



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 356**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00913818 .1**

96 Fecha de presentación : **08.03.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1560590**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.08.2005**

54 Título: **Péptidos sintéticos complementarios y sus utilizaciones oftalmológicas.**

30 Prioridad: **09.03.1999 US 123409 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Fornix BioSciences N.V.**
Vijzelweg 11
8243 PM Lelystad, NL

72 Inventor/es: **Haddox, Jeffrey, Lynn;**
Blalock, James, Edwin;
Pfister, Robert, Roswell y
Villain, Matteo

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 316 356 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

Péptidos sintéticos complementarios y sus utilizaciones oftalmológicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a la farmacología bioquímica de agentes oftalmológicos. Más específicamente, la presente invención se refiere a péptidos complementarios sintéticos y a sus utilizaciones oftalmológicas.

10 **Descripción de la técnica relacionada**

La lesión por álcali del ojo provoca una reacción inflamatoria aguda, compuesta en gran medida por leucocitos polimorfonucleares (PMN), que son responsables de ulceraciones y perforaciones de la córnea¹⁻³. Los cebos químicos neutrófilos N-acetil-PGP y N-metil-PGP liberados durante la hidrólisis alcalina directa de las proteínas de la córnea, son los desencadenantes iniciales de la invasión de leucocitos polimorfonucleares en la córnea lesionada por álcalis⁴⁻⁶. La actividad específica de N-acetil-PGP es mayor que la del tripéptido metilado⁴.

En reconocimiento de que el N-acetil-PGP es un mediador importante en la enfermedad ha abierto una ventana terapéutica de oportunidades. La inhibición precoz de este cebo químico en un ojo lesionado por álcali puede reducir o eliminar el primer influjo neutrófilo. Minimizando el número de neutrófilos inicialmente que penetran en la córnea dañada se limitaría la producción de los mediadores inflamatorios secundarios, tales como el leucotrieno B₄, reduciendo en consecuencia la regeneración adicional de los leucocitos polimorfonucleares. La exclusión de neutrófilos de la córnea lesionada por álcalis es la clave para disminuir o eliminar la ulceración de la córnea. Por consiguiente es de la mayor importancia investigar compuestos principales que puedan inhibir este cebo químico.

Un método para el desarrollo de un compuesto inhibidor principal puede encontrarse en la teoría del reconocimiento molecular⁷. Este concepto propone como principio que un requisito fundamental para las reacciones biológicas consiste en que las moléculas proteicas reconocen una a otra de manera genéticamente definida. Blalock y Smith⁸ propusieron un nuevo método para el reconocimiento molecular que ha tenido éxito en la predicción de las interacciones de moléculas proteicas con mucha frecuencia. Este método, basado en el desarrollo de péptidos complementarios especificados por el ARN complementario del ligando, ha demostrado ser útil para diseñar péptidos interactivos, receptores aislantes y anti-receptores productores y anticuerpos antiidiotípicos^{9,10}.

Por lo tanto, la técnica anterior es insuficiente en péptidos complementarios sintéticos para tratar trastornos oftalmológicos. La presente invención completa esta necesidad existente desde hace tiempo en la técnica.

Compendio de la invención

La presente invención demuestra una aplicación de la teoría de reconocimiento molecular, que es la generación de agentes terapéuticos que pueden utilizarse para tratar la enfermedad. Utilizando este método, se diseñaron, sintetizaron y probaron una serie de péptidos complementarios para la secuencia pro-gly-pro como antagonistas del cebo químico de PMN, N-acetil-PGP.

En una forma de realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para utilizaciones oftalmológicas. Específicamente, dicha composición es un péptido complementario que comprende secuencias complementarias para prolina-glicina-prolina (PGP). Generalmente, las secuencias complementarias se diseñan basándose en el posible triplete de codificación para prolina y glicina y en el valor hidropático de los dos aminoácidos. El aumento de la potencia de la secuencia complementaria se consiguió con un procedimiento de polimerización. La molécula resultante puede dividirse en 4 subunidades específicas, conectadas por enlaces amida con diferentes funciones: 1) subunidad de reconocimiento 2) subunidad polimerizante del núcleo 3) subunidad espaciadora y 4) subunidad R N-terminal.

Subunidad de reconocimiento: secuencia complementaria a Pro-Gly-Pro, esta subunidad es responsable de la interacción con el cebo químico. La subunidad de reconocimiento está presente como unidad individual en el monómero, se repite dos veces en el dímero, 4 veces en el tetrámero y 8 veces en el octámero. Se define mediante la secuencia todo-L Arg-Thr-Arg y mediante la secuencia completa todo-L Xxx-Thr-Arg (Xxx = los 20 aminoácidos naturales) y por todo-D Arg-Thr-Arg y todo-D Xxx-Thr-Arg (Xxx = los 20 aminoácidos naturales).

La subunidad polimerizante del núcleo, ausente en los monómeros lineales, se caracteriza por un diaminoácido con ramificación (lisina, ácido diamino propiónico, ácido diamino butírico) conectado a la única alanina, donde ambos grupos amino están implicados en un enlace amida. La función del núcleo es determinar el número de unidades de reconocimiento en la molécula y controlar la distribución espacial relativa de las subunidades de reconocimiento. El núcleo representa también el punto de conexión con la resina durante la síntesis de péptidos en fase sólida. El núcleo octamérico está definido por la fórmula todo-L (((B)₂B)₂)B-Ala, el tetrámero por todo-L (B)₂B-Ala y el dímero por todo-L B-Ala (en la que B = lisina, ácido diamino propiónico y ácido diamino butírico). El núcleo se obtuvo también con los aminoácidos todo-D con las mismas fórmulas genéricas.

Los espaciadores representan el punto de conexión entre el núcleo y las subunidades de reconocimiento y determina la distribución espacial relativa de las subunidades de reconocimiento. Puede estar constituido por una diglicina. La diglicina podría estar sustituida por un solo aminoácido con la fórmula: $\text{NH}_2[\text{CH}_2]_n\text{-COOH}$ [$n=2$ [ácido 3-amino-propiónico]; 3; 4; 5; 6 ó 7 [ácido 8-aminocaprílico]].

Subunidad R-terminal: un grupo terminal amino libre en cada subunidad de reconocimiento no es necesario para la función de la subunidad. Este grupo puede estar funcionalizado por una molécula R para modificar las propiedades dinámicas del fármaco de la molécula y para producir una molécula más forzada. El R puede ser $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n\text{-CO}$ con $n=0$ (acetil), $n=4$ (caproíl) y $n=14$ (palmitoleíl). R puede ser también el aminoácido cisteína. En el caso del péptido tetramero los grupos azufre pueden utilizarse para la formación de un puente de disulfuro intramolecular, generando una molécula bicíclica forzada.

En otra forma de realización de la presente invención, se proporciona la utilización de una composición farmacéutica de la presente invención para inhibir la polarización de leucocitos polimorfonucleares, la quimiotaxia y la infiltración en el tejido activado por un cebo químico neutrófilo. Preferentemente el cebo químico neutrófilo se selecciona del grupo consistente en N-acetil-PGP, N-acetil-PGX, N-metil-PGX, N-metil-PGP y pequeños cebos químicos peptídicos que contienen prolina y glicina. Incluso preferentemente, la composición farmacéutica se administra en un intervalo de concentración desde aproximadamente $1\text{ }\mu\text{M}$ hasta aproximadamente 100 mM , dependiendo del péptido.

Incluso en otra realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar una enfermedad ocular.

Preferentemente, la composición farmacéutica se administra en un intervalo de concentración desde aproximadamente $1\text{ }\mu\text{M}$ a aproximadamente 100 mM , dependiendo del péptido. Las enfermedades oculares representativas que pueden tratarse utilizando este procedimiento de la presente invención, incluyen el ojo lesionado por álcalis, el ojo lesionado químicamente o enfermedades inflamatorias del ojo que son bien conocidas por los expertos en esta materia.

Otros y más aspectos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las formas de realización actualmente preferidas de la invención. Estas formas de realización se dan a título de exposición.

