



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 666**

51 Int. Cl.:

C07K 5/06 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61P 9/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03773592 .5**

96 Fecha de presentación : **25.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1569953**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **Moduladores de uniones comunicantes de péptidos.**

30 Prioridad: **25.11.2002 US 428973 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.03.2011

73 Titular/es: **ZEALAND PHARMA A/S**
Smedeland 26B
2600 Glostrup, DK

72 Inventor/es: **Petersen, Jørgen, Søberg;**
Knudsen, Carsten, Boye y
Larsen, Bjarne, Due

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 353 666 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moduladores de uniones comunicantes de péptidos.

5 **Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a dipéptidos disponibles oralmente capaces de modular la comunicación por uniones comunicantes intracelulares. La presente invención también se refiere a procedimientos de utilización de los péptidos para modular dicha comunicación, a la utilización de los péptidos para la fabricación de medicamentos para la prevención y/o el tratamiento de condiciones patológicas asociadas con dicha comunicación y a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos dipéptidos.

15 **Antecedentes**

15 Existe un reconocimiento creciente de que la comunicación intercelular es esencial para la homeostasis, la proliferación y la diferenciación celular. Se cree que dicha comunicación está facilitada por uniones comunicantes. Se piensa que estas estructuras son una ruta para el acoplamiento de células y que permiten la “conversación cruzada”. Ver generalmente, Sperelakis, N., (1989) Cell Interactions and Gap Junctions by N. Sperelakis, William C. Cole (Editor).

20 Se han realizado esfuerzos para comprender la estructura y la función de las uniones comunicantes. Por ejemplo, se ha descrito que dichas uniones son un tipo de complejo formado entre células adyacentes. Se piensa que la mayoría de uniones comunicantes consisten en canales agregados que directamente enlazan los interiores (citoplasmas) de células vecinas. En mamíferos adultos, se encuentran uniones comunicantes en la mayoría de tipos de células con la excepción de elementos sanguíneos circulantes.

25 Más específicamente, existe el conocimiento de que las uniones comunicantes son regiones especializadas de la membrana celular con agrupaciones de cientos a miles de canales de uniones comunicantes densamente empaquetados (que comprenden dos hemicanales o conexinas). Se piensa que muchos conectan directamente los compartimentos citoplasmáticos de dos células vecinas. El canal de unión comunicante puede cambiar entre un estado abierto y un estado cerrado. En el estado abierto se piensa que los iones y las moléculas pequeñas pasan a través del poro. La conducción de impulsos eléctricos y la difusión intercelular de moléculas de señal tienen lugar a través de las uniones comunicantes.

30 La “conversación-cruzada” entre uniones comunicantes hace referencia a la comunicación intracelular por uniones comunicantes (GJIC), que se cree que juega un rol importante en la regulación del metabolismo celular, la proliferación, la señalización célula-a-célula, y la integridad tisular.

35 Por ejemplo, se cree que GJIC permite el equilibrado rápido de nutrientes, iones y fluidos entre las células. También se cree que las uniones comunicantes sirven de sinapsis eléctricas en células excitables eléctricamente. En muchos tejidos, se cree que el acoplamiento eléctrico permite la transmisión célula-a-célula más rápida de potenciales acciones que la sinapsis química. Por ejemplo, en cardiomiocitos y células musculares lisas, se cree que ayudan a la contracción sincrónica.

40 Se han descrito otras funciones mediadas por GJIC. Por ejemplo, se cree que GJIC mejora la sensibilidad de tejidos a estímulos externos. Generalmente, se cree que los segundos mensajeros son lo suficientemente pequeños como para que pasen de células activadas hormonalmente a células inactivas a través de canales de unión y activar a las segundas.

45 Adicionalmente, se ha descrito que las uniones comunicantes pueden proporcionar vías intercelulares para señales de desarrollo químico y/o eléctrico y ayudar en la definición de los límites de los compartimentos de desarrollo. Se ha descrito que la GJIC tiene lugar en patrones específicos en células embrionarias y la alteración de la GJIC se ha relacionado con anomalías de desarrollo y los efectos teratogénicos de muchos compuestos químicos. Además, se cree que GJIC ayuda en la coordinación de las actividades celulares.

50 Algunos han establecido una conexión entre anomalías en GJIC y se ha establecido un rango de estados de enfermedad tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, se piensa que hay una conexión entre anomalías en las conexinas y la enfermedad cardíaca. Diversos estudios de la expresión y la distribución de Cx43 en corazones describieron un grado reducido de expresión de Cx43 y un patrón cambiado de distribución para esta proteína de unión comunicantes. Véase Kaprielian, R. R., *et al.* (1998) *Circulation* 97: 651-660; y Saffitz, J. E., *et al.*, (1999) *Cardiovasc Res.* 42: 309-317.

55 Por consiguiente, se reconoce en el campo una relación entre una disfunción o la ausencia de uniones comunicantes y un riesgo incrementado de arritmias. Se piensa que existe una relación adicional entre la expresión/distribución alterada de conexinas y la enfermedad cardíaca crónica.

Se han hecho intentos por analizar péptidos que influyen en la GJIC. Por ejemplo, se ha descrito un grupo de péptidos (los péptidos antiarrítmicos) con capacidad de incrementar la conductancia de las uniones comunicantes en el corazón. En concreto, se describió un hexapéptido con un peso molecular de 470D que había sido aislado de aurículas bovinas. En cardiomiocitos de rata neonatal, se describió que el péptido podía convertir la fibrilación inducida por ouabaína, calcio, o potasio, en el ritmo normal. Además, se ha descrito que el péptido convierte el movimiento arrítmico de aurículas de rata aisladas inducidas mediante la combinación de potasio y acetilcolina en el ritmo normal. Este péptido es referido frecuentemente como péptido antiarrítmico (AAP). Ver, por ejemplo, Aonuma, S., *et al.* (1980) *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 28: 3332-3339.

Existe una mayor conciencia de que el AAP es un péptido importante con capacidad para modular la CJIC en el corazón.

Por ejemplo, en el cultivo celular, se ha observado que el AAP incrementa el número de centros palpitantes, el contenido relativo de las células de expansión, y la síntesis de proteínas. Véase, Aonuma, S., *et al.* (1980) *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 28: 3340-3346. En otros estudios, se ha confirmado el efecto antiarrítmico de APP observado *in vitro*. Se ha descrito que el AAP es eficaz contra la arritmia inducida por CaCl_2 , oubaína y acotinina en ratones. Véase Ronsberg, M.A., *et al.* (1986) *Med. Sci.* 14: 350-351.

Se ha descrito la secuencia de AAP. Véase por ejemplo, Aonuma, S., *et al.* (1982) *J Pharmacobiodyn.* 5: 40-48.

Se han hecho esfuerzos por preparar un conjunto de derivados de AAP. Véase, por ejemplo, Dikshit, M., *et al.* (1988) *Indian J. Exp. Biol.* 26: 874-876; Kohama, Y., *et al.* (1987) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 35: 3928-3930; y Kohama, Y., *et al.* (1988) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 36: 4597-4599.

Por ejemplo, uno de dichos derivados, AAP10, se cree que afecta la GJIC. Véase, Dhein, S., *et al.* (1994) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 350: 174-184; y Muller, A., *et al.* (1997) *Eur. J. Pharmacol.* 327: 65-72. Se ha descrito que el APP mejora la GJIC, reduce la potencial dispersión y mejora la conductancia.

Existe un creciente conocimiento de que muchos péptidos antiarrítmicos impactan positivamente la GJIC, a menudo sin afectar la duración o forma potencial de la acción. Además, se cree que muchos de dichos péptidos carecen de efectos secundarios proarrítmicos indeseables. Dichos efectos se cree que limitan la utilización de muchos fármacos antiarrítmicos actualmente disponibles. Además, el APP, así como ciertos derivados de APP, se cree que presentan algunas características no deseadas, por ejemplo, una estabilidad baja y la necesidad de dosis elevadas antes de conseguir la eficacia terapéutica.

Muchos péptidos potenciales importantes padecen de una falta de disponibilidad oral aceptable. Es decir, los péptidos son degradados en el tracto gastrointestinal, entericitos, o ambos. En dichos casos, los péptidos se administran a menudo a sujetos mediante rutas intravenosas más dolorosas y menos convenientes.

Han habido intentos para mejorar la disponibilidad oral de ciertos compuestos mediante el aumento del contacto con una proteína de transportadora de péptidos intestinales llamada PepT1. Se conoce mucho sobre el sistema transportador PepT1. Véase Bailey, P.D., *et al.* (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.* 39:506; y las referencias citadas en la misma.

Sería deseable tener péptidos moduladores eficaces de GJIC. Sería especialmente deseable tener péptidos moduladores que estén disponibles oralmente.

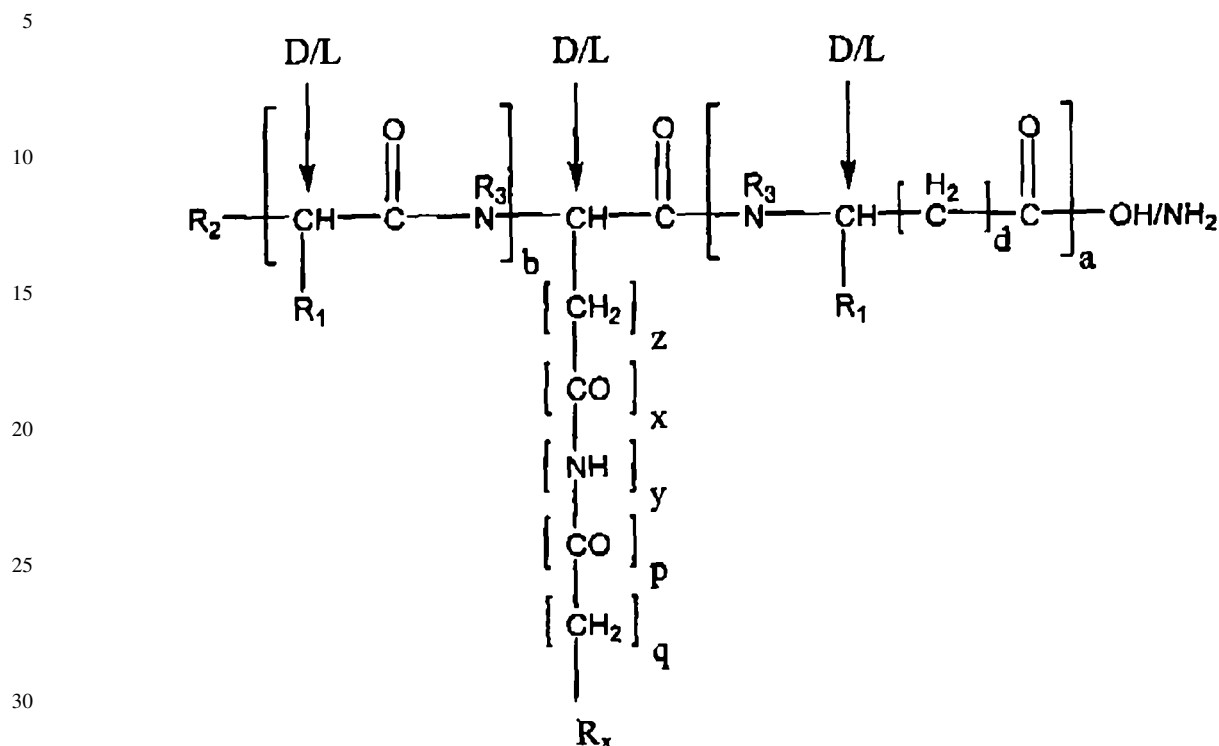
Seki *et al* (*Agric-Biol. Chem.*, 54(7):1811-1818, 1990) describen derivados de péptidos pequeños para su uso como edulcorantes.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere en general a péptidos que modulan la comunicación intercelular por unión comunicante (GJIC) tal como se establece en las reivindicaciones. Los péptidos preferidos están disponibles oralmente. La presente invención presenta un amplio espectro de aplicaciones útiles que incluyen la utilización en el tratamiento o prevención de patologías asociadas con una GJIC dañada.

ES 2 353 666 T3

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer un péptido para su utilización en terapia representado por la fórmula general I:



en la que:

a es 1 y b es 0; o

b es 1 y a es 0;

d es 0-8; y

z es 1-7; y

x es 1, y y q son 1, y p es 0; o

p es 1, x y q son 0, e y es 1;

y además en la que y además en la que,

si R_1 es H, entonces d es 0-8; o

si R_1 no es H, entonces d es 0;

en la que R_1 es la cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina;

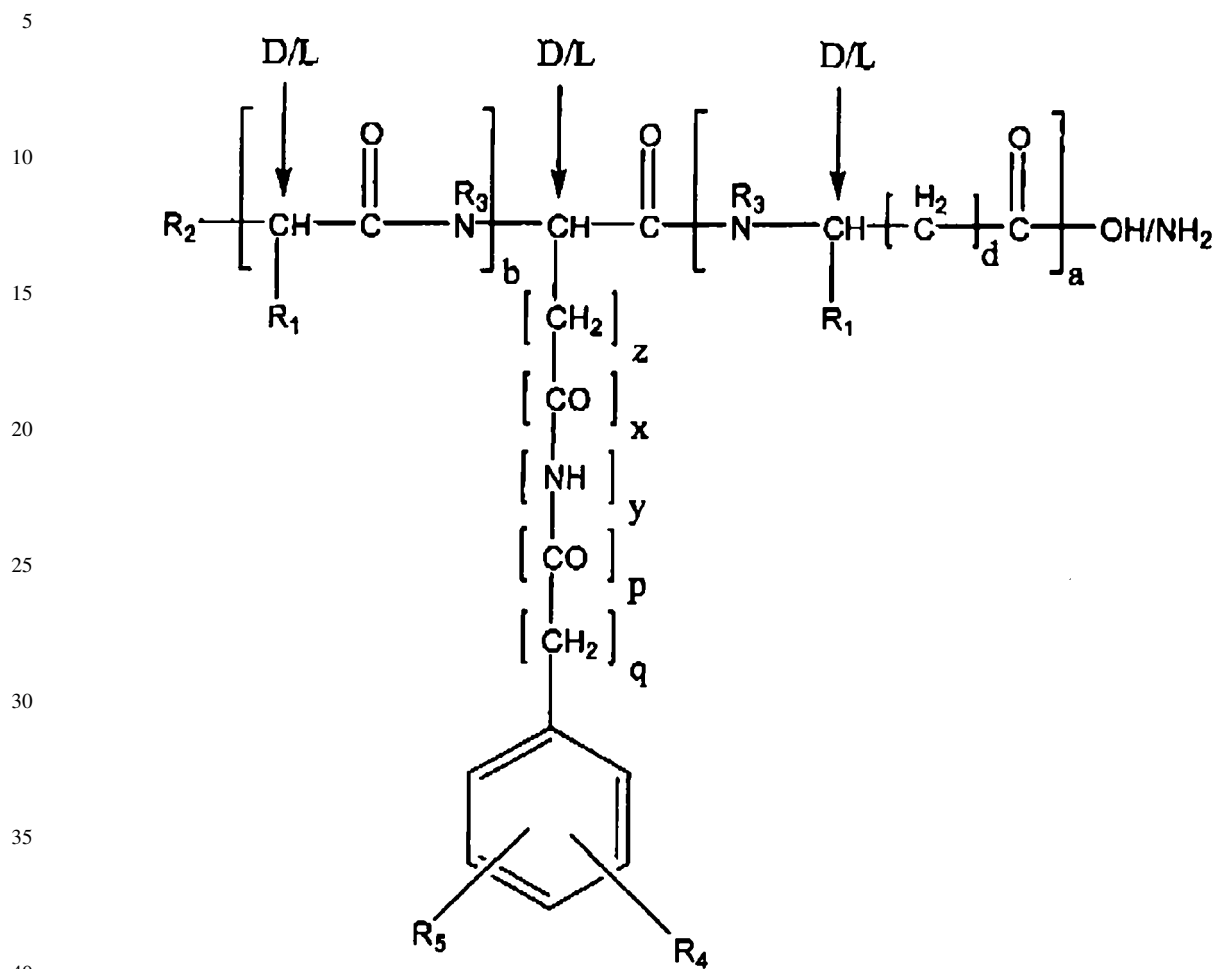
en la que R_2 se selecciona del grupo que consiste en NH_2 , NHR , NR_2 , NR_3^+H , OH , SH , RO , RS , RSO , RSO_2 , COR , CSR , COOH , COOR , CONH_2 , CONHR , CONR_2 , OCOR , y SCOR , en la que R = alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, o cicloalquilo;

en la que R_3 es H o CH_3 ; y

en la que R_x es un grupo hidrofóbico;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Además, la presente invención se refiere a un péptido representado por la fórmula general II:



45 en la que:

a es 1 y b es 0; o

b es 1 y a es 0;

50 d es 0-8; y

z es 1-7; y

55 x es 1, y y q son 1, y p es 0; o

p es 1, x y q son 0, e y es 1;

y además en la que,

60 si R_1 es H, entonces d es 0-8; o

si R_1 no es H, entonces d es 0;

65 en la que R_1 es la cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina;

ES 2 353 666 T3

en la que R₂ se selecciona del grupo que consiste en NH₂, NHR, NR₂, NR₃⁺H, OH, SH, RO, RS, RSO, RSO₂, COR, CSR, COOH, COOR, CONH₂, CONHR, CONR₂, OCOR, y SCOR, en la que R = alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, o cicloalquilo;

5 en la que R₃ es H o CH₃:

en la que R₄ y R₅ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, halógeno, CN, NO₂, alcoxi, ariloxi, aralquiloxi, tioalcoxi, tioariloxi, tioaralquiloxi, +S(CH₃)₂, SO₃H, SO₂R, NH₂, NHR, NR₂, +NR₃, OH, SH, COOH, COOR, CONH₂, CONHR, CONR₂, CH₂OH, NCO, NCOR, NHOH, NHNH₂,
10 NHNHRH, CH₂OCOR, CH₂OCSR, COR, CSR, CSOR, CF₃, y CCl₃, y en la que R es alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, o cicloalquilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

15 Dichos péptidos también pueden comprender un enlace peptídico que se alquila o en cualquier caso se modifica para estabilizar el péptido contra la degradación enzimática y/o pueden comprender D-aminoácidos.

Los péptidos más preferidos tal como se representan por la fórmula I y II están disponibles oralmente para un mamífero, y particularmente a un sujeto humano. Se conocen varios ensayos en el sector para establecer la disponibilidad oral e incluyen pero sin limitación, las siguientes pruebas específicas.

25 *Pruebas de biodisponibilidad oral*

Una prueba (“la prueba de Bailey”) es una prueba predictiva y se sigue generalmente según la presente invención por otras pruebas empíricas, descritas a continuación. En la prueba de Bailey, los péptidos candidatos se alinean prácticamente con una plantilla sustrato que se modela para representar un compuesto, el cual se une a PepT1, para identificar que probablemente se unen a PepT1 *in vitro* e *in vivo*. La prueba de Bailey se puede utilizar para facilitar la
30 detección de péptidos disponibles oralmente de la presente invención.

En una realización, los péptidos según las fórmulas I y II se utilizan en sustancial concordancia con este modelo de plantilla sustrato (por ejemplo, los péptidos que muestran sustancialmente la misma conformación tridimensional que los sustratos identificados anteriormente que se unen al hPepT1 con afinidad elevada) y, por lo tanto, son buenos candidatos para los péptidos, que están disponibles oralmente. De este modo, dichos péptidos son normalmente
35 dipéptidos.

