



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 663**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02758940 .7**

96 Fecha de presentación : **28.08.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1423413**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2004**

54 Título: **Compuestos peptídicos que se unen selectivamente a P-selectina.**

30 Prioridad: **03.09.2001 EP 01203314**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.04.2010**

73 Titular/es: **Astellas Pharma Europe B.V.**  
**Elisabethhof 19**  
**2353 EW Leiderdorp, NL**

72 Inventor/es: **Molenaar, Thomas, Jacobus, Maria;**  
**Kuiper, Johan;**  
**Van Berkel, Theodorus, Josephus, Cornelis y**  
**Biessen, Erik, Anna, Leonardus**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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 que se unen selectivamente a P-selectina.

La presente invención se refiere a compuestos que se unen selectivamente a la molécula de adhesión P-selectina humana, a métodos para preparar tales compuestos, al uso de tales compuestos en métodos terapéuticos o diagnósticos y en composiciones farmacéuticas, a ácidos nucleicos que codifican para materiales proteínicos que comprenden las secuencias de aminoácidos de dichos compuestos, a vehículos de aporte de genes que comprenden tales ácidos nucleicos, a moléculas de unión que se unen a dichos compuestos y a un método para determinar si un compuesto es capaz de unirse a P-selectina.

## Antecedentes de la invención

En los últimos años, las moléculas de adhesión a la superficie celular se han reconocido como mediadores clave en numerosos procesos celulares incluyendo el crecimiento y la diferenciación celulares, la trans migración y la respuesta de células inmunitarias y la metástasis del cáncer. Se han identificado cuatro categorías principales de moléculas de adhesión: La superfamilia de inmunoglobulinas moléculas de adhesión celular (CAMs), cadherinas, integrinas y selectinas. Las selectinas representan una familia de actualmente tres glicoproteínas transmembranas que se unen a carbohidratos: E-selectina "endotelial", L-selectina "leucocitaria" y P-selectina "plaquetaria". Las tres selectinas dependen de cationes divalentes (p. ej. calcio) y poseen un dominio extracelular con un motivo de reconocimiento de carbohidrato, un motivo similar al factor de crecimiento epidérmico y algunos dominios menores relacionados con proteínas reguladoras del complemento.

La P-selectina humana (también denominada GMP-140, LECAM-3, PAD-GEM, CD62, CD62P) es expresada por plaquetas y células endoteliales. Cuando se expresa sobre las superficies de estas células, su efecto más notable es la pérdida de velocidad de leucocitos a medida que estos abandonan los capilares y entran en las vénulas poscapilares, representando las últimas la zona principal de adhesión leucocito-endotelio. El proceso de pérdida de velocidad se observa como rodamiento de leucocitos, que significa una adhesión inicial con una afinidad relativamente baja. La adhesión firme de leucocitos rodantes está mediada principalmente por integrinas.

En las células endoteliales, la P-selectina se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade; en las plaquetas, se encuentra en los gránulos  $\alpha$ . Después de la activación, la P-selectina se moviliza hasta las superficies celulares en unos pocos minutos en respuesta a una variedad de agentes inflamatorios o trombogénicos. La función primaria de la P-selectina endotelial es reclutar leucocitos hacia las vénulas poscapilares, mientras que la P-selectina plaquetaria también da como resultado la formación de trombos. Uno de los ligandos de P-selectina actualmente conocidos es el PSGL-1 (ligando 1 de glicoproteína de P-selectina), una sialoproteína de 160 kDa expresada sobre la superficie de leucocitos donde se concentra en el urópodo. Descripciones más detalladas de la estructura y las funciones de la P-selectina se encuentran en numerosas publicaciones, tales como J. Panes, *Pathophysiology* 5, 271 (1999); F. Chamoun *et al.*, *Frontiers in Bioscience* 5, e103 (1 de nov. de 2000); S.-I. Hayachi, *Circulation* 102, 1710 (2000).

La P-selectina también parece estar implicada más directamente en la agregación de plaquetas, como se mostraba recientemente mediante estudios de las interacciones independientes del Ca de P-selectina con galactosilceramida sulfatada en 3 (también denominada sulfátidos). Esta interacción probablemente tiene lugar en un sitio de unión diferente de P-selectina, ya que la unión puede ser inhibida por el anticuerpo WASP12.2, pero no por AK4, mientras que la unión del ligando de P-selectina natural PSGL-1, que está implicado en la adhesión de leucocitos, es bloqueada tanto por WASP12.2 como por AK4. Sin embargo, parece que los sitios de unión están solapados. Se supone que las interacciones con sulfátidos estabilizan los agregados de plaquetas.

La inflamación y los procesos inflamatorios representan un papel fundamental en la patofisiología de numerosas enfermedades y afecciones. Afecciones del cerebro en la que se encontraban niveles incrementados de selectina, y que por lo tanto pueden implicar episodios patofisiológicos mediados por selectina, incluyen lesión cerebral traumática grave, esclerosis múltiple recurrente-remitente, oclusión de las arterias cerebrales, isquemia y apoplejía. Afecciones del corazón en las que se sugiere que las selectinas representan un papel incluyen infarto de miocardio agudo, lesión arterial, tal como la producida por angioplastia, e isquemia. De forma similar, las selectinas están implicadas en afecciones de los riñones, tales como lesión renal por isquemia y reperfusión, y fallo renal. Por otra parte, las selectinas parecen representar un papel en el rechazo del trasplante de órganos, la isquemia fría, el choque hemorrágico, el choque séptico, la metástasis tumoral, la inflamación crónica, la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria del intestino, la aterosclerosis, la reestenosis, la angiogénesis, la coagulación intravascular diseminada, el síndrome de fatiga respiratoria del adulto y el choque circulatorio.

Así, parecería factible mejorar estas y otras afecciones que implican la activación de células endoteliales y leucocitos y específicamente la movilización y la expresión de P-selectina interrumpiendo específicamente las cascadas de P-selectina. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante la administración de ligandos que se unen selectivamente a P-selectina humana, pero que no poseen su bioactividad. Mediante este método, la P-selectina movilizada podría inactivarse y el daño tisular inducido por leucocitos podría prevenirse. Potencialmente, el mismo efecto podría conseguirse mediante terapia génica, con tal de que el ligando o el antagonista de P-selectina sea un péptido o un péptido modificado. De acuerdo con este método, las células somáticas de una persona que necesite la terapia se transfectarían con un vector de expresión que tiene una secuencia de DNA que codifica un antagonista de P-selectina.

Los ligandos o antagonistas de P-selectina también pueden usarse para la prevención de enfermedades y afecciones descritas anteriormente. Por otra parte, tales ligandos también pueden ser útiles en la diagnosis de estas enfermedades *in vivo* o *in vitro*.