Breve descripción de los dibujos

Para que la materia en la que las características, ventajas y objetivos relacionados anteriormente de la invención, así como otros que serán evidentes, se alcancen y pueden entenderse con detalle, pueden hacerse más descripciones específicas de la invención resumidas brevemente con anterioridad haciendo referencia a determinadas de sus formas de realización que se ilustran en las formas de realización adjuntas preferidas de la invención y por consiguiente no se consideran limitativas del alcance.

La Figura 1 demuestra la estructura polimérica y los pesos moleculares de los péptidos complementarios que han sido probados.

Descripción detallada de la invención

El cebo químico neutrófilo, N-acetil-PGP, desempeña una función principal en el inicio de la invasión por leucocitos polimorfonucleares (PMN) en el ojo lesionado por álcali. En el estudio actual, se utilizó metodología transcrita-complementaria para desarrollar péptidos complementarios como inhibidores potenciales de N-acetil-PGP. Se utilizó el ensayo de polarización para medir la respuesta quimiotáctica potencial de leucocitos polimorfonucleares al N-acetil-PGP sintético, los cebos químicos tripeptídicos ultrafiltrados obtenidos a partir de córneas de conejo degradadas con álcali, o leucotrienos B_4 . La inhibición se expresó como la concentración de péptido requerida para producir 50% de inhibición (ID_{50}) de polarización. Se probaron cinco péptidos complementarios como inhibidores potenciales de N-acetil-PGP: RTR, RTRGG, dímero RTR, tetramero RTR y tetramero ASA. Además, se analizó, independientemente, el tetramero RTR y ambos péptidos monoméricos (RTR y RTRGG), de cebos químicos tripeptídicos ultrafiltrados de LTB_4 .

El péptido tetramérico RTR complementario fue un antagonista potente de la polarización de leucocitos polimorfonucleares inducida por N-acetil-PGP (ID_{50} de 200 nM). El dímero RTR fue mucho menos potente (ID_{50} de $105\text{ }\mu\text{M}$). Ambos péptidos monoméricos, RTR y RTRGG, eran solamente antagonistas a concentraciones milimolares. El tetramero ASA no presentaba capacidad para inhibir a N-acetil-PGP. El tetramero RTR inhibió también la activación del leucocito polimorfonuclear por los cebos químicos tripeptídicos ultrafiltrados (ID_{50} de $30\text{ }\mu\text{M}$), pero no tuvo ningún efecto sobre LTB_4 . Se diseñó un péptido complementario (RTR) que es un inhibidor eficaz del cebo químico neutrófilo, N-acetil-PGP. La potencia del péptido aumenta drásticamente por tetramerización. La inhibición de este cebo químico en el ojo lesionado por álcali por péptidos complementarios es muy prometedor para el control de la respuesta inflamatoria que se espera a dichas lesiones.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para utilizaciones oftalmológicas. Específicamente, esta composición es un péptido complementario que comprende secuencias complementarias a prolina-glicina-prolina (PGP), en la que dicha composición comprende un polímero RTR. Generalmente, las secuen-

cias complementarias se diseñan basándose en el posible triplete de codificación para la prolina y glicina y en el valor hidropático de los dos aminoácidos. El aumento de la potencia de la secuencia complementaria se consiguió con un procedimiento de polimerización. La molécula resultante puede dividirse en 4 subunidades específicas, conectadas por enlaces amida con diferentes funciones: 1) subunidad de reconocimiento, 2) subunidad de polimerización del núcleo, 3) subunidad espaciadora y 4) subunidad R N-terminal.

Subunidad de reconocimiento: la secuencia complementaria a Pro-Gly-Pro, esta subunidad es responsable de la interacción con el cebo químico. Está presente en una sola unidad en el monómero, se repite dos veces en el dímero, 4 veces en el tetramero y 8 veces en el octámero. La subunidad de reconocimiento está definida por la secuencia Todo-L Arg-Thr-Arg y por la secuencia Todo-L Xxx-Thr-Arg (Xxx = los 20 aminoácidos naturales), y por D completa Arg-Thr-Arg y D completa Xxx-Thr-Arg (Xxx = los 20 aminoácidos naturales).

La subunidad de polimerización del núcleo, ausente en los monómeros lineales, se caracteriza por un diaminoácido con ramificación (lisina, ácido diaminopropiónico, ácido diaminobutírico) conectada a una sola alanina, en la que ambos grupos amino están implicados en un enlace amida. La función del núcleo consiste en determinar el número de unidades de reconocimiento en la molécula y en controlar la distribución espacial relativa de las subunidades de reconocimiento. El núcleo representa también el punto de conexión a la resina durante la síntesis de péptidos en fase sólida. El núcleo octamérico está definido por la fórmula Todo-L (((B)₂B)₂)B-Ala, el tetramero por la Todo-L (B)₂B-Ala y el dímero por la Todo-L B-Ala (donde B = lisina, ácido diamino propiónico y ácido diamino butírico). El núcleo se obtuvo también con los aminoácidos Todo-D con las mismas fórmulas genéricas.

Los espaciadores representan el punto de conexión entre el núcleo y las subunidades de reconocimiento y determina la distribución espacial relativa de las subunidades de reconocimiento. Puede estar constituido por una di-glicina. La di-glicina puede sustituirse por un único aminoácido de fórmula: NH₂[CH₂]_n-COOH [n=2[ácido 3-aminopropiónico]; 3; 4; 5; 6; o 7[ácido 8-aminocaprílico]].

Subunidad R-terminal: Un grupo terminal amino libre en cada subunidad de reconocimiento no es necesario para la función de la subunidad. Este grupo puede estar funcionalizado por una molécula R para modificar las propiedades farmacodinámicas de la molécula y para producir una molécula más forzada. El R puede ser H₃C-(CH₂)_n-CO con n=0 (acetil), n=4 (caproil) y n=14 (palmitoleil). R puede ser también el aminoácido cisteína. En el caso del péptido tetramero los grupos azufre pueden utilizarse para la formación de un puente disulfuro intramolecular, que genera una molécula bicíclica forzada.

En otra forma de realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para utilizaciones oftalmológicas que comprende un péptido complementario que tiene una secuencia complementaria a la prolina-glicina-prolina (PGP), en la que dicho péptido comprende RTR, para inhibir la polarización de leucocitos polimorfonucleares, la quimiotaxia y la infiltración en el tejido activada por un cebo químico neutrófilo.

Se proporciona también la utilización de un péptido complementario con una secuencia complementaria a la prolina-glicina-prolina (PGP), en la que dicho péptido comprende RTR, para la preparación de un medicamento destinado a inhibir la polimerización por leucocitos polimorfonucleares, la quimiotaxia y la infiltración en el tejido activada por un cebo químico neutrófilo. Los cebos químicos neutrófilos representativos incluyen N-acetil-PGP, N-acetil-PGX, N-metil-PGX, N-metil-PGP y pequeños cebos químicos peptídicos que contienen prolina y glicina. Incluso preferentemente, la composición farmacéutica se administra en un intervalo de concentración desde aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM, dependiendo del péptido.

Incluso en otra forma de realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica reivindicada para tratar una enfermedad ocular.

Se proporciona también la utilización de un péptido complementario que tiene una secuencia complementaria a la prolina-glicina-prolina (PGP), en la que dicho péptido comprende un polímero RTR, para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad ocular. Preferentemente, la composición farmacéutica se administra a un intervalo de concentración desde aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM, dependiendo del péptido. Incluso preferentemente, la enfermedad ocular puede ser el ojo lesionado por álcali, el ojo lesionado químicamente o la enfermedad inflamatoria de los ojos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polímero" se referirá a un dímero, tetramero u octámero.

Los ejemplos siguientes se dan a título ilustrativo de varias realizaciones de la invención y no significa que limiten la presente invención en modo alguno:

Ejemplo 1

Materiales

Se adquirió solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) en Gibco Laboratories (Chagrin Falls, OHJ). El cloruro de calcio, cloruro magnésico, cloruro sódico, fosfato sódico monobásico y fosfato sódico dibásico, el glutaraldehído y Ficoll (tipo 400) se adquirieron en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Hypaque-76 se adquirió en Winthrop

Laboratories (Nueva York, NY). El leucotrieno B₄ (LTB₄) se adquirió en Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA). Los aminoácidos y resinas utilizados en la síntesis de proteína fueron de Perseptive Biosystem (Frammingham, MA). N,N-dimetilformamida, cloruro de metileno y otros disolventes utilizados en la síntesis fueron de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ).

