



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 283 317**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00962685 .4**

(86) Fecha de presentación : **15.09.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1131348**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2001**

(54) Título: **Péptidos de ezrín de regulación/despliegue.**

(30) Prioridad: **17.09.1999 GB 9921881**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

(73) Titular/es: **Rupert Donald Holms**
66 Regent's Park Road
London NW1 7SX, GB

(72) Inventor/es: **Holms, Rupert Donald**

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos de ezrín de regulación/despliegue.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los péptidos que resultan útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer y trastornos del sistema inmunitarios.

10 **Antecedentes de la invención**

La ezrín es un elemento de la familia de los ERM (ezrín-radixin-moesin) de proteínas que desempeñan un papel estructural y regulador en un amplio valor de tipos celulares. Hay pruebas suficientes para indicar que la ezrín regula la estructura del citoesqueleto cortical para controlar la topografía de la superficie celular.

15 El análisis detallado de la estructura secundaria de la ezrín muestra que hay tres dominios estructurales principales: Un dominio N-terminal de aminoácidos del 1 al 300, un dominio α altamente cargado desde el aminoácido 300 al 470 y un dominio carboxiterminal desde los aminoácidos 470 al 585.

20 El documento WO95/33768 da a conocer un péptido de 14 aminoácidos identificado como HEP1, es decir TEKKRRETEREKE (idéntico a los aminoácidos 324-337 de la ezrín humana) que presenta un 70% de coincidencia con el carboxiterminal de gp 120, puede inhibir la replicación del VIH *in vivo* en el ser humano. A la vez se consideró que el efecto observado sobre el anti-VIH se debió a la provocación de la tolerancia inmunitaria para autoactivar las respuestas inmunitarias provocadas por el grupo carboxiterminal del VIH gp 120.

25 Gould *et al.*, EMBO J. (1989) 8(13): 4133-32, de a conocer péptidos idénticos a partes del receptor Hep.

Sumario de la invención

30 La conformación soluble de la ezrín encontrada en el citoplasma comprende dos dominios α helicoidales adyacentes, que están plegados juntos en una región bisagra (M339-M340) en dos hélices antiparalelas estabilizadas por cargas de la secuencia primaria de aminoácidos de la cadena lateral complementaria. La presente invención se basa en el conocimiento de que las cadenas laterales cargadas positiva y negativamente de la secuencia de aminoácidos del Dominio A del receptor Hep son complementarias a las cadenas laterales cargadas positiva y negativamente de la secuencia de aminoácidos del Dominio B del receptor Hep.

35 En la conformación abierta activada de la ezrín, la interacción del Dominio A y Dominio B de los receptores Hep de dos moléculas diferentes de la ezrín permite la formación del dímero antiparalelo. Además de los dímeros de la ezrín antiparalelos que se forman debajo de la superficie celular, se ha determinado que dichos dímeros se pueden formar entre un receptor Hep expuesto en la superficie en una célula con un receptor Hep expuesto en la superficie de otra célula. Cuando los dos receptores Hep entran en control durante una asociación cercana de dos superficies celulares, se inicia una activación de las señales en ambas células. Cualquier molécula cargada que imita parcialmente la interacción entre las cargas de las cadenas laterales del Dominio A y el Dominio B del receptor Hep, da lugar a una respuesta biológica muy útil en medicina.

40 La presente invención se basa también en la observación de que la actividad anti-VIH del HEP1 se debe a su enlace con el Dominio B del receptor Hep y la provocación de una respuesta inmunitaria nueva.

45 Según la presente invención, un péptido para el tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer o un trastorno del sistema inmunitario, comprende por lo menos 5 aminoácidos consecutivos de la siguiente secuencia de 34 aminoácidos:

M R E K E E L M L R L Q D Y(p) E E K T K K A E R E L S E Q I Q R A L Q.

50 Dicha secuencia de 34 aminoácidos es el DominioB-Receptor Hep (aminoácidos números 340-373 de la ezrín humana), en la que la Tiroxina 353 [Y] puede ser fosforilada a fosfotiroxina [Yp] en la conformación asociada a la membrana de la ezrín. Se ha determinado que el Dominio B del receptor Hep es el sitio en la ezrín al que el VIH gp120 se une durante la infección cerebral (VIH gp 120 se une al Dominio B del receptor Hep usando sus aminoácidos de terminal C que tienen un 70% de coincidencia con parte del Dominio A del receptor Hep). Las moléculas nuevas cargadas que se unen al receptor Hep pueden resultar útiles en el tratamiento de la demencia relacionada con el VIH.

