



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 282 301**

(51) Int. Cl.:
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01977301 .9**
(86) Fecha de presentación : **27.09.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1320541**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2003**

(54) Título: **Inhibidores de TGF- β y procedimientos.**

(30) Prioridad: **29.09.2000 US 676108**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

(73) Titular/es:
The Regents of the University of California
12th Floor, 1111 Franklin Street
Oakland, California 94607-5200, US

(72) Inventor/es: **Bhatnagar, Rajendra, S.;**
Gough, Craig, A. y
Qian, Jing, Jing

(74) Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 282 301 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

Inhibidores de TGF- β y procedimientos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de manera general a agentes que inhiben la actividad de TGF- β para usos tales como la inhibición de la cicatriz de tejido durante la cicatrización de una herida y más particularmente a pequeños péptidos con una actividad potente anti-factor de crecimiento transformante β y útiles contrarrestando el efecto de la actividad de TGF- β incrementada observada en muchas condiciones patológicas.

Estado de la técnica

Los niveles incrementados de actividad del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) están implicados en un gran número de condiciones patológicas que incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: (i) fibrosis, señalización y adhesión durante la cicatrización de la herida; (ii) enfermedades fibróticas de los pulmones, hígado y riñones; (iii) aterosclerosis y arterioesclerosis; (iv) determinados tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de próstata, tumores euroendocrinos del sistema digestivo, cáncer del cérvix, glioblastomas y cáncer gástrico; (v) angiopatía, vasculopatía, neuropatía, (vi) esclerosis sistémica; (vii) infección vírica tal como hepatitis C y VIH; y (viii) enfermedades y deficiencias inmunológicas.

Por ejemplo, miembros de la familia de TGF- β están entre los péptidos conocidos por tener una serie de actividades biológicas relacionadas con la tumorigénesis (incluyendo la angiogénesis) y metástasis. El TGF- β inhibe la proliferación de muchos tipos celulares incluyendo las células endoteliales capilares y las células del músculo liso. El TGF- β infrarregula la expresión de integrina ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ implicadas en la migración de células endoteliales). Las integrinas están implicadas en la migración de todas las células, incluyendo las metastásicas. El TGF- β infrarregula la expresión de metaloproteinasas de matriz necesarias para tanto la angiogénesis como la metástasis. El TGF- β induce el inhibidor del activador de plasminógeno el cual inhibe una cascada de proteinasas necesaria para la angiogénesis y metástasis. El TGF- β induce a las células normales para inhibir células transformadas.

Los factores de crecimiento transformantes β se denominaron originalmente por su capacidad para transformar fibroblastos normales en células capaces de crecer independientemente del anclaje. Los efectos de los TGF- β sobre las células se clasifican en general en proliferativos y no proliferativos. Según se estableció originalmente con los primeros experimentos sobre fibroblastos, los TGF- β son auténticos factores de crecimiento. Dos tipos de células importantes en los que es potenciada la proliferación por TGF- β son los osteoblastos y las células de Schwann del sistema nervioso periférico. Sin embargo, en muchas células, los TGF- β son inhibidores potentes de la proliferación celular. Este control negativo del crecimiento puede ser el mecanismo regulador negativo que controla la regeneración de determinados tejidos y puede jugar un papel en el inicio de la carcinogénesis.

La función no proliferativa más importante de los TGF- β es en la estimulación de la formación de matrices extracelulares. A pesar de que esto se consigue principalmente mediante el aumento de la transcripción de tanto el colágeno como la fibronectina, la inhibición de las proteasas en la degradación de la matriz también contribuye a su estabilidad. La degradación de la matriz extracelular es inhibida por el descenso en la secreción de las proteasas en sí mismas y el incremento simultáneo de los niveles de inhibidores proteasa.

Debido a la amplia aplicabilidad de los TGF- β en terapia clínica, estos han sido el centro de gran parte de la investigación. A pesar de que gran parte de la investigación implicaba usos *in vitro*, recientes estudios *in vivo* han confirmado algunos de los efectos más prometedores *in vitro*.

Los miembros naturales de la familia del factor de crecimiento transformante β están en el rango de peso molecular de algo más de 25 KDa. Los usos clínicos de factores de crecimiento, incluyendo los TGF- β , pueden ser limitados por su tamaño, lo cual puede causar respuestas inmunes. Por ejemplo, el TGF- $\beta 1$ es una proteína homodimérica de 25.000 daltons. Además de las posibles respuestas inmunológicas adversas, las proteínas grandes no son a menudo los mejores candidatos para los fármacos debido a las dificultades en la administración y liberación.

