, as above, where the vascular complication is diabetic retinopathy (George - pg 6, ln 36-37).

Regarding claim 11, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 10, as above, where the vascular complication is diabetic retinopathy (George - pg 6, ln 36-37). The combination of Bar-Or and George does not expressly disclose where the diabetic retinopathy species is nonproliferative diabetic retinopathy. This would have been encompassed within the knowledge level of, or determined without undue experimentation by, one of ordinary skill.

Regarding claim 12, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 5, as above, where the vascular complication is diabetic nephropathy (George - pg 8, ln 35).

Regarding claim 13, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 2, as above, where the disease or condition is diabetes (George - pg 7, ln 16), macular edema (George - pg 8, ln 33), neuropathy (George - pg 9, ln 25) or retinopathy (George - pg 7, ln 14).

Regarding claim 14, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 13, as above, where the disease or condition is a macular edema (George - pg 8, ln 33).

Regarding claim 15, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 13, as above, where the disease or condition is a neuropathy (George - pg 9, ln 25).

Regarding claim 16, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 13, as above, where the disease or condition is a retinopathy (George - pg 7, ln 14).

Regarding claim 17, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 1, as above, where the animal is in need of the diketopiperazine i.e., a PAF inhibitor (Bar-Or - para [0018]) or salt thereof (Bar-Or - para [0008]) because of the presence of a disease or condition e.g., diabetic cardiomyopathy (George - pg 6, ln 1, 36-37; pg 7, ln 16), diabetic retinopathy (George - pg 6, ln 36-37), diabetes (George - pg 7, ln 16), diabetic macular edema (George - pg 6, ln 36-37; pg 7, ln 16; pg 8, ln 33), diabetic nephropathy (George - pg 8, ln 35), or diabetic neuropathy (George - pg 6, ln 36-37; pg 7, ln 16; pg 9, ln 25), mediated by vascular hyperpermeability (George - pg 35, ln 20-26; pg 36, ln 5-6). The combination of Bar-Or and George does not expressly disclose where the animal is in need of the diketopiperazine because of one or more early signs of, or a predisposition to develop, a disease or condition mediated by vascular hyperpermeability. This would have been determined without undue experimentation by one of ordinary skill.

Regarding claim 18, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 17, as above, where the disease or condition is diabetes (George - pg 7, ln 16).

Regarding claim 23/1-18, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 1-18, as above, where R1 is the side chain of aspartic acid or glutamic acid (Bar-Or - para [0010]; [0012], Bar-Or's R3 is -OH; [0020]).

Regarding claim 24/1-18, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 23, as above, where R1 is the side chain of aspartic acid or glutamic acid (Bar-Or - para [0010]; [0012], Bar-Or's R3 is -OH; [0020]) and R2 is the side chain of alanine or tyrosine (Bar-Or - para [0011]).

Regarding claim 25/1-18, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 24, as above, where R1 is the side chain of aspartic acid (Bar-Or - para [0007]; [0010]; [0012], Bar-Or's R3 is -OH; [0020]) and R2 is the side chain of alanine (Bar-Or - para [0007]; [0011]).

Regarding claim 26, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 1, as above, where R2 is the side chain of methionine or arginine (Bar-Or - para [0011]).

-- see supplemental box --

M7

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 11/50612

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

-- Citations and explanations --

Claims 19-22 and 23-25/19-22 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Bar-Or in view of George and in view of the article entitled, Role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in eye disease, by Schlingemann et al. (hereinafter 'Schlingemann').

Regarding claim 19, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 1, as above, for treating a disease or condition (George - pg 5, ln 7 - pg 9, ln 37; pg 35, ln 22) e.g., diabetic retinopathy (George - pg 6, ln 36-37) mediated by vascular hyperpermeability (George - pg 35, ln 20-26; pg 36, ln 5-6). The combination of Bar-Or and George does not expressly disclose where the vascular hyperpermeability is vascular hyperpermeability of a continuous endothelium found in, or around, a kidney or retina. The suggestion of such is provided for by Schlingemann.