5 En los últimos años, se han realizado diversos intentos de identificar o crear tales ligandos selectivos para P-selectina. Hasta ahora, se ha probado un número de sustancias, pero los estudios clínicos no han proporcionado todavía una evidencia concluyente de que alguno de estos compuestos produzca los efectos clínicos deseados siendo a la vez tolerable en términos de efectos secundarios.

10 Por ejemplo, se encontró que los anticuerpos para P-selectina que se producían y se probaban en modelos animales protegían los riñones de la lesión isquémica por reperusión (H. C. Rabb *et al.*, JASN 5, 907, 1997; US-A-6.033.667). En otro estudio, se usó una forma soluble recombinante de ligando-1 de glicoproteína de P-selectina (rPSGL-Ig) para inhibir la trombosis en gatos (M. J. Eppihimer *et al.*, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 20, 2483, 2000). WO-A-96/09309 divulga estructuras de oligosacárido que son ligandos para E- y P-selectina. WO-A-99/41363 divulga proteínas similares a podocalixina que se unen a selectinas. WO-A-00/41711 describe diversos péptidos o secuencias peptídicas menores que se unen a miembros de la familia de selectinas humanas; la mayoría de las secuencias comprende una o más unidades de leucina o isoleucina.

20 Como otro sistema para inhibir la cascada de P-selectina, se encontró que diversos péptidos derivados del dominio de lectina de la familia de selectinas inhiben la adhesión de neutrófilos a P-selectina (p. ej. US-A-6.111.065 y US-A-5.916.876); estos péptidos probablemente se unen a receptores de P-selectina sobre leucocitos.

25 En WO-A-94/05269, se describen péptidos que inhiben la unión de selectinas tales como P-selectina, E-selectina y L-selectina. Estos péptidos tienen como su región central porciones de la secuencia de 11-18 aminoácidos de P-selectina, E-selectina o L-selectina. Por otra parte, WO-A-95/31210 se refiere a péptidos y compuestos que se unen a selectinas, incluyendo molécula 1 de adhesión a leucocitos endoteliales (ELAM-1). Estos péptidos se usan para bloquear la adhesión de leucocitos a las selectinas, es decir, especialmente E-selectina, pero también P-selectina o L-selectina, con el propósito de inhibir la inflamación.

30 A pesar de estos esfuerzos, todavía existe una necesidad de sustancias con afinidad selectiva hacia P-selectina, que puedan usarse para preparar composiciones farmacéuticas para la diagnosis, la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones que implican la adherencia de leucocitos a células endoteliales vasculares o a plaquetas. También existe una necesidad de ligandos de P-selectina, que puedan usarse como moléculas o restos de orientación en composiciones farmacéuticas para la orientación de fármacos o material genético hacia tejidos que expresan P-selectina.

### Objetivos de la invención

40 Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar compuestos con afinidad hacia P-selectina humana.

En particular, un objetivo de la invención es proporcionar compuestos que actúen como antagonistas o antagonistas parciales de P-selectina.

45 Otro objetivo de la invención es proporcionar compuestos que actúen como ligandos de orientación con una capacidad para orientar fármacos y material genético hacia células y tejidos que expresan P-selectina.

Un objetivo adicional de la invención es la presentación de métodos para preparar tales compuestos.

50 Otro objetivo más es la presentación de usos de tales compuestos y de composiciones que contienen los compuestos.

Otros objetivos de la presente invención estarán claros basándose en la siguiente descripción.

### Sumario de la invención

55 En un primer aspecto, la presente invención proporciona compuestos con afinidad selectiva hacia P-selectina humana. Los compuestos de la invención son péptidos.

60 Comprenden la secuencia  $XA_xA_8A_1A_2A_1Y$ , en la que  $A_1$  es un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en cisteína (C), metionina (M) y valina (V);  $A_2$  es ácido D- o L-aspártico (D) y  $A_3$  es un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W);  $A_x$  es cualquier D- o L-aminoácido; X es cualquier grupo o secuencia N-terminal; e Y es cualquier grupo o secuencia C-terminal. Los compuestos tienen una constante de afinidad para P-selectina humana típicamente en el intervalo micromolar, pero su afinidad se incrementa sustancialmente cuando están configurados como multímeros con una valencia de 2 o más.

65 En WO-A-00/34303, se describe una secuencia que contiene 610 aminoácidos que comprende las secuencias Val-Val-Glu-Cys (VVEC) y Phe-Val-Glu-Cys (FVEC). Estas secuencias no cumplen los requisitos estructurales de la reivindicación 1. La P-selectina no se menciona en esta WO-A-00/34303.

En un segundo aspecto, la invención proporciona métodos para la preparación de tales compuestos. Los métodos incluyen la ligación química y enzimática de aminoácidos, monómeros u oligómeros para ensamblar los compuestos. También incluyen la expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican los compuestos en células huésped, usando un vector para transfectar las células huésped con las secuencias de ácido nucleico.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de los compuestos de la invención para preparar composiciones farmacéuticas o diagnósticas que son adecuadas para inhibir la unión de leucocitos a plaquetas y células endoteliales *in vitro* e *in vivo* así como para la inhibición directa de la agregación de plaquetas. Como medicamentos, las composiciones pueden ser útiles en el tratamiento y la prevención de afecciones y trastornos que implican la activación de la unión mediada por P-selectina de leucocitos a plaquetas y células endoteliales, tales como trastornos trombóticos, isquemia, reestenosis, aterosclerosis, fallo renal, enfermedades parasitarias, tumores y metástasis tumorales; por otra parte, los compuestos y las composiciones pueden ser útiles en el diagnóstico, la prevención y la terapia de enfermedades y afecciones que implican la agregación de plaquetas, tales como trombosis, apoplejía y ataques cardíacos. Las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención pueden adaptarse para diversas rutas de administración, tales como parenteral, oral, transmucosal, nasal o pulmonar. Pueden contener además agentes de orientación de fármacos, agentes de mejora de la biodisponibilidad o ingredientes activos distintos de los compuestos de la invención, y proporcionar liberación inmediata o modificada.

En un aspecto adicional más, la presente invención se refiere a un método para determinar si una molécula comprende una afinidad de unión para P-selectina, que comprende poner en contacto P-selectina con dicha molécula y con un compuesto de acuerdo con la invención, seguido por determinar si se reduce la unión de dicho compuesto a dicha P-selectina.

Además, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una molécula proteínica que comprende una secuencia de aminoácidos  $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ , en la que  $A_x$ ,  $A_3$ ,  $A_1$  y  $A_2$  se definen como anteriormente en la presente memoria y en la que X es el lado N-terminal de dicha secuencia e Y es el lado C-terminal de dicha secuencia.