Los péptidos más preferidos son aquellos que muestran por lo menos las siguientes cuatro propiedades atribuidas a sustratos de afinidad elevada para PepT1; es decir, desde el extremo N terminal al extremo C-terminal del péptido, el péptido comprende: 1) un fuerte sitio de unión para un grupo NH₃⁺ N-terminal; 2) un enlace de hidrógeno al grupo carbonilo del primer enlace peptídico; 3) un bolsillo hidrofóbico que pone de relieve preferiblemente un fuerte vector direccional y 4) un sitio de unión a carboxilato. Preferiblemente, el primer sitio de unión a carboxilato va seguido por un segundo sitio de unión a carboxilato según el modelo. Véase, por ejemplo, Bailey, P.D., *et al.*, (2000) *supra*.

Una prueba empírica para validar la prueba de Bailey predictiva descrita anteriormente es una “prueba de biodisponibilidad oral *in vivo* estándar”. En esta prueba, se administra oralmente un péptido a un mamífero y se extraen muestras de sangre con el tiempo. La concentración del péptido se determina a diferentes intervalos de tiempo utilizando pruebas de cuantificación estándar, tales LC/MS/MS para calcular el área bajo la curva (AUC) de una representación de la concentración de proteína en plasma frente al tiempo, utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica. Preferiblemente, se administran dosis diferentes de péptidos a un conjunto de animales en paralelo para identificar los péptidos que muestran un incremento proporcional con la dosis en la máxima concentración en plasma y valores AUC. Como control, se pueden administrar intravenosamente las mismas concentraciones de péptido y el área bajo AUC obtenida para la administración oral se puede comparar con la AUC obtenida para la administración intravenosa. Véase, por ejemplo, Milo Gibal (1991) *Biopharmaceutics and Pharmacology*, 4th edition (Lea y Sediger). En una realización preferida, los péptidos con buena disponibilidad oral son aquellos en los que la AUC normalizada en la dosis después de la administración oral representa por lo menos un 20% de la AUC normalizada en la dosis después de la administración intravenosa.

Los péptidos que muestran una buena disponibilidad oral según la prueba de disponibilidad oral *in vivo* estándar descrita anteriormente, pueden concordar o no con la prueba de Bailey.

A menudo será útil realizar una segunda prueba empírica para validar adicionalmente los péptidos disponibles oralmente tal como se representan por las Fórmulas I o II. En dicha prueba, se determina la capacidad del péptido para unirse al transportador de hPEpT1 o un fragmento funcionalmente activo del mismo. Preferiblemente, los péptidos según la presente invención presentan una buena afinidad por un transportador hPEpT1 o un fragmento biológicamente activo de los mismos. Preferiblemente, la Ki de dichos péptidos es inferior a aproximadamente 20 mM, más preferiblemente es inferior a aproximadamente 10 mM y aún más preferiblemente, es inferior a aproximadamente 5 mM o inferior a aproximadamente 1 mM.

ES 2 353 666 T3

Se puede realizar una prueba de unión a hPepT1 como cribado inicial para péptidos que a continuación se criban en una prueba de disponibilidad oral *in vivo* estándar y/o se puede realizar para confirmar los resultados de una prueba de disponibilidad oral *in vivo* estándar, sin embargo, la prueba de disponibilidad oral *in vivo* estándar proporciona la prueba más significativa de la disponibilidad oral del péptido. Adicionalmente, los péptidos preferidos tal como se representan por la fórmula I anterior, muestran una buena vida media según a lo que se hace referencia en la presente invención como “prueba de estabilidad en plasma *in vivo*” o alguna frase relacionada. Dichos péptidos pueden concordar sustancialmente con el modelo de plantilla sustrato PepT1 anterior (prueba de Bailey). Sin embargo, para algunos péptidos puede haber poca concordancia o ninguna con el modelo. Los péptidos que muestran una buena estabilidad en la prueba presentan en una realización una vida media de más de aproximadamente 48 horas, tales como más de 24 horas, por ejemplo, más de 12 horas, tales como más de 6 horas, por ejemplo, más de 3 horas, tales como más de 1 hora, por ejemplo, más de 30 minutos. En esta realización, los péptidos de la presente invención muestran una mayor estabilidad en el torrente sanguíneo.

Los péptidos del alcance de la presente invención están representados aquí en una realización con el grupo N-terminal y/o el grupo C-terminal libres. Estos grupos pueden permanecer libres para algunos usos de la invención. Sin embargo, en otra realización, los péptidos pueden caracterizarse por grupos C-terminales bloqueados y grupos N libres. Alternativamente, dichos péptidos pueden tener grupos N bloqueados y grupos C-terminal libres, o grupos N y C-terminal bloqueados. La naturaleza de los grupos terminales en cualquier extremo de la molécula no es crítica siempre que los péptidos sean capaces de unirse con afinidad satisfactoria con hPepT1, de manera que los péptidos estén oralmente disponibles. Tal como se ha descrito, se puede predecir la “afinidad satisfactoria” para el transportador de hPepT1, por adelantado, mediante la determinación si un péptido objeto concuerda sustancialmente con el modelo de plantilla sustrato para la unión con el portador de hPepT1. Véase, Bailey, P.D., *et al.* (2000), *supra*.

Adicionalmente, los residuos de aminoácidos de los dipéptidos pueden ser D o L-aminoácidos. En ciertos aspectos, para aumentar la estabilidad de los compuestos, se prefieren los aminoácidos D.

Los péptidos según la presente invención presentan una amplia variedad de usos importantes y ventajas.

Por ejemplo, dichos péptidos se pueden utilizar para prevenir y/o tratar condiciones patológicas asociadas con una función de unión comunicantes dañada que da lugar a una menor comunicación intercelular o sobreacoplamiento de la comunicación intercelular o la no regulación de la comunicación celular y se pueden utilizar para la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar condiciones patológicas asociadas con la función de unión comunicantes dañada. En un aspecto, la presente invención proporciona un método de administración a un paciente que tiene, o se encuentra en riesgo de desarrollar dicha condición patológica, de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los péptidos descritos anteriormente. Preferiblemente, la administración es oral. En un aspecto preferido, el paciente es un ser humano.

Entre los ejemplos de condiciones patológicas que se pueden tratar se incluyen, pero sin limitación, enfermedad cardiovascular, inflamación del epitelio de las vías respiratorias, trastornos del tejido alveolar, incontinencia de la vejiga, oído dañado debido a enfermedades de la cóclea, lesiones endoteliales, retinopatía diabética y neuropatía diabética, isquemia del sistema nervioso central y médula espinal, trastornos del tejido dental, incluyendo la enfermedad periodontal, enfermedades renales, fracaso en el trasplante de médula ósea, heridas, disfunción eréctil, incontinencia urinaria de la vejiga, dolor neuropático, inflamación subcrónica y crónica, cáncer y fracaso en el trasplante de médula ósea y células madre, condiciones patológicas que aparecen durante el trasplante de células y tejidos o durante procedimientos médicos, tales como cirugía.

Estos tratamientos pueden utilizar composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los péptidos descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el portador es estéril, libre de pirógenos y libre de virus. Aún más preferiblemente, la composición es administrable oralmente.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B muestran esquemas de síntesis de ejemplo para generar péptidos según ciertos aspectos de la invención.

La figura 2 muestra el efecto del compuesto 4, el compuesto 22, el compuesto 23 y el compuesto 95 en la ALP (fosfatasa alcalina) en osteoblastos humanos.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha descrito, la presente invención se refiere a péptidos disponibles oralmente que modulan la comunicación intercelular por uniones comunicantes (GJIC). La presente invención tiene un amplio espectro de aplicaciones útiles, incluyendo la utilización en el tratamiento o prevención de patologías asociadas con una GJIC dañada. Los péptidos de la invención particulares se representan por la fórmula I anterior.

ES 2 353 666 T3

Los péptidos más específicos según la presente invención se representan mediante la siguiente fórmula II tal como se define anteriormente y en las reivindicaciones.

Tal como se ha descrito, el péptido puede incluir un N-terminal libre o un C-terminal libre o ambos.

Preferiblemente, el péptido comprende por lo menos un grupo hidrofóbico y por lo menos un grupo de enlace de hidrógeno. En un aspecto de la invención, la estructura tridimensional del péptido, la distancia entre el por lo menos un grupo hidrofóbico y el por lo menos un grupo de enlace de hidrógeno es de aproximadamente 4 Ångströms a aproximadamente 12 Ångströms, preferiblemente de 5 a aproximadamente 10 Ångströms. Más preferiblemente, el grupo hidrofóbico es un grupo aromático, incluyendo, pero sin limitación, un grupo benzoilo o bencilo, o formas sustituidas o modificados de los mismos. Los grupos benzoilo o bencilo sustituidos comprenden preferiblemente sustituyentes en la posición 4. Más preferiblemente, los sustituyentes tienen un radio de 3-11 Ångströms en la esfera adoptada por el sustituyente. Entre los sustituyentes adecuados se incluyen, pero sin limitación: metilo, etilo, t-butilo, c-hexilo, fenilo, n-butilo, n-hexilo, n-octilo, etoxi, t-butoxi, fenoxi, butoxi, benciloxi, n-hexiloxi, n-octiloxi.

Los péptidos más específicos en el alcance de la invención y que tienen esta fórmula general se muestra en la Tabla

Tabla 1

No. de compuesto	Nombre del compuesto
1	H-Gly-Lys(4-nitrobenzoil)-OH
2	H-Gly-Lys(4-fluorobenzoil)-OH
3	H-Gly-Lys(4-cianobenzoil)-OH
4	H-Gly-Lys(4-metoxibenzoil)-OH
5	H-Gly-Lys(4-clorobenzoil)-OH
6	H-Gly-Lys(benzoil)-OH

ES 2 353 666 T3

Tabla 1

No. de compuesto	Nombre del compuesto	
5	7	H-Lys(4-nitrobenzoil)-Gly-OH
	8	H-Lys(4-nitrobenzoil)-Sar-OH
10	9	H-Lys(benzoil)-Sar-OH
	10	H-Lys(benzoil)-Gly-OH
	11	H-Lys(4-metoxibenzoil)-Gly-OH
15	12	H-Gly-D-Lys(4-metoxibenzoil)-OH
	13	H-Gly-D-Lys(4-nitrobenzoil)-OH
	14	H-Gly-D-Lys(4-fluorobenzoil)-OH
20	15	H-Gly-D-Lys(4-cianobenzoil)-OH
	16	H-Gly-D-Lys(4-nitrobenzoil)-OH
	17	H-Gly-D-Lys(benzoil)-OH
25	18	H-Lys(4-fluorobenzoil)-Gly-OH
	18	H-Lys(4-cianobenzoil)-Gly-OH
	20	H-Lys(4-clorobenzoil)-Gly-OH
30	21	H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Gly-OH
	22	H-D-Lys(4-nitrobenzoil)-Gly-OH
	23	H-D-Lys(benzoil)-Gly-OH
35	24	H-D-Lys(4-fluorobenzoil)-Gly-OH
	25	H-D-Lys(4-cianobenzoil)-Gly-OH
40	26	H-D-Lys(4-clorobenzoil)-Gly-OH
	27	H-Lys(4-cianobenzoil)-Sar-OH
	28	H-Lys(4-metoxibenzoil)-Sar-OH
45	29	H-Lys(4-fluorobenzoil)-Sar-OH
	30	H-Lys(4-clorobenzoil)-Sar-OH
	31	H-D-Lys(4-cianobenzoil)-Sar-OH
50	32	H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Sar-OH
	33	H-D-Lys(4-fluorobenzoil)-Sar-OH
	34	H-D-Lys(4-clorobenzoil)-Sar-OH
55	35	H-D-Lys(4-nitrobenzoil)-Sar-OH
	36	H-D-Lys(benzoil)-Sar-OH
	37	H-Ala-D-Lys(4-metoxibenzoil)-OH
60	38	H-Val-D-Lys(4-metoxibenzoil)-OH
	39	H-Ile-D-Lys(4-metoxibenzoil)-OH

65

ES 2 353 666 T3

Tabla 1

No. de compuesto	Nombre del compuesto
5	40 H-Leu-D-Lys(4-metoxibenzoil)-OH
	41 H-Phe-D-Lys(4-metoxibenzoil)-OH
10	42 H-Trp-D-Lys(4-metoxibenzoil)-OH
	43 H-His-D-Lys(4-metoxibenzoil)-OH
	44 H-Tyr-D-Lys(4-metoxibenzoil)-OH
15	45 H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Ala-OH
	46 H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Phe-OH
	47 H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Ile-OH
20	48 H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Leu-OH
	49 H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Val-OH
	50 H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-His-OH
25	51 H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Trp-OH
	52 H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Tyr-OH
	53 H-D-Lys(4-fenoxibenzoil)-Gly-OH
30	54 H-D-Lys(4-t-butilbenzoil)-Gly-OH
	55 H-D-Lys(4-n-butoxibenzoil)-Gly-OH
	56 H-D-Lys(4-metilbenzoil)-Gly-OH
35	57 H-D-Lys(4-etilbenzoil)-Gly-OH
	58 H-D-Lys(4-n-butilbenzoil)-Gly-OH
40	59 H-D-Lys(4-n-hexilbenzoil)-Gly-OH
	60 H-D-Lys(4-n-octilbenzoil)-Gly-OH
	61 H-D-Lys(4-fenilbenzoil)-Gly-OH
45	62 H-D-Lys(4-benciloxibenzoil)-Gly-OH
	63 H-D-Lys(4-etoxibenzoil)-Gly-OH
	64 H-Asn(NH(4-trifluorometilbencil))-Ala-OH
50	65 H-Asn(NH(4-metoxibencil))-Ala-OH
	66 H-Asn(NH(4-nitrobencil))-Ala-OH
	67 H-Asn(NH(bencil))-Ala-OH
55	68 H-Asn(NH(4-fluorobencil))-Ala-OH
	69 H-Asn(NH(4-clorobencil))-Ala-OH
	70 H-Asn(NH(4-cianobencil))-Ala-OH
60	71 H-Asn(NH(4-metilbencil))-Ala-OH
	72 H-Asn(NH(4-n-butilbencil))-Ala-OH

65

ES 2 353 666 T3

Tabla 1

No. de compuesto	Nombre del compuesto
5	73 H-Asn(NH(4-t-butilbencil))-Ala-OH
	74 H-Asn(NH(4-n-hexilbencil))-Ala-OH
10	75 H-Asn(NH(4-n-octilbencil))-Ala-OH
	76 H-Asn(NH(4-fenilbencil))-Ala-OH
	77 H-Asn(NH(4-fenoxibencil))-Ala-OH
15	78 H-Asn(NH(4-n-butoxibencil))-Ala-OH
	79 H-Asn(NH(4-trifluorometilbencil))-D-Ala-OH
	80 H-Asn(NH(4-metoxibencil))-D-Ala-OH
20	81 H-Asn(NH(4-nitrobencil))-D-Ala-OH
	82 H-Asn(NH(bencil))-D-Ala-OH
	83 H-Asn(NH(4-fluorobencil))-D-Ala-OH
25	84 H-Asn(NH(4-clorobencil))-D-Ala-OH
	85 H-Asn(NH(4-cianobencil))-D-Ala-OH
	86 H-Asn(NH(4-metilbencil))-D-Ala-OH
30	87 H-Asn(NH(4-n-butilbencil))-D-Ala-OH
	88 H-Asn(NH(4-t-butilbencil))-D-Ala-OH
	89 H-Asn(NH(4-n-hexilbencil))-D-Ala-OH
35	90 H-Asn(NH(4-n-octilbencil))-D-Ala-OH
	91 H-Asn(NH(4-fenilbencil))-D-Ala-OH
40	92 H-Asn(NH(4-fenoxibencil))-D-Ala-OH
	93 H-Asn(NH(4-n-butoxibencil))-D-Ala-OH
	94 H-D-Asn(NH(4-trifluorometilbencil))-Ala-OH
45	95 H-D-Asn(NH(4-metoxibencil))-Ala-OH
	96 H-D-Asn(NH(4-nitrobencil))-Ala-OH
	97 H-Asn(NH(4-metoxibencil))-Sar-OH
50	98 H-Asn(NH(4-metoxibencil))-Leu-OH
	99 H-Asn(NH(4-metoxibencil))-Phe-OH
	100 H-Gln(NH(4-metoxibencil))-Ala-OH
55	101 H-Orn(4-metoxibenzoil)-Gly-OH
	102 H-Gly-Asn(NH(4-metoxibencil))-OH
	103 H-D-Lys(2,4-dinitrobenzoil)-Gly-OH
60	104 H-D-Lys(2,4-dimetilbenzoil)-Gly-OH
	105 H-D-Lys(2,5-dimetilbenzoil)-Gly-OH

65

Tabla 1

No. de compuesto	Nombre del compuesto
106	H-D-Lys(3,5-dimetilbenzoil)-Gly-OH
107	H-D-Lys(2,4-diclorobenzoil)-Gly-OH
108	H-D-Lys(2,5-diclorobenzoil)-Gly-OH
109	H-D-Lys(4-fluoro-3-nitrobenzoil)-Gly-OH
110	H-D-Lys(3-fluoro-4-metilbenzoil)-Gly-OH

Los péptidos particulares según la presente invención en un aspecto facilitan y/o mantienen o inhiben la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes. En una realización, los péptidos pueden ser péptidos antiarrítmicos que reconocen las mismas células reconocidas por AAP, AAP10, HP5, y/o análogos funcionales de las mismas, es decir, los péptidos son capaces de modular la función de estas células mediante el efecto agonista o antagonista de la función de AAP, AAP10, HP5, y/o análogos funcionales de los mismos. La presente invención también se refiere a la preparación y utilización de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de patologías asociadas con la comunicación intercelular por uniones comunicantes dañada y métodos para utilizar estas composiciones.

Los péptidos adicionales preferidos según la presente invención muestran una buena actividad en uno o más de los siguientes ensayos. Aunque no es necesario identificar péptidos disponibles oralmente tal como se representan por las fórmulas I y II anteriores, se pueden utilizar para confirmar adicionalmente y cuantificar opcionalmente la actividad de uno o un grupo de péptidos.

En una realización de la presente invención, el péptido se selecciona del grupo que consiste en H-Gly-Lys(4-nitrobenzoil)-OH (Compuesto 1); H-Gly-Lys(4-metoxibenzoil)-OH (compuesto 4); H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Gly-OH (Compuesto 21); H-D-Lys(4-nitrobenzoil)Gly-OH (Compuesto 22); H-D-Lys(4-t-butilbenzoil)-Gly-OH (Compuesto 54); y H-D-Asn(NH(4-nitrobenzil)Ala-OH (Compuesto 96).

En otra realización, el presente péptido se selecciona del grupo que consiste en H-D-Lys(benzoil)Gly-OH (compuesto 23) y H-D-Asn(NH(4-metoxibencil)Ala-OH (compuesto 95).

En otra realización de la presente invención, el péptido es H-Gly-Lys(4-nitrobenzoil)-OH (compuesto 1).

Según la presente invención, en un aspecto, el péptido es H-Gly-Lys(4-metoxibenzoil)-OH (compuesto 4).

Además, en otra realización, el péptido es H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Gly-OH (compuesto 21).

En otro aspecto el péptido es H-D-Lys(4-nitrobenzoil)Gly-OH (compuesto 22).

En un aspecto adicional, el péptido es H-D-Lys(4-t-butilbenzoil)-Gly-OH (compuesto 54).

En otro aspecto, el péptido es H-D-Asn(NH(4-nitrobenzil)Ala-OH (compuesto 96).