65 Según un aspecto adicional de la presente invención, un péptido de la presente invención se usa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer o un trastorno del sistema inmunitario.

Descripción de la invención

Los péptidos de la presente invención presentan preferentemente de 5 a 13 aminoácidos. Péptidos de ejemplo de la presente invención son los siguientes péptidos de enlace con el Dominio A del receptor Hep:

5 Rupe2024: KEELM
 Rupe2032: KEELMLRLQDYEE
 10 Rupe2032p: KEELMLRLQDYpEE
 Rupe2132: EELMLRLQDYEE
 Rupe2132p: EELMLRLQDYpEE
 15 Rupe2132: ELMLRLQDYEE
 Rupe2132p: ELMLRLQDYpEE
 20 Rupe2428: MLRLQ
 Rupe2832: QDYEE
 Rupe22832p: QDYpEE

Otros péptidos u otras moléculas cargadas que se unen al Dominio A del receptor Hep son probablemente biológicamente activos. Dichos péptidos u otras moléculas cargadas pueden administrarse por vía oral y por otras vías, para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas y el cáncer.

Preparación

Los péptidos usados en la presente invención deben ser sintetizados, por ejemplo, usando un procedimiento de fase sólida, utilizando Boc o Fmocquímica o cualquier otra ruta práctica para la síntesis de péptidos conocida por los expertos en la síntesis de péptidos.

Se puede realizar la síntesis de la fase sólida gradualmente con aminoácidos Boc mediante el procedimiento de Merrifield; (*Journal of American Chemical Society* 85 2149-2154). Se pueden utilizar los siguientes compuestos: (Resina Novabiochem: Boc-Glu(OBzl)-PAM; Aminoácidos: Boc-Lys (2Cl-Z)-OH, Boc-Glu(OBzl)OH, Boc-Arg(Tos) OH, Boc-Val-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH; Disolventes: DMF (Rathburn), Diclorometano (BDH), Etilacetato (BDH); Reactivos: HBTU (Phase Separations Ltd), p-Cresol (Lanchester), TFA (Halocarbon Products Corporation), HF (BOC) DIEA (Fluka). Los reactivos recomendados con grupos protectores de cadena lateral para aminoácidos Boc son: Arg (Tos), Asn (Xan), Asp (OcHxl), Glu (OcHxl) Gln (Xan) o Gln, His (DNP), Lys (CIZ), Serina (Bzl) Tyr (BrZ) Trp (CHO). Las abreviaturas tienen los siguientes significados: DCC= Dicclohexildarbodilmida, DIC= Dilsopropilcarbodimida, DCM= Diclorometano, DMF= Dimetilformamida, TFA= Ácido Trifluoroacético, Boc= t-Butiloxicarbonilo, HOBT= Hidroxibenzotriazol, DIEA= Diisopropiletilamina, DCU= Diccloexilurea.

Por ejemplo, la síntesis boc de un péptido de la presente invención se podría realizar del siguiente modo: activación de HBTU *in situ* neutralización en la escala 0,5 mmol de resina y un excedente de tres veces de aminoácido Boc activado. El aminoácido Boc y el reactivo de activación (HBTU) deben ser usados en cantidades equimolares de 2 mmol cada una, en dicho caso igual a un excedente de tres veces. La DIEA se usa para neutralizar la resina para unir y para activar el aminoácido Boc. (Por ello se usa 2,5 mmol, 1 equivalente de aa Boc y 1 equivalente de resina). Reactivos: 0,5 M HBTU en DMF (MW=379, 0,5 M=18,95 g en 100 ml, tenga en cuenta que no es estable a la luz) requiere 2 mmol=4 ml y 2,5 mmol DIEA=0,46 ml (MW=129, d=0,742). Activación de aminoácidos: los aminoácidos Boc deben de ser activados sólo inmediatamente antes de la adición de la resina, especialmente en el caso de Arg (Tos). Para todos los aminoácidos Boc: pesar 2 mmol de aminoácido Boc en una botella de muestra de cristal de 20 ml. Añadir 4 ml de solución HBTU 0,5M y agitar para disolver el sólido. Añadir 0,46 ml de DIEA y mezclar (se puede observar un cambio de color). Procedimiento: lavar la resina con DMF, quitar el grupo protector Boc con TFA al 100% agitar dos veces durante un minuto drenando entre agitación, drenar, lavar con flujo de DMF durante 1 minuto, drenar, añadir solución activadora de aminoácido, agitar durante 10 minutos, a continuación tomar la muestra y realizar el test ninhydrin para determinar la eficiencia de enlace. Cuando se complete la síntesis, lavar con DMF, a continuación DCM y secar. La síntesis del primero y cada nivel posterior en la construcción del péptido se consigue usando un excedente de tres veces de HBTU de aminoácidos Boc activados en DMF. En todos los enlaces la eficiencia de enlace debe ser mayor del 99%, como se indica en el test cuantitativo ninhydrin. La desprotección del grupo aminoterminal se realiza en TFA al 100%. El péptido de resina se lava cuidadosamente antes y después de la desprotección. Tras la última unión y eliminación de la protección Boc, la resina de péptido se lava con diclorometano y se seca con aire. Los péptidos se quitan del soporte de resina que se precipita con acetato de etilo (100 ml) y se disuelven de nuevo en una solución de 6M guanidina HCL-0,1M TRIS.

