



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 251**

51 Int. Cl.:
C07K 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03701387 .7**

96 Fecha de presentación : **04.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1474439**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2004**

54 Título: **Dipéptidos y tripéptidos con actividad antiinflamatoria.**

30 Prioridad: **04.02.2002 US 353231 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.08.2009

73 Titular/es: **Salpep Biotechnology Inc.**
MaRS Centre, Heritage Building
101 College Street, Suite 335
Toronto, ON M5G 1L7, CA

72 Inventor/es: **Mathison, Ronald**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 325 251 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

Dipéptidos y tripéptidos con actividad antiinflamatoria.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a dipéptidos y tripéptidos con actividad antiinflamatoria y a los procedimientos y las composiciones para el tratamiento de reacciones inflamatorias, que comprenden las reacciones alérgicas.

10 **Antecedentes de la invención**

Las reacciones alérgicas de tipo 1 o inmediatas tienen lugar generalmente, en los animales y humanos susceptibles, inmediatamente tras el contacto con un antígeno, al que se hace referencia como alérgeno. Dichas reacciones pueden acarrear consecuencias a largo plazo. Las reacciones alérgicas de tipo 1 son atribuidas en gran parte a los anticuerpos 15 IgE, aunque los anticuerpos IgG pueden tomar parte y modularlas (Dombrowicz *et al*, 1998; Ujike *et al*, 1999). Una reacción alérgica es causada generalmente por la activación de una subpoblación de células inmunológicas, los mastocitos y los basófilos. Cuando un antígeno reacciona con los receptores de anticuerpos IgE sobre la superficie de una célula, los mediadores químicos inician la reacción alérgica mediante la actuación sobre las células de músculo liso y endoteliales, epiteliales, inmunológicas adyacentes, y estimula, en un periodo más prolongado, la afluencia de 20 otras células inmunológicas e inflamatorias (neutrófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos) al tejido afectado. Esta afluencia de células inflamatorias predispone al paciente a reacciones de hipersensibilidad o alérgicas recurrentes, y en ocasiones retardadas o prolongadas y está asociada con frecuencia a un remodelado no reversible del tejido. Las reacciones alérgicas de tipo 1 son identificadas según la ubicación en la que se producen, por ejemplo las reacciones asmáticas tienen lugar en los pulmones, la rinitis en la nariz, la conjuntivitis en los ojos, la dermatitis atópica en la 25 piel, las reacciones alérgicas sistémicas en las reacciones intestinales y de circulación en el sistema gastrointestinal.

El asma puede definirse clínicamente como un estado de obstrucción de las vías respiratorias reversible, intermitente; el asma se manifiesta como entidades clínicas severas: asma alérgica, asma bronquial, asma inducida por el ejercicio (AIE), asma inducida químicamente, y *status asthmaticus*. El asma se puede dividir en dos tipos. El asma 30 extrínseca es desencadenada generalmente por un agente externo tal como los alérgenos (ácaros del polvo, polen, picaduras, fármacos, o alimentos), y es diagnosticada comúnmente en los primeros años. El asma intrínseca, que es similar al asma alérgica y se desarrolla generalmente posteriormente, se puede desencadenar por tejidos inflamados y congestionados, infección, virus del resfriado común (VRS, virus de la parainfluenza, rinovirus), catecolaminas endógenas (por ejemplo, adrenalina), fármacos (por ejemplo, aspirina), aire frío, estrés, esfuerzo, diversos agentes irritantes 35 (humo de cigarrillos, quema de hojas, perfumes, olores fuertes) y alguna intolerancia alimenticia. El asma intrínseca tiene lugar sin la participación de un detonante alérgico por anticuerpos específicos contra un alérgeno.

El asma bronquial es habitualmente una enfermedad crónica (de larga duración) que afecta a los conductos bronquiales (bronquios y/o vías respiratorias) de los pulmones. Los síntomas del asma son el resultado de la constricción o estrechamiento de los conductos bronquiales irritables que ocasionan sibilancia y dificultad al respirar. La constricción 40 de las vías respiratorias, provocada por el espasmo muscular del conducto bronquial y el estrechamiento debido a la inflamación, es provocada con la mayor frecuencia por la liberación inducida por antígeno de histamina, leucotrienos y otros mediadores químicos de los mastocitos. Con el asma intrínseca, estos mediadores son liberados sin detonante alérgico. El resultado global del ataque asmático es un espasmo muscular, inflamación, edema (hinchazón), y una 45 producción de mucosidad aumentada en los bronquios. Ambas reacciones asmáticas extrínsecas e intrínsecas generan síntomas dentro de los 15 a 30 minutos de la exposición (respuesta inmediata) que decaen generalmente dentro del periodo de una hora. En algunos individuos, una respuesta retardada (reacción de fase tardía) tiene lugar 3 a 4 horas tras la respuesta inicial o inmediata. Debe apreciarse, sin embargo, que la distribución temporal de estas reacciones muestra una variabilidad acusada entre pacientes y puede ser más corta o más larga en la aparición y la duración. La 50 reacción de fase tardía, que se desarrolla probablemente a partir de una reacción inflamatoria, puede prolongarse muchas horas y días y está asociada con frecuencia a hiperreactividad bronquial incrementada o hiperreceptividad de las vías respiratorias persistente. Como consecuencia, los bronquiolos resultan irritables e hiperreceptivos, sensibilizando más a los individuos a una variedad de agentes irritantes inhalados diferentes del alérgeno.

La rinitis, la conjuntivitis alérgica y la dermatitis atópica son inflamaciones de la mucosa nasal, ojos y piel, respectivamente, con frecuencia debido a los alérgenos tal como polen, polvo u otras sustancias transportadas por el 55 aire.

El choque anafiláctico, la forma más grave de alergia, es una urgencia médica. Es a menudo grave y puede en 60 ocasiones provocar una reacción sistémica fatal en un animal o humano previamente sensibilizado bajo la exposición a un antígeno específico, como los frutos secos, el veneno de abeja o avispa o la penicilina. El choque anafiláctico está caracterizado porque presenta síntomas respiratorios, desmayo, prurito, urticaria, hinchazón de la garganta u otras membranas mucosas y/o descenso súbito de la presión sanguínea. Los síntomas del choque anafiláctico comprenden mareo, pérdida de conciencia, respiración laboriosa, hinchazón de la lengua, piel azulada, broncoespasmo, presión 65 sanguínea baja, y muerte. Las reacciones anafilácticas pueden asimismo modificar la función cardíaca y están asociadas a un aumento en la afluencia de neutrófilos al tejido cardíaco (Turesin *et al*, 2000). Esta inflamación del corazón es efectuada por la cascada de adhesión leucocitaria.

En mayor parte, los fármacos disponibles para el tratamiento del asma bloquean y neutralizan los efectos de la liberación de los mediadores inflamatorios tales como histamina, prostaglandinas, leucotrienos, factor activador plaquetario (FAP) y factores quimiotácticos para los monocitos, neutrófilos y eosinófilos. Estos mediadores activan el músculo liso, causando la constricción bronquial, y actúan sobre las células endoteliales, epiteliales, inmunológicas adyacentes para facilitar y amplificar la respuesta inflamatoria. Los fármacos disponibles actualmente para el tratamiento del asma comprenden los beta-adrenérgicos, los corticosteroides, antileucotrienos, anticolinérgicos, xantinos y, con menor frecuencia fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS).

Estos fármacos, cuando son utilizados adecuadamente, proporcionan un buen control del asma. Un número significativo de pacientes asmáticos, sin embargo están poco controlados y persiste la necesidad de una terapia de fármaco antiasmático mejorada.

Los péptidos antiinflamatorios que proceden de la glándula salivar han sido descritos anteriormente. Éstos comprenden el péptido de la glándula submandibular-T (SGP-T), que inhibe la hipotensión inducida por lipopolisacáridos a dosis tan bajas como 1 $\mu\text{g/Kg}$ (Mathison *et al.*, (1997) *Amer. J. Physiol.*, v. 273, p. R1017) y que se ha demostrado asimismo que inhibe las reacciones de hipersensibilidad de tipo I intestinales y sistémicas (Befus *et al.*, (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 113, p. 337; Mathison *et al.*, (1997) *supra* y *Proc. West Pharmacol. Soc.*, v. 40, p. 73). Otros estudios demostraron que los tripéptidos y los fragmentos más grandes de SGP-T presentan asimismo una actividad antiinflamatoria significativa (solicitud de patente internacional WO 98/06742).

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos péptidos que son potentes inhibidores de las reacciones inflamatorias en los mamíferos.

Los di- y tripéptidos de la invención se ha demostrado que inhiben las reacciones inflamatorias debido a una amplia variedad de causas y pueden ser utilizados para tratar reacciones inflamatorias y trastornos que implican una reacción inflamatoria en general, en mamíferos humanos y no humanos. Los péptidos presentan usos farmacéuticos veterinarios y humanos. Pueden ser formulados como composiciones farmacéuticas o utilizados como aditivos alimenticios.

Según una forma de realización, la invención proporciona un péptido seleccionado de entre el grupo constituido por:

- (a) ciclohexilalanina-ácido glutámico-glicina;
- (b) ciclohexilalanina-ácido glutámico-metionina; y
- (c) ciclohexilalanina-ácido glutámico-isoleucina.

Según otra forma de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido como se ha descrito anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

Según otra forma de realización, la invención proporciona la utilización de un péptido como se ha descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para la inhibición de una reacción inflamatoria o para el tratamiento del asma.

Sumario de los dibujos

Se describen determinadas formas de realización de la invención haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1A representa el efecto del tratamiento de aerosol feG sobre la broncoconstricción de las vías respiratorias inducida por antígeno en ovejas, expresado como cambio en % en SR_L , a lo largo del tiempo (horas) tras la exposición a antígeno. Los valores están expresados como $\pm$ SEM media para dos animales.

La figura 1B representa el efecto del aerosol feG sobre la hipersensibilidad de las vías respiratorias inducida por antígeno en ovejas, expresado como el número de respiraciones (unidades de respiración) requerido para aumentar la resistencia de las vías respiratorias 400% (PC_{400}), antes (base de referencia) y a las 24 h posexposición a antígeno (24h P-Ag). Los valores están expresados como $\pm$ SEM media para dos animales.

Las figuras 2A y 2B representan el efecto del tratamiento intravenoso con feG sobre las respuestas de las vías respiratorias inducidas por antígeno en ovejas expresado como en las figuras 1A y 1B.

ES 2 325 251 T3

Las figuras 3A y 3B representan el efecto de dos tratamientos de preexposición oral con FeG sobre las respuestas de las vías respiratorias inducidas por antígeno en ovejas expresado como en las figuras 1A y 1B.

Las figuras 4A y 4B representan el efecto del tratamiento de aerosol con (Cha)EG sobre las respuestas de las vías respiratorias inducidas por antígeno en ovejas expresado como en las figuras 1A y 1B.

Las figuras 5A y 5B representan el efecto del tratamiento intravenoso con (Cha)EG sobre las respuestas de las vías respiratorias inducidas por antígeno en ovejas expresado como en las figuras 1A y 1B.

Las figuras 6A y 6B representan el efecto de los tratamientos preexposición orales con (Cha)EG sobre las respuestas de las vías respiratorias inducidas por antígeno en ovejas expresado como en las figuras 1A y 1B.

Las figuras 7A y 7B representan el efecto del tratamiento de aerosol con (Cha)EG sobre las respuestas de las vías respiratorias inducidas por antígeno en ovejas expresado como en las figuras 1A y 1B.

Las figuras 8A y 8B representan el efecto del tratamiento intravenoso con (Cha)EG sobre las respuestas de las vías respiratorias inducidas por antígeno en ovejas expresado como en las figuras 1A y 1B.

Las figuras 9A, 9B y 9C representan el efecto inhibitor de los péptidos de la invención en la permeabilidad vascular mediada por inmunoglobulina en ratas, expresado como disminución en % en la filtración.