Ejemplo 2

Diseño del péptido complementario

Se diseñaron secuencias complementarias a PGP basándose en el posible triplete de codificación para la prolina y la glicina y en el valor hidropático de éstos dos aminoácidos. La glicina es un aminoácido ligeramente hidrófilo y normalmente complementado por serina o treonina. Las características hidropáticas de la prolina no están bien definidas. En la escala de Kyte y Doolittle¹¹, la prolina se considera un aminoácido ligeramente hidrófilo, sin embargo la característica estructural de la cadena lateral de la prolina debería comunicar un carácter más hidrófobo. Esto se refleja en la escala de Akamatsu y Fujita¹², en la que el valor hidrófobo está próximo a otros aminoácidos hidrófobos, exactamente entre la alanina y la metionina.

Se sintetizaron dos péptidos complementarios diferentes, reflectantes de estos dos posibles características hidropáticas de prolina. Una prolina ligeramente hidrófila está complementada mejor por la alanina, por eso se seleccionó la secuencia ASA. Una prolina hidrófoba está mejor complementada genéticamente por arginina y se seleccionó RTR. Para aumentar la afinidad potencial para N-acetil-PGP, se sintetizaron péptidos complementarios en formas poliméricas, partiendo de un núcleo de polilisina, y se espaciaron del núcleo con dos glicinas. Se sintetizaron también las secuencias RTR y RTRGG lineales individuales para verificar la especificidad de la secuencia RTR en los péptidos poliméricos (Figura 1).

Ejemplo 3

Síntesis y aislamiento de péptidos

Se sintetizaron péptidos complementarios utilizando síntesis de péptidos en fase sólida según la metodología Fmoc en un sintetizador de péptidos 9050 de Perseptive Biosystem. Se sintetizaron péptidos lineales utilizando una resina de poliestireno injertada con amida-polietilenglicol (PEG-PS) y aminoácidos preactivados con éster *O*-pentafluorofenílico. Se sintetizaron péptidos ramificados partiendo de una resina Fmoc-alanina-PEG-PS, con uno o dos ciclos de acoplamiento activados con HATU/DIPEA. El reactivo de desprotección de Fmoc fue DBU al 1%, piperidina al 1% en dimetilformamida. Los péptidos se escindieron de las resinas añadiendo 10 ml de ácido trifluoroacético (TFA)/fenol/tioanisol/H₂O/etanditiol 93/2/2/2/1 y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 horas. Las mezclas se filtraron y los péptidos precipitaron en éter etílico frío. Los precipitados se recogieron y se disolvieron en H₂O para liofilización. Todos los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC), utilizando una Dynamax RP C18 (300×10 mm d.i.) y equilibrada a 3 ml/min. utilizando un gradiente lineal de CH₃CN de 5% a CH₃CN al 60% en TFA al 0,1% en 40 minutos. Las fracciones que contienen el péptido se acidificaron con HCl 1 N para ayudar a la eliminación de TFA y se liofilizaron. Se confirmó la identidad del péptido por espectroscopía de masas de ionización con desorción por láser asistida por la matriz de tiempo de vuelo. Se confirmó la pureza por RP-HPLC analítica.

Para la síntesis a gran escala de N-acetil-PGP, se utilizó un procedimiento alternativo para aumentar el rendimiento del producto. En este procedimiento, se acopló el dipéptido *t*-Boc-PG a la resina Pro-Merrifield utilizando el procedimiento con diciclohexilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Tras la eliminación de la protección del N-terminal y la acetilación utilizando anhídrido acético, el péptido se separó de la resina utilizando ácido fluorhídrico anhidro. Se purificó el producto en una columna con gel de sílice utilizando cloroformo: metanol (90:10 v/v) como eluyente. La homogeneidad se confirmó por RP-HPLC en una columna analítica Vydac C18 equilibrada a un caudal de 1,2 ml/min. y eluida con un gradiente lineal de 0% a 30% de acetonitrilo en agua (ácido trifluoroacético al 0,1%) en 30 minutos. Se confirmó la identidad del péptido por espectrometría de masas por electroatomización (Perkin-Elmer-Sciex API-3). Se realizó análisis cuantitativo de aminoácidos para presentar la relación correcta de los aminoácidos y para determinar el contenido en péptido para el cálculo de la concentración final.

Ejemplo 4

Preparación de soluciones

Se disolvió LTB₄ en etanol y se diluyó con HBSS (pH 7,3) hasta una concentración final de etanol de 0,001%. Los péptidos complementarios sintéticos y los cebos químicos sintéticos se disolvieron en HBSS (pH 7,3). Cuando fue necesario, se ajustó la osmolalidad entre 280 y 320 mOsm añadiendo una pequeña cantidad de agua destilada.

Ejemplo 5

Ultrafiltrado de córneas de conejo degradadas con álcali

5 Se obtuvieron cebos químicos tripeptídicos ultrafiltrados de córneas de conejo degradadas con álcali. Se extirparon los fondos de la córnea de los ojos de conejo (Pel-Freez Biologicals, Rogers, AR) utilizando un trépano de 11 mm. Basándose en un peso medio en seco de 1 1 mg/córnea en un experimento preliminar, se colocaron las córneas en una cantidad conocida de NaOH 1,0 N (83,34 mg de peso en seco de córnea/ml de álcali, 1:12) durante 24 horas a 37°C. La suspensión resultante se valoró a pH 7,4 con HCl 1,0 N. Esto proporcionó un extracto en bruto que contenía 41,67 mg
10 de peso en seco de córnea/ml de álcali neutralizado. En resumen, la técnica de purificación implicaba la ultrafiltración (membranas con corte a peso molecular 30.000, 3.000 y 1.000 en la secuencia) y diálisis (membrana con corte a 100 P_m) de este extracto en bruto⁴. El ultrafiltrado final se liofilizó y se disolvió el polvo en HBSS hasta una concentración final de 83,34 mg de peso en seco de córnea/ml. Esta concentración estaba basada en los mg originales de peso en seco de córnea expuestos al álcali.

15 Según un estudio anterior⁴, la muestra cebo químico ultrafiltrada se componía de pequeños péptidos entre 100 y 1.000 de P_m. Los únicos cebos químicos en este ultrafiltrado fueron N-acetil-PGP y N-metil-PGP. Se observó que la actividad específica de N-acetil-PGP era superior.

Ejemplo 6

Aislamiento de neutrófilos

25 Estos experimentos siguieron los principios de la declaración de Helsinki y fueron aprobados por el comité de investigación humano en el Brookwood Medical Center. Todos los donantes firmaron formas de consentimiento por escrito que explicaban la naturaleza y posibles consecuencias del estudio. Se recogió sangre de un donante solamente cada día.

30 Siguiendo la técnica de Ferrante y Thong¹³, se aislaron leucocitos polimorfonucleares de la sangre completa humana heparinizada reciente por centrifugación en Hypaque-Ficoll (densidad=1,114) según el procedimiento descrito¹⁴. Se volvieron a poner en suspensión los leucocitos polimorfonucleares aislados (viabilidad del 96 al 99%) en HBSS con tampón fosfato 15 mM a temperatura ambiente y se agitaron suavemente con un agitador. La pureza de esta suspensión celular fue $\geq 85\%$ de leucocitos polimorfonucleares, $\leq 5\%$ de células mononucleares y plaquetas, consistiendo el
35 porcentaje restante en glóbulos rojos. Se utilizaron leucocitos polimorfonucleares purificados en el ensayo de polarización. Todas las mezclas de incubación se mantuvieron entre una osmolalidad de 280 a 320, un intervalo de pH de 7,2 a 7,6, tampón fosfato 15 mM y Ca²⁺ 50 μ M y Mg²⁺ 50 μ M.