Debido a la implicación del TGF- β en un gran número de condiciones patológicas serias, existe un interés considerable en el desarrollo de inhibidores de TGF- β . Muchas de las propuestas de inhibidores de TGF- β han implicado anticuerpos.

Por ejemplo, la patente US 5.662.904, publicada el 2 de Septiembre de 1997, inventores Ferguson et al., describen una composición para usar en el tratamiento de heridas para inhibir la formación de tejido cicatrizado. Un ejemplo de tal composición tiene anticuerpo neutralizante de factor de crecimiento, tal como los anticuerpos para TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ y PDGF.

La patente US 5.972.335, publicada el 26 de octubre de 1999, inventores Ferguson et al., describe composiciones que comprenden al menos dos anticuerpos para usar en la promoción de la cicatrización de heridas o enfermedades fibróticas, donde el primer anticuerpo es específico para un único epítipo en TGF- $\beta 1$ y el segundo anticuerpo es específico para un único epítipo de TGF- $\beta 2$.

La patente US 6.062.460, publicada el 9 de mayo de 2000, inventor Ferguson, describe el uso de betaglicano soluble (conocido de otra manera como receptor III de TGF- β) para usar en la promoción de la cicatrización de heridas de enfermedades fibróticas con cicatrización reducida.

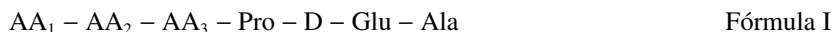
La patente US 5.958.411, publicada el 28 de Septiembre de 1999, inventores Logan y Baird, describen métodos para el tratamiento de una patología del SNC administrando anticuerpos anti-TGF- β .

Sin embargo, los anticuerpos y receptores son proteínas grandes. Debido a las cantidades de TGF- β 1 en el suero de sujetos con enfermedades tales como el cáncer de próstata (los cuales son tan elevados como 35 ng/ml), serían necesarias cantidades muy elevadas de proteínas "neutralizantes", tales como anticuerpos. Esto representa un problema difícil y se pueden prever efectos adversos.

Además, si bien la cantidad de factor de crecimiento en el fluido extracelular se incrementa de manera constante debido a la secreción de las células enfermas, el número de células y receptores no se incrementa probablemente a la misma velocidad. Por lo tanto, un método que dirigiera al receptor debería implicar la administración de pequeñas cantidades de un inhibidor del receptor.

Explicación resumida de la invención

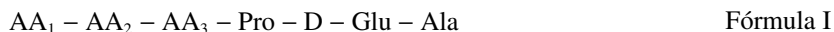
En un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que inhibe la actividad de TGF- β , comprendiendo el péptido la estructura primaria de Fórmula I



donde AA_1 es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina; AA_2 es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina y AA_3 es alanina o N-metilalanina,

excluyendo el péptido Leu-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala.

La invención proporciona además un péptido que comprende la estructura primaria de Fórmula I



donde AA_1 es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina; AA_2 es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina y AA_3 es alanina o N-metilalanina, excluyendo el péptido Leu-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala, para usar en un método de tratamiento de la fibrosis, cáncer, enfermedad autoinmune o supresión inmune de una infección vírica en un paciente. Los péptidos preferidos para tal uso incluyen Phe-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala o Leu-Phe-Ala-Pro-D-Glu-Ala.

La invención proporciona además el uso de un péptido que comprende la estructura primaria de Fórmula I



donde AA_1 es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina; AA_2 es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina; y AA_3 es alanina o N-metilalanina, excluyendo el péptido Leu-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la fibrosis, el tratamiento del cáncer, el tratamiento de una enfermedad autoinmune o el tratamiento de una infección vírica acompañada de una respuesta inmune suprimida en un paciente.

La invención también proporciona el uso de un péptido que comprende la estructura primaria de Leu-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la fibrosis, o el tratamiento de una infección vírica acompañada de una respuesta inmune suprimida en un paciente.

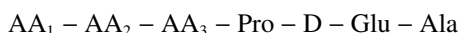
La alanina C-terminal puede incluir también un grupo bloqueante, por ejemplo, se puede amidar o esterificar.