La figura 10 representa el efecto inhibitor de los péptidos de la invención sobre la anafilaxis cutánea activa en las ratas.

Descripción detallada de la invención

Se hace referencia a los aminoácidos que son componentes de las proteínas de mamífero normales en la presente memoria por los códigos de tres letras o una letra convencionales. Cuando es utilizado el código de una letra, las formas L-isoméricas de los aminoácidos son identificadas mediante letras mayúsculas y las formas D mediante letras minúsculas, por ejemplo, L-fenilalanina: F; D-fenilalanina: f. La referencia a un aminoácido sin indicación explícita de la forma isomérica hace referencia a la forma L.

Otros aminoácidos a los que se hace referencia en la presente memoria son identificados como se expone a continuación:

<u>Aminoácido</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Fórmula</u>
β alanina	β Al	(NH ₂)-CH ₂ -CH ₂ -COOH
γ amino ácido butírico	γ Abu	(NH ₂)-(CH ₂) ₃ -COOH
L-ciclohexilalanina	Cha	C ₆ H ₁₁ -CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH
D-ciclohexilalanina	cha	
Homoserina	Hse	HO-(CH ₂) ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Norleucina	Nle	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -CH(NH ₂)-COOH
Norvalina	Nval	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Fenil glicina	Phg	C ₆ H ₅ -CH(NH ₂)-COOH
Sarcosina	Sar	NH(CH ₃)-CH ₂ -COOH

Un "aminoácido ácido" es un aminoácido que presenta una cadena lateral que contiene uno o más grupos carboxilo.

Empezando por el péptido FEG, que se ha demostrado que presenta actividad antiinflamatoria, varios análogos del péptido han sido sintetizados, sustituyendo uno o más aminoácidos con un aminoácido diferente, en la forma D o L, y se ha estudiado la actividad antiinflamatoria de estos análogos. Sobre la base de estos estudios, y los resultados inesperados de varias sustituciones, la invención proporciona nuevos grupos de péptidos que son moduladores potentes de las reacciones inflamatorias en los mamíferos.

Aunque estudios previos han indicado que el ácido amino N-terminal de los análogos de FEG debía ser aromático para la actividad, se ha descubierto de manera inesperada que el amino ácido N-terminal puede ser alifático. Se ha descubierto inesperadamente además que un dipéptido puede ser suficiente para la actividad antiinflamatoria.

La invención proporciona péptidos antiinflamatorios seleccionados de entre el grupo constituido por:

- (a) ciclohexilalanina-ácido glutámico-glicina;
- (b) ciclohexilalanina-ácido glutámico-metionina; y
- (c) ciclohexilalanina-ácido glutámico-isoleucina.

Uno o más de los aminoácidos de los péptidos de la invención pueden ser D-aminoácidos.

En otra forma de realización, y por analogía con conclusiones anteriores sobre los feG y FEG amidados, los tripéptidos y dipéptidos de la invención pueden ser utilizados en forma amidada, es decir, el aminoácido C-terminal del péptido es amidado. Dichos péptidos amidados pueden ser más estables en el cuerpo del mamífero que los péptidos carboxi terminales.

En otra forma de realización, en los péptidos de la invención, la amida del aminoácido N-terminal puede estar sustituida con un grupo alquilo inferior de cadena recta de 1 a 3 carbonos. Cuando la metionina es el aminoácido N-terminal, puede ser tio-sustituida. Los péptidos que contienen ciclohexilo pueden ser alquilo inferior sustituido en el anillo ciclohexilo. La sustitución de alquilo inferior es preferentemente la sustitución de metilo.

Una reacción inflamatoria en un mamífero es una respuesta protectora contra una diversidad de agentes perjudiciales o potencialmente perjudiciales. Dichos agentes comprenden alérgenos, toxinas, bacterias, virus, parásitos y hongos.

Las reacciones inflamatorias están asociadas a flujo sanguíneo y permeabilidad vascular aumentados, migración de leucocitos al lugar de la reacción inflamatoria, y liberación de moléculas de reparación tisular, citotóxicas y vasodilatadoras.

En función del tejido u órgano implicado, una reacción inflamatoria desembocará en diferentes síntomas. Por ejemplo, una reacción inflamatoria en los pulmones puede desembocar en inflamación pulmonar, broncoconstricción y obstrucción de las vías respiratorias.

Las reacciones inflamatorias están implicadas en la sintomatología del asma, ya sea desencadenadas por agentes externos tales como alérgenos, como en el asma extrínseca, o por factores no alérgenos, como en el asma intrínseca.

El síndrome de respuesta inflamatoria (SRI) implica una reacción inflamatoria generalizada y grave que afecta a múltiples órganos y tejido. El SRI tiene lugar como resultado de una lesión de tejido extensa y necrosis o la invasión de microorganismos, con la liberación de mediadores químicos o subproductos celulares como las citoquinas, metabolitos lipídicos y autocoides. Estos mediadores pueden ser liberados como resultado de los tejidos y las células afectadas por infecciones, choque (endotoxemia, pérdida sanguínea, traumatismo cerrado), hipoxemia, radiación, quemaduras, trasplantes de órganos, rechazos de injerto. El SRI inflamatorio es principalmente responsable del desarrollo de disfunciones de órganos, tales como lesión del pulmón aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), daño a la disfunción gastrointestinal (íleo, cambios en la permeabilidad, pancreatitis como problemas), y disfunciones del riñón, corazón, hígado y cerebro.

Una reacción incontenible y aguda a un alérgeno puede desembocar en el choque anafiláctico, cuando muchos órganos y sistemas del cuerpo están afectados por la reacción inflamatoria.

La exposición a un alérgeno puede causar una reacción inflamatoria en los intestinos que, en casos graves, puede causar anafilaxis intestinal o incluso anafilaxis sistémica. La inflamación cardíaca puede resultar de la isquemia o como un componente de la lesión de reperfusión.

Las reacciones inflamatorias comprenden asimismo reacciones endotóxicas, reacciones inmunológicas y reacciones de hipersensibilidad, que comprenden las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, de tipo II y de tipo III.

Las reacciones inflamatorias comprenden asimismo las reacciones endotóxicas a los componentes lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas.

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I o las reacciones alérgicas están típicamente mediadas por la inmunoglobulina E y se producen en muchos trastornos alérgicos, que comprenden rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma extrínseca, y algunos casos de urticaria, reacciones gastrointestinales a los alimentos y anafilaxis sistémica.

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo II y tipo III están mediadas generalmente por anticuerpos diferentes a IgE, y pueden implicar reacciones mediadas por inmunoglobulina G, así como las que utilizan otras inmunoglobulinas. Las reacciones de tipo II son reacciones citotóxicas que tienen lugar cuando el anticuerpo reacciona con

componentes antigénicos de una célula o elementos tisulares o con antígeno o hapteno que está acoplado a una célula o tejido. La reacción antígeno-anticuerpo puede activar determinadas células citotóxicas (por ejemplo células T asesinas o macrófagos) para producir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo. Las reacciones de tipo II está implicadas en trastornos que comprenden anemias hemolíticas, púrpura trombocitopénica inducida por anticuerpos, leucopenia, pénfigo, penfigoide, síndrome de Goodpasture, anemia perniciosa, transfusiones sanguíneas incompatibles, trombocitopenia neonatal y afecciones de hipersensibilidad multisistémica tales como la escleroderma. Las reacciones de tipo III son reacciones de inmunocomplejo (IC) que derivan de la deposición de IC de anticuerpo-antígeno que circulan solubles en los vasos o tejido, y están implicadas en trastornos que comprenden enfermedad sérica debida a suero, fármacos o antígeno de la hepatitis vírica, escleroderma, artritis reumatoide, poliarteritis, crioglobulemia, neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar, glomerulonefritis aguda, glomerulonefritis proliferativa de membrana crónica y enfermedades renales relacionadas.

Los resultados descritos en la presente memoria indican que los compuestos de la invención resultan eficaces en la inhibición de las reacciones inflamatorias que implican las reacciones de hipersensibilidad de tipo I (por ejemplo, asma alérgica, respuesta intestinal al antígeno) y reacciones inflamatorias que implican las reacciones de hipersensibilidad de tipo III (por ejemplo, la permeabilidad vascular y la anafilaxis cutánea).

En cualquier trastorno que implique una reacción inflamatoria, los síntomas del sujeto pueden resultar mejorados y el trastorno tratado mediante la administración de un agente antiinflamatorio al sujeto para inhibir la reacción. Aunque no resulte conocido aún por qué mecanismo los péptidos de la invención interfieren en las reacciones inflamatorias, los péptidos de la invención pueden ser utilizados para inhibir generalmente las reacciones inflamatorias. Resulta evidente a partir de los estudios descritos en la presente memoria que resultan eficaces para inhibir las reacciones inflamatorias que implican una amplia variedad de causas, que comprenden asma inducida por alérgeno y asma inducida por no alérgeno, trastornos intestinales relacionados con la intolerancia alimenticia e inducidos por alérgeno, choque anafiláctico, reacciones endotóxicas y síndrome de respuesta inflamatoria.

Los compuestos de la invención pueden asimismo ser utilizados como fármacos veterinarios, para el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones comunes a mamíferos diferentes a los humanos. Todos los animales pueden experimentar las reacciones de hipersensibilidad de los tipos I, II y III, reacciones inmunológicas, y los otros tipos de reacciones inflamatorias descritos en la presente memoria.

Una de las afecciones más comunes que afectan a los animales domésticos, incluyendo los gatos y los perros, es la alergia, que puede afectar a la totalidad de los sistemas de órganos principales. Estas alergias están caracterizadas porque presentan prurito de la piel, localizado o generalizado, vías respiratorias con hiperrespuesta (hiperreactivas), tos, estornudos y/o sibilancias y secreciones de nariz y/o oídos o vómitos o diarrea. Los mamíferos no humanos que pueden ser tratados con los procedimientos y composiciones de la invención comprenden perros, gatos, ratones, ratas, conejos, caballos, vacas, ovejas y otros animales domésticos y animales de granja.

La invención proporciona por lo tanto nuevas composiciones farmacéuticas y su utilización en procedimientos para la inhibición de una reacción inflamatoria en mamíferos humanos y no humanos, que comprenden administrar al mamífero una cantidad eficaz de un péptido como se ha descrito en la presente memoria. Estos procedimientos y composiciones pueden utilizarse para tratar una amplia variedad de trastornos que implican una reacción alérgica, que comprenden asma, rinitis, conjuntivitis, dermatitis atópica, anafilaxis intestinal, trastornos intestinales relacionados con la intolerancia alimenticia e inducidos por alérgenos y reacciones alérgicas sistémicas.

Los péptidos de la invención pueden asimismo ser utilizados para el tratamiento de la inflamación pulmonar y la broncoconstricción y las reacciones inmunológicas y para inhibir la quimiotaxia de las células inflamatorias, incluyendo los neutrófilos, en un lugar inflamatorio.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para producir una inhibición significativa de una reacción inflamatoria, como se demuestra, por ejemplo, mediante una mejora apreciable de uno o más síntomas producida por la reacción inflamatoria o por una reducción de uno o más de indicios descritos anteriormente de las reacciones inflamatorias, tales como la permeabilidad vascular aumentada, la migración leucocitaria, etc.

Los péptidos según la invención pueden ser preparados mediante cualquier procedimiento sintético de péptidos adecuado, como resulta evidente para los expertos en la materia.