Ejemplo 7

Ensayo de polarización

45 Los estudios anteriores utilizando ensayo quimiotáctico visual con gel de colágeno⁴ han demostrado que N-acetil-PGP es un cebo químico de leucocitos polimorfonucleares. Para que se produzca el movimiento quimiotáctico la célula debe tener una morfología polarizada, por consiguiente, la polarización es una necesidad para la quimiotaxia. Cuando un inhibidor evita la polarización, la quimiotaxia se inhibe necesariamente. Para este experimento, se eligió por consiguiente basarse directamente en los resultados de la polarización.

50 El ensayo de polarización¹⁵ se realizó a ciegas. Este ensayo se utilizó para determinar la respuesta del leucocito polimorfonuclear a los cebos químicos e inhibidores midiendo la frecuencia y el grado de cambio de la forma celular. En resumen, se mezclaron 2×10^5 leucocitos polimorfonucleares con péptidos complementarios sintéticos preincubados y cebos químicos en una cámara de reacción (volumen total = 100 μ l) a 37°C durante 5 min. Al final de periodo de incubación se recogió una alícuota y se mezcló con un volumen igual de glutaraldehído al 4% para observación
55 al microscopio. El volumen restante de cada suspensión celular se centrifugó inmediatamente a $15.000 \times g$ durante 5 segundos para separar las células. En el sobrenadante resultante se analizó la actividad de la láctico deshidrogenasa¹⁶. Todas las incubaciones generaron actividad de lactato deshidrogenasa que se correlaciona con $<5\%$ de muerte celular. Los leucocitos polimorfonucleares en cada muestra se observaron al microscopio y se les asignó puntuaciones de 0 (en reposo = célula esférica con una membrana lisa), 1 (activado = célula irregular con membranas desiguales) o 2 (polarizado = longitud de la célula $\geq$ anchura $\times 2$). Las puntuaciones de 100 leucocitos polimorfonucleares para cada muestra se añadieron para producir un índice de polarización. Se realizó una respuesta a la dosis para cada cebo químico. Se seleccionó una concentración de cada cebo químico de la fracción lineal de cada curva de respuesta a la dosis y se utilizó como referencia positiva. Las muestras de referencia negativa consistían en leucocitos polimorfonucleares en HBSS solamente. La inhibición (ID₅₀) se expresó como concentración en péptido requerida para producir una reducción del
65 50% en la respuesta de la polarización de leucocitos polimorfonucleares al cebo químico. Se utilizó la prueba de la *t* de Student (para datos independientes) para analizar las diferencias en la respuesta media de la polarización entre los leucocitos polimorfonucleares activados con el cebo químico en ausencia o presencia de péptidos complementarios.

Ejemplo 8

Inhibición por el tetrámero D-RTR de la polarización PMN producida por N-acetil-PGP o N-metil-PGP

Se ha demostrado que el péptido complementario RTR inhibe la polarización de los leucocitos polimorfonucleares activados por N-acetil-PGP. La secuencia complementaria, RTR, se diseñó para interactuar de manera específica hidropáticamente con una secuencia PGP en N-acetil-PGP y, por consiguiente, debería también interactuar con la misma secuencia en N-metil-PGP. El péptido tetrámero D-RTR se diseñó para inhibir la polarización de leucocitos polimorfonucleares inducida por N-acetil-PGP o N-metil-PGP, pero tienen una estabilidad mayor *in vivo* resistiendo la degradación proteolítica.

Un estudio preliminar demostró que el tetrámero D-RTR inhibía (media $\pm$ SD) la polarización de leucocitos polimorfonucleares provocada por N-acetil-PGP 800 μ M de la manera siguiente: tetrámero D-RTR 100 nM = 37% $\pm$ inhibición del 35% (n=7), tetrámero D-RTR 1 μ M = 65% $\pm$ inhibición del 26% (n=6) y tetrámero D-RTR 10 μ M = 92% $\pm$ inhibición del 6% (n=6). El tetrámero D-RTR inhibió la polarización de leucocitos polimorfonucleares producida por N-metil-PGP 1 mM de la manera siguiente: tetrámero D-RTR 1-10 μ M = 14% $\pm$ inhibición del 10% (n=5), tetrámero D-RTR 40-100 μ M = 45% $\pm$ 7% de inhibición (n=2) y tetrámero D-RTR de 200-800 μ M = 100% de inhibición (n=5).

Ejemplo 9

Resultados

Los cuatro péptidos complementarios (antisentido) que contienen la secuencia RTR, presentaron inhibición sustancial de polarización de leucocitos polimorfonucleares activados con N-acetil-PGP (Tabla 1). El péptido tetrámero RTR fue un potente inhibidor de N-acetil-PGP (ID₅₀ de 200 nM). El dímero RTR fue mucho menos potente (ID₅₀ de 105 μ M). Ambos monómeros, RTR (ID₅₀ de 2,5 mM) y RTRGG (ID₅₀ de 2,1 mM), fueron solamente concentraciones antagonistas y milimolares. La preincubación del péptido tetrámero RTR con N-acetil-PGP o los neutrófilos durante 5 min. no cambió los resultados descritos anteriormente. Un péptido complementario adicional, el tetrámero ASA, no pudo presentar inhibición alguna de los leucocitos polimorfonucleares activados por N-acetil-PGP.

TABLA I

Inhibición por el péptido complementario de la polarización de PMN activada por N-acetil-PGP		
Péptidos complementarios	Actividad antagonista (ID ₅₀)	Valor p
Tetrámero RTR	200 nM $\pm$ 75 nM	<0,001
Dímero RTR	105 μ M $\pm$ 68 μ M	0,001
Monómero RTR	2,5 mM $\pm$ 1,2 mM	<0,001
Monómero RTRGG	2,1 mM $\pm$ 0,8 mM	<0,001
Tetrámero ASA	Ninguna, $\leq$ 4 mM	----
* Los PMN sin tratar (referencia negativa) produjeron una respuesta a la polarización de 7,8% $\pm$ 4,4% (n = 41). Los PMN activados con N-acetil-PGP 500 μM (referencia positiva) produjeron una respuesta a la polarización de 56,5% $\pm$ 16,4% (n = 41). Esta concentración de cebo químico se seleccionó de entre la fracción lineal de la curva de respuesta a la dosis, proporcionando aproximadamente 50% de polarización después de la sustracción de los valores de la referencia negativa. La actividad antagonista (ID₅₀, media $\pm$ desviación estándar) se interpoló en cinco curvas de respuesta a la dosis para cada péptido complementario.		

ES 2 316 356 T3

El tetramero RTR y ambos péptidos monómeros (RTR y RTRGG) inhibieron también los leucocitos polimorfonucleares activados por cebos químicos tripeptídicos ultrafiltrados; aunque a concentraciones muy superiores (Tabla 2). Ninguno de los péptidos fue antagonista para la activación de LTB_4 de leucocitos polimorfonucleares (Tabla 3). Ninguno de los péptidos complementarios estimuló a los leucocitos polimorfonucleares en reposo (Tabla 4).

TABLA 2

Inhibición por el péptido complementario de la polarización de PMN activada por el ultrafiltrado de córnea de conejo degradado con álcali		
Péptidos complementarios	Actividad antagonista (ID_{50})	Valor p
Tetramero RTR	$30 \mu M \pm 7 \mu M$	$<0,001$
RTR	$7,4 mM \pm 1,6 mM$	$<0,001$
RTRGG	$9,0 mM \pm 2,5 mM$	$<0,001$
* Los leucocitos polimorfonucleares sin tratar (referencia negativa) produjeron una respuesta a la polarización de $6,6\% \pm 1,4\%$ ($n = 10$). Los PMN activados con cebos químicos tripeptídicos ultrafiltrados (25,0 mg de peso en seco de córnea original degradados por ml de álcali) produjeron una respuesta a la polarización de la referencia positiva de $57,6\% \pm 4,4\%$ ($n = 10$). Esta concentración de cebo químico se seleccionó de entre la fracción lineal de la curva de respuesta a la dosis, proporcionando aproximadamente 50% de polarización después de la sustracción de los valores de la referencia negativa. La actividad antagonista (ID_{50}, media $\pm$ desviación estándar) se interpoló en cinco curvas de respuesta a la dosis para cada péptido complementario.		

