

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 026 158**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/06** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2019 PCT/IL2019/050774**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2020 WO20012478**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2019 E 19752749 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2025 EP 3820882**

54 Título: **Compuestos peptídicos y usos terapéuticos de los mismos**

30 Prioridad:

**11.07.2018 IL 26055518**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.06.2025**

73 Titular/es:

**IMMUNITY PHARMA LTD. (100.00%)  
28 Meron Street  
9076424 Mevasseret Zion, IL**

72 Inventor/es:

**OVADIA, ERAN y  
BEN-SHIMON, AVI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 3 026 158 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**

Compuestos peptídicos y usos terapéuticos de los mismos

5 Solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud israelí N.º 260555 presentada el 11 de julio de 2018.

10 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a composiciones y métodos de uso de la misma para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

15 Existe una necesidad insatisfecha de composiciones novedosas que puedan servir para atenuar la respuesta celular e inmunitaria al estrés en el tejido normal, de una manera que es específica, segura y eficaz, reduciendo de este modo la gravedad de las enfermedades degenerativas asociadas al estrés y la inflamación inducida por el estrés.

20 El péptido LPPLPYP (SEQ ID NO: 2, también conocido como Estresina-1 e IPL344) es un péptido corto de 7 aminoácidos que protege a las células de diversos tipos de las presiones pro-apoptóticas y activa el sistema de señalización de Akt. La estructura de IPL344 se asemeja a los sitios de unión de las proteínas adaptadoras. Se ha propuesto que tiene un mecanismo de acción que comprende imitar dichas proteínas y activar procesos de protección celular a través de Akt y posiblemente otras vías.

25 Las publicaciones de solicitud de patente internacional N.º: WO 2006/021954 y WO2012/160563 divulgan el uso del péptido LPPLPYP (SEQ ID NO: 2) para tratar enfermedades tales como la ELA.

Sumario de la invención

30 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un péptido aislado que no tiene más de diez aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 21, en donde el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o del timo inducida por dexametasona en un ratón.

35 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 como agente activo y un portador fisiológicamente aceptable.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el péptido tiene 7 aminoácidos de longitud.

40 De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el péptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el péptido aislado consiste en una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4.

45 De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el péptido es para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria o degenerativa.

50 De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la enfermedad asociada a la apoptosis es una enfermedad inflamatoria o degenerativa.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad autoinmunitaria.

55 De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la enfermedad degenerativa es una enfermedad neurodegenerativa.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la enfermedad asociada a la apoptosis se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinitis pigmentaria, ictus e infarto de miocardio.

60 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o el ensayo de las realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales de ejemplo. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no tienen por

65

objeto ser necesariamente limitantes.

#### Breve descripción de los dibujos

5 En el presente documento se describen algunas realizaciones de la invención, únicamente a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. A continuación, con referencia específica a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que las particularidades mostradas son a modo de ejemplo y con el objetivo de describir ilustrativamente las realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción, junto con los dibujos, hace que sea evidente para los expertos en la materia cómo pueden ponerse en práctica las realizaciones de la invención.

10 En los dibujos:

La FIG. 1 es un gráfico que ilustra el efecto de los péptidos de ejemplo sobre el peso del bazo, el número de células del bazo, el peso del timo y el número de células del timo.

15 Los péptidos utilizados en el cribado fueron los siguientes:

PPLPY - SEQ ID NO: 3  
 LPPLAYP - SEQ ID NO: 4  
 PLPYP - SEQ ID NO: 9  
 20 PPL - SEQ ID NO: 10  
 PLP - SEQ ID NO: 11  
 PYP - SEQ ID NO: 12  
 LPGLPYP - SEQ ID NO: 13  
 LPPLGYP - SEQ ID NO: 14  
 25 LAPLPYP - SEQ ID NO: 15  
 LPALPYP - SEQ ID NO: 16

La FIG. 2 es un gráfico que ilustra el efecto de los péptidos de ejemplo sobre el peso del bazo, el número de células del bazo, el peso del timo y el número de células del timo.

30 Los péptidos utilizados en el cribado fueron los siguientes:

LPPLPYP - SEQ ID NO: 2 (control)  
 PPLAYP - SEQ ID NO: 18  
 LPPLPY - SEQ ID NO: 7  
 35 LPPLAYP - SEQ ID NO: 4  
 PPLPY-NH2 - SEQ ID NO: 19  
 PPLPY - SEQ ID NO: 3

#### Descripción de las realizaciones específicas de la invención

40 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a composiciones y métodos de uso de la misma para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

45 Antes de explicar en detalle al menos una realización de la invención, ha de entenderse que la invención no se limita necesariamente en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es apta para otras realizaciones o puede ponerse en práctica o realizarse de diversas maneras.

Los enlaces peptídicos se encuentran casi exclusivamente en una conformación trans con un ángulo de torsión omega cercano a 180°, mientras que sólo se observa una porción muy limitada en la conformación cis, con un ángulo omega de aproximadamente 0°. La barrera energética entre las configuraciones trans/cis es de aproximadamente 20 [kcal/mol] y el isómero trans se ve favorecido energéticamente en ~2,5 [kcal/mol]. Entre los 20 aminoácidos canónicos, la prolina desempeña una función especial. El enlace peptídico de prolina con el resto de aminoácido anterior (Xaa-Pro, Xaa indica cualquier aminoácido) carece del hidrógeno de amida de manera que este enlace peptídico no puede actuar como donante de enlace de hidrógeno y la barrera energética así como la brecha energética se reducen significativamente a ~13 y ~0,5 [kcal/mol] respectivamente [2], desplazando el equilibrio trans/cis hacia la configuración cis. Los grandes cambios en el ángulo omega asociados al proceso de isomerización trans/cis de la prolina (de 0 a 180) se modulan por interacciones intra e intermoleculares, e influyen drásticamente en la relación de actividad estructural de la cadena polipeptídica. Por lo tanto, la isomerización de la prolina se perfila como un componente crítico en el control de la actividad de muchos procesos biológicos. Esto es especialmente pertinente para los péptidos cortos en los que la configuración cis podría ocupar más del 30 % de la población conformacional, en función del resto anterior.

Se sabe además que el efecto multiconformacional de la prolina se manifiesta en restos prolina ubicados como el segundo resto desde el extremo N del péptido (penúltima prolina). El truncamiento del 1.º resto N-terminal en el péptido que contiene la penúltima prolina por lo general da como resultado un cambio conformacional del péptido. En un conjunto de datos de 58 péptidos se encontró que casi el 80 % de los péptidos mostraban este efecto [Glover, M.S.,

*et al.*, 2014 *J Am Soc Mass Spectrom.* 26(3): pág. 444-5].

El péptido de múltiples prolina LPPLPYP (SEQ ID NO: 2), también conocido como IPL344 y Estresina-1) es un péptido corto de 7 aminoácidos que protege a las células de diversos tipos de las presiones pro-apoptóticas y activa el sistema de señalización de Akt. Es un candidato para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

Teniendo en cuenta la delicada naturaleza conformacional de las prolina, los presentes inventores se propusieron determinar si la configuración de prolina trans domina la funcionalidad de los cuatro restos prolina del péptido LPPLPYP (SEQ ID NO: 2). Los presentes inventores encontraron sorprendentemente que sustituir la penúltima prolina por una alanina dio como resultado un péptido (SEQ ID NO: 4) que redujo significativamente la pérdida de peso del bazo y/o del timo inducida por dexametasona en un ratón (Figura 1). En marcado contraste, sustituir la penúltima prolina por una glicina dio como resultado un péptido que carecía de esta actividad.

