

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

PIDOTIMOD PARA EL USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS CON LA INFLAMACIÓN

2 Datos del Solicitante

Nombre:	POLICHEM S.A.	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com
Dirección:	50, Val Fleuri, L-1526 Luxembourg, Luxemburgo	Domicilio/País de constitución:	LUXEMBURGO - LUXEMBOURG - LUXEMBOURG
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE Número: 959138-			

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1. POLICHEM S.A.	EE	959138

4 Datos del Inventor

Nombre:		Arnaldo CARUSO	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com
Dirección:		Via Daniele Comboni, 19 I-25123 Brescia (IT)	Domicilio/País de constitución:	ITALIA - LOMBARDIA - BRESCIA
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica				
Número:		-		
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1.	CARUSO Arnaldo	ITALIA		
2.	FIORENTINI Simona	ITALIA		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ITALIA	LOMBARDIA	BRESCIA	Via Daniele Comboni, 19 I-25123 Brescia (IT)
2.	ITALIA	LOMBARDIA	VILLA CARCINA	Via Angelo Canossi, 23 I-25069 Villa Carcina (BS) (IT)
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		JOSE ANDRES RINCON USCATEGUI	Dirección Electrónica:	arincon@bcrlegal.com

Dirección:		CARRERA. 4 No. 72-35	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 79780910-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/EP2014/069103	Fecha Solicitud:	08/09/2014
Número Publicacion:		WO 2015/036370 A1	Fecha Publicacion:	19/03/2015
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen EUROP PATENT ORGANIZATION(EPO)	Codigo del país EP	(31) No. Solicitud PCT/EP2013/068701	(32) Fecha 10/09/2013
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		18	Pago Reivindicaciones:	No
11	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 Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				

12 Documentos Anexos

- ☒ Reivindicaciones
- ☒ Descripción
- ☒ Dibujos y/o Figuras
- ☒ Resumen
- ☐ Certificado Depósito Material Biológico
- ☐ Uso de Conocimiento tradicional
- ☐ Listado de secuencias
- ☐ Artes finales 12 x 12 cm
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Otros Anexos

PIDOTIMOD PARA EL USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS CON LA INFLAMACIÓN

La presente invención se refiere a un nuevo uso del ingrediente activo Pidotimod, o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables de los mismos, para tratar enfermedades asociadas con la inflamación caracterizada por una hiperactivación aberrante de la vía no canónica de NFkB, tales como enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes u otras enfermedades inflamatorias basadas en mecanismos diferentes del alérgico o autoinmune.

ANTECEDENTES

El reconocimiento de los componentes microbianos durante la infección del huésped es un paso clave en la activación de la respuesta inmune innata seguido de la inducción de la expresión de genes inflamatorios. Los receptores de reconocimiento de patrones ejemplificados por los receptores tipo Toll (TLRs) son reguladores clave en la respuesta del huésped a los componentes bacterianos, virales y micóticos. Fundamental para esta respuesta es la capacidad para regular positivamente los genes implicados en la protección del huésped, el reclutamiento de células de inmunidad innata y adaptativa y la eliminación de patógenos. Aunque la respuesta inflamatoria mediada por TLR es crítica para proporcionar la defensa inmune frente a los patógenos, las respuestas disfuncionales pueden conducir a estados inflamatorios agudos y crónicos que se manifiestan como la sepsis, inflamación y autoinmunidad. Por lo tanto, la intensidad y la duración de las respuestas por TLR deben ser severamente controladas (Lord et al. 2009).

Además del TLR, la investigación reciente se ha centrado en el descubrimiento y caracterización de una nueva familia de genes inmunes, conocidos como CATERPILLAR o receptores tipo NOD. Las mutaciones en varios genes de NLR se han asociado con estados de enfermedad en humanos, incluyendo autoinmunidad e inflamación. Los miembros de la familia del gen NLR están involucrados en la regulación de la activación celular después de la exposición a productos específicos o múltiples derivados de patógenos. Los genes NLR están involucrados en la regulación de una variedad de procesos de defensa del huésped. La relevancia de los genes NLR está aparentemente más demostrado por el análisis genético de los pacientes que sufren de trastornos inmunes e inflamatorios (Lord et al. 2009)

Monarch-1, también llamado "receptor tipo NOD, que contiene el dominio pirina 12" (NLRP12), es el componente más conocido de NLRs. NLRP12 funciona como un regulador negativo de la señalización de TLR y NF- κ B inducida por TNFR en células humanas. NLRP12 bloquea la hiperfosforilación / activación de IRAK-1 (quinasa asociada a IL-1R) y facilita la degradación de quinasas inducidas por NF- κ B (NIK), lo que lleva a la reducción de la activación de NF- κ B (Lich et al. 2007).