TABLA 3

Inhibición por el péptido complementario de la polarización de PMN activada por LTB_4	
Péptidos complementarios	Actividad antagonista
Tetramero RTR	Ninguna, $\leq 20 mM$
RTR	Ninguna, $\leq 10 mM$
RTRGG	Ninguna, $\leq 10 mM$
* Los leucocitos polimorfonucleares sin tratar (referencia negativa) produjeron una respuesta a la polarización de $5,3\% \pm 2,1\%$ ($n = 6$). Los PMN activados con 2×10^9 $MLTB_4$ (referencia positiva) produjeron una respuesta a la polarización de $53,4\% \pm 11,3\%$ ($n = 6$). Esta concentración de cebo químico se seleccionó de entre la fracción lineal de la curva de respuesta a la dosis, proporcionando aproximadamente 50% de polarización después de la sustracción de los valores de la referencia negativa. La actividad antagonista (ID_{50}, media $\pm$ desviación estándar) se determinó a partir de las curvas de respuesta a la dosis para cada péptido complementario.	

TABLA 4

Efectos del péptido complementario sobre los PMN en reposo	
Péptidos complementarios	Actividad agonista
Tetrámero RTR	Ninguna, ≤ 8 mM
Dímero RTR	Ninguna, ≤ 8 mM
RTR	Ninguna, ≤ 40 mM
RTRGG	Ninguna, ≤ 40 nM
Tetrámero ASA	Ninguna, ≤ 16 mM
* Los PMN sin tratar (referencia negativa) produjeron una respuesta a la polarización de $8,0\% \pm 3,2\%$ ($n = 8$). La actividad agonística fue determinada a partir de cinco curvas de respuesta a la dosis para cada péptido complementario.	

Ejemplo 10

El péptido complementario tetrámero arginina-treonina-arginina reduce la ulceración de la córnea en el ojo de conejo lesionado con álcali

Materiales

El fosfato sódico monobásico y el fosfato sódico dibásico se adquirieron en Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ). Los disolventes para la síntesis del péptido se adquirieron en Fisher Scientific Products (West Chester, PA), mientras que los reactivos se adquirieron en Perseptive Biosystem (Framingham, MA). Fmoc-d-Arg(Pbf)-OH y Fmoc-d-Thr(tBu)-OH se adquirieron en Chem-Impex (Wood Dale, IL).

Síntesis del péptido

El péptido tetrámero RTR $((H_2N-Arg-Thr-Arg-Gly-Gly)_2-Lys-Ala-CONH_2)$, que contiene las secuencias de RTR levógiros (L), se sintetizó utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida siguiendo la metodología Fmoc en un sintetizador de péptidos 9050 de Perseptive Biosystem. Este péptido tetrámero fue sintetizado a partir de una resina Fmoc-Alanina-PEG-PS, con uno o dos ciclos de acoplamiento con Fmoc-K-Fmoc-OH activado con HATU/DIPEA. Los acoplamientos siguientes se consiguieron utilizando Fmoc aminoácidos activados con HATU/DIPEA. El reactivo de desprotección de Fmoc fue DBU al 1%, piperidina al 1% en dimetilformamida. El péptido se separó de la resina añadiendo 10 ml de ácido trifluoroacético (TFA)/fenol/tioanisol/ H_2O /etanditiol 93/2/2/2/1 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla se filtró y se precipitó el péptido en éter etílico frío. Se recogió el precipitado y se disolvió en H_2O para liofilización. Se purificó el péptido por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC), utilizando un Dynamax RP C18 (d.i. 300×10 mm) y se equilibró a 3 ml/min. utilizando un gradiente lineal de CH_3CN al 5% a CH_3CN al 60% en TFA al 0,1% en 40 minutos. Las fracciones que contenían el péptido se acidificaron con HCl 1 N para ayudar a la eliminación del TFA y se liofilizaron. Se confirmó la identidad del péptido por el tiempo de la espectroscopía de masas de ionización por desorción por láser asistido por la matriz. Se confirmó la pureza por RP-HPLC analítica.

El péptido tetrámero RTR $((H_2N-d-Arg-d-Thr-d-Arg-Gly-Gly)_2-Lys)_2-Ala-CONH_2$, que contiene las secuencias RTR dextrógiras (D) (solamente RTR tenía configuración d, las glicinas y el núcleo de polilisina no eran quirales), se sintetizó en manual partiendo de 3 g de resina Fmoc-Pal-Peg-PS con una sustitución inicial de $0,2 \mu\text{moles/g}$ de resina. Se utilizó DMF como disolvente para las etapas de acoplamiento y las etapas de lavado, mientras que la desprotección de Fmoc se consiguió con DBU al 1%/piperidina al 2% en DMF. Las etapas de control del acoplamiento y de desprotección se realizaron utilizando la prueba de Kaiser. Todos los aminoácidos se acoplaron dos veces durante una hora, utilizando como reactivos de activación, HOAt para el éster O-pentafluorofenílico aminoácido y HATU/DIPEA para los ácidos libres. Se utilizó un exceso de 5 equivalentes de aminoácido sobre la sustitución de la resina por la alanina y la primera lisina, 10 equivalentes para la segunda lisina y 20 equivalentes para los siguientes aminoácidos. Se separó el péptido de las resinas y se purificó como para el péptido (L)-RTR.

ES 2 316 356 T3

Preparación de soluciones

Se disolvieron péptidos sintéticos en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,3). La osmolalidad estaba comprendida entre 280 y 320 mOsm.

Modelo para lesión por álcali

Se mantuvieron los animales y se trataron en cumplimiento total con la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Resolution on the Use of Animals in Research. Se anestesiaron con cetamina HCl (12 mg/kg) y xilazina (7,5 mg/kg) cuarenta y ocho conejos albinos de la cepa Dutch de Nueva Zelanda (Myrtles Rabbitry, Thompson Station, TN, E.U.A) que pesaban entre 2,0 y 2,5 kg. Se colocaron dos gotas de proparacaína tópica (Allergan, Hormigueros, Puerto Rico). Después de la próptosis ocular, el pocillo de plástico de 12 mm se centró en la córnea y se instilaron 0,4 ml de NaOH 1 N en el pocillo y se dejó durante un periodo de 35 s. Se aspiró el álcali y se irrigó el pocillo con 10 ml de solución salina fisiológica. Se aplicó pomada de eritromicina (0,5%) dos veces al día y el técnico de Fraunfelder administró las medicaciones del estudio. Se realizaron exámenes dobles a ciegas (lámpara translúcida y microscopia de disección) el martes, miércoles y viernes con fotografías el miércoles. Se hizo evaluación de la presencia y del tamaño de los defectos epiteliales, ulceración córnea, perforación y vascularización. Se subdividieron los animales al azar en dos grupos de 16 ojos cada uno: 1) referencia de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y 2) tetrámero (D)-RTR 800 μ M en PBS o tetrámero (L)-RTR 1,5 mM en PBS alternando cada hora. Cada animal recibió una gota de la medicación apropiada cada hora durante 14 horas al día durante 33 días y disminuyendo se discontinuó hasta el final del experimento el día 42.

Los resultados clínicos el día 33 presentaban una reducción estadísticamente significativa en la frecuencia de la ulceración corneal en el grupo del tetrámero RTR en comparación con el grupo de PBS. Habían 9 úlceras en el grupo de PBS y 4 úlceras en el grupo de RTR ($p=0,0360$).

Los días restantes a partir del día 33 al 42 transcurrieron sin ningún goteo tópico adicional en ningún grupo de animales. A pesar del cese de todas las gotas el día 33 el efecto favorable del inhibidor de RTR ($p = 0,0046$) persistió al final del experimento. Los resultados clínicos el día 42 se detallan en la tabla.