Mientras reducían adicionalmente la presente invención a la práctica, los presentes inventores encontraron que eliminar el primer y el último aminoácido de la SEQ ID NO: 2, también dio como resultado un péptido (que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3) que redujo significativamente la pérdida de peso del bazo y/o del timo inducida por dexametasona en un ratón.

Los presentes inventores concluyen que los péptidos cortos basados en las SEQ ID NO: 3 y 4 son prometedores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

Mientras reducían adicionalmente la presente invención a la práctica, los presentes inventores encontraron que un péptido adicional, no reivindicado (SEQ ID NO: 18) que se ajustaba a la fórmula expuesta en la SEQ ID NO: 17 mostró una mejora significativa en la reducción de la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o del timo inducida por dexametasona en ratones (véase la Figura 2).

Los presentes inventores demostraron además que los péptidos de ejemplo que se ajustan a cualquiera de las fórmulas generales divulgadas muestran una mejora significativa en comparación con el péptido base (SEQ ID NO: 2) para reducir la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o del timo inducida por dexametasona en ratones.

El término "péptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero de aminoácidos naturales o sintéticos, que abarcan péptidos nativos (ya sean productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (normalmente, péptidos sintetizados sintéticamente), así como peptoides y semipeptoides que son análogos polipeptídicos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean aún más estables mientras están en el cuerpo o más capaces de penetrar en las células.

La presente invención también abarca derivados (con modificación y/o adición de una función química a la cadena lateral del aminoácido, sin un cambio químico en la cadena principal peptídica) y análogos (con modificación y/o adición de una función química dentro de la cadena principal peptídica, por ejemplo, una modificación del extremo N o del extremo C, una modificación del enlace peptídico, una modificación de aminoácidos no definida como "derivado"), complejos con otras especies tales como un ion metálico (por ejemplo, cobre, cinc, manganeso, magnesio y otros).

Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, la modificación del extremo N, la modificación del extremo C, la modificación del enlace polipeptídico, incluyendo, pero sin limitación, CH<sub>2</sub>-NH, CH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>-S=O, O=C-NH, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de la cadena principal y la modificación de restos. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar compuestos peptidomiméticos y se especifican, por ejemplo, en *Quantitative Drug Design*, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), A continuación en el presente documento se proporcionan detalles adicionales al respecto.

Los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido pueden estar sustituidos, por ejemplo, con enlaces N-metilados (-N(CH<sub>3</sub>)-CO-), enlaces éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), enlaces cetometilénicos (-CO-CH<sub>2</sub>-), enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH<sub>2</sub>-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-), enlaces tioamida (-CS-NH-), dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-), enlaces retro amida (-NH-CO-), derivados polipeptídicos (-N(R)-CH<sub>2</sub>-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", presente de forma natural en el átomo de carbono.

Estas modificaciones pueden producirse en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo.

Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, pueden sustituirse por ácidos no naturales sintéticos tales como el análogo Fenilglicina, TIC, naftilelanina (Nol), derivados metilados en anillo de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr.

La prolina puede reemplazarse por ácidos no naturales sintéticos tales como los derivados N-metil prolina, alfa-metil prolina y el análogo ácido α-aminobutírico.

Otros aminoácidos no naturales se resumen en la Tabla 2, a continuación en el presente documento.

Además de lo expuesto anteriormente, los polipéptidos de la presente invención también pueden incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros no aminoacídicos (es decir, ácidos grasos, hidratos de carbono complejos, etc.).

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones a continuación, se entiende que el término "aminoácido" o "aminoácidos" incluye los 20 aminoácidos de origen natural; aquellos aminoácidos con frecuencia modificados postraduccionalmente *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales incluyendo, pero sin limitación, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye los aminoácidos tanto D como L (estereoisómeros).

En las Tablas 1 y 2 a continuación se enumeran los aminoácidos de origen natural (Tabla 1) y los aminoácidos no convencionales o modificados (Tabla 2) que pueden usarse con la presente invención.

Tabla 1

<i>Aminoácido</i>	<i>Abreviatura de tres letras</i>	<i>Símbolo de una letra</i>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Cualquier aminoácido como los anteriores	Xaa	X

Tabla 2

<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>
ornitina	Orn	hidroxiprolina	Hyp
ácido $\alpha$ -aminobutírico	Abu	aminonorbornil-carboxilato	Norb
D-alanina	Dala	aminociclopropano-carboxilato	Cpro
D-arginina	Darg	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-asparagina	Dasn	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
ácido D-aspártico	Dasp	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D-cisteína	Dcys	N-(tiometil)glicina	Ncys
D-glutamina	Dgln	N-(2-carbametiletil)glicina	Ngln

ES 3 026 158 T3

(continuación)

<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>
ácido D-glutámico	Dglu	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D-histidina	Dhis	N-(imidazolilet)glicina	Nhis
D-isoleucina	Dile	N-(1-metilpropil)glicina	Nilo
D-leucina	Dleu	N-(2-metilpropil)glicina	Nleu
D-lisina	Dlys	N-(4-aminobutil)glicina	Nlys
D-metionina	Dmet	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
D-ornitina	Dom	N-(3-aminopropil)glicina	Nom
D-fenilalanina	Dphe	N-bencilglicina	Nphe
D-prolina	Dpro	N-(hidroximetil)glicina	Nser
D-serina	Dser	N-(1-hidroxietil)glicina	Nthr
D-treonina	Dthr	N-(3-indolilet) glicina	Nhtrp
D-triptófano	Dtrp	N-( <i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Ntyr
D-tirosina	Dtyr	N-(1-metilet)glicina	Nval
D-valina	Dval	N-metilglicina	Nmgly
D-N-metilalanina	Dnmala	L-N-metilalanina	Nmala
D-N-metilarginina	Dnmarg	L-N-metilarginina	Nmarg
D-N-metilasparagina	Dnmasn	L-N-metilasparagina	Nmasn
D-N-metilasparato	Dnmasp	ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
D-N-metilcisteína	Dnmcys	L-N-metilcisteína	Nmcys
D-N-metilglutamina	Dnmglu	L-N-metilglutamina	Nmglu
D-N-metilglutamato	Dnmglu	ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
D-N-metilhistidina	Dnmhis	L-N-metilhistidina	Nmhis
D-N-metilisoleucina	Dnmile	L-N-metilisoleucina	Nmile
D-N-metil-leucina	Dnmleu	L-N-metil-leucina	Nmleu
D-N-metil-lisina	Dnmlys	L-N-metilisina	Nmlys
D-N-metilmetionina	Dnmmet	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-N-metilornitina	Dnmom	L-N-metilornitina	Nmorn
D-N-metilfenilalanina	Dnmphe	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-N-metilprolina	Dnmpro	L-N-metilprolina	Nmpro
D-N-metilserina	Dnmser	L-N-metilserina	Nmser
D-N-metiltreonina	Dnmthr	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-N-metiltriptófano	Dnmtrp	L-N-metiltriptófano	Nmtrp
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	L-N-metiltirosina	Nmtyr
D-N-metilvalina	Dnmval	L-N-metilvalina	Nmval
L-norleucina	Nle	L-N-metilnorleucina	Nmle
L-norvalina	Nva	L-N-metilnorvalina	Nmva
L-etilglicina	Etg	L-N-metil-etilglicina	Nmetg
L-t-butilglicina	Tbug	L-N-metil-t-butilglicina	Nmbug
L-homofenilalanina	Hphe	L-N-metil-homofenilalanina	Nmhphe
$\alpha$ -naftilalanina	Anap	N-metil- $\alpha$ -naftilalanina	Nmanap
penicilamina	Pen	N-metilpenicilamina	Nmpen
ácido $\gamma$ -aminobutírico	Gabu	N-metil- $\gamma$ -aminobutirato	Nmgabu
ciclohexilalanina	Chexa	N-metil-ciclohexilalanina	Nmchexa
ciclopentilalanina	Cpen	N-metil-ciclopentilalanina	Nmcpen