El resultado de la señalización de NF- κ B activado por TLR es la producción de varias citoquinas inflamatorias, incluyendo TNF- α . La sobreproducción de esas citoquinas conduce a signos y síntomas de enfermedades inflamatorias como alergias, enfermedades autoinmunes y otras enfermedades inflamatorias crónicas / agudas. Las enfermedades más importantes que se asocian a una hiperactivación aberrante de la vía no canónica de NF- κ B son resumidas de la siguiente manera (de Imani Fooladi et al. 2013; Delunardo et al. 2013; Meneghini et al. 2013; Lv et al. 2013; Monaco et al. 2004; Zhang et al. 2013; Medeiros, LaFerla. 2013; Qu et al. 2012; Wenhong et al. 2012; Qi et al. 2012; Mori T et al. 2012):

- Enfermedades alérgicas, como rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, alergia atópica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, eczema y / o vasculitis alérgica.
- Enfermedades autoinmunes, como alopecia areata, espondilitis anquilosante, miocardiopatía autoinmune, enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, enteropatía autoinmune, hepatitis autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis, autoinmune, síndrome poliglandular autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, urticaria autoinmune, uveítis autoinmune, enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica, fibrosis quística, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA, artritis idiopática juvenil (o artritis reumatoide juvenil o enfermedad de Still), enfermedad de Kawasaki, liquen plano, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, fiebre reumática, síndrome de Sjögren, espondiloartropatía, arteritis temporal (o arteritis de células gigantes), la colitis ulcerosa, vasculitis urticarial, vitíligo.
- Enfermedades inflamatorias que son diferentes de enfermedades alérgicas o autoinmunes, como la enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, enfermedades crónicas del hígado, nefropatía crónica, gastritis,

glomerulonefritis, hepatitis A, B y C, hidradenitis supurativa, hipogammaglobulinemia, cistitis intersticial, liquen escleroso, esteatosis hepática, síndrome metabólico, obesidad, enfermedad de Parkinson, pénfigo vulgar, inflamación post-isquémica, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de piernas inquietas, la fibrosis retroperitoneal, trombocitopenia.

Pidotimod, cuyo nombre químico es ácido (4*R*)-3-(5-oxo-L-prolil)-1,3-tiazolidina-4-carboxílico, se dio a conocer por primera vez en IT1231723. Es una molécula del tipo péptido sintético provista de acción inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* (Giannulli et al., 2009). El sistema inmunológico interviene en el mantenimiento de un equilibrio homeostático entre nuestro cuerpo y todas las sustancias extrañas; por lo tanto, una anomalía en esta función puede provocar una respuesta defectuosa o aberrante hacia las propias estructuras, así como la pérdida de tolerancia hacia antígenos propios: en algunos casos, el error del sistema inmune se exhibe clínicamente como signos de la enfermedad.

Pidotimod ejerce una acción protectora hacia procesos infecciosos (aunque es libre de una acción antimicrobiana y antiviral directa), como se ha confirmado en modelos de infección bacterianas y virales experimentales y confirmado por un número de ensayos clínicos controlados. En particular, estudios *ex vivo* pusieron de relieve la capacidad de Pidotimod para incrementar la estimulación de la fagocitosis y la acción fagocítica relativa, así como la acción citotóxica de las células NK. Por otra parte, se encontró que Pidotimod aumenta la liberación de moléculas antivirales (IFN- α) inducida por estímulos específicos (Taramelli et al. 1994).

Se demostró que Pidotimod, administrado en tabletas por vía oral, es capaz de inducir una mayor resistencia a las infecciones virales en modelos animales, así como una mayor eficiencia en el tratamiento de infecciones respiratorias recurrentes en los pacientes pediátricos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que además es activo en el mantenimiento de las respuestas inmunes protectoras antimicrobianas. Pidotimod aumenta la transcripción y la síntesis de NLRP12 (Monarch 1), que participan en el control de la inflamación consiguiente con la activación de TLR. Este evento

inducido por Pidotimod conduce al control de la producción de mediadores inflamatorios liberados por las células inmunes a la estimulación por TLR. Por lo tanto, a través de este mecanismo recién descubierto, Pidotimod también es capaz de mitigar la vía inflamatoria subyacente a enfermedades asociadas con la inflamación caracterizadas por una hiperactivación aberrante de la vía no canónica de NFkB, donde NLRP12 juega un papel crucial.

La terapia con los medicamentos disponibles actúa sobre los efectores finales de la cascada inflamatoria, por ejemplo, mediante la unión del TNF o mediante la reducción de sus concentraciones, como anticuerpos monoclonales, o por la supresión del sistema inmunológico, como con los corticosteroides, que son la causa de una serie de efectos adversos después de un uso prolongado.

Por el contrario, mediante la activación de Monarch-1, Pidotimod es el único fármaco que actúa en las primeras etapas del mecanismo inflamatorio, desconectando la cascada de activación de NF-κB. En comparación con los anticuerpos monoclonales, su efecto es mucho más general y no dirigido en una sola citoquina inflamatoria. En comparación con los corticosteroides, Pidotimod es extremadamente seguro y no provoca los efectos tóxicos conocidos del tratamiento con cortisona a largo plazo.

Por consiguiente, el objeto de la presente invención está representado por el uso de Pidotimod, o sus estereoisómeros y/o sus sales fisiológicamente aceptables del mismo, en el tratamiento de enfermedades asociados con la inflamación caracterizadas por una hiperactivación aberrante de la vía no canónica de NFkB, tales como enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes y otras enfermedades inflamatorias basadas en mecanismos diferentes del alérgico o autoinmune.