TABLA 5

	Tetrámero RTR	PBS	Estadística (chi al cuadrado)
NÚMERO DE OJOS	16	16	
PROFUNDIDAD DE LA ÚLCERA			
Sin úlcera	9	2	
Anterior	4	6	
Medio	0	3	
Posterior	2	4	
Descemetocel	1	1	
Perforación	0	0	
ÚLCERAS TOTALES			
Durante expt.	7 (43,8%)	14 (87,5%)	$p=0,0046$, muy significativa (RTR vs PBS)
Fin del expt. (día 42)	6 (37,5%)	12 (75%)	$p=0,0163$, significativa (RTR vs PBS)

Exposición

La lesión por álcali a los ojos degrada muchas proteínas en todas las capas de la córnea por hidrólisis de los enlaces peptídicos y destrucción de determinados aminoácidos¹⁷. Esta degradación de las proteínas de la córnea celulares y extracelulares libera directamente dos cebos químicos tripeptídicos neutrófilos⁵. Los experimentos *in vitro* ulteriores identificaron estos cebos químicos como N-acetil-PGP y N-metil-PGP y confirmaron sus propiedades quimiotácticas⁴. El tripeptido acetilado fue el más activo. La inyección intraestromica del N-acetil-PGP sintético o de los cebos químicos tripeptídicos ultrafiltrados en la córnea normal demostró la invasión neutrófila pesada en el punto de inyección⁶. Considerados en conjunto estos descubrimientos establecieron la función de este cebo químico tripeptídico en el desencadenamiento de la respuesta neutrófila precoz en el ojo lesionado por álcali, confirmando su importancia como mediador inflamatorio.

Utilizando la teoría de reconocimiento molecular, se diseñaron y se sintetizaron péptidos complementarios de RTR que se descubrió que eran inhibidores de N-acetil-PGP. La capacidad de estos péptidos complementarios para inhibir la fosforilación del leucocito polimorfonuclear variaba con el cebo químico. El péptido complementario más potente, el tetramero RTR, presentó potencia inhibidora mayor para el N-acetil-PGP sintético en comparación con los cebos químicos tripeptídicos ultrafiltrados. Este puede ser el resultado de la interacción no específica con el grupo heterogéneo de pequeños péptidos (100-1.000 P_m) que se sabe que está presente en esta última muestra. El hecho adicional de que estos péptidos complementarios no inhibían la polarización activada por LTB₄ demuestra que no están actuando directamente sobre el neutrófilo de manera inespecífica. La ausencia de inhibición de LTB₄ y la escasez de liberación de LDH extracelular de todas las incubaciones confirma que los péptidos complementarios de RTR no eran tóxicos para los neutrófilos. Por último, estos resultados indican también que N-acetil-PGP se une a un receptor neutrófilo diferente de LTB₄.

La teoría de reconocimiento molecular (o los péptidos complementarios) propone que el modelo de hidropatía de aminoácidos es un determinante bruto de la forma y la función rudimentaria de este péptido o proteína.⁷ Por consiguiente, invirtiendo este patrón hidropático debería producirse un péptido con una forma complementaria, ya que las mismas fuerzas directoras están implicadas, pero en orientación inversa. Por consiguiente, se proporciona la denominación de péptidos complementarios. Se ha demostrado que dichos péptidos complementarios interactúan específicamente con sus dianas con afinidad moderada¹⁸. Una manera de conseguir esta inversión de hidropatía se refiere a una característica interesante del código genético. Es decir, ya que A y U son complementarias, y cuando en la base media del codón se especifica respectivamente hidrófilo e hidrófobo, entonces la cadena no codificadora del ADN (o ARNm), codificará un péptido que es complementario con el péptido codificado por la cadena de codificación. Aparte de ser un procedimiento útil para diseñar péptidos complementarios, esto sugiere un mecanismo para la evolución de pares de ligando interactuantes. Sin embargo, el utilizar el procedimiento del diseño basado en el ADN no siempre produce el modelo óptimo de complementariedad hidropática. Por esta razón ha demostrado también ser útil el diseñar péptidos complementarios basados en el modelo hidropático del péptido diana utilizando programas informáticos¹⁹.

El concepto de péptidos complementarios basados en modelos hidropáticos se probó en primer lugar con la hormona peptídica corticotropina (ACTH). Se sintetizó un péptido complementario HTCA, que corresponde a la cadena no codificadora de ARNm de ACTH y demostró su capacidad para unirse a ACTH. En el ensayo de fijación en fase sólida, se observó que ACTH se une específicamente a este péptido complementario, HTCA, con afinidad nanomolar²⁰. Además, se observó fijación equivalente con péptidos HTCA basados en una lectura transcrita o complementaria del ARN complementario con ACTH²¹. La observación de que estos péptidos tenían diferentes secuencias de aminoácidos pero la misma matriz lineal de hidropatía sugirió que esta última propiedad era responsable de la interacción. El apoyo adicional para la idea que la hidropatía invertida es la fuerza conductora para las córneas de interacción a partir de la observación de que los péptidos complementarios interactúan cuando proceden de la inversión informatizada o la inversión dirigida a la secuencia nucleotídica²².

Los péptidos complementarios procedentes de la teoría del reconocimiento molecular se han utilizado en una amplia variedad de sistemas como antagonistas²³⁻²⁶. La presente invención describió el diseño de péptidos complementarios que se unen específicamente y alteran la actividad del ligando quimiotáctico, N-acetil-PGP. Dado que las características hidropáticas de la prolina no están muy bien definidas, se diseñaron dos péptidos complementarios con el N-acetil-PGP. Un péptido, ASA, se basó en la escala Kyte y Doolittle¹¹ y el otro péptido, RTR, se basó en la escala de Akamatsu y Fujita¹². Este último está basado en los coeficientes de partición de los di- y tri-péptidos haciéndolo más apropiado para el diseño de un péptido complementario a dicha pequeña diana. Se sintetizaron también los péptidos complementarios y se probaron como tetrameros, un método común utilizado para mejorar la actividad de fijación para la diana^{27,28}. La polimerización aumenta la estequiometría de la reacción, secuestrando un número mayor de moléculas de cebos químicos, reduciendo por consiguiente la dosis del péptido complementario necesario para bloquear el N-acetil-PGP.

Las propiedades inhibitoras de los péptidos complementarios RTR se declaran en la interacción molecular de la secuencia RTR con N-acetil-PGP. Este hecho se hace evidente comparando los valores de ID₅₀ de cada péptido complementario frente a N-acetil-PGP. Las propiedades inhibitoras de ambos péptidos monómeros, RTR y RTRGG (ID₅₀ = 2 mM), eran 20 veces menores que las del dímero RTR que eran 500 veces menores que las del tetramero RTR. El péptido complementario ASA (con un núcleo de polilisina y un espaciador de diglicina idéntico al tetramero RTR) sirve como referencia para el núcleo del tetramero y como referencia para la secuencia de RTR. La ausencia de

actividad inhibidora del tetrámero ASA demuestra que el núcleo de polilisina y otra secuencia tripeptídica hidropática no es activa. Estos resultados demuestran que el péptido RTR es específico para R-acetil-PGP, dado que la secuencia ASA no puede bloquear la activación de N-acetil-PGP de la polarización del leucocito polimorfonuclear.

5 La afinidad del péptido tetrámero RTR para N-acetil-PGP fue 10.000 veces mayor que para el monómero RTR. Es posible que la gran distribución de la carga en el péptido polímero, resultante de las cadenas laterales de arginina, reduzca el número de configuraciones de RTR en el tetrámero en comparación con el monómero RTR. La presencia de configuradores de la unión favorable en este número limitado de configuraciones aumentaría la afinidad de unión con el cebo químico. Alternativamente, o además, la asociación íntima de las ramificaciones de RTR en el tetrámero
10 podría limitar los parámetros de difusión de N-acetil-PGP, manteniendo el cebo químico en asociación más íntima con el tetrámero y cambiando la cinética de la interacción. Estos descubrimientos son coherentes con el efecto creciente a medida que la estructura polimérica aumenta el número de secuencias de RTR.

15 Los péptidos compuestos por L-aminoácidos son degradados rápidamente por enzimas en el cuerpo, especialmente en los tejidos inflamados. Se ha demostrado que la forma D de los péptidos complementarios conserva la actividad biológica de la forma L^{18,19,29}, todavía es más resistente a las proteasas y por consiguiente más estable *in vivo*. Por esta razón el tetrámero RTR, las formas D de todos los aminoácidos, puede ser un agente terapéutico alternativo.