Debido a que los inhibidores de TGF- β de la presente invención son péptidos pequeños, se sintetizan fácilmente, se obtienen en una forma altamente pura y se pueden liberar fácilmente en una amplia variedad de modalidades. Por ejemplo, los péptidos de Fórmula I se pueden aplicar tópicamente a heridas con el fin de prevenir las adhesiones y señalizaciones, se pueden liberar por inyección para afectar al comportamiento de tumores, tejidos fibróticos, sitios de inflamación y para modular el comportamiento de células del sistema inmune.

Descripción detallada de la invención

En la patente US N° 5.780.436, publicada el 4 de Julio de 1998 y en WO 00/02916 nuestra solicitud en trámite con el número 09/113.696 presentada el 10 de Julio de 1998, inventores Bhatnagar, Qian y Gough, de las que todas las asignaciones adjuntas, describimos una serie de péptidos pequeños denominados “análogos de citomodulina” los cuales se encontraron que eran activos como agonistas del TGF- β . Uno de estos era L-I-A-P-(D-Glu)-A. Se sugirió que estos análogos de la citomodulina tenían utilidad en cirugía como agentes que promovían la cicatrización y la regeneración de heridas.

En la solicitud en cuestión, el L-I-A-P-(D-Glu)-A anterior, el cual habíamos estudiado por su actividad como agonista del TGF- β , junto con los otros de ahora, se han encontrado compuestos nuevos que son inhibidores de la actividad TGF- β . Los hemos designados con el acrónimo “CITA”. Estos compuestos CITA son preferiblemente hexapéptidos que tienen la estructura primaria de Fórmula I.



Fórmula I

donde AA_1 es un residuo aminoacídico del grupo de leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico (Aib), N-metilalanina (NmeA), N-metilisoleucina e isoleucina; AA_2 es el mismo residuo o diferente al que se ha descrito para AA_1 ; y AA_3 es alanina o N-metilalanina.

De esta manera, el L-I-A-P-(D-Glu)-A (Leu-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala) descrito más arriba es una de las realizaciones preferidas de Fórmula I de CITA. Otras dos realizaciones particularmente preferidas son Phe-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala y Leu-Phe-Ala-Pro-D-Glu-Ala, algunas veces designadas de aquí en adelante como “CITA-II” y “CITA-III”, respectivamente.

Los residuos aminoacídicos AA_1 y AA_2 de la Fórmula I constituyen las cadenas laterales hidrofóbicas mayores. Sin que esté sostenido a la teoría, se cree que las cadenas laterales hidrofóbicas de AA_1 y AA_2 ocupan el bolsillo en el receptor y puede moverse libremente e interaccionar con varias regiones del bolsillo. La presencia de la prolina en la cuarta posición y del residuo D-Glu en la quinta posición se creen que fuerzan la conformación.

La sorprendente naturaleza antagonista de los péptidos CITA con sus residuos aminoacídicos que contienen D-Glu se debe probablemente a la incapacidad de estos péptidos a experimentar un cambio conformacional necesario en la actividad de señalización después de que se unan al receptor de TGF- β 1. A pesar de que los grupos funcionales de cadena lateral pueden adoptar las posiciones y orientaciones relativas correctas para permitir las interacciones favorables con los grupos funcionales del receptor complementario, las limitaciones conformacionales probablemente no dejen al complejo péptido-receptor experimentar el cambio de conformación requerido. Esto puede ser debido en parte por la rigidez de la prolina y la rigidez inducida de la alanina en su lado N-terminal, pero puesto que algunos péptidos de prolina e hidroxiprolina son agonistas, el residuo de D-Glu parece jugar el papel principal.

A pesar de que D-Glu puede colocar sus oxígenos carbonilo en las posiciones correctas para la unión al receptor, sus tendencias conformacionales intrínsecas del esqueleto son bastante diferentes de la L-Glu; una mapa de energía conformacional ϕ , Ψ ; de un D-aminoácido es aproximadamente una imagen especular del correspondiente L-aminoácido, con el plano especular desplazándose del extremo superior izquierdo al extremo inferior derecho.

Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar mediante cualquiera de los varios procedimientos adecuados que son bien conocidos en la materia, preferiblemente mediante síntesis en fase sólida, manual o automatizada, como fue desarrollada en primer lugar por Merrifield y descrita por Stewart *et al.*, en *Solid Phase Peptide Synthesis* (1984). La síntesis química une aminoácidos en una secuencia predeterminada empezando por el C-terminal. Procedimientos de fase sólida básicos requieren el acoplamiento del α -aminoácido protegido en el C-terminal a un soporte de resina insoluble adecuado. Los aminoácidos para la síntesis requieren la protección del grupo α -amino para asegurar la formación del enlace peptídico adecuado con el residuo anterior (o soporte de resina). Después de la completación de la reacción de condensación en el extremo carboxilo, se elimina el grupo protector de α -amino para permitir la adición del siguiente residuo. Se han descrito diversas clases de grupos α -protectores, véase Stewart *et al.*, en *Solid Phase Peptide Synthesis* (1994), con el ácido lábil, siendo históricamente preferido el butiloxicarbonil terciario basado en uretano. Se pueden usar otros grupos protectores y las estrategias químicas relacionadas, incluyendo la base lábil 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). También, los grupos funcionales reactivos de la cadena lateral del aminoácido requieren el bloqueo hasta que se complete la síntesis. La serie compleja de grupos bloqueantes funcionales junto con las estrategias y limitaciones a su uso han sido revisadas por Bodansky en *Peptide Synthesis* (1976) y Stewart *et al.*, en *Solid Phase Peptide Synthesis* (1984).

La síntesis en fase sólida se inicia mediante el acoplamiento del residuo aminoacídico descrito α -protegido en el C-terminal. El acoplamiento requiere agentes de activación, tal como la diciclohexcarbodiimida (DCC) con o sin 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), diisopropilcarbodiimida (DIIP) o etildimetilammopropilcarbodiimida (EDC). Después del acoplamiento del residuo C-terminal, el grupo protegido α -amino se elimina mediante ácido trifluoroacético (25% o superior) en diclorometano en el caso de grupos butiloxicarbonilo terciarios (Boc) de ácido lábil. Una etapa de neutralización con trietilamina (10%) en diclorometano recupera la amina libre (frente la sal). Después de que se añada el residuo C-terminal a la resina, se repite el ciclo de desprotección, neutralización y acoplamiento, con etapas de lavado

intermedias, con el fin de extender la cadena peptídica protegida. Cada aminoácido protegido se introduce en exceso (de tres a cinco veces) con cantidades equimolares de reactivo de acoplamiento en el disolvente adecuado. Finalmente, después de que el péptido bloqueado completamente se ensamble en el soporte sólido, los reactivos se aplican para cortar el péptido de la resina y para eliminar los grupos bloqueantes de la cadena lateral. El fluoruro de hidrógeno anhidro (HF) corta los grupos químicos butiloxicarbonil terciarios de ácido lábil. Varios “scavengers” nucleofílicos tales como el dimetilsulfuro y el anisol, se incluyen con el fin de evitar reacciones secundarias especialmente en los grupos funcionales de las cadenas laterales.

Se pueden realizar modificaciones para conferir resistencia a la degradación enzimática tal como la adición de grupos bloqueantes a los residuos N y C-terminales. Otro procedimiento para prevenir la degradación y la eliminación prematura por el sistema renal es el uso de sustitutos aminoácidos no naturales, tal como Aib y NmeA, que pueden estar en una o las dos posiciones AA₁ y AA₂.

Se pueden formular composiciones terapéuticas de esta invención dependiendo de la dosis efectiva requerida y de los modos de administración usados. Por ejemplo, se pueden formular composiciones farmacéuticas donde el inhibidor de TGF- β está en una cantidad de 1 μ g/kg a 10 mg/kg del peso del paciente. Como proposición general, la cantidad total farmacéuticamente efectiva de cada péptido administrado estará sujeto a discreción terapéutica.

Las realizaciones de composición como agentes terapéuticos se administran al paciente mediante cualquier técnica adecuada. Las composiciones a ser usadas en la terapia inventiva serán formuladas y dosificadas de manera consistente con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición clínica del paciente, el método de administración, la programación de dosificación y otros aspectos conocidos para los médicos. La “cantidad efectiva” para los propósitos descritos en el presente documento se determina de esta manera mediante dichas consideraciones.

Estos antagonistas potentes de TGF- β 1 pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades donde se encuentran incrementados los niveles de actividad de TGF- β 1, incluyendo fibrosis, cáncer, enfermedades autoinmunes y una variedad de infecciones víricas acompañadas de una respuesta inmune suprimida. Cada una de estas aplicaciones diferentes tendrá técnicas preferidas para la administración. Están apareciendo una serie de nuevos procedimientos de liberación de fármacos, incluyendo péptidos pequeños como los de aquí, para complementar y ampliar los procedimientos tradicionales de liberación de fármacos. Por ejemplo, un artículo de revisión publicado el 18 de Septiembre de 2000 en *C&EN*, páginas 49-65, describe procedimientos alternativos de liberación de fármacos, tal como las formulaciones pulmonares (inhalación) y oral, así como las formulaciones inyectables transdérmicas y de liberación controlada.