Además, en otra realización, el péptido es H-D-Lys(benzoil)Gly-OH (compuesto 23).

En otra realización, el péptido es H-D-Asn(NH(4-metoxibencil)Ala-OH (compuesto 95).

Los péptidos preferidos según las fórmulas I y II anteriores muestran una buena función como moduladores de la comunicación por la unión comunicante (por ejemplo, como agonistas o antagonistas). En un aspecto, los péptidos tienen la función como fármacos antiarrítmico.

En una realización, los péptidos agonistas preferidos de la invención proporcionan una conductancia intracelular (G_j) que es sustancialmente la misma que, o es más grande que, la G_j de AAP en lo que se refiere aquí como "ensayo estándar de cardiomiocitos".

En otra realización, los péptidos antagonistas preferidos proporcionan una G_j que es inferior a la G_j de AAP y/o bloquean la capacidad de AAP de normalizar la G_j de una célula isquémica, es decir, devolver la G_j a sustancialmente los mismos valores hallados en células no isquémicas. En un aspecto de la presente invención, los presentes antagonistas proporciona una G_j que es por lo menos aproximadamente un 40% inferior que la G_j de AAP, tal como por lo menos aproximadamente un 50% menos, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 60% menos, tal como por lo menos aproximadamente un 70% menos, por ejemplo, por los menos aproximadamente un 80% menos, tal como por lo menos un 90% menos, por ejemplo, por lo menos un 100% menos.

ES 2 353 666 T3

Las propiedades inhibitorias de los presentes antagonistas no se limitan a la Gkj relativa descrita anteriormente. En realizaciones y tipos de ensayo adicionales, los antagonistas pueden mostrar una Gj diferente relativa. Esto puede depender adicionalmente del péptido/compuesto relativo.

5 Corazón

Los péptidos adicionalmente preferidos de la presente invención incrementan el tiempo para el bloqueo de AV en un ratón después de la infusión de CaCl₂, en lo que se refiere en la presente invención como “ensayo estándar de arritmia inducida por calcio”. Preferiblemente, los péptidos proporcionan por lo menos aproximadamente un 40% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 50% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 60% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 70% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 80% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 90% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente sustancialmente la misma actividad de AAP, tal como aproximadamente un 110% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 120% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 130% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 140% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 150% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 160% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 170% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 180% de actividad de AAP, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 190% de la actividad de AAP, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 200% o más de la actividad AAP (es decir, muestran intervalos de tiempo de aproximadamente la misma duración).

Los péptidos pueden adicionalmente mostrar descensos en la incidencia de la reentrada de arritmias o en el tamaño de la zona de infarto observada en lo que se hace referencia aquí como “ensayo estándar de la reentrada ventricular”. Preferiblemente, los péptidos proporcionan por lo menos aproximadamente un 40% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 50% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 60% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 70% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 80% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 90% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente sustancialmente la misma actividad de AAP, tal como aproximadamente un 110% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 120% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 130% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 140% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 150% de la actividad de AAP, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 160% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 170% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 180% de actividad de AAP, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 190% de la actividad de AAP, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 200% o más de la actividad AAP (es decir, que proporciona descensos similares en la incidencia o zonas de infarto de tamaño similar o más pequeños).

Osteoporosis

Existe el conocimiento de que la GJIC es importante para la formación ósea. Adicionalmente, los péptidos preferidos, adicionalmente o alternativamente, aumentan la actividad de los osteoblastos en lo que se refiere aquí como “ensayo estándar de la actividad de osteoblastos” que mide la formación de la onda de calcio y/o la actividad de fosfatasa alcalina de las células de osteoblastos en presencia de péptidos. Preferiblemente, dichos péptidos incrementaron la actividad de la onda de calcio, manifestada como el incremento en el número de células implicadas en una onda (determinado midiendo los niveles de Ca²⁺ intracelular utilizando un colorante fluorescente sensible a calcio, tal como fura-2 y contando el número de células que son fluorescentes). La actividad de la fosfatasa alcalina también se puede utilizar para proporcionar la medida de la actividad de los osteoblastos utilizando ensayos colorimétricos estándar. Los péptidos agonistas según la presente invención proporcionan por lo menos aproximadamente un 10% de la actividad de AAP en dicho ensayo, tal como por lo menos aproximadamente un 20% de actividad, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 30% de actividad, tal como por lo menos aproximadamente un 40% de actividad, ejemplo, por lo menos aproximadamente un 50% de actividad de AAP, preferiblemente, por lo menos aproximadamente un 70% de actividad, y aún más preferiblemente, 100% o más actividad de la actividad de AAP.

Cáncer

Los péptidos preferidos según la presente invención, alternativamente o adicionalmente, disminuyen la inhibición de GJIC mediada por promotores de tumores, tales como DTT, en lo que se refiere aquí como “ensayo estándar de promotores de tumores”. Preferiblemente, los péptidos muestran descensos en la inhibición de GJIC que son por lo menos de un 50%, preferiblemente de un 70%, y más preferiblemente un 100% o más, que los descensos observados para AAP.

Tal como se ha descrito, un objetivo de la invención es proporcionar péptidos que modulan la comunicación intercelular por uniones comunicantes (GJIC). De este modo, muchos péptidos según la presente invención pueden incluir una o más de las siguientes características: la capacidad de disminuir el desacoplamiento celular, de normalizar la dispersión de la duración potencial de la acción, y de normalizar la velocidad de conducción, la capacidad de controlar la cantidad celular de uniones comunicantes que normalizan (sobreregulan o subregulan según sea necesario) la expresión de conexinas; de normalizar la degradación de uniones comunicantes (inhibir o aumentar), de normalizar el tráfico celular de conexinas a la membrana plasmática (incrementar o disminuir); de facilitar el ensamblaje de las conexinas en uniones funcionales comunicantes; de normalizar la abertura de las uniones comunicantes existentes,

ES 2 353 666 T3

por ejemplo, induciendo o aumentando la abertura cuando se han cerrado o canalizado (“gated”) por inhibidores (por ejemplo, tal como mediando o aumentando a hiperfosforilación del dominio carboxi terminal citoplasmático de una o más conexinas (por ejemplo, tal como Cx43)) o cerrando éstos cuando están abiertos de manera aberrante (por ejemplo, como en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth); y similares.

A continuación, se describen ensayos particulares útiles para identificar y opcionalmente cuantificar la actividad de péptidos de la invención preferidos. Los ensayos son no limitantes y sirven simplemente con el objetivo de ilustrar un conjunto de ensayos en los que se pueden analizar los presentes péptidos por sus capacidades de modular la unión comunicante. Debe entenderse que los ensayos no se excluyen mutuamente, es decir, un péptido según la presente invención puede mostrar actividad en un ensayo particular, pero mostrar una actividad diferente o nula en otro ensayo particular. Esto puede ser un reflejo de la diversidad de los péptidos individuales y los tipos de ensayos para analizar dichos péptidos.

A. Ensayos Estándar de Disponibilidad Oral

Es un aspecto preferido de la invención proporcionar péptidos con una mayor disponibilidad *in vivo*. La absorción de péptidos después de la administración oral está limitada a menudo porque se degradan por enzimas en el tracto gastrointestinal (GI) o por enzimas en el lumen intracelular de los enterocitos. Además, las propiedades físico-químicas de los péptidos, especialmente su gran potencial de unión a hidrógeno, dificulta que estas moléculas permeen los enterocitos mediante difusión pasiva transcelular. Sin embargo, los dipéptidos y tripéptidos que han sobrevivido a las enzimas del fluido gastrointestinal pueden entrar en el lumen intracelular mediante el transportador de péptidos hPepT1, que es una proteína de membrana localizada en la membrana apical de los enterocitos del intestino delgado superior.

Los péptidos preferidos según la presente invención son por tanto péptidos que presentan afinidad por un transportador hPepT1 o un análogo del mismo. La conformación tridimensional y los sitios de unión claves de los compuestos péptidos que se unen al transportador hPepT1 se describen en Bailey, P.D., *et al.*, 2000, *supra*, y los péptidos deseados se pueden modelar *in silico* para ajustarlos de manera óptima en este sitio de unión tal como se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Bailey, P.D., *et al.*, (2000), *supra*; Vinter, J.G., (1996) *J. Comput. Aided Des.* 10: 417).

La disponibilidad oral de un péptido que comprende una estructura tal como se muestra en la fórmula I, Fórmula II, tabla I o de manera más general identificado utilizando el ensayo de Bailey, se puede evaluar por su capacidad de unirse a un transportador PepT1, preferiblemente un transportador hPepT1. Por ejemplo, se puede expresar un ADNc de PepT1, preferiblemente un ADNc de hPepT1 (véase, por ejemplo, Covitz, K. M., *et al.*, (1996) *Pharm. Res.* 13(11): 1631-34) en un sistema de expresión de ovocitos de *Xenopus* y se puede monitorizar la captación del péptido marcado en el ovocito para aproximar los valores de K_i tal como se describe en Temple, C.S., *et al.* (1996) *J. Physiol. (London)* 494: 795; Meredith, D., *et al.*, (1998) *J. Physiol. (London)* 512: 629.

En un aspecto de la invención, se realiza un ensayo estándar de disponibilidad oral *in vivo* para determinar la disponibilidad oral de un péptido que ha sido modelado para ajustarse a la plantilla sustrato de Bailey, tal como se ha descrito anteriormente. En este ensayo, se administra oralmente un péptido a un mamífero, tal como una rata, en una forma administrable oralmente (por ejemplo, como parte de un residuo de alimento o en agua), mientras que a la vez, se administra i.v. la misma concentración de péptido (por ejemplo, a través de un catéter insertado en la vena femoral y la arteria). Los péptidos se pueden administrar como inyecciones en bolo a las concentraciones que varían de 10^{-5} a 10^{-10} en volúmenes de 1 ml/kg para la dosificación tanto oral como i.v. A los animales se les administra 500 I.U. de heparina i.v. 5 minutos antes de extraer la primera muestra de sangre. Se recoge una muestra de sangre de control, muestra de “antes de la dosis” o muestra B.D., aproximadamente 5 minutos antes de la administración de los péptidos. Se mantiene una muestra de solución de dosificación (por ejemplo, 100 ml de agua que comprende 10^{-5} - 10^{-10} M de péptido) para la determinación de la concentración. Se recogen las muestras de sangre a $t =$ B.D. 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, y 240 minutos.

Se recoge la sangre en viales marcados enfriados con hielo con muestras de sangre estabilizadas con EDTA y se almacenaron en hielo hasta que se centrifugaron rápidamente a 4°C durante 5 minutos (10,000 x g). Se recoge el plasma (100 ml), se transfiere a un vial de microcentrífuga de polipropileno marcado (por ejemplo, eppendorf de 0,5 ml), se congela en hielo y se almacena a -20°C hasta un análisis posterior. Se inyectan aproximadamente 40 ml del filtrado en una columna HPLC (XterraMS C18, 3 x 50 mm, partículas 3,5 mm) y se eluyen utilizando un gradiente lineal de 0 a 100% B en 4,0 minutos. La columna se lava durante 2,9 minutos en tampón B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo u otro tampón adecuado) y se equilibra durante 5 minutos en Tampón A (ácido fórmico al 0,1% en agua u otro tampón adecuado antes de la siguiente inyección de la muestra. Se realiza espectrometría de masas utilizando métodos de rutina y tal como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2.

Las concentraciones de los compuestos en las muestras de plasma se calculan a partir de una curva estándar externa que cubren el intervalo de 1,00 a 1000 nM. Las concentraciones en plasma frente a los datos del tiempo se utilizan para el modelado farmacocinético en WinNonLin 3.5 (Pharsight, Mountain view, CA) utilizando un análisis no compartimental y se determinan los valores AUC tal como se conocen en la técnica. Preferiblemente, se observan péptidos disponibles oralmente según la presente invención en niveles significativos en plasma en aproximadamente

ES 2 353 666 T3

30 minutos o menos. Se utilizan los valores de AUC observados en animales que reciben administraciones i.v. de péptido para evaluar efectos, tales como la depuración y la vida media, que deberían ser iguales en los dos sistemas.

B. Ensayos estándar de estabilidad en plasma

La presente invención también proporciona péptidos que presentan una mayor estabilidad *in vitro* o *in vivo*. En un aspecto, el péptido comprende un enlace peptídico que está alquilado o en cualquier caso modificado para estabilizar el péptido contra la degradación enzimática. En otro aspecto, el péptido comprende uno o más D-aminoácidos. En un aspecto adicional, el péptido presenta una mayor estabilidad en un ensayo de estabilidad estándar.

En un aspecto, se realiza un ensayo de estabilidad en plasma *in vitro* tal como se ha descrito en W02/077017 (PCT/US02/05773, presentada el 22 de febrero de 2002).

Tal como se ha descrito en WO02/077017, los péptidos se pueden incubar en plasma o suero y se pueden tomar muestras en intervalos regulares para el análisis por HPLC o LC/MS/MS para cuantificar la cantidad de péptido no degradado. Se estiman las condiciones apropiadas (columna, disolvente, gradiente y temperatura) para dichos análisis para asegurar que el pico del péptido y los picos del plasma no tiene el mismo tiempo de retención. Esto se realiza mediante inyecciones posteriores de un péptido, plasma y una coinfección con el péptido y el plasma, seguido de la optimización de los parámetros del método de LC hasta obtener una separación satisfactoria. También se puede tomar una muestra de plasma de control sin el péptido, tratado de la misma manera, y se puede evaluar. Las muestras pueden incluir, pero sin limitación, un blanco, el péptido en una concentración adecuada (por ejemplo, 0,1 mg/ml), plasma sin péptido, una o más muestras para $t = 0$, y una o más muestras en cada uno de los intervalos regulares. Preferiblemente, se toman muestras múltiples en paralelo. Las concentraciones de las muestras (altura del pico en mAU o recuento de iones) se pueden representar frente al tiempo y ajustarse a una función que describe una caída monoexponencial (por ejemplo, utilizando un paquete Excel estándar). Preferiblemente, un péptido según la presente invención tiene una vida media de más de aproximadamente 48 horas, tal como más de 24 horas, por ejemplo, más de 12 horas, tal como más de 6 horas, por ejemplo, más de 3 horas, tal como más de 1 hora, por ejemplo, más de 30 minutos determinada utilizando este ensayo.

La estabilidad se puede examinar *in vivo* utilizando ensayo estándar. Por ejemplo, se pueden administrar péptidos a un mamífero, tal como un rata, mediante inyecciones en bolos en volúmenes de aproximadamente 1 ml/kg para dosificación i.v. y p.o. Preferiblemente, los péptidos se analizan en paralelo con muestras de control, tales como tampón o un péptido antiarrítmico con una estabilidad conocida. Las muestras de sangre se recogen a diferentes periodos de tiempo (por ejemplo, a B.D. 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, y 240 minutos, donde B.D. se refiere a antes de la dosis). Las cantidades de péptidos en muestras se pueden cuantificar utilizando métodos de rutina, tales como LC/MS/MS. Por ejemplo, las concentraciones de péptidos en muestras de plasma se pueden calcular a partir de una curva estándar externa que cubre los intervalos de péptidos de 1,00 a 1000 nM. Los datos de concentraciones en plasma frente al tiempo se pueden utilizar para el modelado farmacocinético en WinNonLin 3.5 (Pharsight, Mountain view, CA) utilizando un análisis no compartimental y se pueden determinar los parámetros resultantes de AUC, Fpo, Clb, $t_{1/2}$, Cmax y tmax tal como se conoce en la técnica.

C. Ensayos estándar de cardiomiocitos

En un aspecto, se administra un péptido según la presente invención a una célula cardiaca y se evalúa la función de uniones comunicantes. Se pueden identificar los péptidos óptimos para dichos procedimientos en ensayos estándar de cardiomiocitos. En un aspecto, se aíslan células cardiacas de un mamífero, tal como corazones de cobaya, mediante perfusión con colagenasa según el método de Langendorf. Las células se exponen a péptido y se evalúa la G_j mediante el pinzamiento zonal de membrana utilizando métodos conocidos en la técnica. La conductancia intercelular (G_j) se calcula utilizando la fórmula:

$$G_j = \frac{\Delta I_p}{\Delta U_j} = \frac{I_{p, \text{ pulso}} - I_{p, \text{ reposo}}}{U_p - U_a}$$

(Ecuación 1)

en la que $I_{p, \text{ pulso}}$ y $I_{p, \text{ reposo}}$ representan la corriente en la célula pasiva durante el pulso y antes del pulso, respectivamente, y U_p y U_a representan el voltaje de la célula pasiva y activa. El cambio en el valor de G_j tras la administración del péptido se analiza comparando con los cambios relativos en j. Por ejemplo, se puede determinar la G_j relativa en función del tiempo antes, y durante, la estimulación con el péptido (por ejemplo, a aproximadamente 10^{-8} M).

En una realización, el péptido proporciona una G_j, que es sustancialmente la misma que la G_j (en aproximadamente $\pm 10\%$) de un péptido antiarrítmico, tal como AAP, AAP10, HP5, y análogos funcionales de los mismos. En un aspecto,

ES 2 353 666 T3

la célula es una célula isquémica y el péptido proporciona una G_j que es sustancialmente la misma que la de una célula no isquémica ($\pm 20\%$, preferiblemente, $\pm 10\%$).

5 En otra realización, los presentes péptidos proporcionan una G_J que es diferente de la G_j (en aproximadamente $\pm 40\%$) de un péptido antiarrítmico, tal como AAP, AAP10, HP5, y análogos funcionales de los mismos.

En WO2002/077017 (PCT/US02/05773, solicitada el 22 de febrero de 2002) se proporcionan detalles adicionales referentes a la realización de ensayos con cardiomiocitos.

10 D. Ensayo estándar de arritmia inducida por calcio

Los péptidos adecuados para la administración a células cardíacas se pueden identificar en un modelo *in vivo* de arritmias inducidas con calcio según el modelo Lynch *et al.* (1981) J Cardiovasc. Pharmacol. 3; 49-60. Se anestesian ratones (25-30 g) con una combinación neurolepto anestésica y se inserta una cánula i.v. en la vena de la cola. Se registra la señal ECG II principal de manera continua mediante la colocación de electrodos ECG de acero inoxidable en la pata delantera derecha y en la pata trasera izquierda. El electrodo de tierra se coloca en la pata trasera derecha. La señal se amplifica ($\times 5.000-10.000$) y se filtra (0,1-150 Hz) a través de un módulo ECG de Hugo Sachs Electronic modelo 689. La señal análoga se digitaliza a través de una placa de adquisición de datos de 12 bit (Data Translation modelo DT321) y se muestrea a 1000 Hz utilizando el software Notocord HEM 3.1 para Windows NT. Después de un periodo de equilibrado de 10 minutos, la muestra de prueba del péptido se inyecta en la vena de la cola. Los ratones pretratados con tampón se analizan como la medida del nivel de control en animales ni tratados. El volumen de inyección es de 100 ml en todos los experimentos.

25 La infusión de CaCl₂ (30 mg/ml, 0,1 ml/min \approx 100 mg/kg/min (cloruro de calcio-2-hidratado, Riedel-de Haën, Alemania)) se inicia 3 minutos después de la administración i.v. del fármaco o vehículo. El periodo de tiempo para el inicio del bloque AV de segundo grado se determina como el tiempo desde el inicio de la infusión de CaCl₂ hasta que tiene lugar el primer suceso arrítmico. Un suceso de bloqueo AV de segundo grado se define como un fallo intermitente de la conducción AV caracterizado por una onda P sin el complejo QRS concomitante.

