



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 849**

51 Int. Cl.:
A61K 31/39 (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01)
A61K 31/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01942551 .1**
86 Fecha de presentación : **18.01.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1265605**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos cíclicos peptidomiméticos con giro β .**

30 Prioridad: **18.01.2000 US 176482 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es: **McGill University**
845 Sherbrooke Street West
Montreal, Québec H3A 2T5, CA
The Texas A & M University System

72 Inventor/es: **Saragovi, Horacio, Uri y**
Burgess, Kevin

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 273 849 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

Composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos cíclicos peptidomiméticos con giro β .

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a composiciones farmacéuticas agonistas y antagonistas de receptores de neurotrofinas, que comprenden un compuesto cíclico peptidomimético con giro β que mimetiza a una neurotrofina y que tiene la fórmula (I) presentada a continuación, y a usos de dichas composiciones.

10 Técnica antecedente

La tirosina quinasa A (TrkA) es un receptor de tipo tirosina quinasa transmembrana con alta selectividad por la neurotrofina conocida como factor de crecimiento nervioso (NGF). Las neurotrofinas relacionadas incluyen el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) que se une a receptores de tipo tirosina quinasa B (TrkB) y la Neurotrofina-3 (NT-3) que prefiere unirse a receptores de tipo tirosina quinasa C (TrkC).

El acoplamiento de TrkA con NGF inicia la dimerización del receptor, la fosforilación catalítica de restos de tirosina citoplásmicos del receptor y una cascada de sucesos de señalización celular. Estas señales conducen a la prevención de la muerte celular apoptótica, a la promoción de la diferenciación celular y el alargamiento de axones y a la regulación positiva de la acetilcolina transferasa (ChAT). Esto mismo se aplica a otras neurotrofinas, con la excepción de que las diferentes poblaciones celulares responden selectivamente basándose en sus patrones de expresión de receptores. El NGF se usará como prueba para determinar la actividad biológica, pero las nociones se aplicarán a todas las neurotrofinas (NTF).

Varios tipos de células neuronales que están implicados en importantes estados de enfermedad expresan TrkA y, por lo tanto, responden a NGF, incluyendo neuronas sensoriales, simpáticas y colinérgicas. Se ha sugerido que la terapia con NGF puede retrasar el inicio de la enfermedad de Alzheimer, prevenir la pérdida funcional asociada con un ictus cerebral y mejorar las neuropatías diabéticas periféricas. Otras aplicaciones propuestas para el NGF incluyen el tratamiento de lesiones neuronales y la dirección a tumores derivados del neuroectodermo. Como revisión de enfermedades diana véase (Saragovi y Burgess, 1999).

A pesar del potencial terapéutico del NGF, los ensayos clínicos que se centran en esta proteína han sido decepcionantes (Saragovi y Burgess, 1999). Hay varias razones para esto: los inconvenientes intrínsecos asociados con el uso de polipéptidos aplicados como fármacos, inestabilidad *in vivo* y efectos pleiotrópicos debidos a la activación de señales que no se dirigieron intencionadamente. Además, la producción de la proteína NGF para aplicaciones medicinales es relativamente cara.

Los agonistas de los receptores TrkA, TrkB, TrkC y p75 tendrían utilidad en el tratamiento y prevención de trastornos mediados por receptores de tipo tirosina quinasa, por ejemplo, neurodegeneración crónica o aguda, dolor, cáncer, ataques cerebrales, neuromas, enfermedades del nervio ocular, tales como glaucoma, y enfermedad de Alzheimer.

Las estrategias que dan como resultado agonistas de receptores de tipo tirosina quinasa no están bien establecidas. Previamente, se han intentado estrategias de mimetismo de ligandos y mimetismo de anticuerpos para generar análogos peptídicos de dos agonistas dirigidos al dominio extracelular de TrkA: el ligando natural NGF (LeSauter *et al.*, 1995) y el anticuerpo monoclonal (mAb) 5C3 (LeSauter *et al.*, 1996). La unión de TrkA está mediada por regiones con giro β discretas de estos ligandos. Sólo ciertos análogos con giro β cíclicos eran activos (Beglova *et al.*, 1998) y otros confórmeros o péptidos lineales eran inactivos.

50 Descripción

Esta invención pretende proporcionar una composición farmacéutica agonista o antagonista de receptores de neurotrofinas.

La invención también pretende proporcionar su uso en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir trastornos de tejidos en los que participan receptores de neurotrofinas.

Además, esta invención pretende proporcionar el uso de compuestos cíclicos peptidomiméticos con giro β para uso en la evaluación de requisitos estructurales de agonistas y antagonistas de receptores de neurotrofinas.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica agonista o antagonista de receptores de neurotrofinas que comprende una cantidad agonista o antagonista de receptores de neurotrofinas aceptable de un compuesto cíclico peptidomimético con giro β que mimetiza a las neurotrofinas y que tiene la fórmula (I), como se define más adelante, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto cíclico peptidomimético con giro β que mimetiza a una neurotrofina y que tiene la fórmula (I) como se define más adelante, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno mediado por receptores de neurotrofina.

ES 2 273 849 T3

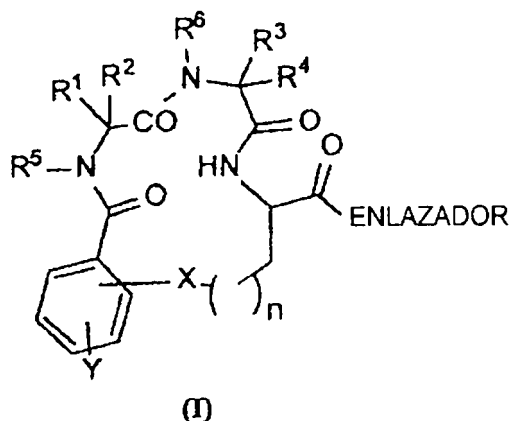
De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de compuestos cíclicos peptidomiméticos con giro β de fórmula (I) para evaluar los requisitos estructurales de compuestos cíclicos peptidomiméticos con giro β que mimetizan a las neurotrofinas. Los compuestos de fórmula (I) son

5

10

15

20



o un dímero de los mismos, donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan entre sustituyentes de cadena lateral hidrógeno, alquilo o arilo que se encuentran en un aminoácido natural o no natural; o

25

R^1 y R^2 o R^3 y R^4 junto con el átomo de carbono al que están unidos pueden formar un grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo,

30

Y es hidrógeno o uno o dos sustituyentes seleccionados entre nitro, amino, halo, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo o naftilo, estando dicho grupo alquilo, fenilo o naftilo sin sustituir o sustituido con nitro o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, o Y es un grupo modificado que contiene biotina,

X es O, N, S, P, Se, C, NH, SO, SO₂ o alquileo de 1 a 6 átomos de carbono,

35

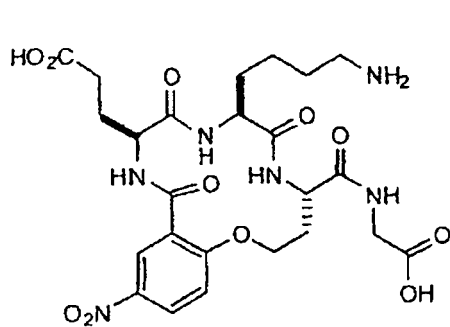
n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5, y

ENLAZADOR es un grupo de unión eficaz para formar un dímero del compuesto por reacción con un compuesto homo difuncional, llevando dicho enlazador un grupo seleccionado entre NH₂, OH, SH, COOH, CH₃CO y CHO, Zhicheng Wang *et al.* (1999) y Yangbo Feng *et al.* (1999) en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40

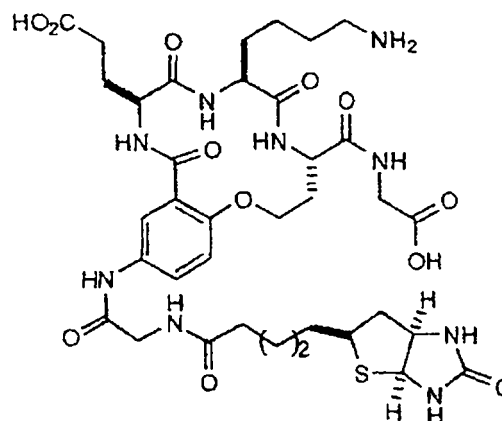
Los compuestos de fórmula (I) incluyen el material denominado D3 y sus derivados.