Particularmente contempladas para la práctica de esta invención son las administraciones tópica y sistémica, administración intravenosa, administración subcutánea, inyección intraperitoneal, inyección subperiosteal, administración intratraqueal, liberación de polímeros o bombas, implantes o liberación de liposomas. Implantes adecuados (si utilizan un dispositivo de implante) incluyen, por ejemplo, implantes de gel espuma, cera o basados en micropartículas. Sólo como ejemplo, la tecnología de liberación de microesferas está siendo adaptada para la liberación inyectable sostenida de fármacos donde los péptidos se pueden dispersar a través de las microesferas. Las dosis utilizadas deberían ser suficientes para conseguir concentraciones circulantes de ingrediente activo en plasma que sean eficaces. Se pueden extrapolar las dosis efectivas a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o modelo animal.

Cuando los péptidos se preparan para la administración mediante mezclado con portadores fisiológicamente aceptables, i.e., portadores que no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, supondrá habitualmente combinar el(los) péptido(s) inventivo(s) de la invención con tampones, antioxidantes tales como el ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa y dextrinas, agentes quelantes como el EDTA y otros excipientes. Cuando se utiliza en administraciones terapéuticas, los componentes deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril (0,22 micras).

Los péptidos se pueden administrar en cualquier portador farmacéuticamente aceptable y dependiendo del modo de administración deseado se puede formular junto con un portador líquido en forma de liposomas, microcápsulas, polímeros o preparaciones basadas en cera y de liberación controlada o se puede formular en forma de tableta, píldora o cápsula.

Los péptidos forman sales farmacéuticamente aceptables con ácidos orgánicos e inorgánicos y se pueden administrar en forma de sal y/o se pueden amidar. Ejemplos de ácidos adecuados para la formación de sales farmacéuticamente aceptables son el clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, benzoico, cítrico, malónico, salicílico, málico, fumárico, succínico, tartárico, láctico, glucónico, ascórbico, maleico, bencenosulfónico, metano- y etanosulfónico, hidroximetano- e hidroxietanosulfónico.

Se pueden formar sales con sales de adición de base orgánicas adecuadas farmacéuticamente aceptables. Estas bases orgánicas forman una clase cuyos límites son fácilmente comprendidos por aquellos expertos en la materia. Meramente a modo de ilustración, se puede decir que la clase incluye mono-, di- y trialkilaminas tales como metilamina, dimetilamina y trietilamina; mono-, di- o trihidroxialquilaminas tales como la mono-, di- y trietanolamina; aminoácidos tales como arginina y lisina; guanidina; N-metilglucosamina; N-metilglucamina; L-glutamina; N-metil-

piperazina; morfolina; etilendiamina; N-bencilfenetilamina; tris(hidroximetil)aminometano; y similares. (Véase, por ejemplo, "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.*, 66 (1), 1-19 (1977)).

Se pueden preparar formulaciones terapéuticas que contengan al menos uno de los péptidos para el almacenaje mediante mezclado con portadores fisiológicamente aceptables, excipientes o portadores, en forma de pasta liofilizada o soluciones acuosas. Portadores, excipientes y estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas cuando se administran e incluyen tampones tal como el fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como la albúmina de suero, gelatina e inmunoglobulinas.

Otros componentes pueden incluir glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como el EDTA; alcoholes de azúcar tales como el manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tal como el sodio; y/o tensioactivos no iónicos como el TWEEN, PLURONICS o PEG.

Las composiciones se pueden utilizar en forma irrigante estéril, preferiblemente en combinación con una solución salina fisiológica. Las composiciones para la administración sistémica se formulan, preferiblemente, como inyecciones o infusiones estériles, isotónicas parenterales.

Las composiciones terapéuticas se preparan típicamente como soluciones líquidas o suspensiones o en formas sólidas. Las formulaciones para la cicatrización de heridas habitualmente incluirán aditivos utilizados de manera habitual tal como aglutinantes, rellenos, portadores, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes, tampones y excipientes como, por ejemplo, clases farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen típicamente del 1%-95% de ingrediente activo, preferiblemente 2%-70%. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración tal como la administración tópica, incluye pomadas, tintura, cremas, lociones y en algunos casos supositorios. Para pomadas y cremas se pueden incluir aglutinantes, portadores y excipientes tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos.