30 Las respuestas se expresan en relación con el tiempo hasta el bloqueo AV de segundo grado ocurrido en ratones tratados con vehículo. Se determina el efecto máximo de los compuestos (por ejemplo, péptidos, AAP, AAP10 o controles). Preferiblemente, los péptidos según la presente invención presentan una actividad antiarrítmica comparable con los compuestos AAP, AAP10, HP5, o un análogo funcional de los mismos, es decir, los péptidos incrementan el tiempo hasta un bloqueo AV en un ratón después de la infusión de CaCl₂. Preferiblemente, los péptidos proporcionan por lo menos aproximadamente un 40% de actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 50% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 60% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 70% de la actividad de AAP, tal como por lo menos aproximadamente un 80% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 90% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 110% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 120% de la actividad de AAP, tal como por lo menos aproximadamente un 130% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 140% de la actividad de AAP, tal como aproximadamente un 150% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 160% de la actividad de AAP, tal como por lo menos aproximadamente un 170% de la actividad de AAP, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 180% de la actividad de AAP, preferiblemente por lo menos aproximadamente 190% de la actividad de AAP, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 200 o más % de la actividad de AAP (es decir, los péptidos muestran periodos de tiempo de aproximadamente la misma duración que inducido por AAP).

E. Ensayo estándar de la actividad de osteoblastos

50 La modulación de la comunicación intercelular representa un mecanismo por el cual los factores osteotrópicos regulan la actividad de las células formadoras de huesos. Por lo tanto, en un aspecto, los péptidos según la invención se utilizan para incrementar la actividad de los osteoblastos mediante el incremento de la comunicación por uniones comunicantes entre células óseas, aumentando así la formación ósea *in vivo*.

55 La eficacia de un péptido según la presente invención se puede analizar preliminarmente en células de osteoblastos humanos (hOB), por ejemplo, midiendo la actividad de la onda de calcio y/o la actividad de fosfatasa alcalina.

En un aspecto, las células se aíslan de médula ósea humana obtenida mediante la punción de la espina ilíaca posterior de voluntarios sanos (edad de 20 a 36): se recogen 10-15 ml de material de médula en 15 ml de PBS + Ca, Mg (Life Technologies, Cat. No. 14040) con 100 U/ml Heparina (Sigma, Cat. No. H-3149). La fracción mononuclear de la médula se aísla en un gradiente Lymphoprep (Nycomed Pharma, Cat. No. 1001967), mediante centrifugación a 2200 rpm durante 30 minutos. Después de su recogida, la fracción mononuclear se lava una vez con medio de cultivo y se centrifuga a 1800 rpm durante 10 min. Posteriormente, se cuentan las células y se emplazan en un medio de cultivo a 5×10^6 células/100 mm de placa. Medio de hOB (todos los reactivos obtenidos de Life Technologies): MEM sin Rojo Fenol con Glutamax (Cat. No. 041-93013) suplementado con suero de ternero fetal al 10% inactivado por calor (Cat. No. 10106) y Penicilina/estreptomina al 0,1% (Cat. No. 15140). El medio se cambia el día siguiente y las células se cultivan a 37°C en CO₂ al 5% con cambio de medio cada 7 días. Después de 4-6 semanas de cultivo, las células alcanzarán el 70% de confluencia. A continuación, el medio se complementa con Dexametasona 100 nM

ES 2 353 666 T3

(Sigma, Cat. No. D-4902) durante 7 días. A continuación, las células se emplacan para experimentos de visualización por vídeo: un cubreobjetos de vidrio de 25 mm #1 se coloca en una placa de 35 mm (o cada pocillo de una multiplaca de 6 pocillos), las células se emplacan a $2,5 \times 10^5$ células/cubreobjeto y se cultivan durante 2-3 días antes de su uso.

5

Se cultivan células ROS 17/2.8 en placas de 100 mm a 37°C con CO₂ al 5% y se cambia el medio cada 2-3 días. Medio ROS (todos los reactivos obtenidos de Life Technologies): MEM (Cat. No. 31095) se suplementa con suero de ternero inactivado por calor al 10% (Cat. No. 16170), NEAA al 1% (Cat. No. 11140), Piruvato Sódico al 1% (Cat. No. 11360), L-Glutamina al 1% (Cat. No. 25030) y Penicilina/Estreptomicina al 0,1% (Cat. No. 15140). Para experimentos de visualización de imágenes en vídeo, las células se emplacan en cubreobjetos $2-3 \times 10^5$ células/cubreobjeto y se cultivan durante 2-3 días antes de su uso.

10

Las células cultivadas en cubreobjetos se cargan con fura-2-AM 5 mM (Molecular Probes, Cat. No. F-1221), durante 30 minutos a 37°C, y se incuban en medio fresco durante 30 minutos. A continuación se fijan los cubreobjetos a una cámara de cultivo de PDMI-2 (Medical Systems Corp.), se mantienen a 37°C con CO₂, en un microscopio Zeiss Axiovert. Las ondas de calcio intercelular son inducidas por estimulación mecánica de una célula individual utilizando una micropipeta de vidrio de borosilicato fijado a un micromanipulador Eppendorf 5171.

15

Se realiza la visualización con imágenes utilizando un sistema de obtención de imágenes MetaMorph (Universal Imaging). La luz de excitación (340 y 380 nm) es proporcionada por un monocromador (T.I.L.L. Photonics GmbH). Las imágenes se adquieren con una cámara CCD intensificada (Dage MTI) y se digitalizan con un panel de procesamiento de imágenes Matrox MVP. El número de células implicadas en una onda de calcio en presencia y ausencia de péptido se puede utilizar para proporcionar una medición del incremento en GJIC.

20

En un aspecto, la administración de un péptido incrementa el número de células implicadas en una onda por lo menos aproximadamente dos veces en comparación con las células que se han expuesto a un control, tal como tampón. En otro aspecto, la administración de un péptido disminuye el número de células implicadas en una onda por lo menos aproximadamente dos veces. Los péptidos agonistas según la presente invención proporcionan por lo menos aproximadamente un 10% de la actividad de AAP en dicho ensayo, tal como por lo menos aproximadamente un 20% de la actividad, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 30% de actividad, tal como por lo menos aproximadamente un 40% de actividad, por ejemplo por lo menos aproximadamente un 50% de la actividad de AAP, preferiblemente, por lo menos aproximadamente un 70% de la actividad, y aún más preferiblemente, 100% o más actividad de la actividad de AAP.

25

30

Las células también se pueden medir por la presencia de la actividad de fosfatasa alcalina para proporcionar una medición general de la actividad de osteoblastos. En un aspecto, las células se emplacan en placas de 96 pocillos en una concentración de 8000 células/pocillo (hOB) ó 3000 células/pocillo (ROS) en 200 ml de medio de cultivo normal. En el día 5 (o el día 3 para las células ROS), las células se lavan con 200 ml de MEM, BSA al 0,1% (Sigma, Cat. No. A-9418). Las muestras que comprenden un medio adecuado (por ejemplo, 200 ml de MEM, BSA al 0,1%) que contiene varias concentraciones de péptidos, control, AAP o AAP10 se añaden a las células, y se continúa el cultivo durante aproximadamente 4 días (2 días para células ROS).

35

40

En aproximadamente el día 8 (preferiblemente el día 5 para células ROS), las células se analizan por la fosfatasa alcalina utilizando un ensayo de Fosfatasa Alcalina (ALP), tal como se conoce en la técnica. Los ensayos de ALP con generalmente métodos de punto final colorimétrico para la medición de la actividad enzimática, y se puede realizar utilizando un Kit de Fosfatasa Alcalina (Sigma, Cat. No. 104-LL). Preferiblemente, las células se lavan una vez con 200 ml de PBS+Ca, Mg, se añaden 100 ml de solución de Tampón Alcalino a cada pocillo y las células se incuban a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se añaden 100 ml de la solución sustrato a cada pocillo y la placa se incubaba a 37°C durante 30 min. Se añaden 100 ml NaOH 2,0 N a cada pocillo para detener la reacción. Se mide la absorbancia utilizando un lector de placas a 405 nm.

50

Los péptidos agonistas según la presente invención proporcionan por lo menos aproximadamente un incremento del 5% en la producción de fosfatasa alcalina en relación a la solución salina isotónica, preferiblemente, por lo menos aproximadamente un incremento del 10% en producción de fosfatasa alcalina en relación con la solución salina isotónica, y aún más preferiblemente un incremento del 15% o superior en la producción de fosfatasa alcalina en relación con la solución salina isotónica. El incremento en la producción de fosfatasa alcalina es una medición del incremento de la actividad de los osteoblastos y, por consiguiente, una medición de un incremento en la formación ósea.

55

F. Ensayo estándar de promotores de tumores

60

El compuesto 1,1-bis(p-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano, también conocido como el insecticida DDT, es un inhibidor de la comunicación por uniones comunicantes y tiene la capacidad de inducir tumores. Inhibe la comunicación célula a célula mediante la reducción del número y tamaño de uniones comunicantes y la exposición al DDT se asocia con niveles celulares reducidos de formas fosforiladas (activas) de la proteína de unión comunicante Cx43. Estas acciones se consideran fundamentales para las propiedades oncogénicas del compuesto (X. Guan, *et al.* (1996) *Carcinogenesis*, 17 1791-1798; R. J. Ruch, *et al.* (1994) *Carcinogenesis*, 15 301-306); B. V. Madhukar, *et al.* (1996) *Cancer Lett.* 106 117-123). Como medio de seguimiento de la eficacia terapéutica de los péptidos, se pueden determinar los efectos de los péptidos en el desacoplamiento inducido por DDT en células de osteoblastos humanos. De este modo, en un

65

ES 2 353 666 T3

aspecto, se utilizan los péptidos según la presente invención para inhibir o prevenir las reducciones de GJIC inducidas por un promotor de tumores (W. K. Hong, *et al.* (1997) *Science*, 278 1073-1077).

En un ensayo de ejemplo, se aíslan células de osteoblastos humanos de médula ósea humana obtenidas mediante punción de la espina ilíaca posterior de voluntarios sanos (edad de 20 a 36). Se recogen 10-15 ml de material de médula ósea en 15 ml de PBS+Ca,Mg (Life Technologies, Cat. No. 14040) con 100 U/ml Heparina (Sigma, Cat. No. H-3149). La fracción mononuclear de la médula se aísla en un gradiente Lymphoprep (Nycomed Pharma, Cat. No. 1001967), mediante centrifugación a 2200 rpm durante 30 minutos.

Después de su recogida, la fracción mononuclear se lava una vez con medio de cultivo y se centrifuga a 1800 rpm durante 10 min. Posteriormente, se cuentan las células y se emplacan en un medio de cultivo a 8×10^6 células/100 mm de placa. El medio se cambia el día siguiente y las células se cultivan a 37°C en CO₂ al 5% con cambios de medio cada 7 días. Después de 3-4 semanas de cultivo, las células alcanzan el 70% de confluencia. A continuación, el medio se complementa con Dexametasona 100 nM (Sigma, Cat. No. D-4902) durante 7 días. A continuación, las células se emplacan para experimentos de visualización por vídeo. En general, las células se emplacan a $2,5 \times 10^5$ células/cubreobjeto y se cultivan durante 2-3 días antes de la visualización de imágenes.

Después del cultivo, las células se fijan a una cámara de cultivo de PDMI-2 (Medical Systems Corp.), se mantienen a 37°C con CO₂ superfundido en un microscopio Zeiss Axiovert. Se realizan microinyecciones utilizando una micropipeta cargada con una solución de amarillo lucifer 10 mM (Sigma, Cat. No. L-0259). Se inyecta con precaución una célula en la monocapa con LY durante 30 segundos; se extrae la micropipeta de la célula y después de 30 segundos se cuenta el número de células que muestran transferencia de colorante. Para un subgrupo de cultivos celulares, se añade DDT al medio en una concentración final de 13 mM y se deja durante 60 minutos. Las imágenes de las células se adquieren con una cámara CCD intensificada (Dage MTI) y se digitaliza con un panel procesador de imágenes Matrox MVP, utilizando el software para imágenes MetaMorph (Universal Imaging).

Bajo las condiciones de control (sin tratamiento con DDT), el colorante se extiende generalmente a una mediana de 14,5 células (n = 12). Las células expuestas a DDT muestran habitualmente un acoplamiento celular reducido con una mediana de 7 (n = 13).

Se añaden péptidos a la solución para baño en una concentración final de 10^{-8} mol/l y, después de 10 minutos, se realiza otra microinyección. Preferiblemente, los péptidos agonistas según la presente invención muestran un incremento en la transferencia de colorante de célula a célula. Más preferiblemente, este incremento es significativamente diferente de las muestras de control (sin péptidos) determinado utilizando test estadísticos de rutina, tal como el test estadístico no paramétrico de Wilcoxon (con $p < 0,05$). Preferiblemente, los péptidos muestran disminuciones en la inhibición de GJIC que son por lo menos aproximadamente un 50%, preferiblemente aproximadamente un 70%, y más preferiblemente, aproximadamente un 100% o superior, que las reducciones observadas para AAP.

Este ensayo se puede utilizar para identificar péptidos candidatos con la eficacia terapéutica más elevada al invertir el acoplamiento intercelular reducido en relación con la promoción de tumores y, en un aspecto, dichos péptidos se administran a pacientes con riesgo de desarrollar o tener cáncer. Se puede utilizar un péptido solo o en combinación con otros péptidos y/o en una terapia de combinación con otros agentes anti-cancerosos.

Se pueden realizar otros ensayos para identificar péptidos que producen sustancialmente las mismas respuestas fisiológicas que los péptidos antiarrítmicos AAP, AAP10, HP, y sus análogos funcionales (por ejemplo, para identificar agonistas) o que inhiben o suprimen estas respuestas fisiológicas (por ejemplo, para identificar antagonistas). Entre los ensayos adecuados se incluyen, pero sin limitación: ensayos para medir la formación de AMPc en células (por ejemplo, células CHO); ensayos de eficacia de AMPc (por ejemplo, midiendo la inhibición de la formación de compuestos parecidos a APP por AMPc estimulada por forskolina en células CHO); recambio de fosfoinositol en cardiomiocitos (Meier *et al.*) (E. Meier, *et al.* (1997) *Drug Development Research*, 40: 1-16); y las respuestas a glucose y privación de oxígeno.

Anteriormente se detallan un conjunto de ensayos estándar. Se describen ensayos adicionales en la PCT/US02/05773, presentada el 22 de febrero de 2002, toda ella incorporada por referencia en la presente invención. Estos ensayos son sólo ejemplos y otros ensayos adecuados que se pueden desarrollar y estandarizar están comprendidos en el alcance de la presente invención.

Composiciones farmacéuticas

Los péptidos se pueden formular en una composición farmacéutica que comprende uno o más de cualquiera de los péptidos descritos anteriormente, en combinación con un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones están preferiblemente en una forma adaptada para la administración oral.

Las formulaciones para la administración oral se pueden preparar de una manera conocida para el experto en la materia, por ejemplo, tal como se describe en general en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 y ediciones más recientes y en monografías en las series "Drugs and the Pharmaceutical Sciences", Marcel Dekker. En un aspecto preferido, las composiciones

ES 2 353 666 T3

están en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, pélets, pastilla, pastilla para chupar y similares. En, por ejemplo, la Patente US No. 5.350.741 se describen formulaciones entéricas adecuadas.

5 El portador o diluyente farmacéutico utilizado puede ser un portador sólido o líquido convencional. Ejemplos de portadores sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrina, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico o alquil éteres inferiores de celulosa. Ejemplos de portadores líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, polioxietileno y agua.

10 De manera similar, el portador o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solos o mezclados con una cera.

15 Si se utiliza un portador sólido para la administración oral, la preparación se puede poner como comprimidos, colocarse en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o pélet, o puede estar en forma de pastilla o pastilla para chupar. La cantidad de portador sólido variará ampliamente, pero será normalmente desde aproximadamente 25 mg hasta aproximadamente 1 g.

Si se utiliza un portador líquido, la preparación puede estar en forma de un jarabe o líquido adecuado para la ingestión oral.

20 Se entenderá que las cantidades preferidas reales de compuestos activos utilizadas en una terapia determinada variará según, por ejemplo, el compuesto específico que se utiliza, la composición particular formulada, el modo de administración y las características del sujeto, por ejemplo, la especie, el sexo, el peso, la salud general y la edad del sujeto. Las dosis de administración óptimas para un protocolo de administración determinado se pueden determinar fácilmente por los expertos en la materia utilizando tests de determinación convencionales de la dosificación realizados con respecto a las directrices anteriores. Los intervalos de dosificación adecuados pueden incluir desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día.

30 Los compuestos terapéuticos de la presente invención se administran de manera adecuada en forma protonada y en forma soluble en agua, por ejemplo, como una sal farmacéuticamente aceptable, habitualmente una sal de adición, tal como una sal de adición de ácido inorgánico, por ejemplo, una sal de clorhidrato, sulfato, o fosfato, o una sal de adición de ácido orgánico, tal como una sal de acetato, maleato, fumarato, tartrato, o citrato. Las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos terapéuticos de la presente invención también pueden incluir sales metálicas, particularmente sales de metales alcalinos, tales como una sal de sodio o sal de potasio; sales de metales alcalinotérreos, tal como una sal de magnesio o calcio; sales de amonio, tal como una sal de amonio o tetrametilamonio; o un sal de adición de aminoácido, tal como una sal de lisina, glicina, fenilalanina.

Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar de forma tópica para tratar enfermedades vasculares periféricas y como tales se pueden formular como una crema o pomada.

40 Los presentes péptidos también se pueden formular en composiciones, tales como soluciones o suspensiones estériles para la administración no oral. Los péptidos de la presente invención se pueden administrar parenteralmente, es decir, mediante administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intrarectal, intravaginal o intraperitoneal.

45 La presente invención se describirá a continuación mediante los siguientes ejemplos de trabajo que ilustran las realizaciones preferidas de la invención.

Métodos de tratamiento

50 En un aspecto, la presente invención proporciona un método de administración a un paciente que tiene o presenta el riesgo de desarrollar una condición asociada con GJIC dañada, de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los péptidos descritos anteriormente. Preferiblemente, la administración es oral. Los pacientes que se pueden tratar utilizando péptidos según la presente invención incluyen, pero sin limitación, animales, preferiblemente mamíferos, por ejemplo, roedores (incluyendo ratones, ratas, hámsters y lagomorfos, tales como conejos), perros, cerdos, cabras (generalmente cualquier animal doméstico) y primates. En un aspecto preferido, un paciente es un ser humano.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido según la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición patológica que implica la comunicación de uniones comunicantes dañada que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho péptido.

65 Entre los ejemplos de condiciones que se pueden tratar se incluyen, pero sin limitación, la enfermedad cardiovascular, la inflamación del epitelio de las vías respiratorias, trastornos del tejido alveolar, incontinencia de la vejiga, oído dañado debido a enfermedades de la cóclea, lesiones endoteliales, retinopatía diabética y neuropatía diabética, isquemia del sistema nervioso central y médula espinal, trastornos del tejido dental, incluyendo la enfermedad periodontal, enfermedades renales, fracaso en el transplante de médula ósea, heridas, disfunción eréctil, incontinencia urinaria de la vejiga, dolor neuropático, inflamación subcrónica y crónica, cáncer y fracaso en el transplante de médula ósea y células madre, condiciones patológicas que aparecen durante el transplante de células y tejidos o durante procedimien-

tos médicos, tales como cirugía; así como condiciones causadas por un exceso de especies reactivas de osígenos y/o radicales libres y/u óxido nítrico.

