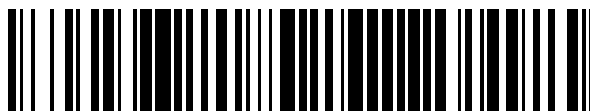


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 882 007**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2017** **PCT/EP2017/064803**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017** **WO17216360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2017** **E 17732067 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021** **EP 3472195**

54 Título: **Análogos de péptidos de espexina metabólicamente estables**

30 Prioridad:

16.06.2016 EP 16305734

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

30.11.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (50.0%)
4, rue Blaise Pascal
67000 Strasbourg, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

BONNET, DOMINIQUE;
SIMONIN, FRÉDÉRIC;
LE COZ, GLENN-MARIE y
ESTÉOULLE, LUCIE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 882 007 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

Análogos de péptidos de espexina metabólicamente estables

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a análogos de espexina metabólicamente estables y no inmunógenos que son completamente solubles a pH fisiológico, y su uso para la prevención o el tratamiento de enfermedades mediadas por el receptor de galanina 2 (GALR2).

10

Antecedentes de la invención

El receptor de galanina 2 (GALR2), que pertenece a los receptores acoplados a proteína G (GPCR) responsables de la transducción de una señal dentro de una célula, se aisló del extracto de hipotálamo de rata (Howard et al., FEBS Letts., 405: 285-290, 1997; Smith et al., J. Biol. Chem. 272: 24612-24616, 1997; Wang et al., Mol. Pharmacol., 52: 337-343, 1997) [1-3]. Este receptor se acopla a los tipos de proteína G GI/Go, Gq/G11 o G12, lo que significa que este subtipo de receptores de galanina puede mediar tanto en efectos estimulantes como inhibidores. La distribución de GALR2 está muy extendida dentro del CNS pero es diferente de la de GALR1. Los ganglios de la raíz dorsal (DRG) expresan el nivel más alto de GALR2 en la rata (O'Donnell et al., J. Comp. Neurol., 409: 469-481, 1999; Waters et Kraus, Neurosci., 95: 265-271, 2000) [4, 5], mientras que se detectaron niveles bajos de ARNm de GALR2 en el locus coeruleus de rata (LC) y en la región del núcleo del rafe dorsal (DRN) (O'Donnell et al., J. Comp. Neurol., 409: 469-481, 1999) [4]. Se ha informado de GALR2 de ratón en el cerebro de ratón pero no en el DRN (Hawes et al., J. Comp. Neurol., 479: 410-423, 2004) [6]. Aunque se sabe que GALR2 muestra una función particularmente en la ansiedad, depresión, regulación del apetito y modulación del dolor, la determinación adicional de sus funciones se beneficiaría de un agonista estable y selectivo que actúa solo en GALR2.

El neuropéptido Q, alias Espexina, es una hormona descubierta recientemente por Mirabeau et al. (Genome Res., 17: 320-327, 2007) [7]. Los autores desarrollaron un modelo de Markov oculto (HMM) basado en búsquedas de algoritmos que integra varias características de la secuencia de hormonas peptídicas para identificar novedosas hormonas peptídicas. La secuencia de péptidos espexina madura predicha de 14 aminoácidos flanqueados por sitios de escisión dibásicos se conserva evolutivamente en todas las especies de vertebrados. La expresión de espexina en regiones del cerebro y tejidos periféricos de varios mamíferos sugiere múltiples funciones fisiológicas para la espexina. Recientemente, la espexina estuvo implicada en la regulación de las conductas alimentarias y los procesos metabólicos relacionados (Walewski et al., Obesity 22: 1643-1652, 2014) [11]. Además, es probable que la espexina esté involucrada en la reproducción, la función cardiovascular/renal y la nocicepción (Liu et al., Mol. Cell Endocrinol., 374 (1-2): 65-72, 2013; Toll et al., Faseb J., 26: 947-954, 2012) [12, 13]. Sin embargo, las funciones precisas de la espexina en estos procesos no se entendieron bien debido a la falta de información sobre el receptor de la espexina.

Más recientemente se ha encontrado que la espexina es un ligando endógeno que actúa en GALR2 y GALR3 pero no en GALR1 (Kim et al., Endocrinol., 155: 1864-1873, 2014) [8]. Sobre la base de la interacción GALR2/espexina, se ha propuesto desarrollar ensayos de cribado para agentes que modulan la actividad de GALR2 y ensayos de diagnóstico, así como kits para realizar los mismos (Solicitud internacional WO 2012/042455) [9].

Teniendo en cuenta la interacción entre Espexina y los receptores de galanina, el desarrollo de agonistas de GALR2 más estables y selectivos de subtipo conduciría a un progreso notable en el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con los receptores de galanina, en particular de enfermedades relacionadas con GALR2 o trastornos relacionados con GALR2. Por tanto, se han desarrollado agonistas específicos de GALR2 humanos basados en espexina con mayor estabilidad en suero y efecto ansiolítico en ratones (Reyes-Alcaraz et al., Scientific Reports, 6: 21453, DOI: 10.1038/srep21453, 24 de febrero de 2016) [10].

Se describe un reactivo de marcación fluoroso soluble en agua que es reactivo a grupos amina primaria en proteínas o péptidos que comprenden (OEG)₃ como espaciador, como útil para la purificación y también para el marcaje in vivo, por ejemplo, utilizando C₆F₁₇-CH₂-CH₂-CO-. Sin embargo, solo se ejemplifica la marcación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH(4-11)) y la albúmina con perfluorooctanato y (OEG)₃ (Qian et al., J. Mass Spectrometry, 46 (1): 1-11, 2010) [14].

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a novedosos fluoropéptidos metabólicamente estables derivados del neuropéptido Q, alias Espexina. Tales análogos de espexina no son inmunógenos, son completamente hidrosolubles a pH fisiológico y tienen una mejor afinidad hacia GALR2 que el neuropéptido Q endógeno del que derivan. Existe un interés terapéutico en usar dichos análogos metabólicamente estables como agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con GALR2 o trastornos de GALR2, por ejemplo, trastornos del sistema nervioso central (CNS) o trastornos cardiovasculares.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de espexina que tiene el siguiente péptido de fórmula (I):

Xaa1-Trp-Xaa2-Xaa3-Gln-Ala-Xaa4-Xaa5-Tyr-Leu-Lys-Gly-Xaa6-Xaa7 (I)

en la que

Xaa1 es Asn, Pro o Ala o hidrógeno;

Xaa2 es Thr o Pro;

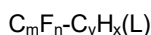
Xaa3 es Pro o Ala;

Xaa4 es Met o Ala;

Xaa5 es Leu o Ala;

Xaa6 es Ala, Pro o NH₂;

Xaa7 es Gln, Pro, Ala o NH₂, cuando Xaa6 no es NH₂, en el que dicho péptido de fórmula (I) (SEQ ID NO: 1) está enlazado covalentemente a un grupo fluorocarbono de fórmula (II):



en la que $m = 3$ a 30 , $n \leq 2m+1$, $y = 0$ a 2 , $x \leq 2y$, $(m+y) = 3$ a 30 , y L , que es opcional, es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en un PEG o un péptido que tiene de 1 a 6 aminoácidos, directamente o a través de un enlazador seleccionado del grupo que consiste en un PEG o un péptido que tiene de 1 a 6 aminoácidos, ya sea en el grupo alfa-amino o épsilon-amino de la lisina del péptido de fórmula (I), y cuando el enlazador es una lisina, el grupo fluorocarbono está enlazado al grupo épsilon-amino de dicha lisina.