Se puede utilizar la síntesis química; se pueden utilizar por ejemplo la técnicas sintéticas de péptidos de fase sólida estándares. En la síntesis de péptidos de fase sólida estándar, se pueden preparar los péptidos de longitud variable utilizando el equipo disponible comercialmente. Este equipo se puede obtener, por ejemplo, de Applied Biosystems (Foster City, CA). Las condiciones de reacción en la síntesis de péptidos se optimizan para impedir las reacciones secundarias y para obtener rendimientos elevados. Los péptidos son sintetizados utilizando los protocolos automatizados estándares, utilizando t-butoxicarbonilo-alfa-aminoácidos, y siguiendo las instrucciones de preparación para bloquear los grupos de interferencia, proteger el aminoácido se debe hacer reaccionar, acoplar, desproteger y cubrir los residuos sin reaccionar. El soporte sólido es generalmente a base de resina de poliestireno, actuando la resina como un soporte para la cadena de péptido de crecimiento, y como grupo protector para el terminal carboxi. La división de la resina proporciona el ácido carboxílico libre. Los péptidos son purificados mediante técnicas de HPLC, por ejemplo sobre una columna de fase inversa C18 de preparación, utilizando gradientes de acetonitrilo en ácido trifluoroacético

al 0,1%, seguido por secado al vacío. Los péptidos de la invención pueden ser asimismo producidos mediante química de péptidos de fase líquida.

Los péptidos pueden ser asimismo producidos por síntesis recombinante. Una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado es preparada y subclonada en una ADN plásmido de expresión. Los plásmidos de expresión de mamífero adecuados comprenden pRC/CMV de Invitrogen Inc. El constructo génico es expresado en una línea celular adecuada, tal como línea celular Cos o CHO y el péptido expresado es extraído y purificado mediante procedimientos convencionales. Los procedimientos adecuados para la síntesis recombinante de péptidos son descritos en Sambrook *et al.*, (1989), "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor, Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Mediante procedimientos sintéticos similares pueden prepararse los derivados de un péptido. Los ejemplos de modificaciones de cadena lateral comprendidos en la presente invención incluyen la modificación de los grupos amino tal como mediante la alquilación reductora por reacción con un aldehído seguido por la reducción con NaBH₄; amidación con metilacetamida; acetilación con anhídrido acético; carbamilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS); alquilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de la lisina con piridoxal-5'-fosfato seguido por la reducción con NaBH₄.

El grupo guanidino de los residuos de arginina pueden ser modificados mediante la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y glioxal.

El grupo carboxilo puede ser modificado mediante la activación con carbodiimida a través de la formación de acilisourea seguido por la derivación posterior, por ejemplo, a una amida correspondiente.

Se proporcionan a título de ejemplo no limitativo de incorporación de aminoácidos artificiales y derivados durante la síntesis de péptidos, la utilización de norleucina, ácido 4-amino butírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, 5-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienil alanina y/o D-isómeros o aminoácidos.

Los péptidos sintetizados pueden ser examinados por su actividad antiinflamatoria mediante uno de los sistemas de ensayo descritos en la presente memoria. El ensayo seleccionado dependerá de la actividad biológica de interés en cada caso. Por ejemplo, los péptidos pueden ser examinados por su eficacia en la inhibición de los cambios de la permeabilidad vascular mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 o por su eficacia en la inhibición de la broncoconstricción de las vías respiratorias inducidas por antígeno, como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Los péptidos de la invención pueden ser administrados terapéuticamente mediante inyección o por rutas oral, nasal, bucal, sublingual, rectal, vaginal, transdérmica u ocular en una variedad de formas, como resultará evidente para los expertos en la materia.

Para la administración oral, pueden ser utilizadas diversas técnicas para mejorar la estabilidad, sobre la base por ejemplo de la modificación química, la formulación y la utilización de los inhibidores de la proteasa. La estabilidad puede ser mejorada si son utilizados aminoácidos sintéticos, tales como péptidos o ácidos betidamino, o si son preparados los análogos metabólicamente estables.

La formulación puede estar, por ejemplo, en emulsión de agua/aceite o en liposomas para la estabilidad mejorada. La administración oral de péptidos puede ser acompañada por inhibidores de la proteasa tales como aprotinina, inhibidor de la tripsina de soja o FK-448, para proporcionar protección para el péptido. Los procedimientos adecuados para la preparación de formulaciones orales de fármacos peptídicos han sido descritos, por ejemplo por Saffran *et al.*, (1979), Can. J. Biochem., v. 57, p. 548-553; Lundin *et al.*, (1986), Life Sci., v. 38, p. 703-709, y Vilhardt *et al.*, (1986), Gen. Pharmacol., v. 17, p. 481-483.

Debido a la elevada área superficial y la red vascular extensa, la cavidad nasal proporciona una buena ubicación para la absorción de los fármacos lipófilos e hidrófilos, especialmente cuando son coadministrados con potenciadores de la absorción. La absorción nasal de los fármacos basados en péptidos puede ser mejorada mediante la utilización de derivados de ácido aminoborónico, amastatina, y otros inhibidores de enzimas como los potenciadores de la absorción y utilizando surfactantes como el glicolato sódico, como se describe en Amidon *et al.*, (1994), Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 34, p. 321-341. La ruta transdérmica proporciona un buen control del suministro y mantenimiento del nivel terapéutico de fármacos durante un periodo prolongado de tiempo, Amidon *et al.*, (1994), Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 34, p. 321-341 y Choi *et al.*, (1990), Pharm. Res., v. 7, p. 1099-1106. Resultan deseables unos medios para incrementar la permeabilidad cutánea, para proporcionar acceso sistémico de los péptidos. Por ejemplo, puede ser utilizada la iontoforesis como una fuerza motriz activa para los péptidos cargados o pueden utilizarse potenciadores químicos tales como el n-decilmetil sulfóxido (NDMS) surfactante no iónico.

Los péptidos pueden asimismo ser conjugados con polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, dextrano o albúmina o incorporados en sistemas de suministro de fármacos tales como matrices poliméricas para incrementar la vida media del plasma.

Más generalmente, las formulaciones adecuadas para los modos particulares de administración de los péptidos son descritas, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Gennaro, A.R., (2000), 20th Edition, Williams & Wilkins PA, U.S.A.).

La dosis particular requerida en un sujeto dado puede ser determinada por el médico responsable. Puede ser utilizada una dosis de partida en el intervalo de 1 μ m a 1000 μ g de peso corporal de péptido/kg, con el ajuste de la dosis sobre la base de la respuesta de un sujeto particular, como resultará evidente para los expertos ordinarios en la materia.

Los péptidos de la invención pueden ser asimismo formulados como suplementos alimenticios mediante su adición a los productos alimenticios o bebidas. La utilización de los péptidos como aditivos alimenticios y su incorporación en las bebidas o los productos alimenticios resulta conocida por los expertos en la técnica del tratamiento de alimentos. Si los péptidos contienen únicamente aminoácidos naturales, estos productos pueden resultar atractivos para los que son partidarios de las medicinas naturales y los productos de salud naturales.

Ejemplos

Los ejemplos se describen a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención. Los ejemplos de las partes de los mismos que se refieren a los péptidos diferentes a a) ciclohexilalanina-ácido glutámico-glicina; b) ciclohexilalanina-ácido glutámico-metionina o c) ciclohexilalanina-ácido glutámico-isoleucina se proporcionan únicamente como referencia.

Se informa de los procedimientos de química, bioquímica de péptidos y proteínas e inmunología a los que se hace referencia pero no descritos explícitamente en esta exposición y los ejemplos en la literatura científica y resultan conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplo 1

Efectos de los péptidos en la contracción inducida por antígeno del íleo de rata sensibilizado

Para este estudio de motilidad *in vitro*, los péptidos se prepararon mediante procedimientos convencionales en las Protein Synthesis Facilities, University of Calgary, Calgary, Alberta, o por Core Laboratories, Queen's University, Kingston, Ontario, y se examinaron por sus efectos inhibidores en una reacción anafiláctica provocada por antígenos en segmentos intestinales aislados de ratas sensibilizadas con ovalbúmina. Se siguieron los procedimientos descritos por Mathison *et al.* (1997), (*supra*) con ligeras modificaciones. Las ratas Sprague-Dawley se sensibilizaron para 1 mg de ovalbúmina (OA) y 50 ng de la toxina *pertussis* (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (Kosceka *et al.*, 1994, Am. J. Physiol., v. 267, pG745). Tras cuatro a seis semanas de la sensibilización, se escindió el íleo terminal y se montaron secciones de 2 cm en baños de órganos de 20 ml a 0,75 de tensión y la fuerza isométrica generada por OA y urecolina (Frosst, Kirkland, QC) se midió utilizando un transductor de desplazamiento de fuerza de Grass FT03 (Quincy, MA). Los tejidos se lavaron varias veces en Krebs y se dejaron en equilibrio durante 15 minutos. Las propiedades antianafiláticas de los péptidos se determinaron añadiendo 10 μ g de péptido a un baño e incubando durante 10 minutos. Los segmentos de tejido fueron lavados, la línea de referencia reestablecida, y a continuación expuesta a 1 mg de antígeno OA. La respuesta contráctil de OA se midió en contracción pico. Los tejidos se lavaron y la respuesta contráctil pico se obtuvo añadiendo urecolina a una concentración de 10^{-5} M. La mucosa se raspó a continuación del tejido, se determinó la masa del músculo subsistente, y se calculó la tensión en gramo de fuerza por gramo de tejido húmedo. Los resultados se expresaron como la proporción de respuesta contráctil inducida por OA a la respuesta contráctil inducida por urecolina. Para obtener la actividad relativa se expresó la proporción de OA/URE para cada péptido como un porcentaje de control.

Los resultados se representan en la Tabla 1. La adición de antígeno (OA) indujo una contracción tónica lenta de los segmentos intestinales (íleo) que alcanzó su pico 2 a 3 minutos antes de regresar lentamente a la tensión de línea de referencia durante 4 a 5 minutos. La urecolina (URE) produjo una contracción tónica rápida que alcanzó su máximo en 10 a 15 segundos. Los análogos tripeptídicos no modificaron la respuesta contráctil a URE (no representado), lo que permitió la utilización de la proporción OA/URE como una medición de las respuestas antianafiláticas del péptido. La proporción OA/URE en los tejidos sin tratar fue de $0,26 \pm 0,02$, lo que indica que el antígeno de sensibilización provocó una respuesta contráctil que fue el 26% de la de la urecolina.

Ejemplo 2

Tratamiento de las reacciones asmáticas en ovejas

Preparación de los animales: Los experimentos se realizaron como se describe por Abraham *et al.* (2000), Am. J. Respir. Crit. Care Med., v. 162, p. 603. Las ovejas alérgicas, con un peso de 27 a 50 kg, han demostrado con anterioridad presentar una reacción cutánea alérgica natural a diluciones de 1:1.000 o 1:10.000 de extracto de *Ascaris suum* (Greer Diagnostics, Lenoir, N.C.) y desarrollar respuestas bronquiales tempranas y tardías ("respuestas duales") al antígeno *Ascaris suum* inhalado (Abraham *et al.*, 1983, Am. Rev. Respir. Dis., v. 128, p. 839). Las ovejas estaban conscientes y confinadas en un carrito de la compra modificado en la posición de decúbito prono con sus cabezas inmovilizadas. Se aplicó la anestesia tópica (lidocaína al 2%) a las vías nasales, y se hizo avanzar un catéter de balón a través de un orificio nasal hacia el esófago inferior. Los animales fueron a continuación intubados con un conducto endotraqueal con manguito a través del otro orificio nasal con un broncoscopio de fibra óptica flexible como

guía. Todos los protocolos fueron aprobados por el Mount Sinai Medical Center Animal Research Committee, que es responsable de asegurar la utilización y el cuidado humanitarios de los animales experimentales.

Mecanismo de las vías respiratorias: La determinación de la resistencia al flujo pulmonar medio (RL) se midió con la técnica de balón esofágico (Abraham *et al.*, (1994), J. Clin. Invest., v. 93, p. 776 y (1997), Am. J. Respir. Crit. Care Med., v. 156, p. 696). La media de por lo menos 5 respiraciones, libres de artefactos de ingestión, se utilizó para obtener la RL en cm H₂O/L/s. Inmediatamente tras la medición de la RL, se midió el volumen de gas torácico (Vtg) en un pletismógrafo corporal de volumen constante para obtener la resistencia pulmonar específica (SRL=RL x Vtg) en cm H₂O . s/l.