Según se usa en la presente memoria, moléculas proteínicas son compuestos basados en secuencias de aminoácidos, tales como proteínas y oligo- o poli-péptidos. Dicho ácido nucleico puede usarse para la preparación de un medicamento, aunque además los vehículos de aporte de genes que comprenden dicho ácido nucleico también están dentro del alcance de la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención también abarca moléculas de unión que son capaces de unirse específicamente a un compuesto de la invención.

Por otra parte, la presente invención se refiere a un método para determinar si un compuesto es capaz de unirse a P-selectina humana, que comprende sustituir, en un compuesto de acuerdo con la invención, un aminoácido por un aminoácido conservativo y determinar si el compuesto resultante es capaz de unirse a dicha P-selectina.

#### Descripción detallada de la invención

Los compuestos de la invención tienen una afinidad hacia P-selectina humana, una glicoproteína de membrana expresada por células endoteliales vasculares y plaquetas, que está implicada en la adhesión de leucocitos al endotelio y las plaquetas. La afinidad o las características de unión de los compuestos a P-selectina pueden cuantificarse, por ejemplo, en términos de la constante de afinidad ( $IC_{50}$ ). Típicamente, una constante de afinidad de aproximadamente 60-100  $\mu M$  o menos se consideraría como evidencia de afinidad y unión. Más deseables para los ligandos son sustancias con constantes de afinidad de aproximadamente 10  $\mu M$  o menos. La constante de afinidad más alta alcanzable para los enlaces de tipo no covalente que representan un papel en las interacciones o uniones de acuerdo con la presente invención es aproximadamente  $10^{-15}$  M. Generalmente, sin embargo, las constantes de afinidad son mayores de aproximadamente  $10^{-12}$  M y en la mayoría de los casos mayores de aproximadamente  $10^{-9}$  M.

Por otra parte, un compuesto de la invención comprende un péptido. Los péptidos se definen como amidas que se derivan de dos o más aminoácidos mediante la combinación del grupo amino de uno con el grupo carboxilo de otro (Merriam Webster Medical Dictionary ©2001). Según se usa en la presente memoria, un péptido también puede referirse a una estructura peptídica dentro de una molécula. Típicamente, los péptidos están compuestos por L- $\alpha$ -aminoácidos presentes en la naturaleza, que son alanina (Ala o A), arginina (Arg o R), asparagina (Asn o N), ácido aspártico (Asp o D), cisteína (Cys o C), glutamina (Gln o Q), ácido glutámico (Glu o E), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), metionina (Met o M), fenilalanina (Phe o F), prolina (Pro o P), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), triptófano (Trp o W), tirosina (Tyr o Y) y valina (Val o V).

Los compuestos de la invención también incluyen sales de péptidos, tales como sales de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptables. También incluyen multímeros de péptidos.

Los compuestos de la invención se caracterizan porque comprenden la secuencia  $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ , en la que  $A_1$  es una D- o L-cisteína (C), D- o L-metionina (M) o D- o L-valina (V);  $A_2$  es un ácido D- o L-aspártico (D);  $A_3$  es una D- o L-fenilalanina (F), D- o L-tirosina (Y) o D- o L-triptófano (W);  $A_x$  es un D- o L-aminoácido, y en la que X marca el lado N-terminal de dicha secuencia e Y marca el lado C-terminal de dicha secuencia o en la que X e Y juntos pueden formar un sistema cíclico. Más particularmente, X es un hidrógeno o un residuo que comprende de 1 a

6 D- o L-aminoácidos; Y es un hidroxilo o un residuo que comprende de 1 a 11 D- o L-aminoácidos terminados por un hidroxilo.

- 5 De acuerdo con la invención, las dos unidades de  $A_1$  dentro de la secuencia se seleccionan independientemente; pueden ser idénticas o diferentes entre sí. Preferiblemente, al menos una de las unidades de  $A_1$  representa valina (V). Más preferiblemente, ambas unidades de  $A_1$  son valina (V).

10 Particularmente, la invención también abarca un método para determinar si un compuesto es capaz de unirse a P-selectina humana, que comprende sustituir, en un compuesto de acuerdo con la invención, un aminoácido por un aminoácido conservativo y determinar si el compuesto resultante es capaz de unirse a dicha P-selectina. A la luz de esto, se ha encontrado, y también es parte de la presente invención, que la composición precisa de aminoácidos del péptido se hace - al menos para los aminoácidos  $A_2$  y  $A_3$  - algo menos crítica con números crecientes de aminoácidos en el péptido. Por ejemplo, se ha encontrado que un péptido que comprende más de 10 y preferiblemente más de 12 aminoácidos, que comprende fenilalanina (F) en lugar de triptófano (W) como  $A_3$ , es capaz de unirse específicamente a P-selectina humana. No obstante, cuando el péptido comprende 6 aminoácidos, dicha sustitución de triptófano por fenilalanina no conduce a un péptido que se une específicamente. Otro ejemplo de un equivalente de acuerdo con la presente invención es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos  $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$  y que comprende 15 aminoácidos que comprenden un ácido glutámico (E) en la posición  $A_2$  en lugar de ácido aspártico (D) y que da una unión específica a P-selectina. Sin embargo, cuando la cadena peptídica tiene solo 6 aminoácidos, la misma sustitución no da un péptido que se une específicamente. Por ejemplo, la secuencia EWVEVA tiene una afinidad de unión de 1.600  $\mu\text{M}$ , mientras que un 15-mero que tiene dicha secuencia tiene una afinidad de unión de menos de 10  $\mu\text{M}$ . Sin querer limitarse por ninguna teoría, se supone que el efecto de la longitud del péptido está relacionado con la conformación del péptido, que tiene un impacto sobre la capacidad de unión. Cuando los péptidos de la presente invención son al menos decámeros o, preferiblemente al menos dodecámeros,  $A_3$  y  $A_2$  pueden representar F y E, respectivamente.

25 De acuerdo con la invención,  $A_2$  es un D- o L-aminoácido con una cadena lateral expuesta a disolvente, que tiene una carga negativa a pH fisiológico, seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E). En una realización preferida,  $A_2$  es bien ácido L-glutámico (E) o bien ácido L-aspártico (D).

30  $A_3$  es un D- o L-aminoácido con una cadena lateral aromática seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). Más preferiblemente,  $A_3$  es un L-aminoácido seleccionado de este grupo. El más preferido es el triptófano (W).