Dicho análogo de espexina es ventajosamente metabólicamente estable, análogo no inmunógeno y completamente hidrosoluble a pH fisiológico.

Como se usa en este documento, la expresión "completamente hidrosoluble a pH fisiológico" significa que los fluoropéptidos de la presente invención como se describió anteriormente tienen al menos 50 % de residuos de aminoácidos hidrófobos y tienen cargas netas positivas generales y una solubilidad final en una mezcla acuosa. por encima de 100 μ M mediante inspección visual de la turbidez de la dispersión resultante y/o mediciones de solubilidad mediante métodos fisicoquímicos clásicos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "no inmunógeno" significa que los fluoropéptidos de la presente invención como se describió anteriormente no derivan de ningún antígeno capaz de inducir una respuesta inmune en un animal, incluidos los humanos. Los antígenos pueden derivar de un virus, bacteria o micobacteria, parásito, hongo o cualquier agente infeccioso o un antígeno o alérgeno autólogo. Los fluoropéptidos descritos en la invención no están incluidos en ninguna vacuna.

Como se usa en este documento, la expresión "metabólicamente estable" significa que los fluoropéptidos de la presente invención, como se describe anteriormente, tienen al menos la vida media del péptido nativo y, en particular, cuando se enlazan a un enlazador cargado, tienen una vida media al menos dos veces más larga que la del péptido nativo, de al menos 20 min o más de una hora, medida en el ensayo de estabilidad realizado en plasma humano.

Como se usa en este documento, el término "fluorocarbono" incluye perfluorocarbono (donde todo el hidrógeno se reemplaza por flúor) o hidrofluorocarbono (que contiene enlaces C-H y C-F).

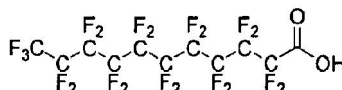
El grupo fluorocarbono puede comprender una o más cadenas derivadas de radicales perfluorocarbono o fluorocarbono/hidrocarbono mixtos, y puede estar saturado o insaturado, teniendo cada cadena de 3 a 30 átomos de carbono. El grupo fluorocarbono se enlaza al péptido a través de un enlace covalente, por ejemplo, a través del grupo NH₂ de una lisina del péptido de fórmula (I). El acoplamiento al péptido se puede lograr a través de un grupo funcional para el enlace a -NH₂, que está presente de forma natural en la lisina del péptido de fórmula I, o en un enlazador. Modificar la naturaleza del enlace entre la cadena fluorocarbono y el péptido permite modular la estabilidad y/o solubilidad del péptido. Ejemplos de tales enlaces entre la cadena fluorocarbono y el péptido de fórmula I incluyen enlaces amida, hidrazina, disulfuro, tioéter, éster y oxima.

Opcionalmente, se puede incorporar un elemento enlazador escindible (péptido o no peptídico) para permitir la escisión del péptido de fórmula I del grupo fluorocarbono. El enlazador también se puede incorporar para ayudar en la síntesis del fluoropéptido y para mejorar su estabilidad y/o solubilidad, por ejemplo, incluyendo cargas adicionales. El enlazador así cargado puede ser particularmente útil, especialmente si el péptido al que está enlazado no tiene aminoácidos catiónicos (es decir, lisina, histidina, arginina) en su extremo N-terminal. Ejemplos de enlazadores incluyen polietilenglicol (PEG), o un péptido que tiene aproximadamente de 1 a 6 aminoácidos, naturales sobre los no naturales,

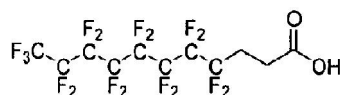
que pueden ser escindidos por enzimas proteolíticas o no. Preferiblemente, dichos aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en aminoácidos básicos o alifáticos, más preferiblemente de histidina, lisina, arginina y glicina. Por ejemplo, el enlazador puede ser Arg-Gly-Arg.

5 Por tanto, el grupo fluorocarbono del análogo de espexina de la presente invención tiene la fórmula química (II) $C_mF_n-C_yH_x(L)$ en la que $m=3$ a 30 , $n \leq 2m+1$, $y = 0$ a 2 , $x \leq 2y$, $(m+y) = 3$ a 30 , y L , que es opcional, es un grupo funcional que conduce a la unión covalente al péptido. Por ejemplo, dicho grupo funcional es un carbonilo $-C(O)-$ que forma un enlace amida con el $-NH_2$ de una lisina.

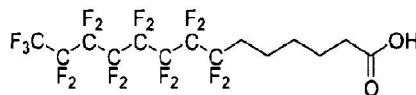
10 De acuerdo con una realización particular de la fórmula II anterior del fluorocarbono, $m=5$ a 15 , preferiblemente $m=5$ a 15 e $y=1$ a 4 . De acuerdo con otra realización particular, la fórmula del grupo fluorocarbono es ácido perfluoroundecanoico de fórmula (A)



15 o alternativamente es ácido 2H, 2H, 2H, 3H, 3H-perfluoroundecanoico de fórmula (B)



20 o alternativamente es ácido heptadecafluoropentadecanoico de fórmula (C)



25 En estos casos, debe tenerse en cuenta que la reducción de la longitud del grupo fluorocarbono de fórmula (II), por ejemplo, eliminando al menos dos grupos CF_2 , preferiblemente al menos cuatro grupos CF_2 , puede aumentar la solubilidad y/o la estabilidad plasmática del péptido de fórmula (I) al que está enlazado.

De acuerdo con una realización particular, el análogo de espexina de fórmula (I) como se definió anteriormente está adicionalmente enlazado covalentemente a un grupo acetilo y/o un grupo acilo $-C(O)R$ donde R es un alquilo C_{7-30} . Por ejemplo, tiene la siguiente fórmula (III) $CH_3-C_yH_x-C(O)-$ en la que $y=7$ a 30 , preferiblemente $y=10$ a 20 , más preferiblemente $y=14$ y $x=2y$.