Sistemas de suministro de aerosol: Todos los aerosoles se generaron utilizando un nebulizador médico disponible (Raindrop; Puritan Bennet, Lenexa, KS) que proporciona un aerosol con un diámetro aerodinámico medio de masa de 3,2 µm como se determina mediante un impactador en cascada Andersen. El nebulizador se conectó a un sistema dosimétrico, que está constituido por una válvula solenoide y una fuente de aire comprimido (20 psi). La salida del nebulizador se dirigió hacia una pieza en T de plástico, un extremo de la cual se conectó a un orificio de inspiración de un respirador de pistón (Harvard Apparatus, Mills, MA). La válvula solenoide se accionó durante 1 s al inicio del ciclo de inspiración del respirador. Los aerosoles se suministraron a un volumen en régimen de marea de 500 ml y a una tasa de 20 respiraciones/min como se ha descrito anteriormente (Abraham *et al.*, 1994; 1997 *supra*).

Curvas de respuesta de concentración al aerosol de carbacol: La respuesta de las vías respiratorias se determinó a partir de las curvas de respuesta de concentración acumulativas para el carbacol inhalado como se ha descrito anteriormente. La SR_L se midió inmediatamente después de la inhalación de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y tras cada administración consecutiva de 10 respiraciones de concentraciones crecientes de carbacol (PBS al 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0% en p/vol). La prueba de provocación se interrumpió cuando SR_L aumentó por encima de 400% a partir del valor post-PBS o tras la administración de la concentración de carbacol más elevada. La concentración de carbacol acumulativa (en unidades de respiración [BU]) que incrementó la SR_L 400% sobre el valor post-PBS (PC400) se calculó mediante interpolación a partir de la curva de respuesta-dosis. Una BU se definió como una respiración de una solución de aerosol de carbacol al 1% en p/vol (Abraham *et al.*, 1994; 1997 *supra*).

Exposición al antígeno: Se diluyó extracto de *A. suum* (Greer Diagnostics, Lenoir, NC) con PBS a una concentración de 82.000 unidades de nitrógeno de proteína/ml y se suministró como un aerosol (20 respiraciones/min x 20 min).

Se disolvió carbamilcolina (carbacol; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en PBS a concentraciones de 0,25, 0,50, 1,0, 2,0 y 4,0% en p/vol y se suministró como un aerosol. Los péptidos se disolvieron en solución salina al 0,9% preparada en un volumen total de 3 a 5 ml en función de la ruta de administración (aerosol, oral o intravenosa) para el estudio.

Ensayos experimentales: Cada oveja se sometió a un ensayo de control en el que se utilizó un placebo (PBS sin aditivo) como el pretratamiento de prueba antes de la exposición a alérgeno con antígeno *Ascaris suum*. A continuación, las ovejas fueron pretratadas, antes de la exposición a alérgeno, con un péptido de prueba (preparado por Core Laboratories) en PBS libre de endotoxinas, estéril, como se expone a continuación:

(i) Se proporcionó feG (30 mg/oveja) mediante aerosol 20 minutos antes de la exposición con antígeno.

La Figura 1A representa la broncoconstricción y la Figura 1B representa la hiperrespuesta de las vías respiratorias, tras la exposición con antígeno.

(ii) Se proporcionó intravenosamente feG (1 mg/kg) 20 min. antes de la exposición con antígeno.

La figura 2a representa la broncoconstricción y la Figura 2B representa la hiperrespuesta de las vías respiratorias, tras la exposición con antígeno.

(iii) Se administró feG oralmente, a una dosis de 2 mg/kg, a las 24 h y 30 minutos antes de la exposición con antígeno.

La Figura 3A representa la broncoconstricción y la Figura 3B representa la hiperrespuesta de las vías respiratorias, tras la exposición con antígeno.

(iv) Se proporcionó (cha)eG (30 mg/oveja) mediante aerosol 20 min antes de la exposición con antígeno.

La Figura 4A representa la broncoconstricción y la Figura 4B representa la hiperrespuesta a las vías respiratorias, tras la exposición con antígeno.

(v) Se proporcionó intravenosamente (cha)eG (1 mg/kg) 20 min antes de la exposición con antígeno.

La Figura 5A representa la broncoconstricción y la Figura 5B representa la hiperrespuesta de las vías respiratorias, tras la exposición con antígeno.

- (vi) Se administró oralmente (cha)eG, a una dosis de 2 mg/kg, a las 24 h y 30 min antes de la exposición con antígeno.

La Figura 6A representa la broncoconstricción y la Figura 6B representa la hiperrespuesta de las vías respiratorias, tras la exposición al antígeno.

- (vii) Se proporcionó (Cha)EG (30 mg/oveja) mediante aerosol 20 min antes de la exposición con antígeno.

La Figura 7A representa la broncoconstricción y la Figura 7B representa la hiperrespuesta de las vías respiratorias, tras la exposición con antígeno.

- (viii) Se proporcionó intravenosamente (Cha)EG (1 mg/kg) 20 min antes de la exposición con antígeno.

La Figura 8A representa la broncoconstricción y la Figura 8B representa la hiperrespuesta de las vías respiratorias, tras la exposición con antígeno.

La actividad de los péptidos análogos se comparó con la actividad de feG.

Las ovejas que habían recibido una dosis total de 30 mg de feG mediante inhalación por aerosol, 20 min antes de la exposición con antígeno, mostraron atenuación de 78% y 89%, respectivamente, de la broncoconstricción temprana (0-3 h) y tardía (6-8 h) provocada por la administración por aerosol del antígeno *Ascaris suum*. Este péptido redujo asimismo el aumento en la hiperrespuesta de las vías respiratorias a la metacolina con una dosis inferior 1,9 veces más produciendo una respuesta de PC₄₀₀.

Las ovejas que habían recibido una dosis de 1 mg/kg de feG proporcionado intravenosamente, 20 min antes de la exposición con antígeno, mostraron una atenuación de 72% de la broncoconstricción tardía (6-8 h) provocada por la administración por aerosol de antígeno *Ascaris suum*. La fase broncoconstrictora temprana no resultó afectada. El tratamiento intravenoso con feG redujo asimismo el aumento en la hiperrespuesta de las vías respiratorias a la metacolina con una dosis 2,2 veces inferior produciendo una respuesta de PC₄₀₀.

Las ovejas que habían recibido feG oralmente, en dos dosis de 2 mg/kg, 24 h y 30 min antes de la exposición con antígeno intravenoso, mostraron una atenuación de 69% de la broncoconstricción tardía (6-8 h) provocada mediante administración por aerosol del antígeno *Ascaris suum*. La fase broncoconstrictora temprana no resultó afectada. El tratamiento intravenoso con feG redujo asimismo el aumento en la hiperrespuesta de las vías respiratorias a la metacolina con una dosis 2,1 veces inferior produciendo una respuesta de PC₄₀₀.

Las ovejas que habían recibido una dosis total de 30 mg de (cha)eG por aerosol, 20 min antes de la exposición con antígeno, mostraron una atenuación de 64% y 88% respectivamente, de la broncoconstricción temprana (0-3 h) y la tardía (6-8 h), provocada por la administración por aerosol del antígeno *Ascaris suum*. El tratamiento de aerosol con (cha)eG redujo asimismo el aumento en la hiperrespuesta de las vías respiratorias a la metacolina con una dosis 2,8 veces inferior produciendo una respuesta de PC₄₀₀.

Las ovejas que habían recibido una dosis de 1 mg/kg de (cha)eG proporcionada intravenosamente, 20 min antes de la exposición con antígeno, mostraron una atenuación de 58% y 43%, respectivamente, de la broncoconstricción temprana (0-3 h) y la tardía (6-8 h) provocada mediante administración de aerosol del antígeno *Ascaris suum*. El péptido redujo asimismo el aumento en la hiperrespuesta de las vías respiratorias a la metacolina con una dosis 1,7 veces inferior produciendo una respuesta de PC₄₀₀.

Las ovejas que habían recibido (cha)eG oralmente en dos dosis de 2 mg/kg, 24 h y 30 min antes de la exposición con antígeno intravenosamente, mostraron una atenuación de 58% y 43%, respectivamente, de la broncoconstricción temprana (0-3 h) y la tardía (6-8 h) provocada por la administración mediante aerosol del antígeno *Ascaris suum*. Cuando se administró oralmente (cha)eG redujo el aumento en la hiperrespuesta de las vías respiratorias a la metacolina con una dosis 1,7 veces inferior produciendo una respuesta de PC₄₀₀.

Las ovejas que recibieron una dosis total de 30 mg de (Cha)EG mediante inhalación de aerosol, 20 min antes de la exposición con antígeno, mostraron una atenuación de 52% y 84%, respectivamente, de la broncoconstricción temprana (0-3 h) y la tardía (6-8 h) provocada mediante la administración por aerosol del antígeno *Ascaris suum*. Este péptido, el (Cha)EG, redujo el aumento en la hiperrespuesta de las vías respiratorias a la metacolina con una dosis 1,9 veces inferior produciendo una respuesta de PC₄₀₀.

Las ovejas que recibieron una dosis de 1 mg/kg de (Cha)EG intravenosamente, 20 min antes de la exposición con antígeno, mostraron una atenuación de 62% y 67%, respectivamente, de la broncoconstricción temprana (0-3 h) y la tardía (6-8 h) provocada mediante la administración por aerosol del antígeno *Ascaris suum*. Este péptido, el (Cha)EG, redujo el aumento en la hiperrespuesta de las vías respiratorias a la metacolina con una dosis 3,2 veces inferior produciendo una respuesta de PC₄₀₀.

Ejemplo 3

Inhibición de la permeabilidad vascular mediada por anticuerpos y anafilaxis cutánea activa en ratas

5 Para este estudio *in vivo*, los péptidos se prepararon de manera convencional por Core Laboratories, Queen's University, Kingston, Ontario, y se estudiaron sus efectos inhibidores en una permeabilidad vascular provocada por los anticuerpos IgG o IgE y sobre las reacciones anafilácticas cutáneas activas (ACA). Las reacciones de anticuerpos IgG o IgE se estudiaron en ratas Sprague-Dawley no sensibilizadas, normales, anestesiadas con pentobarbital sódico (65 mg/kg). Se rasuraron los lomos de los animales, y se trazó una cuadrícula sobre el lomo en tinta negra y en el centro de cada cuadrado se inyectaron intradérmicamente 50 μ l de diferentes concentraciones de péptido (10⁻¹² a 10⁻⁷ moles/l). Se utilizó solución salina como control. Para las reacciones mediadas por IgG se inyectaron intravenosamente a las ratas, a través de la vena peneana, con 10 mg/kg de ovalbúmina y 20 mg/kg de azul de Evans, diez minutos más tarde el anticuerpo IgG (ratón antiovalbúmina) y tras 3 h de la zona de fuga vascular, visualizada mediante puntos azules, fue calculado con la fórmula de la zona superficial de una elipse. Los procedimientos similares se aplicaron para estudiar la fuga vascular mediada por IgE en las ratas a las que se inyectaron intravenosamente 20 mg/kg de azul de Evans, y 10 minutos después se inyectó intradérmicamente un anticuerpo monoclonal contra la cadena pesada del receptor de IgE de rata.