Arritmia

5 En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un péptido antiarrítmico farmacológicamente activo, y la utilización del mismo, para el tratamiento de arritmias y complicaciones trombóticas que surgen durante trastornos cardiovasculares, tal como enfermedad cardíaca isquémica aguda (por ejemplo, angina de pecho estable, angina de pecho inestable, infarto de miocardio agudo), fallo cardíaco congestivo (por ejemplo, fallo cardíaco sistólico, diastólico, con volumen minuto alto, con volumen minuto bajo, del lado derecho o del lado izquierdo), enfermedades cardíacas congénitas, cor pulmonale, cardiomiopatías, miocarditis, enfermedad cardíaca hipertensa, durante la revascularización coronaria y similares.

15 En realizaciones específicas, se utiliza un péptido antiarrítmico según la presente invención para tratar y/o prevenir bradiarritmias, (por ejemplo, debido a la enfermedad en el nódulo sinusal, nódulo AV, haz de His, rama derecha o izquierda del haz) y taquiarritmias asociadas con la reentrada (por ejemplo, complejos prematuros atriales, complejos de unión AV, complejos prematuros ventriculares, fibrilación atrial, latido atrial, taquicardia supraventricular paroximal, taquicardia reentrante del nódulo sinusal, taquicardia reentrante nodal AV y taquicardia ventricular no sostenida), ya sean solas o combinadas con otros compuestos antiarrítmicos, tal como agentes de la clase I (por ejemplo, lidocaína), agentes de la clase II (por ejemplo, metoprolol o propranolol), agentes de la clase III (por ejemplo, amiodarona o sotalol) o agentes de la clase IV (por ejemplo, verapamil).

20 Adicionalmente, o alternativamente, los péptidos según la presente invención se utilizan para tratar una o más de: una arritmia de reentrada; reentrada ventricular (por ejemplo, tal como surge durante el infarto de miocardio agudo, infarto de miocardio crónico, angina de pecho estable y angina de pecho inestable); cardiomiopatía infecciosa o autonómica; fibrilación atrial; repolarización alternans, taquicardia ventricular monomórfica; alternans de onda T; bradiarritmias; y, en general, una contractilidad reducida del tejido cardíaco, trombosis y similares.

Osteoporosis

30 En un aspecto adicional, los péptidos según la presente invención se utilizan para prevenir y/o tratar la osteoporosis u otras patologías que afectan a la formación, el crecimiento o mantenimiento de los huesos. Los péptidos que son capaces de normalizar la GJIC atenuada entre los osteoblastos humanos durante la hipoxia son particularmente adecuados para el tratamiento de las enfermedades óseas con una formación ósea dañada en relación a la resorción ósea. Los péptidos óptimos para su uso en dichos métodos se pueden seleccionar en ensayos para el aumento de la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en osteoblastos, lo cual proporciona un medio para monitorizar la viabilidad celular y el crecimiento celular como consecuencia del mantenimiento adecuado de GJIC. En un aspecto, los osteoblastos humanos se estimulan con concentraciones diferentes de péptidos de 1×10^{-13} a 1×10^{-6} , y se comparan con controles no tratados. Bajo condiciones de cultivo normales, los péptidos preferiblemente incrementan la actividad de ALP. Incluso más preferiblemente, los péptidos estimulan la actividad de ALP durante condiciones hipóxicas en concentraciones que varían desde 10^{-11} hasta 10^{-8} mol/l. De este modo, el ensayo se puede utilizar para optimizar las composiciones de péptidos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades óseas asociadas con una escasa vascularización, hipoxia e isquemia en el tejido óseo.

45 En otro aspecto, los péptidos según la presente invención se utilizan para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de las articulaciones que implican el acoplamiento dañado de célula a célula. Por ejemplo, los péptidos se pueden utilizar para la prevención y/o tratamiento de enfermedades de las articulaciones que implican un estrés metabólico. Éstas incluirían cualquier forma de artritis asociada con una vascularización disminuida o curación del tejido cartilaginoso fracturado.

Cáncer

55 En otro aspecto, los péptidos según la presente invención se utilizan para tratar el cáncer. La carcinogénesis se caracteriza por una discapacidad progresiva de los mecanismos de control del crecimiento en que están implicados factores de crecimiento, oncogenes y genes de supresores tumorales. Un punto general en la carcinogénesis y tumorigénesis es la subregulación de la GJIC. La permeabilidad de las uniones comunicantes en células tumorales utilizando el ensayo de transferencia de colorantes es habitualmente inferior que la GJIC en el tejido circundante. Además, se sabe que el sincronismo de las uniones comunicantes se realiza mediante promotores tumorales que reducen la GJIC. Por lo tanto, en un aspecto, los péptidos según la presente invención se utilizan como medicamentos para el tratamiento del cáncer solos o en combinación con terapias anticancerosas tradicionales.

Heridas

65 En un aspecto adicional, los péptidos según la presente invención se utilizan para tratar heridas y, en particular, para acelerar la curación de heridas. La curación de heridas implican la interacción de muchos tipos de células y se considera que la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes juega un papel importante en la coordinación del metabolismo celular durante el crecimiento y desarrollo de células implicadas en la reparación y regeneración de tejido (K. M. Abdullah, *et al.* (1999) *Endocrine*, 10 35-41; M. Saitoh, *et al.* (1997) *Carcinogenesis*,

18: 1319-1328; J. A. Goliger, *et al.* (1995) *Mol. Biol. Cell*, 6 1491-1501). Los péptidos se pueden administrar al sitio de la herida mediante administración tópica utilizando portadores conocidos en la técnica (por ejemplo, pomadas, cremas, etc.) o se pueden administrar sistémicamente, por ejemplo, para tratar heridas de tejidos internos, tal como en el tratamiento de lesiones crónicas de úlcera gástrica.

5

Las funciones adicionales en que se ha implicado la comunicación intercelular por uniones comunicantes endoteliales son el comportamiento migratorio de las células endoteliales después de lesión, angiogénesis, crecimiento y senescencia endotelial, y la coordinación de respuestas vasomotoras (G. J. Christ, *et al.* (2000) *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33: 423-429). Por lo tanto, en un aspecto, un péptido según la presente invención se utiliza para aumentar las respuestas vasculares realizadas y para mejorar el suministro sanguíneo durante las condiciones de demanda metabólica incrementada (por ejemplo, ejercicio físico, taquicardia) y durante isquemia.

10

También se cree que las uniones comunicantes proporcionan la unión molecular para la señalización coordinada de largo alcance entre miembros individuales del compartimento glial. Así mismo, los astrocitos son idealmente adecuados para el soporte metabólico de neuronas, ya que están funcionalmente polarizados con una extremidad que toca el lecho vascular y el otro polo se aproxima al parénquima neuronal (R. Dermietzel (1998) *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 26: 176-183). Por lo tanto, en una realización preferida, los péptidos según la presente invención se administran a un paciente con necesidad de prevenir el daño isquémico en el cerebro mediante el incremento del soporte metabólico entre células gliales y neuronas. Dichos pacientes pueden incluir pacientes con psicosis orgánica pueden presentarse con signos, tales como la depresión, ansiedad, déficit de aprendizaje y de memoria, fobias, y alucinaciones o pacientes que han sufrido una lesión cerebral traumática. Preferiblemente, dichos péptidos se seleccionan o formulan para que estén disponibles para el sistema nervioso central (es decir, proporcionados o conjugados con portadores que facilitan el transporte a través de la barrera hemato-encefálica).

15

20

25

Los péptidos según la presente invención también se pueden utilizar para acelerar la reparación después de una lesión nerviosa o durante el injerto de células inmaduras (células progenitoras) en el tejido cerebral, por ejemplo, tal como en pacientes con neurotrauma, isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas crónicas, tales como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington (H. Aldskogius, *et al.* (1998) *Prog. Neurobiol.*, 55: 1-26).

30

En realizaciones específicas, un péptido según la presente invención se puede utilizar, debido al efecto en los canales de uniones comunicantes intercelulares, para tratar y/o prevenir las cataratas (D. Mackay, *et al.* (1999) *Am. J. Hum. Genet.*, 64 1357-1364), para tratar y/o prevenir la vascularización de la córnea en estados patológicos con una nutrición pobre de la córnea e incrementar la curación de lesiones córneas (S. G. Spanakis, *et al.* (1998) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39: 1320-1328) y/o prevenir la hipertensión.

35

Será obvio para los expertos en la materia que los péptidos y composiciones farmacéuticas según la presente invención se pueden utilizar para tratar cualquier condición patológica o patología asociada con una comunicación por uniones comunicantes dañada (reducciones o incrementos anormales). Preferiblemente, se administran uno o más péptidos o composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más péptidos a un paciente con necesidad de los mismos en una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal como se utiliza aquí, "una cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que reduce los síntomas de una condición patológica o patología determinada, y preferiblemente, que normaliza las respuestas fisiológicas en un paciente con la condición patológica o patología. La reducción de los síntomas o normalización de las respuestas fisiológicas se pueden determinar utilizando métodos de rutina en la técnica y pueden variar con una condición patológica o patología determinada. En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más péptidos o composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos en una cantidad que restablece un parámetro fisiológico medible hasta sustancialmente el mismo valor (preferiblemente en $\pm 30\%$, más preferiblemente en $\pm 20\%$ y aún más preferiblemente en el 10% del valor) del parámetro en un paciente sin el DMF.

40

45

Ejemplos

50

A continuación se ilustrará adicionalmente la invención en referencia a los siguientes ejemplos. Se entenderá que lo siguiente es a modo de ejemplo únicamente y que se pueden realizar modificaciones en detalle manteniendo aún el alcance de invención.

Ejemplo 1

55

Síntesis de péptidos

A continuación, se describe un procedimiento general preferido. Sin embargo, en WO98/11125, incorporado por referencia en su totalidad, se encuentran descripciones más detalladas de síntesis de péptidos en fase sólida.

60

a. *Síntesis general de péptidos*

Aparato y estrategia sintética

65

Los péptidos se sintetizaron por lotes en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración utilizando 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) como grupo protector de N- α -amino y grupos protectores habituales adecuados para las funciones de las cadenas laterales.

Disolventes

El disolvente DMF (N,N-dimetilformamida, Riedel de-Häen, Alemania) se purificó pasando a través de una columna empacada con una resina de intercambio catiónico fuerte (Lewatit S 100 MB/H ácido fuerte, Bayer AG Leverkusen, Alemania) y se analizan las aminas libres antes de la utilización mediante la adición de 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH) que ocasiona un color amarillo (anión Dhbt-O⁻) si están presentes aminas libres. El disolvente DCM (diclorometano, grado analítico, Riedel de-Häen, Alemania) se utilizó directamente sin purificación. El acetonitrilo (grado HPLC, Lab-Scan, Dublin Irlanda) se utiliza directamente sin purificación.

Aminoácidos

Los aminoácidos protegidos con Fmoc se adquirieron de Advanced ChemTech (ACT) en formas protegidas adecuadas de las cadenas laterales. En otros casos, los aminoácidos protegidos (Boc-Asp(OFm)-OH, Boc-D-Asp(OFm)-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-D-Lys (Aloc)-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, Boc-D-Lys(Fmoc)-OH, Boc-Orn(Fmoc)-OH) eran de Bachem (Suiza); Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Sar-OH eran de NovaBiochem (Suiza).

Ácido benzoico y derivados de bencil amina

El ácido benzoico y los derivados de bencil amina se adquirieron de Aldrich y se utilizaron sin purificación adicional.

Reactivos de acoplamiento

El reactivo de acoplamiento diisopropilcarbodiimida (DIC) se adquirió de (Riedel de-Häen, Alemania), PyBop de Advanced ChemTech.

Enlazadores

El ácido (4-hidroximetilfenoxi)acético (HMPA), se adquirió de Novabiochem, Suiza; y se acopló a la resina como un éster 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) preformado mediante DIC.

Soportes sólidos

Péptidos sintetizados según la estrategia Fmoc en resinas TentaGel S 0,22-0,31 mmol/g (TentaGel-SNH₂; TentaGel S-Ram, polímero Rapp, Alemania).

Catalizadores y otros reactivos

La diisopropiletilamina (DIEA) se adquirió de Aldrich, Alemania, y la etilendiamina de Fluka, la piperidina y piridina de Riedel-de Häen, Frankfurt, Alemania. La 4-(N,N-dimetilamino)piridina (DMAP) se adquirió de Fluka, Suiza y se utilizó como catalizador en reacciones de acoplamiento que implican anhídridos simétricos. El etanditiol se adquirió de Riedel-de Häen, Frankfurt, Alemania. La 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH), el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (HOAt) se obtuvo de Fluka, Suiza.

Procedimientos de acoplamiento

El primer aminoácido se puede acoplar como un anhídrido simétrico en DMF generado a partir del aminoácido protegido en n- α apropiado y los posteriores aminoácidos se pueden acoplar como ésteres HOBt o HOAt generados *in situ* fabricados a partir de aminoácidos protegidos en n- α apropiados y HOBt o HOAt mediante DIC en DMF. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80°C con el fin de evitar la desprotección de Fmoc durante el test (B. D. Larsen, A. Holm, Int. J. Pept. Protein Res. 1994, 43 1-9).

Desprotección del grupo protector de N- α -amino (Fmoc)

La desprotección del grupo Fmoc se realizó mediante el tratamiento con piperidina al 20% en DMF (1 x 5 y 1 x 10 min.), seguido de lavado con DMF (5 x 15 ml, 5 min. cada vez) hasta que no se pudo detectar color amarillo después de la adición de Dhbt-OH al DMF drenado.

ES 2 353 666 T3

Desprotección de Alil/Aloc

Se añadió a la resina de péptido una solución de 3 eq. de Pd(PPh₃)₄ disuelta en 15-20 ml de CHCl₃, AcOH, NMM (37:2:1). El tratamiento se continuó durante tres horas a temperatura ambiente acompañado de burbujeo de una corriente de N₂ a través de la mezcla.

Acoplamiento de ésteres Hobt

Se disolvieron 3 eq. de aminoácidos protegidos en N- α -amino en DMF junto con 3 eq. de HOBt y 3 eq. de DIC y, a continuación, se añadieron a la resina.

Anhídrido simétrico preformado

Se disolvieron seis eq. de aminoácidos protegidos en N- α -amino en DCM y se enfriaron hasta 0°C. Se añadió DIC (3 eq.) y la reacción se continuó durante 10 minutos. Se extrajo el disolvente al vacío y el resto se disolvió en DMF. La solución se añadió inmediatamente a la resina seguido de 0,1 eq. de DMAP.

Separación del péptido se la resina con ácido

Los péptidos se separaron de las resinas mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% (TFA, Riedel-de Hën, Frankfurt, Alemania)-agua v/v o con TFA al 95% y etanoditiol al 5% v/v a temperatura ambiente durante 2 horas. Las resinas filtradas se lavaron con TFA-agua al 95% y los filtrados y lavados se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se lavó con éter y se liofilizó a partir de ácido acético-agua. EL producto crudo liofilizado se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y se identificó mediante espectrometría de masas acoplada a ionización por electrospray (ESMS).

Síntesis de péptidos por lotes en Resina TentaGel (PEG-PS)

Se colocó la resina TentaGel (1g, 0,22-0,31 mmol/g) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración. La resina se hinchó en DMF (15 ml) y se trató con piperidina al 205 en DMF para asegurar la presencia de grupos amino no protonados en la resina. La resina se drenó y se lavó con DMF hasta que no se pudo detectar color amarillo después de la adición de Dhbt-OH a la DMF drenada. Se acopló HMPA (3 eq.) como un éster de HOBt preformado tal como se ha descrito anteriormente y se continuó el acoplamiento durante 24 horas. La resina se drenó y se lavó con (5 x 5 ml, 5 minutos cada vez) y se comprobó la acilación mediante el test de ninhidrina. EL primer aminoácido se acopló como un anhídrido simétrico preformado tal como se ha descrito anteriormente. Los siguientes aminoácidos según la secuencia se acoplaron como ésteres de HOBt (3 eq.) protegidos con Fmoc preformados tal como se ha descrito anteriormente. Los acoplamientos se continuaron durante 2 horas, a menos que se especifique lo contrario. La resina se drenó y se lavó con DMF (5 x 15 ml, 5 min cada vez) a fin de eliminar el exceso de reactivo. Todas las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80°C. Después de completar la síntesis, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 5 min cada vez), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada vez) y finalmente dietiléter (3 x 15 ml, 1 min cada vez) y se secó al vacío.

Condiciones de HPLC preparativa

Se llevó a cabo una cromatografía preparativa utilizando VISION Workstation (PerSeptive Biosystem) equipado con un colector de fracciones/automuestreador automático AFC2000. Se utilizó software VISION-3 para el control de los instrumentos y la adquisición de datos.

Columna

Kromasil (EKA Chemicals) KR100-10-C8 100A, C-8, 10 h; CER 2230, 250 x 50,8 mm o una VYDAC 218TP101550, 300A, C-18, 10-15 h, 250 x 50 mm. El sistema tampón utilizado incluía A: TFA al 0,1% en MQV; B: TFA al 0,085%, MQV al 10%, MeCN al 90%. Las velocidades de flujo fueron 35-40 ml/min y la temperatura de la columna fue de 25°C. La detección UV se realizó a 215 nm y 280 nm. Se optimizaron gradientes adecuados para péptidos individuales.

Condiciones de HPLC analítica

Se realiza un análisis HPLC por gradiente utilizando un sistema HPLC Hewlett Packard HP 1100 HPLC que consistía en una Bomba Cuaternaria HP 1100, un Automuestreador HP 1100, un termostato de columna HP 1100 y un detector de múltiples longitudes de onda HP 1100. Se utilizó software Hewlett Packard Chemstation para LC (rev. A.06.01) para el control de los instrumentos y la adquisición de datos.

Para la HPLC analítica, se utilizaron diferentes columnas según fuera apropiado, tal como VYDAC 238TP5415, C-18, 5 mm, 300A, o una Jupiter, Phenomenex 00F-4053-E0; 5 hm C-18, 300A 150 x 4,6 mm y otras. El sistema tampón utilizado incluía A: TFA al 0,1% en MQV; B: TFA al 0,085%, MQV al 10%, MeCN al 90%. Las velocidades de flujo fueron 1 ml/min. La temperatura de la columna preferida fue de 40°C. La detección UV se realizó a 215 nm. Al igual que antes, se optimizaron gradientes adecuados para péptidos individuales.

ES 2 353 666 T3

Espectrometría de masas

Los péptidos se disolvieron en un super gradiente de metanol (Labscan, Dublin, Irlanda), agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) y ácido fórmico (Merck, Damstadt, Alemania) (50:50:0,1 v/v/v) para producir concentraciones entre 1 y 10 mg/ml. Las soluciones de péptidos (20 ml) se analizaron en el modo de polaridad positiva mediante ESI-TOF-MS utilizando un espectrómetro de masas LCT (Micromass, Manchester, UK) de precisión de +/- 0,1 m/z.