Dicho grupo fluorocarbono o acetilo adicional y/o grupo acilo pueden enlazarse en la parte N-terminal del péptido directamente a través de una lisina, ya sea en los grupos alfa-amino o épsilon-amino.

De acuerdo con una realización particular de un fluoropéptido de fórmula (I), la presente invención se refiere a un análogo de espexina seleccionado del grupo que consiste en:

- i) $CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2C(O)-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln$ (compuesto LE144; SEQ ID NO: 2);
- ii) $CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2C(O)-Arg-Gly-Arg-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln$ (compuesto LE130; SEQ ID NO: 3);
- iii) $Acetil-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Lys(C(O)(CH_2)_2(CF_2)_7CF_3)$ (compuesto LE128; SEQ ID NO: 4);
- 45 iv) $Acetil-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Lys(Arg-Gly-Arg-(C(O)(CH_2)_2(CF_2)_7CF_3))$ (compuesto LE146; SEQ ID NO: 5);
- v) un análogo de espexina con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de (i), (ii), (iii) o (iv).

50 En otro aspecto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un análogo de espexina de fórmula (I) como se describió anteriormente, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Tal composición farmacéutica se prepara para la administración a un sujeto que la necesite y que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los análogos de espexina metabólicamente estables de la presente invención. La cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de espexina metabólicamente estable dependerá de la vía de administración, el tipo de mamífero que es el sujeto y las características físicas del sujeto que se está tratando. Los factores específicos que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad y el estadio de la enfermedad, el peso, la dieta y la medicación simultánea. La relación de estos factores con la determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos divulgados es bien conocida y comprendida por los expertos en la técnica.

Los excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables también son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los excipientes estándar incluyen soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones reguladas a pH fisiológico. Por ejemplo, los excipientes farmacéuticos incluyen espesantes, diluyentes, reguladores, conservantes, agentes tensioactivos y similares, además del análogo de espexina de selección. La composición farmacéutica se puede preparar en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras secas (polvo, gránulos, comprimidos para deshacer en la boca, etc ...). En general, la naturaleza del excipiente o vehículo dependerá del modo particular de administración que se utilice. La composición farmacéutica se puede administrar por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracerebroventricular, oral, intraperitoneal, etc ... o en forma de aerosol.

La dosificación la seleccionan los expertos en la técnica de modo que se logre un efecto terapéutico, y depende de la vía de administración y la forma de dosificación que se utilice. La dosis diaria total de un péptido administrada a un sujeto en dosis unitarias o divididas puede estar en cantidades, por ejemplo, de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día, preferiblemente de 0.01 a 10 mg/kg/día. Las composiciones de unidades de dosificación pueden contener tales cantidades de submúltiplos de las mismas que se puedan usar para completar la dosis diaria. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el peso corporal, salud general, sexo, dieta, hora y vía de administración, tasas de absorción y excreción, combinación con otros fármacos y la gravedad de la enfermedad en particular que se está tratando.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un análogo de espexina de la presente invención, para uso como fármaco.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un análogo de espexina de la presente invención, para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad relacionada con GALR2 o trastorno relacionado con GALR2, preferiblemente seleccionado de trastornos del sistema nervioso central (CNS), trastornos cardiovasculares, nocicepción, trastornos renales, neuroinflamación, etc Por ejemplo, dichas enfermedades o trastornos incluyen, pero no se limitan a:

- enfermedad cardiovascular: insuficiencia cardíaca, enfermedades renales (por ejemplo, insuficiencia renal, nefritis, etc.), hipertensión, hipertensión pulmonar, cirrosis, arteriosclerosis, enfisema pulmonar, edema pulmonar, apoplejía, isquemia cerebral, deterioro del miocardio en la sepsis, miocardiopatía;

- el síndrome de hormona antidiurética inapropiada (SIADH);

- enfermedades metabólicas: obesidad, anorexia, hiperfagia, polifagia, hipercolesterolemia, hipergliceridemia, hiperlipemia;

- diversos tipos de demencia: demencia senil, enfermedad de Alzheimer, demencia cerebrovascular, demencia debida a enfermedades degenerativas por desnaturalización genealógica, demencia resultante de enfermedades infecciosas, demencia asociada con enfermedades endocrinas, enfermedades metabólicas o intoxicaciones, demencia causada por tumores y demencia debida a enfermedades traumáticas, depresión, síndrome del niño hiperactivo, alteración de la conciencia, trastorno de ansiedad, esquizofrenia, fobia;

- dolor e hiperalgesia;

- diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, resistencia a la insulina, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia. La diabetes mellitus se caracteriza por hiperglucemia. Más particularmente, la diabetes de tipo 2 se caracteriza por hiperglucemia y resistencia a la insulina. Se cree que la obesidad es la causa principal de diabetes tipo 2 en personas que están genéticamente predispuestas a la enfermedad. La retinopatía diabética, la neuropatía diabética y la nefropatía diabética son trastornos bien conocidos asociados con la diabetes y la resistencia a la insulina.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la actividad antinociceptiva in vivo de la espexina y el análogo LE144 en ratones. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba post hoc de Anova con Dunett de una vía; *p <0,05; **p <0,01 y cada punto de tiempo se evaluó con respecto a la línea base correspondiente para cada grupo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Material y métodos generales

Los reactivos se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron sin ninguna purificación adicional. Los Fmoc-L-aminoácidos se adquirieron de Novabiochem, Polypeptides e Iris Biotech. La resina Rink Amide NovaGel® protegida con Fmoc se adquirió de Novabiochem y los rendimientos generales para las síntesis en fase sólida se calcularon basándose en las cargas iniciales proporcionadas por el proveedor (0,7 mmol/g). La resina Wang NovaGel® protegida con Fmoc se adquirió de Novabiochem y los rendimientos generales para las síntesis en fase sólida se calcularon basándose en las cargas iniciales proporcionadas por el proveedor (0,1 mmol/g).

Análisis analítico de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC)

El análisis se realizó en una columna Sunfire C18 (5 µm, 4,6 mm x 150 mm) usando un gradiente lineal (5 % a 95 % en 20 min, tasa de flujo de 1 mL·min⁻¹) de disolvente B (TFA al 0,1 % en CH₃CN, v/v) en disolvente A (TFA al 0,1 % en H₂O, v/v). La detección se fijó en 220 nm y 254 nm.

Purificaciones por cromatografía RP-HPLC semipreparativa

Las purificaciones se realizaron en una columna Sunfire C18 (5 µm, 19 x 150 mm) en Gilson PLC2020 con detección de absorción. La separación se logró utilizando gradientes isocráticos y lineales sucesivos (5min al 5 %; 5 % a 60 % en 30 min; 60 % a 100 % en 10 min; tasa de flujo de 20mL·min⁻¹) de disolvente B (0.1 % TFA en CH₃CN, v/v) en disolvente A (TFA al 0,1 % en H₂O, v/v).