ES 3 026 158 T3

(continuación)

<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>
α-amino-α-metilbutirato	Aabu	N-metil-α-amino-α-metilbutirato	Nmaabu
ácido α-aminoisobutírico	Aib	N-metil-α-aminoisobutirato	Nmaib
D-α-metilarginina	Dmarg	L-α-metilarginina	Marg
D-α-metilasparagina	Dmasn	L-α-metilasparagina	Masn
D-α-metilaspartato	Dmasp	L-α-metilaspartato	Masp
D-α-metilcisteína	Dmcys	L-α-metilcisteína	Mcys
D-α-metilglutamina	Dmgln	L-α-metilglutamina	Mgln
ácido D-α-metilglutámico	Dmglu	L-α-metilglutamato	Mglu
D-α-metilhistidina	Dmhis	L-α-metilhistidina	Mhis
D-α-metilisoleucina	Dmile	L-α-metilisoleucina	Mile
D-α-metil-leucina	Dmleu	L-α-metil-leucina	Mleu
D-α-metil-lisina	Dmlys	L-α-metil-lisina	Mlys
D-α-metilmetionina	Dmmet	L-α-metilmetionina	Mmet
D-α-metilornitina	Dmom	L-α-metilornitina	Morn
D-α-metilfenilalanina	Dmphe	L-α-metilfenilalanina	Mphe
D-α-metilprolina	Dmpro	L-α-metilprolina	Mpro
D-α-metilserina	Dmser	L-α-metilserina	Mser
D-α-metiltreonina	Dmthr	L-α-metiltreonina	Mthr
D-α-metilriptófano	Dmtrp	L-α-metilriptófano	Mtrp
D-α-metil tirosina	Dmtyr	L-α-metil tirosina	Mtyr
D-α-metilvalina	Dmval	L-α-metilvalina	Mval
N-ciclobutilglicina	Ncbut	L-α-metilnorvalina	Mnva
N-cicloheptilglicina	Nchep	L-α-metiletilglicina	Metg
N-ciclohexilglicina	Nchex	L-α-metil-t-butilglicina	Mtbug
N-ciclododecilglicina	Ncdec	L-α-metil-homofenilalanina	Mhphe
N-ciclododecilglicina	Ncdod	α-metil-α-naftilalanina	Manap
N-ciclooctilglicina	Ncoct	α-metilpenicilamina	Mpen
N-ciclopropilglicina	Ncpro	α-metil-γ-aminobutirato	Mgab
N-cicloundecilglicina	Ncund	α-metil-ciclohexilalanina	Mchexa
N-(2-aminoetil)glicina	Naeg	α-metil-ciclopentilalanina	Mcpen
N-(2,2-difeniletíl)glicina	Nbhm	N-(N-(2,2-difeniletíl)carbamilmetil-glicina	Nnbhm
N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe	N-(N-(3,3-difenilpropil)carbamilmetil-glicina	Nnbhe
1-carboxi-1-(2,2-difeniletilamino)ciclopropano	Nmbc	ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico	Tic
fosfoserina	pSer	fosfotreonina	pThr
fosfotirosina	pTyr	O-metil-tirosina	
ácido 2-aminoadípico		hidroxilisina	

Tabla 2 Cont.

5 Los aminoácidos de los péptidos de la presente invención pueden sustituirse de forma conservadora o no conservadora.

10 La expresión "sustitución conservadora", como se usa en el presente documento, se refiere al reemplazo de un aminoácido presente en la secuencia nativa en el péptido por un aminoácido de origen natural o no natural o un peptidomimético que tiene propiedades estéricas similares. Cuando la cadena lateral del aminoácido nativo que ha de reemplazarse es polar o hidrófoba, la sustitución conservadora debe ser con un aminoácido de origen natural, un

aminoácido de origen no natural o con un resto peptidomimética que también sea polar o hidrófobo (además de tener las mismas propiedades estéricas que la cadena lateral del aminoácido reemplazado).

5 Como los aminoácidos de origen natural se agrupan normalmente de acuerdo con sus propiedades, las sustituciones conservadoras por aminoácidos de origen natural pueden determinarse fácilmente teniendo en cuenta el hecho de que, de acuerdo con la invención, el reemplazo de aminoácidos con carga por aminoácidos sin carga estéricamente similares se considera una sustitución conservadora.

10 Para producir sustituciones conservadoras por aminoácidos de origen no natural también es posible usar análogos de aminoácidos (aminoácido sintético) bien conocidos en la técnica. Un peptidomimético del aminoácido de origen natural está bien documentado en la bibliografía conocida por el profesional experto.

15 Cuando se trata de sustituciones conservadoras, el aminoácido sustituyente debe tener el mismo grupo funcional o uno similar en la cadena lateral que el aminoácido original.

20 La expresión "sustituciones no conservadoras", como se usa en el presente documento, se refiere al reemplazo del aminoácido presente en la secuencia precursora por otro aminoácido de origen natural o no natural, que tiene diferentes propiedades electroquímicas y/o estéricas. Por lo tanto, la cadena lateral del aminoácido sustituyente puede ser significativamente más grande (o más pequeña) que la cadena lateral del aminoácido nativo sustituido y/o puede tener grupos funcionales con propiedades electrónicas significativamente diferentes de las del aminoácido que se está sustituyendo. Los ejemplos de sustituciones no conservadoras de este tipo incluyen la sustitución de alanina por fenilalanina o cicohexilmetilglicina, glicina por isoleucina o ácido aspártico por  $-\text{NH}-\text{CH}[(\text{-CH}_2)_5\text{COOH}]-\text{CO}-$ . Las sustituciones no conservadoras que se encuentran en el ámbito de la presente invención son aquellas que siguen constituyendo un péptido que tiene propiedades antibacterianas.

25 Como se ha mencionado, los extremos N y C de los péptidos de la presente invención pueden protegerse mediante grupos funcionales. Se describen grupos funcionales adecuados en Green y Wuts, "*Protecting Groups in Organic Synthesis*", John Wiley and Sons, Capítulos 5 y 7, 1991. Los grupos protectores preferidos son aquellos que facilitan el transporte del compuesto unido a los mismos a una célula, por ejemplo, reduciendo la hidrofilia y aumentando la lipofilia de los compuestos.