Las reacciones ACA se sometieron a elisión mediante inyecciones de antígeno en la piel dorsal de las ratas sensibilizadas con albúmina. Las ratas Sprague-Dawley fueron sensibilizadas a 1 mg de ovalbúmina (OA) y 40 ng de toxina pertussis (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (Koscka *et al*, 1994). De cuatro a seis semanas tras la sensibilización, el título de anticuerpos IgE anti-OA fue determinado mediante anafilaxis cutánea pasiva y se utilizaron las ratas con un título de anticuerpo de 1:32. Para realizar la ACA las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (65 mg/kg) y se rasuraron sus lomos. Se dibujó una cuadrícula de 2x4 sobre el lomo en tinta negra y en el centro de cada cuadrado se inyectaron intradérmicamente las diferentes concentraciones de péptido (10⁻¹² a 10⁻¹⁶ moles) en 50 μ l. Se utilizó como control la solución salina. Los animales fueron inyectados, a través de la vena peneana, con azul de Evans (20 mg/kg), un tinte que se une a la albúmina. Diez minutos tras la primera inyección intradérmica se inyectaron 50 μ l de antígeno de ovalbúmina (100 μ g/ml) en el mismo lugar que la solución salina o el péptido. En unos pocos minutos tras la inyección de antígenos en un lugar de control, inicia su desarrollo un azulado de la piel cuando el complejo albúmina-azul de Evans se retira del vaso sanguíneo consiguiendo a la activación de antígenos de los mastocitos. Tras treinta minutos de la inyección del antígeno se midió el tamaño de la roncha inducida por histamina utilizando calibradores.

Los resultados se representan en las figuras 9 y 10.

(cha)eG (figura 9A), (cha)EG (figura 9B), y (Nle)EG (figura 9C) inhibieron el aumento en la permeabilidad vascular (disminución en % en la fuga vascular) sometida a elisión por los anticuerpos IgG o IgE, o ambos anticuerpos. Con la totalidad de los tres anticuerpos, se inhibió la fuga vascular mediada por IgG más que la fuga vascular mediada por IgE. Sin embargo, a bajas concentraciones (10⁻¹¹M a 10⁻⁹M) (cha)eG proporcionó una inhibición significativa de la fuga vascular mediada por IgE. La reacción ACA fue inhibida (tamaño reducido de la roncha) a una extensión similar por (Cha)EG y (cha)eG cuando se inyectaron a concentraciones comprendidas entre 10⁻¹¹M a 10⁻⁸ (figura 10).

Ejemplo 4

Inhibición mediante (Cha)EG, MEG, fe(Sar) y fe de la inflamación pulmonar inducida por alérgeno

Se utilizó el modelo de sensibilización de ovalbúmina/rata de Noruega marrón de asma alérgica. Estas ratas producen mucho IgE y son muy utilizadas para estudiar el asma debido a que desarrollan una broncoconstricción de fase tardía y temprana, así como un aumento en la hiperrespuesta bronquial.

Las ratas de Noruega marrones (10 a 12 meses de vida) se sensibilizaron a la ovalbúmina (OA; Sigma Chemicals Co. St. Louis, MI) con una inyección ip de 1 ml de solución salina al 0,9% que contiene OA de 10 μ g, Al(OH)₃ de 150 mg (ICN, Aurora, OH) y 50 ng de la toxina *B. Pertussis* (Sigma). Veintiún días tras la sensibilización, los experimentos se realizaron bajo una ligera anestesia. Los animales se expusieron a OA por aerosol (5%) y treinta minutos después se les proporcionó un tratamiento oral con péptido de prueba ((Cha)EG, MEG, fe(Sar) o fe: 250 μ g/kg) o solución salina (controles).

Veinticuatro horas tras la exposición al alérgeno, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (65 mg/kg) y las células se recogieron del tracto respiratorio inferior mediante lavado broncoalveolar (BAL). El abdomen se abrió, y el diafragma se diseccionó para mitigar la presión intratorácica. Se realizó una traqueotomía y se insertó una cánula a la primera bifurcación de los bronquiolos. Se lavaron los bronquiolos y los alveolos 10 veces con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se centrifugaron con 200 g durante 20 min y a continuación puestas en suspensión nuevamente en 1 ml de PBS. Se contó el número total de células y se determinaron las diferenciales con tinción May-Grunwald/Giesma.

ES 2 325 251 T3

Las ratas de control respondieron a la exposición a aerosol con ovalbúmina (OA) de antígeno de sensibilización al 5% con una inflamación pulmonar sustancial a las 24 h. El número total de células recubiertas con lavado broncoalveolar de los espacios alveolares aumentó de $3,5 \pm 1,8$ ($\times 10^6$) células en ratas sensibilizadas, no expuestas, a $25,0 \pm 3,2$ ($\times 10^6$) en ratas sensibilizadas, expuestas a antígeno. (Cha)EG, MEG, fe(Sar) y fe (0,25 mg/kg), cuando se administraron 30 min tras la exposición a alérgeno de las ratas sensibilizadas, redujeron de manera significativa el número de células totales recubiertas por lavado broncoalveolar de 50% a 80%, a $8,8 \pm 3,5$ ($\times 10^6$), $12,1 \pm 3,6$ ($\times 10^6$), $5,1 \pm 2,6$ ($\times 10^6$) y $13,1 \pm 3,7$ ($\times 10^6$) respectivamente.

Las características de las formas de realización descritas en la presente memoria no se proporcionan a título limitativo de la presente invención, estando comprendidas la totalidad de las variaciones y las modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones.

TABLA 1

Relaciones de actividad de estructura para los péptidos de tri- y diaminoácidos.

Sustitución primaria	Péptido	Med	SEM	Relevancia
	Control	0,267	0,020	
L-Phe	FEG	0,125	0,040	*
D-phe-D-glu	feG	0,138	0,019	*
D-phe-D-glu-D-ala	fea	0,128	0,018	*
D-tyr-D-glu	yeG	0,157	0,010	*
L-Phg	(Phg)EG	0,136	0,023	*
L-Trp	WEG	0,128	0,052	*
L-Trp-L-Asp	WDG	0,158	0,024	*
NMePhe	(NMeF)EG	0,118	0,027	*
L-Nle	(Nle)EG	0,127	0,027	*
L-Cha	(Cha)EG	0,092	0,014	*
L-Met	MEG	0,121	0,027	*
L-Met (posición 3)	FEM	0,081	0,016	*
L-Ile (posición 3)	FEI	0,161	0,018	*
β -alanina (posición 3)	FE-Ba	0,091	0,012	*
Sarcosina (posición 3)	FESar	0,160	0,034	*
γ Abu (posición 3)	FE(gAbu)	0,130	0,050	*

ES 2 325 251 T3

TABLA 1 (continuación)

Sustitución primaria	Péptido	Med	SEM	Relevancia
Dipéptido	FE	0,105	0,014	*
Dipéptido: D-phe-D-glu	fe	0,161	0,010	*
Dipéptido: D-cha-D-glu	(cha)e	0,189	0,020	*
L-Tyr	YEG	0,306	0,032	NR
L-Phe-L-Asp	FDG	0,262	0,042	NR
D-Phe-D-Asp	fdG	0,95	0,105	NR
L-Tyr-L-Asp	YDG	0,221	0,106	NR
D-Tyr-D-Asp	ydG	0,208	0,083	NR
D-Trp-D-Glu	weG	0,201	0,047	NR
D-Trp-D-Asp	wdG	0,200	0,043	NR
Dipéptido: L-Glu-Gly	EG	0,242	0,085	NR
L-Glu	EEG	0,230	0,015	NR
Gly	GEG	0,202	0,081	NR
L-Ala	AEG	0,252	0,106	NR
L-Leu	LEG	0,196	0,050	NR
L-Ile	IEG	0,222	0,070	NR
L-Val	VEG	0,313	0,030	NR
L-Nval	(Nval)EG	0,191	0,082	NR
L-Thr	TEG	0,250	0,042	NR
L-Cys	CEG	0,247	0,107	NR
L-His	HEG	0,195	0,028	NR
L-Asp	NEG	0,384	0,122	NR
L-Arg	REG	0,220	0,047	NR
L-Pro	PEG	0,324	0,072	NR
L-Ala	FAG	0,171	0,040	NR
L-Gln	FQG	0,309	0,050	NR
L-Asp	FDG	0,262	0,042	NR
D-Tyr-D-Asp	ydG	0,208	0,083	NR
L-Lys	FKG	0,183	0,027	NR

ES 2 325 251 T3

TABLA 1 (continuación)

Sustitución primaria	Péptido	Med	SEM	Relevancia
L-Arg	FRG	0,160	0,025	NR
L-His	FHG	0,167	0,050	NR
L-Hse (posición 2)	F(Hse)G	0,258	0,050	NR
Pro (posición 3)	FEP	0,246	0,021	NR
L-Ala (posición 3)	FEA	0,217	0,046	NR
L-Nval	FE(Nval)	0,241	0,037	NR
L-Gln	FEQ	0,310	0,046	NR
L-Thr	FET	0,237	0,054	NR
L-Glu	FEE	0,318	0,056	NR
L-Lys	FEK	0,252	0,056	NR
L-Arg	FER	0,134	0,023	NR
L-His	FEH	0,200	0,035	NR
L-Cys	FEC	0,187	0,023	NR
	Ac-FEG	0,173	0,046	
	FEG-NH ₂	0,262	0,081	

NR = no relevante

* = inhibición relevante

REIVINDICACIONES

1. Péptido seleccionado de entre el grupo constituido por:

- (a) ciclohexilalanina-ácido glutámico-glicina;
(b) ciclohexilalanina-ácido glutámico-metionina; y
(c) ciclohexilalanina-ácido glutámico-isoleucina.

2. Péptido según la reivindicación 1, en el que por lo menos un aminoácido es un aminoácido D.

3. Péptido según la reivindicación 1 ó 2, en el que el aminoácido C-terminal del péptido está amidado.

4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la amida del aminoácido N-terminal del péptido está sustituida con un grupo alquilo inferior de cadena recta de 1 a 3 carbonos, preferentemente metilada.

5. Péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido es L-ciclohexilalanina-ácido L-glutámico-glicina.

6. Péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido es D-ciclohexilalanina-ácido D-glutámico-glicina.

7. Péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido es L-ciclohexilalanina-ácido L-glutámico-L-metionina.

8. Péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido es D-ciclohexilalanina-ácido D-glutámico-L-metionina.

9. Péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido es L-ciclohexilalanina-ácido L-glutámico-L-isoleucina.

10. Péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido es D-ciclohexilalanina-ácido D-glutámico-D-isoleucina.

11. Utilización de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la preparación de un medicamento destinado a inhibir una reacción inflamatoria en un mamífero.

12. Utilización de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del asma en un mamífero.

13. Utilización según la reivindicación 11, en la que la reacción inflamatoria está asociada a un trastorno seleccionado de entre el grupo constituido por asma, rinitis, conjuntivitis, dermatitis atópica y anafilaxis intestinal.

14. Utilización según la reivindicación 11 ó 13, en la que la reacción inflamatoria es una reacción de hipersensibilidad de tipo I, de tipo II o de tipo III.