Análisis de espectros de masas por cromatografía líquida (LC-MS)

Los análisis se obtuvieron en un espectrómetro ZQ (cuadrupolo Z) Waters/Micromass equipado con una columna X-Terra C18 (0,5 µm, 4,6 mm x 50 mm) usando el modo de ionización por electroaspersión (ESI).

Análisis de espectros de masas de alta resolución (HR-MS)

Los análisis se adquirieron en un espectrómetro de masas Bruker MicroTof, usando ionización por electroaspersión (ESI) y un analizador de tiempo de vuelo (TOF) o en un espectrómetro de masas Autoflex II TOF/TOF Bruker usando técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) y un analizador de tiempo de luz (TOF).

Protocolo general para la síntesis de péptidos en fase sólida automatizada estándar (SPPS)

La síntesis de péptidos en fase sólida automatizada estándar (SPPS) se realizó en un sintetizador Applied Biosystem ABI 433A (Appel, Francia). El alargamiento se llevó a cabo acoplando un exceso de 10 veces de derivados de Fmoc-L-aminoácido, usando hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y diisopropiletilamina (base de Hünig) (DIPEA) como reactivos de acoplamiento en N,N-dimetilformamida (DMF) como disolvente. Al final de la síntesis de la secuencia de péptidos, la resina se lavó con CH₂Cl₂ y MeOH y luego se secó al vacío. Después de cada etapa de acoplamiento, se realizó la desprotección de Fmoc mediante tratamiento con piperidina monitorizado por UV a 301 nm.

Protocolo general para elongación de péptidos mediante SPPS manual

La elongación del péptido se realizó a partir de resina frita sintetizada previamente mediante SPPS automatizado estándar. Se realizaron SPPS no automatizados en tubos de polipropileno equipados con fritas de polietileno y tapones de polipropileno utilizando un dispositivo batidor agitador orbital.

La resina protegida con Fmoc (1 equiv.) se hinchó durante 1 hora en DMF y el exceso de disolvente se eliminó por filtración. La escisión del grupo protector Fmoc se realizó en una solución de piperidina al 20 % (v/v) en DMF (2 veces durante 15 min). Se drenó la solución de piperidina y se lavó la resina sucesivamente con DMF, CH₂Cl₂ y MeOH (3 x 0,5 ml).

Todos los aminoácidos protegidos con Fmoc (4 equiv.) se acoplaron en N,N-dimetilformamida (DMF) durante 45 min usando HBTU (3.8 equiv.) y HOBt (4 equiv.) con N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (12 equiv.) como agentes activadores. El exceso de disolvente se eliminó por filtración y la resina se lavó sucesivamente con DMF, CH₂Cl₂ y MeOH (3 x 0,5 ml).

Se repitió el ciclo de acoplamiento, lavado y desprotección hasta que se obtuvieron los péptidos diana. La finalización de los acoplamientos y las desprotecciones de Fmoc se controló con la prueba de ninhidrina y la prueba de TNBS:

- Prueba de ninhidrina (para aminos primarios): Se suspendieron perlas de resina en 2 gotas de una solución que contenía 5 g de ninhidrina disuelta en 100 ml de etanol, 2 gotas de una solución que contenía 80 g de fenol licuado en 20 ml de etanol y 2 gotas de una solución acuosa 0,001 M de cianuro de potasio a 98 ml de piperidina. La mezcla se calentó a 100 °C durante 1 min. La prueba de color positivo (presencia de grupos amino libres). Una solución amarilla o azul y perlas amarillas indican una prueba negativa.

- Prueba TNBS (para aminas primarias): Se suspendieron perlas de resina en 2 gotas de una solución que contenía DIPEA al 10 % (v/v) en DMF y 2 gotas de una solución que contenía ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) en DMS. Se observó el color de la solución y las perlas. Una solución de color rojo amarillento y perlas rojas indican una prueba positiva. Una solución de color rojo amarillento y perlas amarillas indican una prueba negativa.

Protocolo general para elongación de péptidos con una cadena de perfluoroalquilo

La resina que contenía la secuencia de péptidos de interés (1 equiv.) se hinchó en DMF y el exceso de disolvente se eliminó por filtración. Se añadió una solución de piperidina en DMF (20 % v/v - 0,5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Se drenó la solución y se repitió la operación durante 15 min. Se drenó la solución y se lavó la resina con DMF y CH₂Cl₂. En un vial separado, se añadió DIEA (8 equiv.) a una solución de ácido 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoico (2 equiv.), HBTU (2 equiv.) y HOBT (1,9 equiv.) en DMF (0,5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 min y se añadió a la resina. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se drenó la solución y se lavó la resina con DMF, CH₂Cl₂ y MeOH y se secó al vacío.

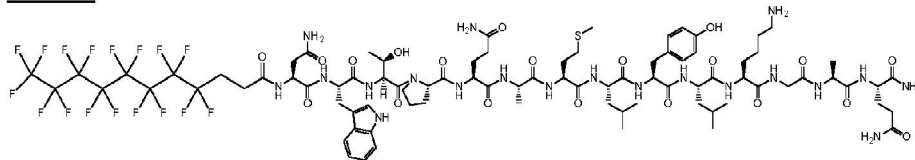
Protocolo general para la escisión de la resina

La resina seca se trató con TFA/fenol/tioanisol/1,2-etanoditiol/agua (10 ml/0,75 g/0,5 ml/0,25 ml/0,5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El filtrado se recolectó en una solución fría de éter dietílico y las perlas se lavaron con TFA. La solución se centrifugó a 3000 rpm durante 2 min. El precipitado se lavó en una solución fría de éter dietílico y se centrifugó a 3000 rpm durante 2 min. Se eliminó la solución de éter dietílico y se secó el precipitado al vacío. El producto crudo se purificó mediante RP-HPLC semipreparativa y se liofilizó.