Las enfermedades alérgicas que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención se pueden seleccionar de la rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, alergia atópica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, eczema y/o vasculitis alérgica

Las enfermedades autoinmunes que pueden ser tratadas de acuerdo con la presente invención se pueden seleccionar de alopecia areata, espondilitis anquilosante, cardiomiopatía autoinmune, enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, enteropatía autoinmune, hepatitis autoinmune, neuropatía autoinmune periférica, pancreatitis autoinmune, síndrome poliglandular autoinmune, púrpura

trombocitopénica autoinmune, urticaria autoinmune, uveítis autoinmune, enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica, fibrosis quística, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA, artritis idiopática juvenil (o artritis reumatoide juvenil, o enfermedad de Still), enfermedad de Kawasaki, liquen plano, lupus eritematoso, artritis reumatoide, fiebre reumática, síndrome de Sjögren, espondiloartropatía, arteritis temporal (o arteritis de células gigantes), colitis ulcerosa, vasculitis urticarial, vitíligo.

Las enfermedades inflamatorias basadas en mecanismos diferentes del alérgico o autoinmune que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención pueden ser seleccionadas de la enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, enfermedades crónicas del hígado, nefropatía crónica, gastritis, glomerulonefritis, hepatitis A, B y C, hidradenitis supurativa, hipogammaglobulinemia, cistitis intersticial, liquen escleroso, esteatosis hepática, síndrome metabólico, obesidad, enfermedad de Parkinson, pénfigo vulgar, inflamación post-isquémica, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, trombocitopenia.

Para el tratamiento de la presente invención, Pidotimod, o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo, se pueden administrar de forma sistémica y tópica.

Cuando se administra sistémicamente, puede ser en forma de formulaciones sólidas o líquidas que contienen Pidotimod, o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo, junto con al menos un excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable; tales formulaciones se pueden administrar por vía parenteral (es decir, intramuscular o intravenosa), por vía enteral (es decir, oral o rectal), en las formulaciones usuales adecuadas para la administración por las diferentes rutas.

Las formulaciones sólidas que se administran por vía sistémica pueden tener una concentración p/p en Pidotimod de 50% a 90%, más preferiblemente de 65% a 80%, más preferiblemente de 70% a 75%.

Las formulaciones líquidas que se administran por vía sistémica puede tener una concentración p/p en Pidotimod de 0,5% a 20%, más preferiblemente de 1% a 10%, más preferiblemente de 2% a 8%.

De acuerdo con una forma de realización de la invención, cuando se administra por vía oral, la cantidad de Pidotimod, o de sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo, puede variar de 10 a 1.000 mg por dosis unitaria, más preferiblemente de 50 a 800 mg por dosis unitaria.

Cuando se administra por vía tópica, puede ser en forma de formulaciones sólidas, semisólidas o líquidas que contienen Pidotimod, o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo, junto con al menos un excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable; dichas formulaciones se pueden administrar por vía cutánea, ocular, auricular, nasal, bucal, intranasal, endotraqueal, vaginal, intravesical, rectal, en las formulaciones usuales adecuadas para la administración por las diferentes rutas.

Tales formulaciones semi-sólidas o líquidas para administrar por vía tópica puede tener una concentración p/p en Pidotimod de 0,1% a 30%, más preferiblemente de 1% a 20%, más preferiblemente de 5% a 15%.

Tales formulaciones sólidas para ser administrado por vía tópica puede tener una concentración p/p en Pidotimod de 50% a 90%, más preferiblemente de 65% a 80%, más preferiblemente de 70% a 75%.

Las formulaciones sólidas, semi-sólidas o líquidas a ser utilizadas de acuerdo con la presente invención pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales, pueden contener excipientes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, y también pueden contener, en combinación, uno o más activos principios con actividad complementaria o, en cualquier caso, actividad útil.

Las composiciones farmacéuticas y los usos de la presente invención se describen con más detalle por los siguientes ejemplos. Debe, sin embargo, tenerse en cuenta que estos ejemplos se dan a modo de ilustración y no de limitación.

EJEMPLO 1

La acción de Pidotimod, que justifica el uso del mismo de acuerdo con la invención, se ha demostrado mediante la prueba experimental capaz de controlar la activación inducida por TLR y la inflamación en las células monocíticas humanas y células monocíticas de sangre periférica.