15. Utilización según la reivindicación 11 ó 13, en la que la reacción inflamatoria es una reacción inmunológica.

16. Composición farmacéutica que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

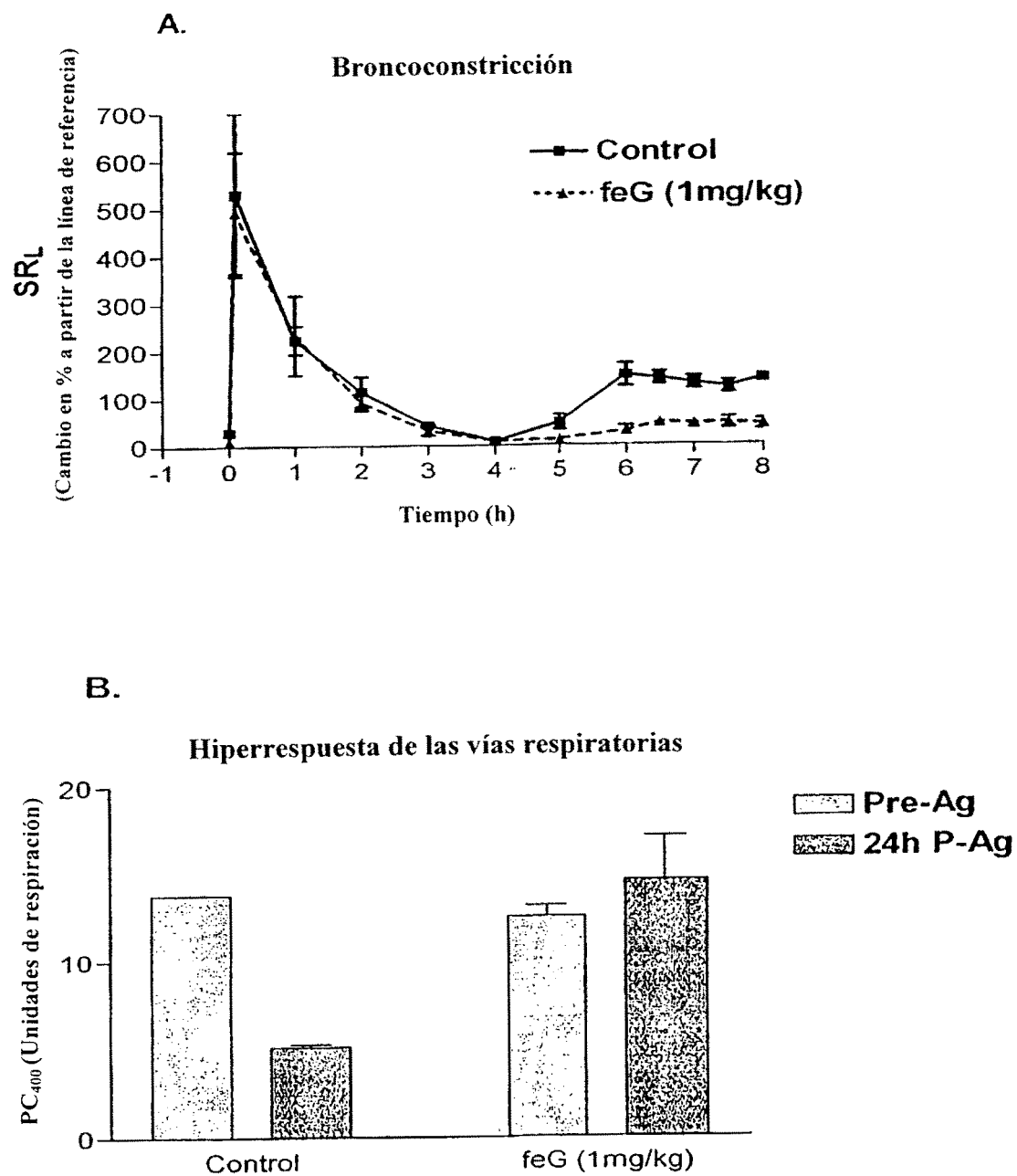


FIGURA 1

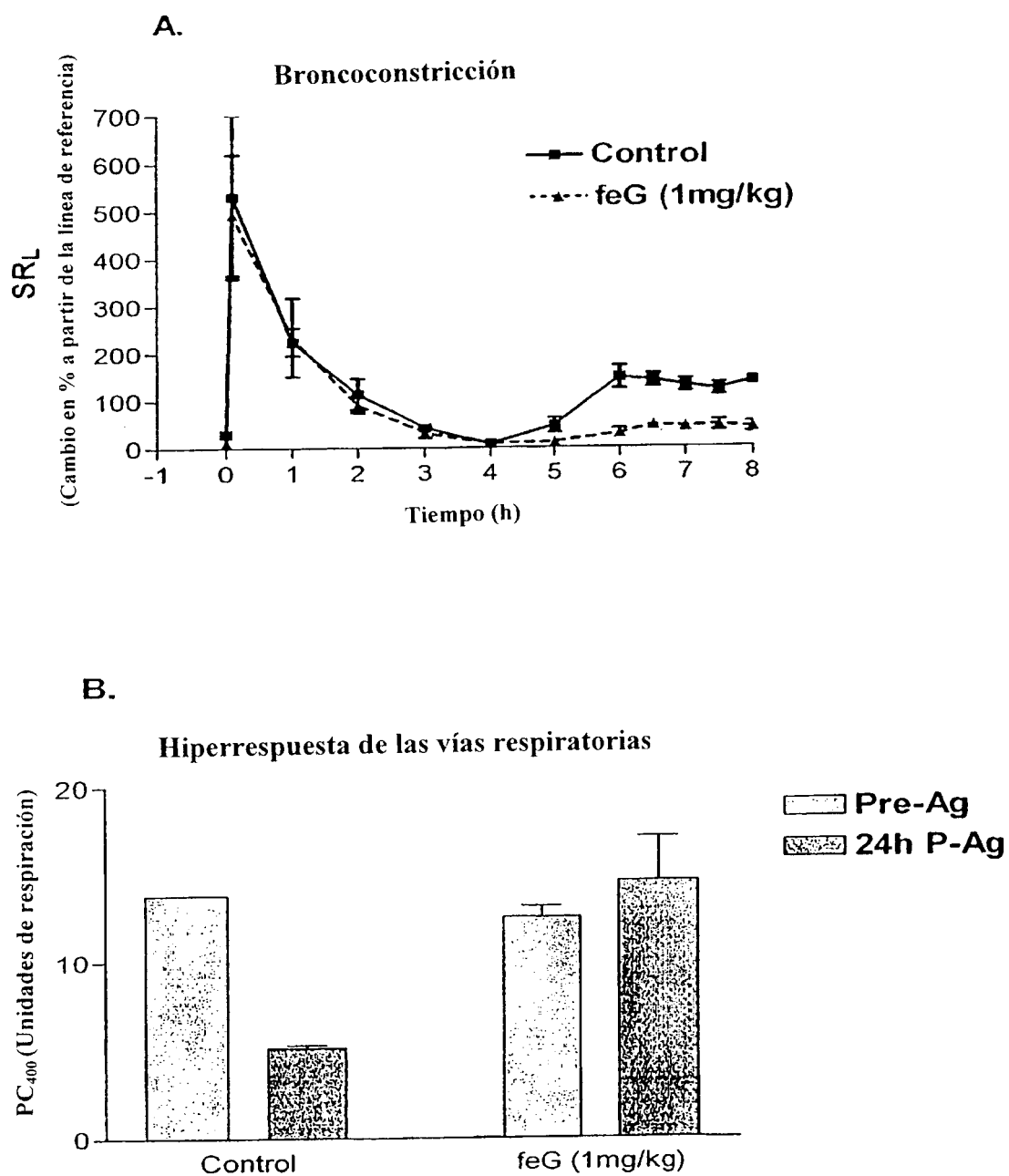


FIGURA 2

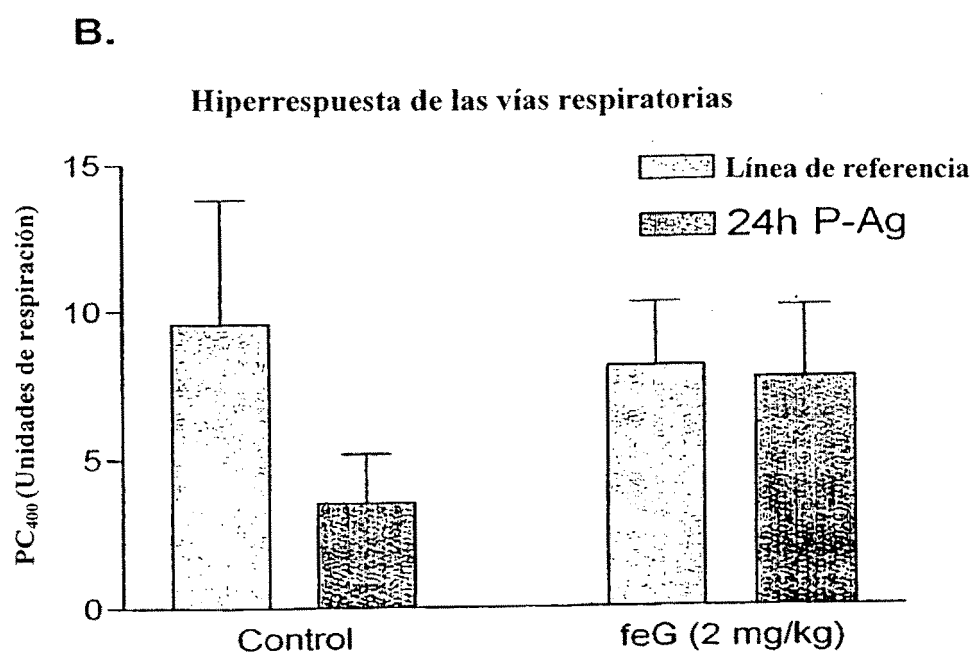
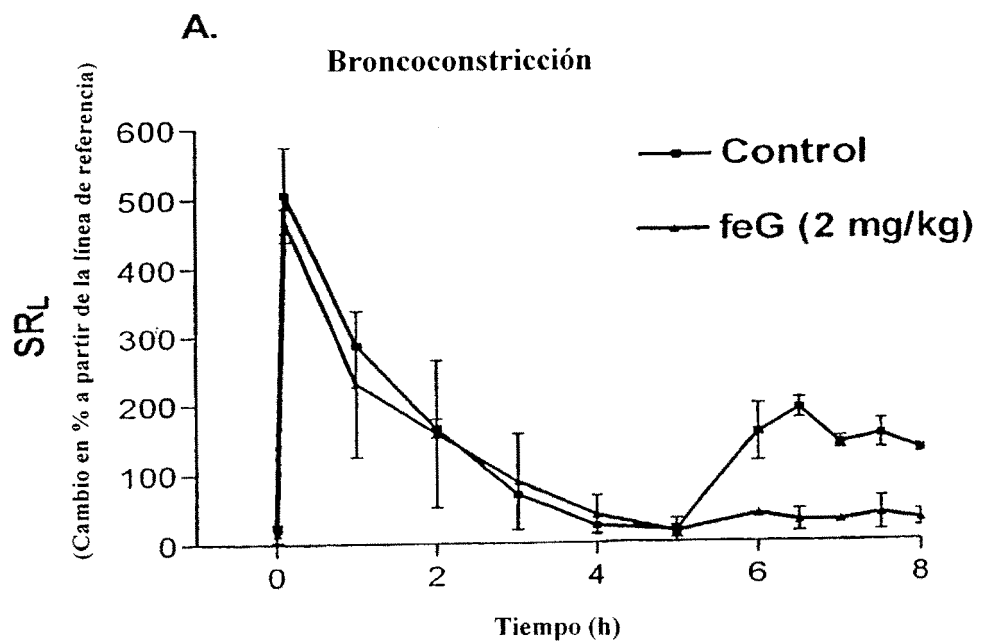