45



(Yanbo Feng y K. Burgess, 1999)

60



65

Algunos de estos derivados pueden ser modificaciones sencillas y evidentes tales como formas biotinizadas y moléculas en las que dos de estas unidades están unidas por dímeros. Otros derivados obvios de D3 incluyen los siguientes. Las cadenas laterales R^1 - R^6 podrían incluir cualquier sustituyente alquilo o arilo encontrado en aminoácidos naturales y no naturales.

ES 2 273 849 T3

Las cadenas laterales típicas de los aminoácidos de las proteínas (por ejemplo, Arg, Trp, His) tienen un interés particular y en la presente invención se han preparado muchos compuestos de esta serie, pero la diversidad de estructuras que generan fácilmente derivados de D3 incluyen muchos tipos de grupos funcionales. Los aminoácidos constituyentes pueden ser derivados N-alquilo, N-arilo o α,α -dialquilo y derivados cíclicos, tales como los que podrían formarse a partir de aminoácidos de ciclopropano.

El sustituyente o los sustituyentes Y es hidrógeno o uno o dos sustituyentes elegidos entre nitro, amino, halo, alquilo C_{1-6} , preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, fenilo o naftilo. Los sustituyentes alquilo, fenilo y naftilo Y pueden estar sin sustituir o sustituidos con nitro o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono.

Y también puede modificarse con un grupo funcional que contiene biotina. El grupo X es O, N, S, P, Se, C, NH o alquilenos C_{1-6} . El punto de conexión podría ser *orto* o *meta* con respecto al carbonilo del benzoílo. Los valores de "n" son 0, 1, 2, 3, 4 y 5. La cadena lateral de unión que incorpora X puede ser alifática como se indica en la estructura (I), aromática o heteroaromática.

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan entre sustituyentes de cadena lateral hidrógeno, alquilo o arilo encontrados en un aminoácido natural o no natural; o

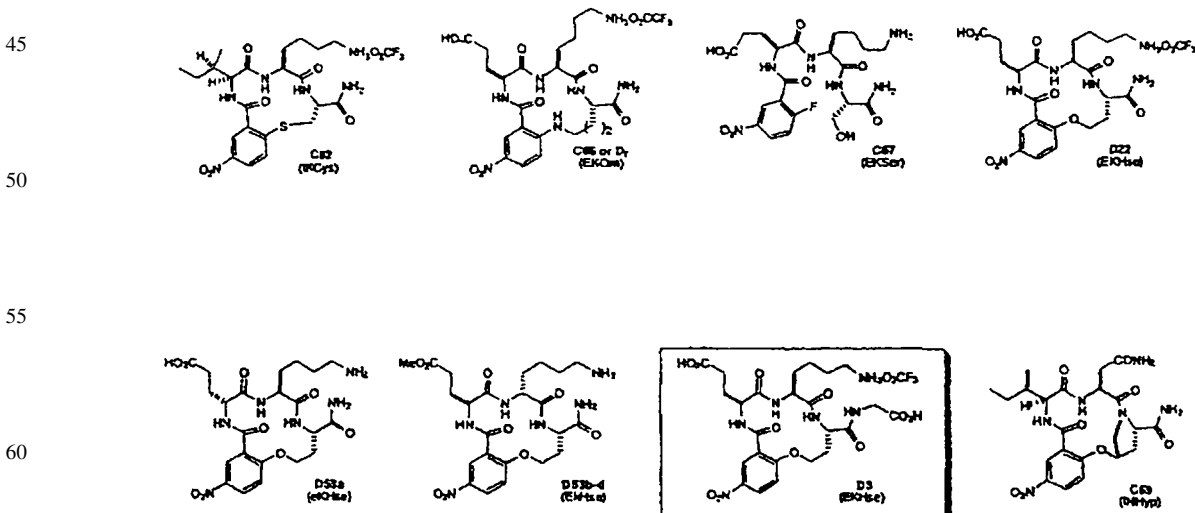
R^1 y R^2 o R^3 y R^4 junto con el átomo de carbono al que están unidos pueden formar un grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

Hay mucha libertad de variación en R^5 y R^6 pero, con mucho, el sustituyente más común en estas posiciones es hidrógeno. Los sustituyentes también podrían diseñarse para corresponder a una de las cadenas laterales de los veinte aminoácidos de las proteínas, principalmente metilo.

Más especialmente, los compuestos (I) son compuestos preparados a partir de los veinte aminoácidos de las proteínas o análogos sencillos de éstos, incluyendo sus enantiómeros, N-alquil-aminoácidos, N-aril-aminoácidos, α,α -dialquil-aminoácidos y aminoácidos cíclicos. Se considera que se obtienen particularmente actividades biológicas cuando R^1 y R^3 son cadenas laterales de lisina, ácido glutámico, tirosina, isoleucina, asparagina y treonina, y R^2 , R^4 , R^5 , y R^6 son hidrógeno. Una o más de las cadenas laterales se seleccionan especialmente para que correspondan a cadenas laterales dentro de regiones de giro de las proteínas neurotrofinas a las que mimetiza el compuesto cíclico, por ejemplo, NGF, NT-3, NT 4/5 y/o BDNF.

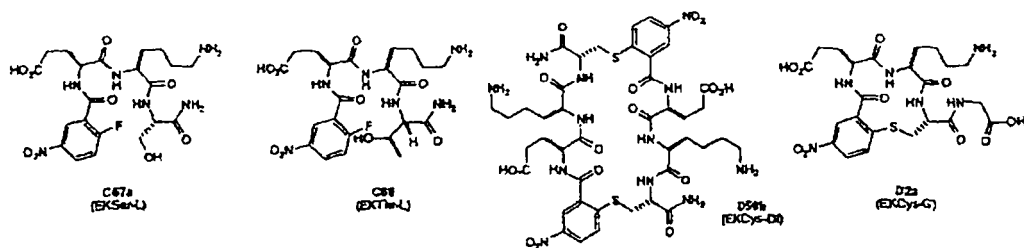
En general, los compuestos macrocíclicos tienen anillos de 13 a 16 miembros donde el sustituyente X es O, N, S, SO o SO_2 . Los fragmentos moleculares Z e Y típicamente son anillos aromáticos basados en un sistema de anillo sencillo, particularmente bencenos sustituidos. En esta posición, son permisibles bencenos sustituidos con nitro, amino, cloro, bromo y flúor.

En general, se han preparado varios cientos de compuestos que se ajustan a la estructura indicada anteriormente. Más adelante se indican algunos ejemplos específicos de compuestos (I) y que se han ensayado en ensayos de actividades relacionadas con neurotrofinas.