1. Cultivo de monocitos humanos. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron de sangre periférica (recién extraída o capa leucocitaria). Se describe que los monocitos fueron luego derivados de las PBMCs por selección positiva utilizando perlas paramagnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotec) (Marini et al., 2008). Tras la purificación, las células se cultivaron en breve (de 24 a 72 horas) en un medio de cultivo completo (RPMI 1640 complementado con 10% de suero bovino fetal bajo en endotoxina certificado). Algunos experimentos se realizaron en una línea celular monocítica humana (MonoMac 6), crece de acuerdo con la sugerencia de colección de cultivos de tipo americano.
2. Tratamiento de la célula con pidotimod. PBMCs, monocitos humanos purificados primarios o MonoMac 6 fueron tratados con Pidotimod, en concentraciones que van de 1 a 25 µg/ml y, a diferentes tiempos. En algunos experimentos, después de 6 a 48 horas desde el inicio del tratamiento con Pidotimod, las células se lavaron y se cultivaron durante 6-24 horas en presencia y ausencia de ligandos óptimos TLR 1-9 (kit Human TLR1-9 Agonist, Invivogen).
3. Evaluación de la expresión de genes involucrados en la actividad de pidotimod. Tras la estimulación, se cosecharon las células y el ARN total se extrajo usando el mini kit RNeasy (Qiagen). Luego el RNA fue retro-transcrito y se sometió a amplificación. Se realizó PCR en tiempo real utilizando el kit de "Human RT2 Profiler PCR microarray" de acuerdo con el protocolo del fabricante (SABiosciences, Qiagen). Este kit permite un amplio análisis de la expresión de genes relacionados con la activación inmune, dando una importancia particular a la expresión de los mediadores de la inflamación.
4. Ensayos de inmunotransferencia e inmunoprecipitación. Se prepararon lisados celulares en tampón de lisis que contiene un cóctel inhibidor de proteasa (Roche). Se resolvieron los lisados de proteína mediante SDS-PAGE (8%) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa previamente bloqueadas durante 1 hora en TBS-Tween 20 (0,1%) que contenían 5% de BSA. Para detectar la presencia de NLRP12 citoplasmático, una primera incubación con el anticuerpo policlonal de cabra para NLRP12 (Santa Cruz Biotechnology) fue seguida por la adicción anticuerpo secundario de burro anti-cabra-HRP. Para los estudios de inmunoprecipitación, se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo para NLRP12 (Santa Cruz Biotechnology) para precipitar las proteínas en presencia de 20µl de perlas recubiertas de proteína A/G (proteína A/G plus, Santa Cruz Biotechnology) durante 12 horas a 4°C. Los complejos de proteínas se lavaron cuatro a seis veces, después se incubaron a 95°C durante 5 minutos y se resolvieron mediante inmunotransferencia como se describió anteriormente.

5. Conjunto de Transcripción. La capacidad de Pidotimod para reducir la inflamación inducida por señales de peligro potentes como LPS o de otro PAMPs se puso de relieve mediante la evaluación del nivel de ARNm específico para moléculas inflamatorias efectoras. Para este alcance el ARN total se extrajo usando el sistema de extracción automatizada semi Nuclisens Easymag (Biomerieux). El ARN fue entonces retro-transcrito en cDNA utilizando el "Kit de transcripción reversa de cADN de alta capacidad" (Applied Biosystems). Para llevar a cabo estudios de expresión génica, el ADNc derivado de células tratadas o no tratadas fue sometido a un PCR utilizando conjuntos de partidores-sonda específicos Taqman (Applied Biosystem). Los datos obtenidos se analizaron usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que utiliza el software Relative Quantification Study (Applied Biosystems). Los valores de Ct para cada gen se normalizaron a los valores de Ct para β -actina.

6. ELISA para la cuantificación de moléculas proinflamatorias inducidas por la estimulación de TLR. El aumento de la síntesis de citoquinas es la señal de la respuesta celular a la estimulación de TLR. Pidotimod controla la extensión de la inflamación mediante la regulación de la expresión de NLRP12 la cual reduce la amplificación de las señales inflamatorias provocadas por la activación de TLR. Los PBMCs y/o monocitos purificados son estimulados o no con una concentración óptima de cada ligando TLR al ser tratado previamente o no con 1 a 25 $\mu\text{g/ml}$ de Pidotimod, y el sobrenadante de los cultivos celulares recogidos después de 24 horas desde el inicio de la estimulación. La presencia de IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 y IL-1 β se cuantificó en el medio de cultivo a través de ensayos de ELISA (Endogen).

Resultados

Los estudios *in vitro* mostraron una actividad directa biológica de Pidotimod en células Monomac 6 humanas, y la capacidad de las mismas para controlar una respuesta inflamatoria exagerada que es perjudicial para el huésped. Esto se ha llevado a cabo mediante el monitoreo *in vitro* de los pasos de la inflamación inducidos por la estimulación TLRs y cómo están regulados por el tratamiento con Pidotimod en términos de citoquina y la liberación de quimioquinas. Además, el monitor de la actividad de pidotimod se produce mediante la evaluación de NLRP12 mediante el estudio de la capacidad de Pidotimod para aumentar su transcripción y expresión después del tratamiento con el compuesto.