Ejemplo 2: Análogos de espexina sintetizados y su caracterización

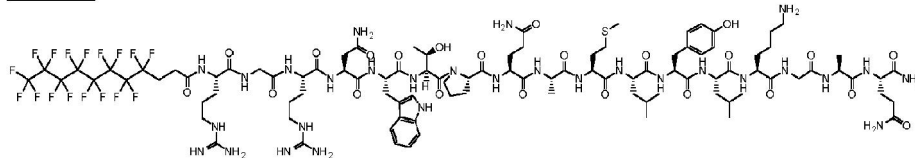
Síntesis de análogos de espexina

LE-144

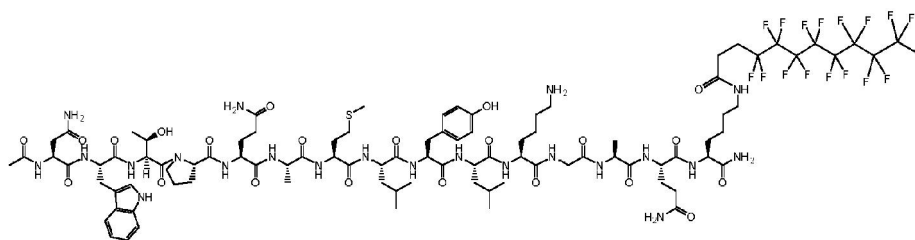


Resina Fmoc-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Rink (23 μmol), ácido 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoico (2 equiv.), HBTU (2 equiv.), HOBT (1,9 equiv.) y DIEA (8 equiv.) se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general, proporcionando el compuesto del título (6,9 mg, 14 %) como un sólido blanco. t_R = 13,60 min (> 95 % de pureza a 220 nm); HRMS (ESI) calculado para C₈₅H₁₁₇F₁₇N₂₀O₂₀S: 2092,82023; encontrado: 2092.81872.

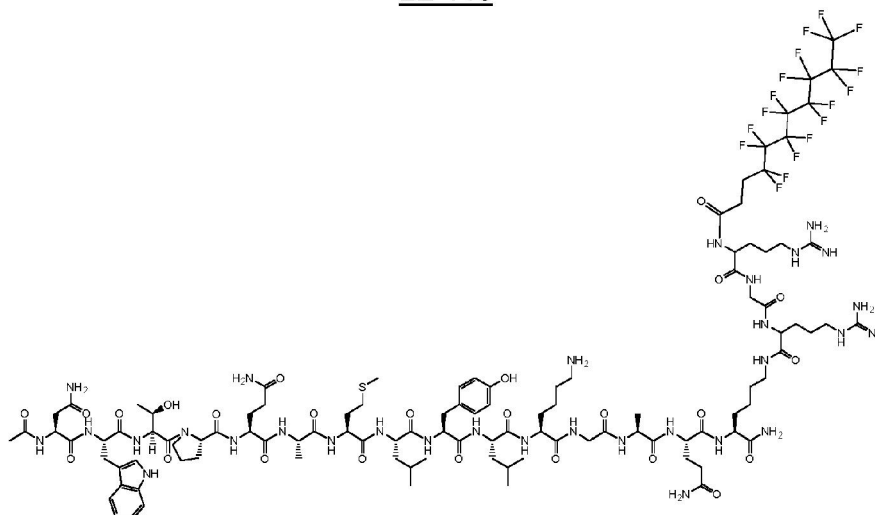
LE-130



Resina Fmoc-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Rink (29 μmol), Fmoc-Arg (Pbf)-OH (4 equiv.), HBTU (3,8 equiv.), HOBT (4 equiv.) y DIEA (12 equiv.) se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general. A continuación, se añadieron Fmoc-Gly-OH (4 equiv.) y Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4 equiv.) con el mismo procedimiento. Finalmente, ácido 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoico (2 equiv.), HBTU (2 equiv.), HOBT (1,9 equiv.) y DIEA (8 equiv.) se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general, proporcionando el compuesto del título (10,5 mg, 13 %) como un sólido blanco. t_R = 11,02 min (> 95 % de pureza a 220,8 nm); HRMS (ESI) calculado para C₉₉H₁₄₄F₁₇N₂₉O₂₃S: 2462.04391; encontrado: 2462.05017.

LE-128

Se trató resina Fmoc-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Lys (ivDde)-Rink (22 μ mol) en una solución de 20 % (v/v) de piperidina en DMF (2 veces durante 15 min). Se drenó la solución de piperidina y se lavó la resina sucesivamente con DMF, CH₂Cl₂ y MeOH (3 x 0,5 ml). La acetilación de la resina NH₂-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Lys (ivDde)-Rink se realizó mediante la adición de 0,5 ml de una solución de 10 % de anhídrido acético y 5 % de DIEA en CH₂Cl₂ durante 10 min. Se drenó la solución de acetilación y se lavó la resina con 0,5 ml de CH₂Cl₂ durante 2 min (3 veces). La eliminación del grupo protector de ivDde se realizó en una solución de hidrazina al 2 % (v/v) en DMF (3 veces durante 3 min). Se drenó la solución de hidrazina y se lavó la resina sucesivamente con DMF, CH₂Cl₂ y MeOH (3 x 0,5 ml). Finalmente, ácido 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoico (2 equiv.), HBTU (2 equiv.), HOBt (1.9 equiv) y DIEA (8 equiv) se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general. Después del tratamiento en condiciones ácidas y precipitación, la mezcla cruda se purificó por RP-HPLC, se concentró bajo vacío y se secó por congelación, proporcionando el compuesto del título (4,5 mg, 8,6 %) como un sólido blanco. t_R = 13,11 min (> 95 % de pureza a 220 nm); HRMS (ESI) calculado para C₉₃H₁₃₁F₁₇N₂₂O₂₂S: 2262,92709; encontrado: 2262.92680.

LE-146

Se realizó el grupo protector Fmoc de la resina Fmoc-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Lys (ivDde)-Rink (21 μ mol) en una solución de piperidina al 20 % (v/v) en DMF (2 veces durante 15 min). Se drenó la solución de piperidina y se lavó la resina sucesivamente con DMF, CH₂Cl₂ y MeOH (3 x 0,5 ml). La acetilación de la resina NH₂-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Lys (CO(CH₂)₂C₈F₁₇)-Rink se realizó mediante la adición de 0,5 ml de una solución de anhídrido acético al 10 % y DIEA al 5 % en CH₂Cl₂ durante 10 min. Se drenó la solución de acetilación y se lavó la resina con 0,5 ml de CH₂Cl₂ durante 2 min (tres veces). La eliminación del grupo protector de ivDde se realizó en una solución de hidrazina al 2 % (v/v) en DMF (3 veces durante 3 min). Se drenó la solución de hidrazina y se lavó la resina sucesivamente con DMF, CH₂Cl₂ y MeOH (3 x 0,5 ml). Se hicieron reaccionar sucesivamente Fmoc-Arg (Pbf) -OH, Fmoc-Gly-OH y Fmoc-Arg (Pbf)-OH de acuerdo con el procedimiento general. La eliminación de N-Fmoc fue seguida por el acoplamiento de ácido 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-heptadecafluoroundecanoico de acuerdo con el procedimiento general. Después del tratamiento en condiciones ácidas y precipitación, la mezcla cruda se purificó por RP-HPLC, se concentró bajo vacío y se secó por congelación proporcionando el compuesto del título (3,1 mg, 5,6 %) como un sólido blanco. t_R = 11,10 min (> 95 % de pureza a 220 nm); LCMS calculado para C₁₀₇H₁₅₈F₁₇N₃₁O₂₅S: 2632.15; hallado: 2633.17.