Procedimiento sintético general

En todas las síntesis, se colocó TentaGel-S-NH₂ (0,23 mmol/g, 1g) seco en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató tal como se ha descrito anteriormente bajo el título "síntesis de péptidos por lotes en resina TentaGel". Cuando la lisina y análogos de la misma (por ejemplo, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 1,3-diaminopropanoico, etc.) se situaban de forma C-terminal se acoplaban como los derivados protegidos con Fmoc en N- α con protección ivDde o Alloc de la función de la cadena lateral (por ejemplo, Fmoc-Lys(Alloc)-OH). Cuando la lisina y análogos de la misma se situaban de forma N-terminal se acoplaban como los derivados protegidos con Boc en N- α con protección Fmoc de las funciones de las cadenas laterales (por ejemplo, Boc-Lys(Fmoc)-OH). Cuando el ácido aspártico, ácido glutámico y análogos de los mismos se situaban de forma C-terminal se acoplaban como derivados protegidos con Fmoc en N- α con protección alílica de las funciones de las cadenas laterales (por ejemplo, Fmoc-Asp(Oalil)-OH). Cuando el ácido aspártico, ácido glutámico y análogos de los mismos se situaban de forma N-terminal se acoplaban como derivados protegidos con Boc en N- α con protección Fm de las funciones de las cadenas laterales (por ejemplo, Boc-Asp(OFm)-OH). Cuando otros aminoácidos diferentes de los anteriores se situaban de forma C-terminal se acoplaban como derivados protegidos con Fmoc en N- α con protección adecuada de las funciones de las cadenas laterales o cuando se situaban de forma N-terminal como derivados protegidos con Boc en N- α con protección adecuada de las funciones de las cadenas laterales.

En todos los casos, el dipéptido se ensambló seguido de la desprotección del grupo protector de la cadena lateral de la lisina, ácido aspártico o ácido glutámico o análogos de los mismos.

En el caso de la lisina o análogos de los mismos, el grupo hidrofóbico funcionalizado como ácido carboxílico se acopló como un éster HOBt generado *in situ* mediante DIC en THF.

En el caso del ácido aspártico o el ácido glutámico o análogos de los mismos, el grupo hidrofóbico funcionalizado como una amina se acopló al éster HOBt regenerado del ácido carboxílico de la cadena lateral mediante DIC en DMF catalizado por trietilamina.

Todos los acoplamientos se continuaron durante por lo menos 2 horas. Las acilaciones se comprobaron mediante el test de ninhidrina realizado a 80°C tal como se ha descrito anteriormente. Después de completar la síntesis, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 1 min cada vez), DCM (3 x 15 ml, 1 min cada vez), dietiléter (3 x 15 ml, 1 min cada vez) y se secó al vacío. A continuación, el péptido se separó de la resina tal como se ha descrito anteriormente y se liofilizó.

Después de la purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, el producto peptídico se recogió y se confirmó la identidad del péptido mediante ES-MS.

El procedimiento anterior se utiliza para la síntesis de todos los péptidos ejemplificados a continuación y los péptidos mostrados en la tabla 1 de la memoria. Los esquemas de síntesis de ejemplo se muestran en las figuras 1A y 1B.

b. Síntesis de péptidos individuales

Síntesis de H-Gly-Lys (4-nitrobenzoil)-OH (compuesto 1)

Se acopló la lisina como Fmoc-Lys(ivDde)-OH y la glicina N-terminal como el derivado Boc. El grupo protector ivDde se extrajo tal como se ha descrito anteriormente. La lisina y la glicina se ensamblaron primero en el soporte sólido. A continuación, se extrajo el grupo ivDde y posteriormente se acopló el ácido 4-nitrobenzoico como un éster de HOBt generado *in situ* mediante DIC en THF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 35 mg de producto peptídico con una pureza superior al 99%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 352,28, MH⁺ calculado 352,21).

Síntesis de H-Gly-Lys(4-cianobenzoil)-OH (compuesto 3)

Se acopló la lisina como Fmoc-Lys(ivDde)-OH y la glicina N-terminal como el derivado Boc. El grupo protector ivDde se extrajo tal como se ha descrito anteriormente. La lisina y la glicina se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación se extrajo el grupo ivDde y posteriormente se acopló el ácido 4-cianobenzoico como un éster de HOBt generado *in situ* mediante DIC en DMF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 6 mg de producto peptídico con una pureza superior al 90%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 332,25, MH⁺ calculado 332,21).

ES 2 353 666 T3

Síntesis de H-Gly-Lys(4-metoxibenzoil)-OH (compuesto 4)

Se acopló la lisina como Fmoc-Lys(ivDde)-OH y la glicina N-terminal como el derivado Boc. El grupo protector ivDde se extrajo tal como se ha descrito anteriormente. La lisina y la glicina se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación, se extrajo el grupo ivDde y posteriormente se acopló el ácido 4-metoxibenzoico como un éster de HOBt generado *in situ* mediante DIC en DMF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 7 mg de producto peptídico con una pureza superior al 95%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 337,28, MH⁺ calculado 337,21).

Síntesis de H-Lys(4-nitrobenzoil)-Gly-OH (compuesto 7)

La glicina se acopló como Fmoc-glicina y la lisina N-terminal se acopló como Boc-Lys(Fmoc)-OH. La glicina y la lisina se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación, se extrajo el Fmoc en la cadena lateral de lisina y posteriormente se acopló el ácido 4-nitrobenzoico como un éster de HOBt generado *in situ* mediante DIC en THF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 64 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98%. La identidad del péptido se confirmó mediante ESMS (MH⁺ hallado 352,19, MH⁺ calculado 352,24).

Síntesis de H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Gly-OH (compuesto 21)

La glicina se acopló como Fmoc-glicina y la lisina N-terminal se acopló como Boc-D-Lys(Fmoc)-OH. La glicina y la lisina se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación, se extrajo el Fmoc en la cadena lateral de lisina y posteriormente se acopló el ácido 4-metoxibenzoico como un éster de HOBt generado *in situ* mediante DIC en DMF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 31 mg de producto peptídico con una pureza superior al 97%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 337,24, MH⁺ calculado 337,21).

Síntesis de H-D-Lys(4-nitrobenzoil)-Gly-OH (compuesto 22)

La glicina se acopló como Fmoc-glicina y la lisina N-terminal se acopló como Boc-D-Lys(Fmoc)-OH. La glicina y la lisina se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación, se extrajo el Fmoc en la cadena lateral de lisina y posteriormente se acopló el ácido 4-nitrobenzoico como un éster de HOBt generado *in situ* mediante DIC en THF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 65 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 352,27, MH⁺ calculado 352,24).

Síntesis de H-D-Lys(benzoil)-Gly-OH (compuesto 23)

La glicina se acopló como Fmoc-glicina y la lisina N-terminal se acopló como Boc-D-Lys(Fmoc)-OH. La glicina y la lisina se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación, se extrajo el Fmoc en la cadena lateral de lisina y posteriormente se acopló el ácido benzoico como un éster de HOBt generado *in situ* mediante DIC en DMF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 31 mg de producto peptídico con una pureza superior al 96%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 307,22, MH⁺ calculado 307,24).

Síntesis de H-D-Lys(4-t-Butilbenzoil)-Gly-OH (compuesto 54)

La glicina se acopló como Fmoc-glicina y la lisina N-terminal se acopló como Boc-D-Lys(Fmoc)-OH. La glicina y la lisina se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación, se extrajo el Fmoc en la cadena lateral de lisina y posteriormente se acopló el ácido 4-t-Butilbenzoico como un éster de HOBt generado *in situ* mediante DIC en DMF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 34 mg de producto peptídico con una pureza superior al 97%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 363,27, MH⁺ calculado 363,22).

Síntesis de H-Asn(NH(4-metoxibencil))- D-Alanina-OH (compuesto 80)

La alanina se acopló como Fmoc-D-alanina y la asparagina N-terminal se acopló como Boc-Asp(OFm)-OH. La alanina y el ácido aspártico se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación, se extrajo el Fm en la cadena lateral del ácido aspártico y posteriormente se acopló 4-metoxibencilamina catalizado por trietilamina al éster de HOBt regenerado del ácido carboxílico de la cadena lateral mediante DIC en DMF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 17 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 323,17, MH⁺ calculado 323,15).

Síntesis de H-D-Asn(NH(4-metoxibencil))-Alanina-OH (compuesto 95)

La alanina se acopló como Fmoc-alanina y la asparagina N-terminal se acopló como Boc-D-Asp(OFm)-OH. La alanina y el ácido aspártico se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación, se extrajo el Fm en

ES 2 353 666 T3

la cadena lateral del ácido aspártico y posteriormente se acopló 4-metoxibencilamina catalizado por trietilamina al éster de HOBt pregenerado del ácido carboxílico de la cadena lateral mediante DIC en DMF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 25 mg de producto peptídico con una pureza superior al 98%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 323,12, MH⁺ calculado 323,15).

Síntesis de H-D-Asn(NH(4-nitrobencil))-Alanina-OH (compuesto 96)

La alanina se acopló como Fmoc-alanina y la asparagina N-terminal se acopló como Boc-D-Asp(O_Fm)-OH. La alanina y el ácido aspártico se ensamblaron primero sobre el soporte sólido. A continuación, se extrajo el Fm en la cadena lateral del ácido aspártico y posteriormente se acopló 4-nitrobencilamina catalizado por trietilamina al éster de HOBt pregenerado del ácido carboxílico de la cadena lateral mediante DIC en DMF. Después de purificación utilizando HPLC preparativa tal como se ha descrito anteriormente, se recogieron 102 mg de producto peptídico con una pureza superior al 99%. La identidad del péptido se confirmó mediante ES-MS (MH⁺ hallado 338,14, MH⁺ calculado 338,12).

Ejemplo 2

Biodisponibilidad

Materiales y métodos

Cribado farmacocinético y estudios de interacción con alimentos

Productos químicos y materiales

El agua utilizada para estos experimentos era de la calidad más elevada obtenida de un sistema primario de ósmosis inversa en combinación con un sistema de tratamiento secundario de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). El metanol era de calidad de supergradiente obtenido de Labscan Ltd. (Dublin, Irlanda). El ácido fórmico p.a. (98-100%) se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido heptafluorobutírico, grado HPLC, se obtuvo de Pierce (Rockford, III, Estados Unidos). El plasma estabilizado con EDTA de rata (Sprague-Dawley) se obtuvo de Harlan Sera Lab Ltd. (Loughborough, Reino Unido). Las muestras de sangre se recogieron en microtainers recubiertos de EDTA de potasio de BD Vacutainer Systems (Plymouth, Reino Unido). La preparación de muestras mediante ultrafiltración se realizó utilizando los dispositivos de filtración por centrifugación de Microcon con un corte de peso molecular de 3000 obtenidos de Millipore (Bedford, MA, Estados Unidos).

Instrumentación

El análisis por LC/MS/MS se realizó en un instrumento HPLC Waters Alliance 2790 en combinación con un espectrómetro de masas Quattro Ultima de Micromass (Manchester, Reino Unido). Tanto la LC como la MS se controlaron mediante el software MassLynx 3.5. Las separaciones por LC anterior a la detección con MS/MS se realizaron en un XTerra MS C18 (2.0 x 50 mm), partículas de 3,5 mm, (Waters, Milford, MA, Estados Unidos).

Animales

Se obtuvieron doce ratas Sprague-Dawley (aproximadamente 350 g) de M&B (Denmark) y se insertaron los catéteres en la vena y arteria femoral durante anestesia con Hypnorm[®]-Dormicum[®]. Después de la cirugía, las ratas se dejaron recuperar durante cinco días antes de iniciarse la administración de fármacos.

Fármacos y niveles de dosificación

Los dipéptidos (compuesto 22, compuesto 21, compuesto 23, compuesto 96, compuesto 95 y compuesto 54) se obtuvieron como sales de TFA y se disolvieron en PBS (KCl 2,6 mM, NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM y Na₂HPO₄ 8,2 mM ajustado a pH = 7,4) para proporcionar concentraciones de 500 mM. Los volúmenes de dosificación fueron 1 mL/kg correspondiente a dosis de 500 nmol/kg, respectivamente. Después de cada experimento, las soluciones de dosificación se diluyeron en ácido fórmico al 0,5% en agua y se analizaron mediante LC/MS/MS su contenido de sustancia fármaco. Las concentraciones de sustancia fármaco en las soluciones dosificantes se calcularon a partir de las respuestas de patrones en el intervalo de 1 a 1000 nM.

Diseño de estudios

Las sustancias fármaco se administraron a dos animales como bolos i.v. y p.o en un diseño de estudio cruzado. La dosis p.o. se administró a ratas en ayuno durante un periodo de 17 horas antes de la administración de fármacos. Los animales se dejaron descansar durante 48 horas entre las administraciones de fármacos. Después del primer experimento, las ratas recibieron una transfusión de sangre con sangre tratada con heparina.

Antes de la administración de fármacos (5 min) las ratas recibieron 500 IU de heparina como un bolo i.v. y se recogió una muestra de sangre de control. Después de la administración de fármacos, se recogieron muestras de

ES 2 353 666 T3

sangre de aproximadamente 250 ml de la arteria femoral en los siguientes puntos de tiempo; antes de la dosis (B.D.), 5, 15, 30, 60, 120, 180 y 240 min después de la administración i.v. y B.D., 10, 30, 50, 80, 120, 180, 240, y 300 min después de la administración p.o. Las muestras de sangre se almacenaron en hielo hasta la centrifugación durante 5 minutos a 10.000 x g (4°C) y el plasma (100 mL) se transfirió a tubos de polipropileno de 1,5 ml y se almacenaron a -20°C hasta la preparación de la muestra y el análisis por LC/MS/MS.

Preparación de muestras y análisis por LC/MS/MS

Las muestras de plasma se descongelaron en hielo y se mezclaron 100 mL de plasma con 100 mL de ácido fórmico al 1% (v/v) y se transfirieron a unidades de filtración microcon YM-3. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 1 hora a 8.300 x g a temperatura ambiente. Los filtrados se recogieron en viales de automuestreo de 300 mL y se almacenaron a 4°C hasta la inyección (40 mL) en la columna de LC. La cromatografía se realizó a 50°C utilizando un gradiente lineal desde tampón A al 100% (ácido fórmico al 0,1% en agua) hasta el tampón B al 100% (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo) en 4 min, seguido de un lavado de 3 minutos utilizando tampón B y finalmente un periodo de reequilibrio durante 7 minutos utilizando el tampón A. La detección de las sustancias fármacos se realizó mediante MS/MS utilizando argón como gas de colisión ($1,3 \times 10^{-3}$ mbar). Los parámetros específicos de MS/MS para cada uno de los compuestos analizados se indican en la tabla 2.

TABLA 2

Parámetros de MS/MS utilizados para la detección de compuestos x-y en el estudio de biodisponibilidad

Compuesto	Voltaje de cono	Energía de colisión	Ión parental	Ión o iones filiales
22	40 V	24 eV	353,15 m/z	150,00 m/z
21	60 V	28 eV	338,15 m/z	135,00 m/z
23	30 V	18 eV	308,10 m/z	187,9 m/z 104,9 m/z
96	45 V	15 eV	339,15 m/z	220,00 m/z 169,80 m/z 123,90 m/z
95	60 V	20 eV	324,10 m/z	120,90 m/z
54	60 V	26 eV	364,20 m/z	160,90 m/z

Análisis de datos

Las concentraciones en plasma de la sustancia fármaco se calcularon a partir del área relacionada con una curva de calibración externa obtenida de las muestras de plasma fortificadas tratadas tal como se ha descrito anteriormente. La curva de calibración se obtuvo por regresión lineal del log(pico área) frente a log (concentración). La curva de calibración cubría el intervalo de concentraciones desde 0,1 a 100 nM.

Los datos de concentraciones en plasma frente al tiempo de cada animal se utilizaron para el modelaje farmacocinético en WinNonLin 3.5 (Pharsight, Mountain View, CA, Estados Unidos) utilizando un análisis no compartimental y se indicó el valor del área bajo la curva de concentración en plasma (AUC). La disponibilidad oral F_{po} se calculó como la proporción en % entre la AUC normalizada con la dosis (D) después de la administración iv y po: $AUC_{po} * D_{iv} / AUC_{iv} * D_{po}$.

Resultados

Se analizó la biodisponibilidad oral de 6 compuestos y se detectaron todos los compuestos después de la administración oral. Las biodisponibilidades calculadas se resumen en la tabla 3. La biodisponibilidad de los compuestos 22, 23, 96, y 95 fue moderada (en el 10-31%) y la biodisponibilidad de los compuestos 54 y 21 fue baja (en el 2-8%).

ES 2 353 666 T3

TABLA 3

La biodisponibilidad promedio \pm el error estándar en el promedio (SEM) de 6 compuestos evaluados

Nº de compuesto	F (%)	
	Promedio	SEM
22	31	5,3
21	2,6	0,78
23	10	5,7
96	15	3,0
95	29	10
54	7,2	0,40

Conclusión

Los péptidos de la presente invención mostraron una disponibilidad oral que tenía un intervalo de disponibilidad en ratas Sprague-Dawley entre el 2 y el 31%.

Ejemplo 3

Actividad de osteoblastos (ensayo de ALP)

Materiales y métodos

Se obtuvieron osteoblastos primarios humanos de biopsias de médula ósea de la espina iliaca posterior de donantes voluntarios. Las células se utilizaron a las 6 semanas del cultivo. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos en un proceso de 8 días y se estimularon con los compuestos de prueba en concentraciones desde 1×10^{-13} a 1×10^{-6} durante los últimos 4 días del experimento. Se recogió el lisado celular para la determinación de la actividad de ALP. Se utilizaron células hOB de 10-15 donantes para los experimentos. Para las mediciones de ALP se utilizó un kit disponible comercialmente (Kit de fosfatasa alcalina, Sigma-Aldrich Denmark A/S). Todas las determinaciones se realizaron según las recomendaciones del fabricante.

Análisis

Se determinó la ALP en el lisado celular recogido en la terminación del experimento. Las mediciones se compararon con los cultivos de control tratados con vehículo.

Análisis de datos

Los datos se presentan como los promedios y las desviaciones estándar o las medianas y percentiles según sea apropiado. Se realiza un ANOVA de dos vías utilizando el test LSD de Fisher para comparaciones *post-hoc* utilizando un nivel de significancia de 0,05.

Resultados

TABLA 4

Compuesto	N	Promedio	SD	Int 0,05
22	4	1,12	0,05	0,05
1	4	1,08	0,07	0,06
23	5	1,08	0,07	0,06
95	5	1,14	0,09	0,08

La actividad de los compuestos 1, 22, 23, y 95 se ilustra en la figura 2 y se resume en la tabla 4 anterior.

Conclusión

Los péptidos de la presente invención incrementaron la actividad de los osteoblastos humanos en el cultivo primario medida mediante el incremento en la producción de fosfatasa alcalina.

Ejemplo 4

Ensayo estándar de arritmia inducida por calcio

El efecto antiarrítmico de los dipéptidos se determinó en un modelo de arritmias inducidas por calcio según el modelo de Lynch *et al.* [6]. Se anestesiaron ratas NMRI macho (25-30 g; Bomholdtgaard, Ll. Skendsved, Dinamarca) con una combinación neurolepto anestésica (Hypnorm® (citrato de fentanilo 0,315 mg/ml y fuanisona 10 mg/ml) + midazolam (5 mg/ml)). Las soluciones comerciales de Hypnorm® y midazolam se diluyeron 1:1 en agua destilada, y una parte de Hypnorm® diluido se mezcló con una parte de midazolam diluido. La anestesia se indujo mediante administración s.c. de esta solución en una dosis de 50-75 μ l/10 gramo ratón.