FIGURA 3

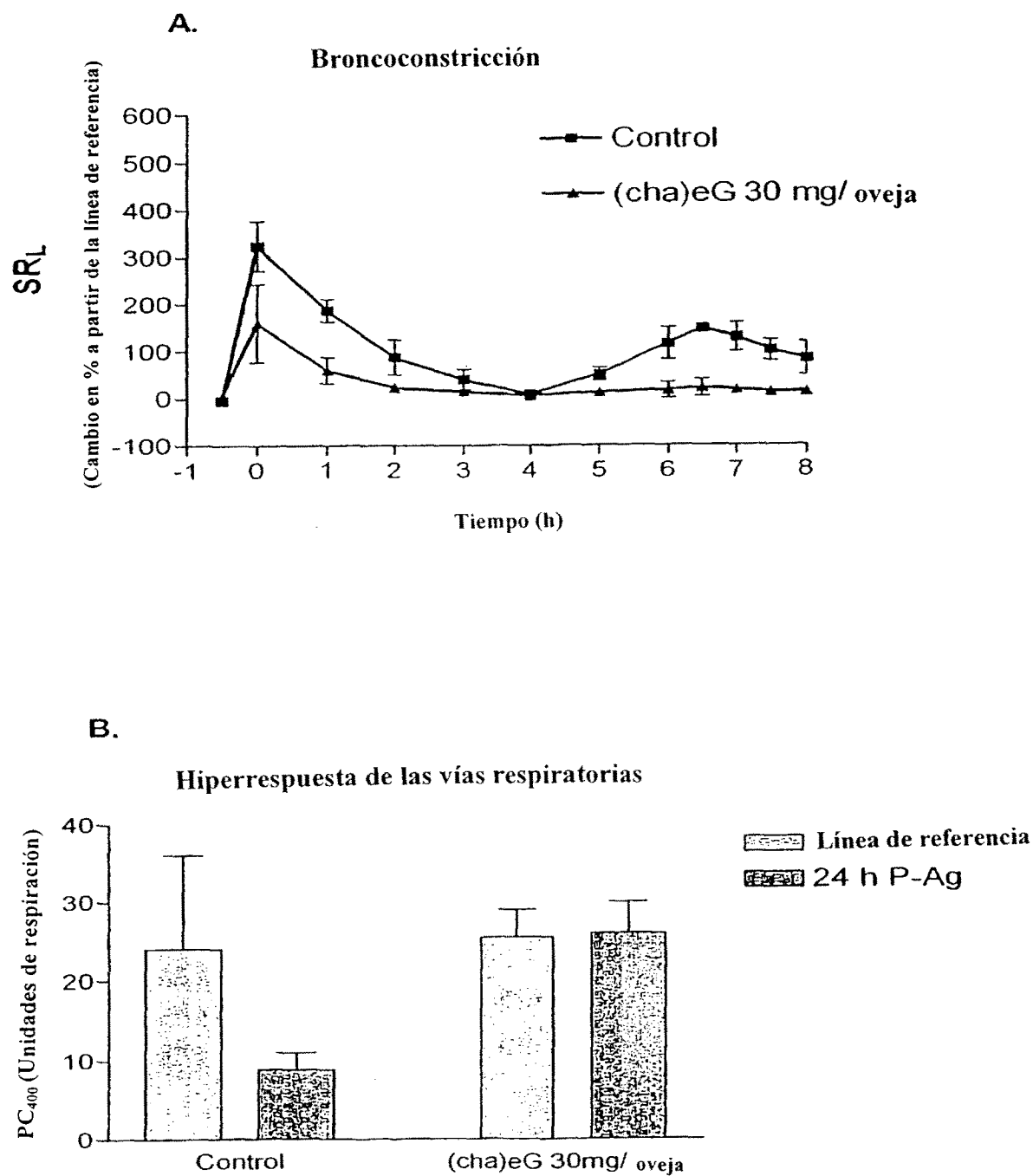


FIGURA 4

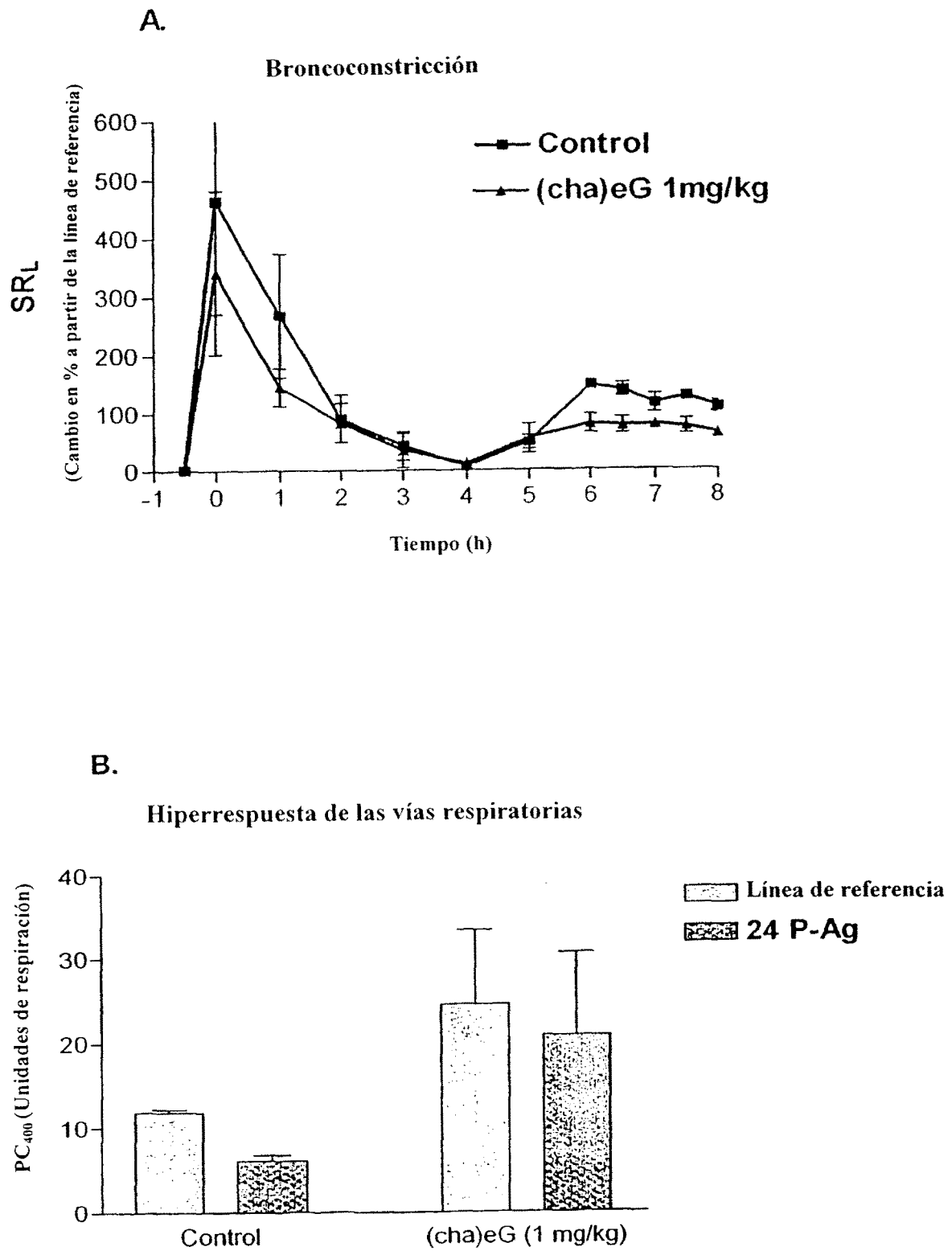


FIGURA 5

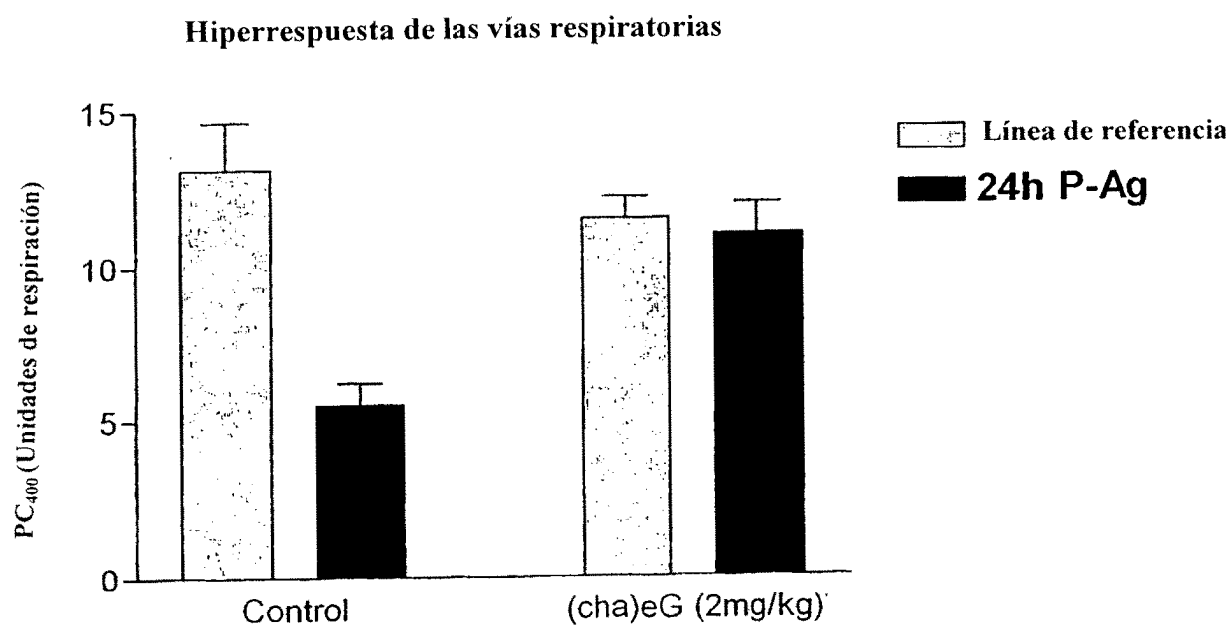
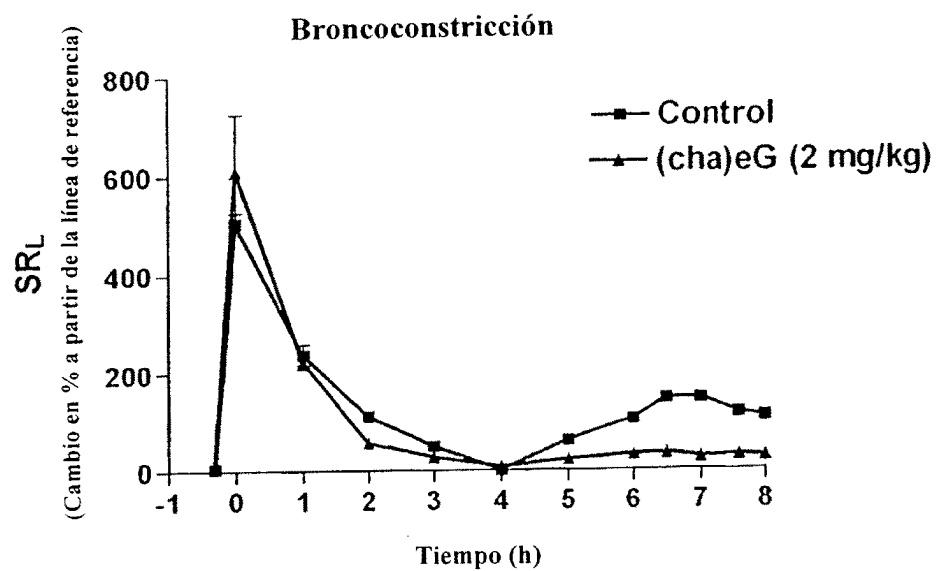