ES 2 283 317 T3

El péptido puede purificarse como se indica usando un HPLC analítico de separación en una columna Vydac C₁₈ 5 RAC. Acetonitrilo de calidad HPLC (Aldrich) y agua se filtran a través del filtro de membrana y desgasificarse con un flujo de helio previo su utilización. La separación analítica se realiza con un gradiente de disolvente empezando con acetonitrilo al 0%, aumentando constantemente hasta un 60% de acetonitrilo a los 20 minutos, permaneciendo en esta concentración durante veinte minutos y disminuyendo hasta el 0% de acetonitrilo durante 10 minutos hasta una corriente constante de 1,2 ml por minuto. La separación preparatoria del péptido se realiza en un GEL TSK en columna C₁₈. La separación se efectúa con un gradiente de disolvente empezando con acetonitrilo al 0%, aumentando constantemente hasta un 18% de acetonitrilo a los 60 minutos, a continuación acetonitrilo al 60% durante 80 minutos, permaneciendo a esta concentración durante 30 minutos a un flujo constante de 8 ml por minuto. El gradiente se puede controlar dos bombas de pistón simple Wilson 302 controladas por microprocesador. Los compuestos pueden detectarse con un Detector de Absorbancia Waters 486 ajustable a 214 nm y cromatógrafos analíticos registrados con una HP jet de laser 5L. Se puede registrar un detector Holochrome UV-VIS 220 nm para cromatógrafos con un grabador de canal único LKB 2210. El control de calidad por Electroforesis Capilar puede realizarse con un equipo Waters Quanta 4000 usando un tampón de fosfato (75 µM) pH 2,5 corriendo a 15 KV, el tiempo de la muestra de 20 segundos, cargada por inyección hidrostática en una columna de 60 cm, tiempo de carrera 12 minutos. El rendimiento de 1 g, 0,46 mmol de síntesis de resina debe ser de unos 250 mg de péptido puro.

Se pueden usar procedimientos alternativos de síntesis de disolución para producir cantidades mayores de los péptidos de la presente invención. Se pueden obtener fragmentos protegidos recortados usando la síntesis etapa a etapa por el procedimiento activo de ésteres conocido por los expertos en la técnica de la síntesis de péptidos. Los fragmentos se montan a continuación usando DCC/HOBT tras quitar los grupos protectores carboxiterminal aminoterminal. Tras quitar todos los grupos protectores, el péptido crudo está parcialmente purificado en cromatografía de intercambio de iones SP-Sephandex-C25 PLC preparatoria y a continuación se liofiliza.

25 *Uso*

Se puede disolver de 0,01 a 1000 mg de péptido liofilizado en de 1 a 10 ml de agua destilada y administrarse por vía oral o vaginal. De 0,01 a 1000 mg pueden formularse en una píldora o cápsula o supositorio con excipientes usados comúnmente por aquellos expertos en la fabricación de las píldoras, cápsulas o supositorios y administrarse por vía oral, vaginal o rectal. Una solución esterilizada con filtro de entre 0,001 y 100 miligramos de péptido en agua destilada puede inyectarse por vía subcutánea, ultravenosa o intramuscular.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar sólo la presente invención, y no deben interpretarse como límite de modo alguno.