30 Estos restos pueden escindirse *in vivo*, ya sea mediante hidrólisis o enzimáticamente, dentro de la célula. Los grupos protectores de hidroxilo incluyen grupos protectores ésteres, carbonatos y carbamatos. Los grupos protectores de amina incluyen grupos alcoxi y ariloxi carbonilo, como se ha descrito anteriormente para grupos protectores N-terminales. Los grupos protectores de ácido carboxílico incluyen ésteres alifáticos, bencilicos y arílicos, como se ha descrito anteriormente para grupos protectores C-terminales. En una realización, el grupo ácido carboxílico en la cadena lateral de uno o más restos ácido glutámico o ácido aspártico en un péptido de la presente invención se protege, preferentemente con un éster metílico, etílico, bencilico o bencilico sustituido.

35 Los ejemplos de grupos protectores N-terminales incluyen grupos acilo ( $-\text{CO}-\text{R}_1$ ) y grupos alcoxi carbonilo o ariloxi carbonilo ( $-\text{CO}-\text{O}-\text{R}_1$ ), en donde  $\text{R}_1$  es un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, aromático o aromático sustituido. Los ejemplos específicos de grupos acilo incluyen acetilo, (etil)- $\text{CO}-$ , n-propil- $\text{CO}-$ , iso-propil- $\text{CO}-$ , n-butil- $\text{CO}-$ , sec-butil- $\text{CO}-$ , t-butil- $\text{CO}-$ , hexilo, lauroílo, palmitoílo, miristoílo, estearilo, oleoil fenil- $\text{CO}-$ , fenil- $\text{CO}-$  sustituido, bencil- $\text{CO}-$  y (bencil sustituido)- $\text{CO}-$ . Los ejemplos de grupos alcoxi carbonilo y ariloxi carbonilo incluyen  $\text{CH}_3-\text{O}-\text{CO}-$ , (etil)- $\text{O}-\text{CO}-$ , n-propil- $\text{O}-\text{CO}-$ , iso-propil- $\text{O}-\text{CO}-$ , n-butil- $\text{O}-\text{CO}-$ , sec-butil- $\text{O}-\text{CO}-$ , t-butil- $\text{O}-\text{CO}-$ , fenil- $\text{O}-\text{CO}-$ , fenil- $\text{O}-\text{CO}-$  sustituido y bencil- $\text{O}-\text{CO}-$ , (bencil sustituido)- $\text{O}-\text{CO}-$ . Adamantano, naftaleno, miristoleílo, tolueno, bifenilo, cinamoílo, nitrobenzoílo, toluoílo, furoílo, benzoílo, ciclohexano, norbornano, Z-caproico. Con el fin de facilitar la N-acilación, puede haber presentes de uno a cuatro restos glicina en el extremo N de la molécula.

40 El grupo carboxilo en el extremo C del compuesto puede estar protegido, por ejemplo, por una amida (es decir, el grupo hidroxilo del extremo C se reemplaza por  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHR}_2$  y  $-\text{NR}_2\text{R}_3$ ) o éster (es decir, el grupo hidroxilo del extremo C se reemplaza por  $-\text{OR}_2$ ).  $\text{R}_2$  y  $\text{R}_3$  son independientemente un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido. Además, tomados junto con el átomo de nitrógeno,  $\text{R}_2$  y  $\text{R}_3$  pueden formar un anillo heterocíclico de C4 a C8 con aproximadamente 0-2 heteroátomos adicionales tales como nitrógeno, oxígeno o azufre.

45 Los ejemplos de anillos heterocíclicos adecuados incluyen piperidinilo, pirrolidinilo, morfolino, tiomorfolino o piperazinilo. Los ejemplos de grupos protectores C-terminales incluyen  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{NH}(\text{etilo})$ ,  $-\text{N}(\text{etilo})_2$ ,  $-\text{N}(\text{metil})(\text{etilo})$ ,  $-\text{NH}(\text{bencilo})$ ,  $-\text{N}(\text{alquil C1-C4})(\text{bencilo})$ ,  $-\text{NH}(\text{fenilo})$ ,  $-\text{N}(\text{alquil C1-C4})(\text{fenilo})$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{O}(\text{etilo})$ ,  $-\text{O}(\text{n-propilo})$ ,  $-\text{O}(\text{n-butilo})$ ,  $-\text{O}(\text{iso-propilo})$ ,  $-\text{O}(\text{sec-butilo})$ ,  $-\text{O}(\text{t-butilo})$ ,  $-\text{O}(\text{bencilo})$  y  $-\text{O}(\text{fenilo})$ .

50 Los péptidos de la presente invención también pueden comprender restos no aminoacídicos, tales como, por ejemplo, restos hidrófobos (diversos hidrocarburos y derivados de hidrocarburos lineales, ramificados, cíclicos, policíclicos o heterocíclicos) unidos a los péptidos; agentes de penetración no peptídicos; diversos grupos protectores, especialmente cuando el compuesto es lineal, que se unen a los extremos del compuesto para disminuir su degradación. Pueden incluirse grupos químicos (no aminoacídicos) presentes en el compuesto con el fin de mejorar diversas propiedades fisiológicas tales como; disminución de la degradación o eliminación; disminución de la repulsión por diversas bombas celulares, mejora de las actividades inmunogénicas, mejora de diversos modos de administración

(tales como la unión de diversas secuencias que permiten la penetración a través de diversas barreras, a través del intestino, etc.); aumento de la especificidad, aumento de la afinidad, disminución de la toxicidad y similares.

La unión del componente de secuencia de aminoácidos de los péptidos de la invención a otros agentes no aminoacídicos puede realizarse mediante unión covalente, mediante formación de complejo no covalente, por ejemplo, mediante formación de complejo con un polímero hidrófobo, que puede degradarse o escindirse produciendo un compuesto susceptible de liberación sostenida; mediante atrapamiento de la parte aminoacídica del péptido en liposomas o micelas para producir el péptido final de la invención. La asociación puede producirse mediante atrapamiento de la secuencia de aminoácidos dentro del otro componente (liposoma, micela) o la impregnación de la secuencia de aminoácidos dentro de un polímero para producir el péptido final de la invención.

De acuerdo con una realización específica, el péptido está unido a un resto de penetración celular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "resto de penetración celular" se refiere a un resto (por ejemplo, un lípido, tal como ácido palmítico) que potencia la translocación de un péptido unido a través de una membrana celular. En una realización particular, el resto de penetración celular no es un resto peptídico. El resto puede unirse al extremo N o al C.

Los péptidos de la invención pueden ser lineales o cíclicos (la ciclación puede mejorar la estabilidad). La ciclación puede tener lugar mediante cualquier medio conocido en la técnica. Cuando el compuesto se compone predominantemente de aminoácidos, la ciclación puede ser a través del extremo N al C, del extremo N a la cadena lateral y del extremo N a la cadena principal, del extremo C a la cadena lateral, del extremo C a la cadena principal, de la cadena lateral a la cadena principal y de la cadena lateral a la cadena lateral, así como la ciclación de la cadena principal a la cadena principal. La ciclación del péptido también puede tener lugar a través de restos orgánicos no aminoacídicos comprendidos en el péptido.