20 Las implicaciones de los procedimientos de la presente invención para el tratamiento de pacientes con lesión por álcali del ojo pueden ser sustanciales. Si un inhibidor de quimiotaxia de leucocito polimorfonuclear se administra inmediatamente después de una lesión, el estímulo de la invasión de leucocito polimorfonuclear en la córnea puede ser suprimido. Los neutrófilos constituyen uno de los peligros más graves para la integridad de la córnea al iniciar y perpetuar la ulceración y producir la perforación del ojo. Si la N-acetil-PGP puede suprimir o disminuir la regeneración inicial de los leucocitos polimorfonucleares, entonces otros mediadores, que se liberan de los leucocitos polimorfonucleares, no tendrían oportunidad para aumentar esta respuesta neutrófila. El resultado final es la conservación del estroma de la córnea, manteniendo la integridad del glóbulo y proporcionando un sustrato adecuado durante el cual el recrecimiento epitelial está estimulado.

30 El descubrimiento del cebo químico generado por el álcali ha conducido a una comprensión más completa de la quimiotaxia en las lesiones por álcali y podría también dar lugar a un tratamiento útil en otras enfermedades oculares y en la inflamación en otros tejidos del cuerpo. Por ejemplo, cuando el tejido blanco es lesionado por el álcali en cualquier lugar en el cuerpo supuestamente se genera el mismo cebo químico que podría participar en el desencadenamiento del ciclo inflamatorio iniciado por el álcali en estos tejidos. Un ejemplo de esto se observó con una variedad de componentes de la sangre humana que provocó una respuesta de la polarización de leucocito polimorfonuclear tras la exposición al álcali. Es concebible que este género de inhibidores podría actuar para truncar la respuesta inflamatoria de leucocito polimorfonuclear en otras enfermedades no traumáticas no relacionadas donde el cebo químico es el mismo o suficientemente similar.

40 La utilización de esta nueva metodología acorta sustancialmente el transcurso del tiempo durante el desarrollo de los compuestos principales; reduciendo el método iterativo tanto en las técnicas de modelado molecular tradicionales como informáticas. Esta tecnología complementaria puede apoyar una clave para el tratamiento de otras enfermedades donde los mediadores son conocidos o pueden identificarse. Las implicaciones prácticas de esta investigación son muy enriquecedoras, incluyendo el desarrollo de compuestos de gran potencia que podrían ser beneficiosos para los ojos lesionados por álcali u otros tipos de enfermedades.

45 Los experimentos *in vitro* han demostrado de manera concluyente que el tetrámero RTR (D) y (L) fue muy inhibidor para los cebos químicos neutrófilos liberados en las etapas iniciales en el ojo lesionado por álcali. Cuando se aplicó este tetrámero al ojo de conejo lesionado por álcali se identificó una disminución estadísticamente significativa en la ulceración córnea en comparación con el grupo de referencia. La afinidad del tetrámero RTR por los cebos químicos que aparece después de la lesión por álcali frustra sus propiedades quimiotácticas del leucocito polimorfonuclear inmediatamente y de este modo reduce la ulceración a corto y largo plazo. La prueba de esta última afirmación se encuentra en el efecto protector continuado del pasado día 33 cuando toda la medicación ha sido interrumpida.

55 N-acetil-PGP y N-metil-PGP son los cebos químicos neutrófilos primarios liberados en el estroma por la hidrólisis directa de las proteínas de la córnea inmediatamente después de una lesión por álcali. Estos cebos químicos se cree que desencadenan la infiltración pesada ulterior de los neutrófilos lo que conduce a la ulceración de la córnea. Es probable que la unión complementaria del tetrámero RTR a N-acetil-PGP y a N-metil-PGP, apenas después de la lesión, inactiven estos cebos químicos en la córnea, reduciendo la invasión precoz y a continuación neutrofílica ulterior. La exclusión de los leucocitos polimorfonucleares protege el tejido de la córnea lesionado de las enzimas degradadoras y de los radicales libres de oxígeno contenidos en estas células inflamatorias. Estas consideraciones explican el efecto terapéutico persistente del tratamiento con RTR y sugieren que el tratamiento precoz del ojo lesionado con álcali, durante un intervalo más breve, pueda proporcionar un resultado similar.

65 Este experimento demuestra que el tetrámero RTR (D) y (L), utilizado alternativamente en el mismo ojo, reduce significativamente la incidencia de las úlceras de córnea que se producen después de la lesión por álcali. El potencial de degradación enzimática de los péptidos en las diferentes etapas de cicatrización en la córnea lesionada por álcali es desconocido. Una escasez de células corneales en los primeros días después de la lesión sería coherente con la baja actividad enzimática en este periodo de tiempo. Otros estudios describen que los péptidos complementarios (D)

presentan actividad biológica similar a los péptidos (L) y que los péptidos (D) son estables *in vivo*^{18,19,29}. Las enzimas de la córnea pueden ser capaces de degradar el tetrámero RTR (L). La razón de administrar ambos tetrámeros en horas alternativas en el mismo ojo fue de evitar la degradación enzimática de una parte del tetrámero, manteniendo superior la concentración del tetrámero RTR total.

En la presente memoria se citaron las referencias siguientes:

1. **Brown**, *et al.*, *Otolaryngol.* 1970; 74: 375-383.
2. **Kenyon**, *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1979; 18:570-587.
3. **Foster**, *et al.*, *Arch Ophthalmol.* 1982; 100:1820-1824.
4. **Pfister**, *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36:1306-1316.
5. **Pfister**, *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37:230-237.
6. **Pfister**, *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39:
7. **Blalock**, *Nature Medicine.* 1995; 1:876-878.
8. **Blalock**, *et al.*, *Bio. Biophys Res Commun* 1984; 121: 203-207.
9. **Blalock**, *et al.*, *Trends Biotechnol* 1990; 8:140-144.
10. **Clarke**, *et al.*, In: Antisense Nucleic Acids and Proteins: Fundamentals and Applications. vandrol Krol AV and Mol JNM (eds): *Dekker*, New York: 169-186 (1991).
11. **Kyte**, *et al.*, *J Mol Biol* 1982; 157:105-132.
12. **Akamatsu**, *et al.*, *Journal of Pharm. Science* 1992; 2:164-174.
13. **Ferrante**, *et al.*, *J Immunol Methods* 1978; 24:389.
14. **Pfister**, *et al.*, *Cornea.* 1984/1985; 3:183-188.
15. **Haston**, *et al.*, *J Immunol Methods.* 1985; 81:229-237.
16. **Decker**, In Worthington Enzyme Manual. Freehold, NJ, *Worthington Biochemical Corp.*, 1977, p19-22.
17. **Berry**, *et al.*, *Cornea* 1989; 8:150-154.
18. **Fassina**, *et al.*, *Arch Biochem Biophys* 1992; 296: 137-143.
19. **Fassina**, *et al.*, *Int J Peptide Protein Res* 1992; 39:540-548.
20. **Bost**, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1372-1375.
21. **Blalock**, *et al.*, *Biochem J* 1986; 234:679-683.
22. **Fassina**, *et al.*, *J Biol Chem* 1989; 264:11252-11257.
23. **Budisavlijevic**, *et al.*, *J Hypertension* 1992; 19:345-353.
24. **Gartner**, *et al.*, *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198:649-655.
25. **Gartner**, *et al.*, *Bio. Biophys Res Commun* 1991; 180:1446-1452.
26. **Johnson**, *et al.*, *J Immunol* 1988; 141:2420-2423.
27. **Fassina**, *et al.*, *Int J Peptide Protein Res* 1992; 39:549-556.
28. **Tam**, *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:5409-5413.
29. **Fassina**, *et al.*, *J Biol Chem* 1989; 264:11252-11257.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para utilizaciones oftalmológicas que comprende un péptido complementario que tiene una secuencia complementaria a la prolina-glicina-prolina (PGP), en la que dicha composición comprende un polímero RTR.
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dichas secuencias complementarias se diseñan basándose en el triplete de codificación para la prolina y la glicina y en el valor hidropático de la prolina y la glicina.
- 15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho péptido complementario se selecciona de entre el grupo consistente en RTR, RTRGG, dímero RTR, tetramero RTR, octámero RTR, polímero N-acetil-RTR, polímero RTR del ácido graso de cadena corta y de cadena larga, polímero RTR que utiliza ácido diaminopropiónico para la subunidad del núcleo, polímero RTR que utiliza ácido diaminobutírico para la subunidad del núcleo, polímero RTR que contiene un espaciador que tiene la fórmula $\text{NH}_2[\text{CH}_2]_n\text{-COOH}$ [$n=2$ [ácido 3-aminopropiónico]... 7 [ácido 8-aminocaprílico]], sustituyendo dicho espaciador el espaciador de diglicina, el polímero RTR de cisteína que tiene una estructura bicíclica, en la que dichos péptidos complementarios tienen aminoácidos dextrógiros sustituidos por el levógiro natural.
- 20 4. Una composición farmacéutica para utilizaciones oftalmológicas que comprende un péptido complementario que tiene una secuencia complementaria a la de la prolina-glicina-prolina (PGP) en la que dicha composición comprende RTR, para inhibir la polarización de leucocito polimorfonuclear, quimiotaxia e infiltración en el tejido activada por el cebo químico neutrófilo.
- 25 5. Utilización de un péptido complementario que tiene una secuencia complementaria a la de la prolina-glicina-prolina (PGP) en la que dicho péptido comprende RTR, para la preparación de un medicamento destinado a inhibir la polarización del leucocito polimorfonuclear, la quimiotaxia y la infiltración en el tejido activado por un cebo químico neutrófilo.
- 30 6. La utilización según la reivindicación 5, en la que dicha composición farmacéutica debe ser administrada a una concentración que oscila desde aproximadamente $1\text{ }\mu\text{M}$ a aproximadamente 100 mM, dependiendo del péptido.
- 35 7. La composición farmacéutica o la utilización de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que dicho cebo químico neutrófilo se selecciona del grupo constituido por N-acetil-PGP y N-metil-PGP.
8. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para tratar una enfermedad ocular.
- 40 9. Utilización de un péptido complementario que tiene una secuencia complementaria a la prolina-glicina-prolina (PGP), en la que dicho péptido comprende un polímero RPR, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad ocular.
- 45 10. Utilización según la reivindicación 9, en la que dicha composición farmacéutica debe administrarse en un intervalo de concentración desde aproximadamente $1\text{ }\mu\text{M}$ hasta aproximadamente 100 mM, dependiendo del péptido.
- 50 11. Composición farmacéutica o utilización de la misma según una cualquier a de las reivindicaciones 8 a 10, en la que dicha enfermedad ocular se selecciona del grupo consistente en ojo lesionado por álcali, ojos lesionados por productos químicos y enfermedad inflamatoria de los ojos.
- 55
- 60
- 65