Los siguientes ejemplos se mencionan para ilustrar pero sin limitar la invención objeto.

Experimental

Inhibición de la actividad TGF- β 1 por los CITA: hemos usado un ensayo *in vitro* estandarizado para TGF- β 1 como prueba para determinar la actividad biológica de los CITA. Nuestra prueba se basa en la inhibición del efecto de TGF- β 1 sobre un sistema de ensayo de proliferación celular. En este ensayo, las células del epitelio de pulmón de visón MV-1-Lu se exponen a TGF- β 1. Esto resulta en la inhibición de las células MV-1-Lu como se observa en el descenso de síntesis de ADN. El descenso en la síntesis de ADN se puede seguir midiendo la incorporación de precursores marcados en el ADN. La incorporación de timidina- H^3 en el ADN en células MV-1-Lu se utiliza como medición de la proliferación celular. Las células MV-1-Lu se expusieron a dos concentraciones diferentes de TGF- β 1, 5,0 nM la cual disminuía la síntesis de ADN en aproximadamente un 70% y 10 nM la cual causaba casi un 97% de inhibición respectivamente en los experimentos actuales. Estas concentraciones de TGF- β 1 se basaron en las cantidades de TGF- β 1 encontradas en el suero normal y en el suero de pacientes con peritonitis, una enfermedad inflamatoria. La cantidad normal de TGF- β 1 en suero humano es aproximadamente 2 nM (39 pG/ml). En pacientes con peritonitis, la cantidad aumenta a casi 10 nM (169-216 pG/ml). La incorporación de timidina- H^3 en ausencia de TGF- β 1 sirvió como control. Para ensayar la actividad anti-TGF- β 1 de los CITA, se expusieron las células a 1 nM, 10 nM y 100 nM de CITA-I, CITA-II y CITA-III en ausencia y en presencia de TGF- β 1 5,0 nM y 10,0 nM.

Detalles de los procedimientos experimentales: se colocaron en cada pocillo de placa 10⁴ MV-1-Lu de una placa de 12 pocillos en 2,0 ml de medio mínimo esencial que contiene aminoácidos no esenciales (MEM) y 10% de suero bovino fetal. Después de 24 horas, el medio se colocó en MEM libre de suero y las células se cultivaron adicionalmente durante dos horas antes de que el medio se colocara en MEM libre de suero que contenía los aditivos de prueba. Después de la exposición al medio de ensayo durante 24 horas, las células se marcaron con pulso durante dos horas con 0,5 μ Ci (metil- H^3 -timidina, (actividad específica 60 Ci/mmol). Después del marcaje con pulso, se eliminó el medio radioactivo y se lavaron las células con 1x con ácido tricloroacético al 10% (TCA), 2x TCA al 5%, a continuación 2x con solución salina tamponada con fosfato que contenía 50 μ g/ml de timidina no radioactiva. Las soluciones de lavado se siguieron para determinar que no quedara timidina radioactiva sin unir. Las capas de células lavadas se disolvieron en 1 ml de NaOH 0,1 N que contenía dodecil sulfato sódico al 1%. La radioactividad en la solución se midió en un contador de centelleo y se expresó como desintegraciones por minuto (d.p.m.). Cada prueba se llevó a cabo por cuadruplicado y se presentaron los datos como media $\pm$ desviación estándar.

Efecto de los CITA sobre la síntesis de ADN: CITA-I, CITA-II y CITA-III disminuían la síntesis de ADN aproximadamente un 20% vs. el control a todas las concentraciones examinadas. Estas observaciones confirman que los CITA pueden unirse a los receptores de TGF- β 1. Cada uno de los tres compuestos ensayados invertía de manera notable la inhibición de la síntesis del ADN causada por TGF- β 1.

Inhibición de la actividad de TGF- β 1 por los CITA: CITA-I, CITA-II y CITA-III invertían la inhibición de la síntesis de ADN por TGF- β 1. Todas las concentraciones de CITA restauraban la síntesis de ADN en células MV-1-Lu expuestas a TGF- β 1 5 nM casi a los niveles observados con los CITA solos o 2x el nivel observado con TGF- β 1. Todas las concentraciones de CITA-I también restauraban la síntesis de ADN en células inhibidas de manera drástica por TGF- β 1 10 nM, resultando en un incremento por encima de 10 veces en la síntesis de ADN en las células inhibidas.