Los presentes inventores también conciben los péptidos grapados.

La expresión "péptido grapado", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido que tiene un número seleccionado de aminoácidos convencionales o no convencionales, y que además tiene al menos dos restos capaces de reaccionar para promover la formación de enlaces carbono-carbono, que se ha puesto en contacto con un reactivo para generar al menos un reticulante entre los al menos dos restos, que modula, por ejemplo, la estabilidad del péptido.

El término "grapado", como se usa en el presente documento, introduce en un péptido al menos dos restos capaces de reaccionar para promover la formación de enlaces carbono-carbono que pueden ponerse en contacto con un reactivo para generar al menos un reticulante entre los al menos dos restos. El grapado proporciona una restricción en una estructura secundaria, tal como una estructura de hélice alfa. La longitud y la geometría del reticulante pueden optimizarse para mejorar el rendimiento del contenido de estructura secundaria deseado. La restricción proporcionada puede impedir, por ejemplo, que la estructura secundaria se despliegue y/o puede reforzar la forma de la estructura secundaria. Una estructura secundaria a la que se le impide desplegarse es, por ejemplo, más estable.

Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse bioquímicamente tal como mediante el uso de técnicas convencionales en fase sólida. Estos métodos incluyen exclusivamente métodos de síntesis en fase sólida, síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos y síntesis en solución clásica. Se conocen bien en la técnica procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida y se describen en más detalle en John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2.<sup>a</sup> Ed., Pierce Chemical Company, 1984).

La síntesis de péptidos a gran escala se describe en *Andersson Biopolymers* 2000; 55(3):227-50.

Pueden purificarse péptidos sintéticos mediante cromatografía de líquidos preparativa de alto rendimiento [Creighton T. (1983) *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman and Co. N.Y.] y cuya composición puede confirmarse a través de secuenciación de aminoácidos.

También pueden usarse técnicas recombinantes para generar los péptidos de la presente invención. Para producir un péptido de la presente invención usando tecnología recombinante, un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención se liga en un vector de expresión de ácido nucleico, que comprende la secuencia polinucleotídica bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora cis (por ejemplo, secuencia promotora) adecuada para dirigir la transcripción constitutiva, específica de tejido o inducible de los polipéptidos de la presente invención en las células hospedadoras.

Además de poder sintetizarse en células hospedadoras, los péptidos de la presente invención también pueden sintetizarse usando sistemas de expresión *in vitro*. Estos métodos son bien conocidos en la técnica y los componentes del sistema están disponibles en el mercado.

Los péptidos descritos en el presente documento son capaces de reducir la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o del timo inducida por dexametasona en un ratón, por ejemplo, después de la inyección (IP) con 100 µg de

Dexametasona.

En otra realización, los péptidos descritos en el presente documento son capaces de interferir y bloquear la secreción tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-6 por las células macrófagas en respuesta a activadores innatos tales como el lipopolisacárido (LPS) y los oligonucleótidos CpG.

Adicionalmente o como alternativa, los péptidos descritos en el presente documento son capaces de reducir, impedir o inhibir la apoptosis en células eucariotas. Independientemente del mecanismo mediante el cual los péptidos de la invención median en las respuestas al estrés y sin desear quedar ligados a teoría o mecanismo de acción alguno, se postula que los péptidos pueden ser capaces de unirse a p53 y, por lo tanto, impedir que p53 se una al ADN dañado. El péptido puede someterse a ensayo analizando su capacidad para inhibir la respuesta a la hipertermia de la estirpe celular L12 (que carece de actividad p53 endógena y se había transfectado de forma estable con el gen p53 o con un vector de control. En estas células, la actividad de p53 induce la detención del crecimiento y la supervivencia celular en lugar de la apoptosis en respuesta a la hipertermia (como se describe en el documento WO2012/160563).

*Métodos de medición de la apoptosis:* La apoptosis es un proceso activo de autodestrucción de la célula dirigido por genes y asociado a cambios morfológicos y bioquímicos característicos. La condensación nuclear y citoplasmática y la fragmentación de la célula moribunda en cuerpos apoptóticos unidos a membrana son características típicas de la apoptosis. Otra característica de la muerte celular apoptótica es la degradación de ADN cromosómico en fragmentos oligonucleosómicos después de la activación de nucleasas específicas.

Por "que inhibe la apoptosis" o "inhibe la actividad apoptótica" se entiende cualquier disminución en el número de células que experimentan apoptosis con respecto a un control sin tratar (es decir, células no expuestas a los péptidos de la invención). Preferentemente, la disminución es de al menos el 25 %, más preferentemente la disminución es de al menos el 50 % y mucho más preferentemente la disminución es de al menos una vez.

La citometría de flujo ofrece una amplia diversidad de posibilidades para medir la apoptosis. Se han establecido e implementado diferentes métodos, algunos de los cuales tiñen la superficie celular y algunos de los cuales tiñen intracelularmente.

Uno de los primeros enfoques fue, aparte de la observación de que las células apoptóticas se encogen y tienen una mayor granularidad intracelular, teñir con fluorocromos específicos de ADN (por ejemplo, yoduro de propidio [PI], bromuro de etidio [EtBr]). Tan pronto como se induce un acierto letal, el ADN empieza a cambiar su perfil. El ADN apoptótico no sólo consiste en ADN fragmentado (visualizado como bandas más cortas, la llamada escalera de ADN, en un gel de agarosa), sino que también se digiere parcialmente en nucleótidos únicos, de manera que los fluorocromos, como PI o EtBr, tienen menos ADN que teñir (Nicoletti *et al.*, 1991). Normalmente se observa un desplazamiento hacia la izquierda, llamado pico sub-G1, en el canal de detección de fluorocromos en el FACScan™ (de Becton Dickinson, EE. UU.).

Otro método es el marcaje terminal de las roturas de la cadena de ADN (TUNEL) mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El método TUNEL detecta roturas de la cadena de ADN en células que experimentan apoptosis. La TdT es una enzima que cataliza la adición de trifosfato de desoxirribonucleótido a los extremos 3'-OH del ADN doble o monocatenario. A diferencia de las células normales, los núcleos de células apoptóticas incorporan nucleótidos exógenos (dUTP)-DIG en presencia de TdT. Un fragmento de anticuerpo anti-DIG con un fluorocromo conjugado permite la visualización de células apoptóticas. Un aumento de células apoptóticas provoca un mayor número de fragmentos de ADN y, por consiguiente, una fluorescencia más brillante. Una ventaja de este método es su especificidad muy alta (Gavrieli *et al.*, 1992). Una desventaja de este método es que es caro y sólo puede usarse para un pequeño conjunto de muestras, porque requiere mucho tiempo. Por lo tanto, no es aplicable para programas de cribado grandes.