Caracterización de análogos de espexina

Afinidad

Evaluación de la afinidad de los compuestos por el receptor GAL2 de galanina humana en células CHO transfectadas determinada en un ensayo de unión de radioligando: Protocolo experimental: Se incubaron homogeneizados de

membrana celular (4 µg de proteína) durante 120 min a 22 °C con 0,05 nM [¹²⁵I]galanina en ausencia o presencia del compuesto de prueba en un regulador que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM y BSA al 0,5 %. La unión no específica se determina en presencia de galanina porcina 1 µM. Después de la incubación, las muestras se filtran rápidamente bajo vacío a través de filtros de fibra de vidrio (GF/B, Packard) empapados previamente con PEI al 0,3 % y se enjuagan varias veces con Tris-HCl 50 mM enfriado con hielo utilizando un recolector de células de 96 muestras (Unifilter, Packard). Los filtros se secan y luego se cuenta la radioactividad en un contador de centelleo (Topcount, Packard) usando un cóctel de centelleo (Microscint 0, Packard). Los resultados se expresan como un porcentaje de inhibición de la unión específica del radioligando de control. El compuesto de referencia estándar es la galanina porcina, que se prueba en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de competencia a partir de la cual se calcula su IC₅₀.

EC₅₀

Movilización de calcio: las células CHO que expresan GalR2 se cargaron con 2,5 µM de Fluo-4 AM en presencia de probenidica 2,5 mM. Los aumentos provocados por agonistas en el calcio intracelular se registraron a lo largo del tiempo (intervalos de 5 segundos durante 220 segundos) a 37 °C utilizando un Flexstation III (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Las señales de fluorescencia se registraron a 520 nm (excitación a 485 nm). Las amplitudes de los picos se normalizaron con respecto a la línea base y el nivel de fluorescencia máximo provocado por digitonina 20 µM, y se calcularon las EC₅₀ con el software Graphpad/Prism.

Solubilidad

Se evaluó la solubilidad de cada análogo de espexina después de la disolución en agua para alcanzar 100 µM. La solución resultante se sometió a vórtex durante 1 min seguido de 1 min en baño de sonicación. A continuación, se evaluó la solubilidad mediante observación visual de la dispersión resultante (transparente/turbio y presencia de partículas).

Estabilidad del plasma humano

Este procedimiento está diseñado para determinar la estabilidad de un compuesto de prueba en sangre o plasma de especies humanas o animales en un formato de placa de 96 pocillos. El compuesto de prueba se cuantifica en 5 puntos de tiempo mediante análisis HPLC-MS/MS. Concentración de prueba: 1 µM con una concentración final de DMSO del 0,5 %. Protocolo experimental: la sangre o el plasma se precalientan en un baño de agua a 37 °C durante 5 min, seguido de la adición del compuesto de prueba. La incubación se realiza en un baño de agua a 37 °C durante 2 h. Se transfiere una alícuota de la mezcla de incubación a acetonitrilo a las 0, 0,5, 1, 1,5 y 2 h, respectivamente. A continuación, las muestras se mezclaron y centrifugaron. Los sobrenadantes se utilizan para el análisis HPLC-MS/MS. Los compuestos de referencia Propoxicaína y propantelina se analizan simultáneamente con el compuesto de prueba en cada ensayo. Métodos analíticos Las muestras se analizan mediante HPLC-MS/MS utilizando una monitorización de reacción seleccionado. El sistema de HPLC consiste en una bomba LC binaria con automuestreador, una columna C-18 y un gradiente. Las condiciones pueden ajustarse según sea necesario. Se registran las áreas pico de análisis de datos correspondientes al compuesto de prueba. El compuesto restante (%) se calcula comparando el área pico en cada punto de tiempo con el tiempo cero. La vida media se calcula a partir de la pendiente del rango lineal inicial de la curva logarítmica del compuesto restante (%) frente al tiempo, asumiendo una cinética de primer orden.

Los resultados se presentan en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Péptido	% de afinidad de inhibición a 100 nM	EC ₅₀ de producción de Ca ²⁺ (nM)	Solubilidad en agua (µM)	Estabilidad del plasma humano (t _{1/2} , min)
SPEXIN	68.3 %	37 ± 18	>100	151
LE-144	100.0 %	0.038 ± 0.008	>100	150
LE-130	98.4 %	0.089 ± 0.04	>100	342
LE-128	-	2.3 ± 4.0	-	-
LE-146	-	8.4 ± 0.7	-	-

Los resultados muestran que los análogos de espexina probados exhiben una mejor afinidad y eficiencia que el péptido nativo (espexina), y al menos la misma o mejor hidrosolubilidad y/o estabilidad en plasma.

Adsorción no específica de fluorospexina a tubos de proteína LoBind de Eppendorf

Se evaluó la propensión de los análogos de espexina a unirse a tubos LoBind de proteína Eppendorf.

Se añadió una solución de 10 μM de análogos de espexina en solución en regulador HEPES/BSA a los tubos de LoBind proteína de Eppendorf, se agitó durante 5 min y se sometió a vórtex durante 2 min. Se retiró el sobrenadante del tubo y se añadió acetonitrilo para disolver el compuesto adsorbido al plástico. La cantidad de péptido recuperado se evaluó luego por HPLC-MS/MS siguiendo el mismo protocolo que el descrito anteriormente para el análisis de estabilidad en plasma. La adsorción inespecífica de péptidos (%) se calculó comparando el área pico de cada compuesto recuperado con la obtenida con el mismo compuesto en DMSO (previene la adsorción de los compuestos al plástico).

Los resultados se presentan en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2		
Péptido	Adsorción inespecífica de péptidos (%)	RP-HPLC, tiempo de retención (min)
SPEXIN	0	8.2
LE-144	42	13.6
LE-130	15	10.9

Estos resultados muestran que la presencia del enlazador catiónico permite reducir las interacciones de unión no específicas de la fluorospexina a los tubos LoBind de proteína Eppendorf.

Además, el tiempo de retención de RP-HPLC de cada compuesto destaca la importancia del enlazador para aumentar la solubilidad acuosa global de la fluorospexina en comparación con la espexina nativa.