ES 2 273 849 T3

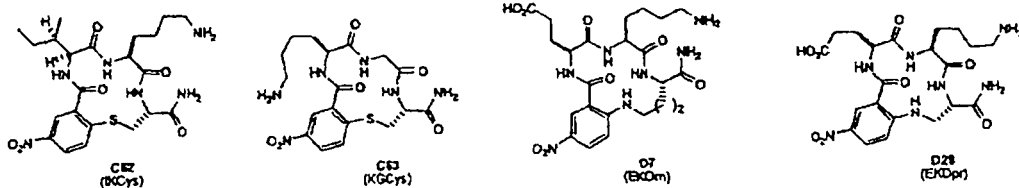
5



10

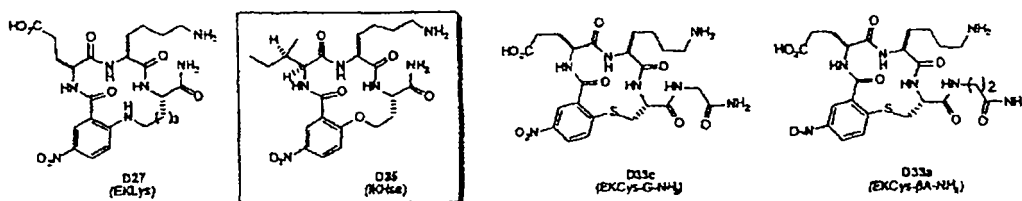
15

20



25

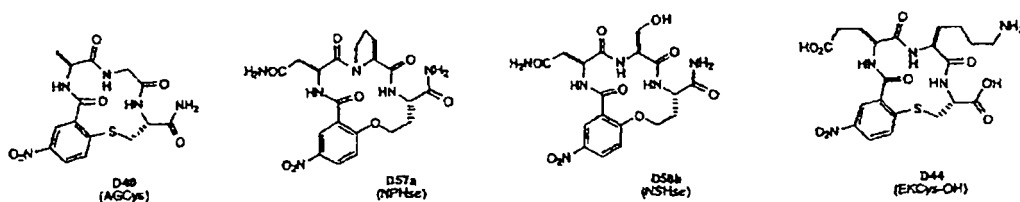
30



35

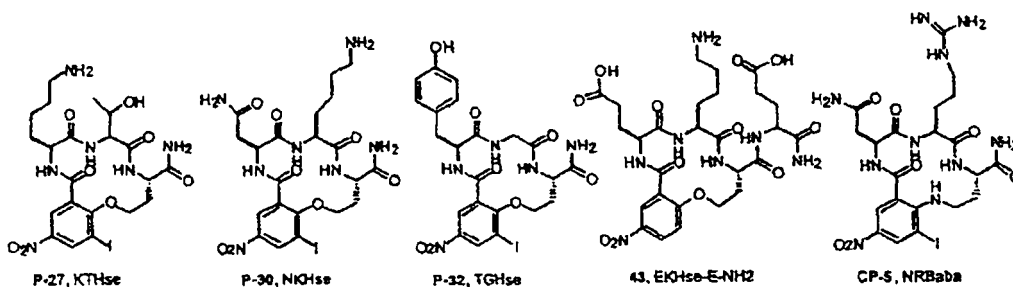
40

45



50

55

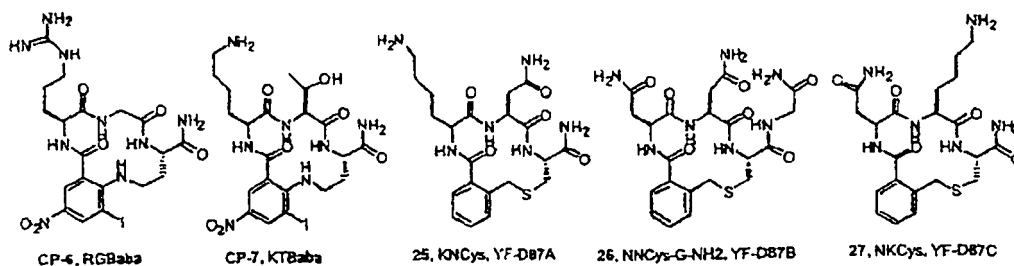


65

ES 2 273 849 T3

5

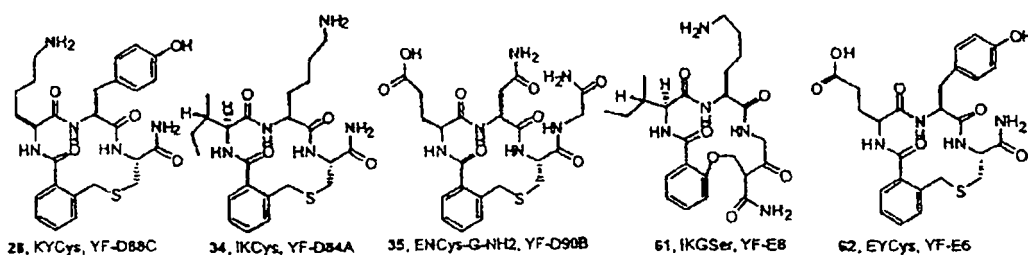
10



15

20

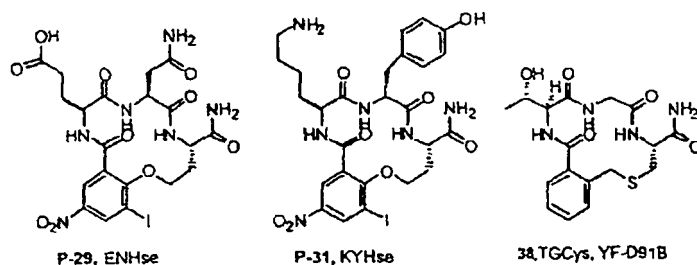
25



30

35

40



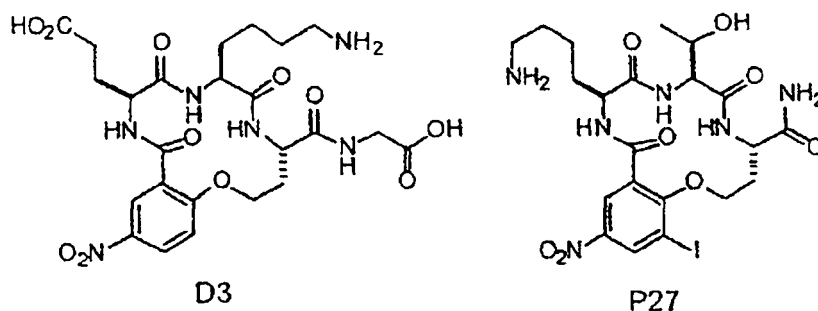
45

Son ejemplos de realizaciones que mimetizan la actividad neurotrófica los agentes denominados D3, P27, D53b-d, 25, P56, P57, P58, P39, D21, D46, D40 y P23. Son ejemplos de realizaciones que antagonizan la actividad neurotrófica P42 y P43. Estos agentes se muestran a continuación:

50

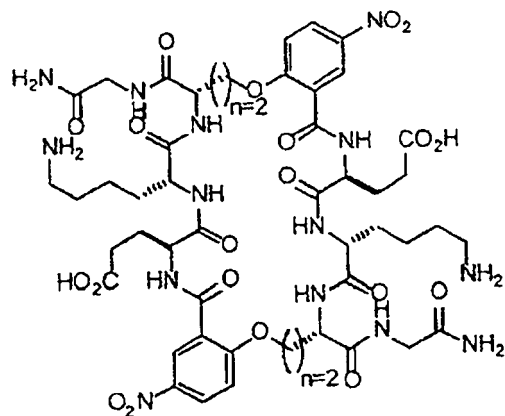
55

60

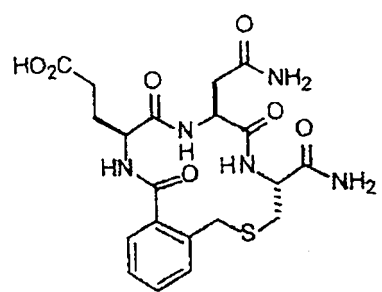


65

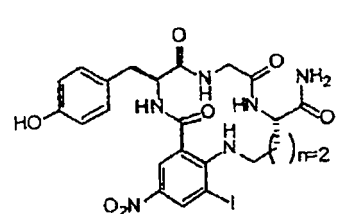
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



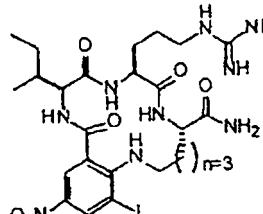
D53b-d



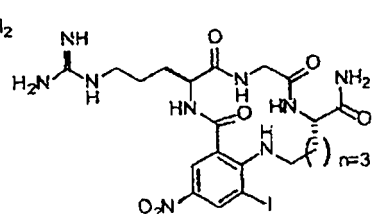
25



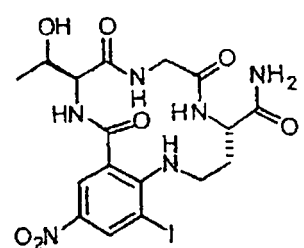
P56



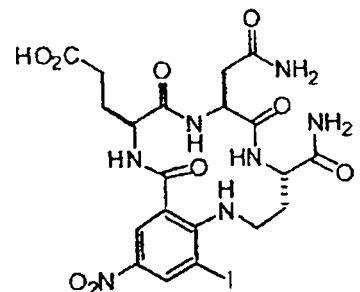
P57



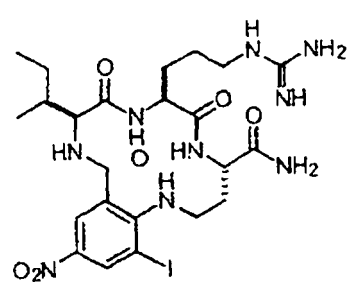
P58



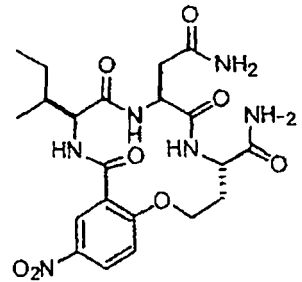
P42



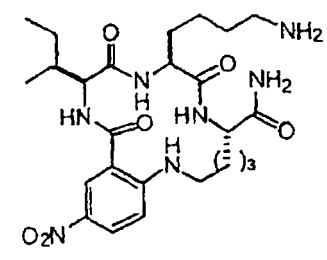
P43



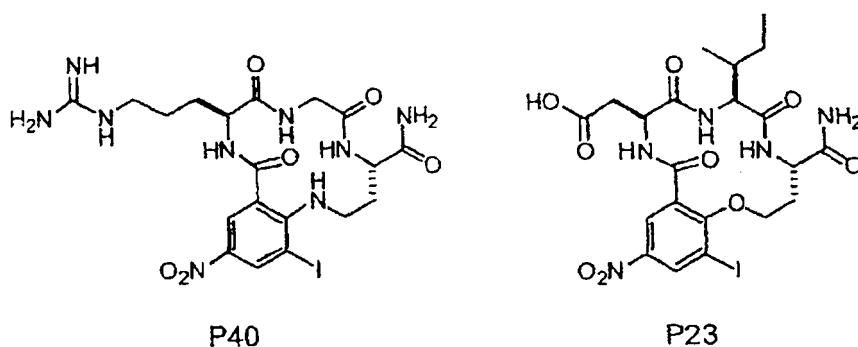
P39



D21



D46



Descripción detallada de la invención

En la presente invención se han desarrollado composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas pequeñas, proteolíticamente estables, con actividad neurotrófica, selectivas para células que expresan receptores de neurotrofinas (receptores de tipo tirosina quinasa Trk y receptores p75).

Basándose en los farmacóforos del mAb 5C3 y de análogos peptídicos de NGF descritos previamente, se ha sintetizado una biblioteca centrada de compuestos peptidomiméticos con giro β .

La biblioteca de compuestos se compone de compuestos cíclicos peptidomiméticos con giro β . Estos compuestos, en particular, mimetizan a las neurotrofinas, y por lo tanto son agonistas o antagonistas de los receptores de neurotrofinas, o pueden emplearse en la selección y/o evaluación de los requisitos estructurales necesarios de estos agonistas y antagonistas.

En general, los compuestos cíclicos tienen un anillo macrocíclico de 13 a 17, más especialmente 14, 15 ó 16 átomos de anillo; y el anillo está formado predominantemente por una cadena principal de carbono y nitrógeno que tiene cadenas laterales de aminoácidos que pueden ser naturales o sintéticas.

El anillo puede caracterizarse por una o más cadenas laterales en el enlace peptídico, especialmente en las posiciones i , $i+1$, $i+2$ e $i+3$. El compuesto cíclico típicamente tiene 1, 2 ó 3 cadenas laterales.

Dichas una o más cadenas laterales corresponden más especialmente a cadenas laterales dentro de giros β de una proteína neurotrófica a la que mimetiza el compuesto cíclico, y en particular los giros β corresponden a los giros β de una neurotrófica tal como NGF, NT-3, NT 4/5 y BDNF.

Los compuestos cíclicos peptidomiméticos con giro β de la invención, en realizaciones particulares, pueden representarse por la fórmula (I), como se ha definido anteriormente en este documento.

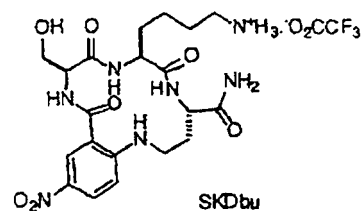
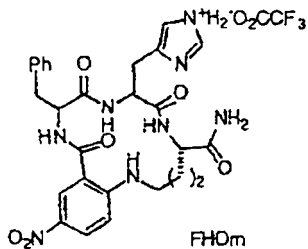
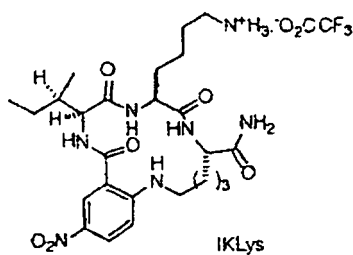
En la fórmula (I), el anillo macrocíclico que contiene de R_1 a R_6 convenientemente tiene de 13 a 17 y preferiblemente, 14, 15 ó 16 átomos de anillo.

En realizaciones preferidas, X es O, S o NH y R_1 , R_3 , R_5 y R_6 son átomos de hidrógeno. Cuando Y es un sustituyente, pueden funcionar como un marcador o precursor de un marcador, pudiendo emplearse dicho marcador en la evaluación de la unión directa, la distribución *in vivo* y la capacidad agonista o antagonista del compuesto cíclico.

El grupo ENLAZADOR funciona como un grupo de unión eficaz para formar dímeros del compuesto (I) por reacción con un compuesto homobifuncional tal como polietilenglicol, llevando el ENLAZADOR un grupo elegido entre NH_2 , OH, SH, $COOH$, CH_3CO y CHO.

A continuación se indican compuestos representativos de fórmula (I) que se han producido como parte de la biblioteca mencionada anteriormente.