Se insertó una cánula i.v. en la vena de cola. La señal ECG II principal se registró de manera continua colocando los electrodos ECG de acero inoxidable en la pata delantera derecha y en la pata trasera izquierda. El electrodo de tierra se colocó en la pata trasera derecha. La señal se amplificó (x 5.000-10.000) y se filtró (0,1-150 Hz) a través de un módulo 689 ECG del modelo electrónico de Hugo Sachs. La señal analógica se digitalizó a través de un panel de adquisición de datos de 12 bit (modelo de Traducción de Datos DT321) y se tomaron muestras a 1000 Hz utilizando el software Notocord HEM 3.1 para Windows NT. Después de un periodo de equilibrio de 10 min, se inyectó la muestra de prueba del fármaco en la vena de la cola y se inició tres minutos más tarde una infusión i.v. de CaCl_2 (30 mg/ml, 0,1 ml/min \approx 100 mg/kg/min), (cloruro de calcio-2-hidratado, Riedel-de Haën, Alemania).

Los ratones pretratados con vehículo (solución salina tamponada con fosfato con albúmina bovina al 0,1%) se analizaron todos los días como una medición para el nivel de control en animales no tratados. El volumen de inyección fue de 100 μ l en todos los experimentos. El periodo de tiempo para el inicio de las arritmias (t_{arr}) se determinó como el tiempo desde el inicio de la infusión de CaCl_2 hasta el primer suceso de bloqueo AV de segundo grado (definido como el fallo intermitente de la conducción AV caracterizada por una onda P sin el complejo QRS concomitante).

Resultados

El % de respuesta de los compuestos analizados se indica en la tabla 5. La respuesta determinada se estima según $(t_{\text{arr}}(\text{compuesto de prueba}) - t_{\text{arr}}(\text{vehículo})) \times 100 / t_{\text{arr}}(\text{vehículo})$.

TABLA 5

Compuesto	% respuesta	SEM
1	52,0	8,0
3	37,0	9,0
4	69,0	11,0
7	40	7
21	55,0	4,0
22	52,0	12,0
23	-8,0	7,0
54	61,3	12,3
80	33	6
95	0,3	9,4
96	54	6
AAP	18,9	6,4

Conclusión

Los péptidos de la presente invención mostraron tanto un efecto antiarrítmico como un efecto no antiarrítmico.

5 Definiciones

A menos que se especifique lo contrario, se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos que se utilizan en la siguiente descripción escrita.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones se utiliza el código de tres letras para aminoácidos naturales, así como los códigos de tres letras generalmente aceptados para otros α -aminoácidos, tal como Sarcosina (Sar). Cuando no se ha especificado la forma L o D, debe entenderse que el aminoácido en cuestión puede ser la forma L o D.

15 El término “halógeno” se refiere a F, Cl, Br, y I, donde F y I son preferidos.

El término “alquilo” se refiere a grupos univalentes derivados de alcanos mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de cualquiera de los átomos de carbono: C_nH_{2n+1} -. Los grupos derivados mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono terminal de alcanos no ramificados forman una subclase de grupos alquilo normales (n-alquilo): $H[CH_2]_n$ -. Los grupos RCH_2 -, R_2CH - (R no igual a H), y R_3C - (R no igual a H) son grupos alquilo primario, secundario y terciario, respectivamente. Alquilo C(1-22) se refiere a cualquier grupo alquilo que tiene de 1 a 22 átomos de carbono e incluye alquilo C(1-6), tal como metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, pentilo y hexilo y todos los posibles isómeros de los mismos.

25 Por la frase “alquilo inferior” se entiende un alquilo lineal o ramificado que tiene menos de aproximadamente 6 átomos de carbono, preferiblemente metilo, etilo, propilo, o butilo.

El término “alqueno” se refiere a un grupo hidrocarburo lineal o ramificado o cíclico que contiene uno o más dobles enlaces carbono carbono. Alqueno C(2-22) se refiere a cualquier grupo alqueno que tiene de 1 a 22 átomos de carbono e incluye alqueno C(2-6), vinilo, alilo, 1-butenilo, etc.

30 El término “aralquilo” se refiere a aril alquilo C(1-22), y el término “arilo” a lo largo de esta memoria significa fenilo o naftilo.

35 Por la frase “grupo hidrofóbico” se entiende un anillo aromático de carbonos opcionalmente sustituido, preferiblemente un anillo aromático de carbonos de 6 ó 12 miembros. Por la frase “opcionalmente sustituido” se entiende la sustitución del anillo aromático de carbonos de 6 ó 12 miembros con por lo menos uno entre alquilo inferior, alcoxi, hidroxilo, carboxi, amina, tiol, hidrazida, amida, haluro, hidroxilo, éter, amina, nitrilo, imina, nitro, sulfuro, sulfóxido, sulfona, tiol, aldehído, ceto, carboxi, éster, un grupo amida; incluyendo seleno y tio derivados de los mismos. También se incluye en la definición de “opcionalmente sustituido” los derivados de sulfuro, sulfóxido, sulfona y tiol con o sin un grupo seleno. En realizaciones en las que el anillo aromático de carbonos está sustituido, dichas sustituciones serán habitualmente inferior a aproximadamente 10 sustituciones, más preferiblemente aproximadamente de 1 a 5 de las misma, siendo preferible aproximadamente 1 ó 2 sustituciones para muchas aplicaciones de la invención. Los grupos alcoxi preferidos incluyen metoxi, etoxi, y propoxi. Los grupos hidrofóbicos ilustrativos incluyen bencilo, fenilo y naftilo no sustituidos.

45 Por la frase “grupo de enlace de hidrógeno” se entiende un dador o aceptor de un enlace de hidrógeno (no covalente). En realizaciones en las que el grupo de enlace de hidrógeno es el dador, incluirá habitualmente por lo menos un átomo electronegativo unido a un átomo de hidrógeno. Entre los ejemplos de dichos átomos electronegativos se incluirán, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno, haluro (por ejemplo, Cl, F, Br, etc), y azufre. Entre los dadores de enlace de hidrógeno ilustrativos se incluyen hidroxilo, amina, tiol, hidrazida y amida. En realizaciones en las que el primer grupo de enlace de hidrógeno es un aceptor, incluirá preferiblemente por lo menos un átomo electronegativo, tal como los mencionados anteriormente en los que el átomo incluyo un par de electrones no enlazada. Dichos pares se refieren a menudo como “pares solitarios”. Ejemplos de aceptores de enlace de hidrógeno preferidos incluyen, pero sin limitación, haluro, hidroxilo, éter, amina, nitrilo, imina, nitro, aldehído, ceto, carboxi, éster, grupo amida; y seleno derivados de los mismos. También se prevén aceptores adecuados de enlace de hidrógeno de sulfuro, sulfóxido, sulfona y tiol, incluyendo seleno derivados de los mismos.

60 Los términos “modulador de la comunicación intercelular”, “facilitador de la unión comunicante”, “compuesto que facilita la comunión de uniones comunicantes” y “abridor de uniones comunicantes”, etc., se refieren todos a un compuesto que facilita, o mantiene, o normaliza (por ejemplo, mediante inhibición o aumento), la GJIC, independientemente del mecanismo particular detrás de esta acción. Más específicamente, el término “abridor de uniones comunicantes” se puede referir a una sustancia que normaliza (es decir, incrementa) el intercambio de moléculas que son capaces de pasar a través de uniones comunicantes entre los espacios extracelulares y/o intracelulares y/o que pueden normalizar el incremento de GJIC.

65 El término “agonista” se refiere a un péptido que puede interactuar con un tejido, célula o fracción celular que es la diana de, por ejemplo, pero sin limitación, un péptido AAP, AAP10, HP5, o un análogo funcional del mismo, para provocar sustancialmente, o por lo menos sustancialmente las mismas respuestas fisiológicas en el tejido, célula

ES 2 353 666 T3

o fracción celular que el péptido AAP, AAP10, HP5, o un análogo funcional del mismo. En un aspecto, la respuesta fisiológica es una o más de: contracción, relajación, secreción y activación enzimática. Preferiblemente, el péptido se une al tejido, célula o fracción celular. En un aspecto, el péptido se une a un receptor en el tejido, célula o fracción celular, que se une a AAP, AAP10, HP5, o un análogo funcional del mismo. Sin embargo, el presente "agonista" puede interactuar con un tejido, célula o fracción celular, que es la diana de cualquier péptido determinado, provocando la misma, o por lo menos sustancialmente la misma respuesta fisiológica.

Un "péptido agonista antiarrítmico", tal como se utiliza aquí, es un péptido, que comprende una actividad antiarrítmica, que es sustancialmente la misma, o mayor que, la actividad antiarrítmica de un péptido AAP, AAP10, HP5 o análogo funcional del mismo. "Mayor que" se refiere a una actividad antiarrítmica que se observa a concentraciones más bajas de péptido o en periodos más cortos de tiempo en comparación con la actividad antiarrítmica de un péptido AAP, AAP10, HP5 o análogo funcional del mismo

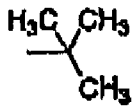
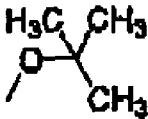

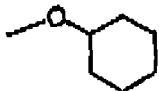
El término "antagonista" se refiere a un péptido que inhibe o antagoniza una o más respuestas fisiológicas observadas en un tejido, célula o fracción celular, después del contacto del tejido, célula, o fracción celular con cualquier péptido determinado, tal como el péptido AAP, AAP10, HP5, o un análogo funcional del mismo. En un aspecto, la respuesta fisiológica es una o más de: contracción, relajación, secreción y activación enzimática. Preferiblemente, el péptido se une al tejido, célula o fracción celular. En un aspecto, el péptido se une a un receptor en el tejido, célula o fracción celular que se une a AAP, AAP10, HP5, o un análogo funcional del mismo y/o que inhibe la unión de uno o más de AAP, AAP10, HP5, un análogo funcional del mismo al receptor.

Tal como se utiliza aquí, "normalizar" se refiere a un cambio en una respuesta fisiológica, de modo que la respuesta es insignificativamente diferente de la observada en un paciente normal. De este modo, la normalización puede implicar un incremento o descenso en la respuesta dependiendo de la patología implicada.

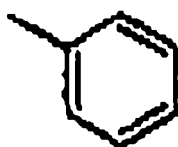
EC₅₀ de menos de aproximadamente 10⁻⁶M, y preferiblemente, menos de aproximadamente 10⁻⁸ M.

Tal como se utiliza aquí, "disponibilidad oral" se refiere a la velocidad y grado de absorción de un fármaco administrado oralmente en el torrente sanguíneo.

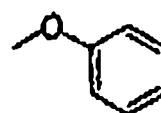
Las abreviaturas utilizadas en la presente solicitud son tal como se definen a continuación.

Metilo (Me)	-CH ₃	Metoxi (MeO)	-OCH ₃
Etilo (Et)	-CH ₂ CH ₃	Etoxi (EtO)	-OCH ₂ CH ₃
n-Butilo (n-Bu)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	n-Butoxi (n-BuO)	-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
n-Hexilo (n-HeX)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	n-Hexiloxi (n-HexO)	-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
n-Octilo (n-Oct)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	n-Octiloxi (n-OctO)	-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
t-butilo (t-Bu)		t-butoxi (t-BuO)	
ciclohexilo (c-Hex)		ciclohexiloxi (c-HexO)	

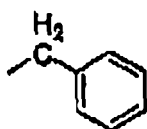
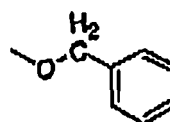
fenilo (Ph)



Fenoxi (PhO)



Bencilo (Bzl)

Benciloxi
(Bzlo)

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 02077017 A [0076] [0077]
- US 0205773 W [0076] [0083] [0105]
- WO 2002077017 A [0083]
- US 5350741 A [0107]
- WO 9811125 A [0133]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- Sperelakis, N. *Cell Interactions and Gap Junctions*. 1989 [0002]
- Kaprielian, R. R. *et al. Circulation*, 1998, vol. 97, 651-660 [0009]
- Saffitz, J. E. *et al. Cardiovasc Res.*, 1999, vol. 42, 309-317 [0009]
- Aonuma, S. *et al. Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1980, vol. 28, 3332-3339 [0011]
- Aonuma, S. *et al. Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1980, vol. 28, 3340-3346 [0013]
- Ronsberg, M.A. *et al. Med. Sci.*, 1986, vol. 14, 350-351 [0013]
- Aonuma, S. *et al. J Pharmacobiodyn.*, 1982, vol. 5, 40-48 [0014]
- Dikshit, M. *et al. Indian J. Exp. Biol.*, 1988, vol. 26, 874-876 [0015]
- Kohama, Y. *et al. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 1987, vol. 35, 3928-3930 [0015]
- Kohama, Y. *et al. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 1988, vol. 36, 4597-4599 [0015]
- Dhein, S. *et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 1994, vol. 350, 174-184 [0016]
- Muller, A. *et al. Eur. J. Pharmacol.*, 1997, vol. 327, 65-72 [0016]
- Bailey, P.D. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, vol. 39, 506 [0019]
- Seki *et al. Agric-Biol. Chem.*, 1990, vol. 54 (7), 1811-1818 [0021]
- Milo Gibal. *Biopharmaceutics and Pharmacology*. Lea and Sediger, 1991 [0031]
- Vinter, J.G. *J. Comput. Aided Des.*, 1996, vol. 10, 417 [0070]

ES 2 353 666 T3

- **Covitz**, K. M. *et al. Pharm. Res.*, 1996, vol. 13 (11), 1631-34 [0071]
- **Temple**, C.S. *et al. J. Physiol. (London)*, 1996, vol. 494, 795 [0071]
- 5 • **Meredith**, D. *et al. J. Physiol. (London)*, 1998, vol. 512, 629 [0071]
- **Lynch** *et al. J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1981, vol. 3, 49-60 [0084]
- **X. Guan** *et al. Carcinogenesis*, 1996, vol. 17, 1791-1798 [0097]
- 10 • **R. J. Ruch** *et al. Carcinogenesis*, 1994, vol. 15, 301-306 [0097]
- **B. V. Madhukar** *et al. Cancer Lett.*, 1996, vol. 106, 117-123 [0097]
- 15 • **W. K. Hong** *et al. Science*, 1997, vol. 278, 1073-1077 [0097]
- **E. Meier** *et al. Drug Development Research*, 1997, vol. 40, 1-16 [0104]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences. Mark Publishing Company*, 1985, vol. 17 [0107]
- 20 • **K. M. Abdullah** *et al. Endocrine*, 1999, vol. 10, 35-41 [0126]
- **M. Saitoh** *et al. Carcinogenesis*, 1997, vol. 18, 1319-1328 [0126]
- 25 • **J. A. Goliger** *et al. Mol. Biol. Cell*, 1995, vol. 6, 1491-1501 [0126]
- **G. J. Christ** *et al. Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2000, vol. 33, 423-429 [0127]
- **R. Dermietzel** *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 1998, vol. 26, 176-183 [0128]
- 30 • **H. Aldskogius** *et al. Prog. Neurobiol.*, 1998, vol. 55, 1-26 [0129]
- **D. Mackay** *et al. Am. J. Hum. Genet.*, 1999, vol. 64, 1357-1364 [0130]
- 35 • **S. G. Spanakis** *et al. Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1998, vol. 39, 1320-1328 [0130]
- **B. D. Larsen; A. Holm.** *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1994, vol. 43, 1-9 [0142]

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Péptido para su utilización en terapia representado por la fórmula general I:

5

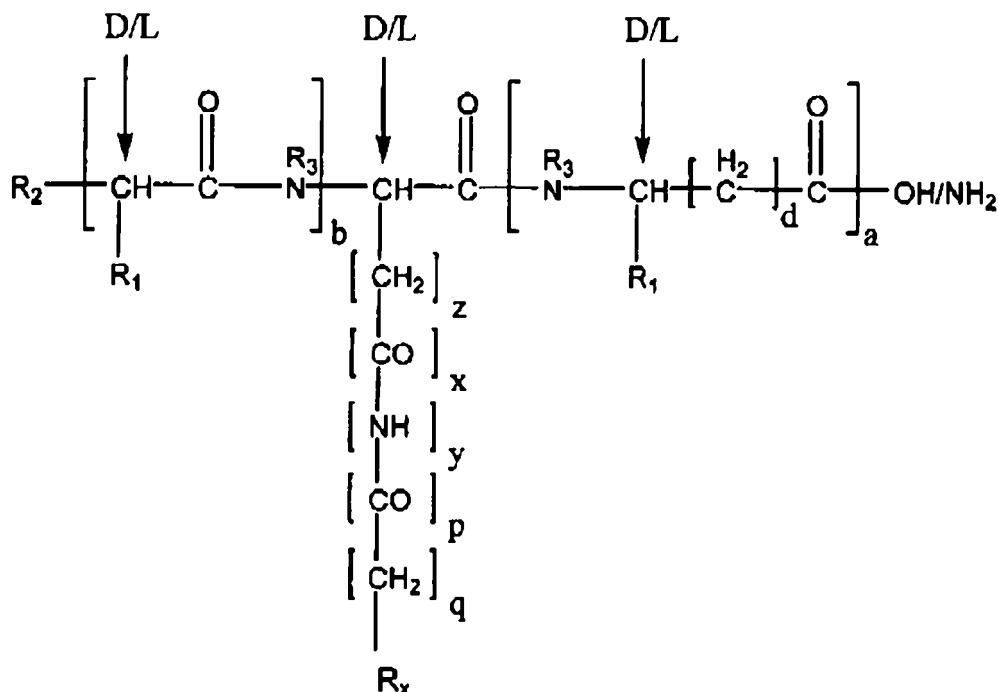
10

15

20

25

30



35

en la que:

a es 1 y b es 0; o

b es 1 y a es 0;

40

d es 0-8; y

z es 1-7; y

45

x es 1, y y q son 1, y p es 0; o

p es 1, x y q son 0, e y es 1;

y además en la que,

50

si R₁ es H, entonces d es 0-8; o

si R₁ no es H, entonces d es 0;

55

en la que R₁ es la cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina;

60

en la que R₂ se selecciona del grupo que consiste en NH₂, NHR, NR₂, NR₃⁺H, OH, SH, RO, RS, RSO, RSO₂, COR, CSR, COOH, COOR, CONH₂, CONHR, CONR₂, OCOR, y SCOR, en la que R = alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo o cicloalquilo;

en la que R₃ es H o CH₃; y

65

en la que R_x es un grupo hidrofóbico;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

2. Péptido según la reivindicación 1, en el que R_x comprende un anillo aromático de carbonos.

ES 2 353 666 T3

3. Péptido según la reivindicación 2, en el que el anillo aromático comprende un anillo de 6 ó 12 miembros o una forma sustituida del mismo.

4. Péptido según la reivindicación 3, en el que el anillo está sustituido con por lo menos uno de: un alquilo inferior, alcoxi, hidroxilo, carboxi, amina, tiol, hidrazida, amida, haluro, hidroxilo, éter, amina, nitrilo, imina, nitro, sulfuro, sulfóxido, sulfona, tiol, aldehído, ceto, carboxi, éster, un grupo amida; un grupo seleno, un grupo tio y un derivado de los mismos.