Schlingemann discloses that a) diabetic retinopathy (DR) is characterised by the development of microvascular leakage and focal areas of retinal ischaemia in non-proliferative DR (NPDR) (pg 505, col 1, para 4). More localised retinal expression of VEGF may only lead to increased microvascular permeability as recent work suggest that VEGF is also upregulated in NPDR (pg 505, col 1, para 6 - pg 505, col 2, para 1), b) two high affinity receptors for VEGF, named VEGFR-1 and VEGFR-2 have been characterised and are expressed on endothelial cells, including retinal endothelial cells (pg 502, col 2, para 2). Further, VEGF is expressed in glomeruli and collecting duct epithelium of the kidney (pg 503, col 2, para 1), and c) it was observed that exogenous VEGF can rapidly induce fenestrations in the continuous endothelium of skin and muscle in vivo (pg 503, col 2, para 1). Thus, it would have been suggested to one of ordinary skill that the vascular hyperpermeability is vascular hyperpermeability of a continuous endothelium found in, or around, a kidney or retina.

Regarding claim 20, the combination of Bar-Or, George and Schlingemann discloses the method of Claim 19, as above, where the continuous endothelium (Schlingemann - pg 503, col 2, para 1) is found in, or around, a retina (Schlingemann - pg 502, col 2, para 2).

Regarding claims 21-22, see the discussion set forth above for claim 19. The combination of Bar-Or, George and Schlingemann discloses the method of Claim 1, as above, where the vascular hyperpermeability is vascular hyperpermeability of a fenestrated endothelium (Schlingemann - pg 503, col 2, para 1) found in, or around, a kidney (Schlingemann - pg 503, col 2, para 1).

Regarding claim 23/19-22, the combination of Bar-Or, George and Schlingemann discloses the method of Claim 19-22, as above, where R1 is the side chain of aspartic acid or glutamic acid (Bar-Or - para [0010]; [0012], Bar-Or's R3 is -OH; [0020]).

Regarding claim 24/19-22, the combination of Bar-Or, George and Schlingemann discloses the method of Claim 23, as above, where R1 is the side chain of aspartic acid or glutamic acid (Bar-Or - para [0010]; [0012], Bar-Or's R3 is -OH; [0020]) and R2 is the side chain of alanine or tyrosine (Bar-Or - para [0011]).

Regarding claim 25/19-22, the combination of Bar-Or, George and Schlingemann discloses the method of Claim 24, as above, where R1 is the side chain of aspartic acid (Bar-Or - para [0007]; [0010]; [0012], Bar-Or's R3 is -OH; [0020]) and R2 is the side chain of alanine (Bar-Or - para [0007]; [0011]).

Claim 27 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Bar-Or in view of George and in view of the article entitled, Crystal Structure of Human Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase, by Samanta et al. (hereinafter 'Samanta').

Regarding claim 27, the combination of Bar-Or and George discloses the method of Claim 26, as above, where R1 is the side chain of aspartic acid (Bar-Or - para [0007]; [0010]; [0012], Bar-Or's R3 is -OH; [0020]) and R2 is the side chain of arginine (Bar-Or - para [0011]) and the diketopiperazine compound is a PAF inhibitor (Bar-Or - para [0018]). The combination of Bar-Or and George does not expressly disclose where R1 is the side chain of methionine. It would have been encompassed within the knowledge level of one of ordinary skill to have made such a PAF inhibitor structure variation in order to have optimized the resultant pharmacological activity; given such practice in the art. The motivation for such is provided for by Samanta.

Samanta discloses that the lipoprotein-associated function of human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) to hydrolyze oxidatively fragmented phospholipids suggests that the enzyme is a significant contributor to pathological conditions, such as inflammation. The development of specific and tight binding inhibitors of the enzyme would serve as effective treatments of such pathological conditions (pg 31621). Samanta discloses the crystal structure of PAF-AH and information concerning the active site of PAF-AH, the active site pocket and the active site residues therein (pg 31618 - pg 31620), coupled with molecular modeling software, would have enabled one of ordinary skill to have designed more selective inhibitors by varying the compound's physico-chemical properties and/or molecular orientation [through structure variation] to have provided for a better fit at the active site.

Claims 1-27 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

118



No. 13-089531- -00000-0000

Fecha: 2013-04-05 14:27:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 118

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE U

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