Efectos de los compuestos sobre la acumulación de AMPc inducida por forskolina

Los efectos se examinaron utilizando el ensayo de AMPc GloSensor™ de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Promega, Madison WI, EE.UU.) con algunas modificaciones. Las células HEK293 seleccionadas para la expresión estable de GALR1 humano se transfectaron con pGloSensor™ -22F usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, EE. UU.). Se recogieron de la placa de cultivo el día siguiente a la transfección y se resuspendieron (10^6 células por ml) en regulador Hepes fisiológico. (HEPES 10 mM, NaH_2PO_4 0,4 mM, NaCl 137,5 mM, MgCl_2 1,25 mM, CaCl_2 1,25 mM, KCl 6 mM, glucosa 5,6 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml, pH 7,4) suplementado con D-Luciferina 1 mM (Synchem UG & Co. KG, Felsberg-Altenburg, Alemania). Después del pre-equilibrio durante 2 h a 25 °C, las células cargadas con D-luciferina se distribuyeron (100,000 células por pocillo) en una placa blanca de 96 pocillos y se adquirieron registros cinéticos de su nivel de luminiscencia utilizando un FlexStation II (Molecular Devices, Sunnyvale CA, Estados Unidos). Los compuestos a ensayar se inyectaron a diversas concentraciones 10 min antes de la adición de forskolina (concentración final 0,5 μM) y se siguieron las lecturas durante 30 min. Los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C en presencia de IBMX 0,1 mM para evitar la degradación del AMPc por las fosfodiesterasas.

Los resultados se presentan en la tabla 3 a continuación:

Tabla 3: actividad de galanina, espexina y derivados de espexina en células HEK293 que expresan de forma estable GalR1

compuesto	EC ₅₀ $\pm$ SEM (nM)	% de actividad a 1 μM
Galanina	0.8 $\pm$ 0.4	100 %
Espexina	n.d.	0
LE-128	n.d.	0
LE-130	n.d.	0
LE-144	n.d.	0
LE-148	n.d.	0
n.d.: no determinado		

Los resultados muestran que, como se esperaba, la galanina mostró una actividad agonista completa en GalR1 con un EO₅₀ de 0,8 nM. La espexina y los derivados de la espexina no mostraron actividad agonista en GalR1 hasta 1 μM .

Ejemplo 3: Resultados in vivo obtenidos con análogos de espexina

Prueba de inmersión de la cola: se realizaron pruebas de nocicepción en ratones macho C57BL/6N despiertos (25-30 g de peso; Janvier Labs, Francia). Los animales se alojaron en grupos de cinco por jaula y se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h a 21 $\pm$ 1 °C con acceso ad libitum a alimentos y agua. Los experimentos se

realizaron durante la fase de luz del ciclo. Los ratones se habituaron a la sala de pruebas y al equipo y se manipularon durante 1 semana antes de comenzar los experimentos de comportamiento. El umbral térmico nociceptivo de los ratones se determinó mediante la prueba de inmersión de la cola. Los ratones fueron inmovilizados en un bolsillo de rejilla, y su cola se sumergió en un baño de agua termostatzado. La latencia (en segundos) para la extracción de la cola del agua caliente ($47 \pm 0,5$ °C) se tomó como una medida de la respuesta nociceptiva. En ausencia de reacción nociceptiva, se estableció un valor de corte de 25 segundos para evitar daño tisular.

Los resultados se muestran en la figura 1.

Los resultados muestran que la inyección intracerebroventricular (icv) de 10 nmol de espexina provocó un efecto analgésico a los 15 y 30 minutos después de la inyección, como lo revela un aumento significativo en las latencias de extracción de inmersión de la cola de los animales en comparación con el umbral de línea base (de $10,45 \pm 0,53$ s umbral basal a $15,38 \pm 0,57$ s a 15 min y $13,06 \pm 0,87$ s a 30 min; $p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente).

La inyección icv de 1 nmol y 0,1 nmol de LE-144 provocó la misma analgesia estadísticamente significativa después de 15 minutos y 30 minutos (1 nmol; línea base: $10,12 \pm 0,59$ segundos, 15 minutos: $15,58 \pm 0,61$ segundos, 30 minutos: $13,94 \pm 0,75$ s; 0,1 nmol; línea base: $9,99 \pm 0,5$ s, 15 min: $14,26 \pm 0,93$ s, 30 min: $14,06 \pm 0,34$ s).

Listado de referencias

1. Howard et al., FEBS Letts., 405: 285-290, 1997
2. Smith et al., J. Biol. Chem. 272: 24612-24616, 1997
3. Wang et al., Mol. Pharmacol., 52: 337-343, 1997
4. O'Donnell et al., J. Comp. Neurol., 409: 469-481, 1999
5. Waters et Kraus, Neurosci., 95: 265-271, 2000
6. Hawes et al., J. Comp. Neurol., 479: 410-423, 2004
7. Mirabeau et al., Genome Res., 17: 320-327, 2007
8. Kim et al., Endocrinol., 155: 1864-1873, 2014
9. International Application WO 2012/042455
10. Reyes-Alcaraz et al., Scientific Reports, 6: 21453, DOI: 10.1038/srep21453, 2016
11. Walewski et al., Obesity, 22 : 1643-1652, 2014
12. Liu et al., Mol. Cell Endocrinol., 374(1-2) : 65-72, 2013
13. Toll et al., Faseb J., 26 : 947-954, 2012

Listado de secuencias

<110> UNIVERSITE DE STRASBOURG
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
BONNET, Dominique
SIMONIN, Frederic
LE COZ, Glenn-Marie
ESTEOULLE, Lucie

<120> ANÁLOGOS DE PÉPTIDOS DE ESPEXINA METABÓLICAMENTE ESTABLES

<130> BNT220810PC00

<150> EP16305734.2

<151> 2016-06-16

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> análogo de espexina de fórmula (I)

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 5 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es Asn, Pro, Ala o hidrógeno
 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (3)..(3)
 15 <223> Xaa es Thr o Pro
 <220>
 20 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Pro o Ala
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 30 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Met o Ala
 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (8)..(8)
 40 <223> Xaa es Leu o Ala
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 45 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es Ala, Pro o NH2
 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (14)..(14)
 55 <223> Xaa es Gln, Pro, Ala o NH2, cuando Xaa en la posición 13 no es NH2
 <400> 1
 Xaa Trp Xaa Xaa Gln Ala Xaa Xaa Tyr Leu Lys Gly Xaa Xaa
 60 1 5 10
 <210> 2
 <211> 14
 65

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> compuesto LE144

<400> 2

10 Asn Trp Thr Pro Gln Ala Met Leu Tyr Leu Lys Gly Ala Gln
1 5 10

<210> 3

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Compuesto LE 130

25 <400> 3

Arg Gly Arg Asn Trp Thr Pro Gln Ala Met Leu Tyr Leu Lys Gly Ala
1 5 10 15

Gln

<210> 4

30 <211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Compuesto LE 128

40 <400> 4

Asn Trp Thr Pro Gln Ala Met Leu Tyr Leu Lys Gly Ala Gln Lys
1 5 10 15

45 <210> 5

<211> 18

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Compuesto LE 146

<400> 5

ES 2 882 007 T3

Asn	Trp	Thr	Pro	Gln	Ala	Met	Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ala	Gln	Lys	Arg
1				5					10					15	