35  $A_x$  puede ser un D- o L-aminoácido. Sin embargo, se requiere la presencia de  $A_x$ , ya que se ha encontrado que los compuestos sin  $A_x$  muestran generalmente una escasa unión a P-selectina en comparación con compuestos similares que comprenden  $A_x$ . En una de las realizaciones preferidas,  $A_x$  es un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E). En esta realización, las características de  $A_x$  se asemejan a las de  $A_2$ ; este compuesto puede definirse por comprender la secuencia  $XA_2A_3A_1A_2A_1Y$ . No obstante, ha de apreciarse que las 2 unidades de  $A_2$  (como las 2 unidades de  $A_1$ ) se seleccionan independientemente, es decir, pueden ser idénticas o diferentes entre sí.

40 X se define como cualquier grupo o secuencia N-terminal. Por ejemplo, X puede ser simplemente un hidrógeno. Más preferiblemente, X es una secuencia de uno o más aminoácidos, o sus análogos o miméticos. En una de las realizaciones preferidas, X comprende al menos dos aminoácidos. Más preferiblemente, X comprende ácido aspártico (D), preferiblemente conectado a  $A_x$  a través de un espaciador que consiste en otro aminoácido.

45 Y se define como cualquier grupo o secuencia C-terminal. Si no están comprendidos aminoácidos o análogos en Y, el grupo C-terminal puede ser un grupo hidroxilo. En una realización preferida, Y es una secuencia de hasta aproximadamente cinco unidades de aminoácido. También se prefiere que al menos un aminoácido con una cadena lateral cargada negativamente esté presente en Y, preferiblemente estando separada de la secuencia  $XA_xA_3A_1A_2A_1$  restante por de uno a tres aminoácidos. El reconocimiento por P-selectina es más tolerante a los sustituyentes en el extremo C que en el extremo N. El experto es competente para encontrar aminoácidos adecuados a este respecto.

50 El compuesto de la invención puede poseer una cadena principal cíclica o restringida de otro modo. En ese caso, X+Y juntos pueden estar conectados adecuadamente a través de una unión cys-cys, aunque, por supuesto, también pueden estar presentes otros tipos de enlaces (químicos), tales como una unión amida, una unión tioéter, una unión carbamato o una unión éster.

60 La longitud del grupo X+Y no es particularmente crítica con tal de que la secuencia central sea reconocida por P-selectina. Generalmente, la longitud mínima de X+Y corresponde con la longitud de 6-6 aminoácidos.

65 En una de sus realizaciones, la invención proporciona compuestos que poseen, además de las características estructurales indicadas anteriormente, una unidad  $A_4$  en el extremo C- o N-terminal, en donde  $A_4$  es un D- o L-aminoácido con una cadena lateral hidrófila. Preferiblemente,  $A_4$  es serina (S), glicina (G), lisina (K), arginina (R) o ácido glutámico (E). El más preferido es la serina (S). Una posición preferida para  $A_4$  está entre Y y la parte restante de la secuencia, según se representa por las secuencias  $A_xA_xA_3A_1A_2A_1A_4Y$  y  $XA_2A_3A_1A_2A_4Y$ .

Los compuestos de la invención poseen cadenas principales lineales, ramificadas, cíclicas o restringidas. Por ejemplo, los péptidos con al menos dos unidades de cisteína (C) pueden ciclarse mediante oxidación. Si un compuesto se cicla a través de tal unión disulfuro, se prefiere que las unidades de cisteína participantes sean miembros de X e Y, respectivamente. De hecho, las estructuras cíclicas son un ejemplo de cadenas principales restringidas conformacionalmente. También pueden introducirse otros tipos de estructuras restringidas para disminuir la flexibilidad conformacional del compuesto. Especialmente, la presencia de uniones olefínicas o pequeñas estructuras anulares en la cadena principal sirve para este propósito. Ejemplos de tales restricciones se dan en Pharmaceutical Biotechnology, Ed. D. J. A. Crommelin y R. D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, p. 139 y siguientes.

En una de las realizaciones preferidas, los compuestos de la invención se proporcionan como multímeros de péptidos. Según se usa en la presente memoria, multímeros, que en la química de los péptidos también se denominan oligómeros, se refiere a péptidos o proteínas, que están compuestos por más de una cadena peptídica. Por ejemplo, se encontró que los tetrámeros de péptidos biotinilados que comprenden la secuencia  $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$  poseen una afinidad sustancialmente superior hacia P-selectina que los péptidos de los que estaban compuestos. Los multímeros preferidos de la invención tienen una constante de afinidad para P-selectina de menos de 1/20, y especialmente menos de 1/100, de la constante de afinidad de los péptidos correspondientes.

En otro tipo de multímero que puede crearse para formar los compuestos de la invención, cadenas peptídicas simples se acoplan a una proteína biocompatible, tal como albúmina de suero humano, anticuerpos humanizados, liposomas, micelas, polímeros sintéticos, nanopartículas y fagos. Los multímeros también pueden representar secuencias peptídicas que están acopladas en serie entre sí a través de espaciadores, es decir concatámeros, o dendrímeros, o aglomerados.

Los compuestos pueden prepararse generalmente mediante los métodos que son conocidos para la preparación de péptidos. Los compuestos menores que contienen solo unos pocos aminoácidos, y preferiblemente no más de 30-60 unidades, pueden prepararse mediante técnicas de ligación químicas o enzimáticas, bien usando el sistema clásico en el que las reacciones tienen lugar en solución o suspensión o bien empleando el sistema en fase sólida más moderno, en el que el péptido se ensambla mientras está anclado a una superficie sólida, tal como una cuenta polímera. Los compuestos mayores se sintetizan típicamente mediante sintetizadores automáticos de péptidos en fase sólida.

Alternativamente, los compuestos pueden prepararse mediante técnicas de ingeniería genética conocidas. Este sistema es especialmente válido si el compuesto es en efecto un péptido. Por ejemplo, una secuencia de DNA que codifica el compuesto puede asociarse o combinarse con un vector de expresión capaz de transfectar células. En otra etapa del método, células huésped o células diana se transfectan con dicho DNA poniendo en contacto las células con el vector y el DNA asociado al vector bajo condiciones que permiten la transfección. En una etapa adicional, las células huésped o diana se cultivan bajo condiciones que permiten la expresión del compuesto. Subsiguientemente, el compuesto puede aislarse. Si el compuesto no puede codificarse o expresarse por sí mismo pero es muy similar a un péptido que puede codificarse o expresarse, el método puede aplicarse para preparar el péptido al que es similar el compuesto, seguido por una o más etapas en las que el péptido se modifica mediante técnicas químicas o enzimáticas para preparar el compuesto.