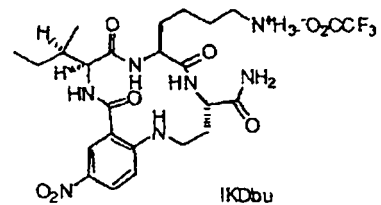
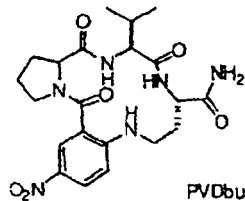
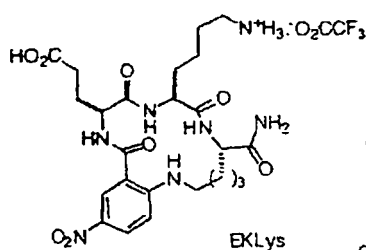
5



10

15

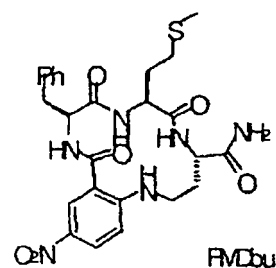
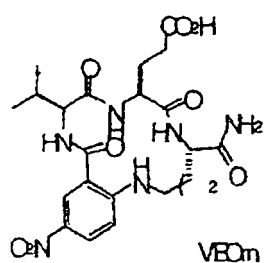
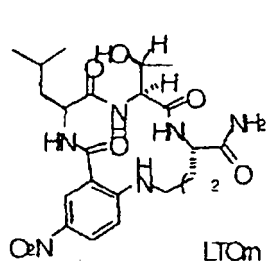
20



25

30

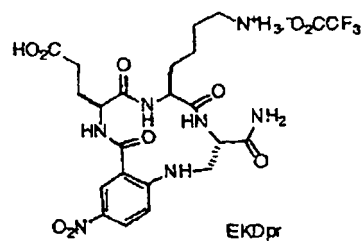
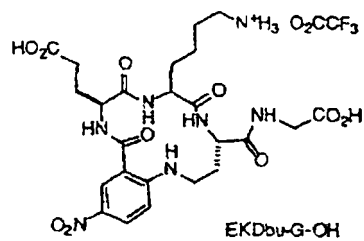
35



40

45

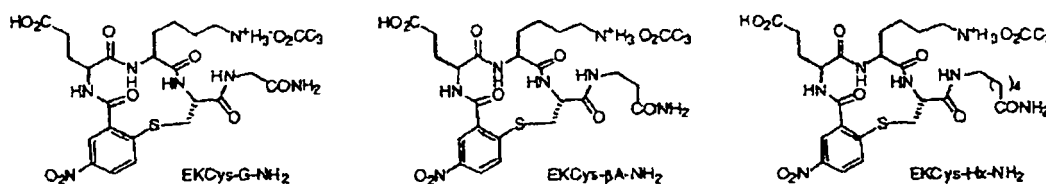
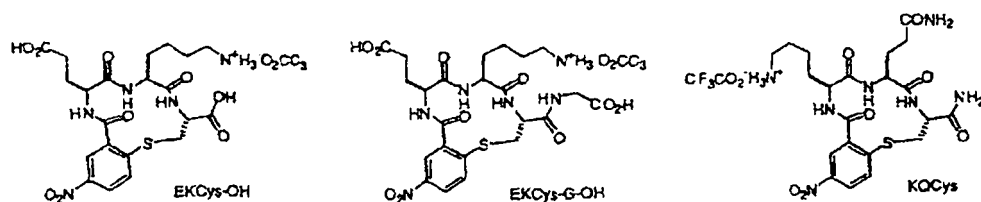
50



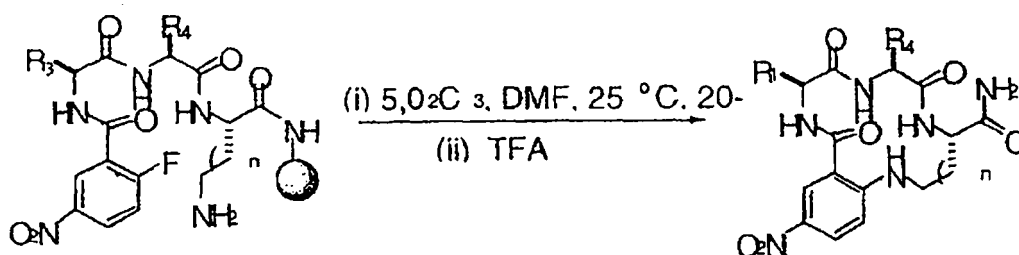
55

60

65



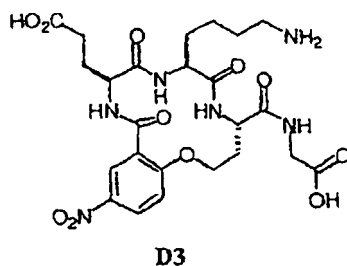
Los compuestos cíclicos de la invención pueden prepararse de acuerdo con el procedimiento descrito por Feng *et al* en J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 10768-1076. El tipo general de reacción se ilustra a continuación

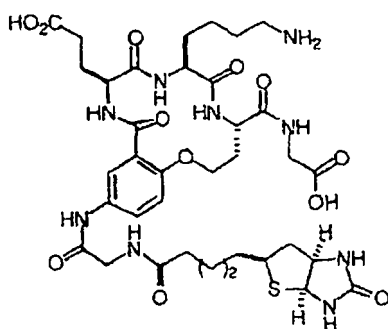


Esta reacción es una macrociclación de S_NAr en fase sólida en la que los aminoácidos secuencialmente forman enlaces peptídicos del anillo macrocíclico. Si es necesario, pueden protegerse las cadenas laterales del enlace peptídico, por ejemplo, como ésteres t-butílicos o BOC-amidas.

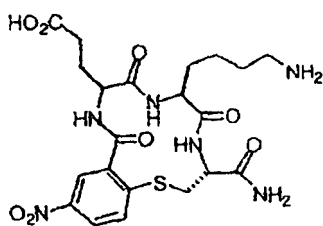
El sustituyente Y en la fórmula (I) puede ser, por ejemplo, NO_2 , el cual puede reducirse fácilmente a amino que puede emplearse para crear un marcador de biotina; otros marcadores que podrían unirse al sustituyente Y incluyen elementos radiactivos tales como yodo y tecnecio.

La invención se ilustra en lo sucesivo haciendo referencia al compuesto EKHse-G-OH denominado en lo sucesivo por conveniencia D3 y su derivado de biotina denominado en lo sucesivo D3-biotina, y al compuesto EKCys denominado en lo sucesivo por conveniencia C59 y que es un análogo de D3, indicándose las estructuras a continuación





D3-Biotina



C59

Las propiedades agonistas o antagonistas de los receptores de neurotrofinas se utilizan de la forma más eficaz en el tratamiento de trastornos mediados por receptores de neurotrofinas cuando el compuesto cíclico se formula en nuevas composiciones farmacéuticas con un vehículo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas convencionales de preparación de composiciones farmacéuticas.

Las nuevas composiciones contienen al menos una cantidad agonista o antagonista de un receptor terapéutico de neurotrofina del compuesto cíclico activo. Generalmente, la composición contiene hasta 0,1-100 mg/kg de peso corporal del paciente del compuesto cíclico. Las composiciones concentradas adecuadas para la dilución antes del uso pueden contener 90% en peso o más. Las composiciones incluyen composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa), pulmonar (inhalación nasal o bucal), administración nasal o insuflación. Las composiciones pueden pre-ensavarse mezclando íntimamente el compuesto cíclico con los componentes adecuados para el medio deseado.