35 Ejemplo 1A

Se ha demostrado que los péptidos receptores Hep presentan una actividad adyuvante significativa y esto se demuestra mediante la respuesta mejorada del anticuerpo IgG contra la ovoalbúmina en ratones, y mejorando la respuesta citotóxica dependiente de anticuerpo en timo contra los hematíes de oveja (SRBC) en ratones, usando Rupa2032.

La respuesta del IgG en ratones dos semanas tras una inyección de 50 microgramos de ovoalbúminas más diversas concentraciones determinadas de Rupe 2032, la respuesta de IgG se determinó por Densidad Óptica (OD) de una a 100 diluciones de suero de ratón en presencia de ovoalbúmina. La siguiente tabla ilustra la respuesta del IgG registrado como OD:

Código del Péptido	Control		Inyección de IP (µg/ratón)		
	0	0,01	0,1	1	10
Rupe2032	0,127	0,509	0,606	0,327	0,203

La siguiente tabla informa de la respuesta del IgG registrada como OD a continuación los datos recalculados en relación a 100 para cada control:

Código del Péptido	Control		Inyección de IP (µg/ratón)		
	0	0,01	0,1	1	10
Rupe2032	100	401	477	257	160

Ejemplo 1B

Se determinó la influencia de los péptidos de receptores Hep en la activación de las células productoras de anticuerpos contra los eritrocitos de oveja (SRBC) en ratones híbridos (CBA - C57Bl Fi, de dos meses de edad, peso de 18 a 22 gramos) se determinó. En primer lugar se inyectaron a los ratones por vía intraperitoneal utilizando tanto 0,5 de solución salina estéril como un control o Rupe 2032 en el mismo volumen de disolución salina. 30 minutos tras la inyección de los péptidos, se administró por vía intraperitoneal a cada ratón una suspensión celular conteniendo 5 millones de SRBC. Cuatro días tras la inmunización, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se procedió a la extracción aséptica de los bazo. Cada bazo fue homogeneizado en 2 ml de Medio 199, a continuación 100 ml de esta suspensión se pusieron en 1 ml de agarosa preparada en Medio 199 (almacenado en un baño de agua a 48°C), y la suspensión de SRBC se añadió, resultando en una concentración final de agarosa al 1%. Se agitó 1 ml de la mezcla de agarosa y células y se transfirió a una placa de Petri para estabilización. Cuando la agarosa se puso sólida, la placa petri se incubó durante 1 hora a 37°C a continuación 0,5 ml de 1 en 20 de suero de cobaya diluido en Medio 199 se añadió al de agarosa como una fuente de complemento. Se continuó la incubación durante otra hora. Las placas luego fueron visualizadas usando un microscopio binocular de 8x y el número de placas contadas (cada placa equivalente a una célula del bazo de ratón secretora de anticuerpos). Los resultados se expresaron como el número de células secretoras de anticuerpo por un millón de células nucleadas del bazo y el número de células secretoras de anticuerpos por todo el bazo. Como no se observó ningún efecto mitógeno (la administración de péptido receptor Hep produjo bazo murinos de tamaño normal), estos dos cálculos dieron unos resultados similares.

La siguiente tabla ilustra los datos medios (desde treinta ratones por punto de datos) del número de células formadoras de anticuerpos por un millón de células nucleadas del bazo. Los datos se recalcularon en relación a 100 por cada grupo de control.

Código del Péptido	Control		Inyección de IP (µg/ratón)
	0	1	10
Rupe2032	100	236	232

REIVINDICACIONES

5 1. Péptido para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, cáncer o un trastorno que requiera la estimulación de la respuesta inmunitaria, comprendiendo el péptido por lo menos 5 aminoácidos consecutivos de la siguiente secuencia de 34 aminoácidos:

M R E K E E L M L R L Q D Y (p) E E K T K K A E R E L S E Q I Q R A L Q

10

2. Péptido según la reivindicación 1, que presenta de 5 a 13 aminoácidos.

3. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos KEELM.

15

4. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos KEELMLRLQDYEE.

5. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos KEELMLRLQDYpEE.

20

6. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos EELMLRLQDYEE.

7. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos EELMLRLQDYpEE.

8. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos ELMLRLQDYEE.

25

9. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos ELMLRLQDYpEE.

10. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos MLRLQ.

11. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos QDYEE.

30

12. Péptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos QDYpEE.

35 13. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad infecciosa, cáncer o trastorno que requiera la estimulación de la respuesta inmunitaria.

40

45

50

55

60

65