La expresión de panel de genes asociados a la activación de las vías relacionadas con el receptor de reconocimiento de patrones entonces se analizó mediante el uso de conjuntos de transcripción. Después de 16 horas de tratamiento, Pidotimod (25 µg/ml) fue capaz de inducir un aumento significativo de la expresión de NLRP12 del receptor tipo NOD. El aumento de dos veces del ARNm de NLRP12 observado en el conjunto de genes en células estimuladas con Pidotimod en comparación con las no estimuladas, se confirmó mediante ensayos cuantitativos específicos de PCR en Tiempo - Real. El análisis de las células tratadas con diferentes concentraciones de Pidotimod (25, 5 y 1 µg/ml) a diferentes puntos de tiempo de estimulación (6, 16, 24, y 48 horas de tratamiento) confirmó este resultado, mostrando un pico de aumento de la expresión NLRP12 después de las 24 horas de estimulación cuando se utilizó 25 y 5 µg/ml de la molécula (Figura 1).

Los monocitos primarios derivados de la sangre periférica de donantes sanos fueron también susceptibles a este efecto de Pidotimod. En todas las muestras examinadas, purificadas a partir de 8 sujetos diferentes, se observó un aumento de la expresión del RNAm de NLRP12. Cuando se compara con las células no tratadas, los monocitos estimulados con Pidotimod a la concentración de 25 y 5 µg/ml mostraron mayores niveles de pico de RNAm de NLRP12 dentro de las 24 y 48 horas después del comienzo de la estimulación (Figura 2).

La expresión de la proteína NLRP12 siguió el curso de la expresión del ARNm. Los Monomac 6 fueron tratados durante 36 horas con Pidotimod a 5 µg/ml y el nivel de expresión de NLRP12 se evaluó por inmunotransferencia en la inmunoprecipitación de proteínas específicas. Se ha detectado una mayor cantidad de proteína NLRP12 en muestra derivadas de células cultivadas en presencia de Pidotimod en comparación con las no tratadas (Figura 3).

NLRP12 se ha definido como una proteína de regulación negativa que suprime la activación no canónica de NFκB y la expresión de quimioquinas p52-dependiente (Allen et al., 2012) y juega un papel crítico en la amortiguación de las posibles actividades proinflamatorias peligrosas que son activadas por agonistas de TLR tales como productos microbianos (Williams et al., 2005). Por lo tanto, se evaluó el efecto de Pidotimod en monocitos humanos primarios tratados con estímulos los cuales, ya que actúan a través de la TLRs, llevan a los monocitos a un fenotipo inflamatorio activado. El tratamiento con Pidotimod contrarresta la medida de los mediadores inflamatorios inducidos por agonistas de TLR. En todas las muestras evaluadas (8 muestras derivadas desde 8 donantes diferentes), los niveles de

MCP-1 específico disminuyeron constantemente, como se muestra representativamente en la Figura 4. Estos datos se confirmaron también cuando se evaluaron otras moléculas proinflamatorias clave (IL-6, IL-8 TNF-a e IL-1β) que muestran que Pidotimod controla la producción de estos mediadores en el nivel transcripcional.

Los datos obtenidos a nivel de RNAm se confirmaron por cuantificación de las moléculas inflamatorias presentes en los sobrenadantes celulares por ELISA. Este conjunto de resultados también fueron reproducibles cuando, en lugar de los monocitos purificados, se utilizaron PBMC total.

Por último, se ha evaluado si en el contexto de una estimulación de un TLR representativo con su agonista óptimo, el tratamiento previo de las células con Pidotimod controla la regulación negativa de NLRP12 inducida en monocitos por la estimulación de TLR (Williams et al., 2005). Los resultados mostrados en la Figura 5 subrayados cómo células cultivadas en presencia de Pidotimod son capaces de contrarrestar la disminución de la expresión de NLRP12 tanto para el nivel mensajero (panel izquierdo) y la proteína (panel derecho).

Estos datos muestran que Pidotimod es capaz de regular por incremento la expresión NLRP12 en monocitos. Por consiguiente, los monocitos responden a la activación de NLRP12 por regulación negativa, la producción de mediadores inflamatorios inducidos por agonistas de TLR controlando así la inflamación excesiva o inapropiada que pueden ser perjudiciales para el huésped.

EJEMPLO 2

Se preparó una solución para ser inyectada o bien para ser pulverizada en la cavidad nasal que tiene la siguiente composición p/V:

1. Pidotimod	6.7 %
2. Agentes tampón	0,05 %
3. Ajuste de pH	c.s.p pH 6,5
4. Agua para inyectables	c.s.p 100 %

Preparación: los componentes 1 a 3 se disolvieron en agua para inyectables y se mezclaron hasta obtener una solución homogénea con un pH de 6,5.

EJEMPLO 3

Se preparó una solución para la administración oral que tiene la siguiente

composición en % p/p:

1. Pidotimod	5,10%
2. Cloruro de sodio	0,07%
3. Edulcorante	0,06%
4. Agentes quelantes	0,05%
5. Trometamina	2,50%
6. Preservantes	0,15%
7. Solución de edulcorantes	31,89%
8. Agentes saborizantes	0,30%
9. Antioxidantes	0,07%
10. Agentes colorantes	0,01%
11. Agua purificada	59,80%

Preparación

En un recipiente disolver los componentes 1 a 10 en una cantidad adecuada de agua purificada. Mezclar hasta que se obtiene una solución transparente. Añadir la cantidad restante de agua, mezclar hasta que se obtiene una solución homogénea y filtrar.