Gly Arg

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de espexina que tiene el siguiente péptido de fórmula (I):

5 Xaa1-Trp-Xaa2-Xaa3-Gln-Ala-Xaa4-Xaa5-Tyr-Leu-Lys-Gly-Xaa6-Xaa7 (I)

en el que

Xaa1 es Asn, Pro o Ala o hidrógeno;

10

Xaa2 es Thr o Pro;

Xaa3 es Pro o Ala;

15

Xaa4 es Met o Ala;

Xaa5 es Leu o Ala;

Xaa6 es Ala, Pro o NH₂;

20

Xaa7 es Gln, Pro, Ala o NH₂, cuando Xaa6 no es NH₂,

en el que dicho péptido de fórmula (I) está enlazado covalentemente a un grupo fluorocarbono de fórmula (II):

25

$C_m F_n - C_y H_x (L)$ (II)

en el que $m = 3$ a 30 , $n \leq 2m + 1$, $y = 0$ a 2 , $x \leq 2y$, $(m + y) = 3$ a 30 , y L, que es opcional, es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en un PEG o un péptido que tiene de 1 a 6 aminoácidos,

30

directamente o a través de un enlazador seleccionado del grupo que consiste en un PEG o un péptido que tiene de 1 a 6 aminoácidos, ya sea en el grupo épsilon-amino de la lisina del péptido de fórmula (I), y cuando el enlazador es una lisina, el grupo fluorocarbono está enlazado al grupo amino o al grupo épsilon-amino de dicha lisina.

35

2. El análogo de espexina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho péptido está además enlazado covalentemente a un grupo acetilo y/o un grupo acilo $-C(O)R$ donde R es un alquilo C_{7-30} .

3. El análogo de espexina de acuerdo con bien sea una de las reivindicaciones 1 o 2, que es un análogo metabólicamente estable y no inmunógeno que es completamente hidrosoluble al pH fisiológico.

40

4. El análogo de espexina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho grupo acilo tiene la siguiente fórmula (III):

$CH_3 - C_y H_x - C(O) -$ (III)

45

en la que $y = 7$ a 30 , $x = 2y$.

5. El análogo de espexina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se selecciona de:

50

i) $CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2C(O)-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln$;

ii) $CF_3(CF_2)_7(CH_2)_2C(O)-Arg-Gly-Arg-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln$;

iii) Acetil-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Lys($C(O)(CH_2)_2(CF_2)_7CF_3$);

55

iv) Acetil-Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-Lys($Arg-Gly-Arg-(C(O)(CH_2)_2(CF_2)_7CF_3)$);

v) un análogo de espexina con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de (i), (ii), (iii) o (iv).

60

6. El análogo de espexina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso como fármaco.

7. El análogo de espexina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con GALR2 o un trastorno relacionado con GALR2 seleccionado de:

- enfermedad cardiovascular: insuficiencia cardíaca, enfermedades renales (por ejemplo, insuficiencia renal, nefritis, etc...), hipertensión, hipertensión pulmonar, cirrosis, arteriosclerosis, enfisema pulmonar, edema pulmonar, apoplejía, isquemia cerebral, deterioro del miocardio en la sepsis, miocardiopatía;

5 - el síndrome de hormona antidiurética inapropiada (SIADH);

- enfermedades metabólicas: obesidad, anorexia, hiperfagia, polifagia, hipercolesterolemia, hipergliceridemia, hiperlipemia;

10 - diversos tipos de demencia: demencia senil, demencia cerebrovascular, demencia debida a enfermedades degenerativas de desnaturalización genealógica, demencia resultante de enfermedades infecciosas, demencia asociada a enfermedades endocrinas, enfermedades metabólicas o intoxicaciones, demencia provocada por tumores y demencia debida a enfermedades traumáticas, depresión, síndrome del niño hiperactivo, alteración de la conciencia, trastorno de ansiedad, esquizofrenia, fobia;

15 - dolor e hiperalgesia;

- diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, resistencia a la insulina, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia.

20 8. Una composición farmacéutica que comprende un análogo de espexina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

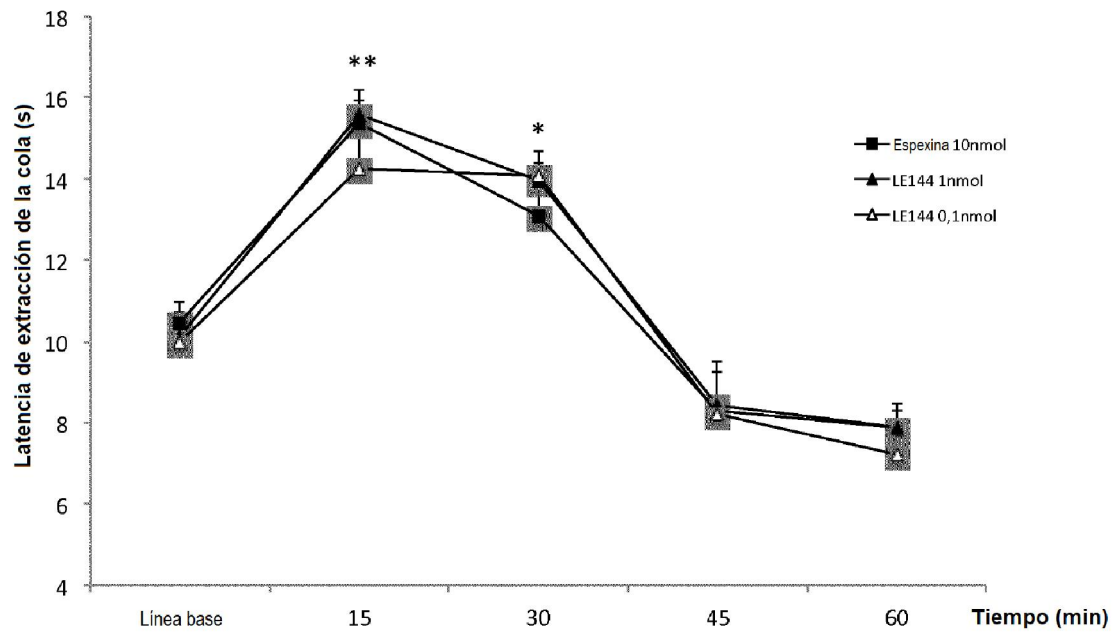


FIGURA 1