Diversos tipos de vectores se usan con este propósito, tales como vectores virales, lipoplexes, poliplexes, microesferas, nanoesferas, dendrímeros, DNA desnudo, sistemas de aporte de péptidos, lípidos, especialmente lípidos catiónicos, o liposomas hechos de ellos, vectores polímeros, especialmente los hechos de polímeros policatiónicos. Entre los vectores virales preferidos están retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus de herpes simple y virosomas. Vectores no virales preferidos incluyen quitosano, SPLP, sistemas polímeros basados en PLGA, polietileniminas, polilisinas, polifosfoamidatos, poli(met)acrilatos, polifosfacenos; DOPE, DOTAP y DOTMA.

Algunos de los resúmenes más exhaustivos de métodos que pueden aplicarse en la preparación de los compuestos se describen en: W. F. Anderson, Nature 392 Supp., 30 de abril de 1998, p. 25-30; Pharmaceutical Biotechnology, Ed. D. J. A. Crommelin y R. D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, p. 53-70, 167-180, 123-152, 8-20; Protein Synthesis, Methods and Protocols, Ed. R. Martin, Humana Press, 1998, p. 1-442; Solid-Phase Peptide Synthesis, Ed. G. B. Fields, Academic Press, 1997, p. 1-780; Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press, 1997, p. 1-89.

Las sales de péptidos se preparan mediante métodos conocidos, que implican típicamente la mezclado del péptido bien con un ácido farmacéuticamente aceptable para formar una sal de adición de ácido o bien con una base farmacéuticamente aceptable para formar una sal de adición de base. Que un ácido o una base sea farmacéuticamente aceptable puede ser decidido fácilmente por un experto en la técnica después de tener en cuenta el uso pretendido específico del compuesto. Por ejemplo, no todos los ácidos o las bases que son aceptables para composiciones diagnósticas *in vitro* pueden usarse para composiciones terapéuticas. Dependiendo del uso pretendido, los ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido maleico, ácido malónico, ácido cinámico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico y ácido tiocianico, que forman sales amónicas con grupos amino libres de péptidos.

Bases farmacéuticamente aceptables, que forman sales de carboxilato con grupos carboxílicos libres de péptidos, incluyen etilamina, metilamina, dimetilamina, trietilamina, isopropilamina, diisopropilamina y otras mono-, di- y tri-alquilaminas, así como arilaminas. Por otra parte, también se abarcan solvatos, complejos o aductos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos o eturatos.

Los multímeros pueden prepararse, por ejemplo, mediante la biotinylación del extremo N de cadenas peptídicas y la complejación subsiguiente con estreptavidina. Como la estreptavidina es capaz de unirse a 4 moléculas o conjugados de biotina con alta afinidad, pueden formarse mediante este método complejos peptídicos tetrámeros muy estables. Los multímeros pueden estar compuestos por péptidos idénticos o diferentes.

Sin embargo, preferiblemente, los multímeros de la invención están compuestos por dos o más péptidos idénticos.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a los usos de los compuestos divulgados. Puesto que los compuestos se unen selectivamente a P-selectina, pueden, dependiendo de su tipo de interacción con P-selectina después de la unión, funcionar como antagonistas, antagonistas parciales o como meros medios de orientación para orientar sustancias conjugadas hacia células y tejidos que expresan P-selectina. Así, los compuestos pueden usarse ventajosamente en composiciones farmacéuticas. De acuerdo con la invención, también se proporcionan tales composiciones farmacéuticas.

Según se usa en la presente memoria, el término “composición farmacéutica” se refiere a composiciones terapéuticas y diagnósticas, así como a medicamentos y diagnósticos que contienen tales composiciones. Las composiciones terapéuticas y los medicamentos se usan para la prevención o el tratamiento de enfermedades y otras afecciones de mamíferos cuya mejoría es deseable. Los diagnósticos y las composiciones diagnósticas se usan para la diagnosis de tales enfermedades *in vivo* e *in vitro*.

Un uso preferido de los compuestos es para preparar composiciones terapéuticas o medicamentos para prevenir o mejorar enfermedades y afecciones que implican la adhesión de leucocitos, tales como monocitos y neutrófilos, al endotelio vascular y a las plaquetas, y que implican además la agregación de plaquetas. Los compuestos también pueden usarse en composiciones para tratar enfermedades en las que es deseable la inhibición de la señalización intracelular mediada por P-selectina.

Por ejemplo, las composiciones que contienen uno o más compuestos de la invención pueden contribuir a controlar procesos inflamatorios mediados por leucocitos. Se sabe que los leucocitos activados liberan moléculas tóxicas que pueden dañar el tejido normal. Las respuestas inflamatorias, algunas de las cuales también implican activación de plaquetas mediada por P-selectina, son parte de varias afecciones patológicas, tales como rechazo de trasplantes, isquemia fría, choque hemorrágico, choque séptico, metástasis tumoral, inflamación crónica, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, aterosclerosis, reestenosis, angiogénesis, coagulación intravascular diseminada, síndrome de fatiga respiratoria del adulto, choque circulatorio, lesión cerebral traumática grave, esclerosis múltiple recurrente-remitente, oclusión de arterias cerebrales, isquemia, apoplejía, infarto de miocardio agudo, lesión arterial, tal como la producida por angioplastia, isquemia de miocardio, lesión renal derivada de isquemia y reperfusión, y fallo renal.

En otra realización, los compuestos se usan en la preparación de composiciones o productos diagnósticos. Tales composiciones pueden usarse para pruebas *in vitro* para cuantificar concentraciones de P-selectina en fluidos corporales como marcadores para las enfermedades y afecciones descritas anteriormente. También pueden usarse para procedimientos diagnósticos de obtención de imágenes *in vivo* para verificar aterosclerosis, aneurismas, reestenosis después de angioplastia coronaria transluminal percutánea (reestenosis pos-PTCA) mediadas por P-selectina y otras afecciones seleccionadas de aquellas en las que se moviliza P-selectina. Como una opción para este uso, un compuesto de acuerdo con la invención puede conjugarse con un quelador, que subsiguientemente se compleja con una etiqueta isotrópica que es detectable mediante el sistema de verificación elegido.

Otro uso de los compuestos es como el de una herramienta en la investigación. Por ejemplo, pueden usarse para probar la afinidad de unión de moléculas hacia P-selectina. Para efectuar este método de prueba, la P-selectina se pondría en contacto y se incubaría con una molécula que hubiera de probarse con respecto a la afinidad de unión y con un compuesto de la invención. Una unión reducida del compuesto de la invención indicaría una afinidad de la molécula a P-selectina.