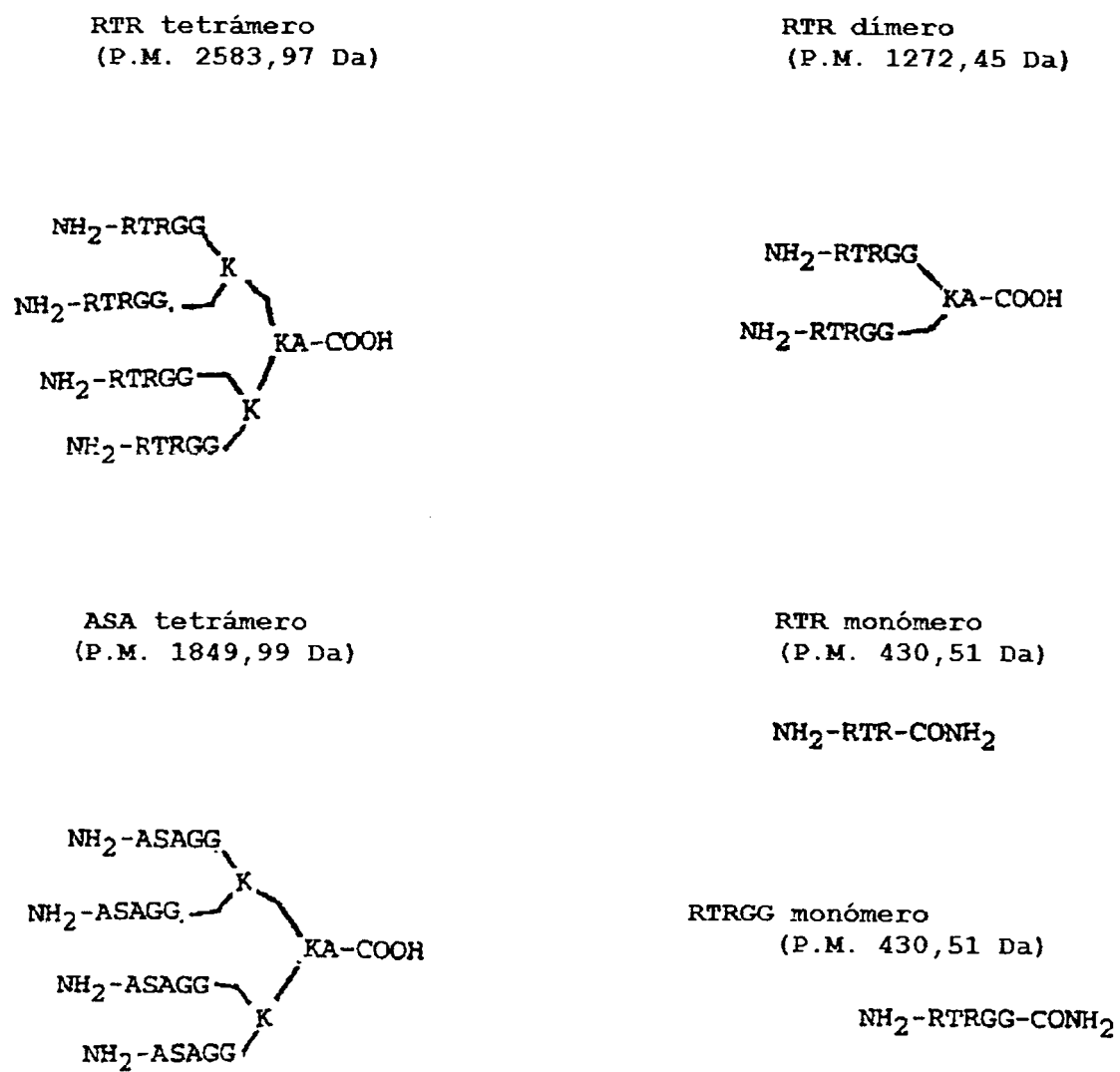


FIG. 1

ES 2 316 356 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Haddox, Jeffrey Lynn Blalock, James Edwin Pfister, Roswell Robert Villain, Matteo
10	<120> Péptidos sintéticos complementarios y sus utilizaciones oftalmológicas
	<130> D6201PCT
	<141> 2000-03-08
15	<150> US 60/123,409 <150> 1999-03-09
20	<160> 4
	<210> 1
	<211> 3
25	<212> PRT
	<213> desconocido
	<220>
30	<223> secuencia de aminoácidos de cebo químico neutrófilo liberado durante la hidrólisis alcalina directa, de proteínas de la córnea; desencadena la invasión de leucocitos polimorfonucleares en la córnea lesionada por álcali
	<400> 1
35	Pro Gly Pro 1
	<210> 2
40	<211> 3
	<212> PRT
	<213> secuencia artificial
45	<220>
	<223> secuencia de aminoácidos del inhibidor peptídico complementario de neutrófilos; utilizada como monómero, dímero y tetramero
50	<400> 2
	Arg Thr Arg 1
55	<210> 3
	<211> 5
	<212> PRT
60	<213> secuencia artificial
	<220>
65	<223> secuencia de aminoácidos de inhibidor peptídico complementario de neutrófilos; utilizada como monómero

ES 2 316 356 T3

<400> 3

Arg Thr Gly Gly
1

5

<210> 4

<211> 3

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia de aminoácidos de inhibidor peptídico complementario de neutrófilos; utilizada como tetramero

<400>

20 Ala Ser Ala
1

25

30

35

40

45

50

55

60

65