Cuando se va a emplear la administración oral, puede ser con una composición líquida. En el caso de las preparaciones líquidas, el agente terapéutico se formula con vehículos líquidos tales como agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares, y en el caso de preparaciones sólidas tales como cápsulas y comprimidos, con vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, etilcelulosa, carbonato cálcico y sódico, fosfato cálcico, caolín, talco o lactosa, generalmente con lubricantes tales como estearato cálcico, junto con aglutinantes, agentes disgregantes y similares. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma de dosificación oral más ventajosa. Es especialmente ventajoso formular las composiciones en forma de dosificación unitaria (como se define más adelante) para facilitar la administración y para permitir la uniformidad de la dosificación. La composición en forma de dosificación unitaria constituye un aspecto de la presente invención.

El compuesto cíclico también puede formularse en composiciones terapéuticas para inyección intravenosa o intraperitoneal y puede presentarse en una forma de dosificación unitaria en ampollas o en recipientes multidosis, si es necesario con un conservante añadido. Las composiciones también pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos tales como cloruro sódico o dextrosa en agua, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Pueden añadirse agentes tamponantes así como aditivos tales como solución salina o glucosa para hacer que las soluciones sean isotónicas. El compuesto cíclico también puede solubilizarse en alcohol/propilenglicol o polietilenglicol para una administración intravenosa por goteo. Como alternativa, los ingredientes activos pueden estar en forma de polvo para reconstituirse con un vehículo adecuado antes de la administración.

La expresión "forma de dosificación unitaria" en este documento se refiere a unidades físicamente discretas, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico. Son ejemplos de estas formas de dosificación unitarias comprimidos, cápsulas, píldoras, paquetes de polvo, obleas, unidades medidas en ampollas o en recipientes multidosis y similares. Una dosificación unitaria de la presente invención generalmente contendrá de 100 a 200 mg de uno de los compuestos cíclicos.

Para administración por inhalación, los compuestos cíclicos de la presente invención convenientemente se suministran en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o nebulizadores. Los compuestos cíclicos también pueden administrarse como polvos que pueden formularse y la composición de polvo puede inhalarse con la ayuda de un dispositivo inhalador de polvo de insuflación. El sistema de administración preferido para inhalación es un aerosol de inhalación de dosis medidas (MDI) que puede formularse como una suspensión o solución del compuesto cíclico en propulsores adecuados, tales como fluorocarburos o hidrocarburos.

Otro método de administración es insuflación, particularmente si la infección se ha extendido a los oídos y a otras cavidades corporales.

Si la aplicación va a ser tópica, el compuesto cíclico puede formularse en cremas y pomadas convencionales tales como vaselina blanca, lanolina anhidra, alcohol cetílico, crema fría, monoestearato de glicerilo, agua de rosas y similares.

15 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 demuestra que D3 induce la diferenciación parcial de cultivos de DRG embrionarios; cuando se aplica solo; y muestra una potenciación sinérgica del efecto de concentraciones subóptimas de NGF.

20 La Fig. 2 demuestra que D3 potencia los homodímeros TrkA·TrkA de la superficie celular;

la Fig. 3 ilustra NGF con regiones de giro destacadas que se consideran críticas para la unión al receptor TrkA (en el dímero están presentes dos átomos de cinc, pero se omiten para proporcionar claridad); y

25 la Fig. 4 ilustra la estructura del heterodímero NG-3/BDNF con las regiones de giro correspondientes de NT-3 destacadas.

Descripción detallada de los dibujos

30 En la Fig. 1 se trataron cultivos de DRG neuronales primarios como se indica durante 8 días y se estudió la diferenciación celular morfológicamente. 60 aumentos. Gráficos representativos de 3 experimentos independientes.

En la Fig. 2, se expusieron células 4-3.6 a ligandos de TrkA según la Tabla 5 (calles 1-4) o sin ligando (calles 5 y 6), y formaron entrecruzamientos químicos (calles 1-5) o no formaron entrecruzamientos (calle 6). Los lisados celulares se sometieron a transferencia de western con antisuero anti-TrkA 203. La intensidad de la banda M_r 300 kDa se analizó densitométricamente a partir de 4 experimentos estandarizados a NGF 1 nM.

El compuesto D3 es un agonista pequeño, selectivo y proteolíticamente estable del receptor TrkA. Además, se ha evaluado el sitio de acoplamiento de D3 sobre TrkA y demuestra que un pequeño ligando peptidomimético puede agonizar un receptor de tipo tirosina quinasa de neurotrofina que normalmente se une a un ligando proteico relativamente grande. Los compuestos de la invención de esta manera ofrecen una estrategia terapéutica alternativa con agentes farmacológicos que se dirigen selectivamente a poblaciones neuronales que expresan receptores de neurotrofinas específicos en la superficie celular.

45 Ejemplos

Materiales y Métodos

Preparación de D3 y D3-biotina

50 El compuesto D3 se preparó de acuerdo con métodos indicados previamente para compuestos relacionados (Feng *et al.*, 1998). Se acoplaron FMOC-Gly, FMOC-Hse(Trt), FMOC-Lys(BOC), FMOC-GJu(OtBu), y después cloruro de 2-fluoro-5-nitrobenzoílo (activación con di-iso-propilcarbodiimida, piperidina al 20% en DMF para retirar los grupos FMOC) a resina TentaGel S PHB a 0,18 mmol/g de carga. El péptido en el soporte se trató seis veces con TFA al 1%/HSiiPr₃ al 4% en CH₂Cl₂ durante 5 min para retirar sólo la protección de Trt. Se realizó una ciclación por tratamiento con 5,0 equivalentes de K₂CO₃ en DMF durante 40 h. Después de la escisión con 90% de TFA/5% de H₂O/5% de HSiiPr₃, el producto final se purificó por HPLC de fase inversa. D3 y sus derivados fueron solubles en agua a 5 mg/ml (la máxima concentración ensayada).

60 Se preparó D3-biotina de la misma manera que D3, con la excepción de que después de la ciclación, el grupo nitro se redujo por tratamiento con 10 equivalentes de SnCl₂·2H₂O en DMF durante 20 h. Después de la reducción, se acopló FMOC-Gly, y después biotina-N-hidroxisuccinimida a la arilamina recién formada. El producto después se escindió de la resina. El producto final se purificó por HPLC de fase inversa.

65 *Líneas celulares:* los neuroblastomas de rata B104 expresan receptores p75 pero no expresan ninguna de las Trk (TrkA- p75+). Las células 4-3.6 son células B104 transfectadas de forma estable con ADNc de TrkA humano, y expresan niveles iguales de p75 y TrkA (TrkA+ p75+). Para seleccionar agentes que activen o antagonicen los receptores TrkC, se transfectaron de forma estable fibroblastos NIH3T3 con ADNc de TrkC humano. Estas células

ES 2 273 849 T3

responden al ligando NT-3. Para la selección de los agentes que activan o antagonizan los receptores TrkA, se transfectoron de forma estable fibroblastos NIH3T3 con ADNc de TrkA humano. Estas células responden al ligando NGF. Como controles se usaron fibroblastos NIH3T3 de tipo silvestre porque no responden a ningún ligando de neurotrofina.