La pérdida de polaridad de la membrana celular y la presentación de mayores cantidades de fosfatidilserina (PS) en el exterior de la membrana celular durante la fase inicial de la apoptosis ha conducido a un nuevo enfoque. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con gran afinidad por PS. La integridad de la membrana celular se mantiene en las fases temprana e intermedia de la apoptosis. Las células apoptóticas tempranas e intermedias muestran una mayor unión de Anexina-FITC y son principalmente negativas para la tinción PI. Las fases apoptóticas tardías y las células necróticas se vuelven doblemente positivas, debido a la presentación de PS en la superficie y a la tinción PI de los ácidos nucleicos intracelulares debida a la disgregación de la membrana. Este método también es caro y laborioso.

Se divulgan otros métodos para medir la apoptosis *in vivo* e *in vitro* en las Pat de los EE. UU. N.º 6.726.895 y 6.723.567.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido aislado que no tiene más de diez aminoácidos de longitud que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 21

Los aminoácidos de origen no natural preferidos que pueden usarse para reemplazar la prolina incluyen, pero sin limitación, N-metil prolina, alfa-metil prolina y ácido  $\alpha$ -aminobutírico.

Los presentes inventores contemplan un aminoácido adicional unido en el extremo N de la SEQ ID NO: 21.

5 El aminoácido adicional se selecciona preferentemente de manera que el enlace peptídico entre él y el extremo N de la SEQ ID NO: 21 (al menos el 50 % de las veces, al menos el 60 % de las veces, al menos el 70 % de las veces, al menos el 80 % de las veces o incluso el 90 % de las veces) está en la configuración cis, es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración cis.

10 Los aminoácidos candidatos incluyen, pero sin limitación, alanina, valina, leucina, cisteína, isoleucina, metionina y un derivado o análogo de las mismas.

En una realización particular, el aminoácido adicional unido al extremo N de la SEQ ID NO: 21 es leucina o un derivado o análogo de la misma.

15 En una realización adicional, el aminoácido adicional unido al extremo N de la SEQ ID NO: 21 es un aminoácido D.

Por lo tanto, los presentes inventores conciben péptidos que tienen 7 aminoácidos.

20 El péptido de este aspecto de la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4 (LPPLAYP). Dicho péptido puede tener 7, 8, 9 o 10 aminoácidos.

El péptido de este aspecto de la presente invención puede consistir en una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4.

25 Para los péptidos de este aspecto de la presente invención  $X_1$  y/o  $X_3$  y/o  $X_5$  pueden ser aminoácidos D como en d-LPPLAYP (SEQ ID NO: 21).

30 Para cualquiera de los péptidos descritos en el presente documento, la presente invención también contempla péptidos retro-inversos. Dichos péptidos son resistentes a las proteasas y consisten en D-aminoácidos en orden inverso, dando como resultado una cadena principal peptídica alterada pero sin cambios en la orientación de las cadenas laterales.

35 Los péptidos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar una gran variedad de enfermedades, incluyendo las relacionadas con respuestas al estrés. Éstas incluyen afecciones patológicas tales como enfermedades neurodegenerativas (es decir, ictus, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer), infarto de miocardio, exposición a radiación o agentes quimioterápicos, inflamación, lesiones (por ejemplo, quemaduras y lesiones del sistema nervioso central), envejecimiento celular, hipertermia, convulsiones, hipoxias (por ejemplo, isquemia e ictus), y en tejidos y órganos trasplantados antes del trasplante.

40 Estas afecciones también incluyen enfermedades autoinmunitarias, caracterizadas por un estado de inmunización de un individuo contra al menos uno de los componentes normales del cuerpo. Estos fenómenos se observan en particular en patologías que incluyen, pero sin limitación, infecciones asociadas al LES (enfermedad de lupus eritematoso sistémico), síndrome de Gougerot-Sjogren (o enfermedad de Sjogren) y poliartritis reumatoide, así como patologías tales como sarcoidosis y osteopenia, espondiloartritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), hipertiroidismo, enfermedad de Addison, anemia hemolítica autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, hemorragia púrpura idiopática, diabetes insulino dependiente, miastenia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, glomerulonefritis postestreptocócica, psoriasis y esterilidad espontánea, así como fenómenos inmediatos o retardados observados durante rechazos de injertos y la enfermedad injerto contra hospedador. En una realización particular, los péptidos de la invención son útiles para el tratamiento de la esclerosis múltiple. En otra realización, los péptidos de la invención son útiles para el tratamiento de la isquemia o el infarto de miocardio.

45 Otras enfermedades contempladas por la presente invención incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, degeneración secundaria después de un traumatismo, ictus, intoxicación del SNC, glaucoma, degeneración macular, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, uveítis autoinmunitaria, enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de injerto, artritis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), soriasis, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad por radiación, hipertermia, hipoxia, hígado tóxico fulminante, insuficiencia renal, infertilidad y muchos otros.

60 El fenómeno del rechazo de injerto es un estado de inmunización de un individuo contra constituyentes extraños (fluidos corporales tales como sangre, líquido cefalorraquídeo, etc., células, tejidos, órganos, anticuerpos, etc.) implantados deliberadamente en el paciente.

65 Como se usan en el presente documento, las expresiones "trastorno degenerativo", "enfermedad degenerativa" y "afección degenerativa" se refieren a cualquier trastorno, enfermedad o afección caracterizada por una proliferación celular inadecuada o una muerte celular inadecuada o, en algunos casos, ambas, o apoptosis aberrante o

desregulada. Estas afecciones también incluyen afecciones en las que, aunque adecuadas y reguladas a nivel de una sola célula, la apoptosis excesiva se asocia a disfunción o fallo orgánico.

5 En una realización, los péptidos son útiles para impedir la muerte celular en tejidos o células no malignos en un sujeto que tiene un trastorno neoplásico y se somete a quimioterapia y/o radioterapia para el tratamiento del cáncer.

10 Las expresiones "enfermedad inflamatoria" y "afección inflamatoria", como se usan en el presente documento, significan cualquier enfermedad o afección en la que una respuesta inflamatoria excesiva o no regulada conduce a síntomas inflamatorios excesivos, daño tisular en el hospedador o pérdida de la función tisular.

15 En una realización, la enfermedad o afección inflamatoria es una enfermedad autoinmunitaria.

En otra realización, la enfermedad o afección inflamatoria tiene una etiología asociada a la producción de al menos una citocina proinflamatoria seleccionada de IL-6 y TNF- $\alpha$ .

20 En otra realización, la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, degeneración secundaria después de un traumatismo, ictus, intoxicación del SNC, glaucoma, degeneración macular, infarto de miocardio, enfermedad por radiación, hipertermia, hipoxia, hígado tóxico fulminante, insuficiencia renal e infertilidad.

En otra realización más, la enfermedad incluye retinosis pigmentaria y degeneración macular.

En otra realización, la enfermedad incluye ictus o infarto de miocardio.

25 Los péptidos pueden proporcionarse en sí o como parte de una composición farmacéutica, donde se mezcla con portadores o excipientes adecuados.

30 Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En el presente documento, la expresión "principio activo" se refiere a los péptidos responsables del efecto biológico.

35 En lo sucesivo del presente documento, las expresiones "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse indistintamente, se refieren a un portador o un diluyente que no provoca irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas expresiones se incluye un adyuvante.