FIGURA 6

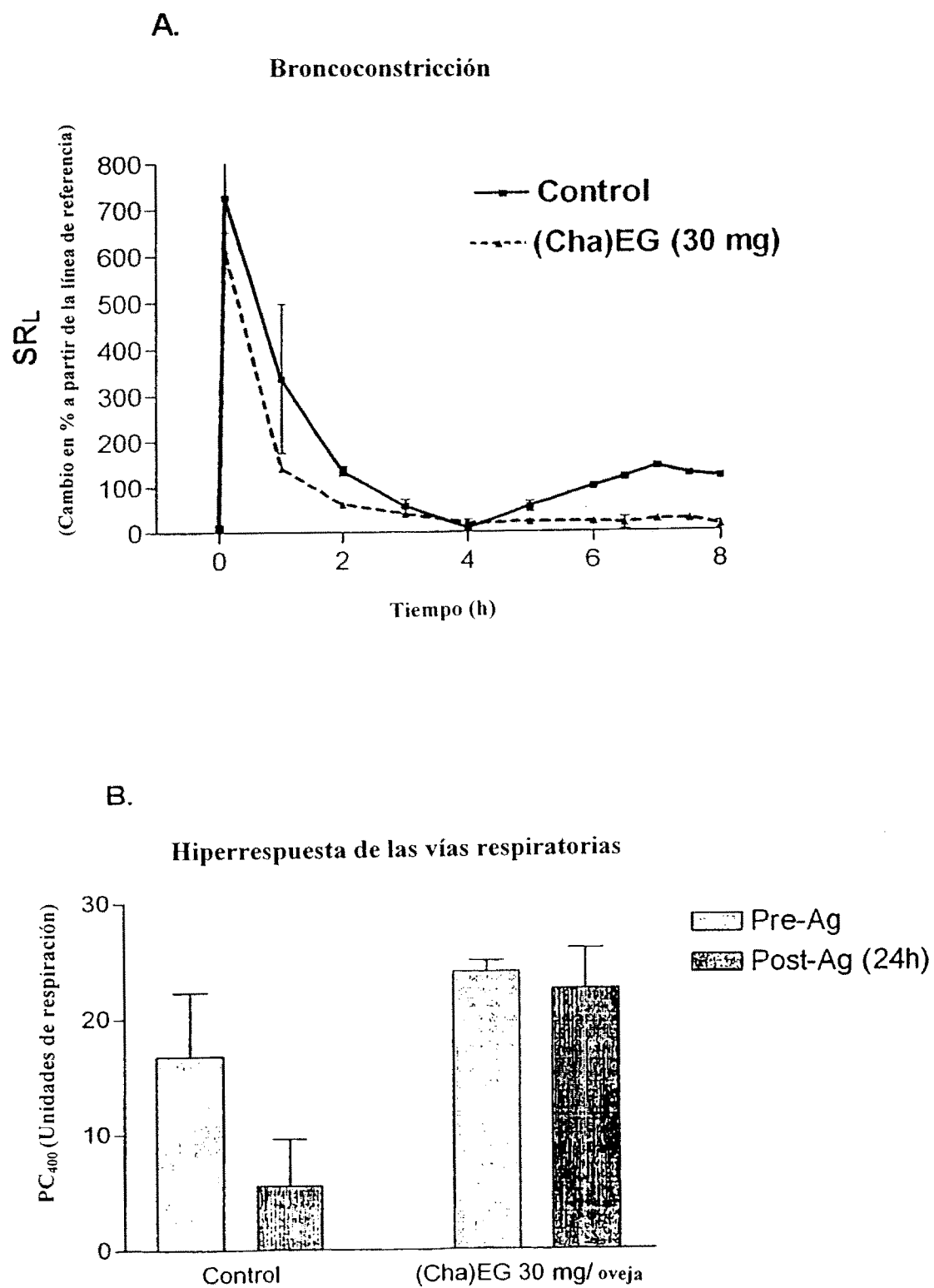


FIGURA 7

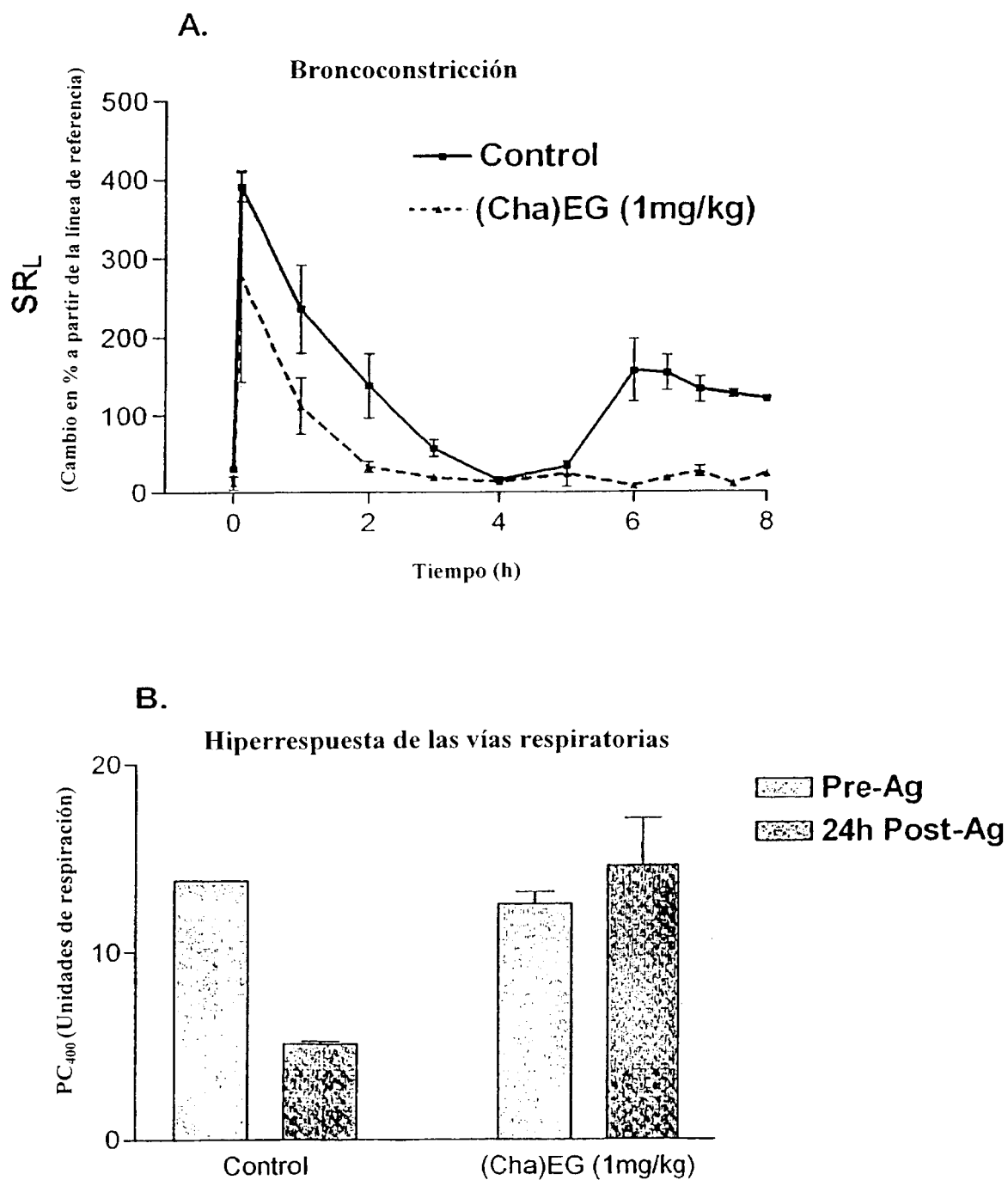


FIGURA 8

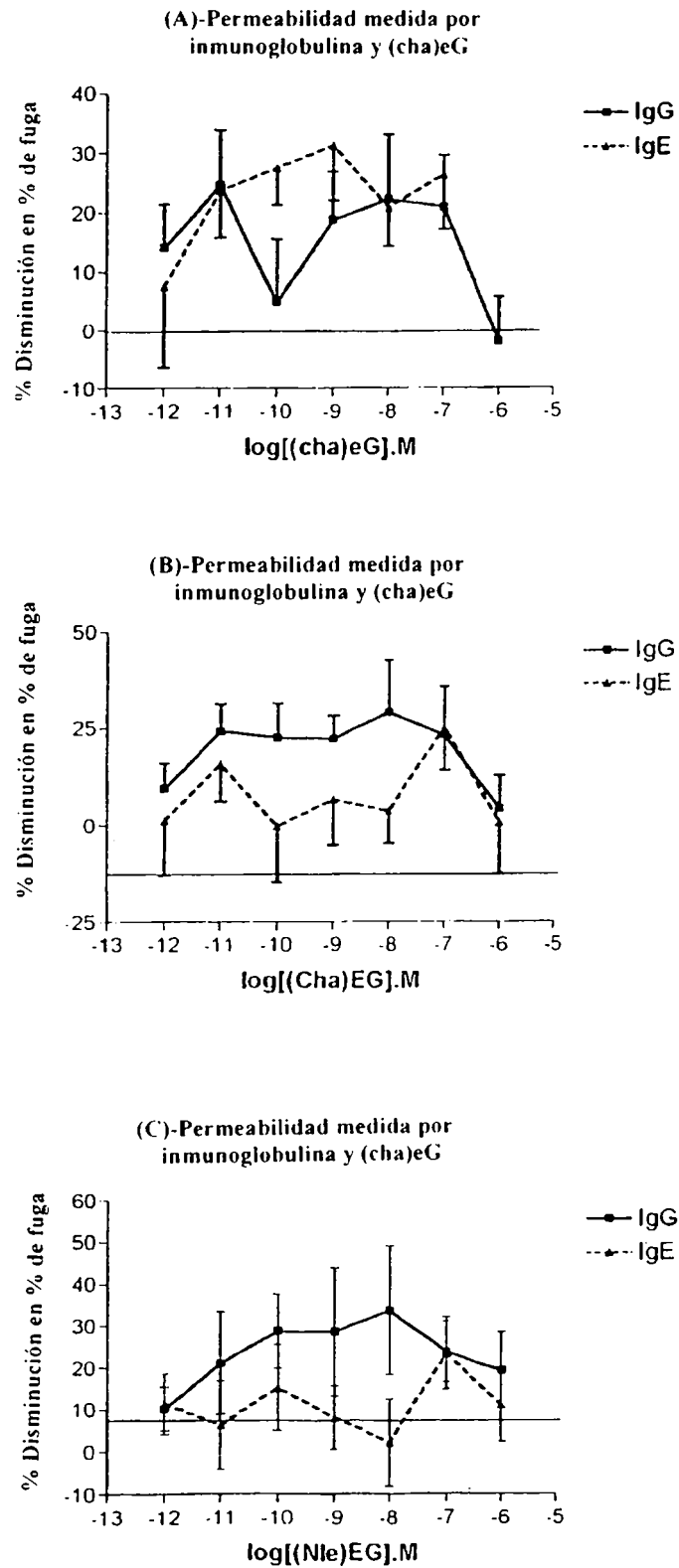


FIGURA 9

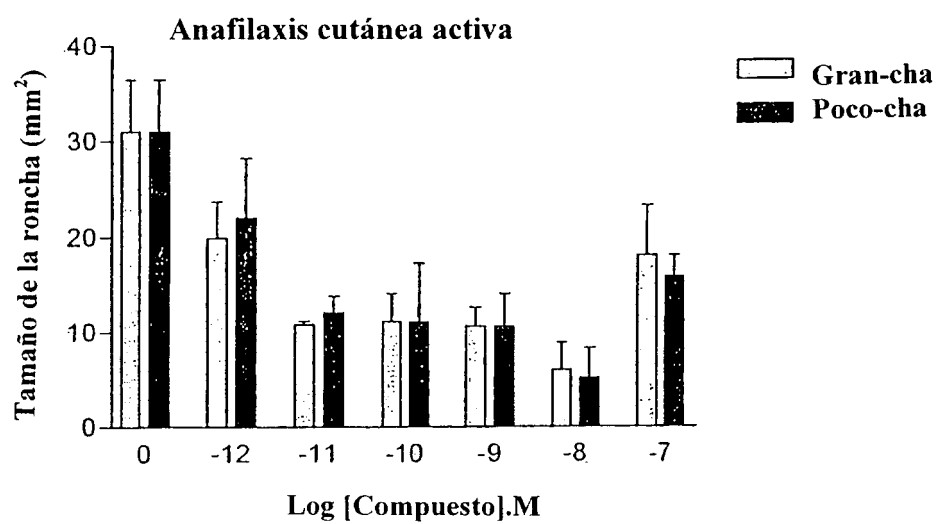


FIGURA 10