También se ha encontrado por los inventores que la P-selectina puede escindir-se mediante miembros presentes en la naturaleza de la familia de la calpaína. De forma interesante, algunas de las proteasas de la familia de la calpaína parecen ser las únicas estructuras polipeptídicas naturales que comprenden una de las secuencias peptídicas preferidas de los compuestos de la invención, que es el motivo central EWVDV. La sobreactivación de calpaína 1 y calpaína 2 está asociada lo más probablemente con enfermedades neurológicas tales como la enfermedad de Alzheimer, la lesión cerebral traumática y las cataratas. La actividad de la calpaína 3 puede estar implicada en algunos tipos de distrofia muscular, la de la calpaína 9 en el cáncer gástrico, mientras que las calpaínas 8 y 10 parecen representar un papel en la diabetes mellitus tipo 2. Aspectos adicionales de la implicación de las calpaínas en diversas enfermedades humanas son descritos por Y. Huang y K. Wang en un artículo de revisión, The calpain family and human disease, Trends Mol. Med. 7, 355-362, 2001.

Por otra parte, se ha encontrado que los compuestos de la invención pueden inhibir la escisión de L-selectina y P-selectina inducida por calpaína, con una afinidad muy superior - típicamente aproximadamente 100 veces - para P-selectina. Desde un punto de vista mecánico, esto sugiere que la calpaína está implicada en la activación de las selectinas. Más en particular, el desprendimiento de las selectinas de las superficies de las células en las que se expresan puede estar inducido por calpaína. Por consiguiente, los compuestos de la invención son útiles en cualesquiera aplicaciones en la que sea deseable inhibir la interacción entre P-selectina y calpaína.

Los compuestos también pueden usarse como moléculas o conjugados de orientación en composiciones farmacéuticas para la orientación de fármacos o material genético a tejidos que expresan P-selectina. Como conjugados, los compuestos pueden acoplarse directamente con moléculas activas o ácidos nucleicos que han de aportarse a tales tejidos. Alternativamente, pueden incorporarse en o anclarse sobre la superficie de liposomas u otras vesículas lipídicas, gotículas de emulsión, polímeros, nano- o micropartículas para obtener vehículos orientados para fármacos o material genético que se aporta a tejidos que expresan P-selectina.

Las composiciones farmacéuticas contienen preferiblemente uno o más compuestos con afinidad hacia P-selectina como los descritos en la presente memoria y al menos un portador o excipiente. Según se usa en la presente memoria, un portador o excipiente es cualquier sustancia o mezcla de sustancias farmacéuticamente aceptable que no tenga actividad farmacológica sustancial, que pueda usarse como un vehículo o como una sustancia adyuvante para formular un compuesto en una forma de dosificación que sea estable y fácil de administrar. Ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables se encuentran en las monografías de todas las principales farmacopeas.

En una realización, la composición se formula y se procesa para inyección parenteral, preferiblemente para inyección intravascular, tal como intravenosa o intraarterial, pero también para rutas intramuscular, subcutánea, intralesional, intraperitoneal u otras rutas de administración parenteral. Los mismos principios que gobiernan la formulación de otros fármacos para estas rutas de administración también mostrarán a los expertos en la técnica cómo preparar tales composiciones. Por ejemplo, uno de los requisitos de las formas de dosificación parenteral es su esterilidad. Otros requisitos se describen en todas las principales farmacopeas, tales como en USP 24, en el monográfico "General Requirements for Tests and Assays. 1. Injections", p. 1775-1777. Para incrementar la estabilidad de una formulación parenteral, puede ser necesario proporcionar una forma de dosificación secada que debe reconstituirse antes de que pueda administrarse. Un ejemplo de tal forma de dosificación es una formulación secada por congelación o liofilizada.

Puede ser deseable administrar un compuesto de la invención como una forma de dosificación parenteral de liberación controlada para evitar inyecciones frecuentes y para mejorar la eficacia y la comodidad de la terapia. Se conocen diversos métodos para preparar tales formulaciones de depósito. La liberación prolongada puede proporcionarse mediante implantes sólidos, nanopartículas, nanocápsulas, micropartículas, microcápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones oleosas, liposomas, o estructuras similares.

Excipientes que son particularmente útiles para la preparación de formulaciones parenterales son disolventes, codisolventes y portadores líquidos o semisólidos, tales como agua estéril, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, butanodiol, aceites grasos, triglicéridos de cadena corta y media, lecitina, derivados polioxietilénicos de aceite de ricino; sustancias para ajustar la osmolalidad y el pH, tales como azúcares, especialmente glucosa, alcoholes sacáricos, especialmente manitol, cloruro sódico, carbonato sódico, ácido cítrico, acetato, fosfato, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, etc.; estabilizantes, antioxidantes y conservantes, tales como ácido ascórbico, sulfito o hidrogenosulfito sódico, EDTA, alcohol bencílico, etc.; otros excipientes y adyuvantes de liofilización, tales como albúmina, dextrano, etc.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden diseñarse para la administración oral y procesarse de acuerdo con esto. Formas de dosificación oral adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas duras, cápsulas blandas, polvos, gránulos, formas de dosificación que se desintegran oralmente, jarabes, gotas, suspensiones comprimidos efervescentes, comprimidos masticables, películas orales, formas de dosificación liofilizadas, formas de dosificación de liberación sostenida y formas de dosificación de liberación controlada. En una de las realizaciones preferidas, la forma de dosificación oral es una forma de dosificación sólida revestida entéricamente para proporcionar protección del compuesto frente al ambiente ácido y proteolítico del estómago.

También puede ser ventajoso administrar un compuesto de la invención en una forma de dosificación transmucosal. Esta ruta de administración es no invasiva y agradable para el paciente; al mismo tiempo, puede conducir a una biodisponibilidad mejorada del compuesto en comparación con la administración oral, especialmente si el compuesto no es estable en los fluidos del sistema digestivo, o si es demasiado grande para ser absorbido eficazmente desde el intestino. La administración transmucosal es posible, por ejemplo, a través de formas de dosificación nasales, bucales, sublinguales, gingivales o vaginales. Estas formas de dosificación pueden prepararse mediante técnicas conocidas; pueden formularse para representar gotas o pulverizaciones nasales, insertos, películas, parches, geles, pomadas o comprimidos. Preferiblemente, los excipientes usados para una forma de dosificación transmucosal incluyen una o más sustancias que proporcionan mucoadhesión, prolongando así el tiempo de contacto de la forma de dosificación con la zona de absorción e incrementando de ese modo potencialmente la extensión de la absorción.

En una realización adicional, los compuestos se administran a través de la ruta pulmonar, usando un inhalador de dosis medidas, un nebulizador, un pulverizador de aerosol o un inhalador de polvo seco. Pueden prepararse formula-

ciones apropiadas mediante métodos y técnicas conocidos. La administración transdérmica, rectal u ocular también es factible en algunos casos.