EJEMPLO 4

Se preparó un comprimido para administración oral que tiene la siguiente composición en % p/p:

1. Pidotimod	72,70%
2. Diluyentes	17,65%
3. Disintegrantes	4,55%
4. Aglutinantes	4,00%
5. Agentes de deslizamiento	1,10%

Preparación

En un recipiente se mezclan los componentes 1 y 2. En otro recipiente, se disuelven el componente 4 en una cantidad adecuada de agua. Mezclar hasta que se obtiene una solución transparente. Pulverizar la solución obtenida en los componentes mezclados 1 y 2 hasta que se obtiene un granulado homogéneo. Después del secado, los componentes 3 y 5 se añaden a los gránulos obtenidos y se mezclan hasta que se obtiene una mezcla homogénea. Después, la mezcla se comprime por medio de una máquina de formación de comprimidos.

EJEMPLO 5

Se preparó una crema aceite en agua que tiene la siguiente composición en % p/p:

1. Pidotimod	10,00%
2. Agentes tampón	5,40%
3. Agente quelante	0,10%
4. Humectante	5,00%
5. Espesante	0,25%
6. Formador de película	0,50%
7. Emulsificante	15,50%
8. Emolientes	13,00%
9. Antioxidante	0,50%
10. Preservantes	1,00%
11. Agua purificada	c.s.p. 100,00%

Preparación

En el recipiente principal, solubilizar los componentes 1, 2, 3, 4, 5 en una parte de agua. Añadir goma Xanthan y dispersar completamente hasta homogeneidad. Por separado solubilizar el componente 7 en parte de agua, después añadirlo al recipiente principal mientras se agita. Calentar la fase a 70-75° C. En otro recipiente, combinar los componentes 8, 9, 10, 11, 12 y calentar a 70-75° C con agitación. Combinar las dos fases calentadas a la misma temperatura y homogeneizar durante aproximadamente 10 minutos. Enfriar a 40° y añadir secuencialmente los componentes 13 y 14, homogeneizando después de cada adición. Enfriar a temperatura ambiente bajo agitación moderada.

EJEMPLO 6

Se preparó una solución tópica que tiene la siguiente composición en % p/p:

1. Pidotimod	10,00%
2. Agentes tampón	5,15%
3. Agentes quelantes	0,10%
4. Humectantes	5,00%
5. Formador de película	1,00%
6. Agua purificada	c.s.p. 100,00%

Preparación

Solubilizar los componentes 1, 2, 3, 4, 6 en agua. Añadir componente 7 y mezclar hasta obtener una solución transparente.

REIVINDICACIONES

1. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo, para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la inflamación caracterizado por una hiperactivación aberrante de la vía no canónica de NFkB.
2. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dichas enfermedades son enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias basadas en mecanismos diferentes del alérgico y autoinmune.
3. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para su uso según la reivindicación 2, caracterizado porque dichas enfermedades alérgicas se seleccionan de rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, alergia atópica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, eczema y/o vasculitis alérgica.
4. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para su uso según la reivindicación 2, caracterizado porque dichas enfermedades autoinmunes se seleccionan de entre alopecia areata, espondilitis anquilosante, miocardiopatía autoinmune, enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, enteropatía autoinmune, hepatitis autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome autoinmune poliendocrino, púrpura trombocitopénica autoinmune, urticaria autoinmune, uveítis autoinmune, enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica, fibrosis quística, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, Nefropatía por IgA, artritis idiopática juvenil (o artritis reumatoide juvenil, o enfermedad de Still), enfermedad de Kawasaki, liquen plano, lupus eritematoso, artritis reumatoide, fiebre reumática, síndrome de Sjögren, espondiloartropatía, arteritis temporal (o arteritis de células gigantes), colitis ulcerosa, vasculitis urticarial , vitíligo.
5. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque dichas enfermedades inflamatorias basadas en mecanismos diferentes del alérgico y autoinmune se seleccionan de entre enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, enfermedades crónicas del hígado, nefropatía crónica,

gastritis, glomerulonefritis, hepatitis A, B y C hidradenitis supurativa, hipogammaglobulinemia, cistitis intersticial, liquen escleroso, esteatosis hepática, síndrome metabólico, obesidad, enfermedad de Parkinson, pénfigo vulgar, inflamación post-isquémica, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, trombocitopenia.

6. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se administra a un ser humano.
7. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se administra sistémicamente.
8. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque se administra por vía parenteral (intramuscular o intravenosa) o por vía enteral (oral o rectal).
9. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque se administra por medio de una formulación sólida o líquida.
10. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque dicha formulación sólida tiene concentración p/p en pidotimod o una sal fisiológicamente aceptable del mismo de 50% a 90%, más preferiblemente de 65% a 80%, más preferiblemente de 70% a 75%.
11. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para su uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicha formulación líquida tiene una concentración p/p en pidotimod o una sal fisiológicamente aceptable del mismo de 0,5% a 20%, más preferiblemente de 1% a 10%, más preferiblemente de 2% a 8%.
12. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para su uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicha formulación sólida contiene una cantidad de pidotimod o de una sal fisiológicamente aceptable del mismo, de 10 a 1.000 mg por dosis unitaria, más preferiblemente de 50 a 800 mg por dosis unitaria.
13. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se administra por vía tópica.

14. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sus sales fisiológicamente aceptables del mismo para uso según la reivindicación 13, caracterizado porque se administra por vía cutánea, ocular, auricular, nasal, bucal, intranasal, endotraqueal, vaginal, intravesical, o rectal.
15. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para su uso según la reivindicación 13, caracterizado porque se administra por medio de una formulación sólida, semisólida o líquida.
16. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque dicha formulación sólida tiene concentración p/p en pidotimod o una sal fisiológicamente aceptable del mismo de 50% a 90%, más preferiblemente de 65% a 80%, más preferiblemente de 70% a 75%.
17. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sus sales fisiológicamente aceptables del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque dicha formulación semi-sólida o líquida tiene una concentración p/p en pidotimod o una sal fisiológicamente aceptable del mismo de 0,1% a 30%, más preferiblemente de 1% a 20%, más preferiblemente de 5% a 15%.
18. Pidotimod o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se administra en combinación o en la proximidad temporal con al menos un principio activo adicional.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un nuevo uso del ingrediente activo Pidotimod, o sus estereoisómeros y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo, para tratar enfermedades asociadas con la inflamación caracterizadas por una hiperactivación aberrante de la vía no canónica de NFkB, tales como enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes u otras enfermedades inflamatorias basadas en mecanismos diferentes del alérgico o autoinmune.

Figura 5. Pidotimod (PDT) contrarresta la regulación negativa de NLRP12 inducida por el acoplamiento de TLR. NT: no se trata. LPS: lipopolisacárido.

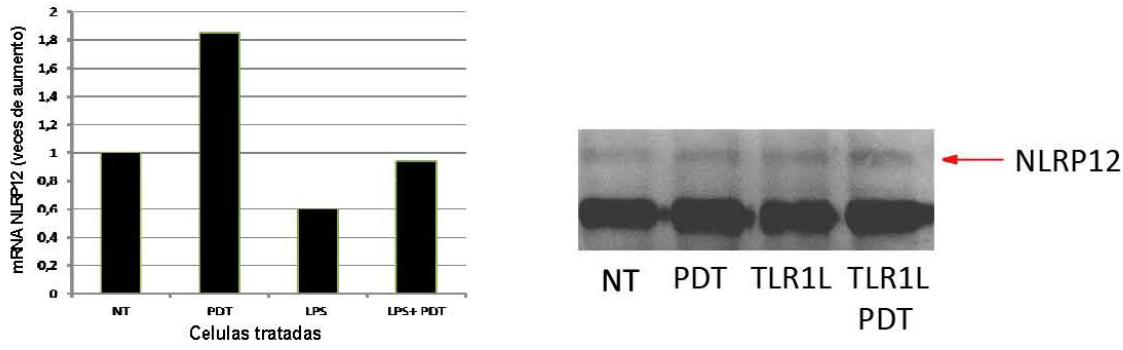


Figura 4. Disminución de la síntesis de MCP-1, inducida por la estimulación celular con agonistas de TLR, tras el tratamiento con Pidotimod (PDT) en monocitos. CTR: Control.