40 La preparación de composiciones farmacéuticas, que contienen péptidos o polipéptidos como principios activos, se conoce bien en la técnica. Normalmente, dichas composiciones se preparan como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también puede prepararse formas sólidas, que pueden suspenderse o solubilizarse antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse. El principio activo terapéutico se mezcla con portadores inorgánicos y/u orgánicos, que sean farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los portadores son excipientes (vehículos) farmacéuticamente aceptables que comprenden sustancias más o menos inertes cuando se añaden a una composición farmacéutica para conferir una consistencia o una forma adecuadas a la composición. Son portadores adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes y agentes tamponantes del pH, que potencian la eficacia del principio activo.

50 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los péptidos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, mediante la determinación de la  $CI_{50}$  (la concentración que proporciona una inhibición del 50 %) y la  $DL_{50}$  (dosis letal que provoca la muerte en el 50 % de los animales sometidos a ensayo) para un compuesto objeto. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos en cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar en función de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en función de la afección del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975).

60 La cantidad de agente activo utilizada en una composición de administración de la presente invención es una cantidad eficaz para cumplir la finalidad del agente activo particular para la indicación objetivo. La cantidad de agente activo en las composiciones normalmente es una cantidad farmacológicamente, biológicamente, terapéuticamente o químicamente eficaz. Sin embargo, la cantidad puede ser inferior a esa cantidad cuando la composición se usa en forma farmacéutica unitaria porque la forma farmacéutica unitaria puede contener una pluralidad de compuestos o

agentes activos en una única composición o puede contener una cantidad farmacológicamente, biológicamente, terapéuticamente o químicamente eficaz dividida. Entonces, la cantidad eficaz total puede administrarse en unidades acumulativas que contienen, en total, una cantidad eficaz del agente activo.

5 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención es una cantidad que cuando se administra a un paciente es capaz de ejercer una actividad anti-apoptótica y/o una actividad anti-inflamatoria. Los ensayos para detectar la actividad anti-apoptótica del péptido de la invención incluyen, pero sin limitación, la tinción de ADN con fluorocromos específicos tales como yoduro de propidio y bromuro de etidio, ensayos de Anexina V, ensayos TUNEL y similares; en los Ejemplos a continuación se presentan determinados ejemplos no limitantes de dichos ensayos.  
10 También se conocen bien en la técnica ensayos para detectar la actividad anti-inflamatoria de los péptidos.

Aunque una dosificación adecuada de un péptido de la invención varía en función de la vía de administración, la edad, el peso corporal, el sexo o el estado del paciente, y debe ser determinada por el médico al final, la dosis adecuada para seres humanos adultos puede ser generalmente de entre aproximadamente 0,2-2000 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 2-200 mg/kg.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más compuestos de la presente invención, y uno o más excipientes o diluyentes. En una realización, uno o más de los compuestos, o solvatos, o sales de estos compuestos.

20 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales que son sustancialmente no tóxicas para los organismos vivos. Las sales farmacéuticamente aceptables típicas incluyen aquellas sales preparadas por reacción de los compuestos de la presente invención con un ácido mineral u orgánico farmacéuticamente aceptable. Dichas sales se conocen también como sales de adición de ácido.

25 Las composiciones que comprenden los compuestos y agentes activos tienen utilidad en el suministro de agentes activos a sistemas biológicos seleccionados y en una biodisponibilidad aumentada o mejorada del agente activo en comparación con la administración del agente activo sin el agente de suministro. El suministro puede mejorarse suministrando más agente activo durante un período de tiempo, o suministrando agente activo en un período de tiempo particular (tal como para efectuar un suministro más rápido o retardado) o durante un período de tiempo (tal como un suministro sostenido).

30 Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

35 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía local o sistémica mediante cualquier vía convencional y adecuada, incluyendo, pero sin limitación, oral, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratecal, tópica, rectal, bucal, inhalatoria o intranasal.

40 Para inyección, los compuestos de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes adecuados para la barrera que ha de permearse. Dichos penetrantes, por ejemplo DMSO, o polietilenglicol se conocen en general en la técnica.

45 Las composiciones farmacéuticas, que pueden usarse por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas y selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los principios activos mezclados con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes.

50 En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

55 Como alternativa, los compuestos de la presente invención pueden incorporarse en preparaciones orales líquidas tales como suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, por ejemplo. Por otra parte, las formulaciones que contienen estos compuestos pueden presentarse como producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, como agentes de suspensión, tales como jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, tales como lecitina, monooleato de sorbitano o goma arábica; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), tales como aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y alcohol etílico; y conservantes, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.

Para la administración por inhalación, los péptidos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del péptido y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también son útiles para aplicación tópica e intralesional. Como se usa en el presente documento, el término "tópico" significa "perteneciente a un área de superficie particular", por ejemplo, la piel y las mucosas, y el agente tópico aplicado a un área determinada de la superficie sólo afectará al área a la que se aplique. Las formulaciones de los péptidos/análogos de péptidos pueden administrarse por vía tópica en forma de gel, pomada, crema, emulsión, formulación de liberación sostenida incluyendo un parche transdérmico, y pueden comprender liposomas y cualquier otro portador farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración del fármaco por vía tópica. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden comprender portadores o excipientes sólidos adecuados en fase de gel. Los ejemplos de dichos portadores o excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Las composiciones de la presente invención, si se desea, pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contengan el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase alveolar. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. El envase o dispensador también puede llevar un aviso asociado al envase en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, el uso o la comercialización de productos farmacéuticos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o de la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser de un etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE. UU. para medicamentos con receta o de un prospecto aprobado. También pueden prepararse composiciones que comprendan una preparación de la invención formulada en un portador farmacéutico compatible, colocadas en un recipiente adecuado y etiquetadas para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado adicionalmente anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 10\%$ .

Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "incluyendo", "que tiene" y sus conjugaciones significan "incluyendo, pero sin limitación".

La expresión "que consiste en" significa "incluyendo y limitado a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero sólo si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.

Como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de esta solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de esta invención en un formato de intervalo. Se debería entender que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en cuanto al alcance de la invención. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo divulga específicamente todos los posibles intervalos secundarios, así como los valores numéricos individuales dentro de dicho intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6, tiene intervalos secundarios específicamente divulgados, tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que se indique en el presente documento un intervalo numérico, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccionario o integral) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/que varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado "que varía/que varía desde" un primer número indicado "hasta" un segundo número indicado se usan en el presente documento indistintamente y pretenden incluir el primer y el segundo números indicados y todos los números fraccionarios e integrales entre medias.