Puede ser ventajoso usar métodos avanzados de aporte u orientación de fármacos para aportar un compuesto de la invención más eficazmente. Por ejemplo, si se elige una ruta de administración no parenteral, una forma de dosificación apropiada puede contener un agente que potencia la biodisponibilidad, que puede ser cualquier sustancia o mezcla de sustancias que incremente la disponibilidad del compuesto. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la protección del compuesto frente a la degradación, tal como mediante un inhibidor enzimático o un antioxidante. Más preferiblemente, el agente de potenciación incrementa la biodisponibilidad del compuesto al incrementar la permeabilidad de la barrera de absorción, que típicamente es una mucosa. Los potenciadores de la penetración pueden actuar a través de diversos mecanismos; algunos incrementan la fluidez de las membranas mucosales, mientras que otros abren o ensanchan las uniones en hendidura entre células mucosales. Además, otros reducen la viscosidad del moco que cubre la capa de células mucosales. Entre los potenciadores de la biodisponibilidad preferidos están sustancias anfifílicas tales como derivados de ácido cólico, fosfolípidos, etanol, ácidos grasos, ácido oleico, derivados de ácidos grasos, EDTA, carbómeros, policarbófilo y quitosano.

En un aspecto adicional, las moléculas capaces de unirse a los compuestos divulgados anteriormente son anticuerpos monoclonales específicos. Por ejemplo, puede aplicarse una tecnología de hibridación estándar para preparar anticuerpos monoclonales para un compuesto.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar adicionalmente la invención, pero no a limitar su alcance a las realizaciones presentadas en la presente memoria.

### Ejemplo 1

Los siguientes péptidos se prepararon mediante síntesis en fase sólida en un sintetizador automático mediante química de Fmoc estándar usando HBTU/HOBt como agente activador:

[illegible]

Los péptidos se biotinilaron conjugando un conector Ahx al extremo N de cada secuencia peptídica y sub-  
guientemente acoplando el conjugado a biotina. TM11 también se preparó en una configuración ciclada mediante  
50 oxidación, formando así uniones disulfuro entre las cisteínas N- y C-terminales. Tetrameros de TM11 y SH31 se de-  
rivarón mediante incubación de estreptavidina 10  $\mu$ M con péptido biotinilado en la relación molar de 1 a 4 durante  
2 horas a temperatura ambiente (TA). La calidad de los péptidos se comprobó mediante espectroscopía de masas y  
HPLC.

La afinidad de los compuestos a P-selectina se investigó usando un método de ELISA adaptado. Streptavidina-peroxidasa de rábano picante (strepPO) se incubó con TM11-biotina en una relación molar de 1 a 4 durante 2 horas a TA, formando de ese modo un péptido tetrámero strepPO-complejo. Para estudios de competición, se revistieron pocillos de microvaloración con P-selectina humana quimérica según se describe para el aislamiento del fago que se une a P-selectina. A continuación, los pocillos se incubaron con TM11-strepPO-complejo 2,5 nM en tampón de ensayo durante 1 hora a 4°C, en presencia de cantidades valoradas de péptidos para competir con respecto a la unión a P-selectina humana. Los compuestos lineales se probaron en presencia de DTT para evitar la formación de agregados. Después de lavar 6 veces con tampón de ensayo, los pocillos se incubaron con 100 µl de TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 min a TA. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y la absorbancia se leyó a 450 nm. A partir de los resultados, se calcularon las constantes de afinidad:

## ES 2 337 663 T3

### Afinidad

	Biotina-TM1:	82 $\mu$ M
	Biotina-TM2:	49 $\mu$ M
5	Biotina-TM11:	2 $\mu$ M
	Biotina-TM11(cíclico):	2 $\mu$ M
	Biotina-TM16:	12 $\mu$ M
10	Biotina-TM17:	7 $\mu$ M
	Biotina-SH31:	19 $\mu$ M
	Biotina-A17:	0,1 $\mu$ M
	Biotina-A19:	12 $\mu$ M
15	TM11 Tetramero:	10,7 nM
	SH31 Tetramero:	61,3 nM

La afinidad de los compuestos se confirmó mediante un ensayo de adhesión celular en el que células de ovario de hámster chino que expresan P-selectina humana se incubaron con células HL60 que expresan PSGL-1 en presencia de cantidades valoradas de los compuestos.

### Ejemplo 2

(Ejemplo comparativo)

Los siguientes compuestos se prepararon como en el ejemplo 1 y se probaron con respecto a su afinidad a P-selectina humana. Debe apuntarse que aun cuando los compuestos sean muy similares a los compuestos del ejemplo 1, no cumplen completamente los requisitos estructurales de la reivindicación 1 y por lo tanto no son compuestos de acuerdo con la invención:

									Afinidad [ $\mu$ M]
35	D	V	E	A	V	D	V	S	400.000
	D	V	E	W	A	D	V	S	1.400
	D	V	E	W	V	A	V	S	21.000
40	D	V	E	W	V	D	A	S	13.000
			E	W	V	K	V	A	13.000

### Ejemplo 3

#### *Inhibición de la Agregación de Plaquetas*

Los siguientes compuestos se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y se probaron con respecto a su efecto de inhibición de la agregación de plaquetas.

Se activaron plaquetas humanas mediante ADV, y la extensión de la agregación de plaquetas se midió en presencia o ausencia de péptidos que contienen EWVDV. Se observó que DVEWVDVS (A19) y CDVEWVDVSC (A17) dificultaban significativamente la segunda fase de la agregación de plaquetas, con la agregación reducida en aproximadamente 45% y 25%, respectivamente.

### Ejemplo 4

#### *Interacción de compuestos con liposomas de sulfátido*

Los compuestos posteriores se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y se probaron con respecto a su interacción con liposomas que tenían 22% de sulfátidos. Debe apreciarse que la interacción de los compuestos con sulfátidos es un aspecto adicional y opcional de la actividad de los compuestos de la invención. No obstante, los compuestos que no interactúan con sulfátidos pueden representar compuestos de la invención, con tal de que se unan a P-selectina y comprendan el motivo de consenso que se define en la reivindicación 1.