5

Generación de quimeras de TrkA humana-TrkB de rata en células HEK293

Se generó el dominio IgG-C2 de TrkA humana usando sitios de restricción únicos en los cebadores para permitir el intercambio con el correspondiente dominio de TrkB de rata. Los receptores quiméricos se construyeron por subclonación del dominio IgG-C2 de TrkA humana en los sitios de restricción correspondientes del ADNc de TrkB de rata indicados en un trabajo previo (Perez *et al.*, 1995). Las construcciones quiméricas se confirmaron por secuenciación y se clonaron en el vector de expresión pCDNA3 que contiene un gen de selección que proporciona resistencia a neomicina (G41S, GIBCO). Se transfectoron células HEK293 usando el método de lipofectamina plus (GIBCO), se seleccionaron con neomicina (0,5 mg/ml) y se obtuvieron al menos 3 subclones independientes por técnicas de dilución limitante (quimera 293-TrkB/A-IgC2). El análisis de transferencia de Western con el anticuerpo policlonal 203 dirigido al dominio intracelular de Trk y el análisis FACScan de la superficie celular con anticuerpo policlonal dirigido al dominio extracelular de TrkA indicaron que todos los subclones estables expresan niveles comparables de receptores quiméricos.

10

15

20

Cultivos de ganglios de la raíz dorsal neuronales disociados

Se establecieron cultivos primarios de DRG de rata fetal a partir de embriones de 17 días de ratas Sprague Dawley. Todos los ganglios se diseccionaron y disociaron primero enzimáticamente con tripsina y después mecánicamente. Las células disociadas se pusieron (10^5 células/pocillo) en placas de 96 pocillos pre-recubiertas con colágeno y se cultivaron durante un total de 8 días en Medio Basal Neuro que contenía suplemento de N2 (GIBCO, Toronto), antibióticos y L-glutamina. Estos cultivos de DRG expresan TrkA en ~85% y son muy dependientes de las señales de TrkA para la supervivencia.

25

Cultivos Neuronales Septales

30

Se establecieron cultivos celulares a partir del área septal de embriones de rata de 17 días. En resumen, el tejido se incubó en PBS que contenía tripsina y DNasa. Después, se disociaron mecánicamente piezas de tejido. Después de la centrifugación, el sedimento se suspendió en medio L-15 de Leibovitz. Las células se cultivaron en placas NUNC de 96 multipocillos (10^5 células/pocillo) recubiertas con poli-D-lisina (5 μ g/ml). Se trataron cultivos puros de neuronas septales un día después de su puesta en las placas. Los fármacos, preparados en medio, se añadieron directamente a las células sin cambiar el medio inicial. La incubación se continuó durante 8 días, después de lo cual se evaluó la actividad de ChAT.

35

Ensayo de unión de D3-TrkA

40

Estudios de unión directa: se realizaron como se ha descrito (Saragovi *et al.*, 1998) usando 6 ng/pocillo de proteína del dominio extracelular de TrkA de baculovirus recombinante (TrkA-ECD) o albúmina de suero bovino de control (BSA, Fracción V, Boehringer Mannheim) inmovilizada en placas de microensayo de 96 pocillos. Los pocillos se bloquearon con tampón de unión (BB: PBS con BSA al 1%) durante 1 hora. Después, se añadieron 50 ng/pocillo de D3 biotinilado como reactivo primario en BB durante 40 minutos en ausencia o en presencia de un exceso de D3 no biotinilado como competidor. Los pocillos se lavaron 5 veces con BB y se añadió avidina acoplada a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma) como reactivo secundario durante 30 minutos. Las placas se lavaron en BB y la actividad peroxidasa se determinó colorimétricamente usando 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolinasulfónico) (ABTS, Sigma). La densidad óptica (DO) se midió a 414 nm en un Lector de Microplacas (Bio-Rad). Los ensayos se repitieron al menos tres veces, n = 4.

50

Ensayos de unión FACScan: se inmunotñeron células 4-3.6 (2×10^5) en tampón de unión FACScan (PBS, BSA al 0,5% y NaN3 al 0,1%) como se ha descrito (Saragovi *et al.*, 1998). Se añadieron a las células durante 1 hora a 4°C mAb anti-TrkA 5C3 saturante o mAb anti-p75 MC192 o IgG de control que no mostraba unión, en presencia o ausencia de D3 como competidor. Se retiró el exceso de anticuerpo primario por lavado y las células se inmunotñeron con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón marcado con fluoresceína. Las células se adquirieron en un FACScan y se analizó la fluorescencia de canal medio de los histogramas con forma de campana usando el programa LYSIS II.

55

Competición de Unión: los estudios fueron como se ha descrito para los ensayos de unión directa a TrkA-ECD, con la excepción de que como reactivo primario se añadieron 50 ng del mAb anti-TrkA 5C3/pocillo en BB, en presencia o ausencia de D3 o controles como competidores como se ha descrito (Saragovi *et al.*, 1998). Los pocillos se lavaron 5 veces con BB y se añadió anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado con HRP como reactivo secundario durante 30 min. Las placas se lavaron en BB y se determinó la actividad peroxidasa. Los ensayos se repitieron al menos tres veces, n = 4.

60

65

Ensayos de supervivencia de células

Cultivos de DRG primarios: Después de un total de 8 días de cultivo con los ligandos de ensayo o de control indicados, se estudió la supervivencia celular usando el ensayo colorimétrico de bromuro de 3(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y por observación microscópica.

Líneas celulares: se sembraron 5.000 células/pocillo en medio sin proteína (PFHM-II, GIBCO, Toronto) que contenía albúmina de suero bovino al 0,2% (BSA) (Fracción cristalina V, Sigma, St. Louis, MO) en placas de 96 pocillos (Falcon, Mississauga, Ontario). Los cultivos se dejaron sin tratar o se trataron con los ligandos de ensayo o de control indicados. La viabilidad celular se cuantificó usando el ensayo MTT después de 56-72 horas de cultivo. El porcentaje de protección se estandarizó a partir de las lecturas de densidad óptica (DO) con respecto a la concentración óptima de NGF (1 nM) = 100%. Se restó la DO de las células sin tratar. La mayor densidad óptica de los cultivos primarios no tratados probablemente se debe a la heterogeneidad celular y a la producción endógena de cantidades limitantes de factores de crecimiento.

Medición de la actividad ChAT

En el día 8 de cultivo, el medio se aspiró y se añadió tampón de lisis enfriado con hielo (fosfato sódico 10 mM, pH 7,4/TritonX-100 al 0,1% - Marca comercial). Los ensayos de actividad ChAT se realizaron directamente en los pocillos usando el método de Fonnum (Fonnum, 1975).

Detección de supuestos homodímeros TrkA-TrkA

Se trataron células 4-3.6 vivas suspendidas en PBS con el ligando o los ligandos indicados durante 40 min a 4°C para permitir la unión. Las células después se lavaron en PBS, se entrecruzaron con el agente de entrecruzamiento impermeable a la membrana suberato de disuccinimidilo (DSS, Pierce; DSS 1 mM, 15 minutos a 15°C). El DSS que no había reaccionado se inactivó con acetato amónico 5 mM. Después, las células se lisaron directamente en tampón de muestra SDS (lisado de células enteras) o se lisaron en un detergente no iónico NP-40 y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Trk o anti-p75 como se ha descrito (LeSauter *et al.*, 1996). Se obtuvieron resultados similares con los dos métodos. Para el análisis de transferencia de western, se resolvieron cantidades iguales de proteína o equivalentes celulares para cada muestra en un gradiente de SDS-PAGE de 5-10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Xymotech Biosystems, Montreal, Qc) y se sometieron a transferencia con el anticuerpo policlonal anti-Trk 203 que reconoce el dominio intracelular de Trk. Las manchas de transferencia se visualizaron usando el sistema de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (New England Nuclear, Boston, MA).