La Tabla 1 muestra la inhibición de la actividad de TGF- β 1 por CITA-I, la Tabla 2 muestra la inhibición de TGF- β 1 por CITA-II y la Tabla 3 muestra la inhibición de TGF- β 1 por CITA-III.

TABLA 1

Adiciones	Incorporación de timidina- H^3 10^3 d.p.m. $\pm$ D.E	%(+/-) de cambio respecto control con TGF- β 1	%(+/-) de cambio respecto control con CITA-I presente	%incremento respecto TGF β -1. TGF β -1 + CITA-I/TGF β -1 x100
Control (Sin adiciones)	57.71 $\pm$ 2.34	-	-	-
+ TGF β -1, 5 nM	16.43 $\pm$ 2.95	-72	-	-
+ TGF β -1, 10 nM	1.91 $\pm$ 0.08	-97	-	-
+CITA-I, 1 nM	46.46 $\pm$ 2.48	-	-19	-
+CITA-I, 10 nM	44.93 $\pm$ 3.34	-	-21	-
+CITA-I, 100 nM	45.10 $\pm$ 1.27	-	22	-
+ TGF β -1, 5 nM+CITA-I, 1 nM	41.05 $\pm$ 2.04	-	-29	250
+ TGF β -1, 5 nM + CITA-I, 10 nM	31.88 $\pm$ 2.32	-	-45	194
+ TGF β -1, 5 nM + CITA I, 100 nM	29.70 $\pm$ 2.79	-	-49	181
+ TGF β -1, 10 nM + CITA-I, 1 nM	21.26 $\pm$ 1.30	-	-63	1113
+ TGF β -1, 10 nM + CITA-I, 10 nM	26.23 $\pm$ 2.73	-	-55	1373
+ TGF β -1, 10 nM + CITA-I, 100 nM	17.30 $\pm$ 2.19	-	-70	906

ES 2 282 301 T3

TABLA 2

Adiciones	Incorporación de timidina- H^3 10^3 d.p.m. $\pm$ D.E	%(+/-) de cambio respecto control con TGF- β 1	%(+/-) de cambio respecto control con CITA-I presente	%incremento respecto TGF β -1. TGF β -1+ CITA-II/TGF β -1 x 100
Control (sin adiciones)	57.71 $\pm$ 2.34	-	-	-
+ TGF β -1. 5 nM	16.43 $\pm$ 2.95	-72	-	-
+ TGF β -1. 10 nM	1.91 $\pm$ 0.08	-97	-	-
+CITA-II. 1 nM	45.10 $\pm$ 1.27	-	-22	-
+CITA-II. 10 nM	42.03 $\pm$ 1.11	-	-27	-
+CITA-II. 100 nM	43.08 $\pm$ 1.23	-	-25	-
+ TGF β -1. 5 nM + CITA-II. 1 nM	31.04 $\pm$ 1.07	-	-29	184
+ TGF β -1. 5 nM + CITA-II. 10 nM	27.75 $\pm$ 1.50	-	-45	169
+ TGF β -1. 5 nM + CITA-II. 100 nM	34.00 $\pm$ 0.86	-	-49	207
+ TGF β -1. 10 nM + CITA-II. 1 nM	18.51 $\pm$ 1.23	-	-63	970
+ TGF β -1. 10 nM + CITA-II. 10 nM	20.70 $\pm$ 2.63	-	-55	1084
+ TGF β -1. 10 nM + CITA-II. 100 nM	18.73 $\pm$ 1.67	-	-70	981