Como se usa en el presente documento, la palabra "método" se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para lograr una tarea dada incluyendo, pero sin limitación, esta maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de dichas maneras, medios, técnicas y procedimientos

conocidos por profesionales de la técnica química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, sustancialmente inhibir, ralentizar o revertir la progresión de una afección, sustancialmente aliviar los síntomas clínicos o estéticos de una afección o sustancialmente prevenir la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que, para más claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, para más brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier combinación secundaria adecuada o como es adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características fundamentales de dichas realizaciones, a menos que la realización resulte inoperativa sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se esbozó anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran respaldo experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que, junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas realizaciones de la invención de manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*" Sambrook *et al.*, (1989); "*Current Protocols in Molecular Biology*" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "*Current Protocols in Molecular Biology*", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "*A Practical Guide to Molecular Cloning*", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "*Recombinant DNA*", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "*Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las Pat. de los EE. UU. N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "*Cell Biology: A Laboratory Handbook*", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "*Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique*" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "*Current Protocols in Immunology*" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "*Basic and Clinical Immunology*" (8.ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "*Selected Methods in Cellular Immunology*", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen exhaustivamente en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las Pat. de los EE. UU. N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "*Oligonucleotide Synthesis*" Gait, M. J., ed. (1984); "*Nucleic Acid Hybridization*" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "*Transcription and Translation*" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1984); "*Animal Cell Culture*" Freshney, R. I., ed. (1986); "*Immobilized Cells and Enzymes*" IRL Press, (1986); "*A Practical Guide to Molecular Cloning*" Perbal, B., (1984) y "*Methods in Enzymology*" Vol. 1-317, Academic Press; "*PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "*Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual*" CSHL Press (1996);

A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se considera que estos procedimientos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

#### EJEMPLO 1

La dexametasona es un fármaco corticosteroideo que induce la apoptosis de las células inmunitarias y los tejidos linfomieloides. Se usaron ratones BALB/c para examinar la capacidad de los péptidos candidatos para rescatar las células linfocitarias de la apoptosis. A los ratones se les inyectaron IP 100 µg de Dexametasona. Los ratones tratados con dexametasona recibieron inmediatamente después y 24 horas después del tratamiento con dexametasona una inyección intravenosa de los péptidos candidatos (250 o 400 µg de péptido/ratón). Los ratones fueron sacrificados 48 horas después del primer tratamiento. Se pesaron el bazo y el timo y se realizó un recuento celular completo de ambos órganos.

Los péptidos utilizados en el cribado fueron los siguientes:

PPLPY - SEQ ID NO: 3  
 LPPLAYP - SEQ ID NO: 4  
 PLPYP - SEQ ID NO: 9  
 PPL - SEQ ID NO: 10  
 PLP - SEQ ID NO: 11  
 PYP - SEQ ID NO: 12

LPGLPYP - SEQ ID NO: 13  
LPPLGY - SEQ ID NO: 14  
LAPLPYP - SEQ ID NO: 15  
LPALPYP - SEQ ID NO: 16

5

*Resultados:*

La dexametasona indujo una pérdida de peso del bazo y del timo y una reducción del recuento de células del bazo de aproximadamente el 50 %. El recuento de células del timo se redujo en casi el 80 % en comparación con los ratones normales. Dos de los péptidos tuvieron un efecto significativo en la reducción de la pérdida de peso del bazo y del timo, así como en la reducción de la pérdida de recuento celular - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 (véase la Figura 1). No se observaron diferencias entre las 2 dosis de tratamiento (250 o 400 µg/ratón).

10

EJEMPLO 2

15

Se usaron ratones BALB/c para examinar la capacidad de los péptidos candidatos para rescatar las células linfocitarias de la apoptosis. A los ratones se les inyectaron IP 100 µg de Dexametasona. Los ratones tratados con dexametasona recibieron inmediatamente después y 24 horas después del tratamiento con dexametasona una inyección intravenosa de los péptidos candidatos (200 µg de péptido/ratón). Los ratones fueron sacrificados 48 horas después del primer tratamiento. Se pesaron el bazo y el timo y se realizó un recuento celular completo de ambos órganos.

20

Los péptidos utilizados en el cribado fueron los siguientes:

LPPLPYP - SEQ ID NO: 2 (control)  
PPLAYP - SEQ ID NO: 18  
LPPLPY - SEQ ID NO: 7  
LPPLAYP - SEQ ID NO: 4  
PPLPY - SEQ ID NO: 3  
PPLPY-NH<sub>2</sub> - SEQ ID NO: 19

25

30

RESULTADOS

Los resultados se proporcionan en la Figura 2. Cada uno de los péptidos sometidos a ensayo mostró una mejora con respecto al péptido de control (SEQ ID NO: 2).

35

A pesar de que la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia. En consecuencia, se pretende abarcar todas esas alternativas, modificaciones y variaciones que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido aislado que no tiene más de diez aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 21
- 5 en donde el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o del timo inducida por dexametasona en un ratón.
2. El péptido aislado de la reivindicación 1, que tiene 7 aminoácidos de longitud.
- 10 3. El péptido aislado de las reivindicaciones 1 o 2, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o degenerativa.
4. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de las reivindicaciones 1 o 2 como agente activo y un portador fisiológicamente aceptable.

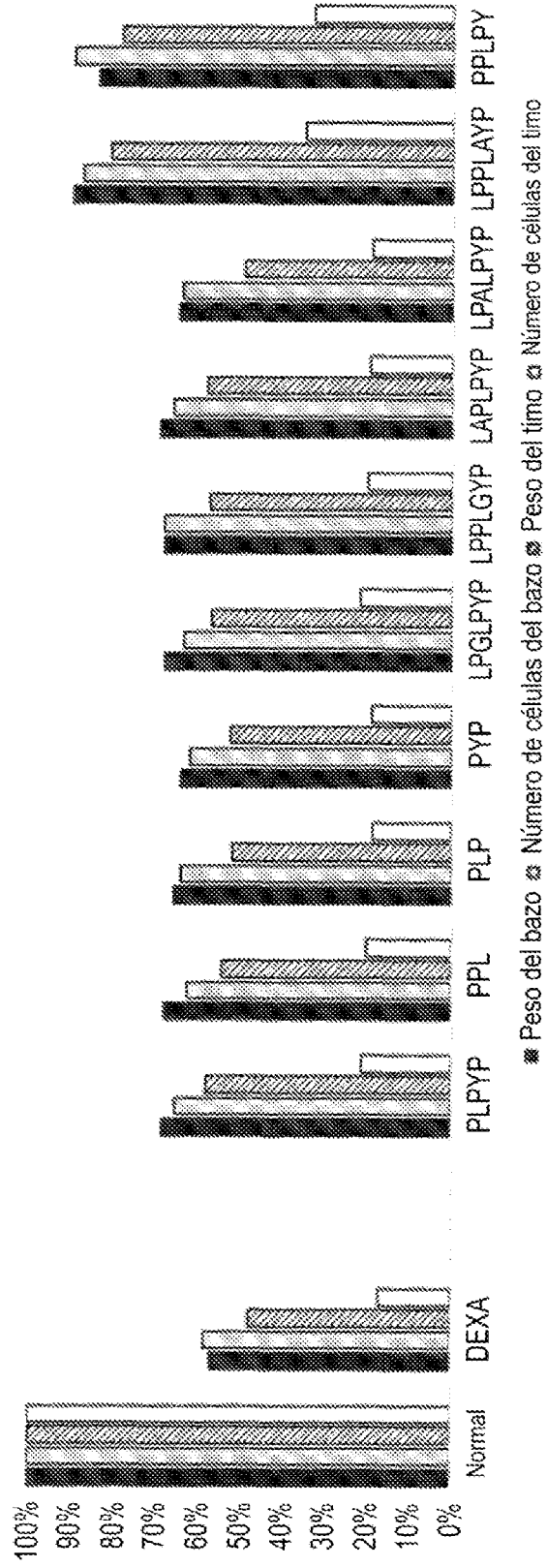


FIG. 1