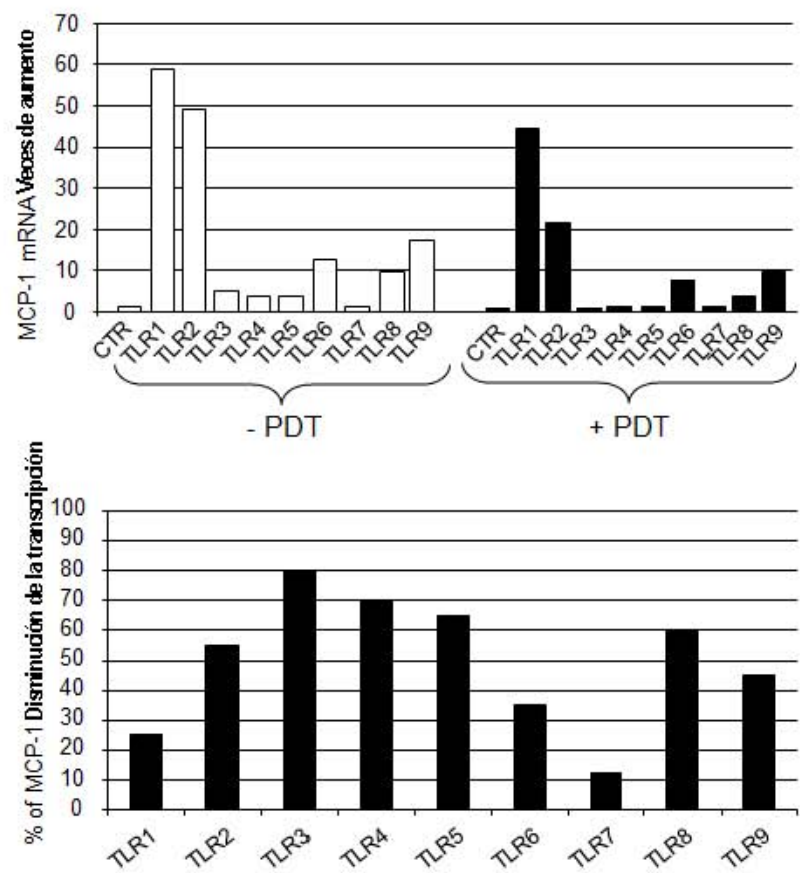


Figura 3. Modulación positiva de la proteína NLRP12 tras el tratamiento con Pidotimod (PDT) en línea celular MonoMac 6. NT: no tratado. MW: peso molecular.

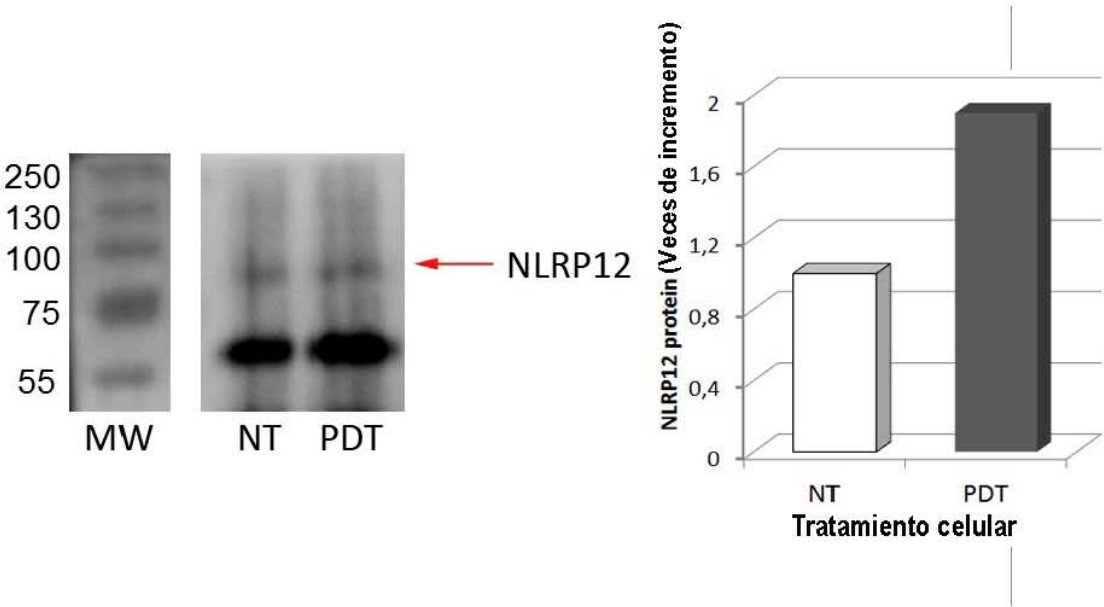


Figura 1. Modulación positiva de la transcripción de NLRP12 específicos bajo tratamiento con Pidotimod en la línea celular MonoMac 6

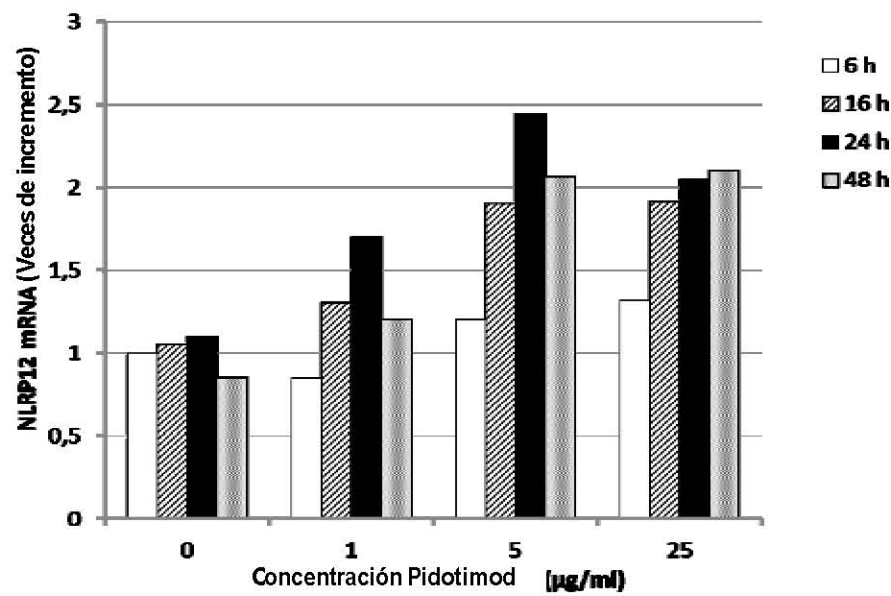


Figura 2. Modulación positiva de transcripción de NLRP12 específicos por tratamiento con Pidotimod en monocitos primarios humanos