TABLA 3

Adiciones	Incorporación de timidina- H^3 10^3 d.p.m. $\pm$ D.E	%(+/-) de cambio respecto control con TGF- β 1	%(+/-) de cambio respecto control con CITA-I presente	%incremento respecto TGF β -1. TGF β -1+ CITA-III/TGF β -1 x100
Control (sin adiciones)	57.71 $\pm$ 2.34	-	-	-
+ TGF β -1. 5 nM	16.43 $\pm$ 2.95	-72	-	-
+ TGF β -1. 10 nM	1.91 $\pm$ 0.08	-97	-	-
+CITA-III. 1 nM	44.67 $\pm$ 2.26	-	-23	-
+CITA-III. 10 nM	47.19 $\pm$ 3.00	-	-18	-
+CITA-III. 100 nM	44.36 $\pm$ 1.76	-	-23	-
+ TGF β -1. 5 nM + CITA-III. 1 nM	34.00 $\pm$ 0.86	-	-41	207
+ TGF β -1. 5 nM + CITA-III. 10 nM	34.03 $\pm$ 1.11	-	-41	207
+ TGF β -1. 5 nM + CITA-III. 100 nM	30.23 $\pm$ 1.69	-	-48	184
+ TGF β -1. 10 nM + CITA-III. 1 nM	24.36 $\pm$ 1.14	-	-58	1275
+ TGF β -1. 10 nM + CITA-III. 10 nM	19.04 $\pm$ 1.47	-	-67	997
+ TGF β -1. 10 nM + CITA-III. 100 nM	17.32 $\pm$ 0.27	-	-70	907

ES 2 282 301 T3

Estos resultados confirman que los CITA son inhibidores potentes de la actividad TGF- β 1. Se debe entender que si bien la invención ha sido descrita más arriba junto con las realizaciones específicas preferidas, la descripción y ejemplos tienen la intención de ilustrar y no limitar el alcance de la invención, el cual queda definido por el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

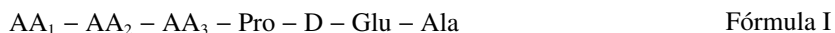
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Péptido que inhibe la actividad de TGF- β , comprendiendo el péptido la estructura primaria de Fórmula I



donde AA₁ es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina; AA₂ es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina; y AA₃ es alanina o N-metilalanina,

excluyendo el péptido Leu-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala.

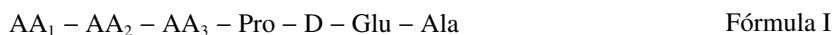
2. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende Phe-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala.

3. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende Leu-Phe-Ala-Pro-D-Glu-Ala.

4. Composición terapéutica que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador fisiológicamente aceptable.

5. Composición de la reivindicación 4, donde el portador es adecuado para la administración tópica.

6. Péptido que comprende la estructura primaria de Fórmula I:



donde AA₁ es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina; AA₂ es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina y AA₃ es alanina o N-metilalanina, excluyendo el péptido Leu-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala, para usar en un método de tratamiento de la fibrosis, cáncer, enfermedad autoinmune o supresión inmune de una infección vírica en un paciente.

7. Péptido para usar de acuerdo con la reivindicación 6, donde el péptido incluye Phe-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala o Leu-Phe-Ala-Pro-D-Glu-Ala.

8. Uso de un péptido que comprende la estructura primaria de Fórmula I



donde AA₁ es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina; AA₂ es leucina, fenilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilisoleucina o isoleucina y AA₃ es alanina o N-metilalanina, excluyendo el péptido Leu-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la fibrosis, el tratamiento del cáncer, el tratamiento de una enfermedad autoinmune o el tratamiento de una infección vírica acompañada de una respuesta inmune suprimida en un paciente.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde el medicamento es para aplicación tópica.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, para inhibir el tejido cicatrizado durante la cicatrización de la herida.

11. Uso de un péptido que comprende la estructura primaria de Leu-Ile-Ala-Pro-D-Glu-Ala para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la fibrosis o al tratamiento de una infección vírica acompañada de una respuesta inmune suprimida en un paciente.

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde el medicamento es para aplicación tópica.

13. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, para inhibir el tejido cicatrizado durante la cicatrización de una herida.

ES 2 282 301 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Bhatnagar, Rajendra S.
Gough, Craig A.
Qian, Jing Jing

<120> Inhibidores TGF-beta y procedimientos

<130> UCAL-225WO

<140> Sin asignar
<141> 2001-09-27

<150> 09/676.108
<151> 2000-09-29
<160> 3

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido

<221> VARIANT
<222> (5)...(5)
<223> d-aminoácido

<400> 1

Leu Ile Ala Pro Glu Ala
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido

<221> VARIANT
<222> (5)...(5)
<223> d-aminoácido

<400> 2

Phe Ile Ala Pro Glu Ala
1 5

<210> 3
<211> 6

ES 2 282 301 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Péptido

<221> VARIANT

10 <222> (5)...(5)
<223> d-aminoácido

<400> 3

15 Leu Phe Ala Pro Glu Ala
 1 5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65