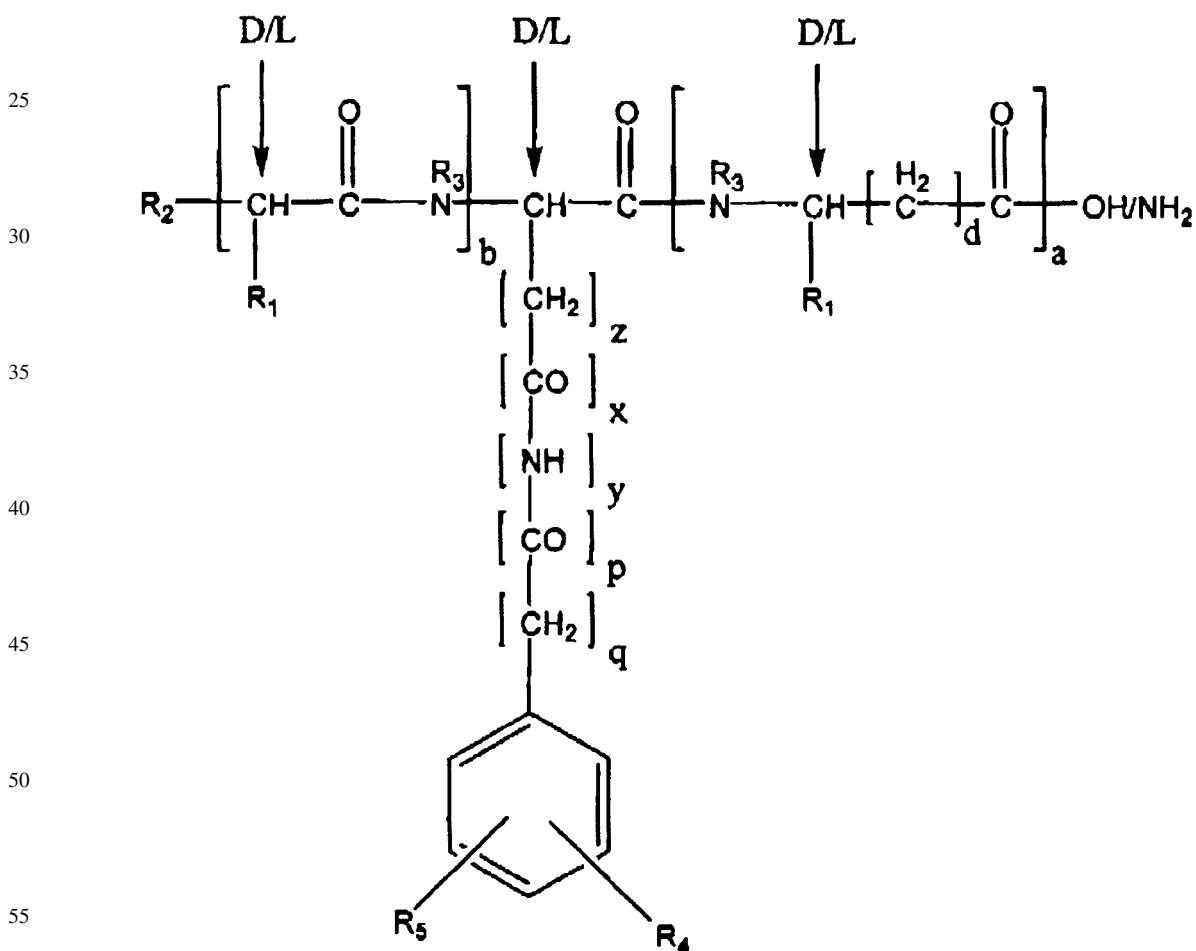
5. Péptido según la reivindicación 3, en el que el anillo comprende entre 1 y 5 sustituciones.

6. Péptido según la reivindicación 3, en el que el anillo comprende 1 ó 2 sustituciones.

7. Péptido según la reivindicación 2, en el que el anillo aromático de carbonos se selecciona del grupo que consiste en: un grupo bencilo, fenilo y naftilo.

8. Péptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el grupo hidrofóbico es un anillo aromático de carbonos de 6 miembros que comprende un sustituyente en la posición 4.

9. Péptido para su utilización en terapia según la reivindicación 1 representado por la fórmula general II:



en la que:

a es 1 y b es 0; o

b es 1 y a es 0;

d es 0-8; y

z es 1-7; y

ES 2 353 666 T3

x es 1, y y q son 1, y p es 0; o

p es 1, x y q son 0, e y es 1;

5 y además en la que,

si R_1 es H, entonces d es 0-8; o si R_1 no es H, entonces d es 0;

10 en la que R_1 es la cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina;

15 en la que R_2 se selecciona del grupo que consiste en NH_2 , NHR , NR_2 , NR_3^+H , OH, SH, RO, RS, RSO, RSO_2 , COR, CSR, COOH, COOR, $CONH_2$, $CONHR$, $CONR_2$, OCOR, y SCOR, en la que R = alquilo, alqueno, arilo, aralquilo o cicloalquilo;

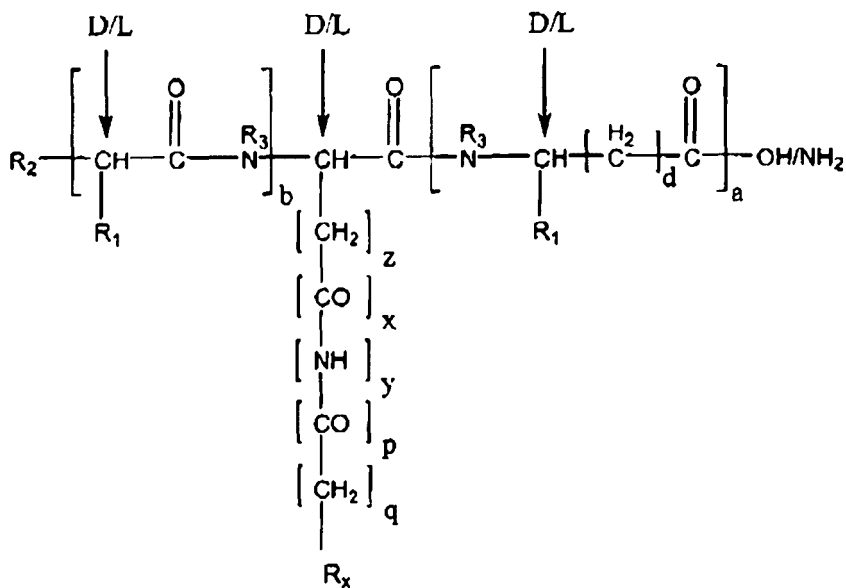
en la que R_3 es H o CH_3 ;

20 en la que R_4 y R_5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alqueno, arilo, aralquilo, halógeno, CN, NO_2 , alcoxi, ariloxi, aralquilo, tioalcoxi, tioariloxi, tioaralquilo, $+S(CH_3)_2$, SO_3H , SO_2R , NH_2 , NHR , NR_2 , $^+NR_3$, OH, SH, COOH, COOR, $CONH_2$, $CONHR$, $CONR_2$, CH_2OH , NCO, NCOR, NHOH, $NHNH_2$, $NHNHR$, CH_2OCOR , CH_2OCSR , COR, CSR, CSOR, CF_3 , y CCl_3 , y en la que R es alquilo, alqueno, arilo, aralquilo o cicloalquilo;

25 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10. Péptido representado por la fórmula general I:

30



35

40

45

50

55 en la que:

a es 1 y b es 0; o

b es 1 y a es 0; y

60

d es 0-8; y

z es 1-7;

65 x es 1, y y q son 1, y p es 0; o

p es 1, x y q son 0, e y es 1;

ES 2 353 666 T3

y además en la que,

si R_1 es H, entonces d es 0-8; o

5 si R_1 no es H, entonces d es 0;

en la que R_1 es la cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina;

10

en la que R_2 se selecciona del grupo que consiste en NH_2 , NHR , NR_2 , NR_3^+H , OH, SH, RO, RS, RSO, RSO_2 , COR, CSR, COOH, COOR, $CONH_2$, CONHR, $CONR_2$, OCOR, y SCOR, en la que R = alquilo, alqueno, arilo, aralquilo o cicloalquilo;

15

en la que $R_3 = H$ o CH_3 ; y

en la que R_x es un anillo aromático de carbonos de 6 miembros que comprende un sustituyente en la posición 4;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

20

11. Péptido según la reivindicación 10, en la que el anillo aromático de carbonos está sustituido con por lo menos uno de: un alquilo inferior, alcoxi, hidroxilo, carboxi, amina, tiol, hidrazida, amida, haluro, hidroxilo, éter, amina, nitrilo, imina, nitro, sulfuro, sulfóxido, sulfona, tiol, aldehído, ceto, carboxi, éster, un grupo amida; un grupo seleno, un grupo tio y derivados de los mismos.

25

12. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende un N-terminal libre, un C-terminal libre, o ambos, un N y un C-terminal libre.

30

13. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de adición de ácido, una sal metálica, una sal de amonio o una sal de adición de aminoácido.

14. Péptido según la reivindicación 13, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de clorhidrato, una sal sulfato, una sal fosfato, una sal acetato, una sal maleato, una sal fumarato, una sal tartrato, una sal citrato, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de magnesio, una sal de calcio, una sal de amonio o tetrametilamonio, una sal de lisina, una sal de glicina o una sal de fenilalanina.

35

15. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende además un grupo de enlace de hidrógeno y la distancia entre el centro de masas del grupo enlace de hidrógeno y el grupo hidrofóbico comprende de aproximadamente 4 Angstroms a aproximadamente 12 Angstroms.

40

16. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende además un grupo de enlace de hidrógeno y la distancia entre el centro de masas del grupo enlace de hidrógeno y el grupo hidrofóbico comprende de aproximadamente 5 Angstroms a aproximadamente 10 Angstroms.

45

17. Péptido según la reivindicación 10, en el que sustituyente tiene un radio de desde 3 a 11 Angstroms.

18. Péptido según la reivindicación 17, en el que el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en un grupo metilo, etilo, t-butilo, c-hexilo, fenilo, n-butilo, n-hexilo, n-octilo, etoxi, t-butoxi, fenoxi, butoxi, benciloxi, n-hexilooxi, y n-octilooxi.

50

19. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido actúa como un fármaco antiarrítmico.

20. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido es un péptido disponible oralmente.

55

21. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido se une a un transportador hPepT1 o un fragmento biológicamente activo del mismo.

60

22. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido tiene una vida media en un ensayo de estabilidad en plasma *in vitro* de más de 30 minutos.

23. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido tiene una vida media en un ensayo de estabilidad en plasma *in vitro* de más de aproximadamente 48 horas.

65

24. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende un enlace peptídico que se modifica para estabilizar el péptido frente a la degradación enzimática.

ES 2 353 666 T3

25. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido se une a un tejido, célula o fracción celular que es un sitio de acción para un péptido antiarrítmico.
26. Péptido según la reivindicación 23, en el que el péptido antiarrítmico se selecciona del grupo que consiste en AAP, AAP10, HP5, o un análogo funcional del mismo.
27. Péptido según la reivindicación 23, en el que el péptido es un modulador de la función del tejido, célula o fracción celular.
28. Péptido según la reivindicación 25, en el que el péptido es antagonista de la función del péptido antiarrítmico.
29. Péptido según la reivindicación 25, en el que el péptido es agonista de la función del antiarrítmico.
30. Péptido según la reivindicación 23, en el que el péptido es un modulador de un receptor del péptido antiarrítmico.
31. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en los péptidos mostrados en la Tabla 1.
32. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido es:
- H-Gly-Lys(4-nitrobenzoil)-OH (compuesto 1);
- H-Gly-Lys(4-metoxibenzoil)-OH (compuesto 4);
- H-D-Lys(4-metoxibenzoil)-Gly-OH (compuesto 21);
- H-D-Lys(4-nitrobenzoil)Gly-OH (compuesto 22);
- H-D-Lys(4-t-butilobenzoil)-Gly-OH (compuesto 54);
- H-D-Asn(NH(4-nitrobenzil)Ala-OH (compuesto 96);
- H-D-Lys(benzoil)Gly-OH (compuesto 23) o
- H-D-Asn(NH(4-metoxibencil)Ala-OH (compuesto 95).
33. Utilización de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición patológica seleccionada entre una enfermedad cardiovascular, inflamación del epitelio de las vías respiratorias, un trastorno del tejido alveolar, incontinencia de la vejiga, oído dañado, una lesión endotelial, retinopatía diabética, neuropatía diabética, isquemia del sistema nervioso central, isquemia de la médula espinal, un trastorno del tejido dental, enfermedad renal, fracaso en el trasplante de médula ósea, heridas, disfunción eréctil, incontinencia urinaria de la vejiga, dolor neuropático, inflamación subcrónica y crónica, cáncer, fracaso en el trasplante, osteoporosis o una patología que afecta a la formación, crecimiento o mantenimiento de los huesos.
34. Utilización según la reivindicación 33, en la que la enfermedad cardiovascular se selecciona entre arritmia, enfermedad cardíaca isquémica aguda, fallo cardíaco congestivo, enfermedades cardíacas congénitas, cor pulmonale, cardiomiopatía, miocarditis, o enfermedad cardíaca hipertensa.
35. Utilización según la reivindicación 33 o la reivindicación 34, en la que el medicamento es para la administración oral.
36. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en la que el medicamento es para la administración a un paciente humano.

FIGURA 1A

Linker = enlazador

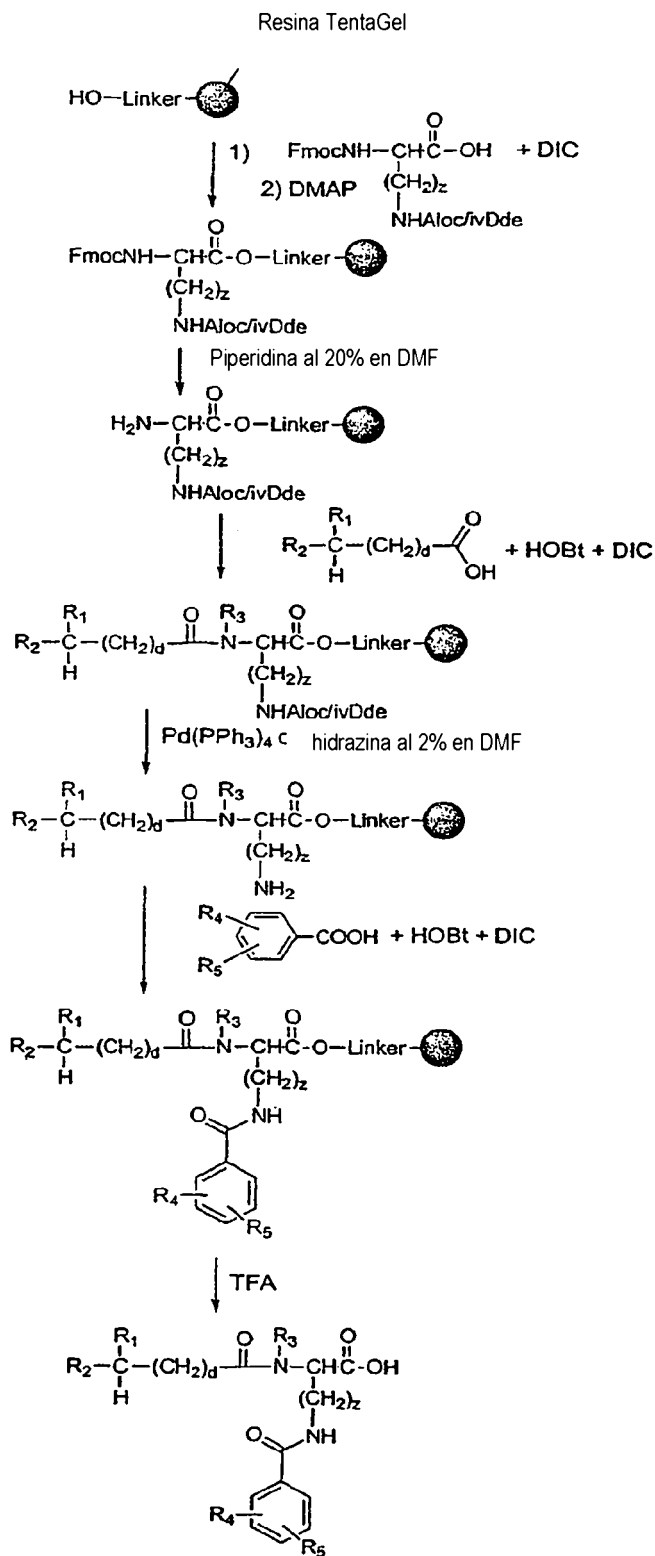


FIGURA 1B

Linker = enlazador

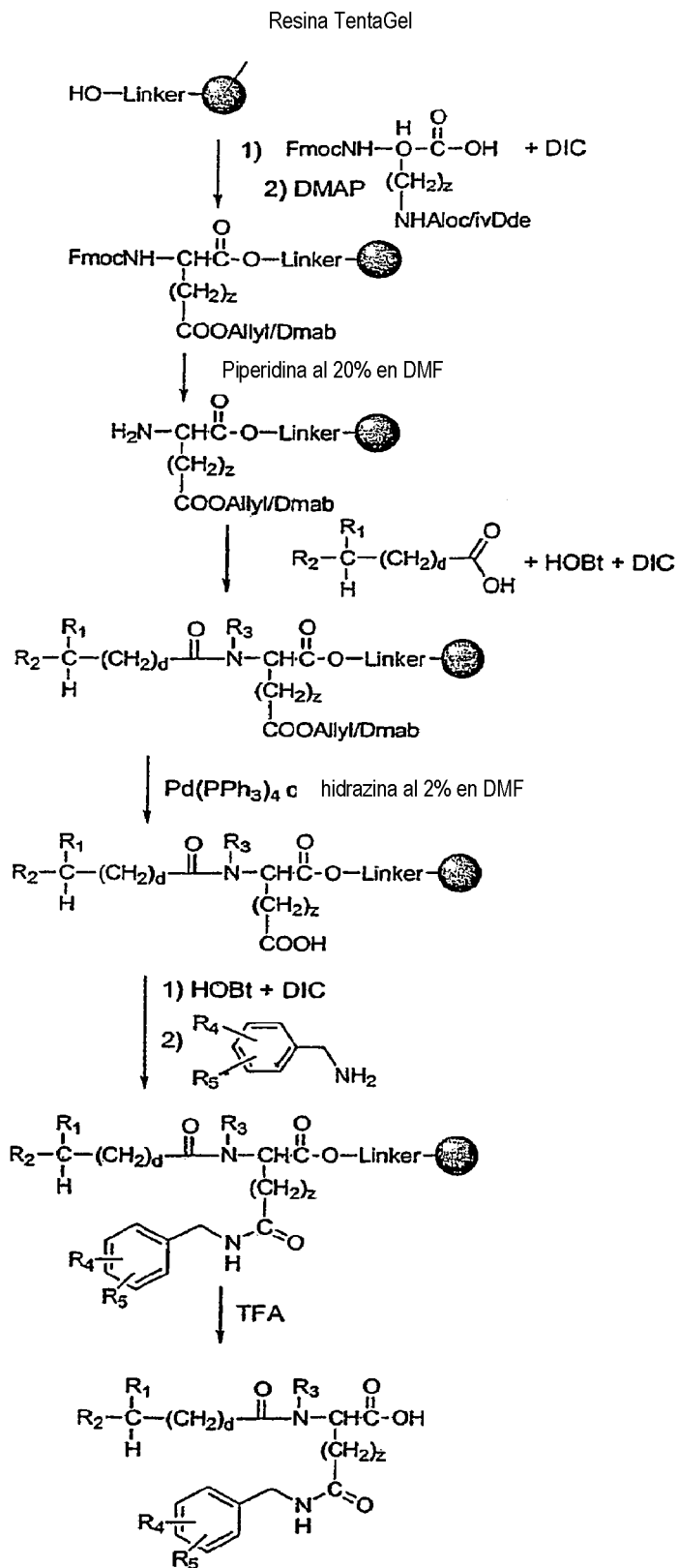


FIGURA 2