## ES 2 337 663 T3

Se prepararon liposomas mediante sonicación de fosfatidilcolina, colesterol y sulfátidos de yema de huevo, todos disueltos en cloroformo/metanol (1:1, v/v), a relaciones en peso de 4:0,8:1,33. Se añadió una cantidad trazadora de [ $^3\text{H}$ ]-colesterol ( $1,3 \times 10^8$  dpm) y la mezcla se secó bajo una corriente de nitrógeno. La capa lipídica resultante se sometió a turbulencia en PBS y subsiguientemente se sonicó, dando como resultado liposomas con diámetros de

IgG anti-humana de cabra específica para Fc en tampón de revestimiento ( $\text{NaHCO}_3$  50 mM, pH 9,6) se incubó en una placa de 96 pocillos de alta capacidad de unión. Al día siguiente, los pocillos se lavaron con tampón de ensayo (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, pH 7,4) y se incubaron con tampón de bloqueo (BSA al 3% en tampón de ensayo). Después de lavar, los pocillos se incubaron con P-selectina humana-IgG, se lavaron y subsiguientemente se incubaron con los liposomas etiquetados con [ $^3\text{H}$ ]-colesterol en presencia o ausencia de los compuestos posteriores y anticuerpos durante 2 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Después de la retirada de liposomas no unidos, los liposomas unidos se recogieron y se contaron usando un contador de centelleo.

Se encontró que los compuestos  $\underline{\text{DVEWVDVS}}$ ,  $\underline{\text{DVEWVDVA}}$  y  $\underline{\text{CDVEWVDVSC}}$  inhibían significativamente la unión de sulfátidos a P-selectina, mientras que los compuestos  $\underline{\text{DVEAVDVS}}$  y  $\underline{\text{EWVDV}}$  no lo hacían. Parece que, aparte de la secuencia central que se define anteriormente, las dos posiciones de ácido aspártico fuera de la secuencia central (D, subrayada) eran un rasgo esencial para la inhibición eficaz de sulfátidos.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con afinidad hacia P-selectina humana, que comprende un péptido con una secuencia de aminoácidos  $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ , en el que:  
5  
     $A_1$  es D- o L-cisteína (C), D- o L-metionina (M) o D- o L-valina (V);  
     $A_2$  es ácido D- o L-aspártico (D);  
10  
     $A_3$  es D- o L-fenilalanina (F), D- o L-tirosina (Y) o D- o L-triptófano (W);  
     $A_x$  es un D- o L-aminoácido;  
    y en el que X marca el lado N-terminal de dicha secuencia e Y marca el lado C-terminal de dicha secuencia o en el que X e Y juntos pueden formar un sistema cíclico.  
15  
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia comprende además un aminoácido  $A_4$  en el extremo N-terminal o C-terminal, en el que  
20  
     $A_4$  es un D- o L-aminoácido que comprende una cadena lateral hidrófila.  
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que  $A_x$  representa ácido D- o L-glutámico (E) o comprende  $A_2$ .  
25  
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que  $A_1$  es valina (V).  
5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que  $A_3$  es triptófano (W).  
6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que X comprende al menos dos aminoácidos, siendo uno de ellos ácido aspártico (D).  
30  
7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una estructura de cadena principal cíclica o restringida.  
8. Una composición multímera que comprende al menos dos péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicha composición una constante de afinidad para la unión a P-selectina que es menor de 1/20, y preferiblemente menor de 1/100, de la afinidad de uno de dichos péptidos.  
35  
9. Un método para la preparación de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que monómeros de aminoácido u oligómeros de aminoácido se ensamblan mediante ligación química o enzimática, que se realiza en una fase líquida y/o en la interfase con una fase sólida funcionalizada.  
40  
10. Un método para la preparación de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de:  
45  
    (a) combinar una secuencia de ácido nucleico que codifica el compuesto con un vector capaz de transfectar células, tal como un vector viral, un vector lipídico o un vector polímero;  
    (b) transfectar células huésped con el vector y la secuencia de ácido nucleico asociada con el mismo;  
50  
    (c) cultivar dichas células huésped bajo condiciones que permiten la expresión del compuesto o el péptido similar al compuesto y  
    (d) aislar el compuesto.  
55  
11. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición multímera de acuerdo con la reivindicación 8, para el uso como un medicamento o un agente diagnóstico.  
12. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición multímera de acuerdo con la reivindicación 8, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la prevención o la diagnosis de trastornos inflamatorios crónicos, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, aterosclerosis, reestenosis, isquemia, lesión por reperfusión incluyendo fallo renal, metástasis tumoral, sepsis bacteriana, coagulación intravascular diseminada, síndrome de fatiga respiratoria del adulto, apoplejía, angiogénesis, rechazo de trasplantes, trombosis o choque circulatorio.  
60  
13. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición multímera de acuerdo con la reivindicación 8 y uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.  
65

14. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, que se formula y se procesa para administración parenteral, preferiblemente para inyección intravascular, intramuscular, subcutánea o intralesional.

15. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, que se formula y se procesa para administración oral, preferiblemente en forma de un comprimido, una cápsula, gránulos, una forma de dosificación sólida entérica, una forma de dosificación sólida que proporciona liberación sostenida o controlada o una forma de dosificación que se desintegra oralmente.

16. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, que se formula y se procesa para administración transmucosal, tal como administración nasal, bucal, sublingual o vaginal.

17. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, que se formula y se procesa para administración pulmonar a través de un inhalador de dosis medidas, un nebulizador, un dispensador de pulverización de aerosol o un inhalador de polvo seco.

18. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, que comprende además un agente de orientación de fármacos y/o un agente que potencia la biodisponibilidad.

19. Un método para determinar si una molécula comprende una afinidad de unión hacia P-selectina, que comprende poner en contacto P-selectina con dicha molécula y con un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y determinar si se reduce la unión de dicho compuesto a dicha P-selectina.

20. Un ácido nucleico que codifica una molécula proteínica que comprende una secuencia de aminoácidos  $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ , en el que:

$A_1$  es D- o L-cisteína (C), D- o L-metionina (M) o D- o L-valina (V);

$A_2$  es ácido D- o L-aspartico (D);

$A_3$  es D- o L-fenilalanina (F), D- o L-tirosina (Y) o D- o L-triptófano (W);

$A_x$  es un D- o L-aminoácido;

y en el que X marca el lado N-terminal de dicha secuencia e Y marca el lado C-terminal de dicha secuencia.

21. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicha secuencia de aminoácidos comprende además un aminoácido  $A_4$  en el extremo N-terminal o C-terminal, en el que  $A_4$  es un D- o L-aminoácido que comprende una cadena lateral hidrófila.

22. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20 o la reivindicación 21, para la preparación de un medicamento.

23. Un vehículo de aporte de genes que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20 o la reivindicación 21.

24. Una molécula de unión capaz de unirse específicamente a un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal específico para dicho compuesto.

25. Un método para determinar si un compuesto es capaz de unirse a P-selectina humana, que comprende sustituir, en un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, un aminoácido por un aminoácido conservativo y determinar si el compuesto resultante es capaz de unirse a dicha P-selectina.