*Resultados**Síntesis de bibliotecas de peptidomiméticos con giro β centradas*

Se desarrolló una síntesis en fase sólida para producir un anillo macrocíclico con los restos i+1 e i+2 de un giro β en la conformación apropiada. Se prepararon aproximadamente 60 compuestos de este tipo (Feng *et al.*, 1998) con cadenas laterales de aminoácidos incorporadas para que correspondieran a los giros β de NGF y mAb 5C3 implicados en la conexión con TrkA (LeSauter *et al.*, 1996; LeSauter *et al.*, 1995). La unión a TrkA está mediada por regiones de giro β discretas en estos ligandos. Los análogos peptídicos cíclicos con giro β de NGF y del mAb 5C3 sólo eran activos en la conformación apropiada (Beglova *et al.*, 1998).

Como control negativo se usó C59 que se consideraba inactivo. Se sintetizó una forma biotinilada de D3, D3-biotina, para realizar estudios de unión directa a TrkA. Todos los ligandos eran muy solubles en tampones fisiológicos y no requerían disolventes orgánicos.

D3 es un ligando selectivo de TrkA

Se usó análisis FACScan que se basaba en el agente fluorescente secundario avidina-FITC para detectar la unión de D3-biotina a la superficie celular (Tabla 1). Las células 4-3.6 (p75+TrkA+) tenían una fluorescencia aproximadamente 4 veces mayor para D3-biotina que para un péptido-biotina de control de fondo. Además, un exceso molar de 10 veces de D3 anulaba la unión de D3-biotina. Por el contrario, no se midió ninguna unión específica para células B140 (p75+TrkA-). Como las células 4-3.6 son células B104 transfectadas de forma estable con ADNc de *TrkA* y estas líneas celulares por lo demás son idénticas, los datos indican que D3-biotina y D3 se unen a TrkA de la superficie celular.

Se obtuvieron datos de unión similares para D3-biotina por ELISA usando el dominio extracelular de TrkA soluble pura (TrkA-ECD) producida en baculovirus (véase la Tabla 3). Estos datos indican además que D3 se une al dominio extracelular de TrkA y que no se requieren lípidos de membrana.

D3 se une con un sitio agonista de TrkA

Previamente, se demostró que el mAb 5C3 actuaba como agonista completo de TrkA. El mAb 5C3 se une con una K_d 2 nM (LeSauter *et al.*, 1996) en un epítipo dentro del dominio IgC2 de TrkA cerca del sitio de unión de NGF.

ES 2 273 849 T3

Se postula que este sitio define un “punto caliente” del receptor. Se ensayaron D3 y el mAb 5C3 para determinar si se unían a sitios receptores solapantes.

5 Dos ensayos relacionados ensayaron la capacidad de D3 de competir por la unión del agonista completo de TrkA mAb 5C3. En el primer ensayo, un ensayo basado en FACScan que usaba células intactas, D3 indujo una reducción competitiva dependiente de la dosis de las interacciones mAb 5C3·TrkA (Tabla 2, filas 2-5). En general, D3 presentó una CI_{50} de $4 \mu M$. A partir de las condiciones experimentales se estima una $K_d \sim 2 \mu M$ para las interacciones D3·TrkA. El bloqueo de las interacciones 5C3·TrkA por D3 es selectivo porque la unión del mAb MC192 dirigida a la subunidad del receptor de NGF p75 no se bloqueaba (Tabla 2, filas 7 frente a 8). Además, el peptidomimético C59 de control inactivo no inhibía la unión del mAb 5C3 (Tabla 2, fila 6) o mAb MC192.

15 El segundo ensayo usó el dominio extracelular de TrkA recombinante purificada (TrkA-ECD) inmovilizada en placas ELISA para ensayar el bloqueo competitivo de 5C3·TrkA-ECD por D3. D3 presentó una inhibición dependiente de la dosis de interacciones 5C3·TrkA-ECD, pero el peptidomimético C59 inactivo de control no tuvo ningún efecto (Tabla 3). Como se midió una $K_d \sim 2 nM$ para las interacciones 5C3·TrkA, a partir de la CI_{50} experimental se calculó una $K_d \sim 2 \mu M$ para las interacciones D3·TrkA-ECD. Este cálculo es coherente con los datos mostrados en la Tabla 2. De manera interesante, los ensayos ELISA y los ensayos de unión RIA similares revelaron que D3 no bloqueaba sustancialmente las interacciones NGF·TrkA-ECD.

20 *D3 produce actividad trófica selectivamente a través de TrkA y es proteolíticamente estable*

Como D3 se une en o cerca de un sitio agonista de TrkA, se probaron los efectos tróficos en ensayos de supervivencia celular usando el método MTT cuantitativo. Se ensayaron varias dosis de D3. Sin embargo, por claridad sólo se muestran las concentraciones próximas a la óptima, que se aproximan a la K_d estimada.

25 Los cultivos neuronales primarios disociados de ganglios de la raíz dorsal (DRG) fetal dependen de agonistas de TrkA para la supervivencia. El NGF exógeno mostró un efecto trófico dependiente de la dosis (Tabla 4, filas 2-4). D3 solo tuvo un efecto protector significativo sobre cultivos de DRG (Tabla 5, fila 5), pero el C59 de control no tuvo este efecto (Tabla 4, fila 6). Los cultivos primarios son heterogéneos y endógenamente se obtienen bajos niveles de neurotrofinas, lo cual explica una densidad óptica relativamente elevada para los cultivos no tratados (Tabla 4, fila 1).

30 Como D3 no bloquea la unión de NGF, se evaluó la posible sinergia entre NGF y D3. D3 combinado con diferentes concentraciones de NGF exógeno demostró un efecto aditivo o potenciador sobre la supervivencia de DRG (Tabla 4, filas 7-9).

35 Se obtuvieron resultados similares con otras líneas de células neuronales, donde D3 potenciaba el efecto de las bajas concentraciones de NGF (Tabla 5). La protección óptima de las células 4-3.6 (p75+TrkA+) y las quimeras HEK293-TrkB/A-IgC2 correspondía al tratamiento con NGF 1 nM (Tabla 5, fila 2) mientras que NGF 10 pM proporcionó una protección significativamente menor (Tabla 5, fila 3). D3 solo produjo una protección baja pero significativa (Tabla 5, fila 4), y la protección aumentó con una combinación de NGF 10 pM + D3 10 μM (Tabla 5, fila 6). El compuesto C59 de control negativo no tuvo ningún efecto solo o en la potenciación de NGF 10 pM (Tabla 5, filas 5 y 7).

45 En otros controles, ni D3 ni NGF protegieron a las células B104, a las células HEK293 de tipo silvestre o a las células HEK293 que expresaban TrkB de la apoptosis. Por lo tanto, la actividad trófica de NGF y D3 requiere la expresión de TrkA o al menos el dominio IgG-C2 de TrkA. Además, D3 no aumentaba el efecto trófico de EGF, lo que sugería que podía ser selectivo con respecto a NGF. Por último, D3 aumentaba la protección por NGF de células NIH3T3 transfectadas de forma estable con ADNc de TrkA, pero no aumentaba la protección por NT-3 de células NIH3T3 transfectadas de forma estable con ADNc de TrkC. Estos datos indican que D3 acentúa selectivamente el efecto trófico de NGF y que no se requiere la expresión del receptor de NGF de baja afinidad p75.

50 Se evaluó la estabilidad proteolítica de D3 frente a tripsina y papaína. En primer lugar, D3 se expuso a tratamiento enzimático como se ha descrito previamente (Saragovi *et al.*, 1992), seguido de la medición de su actividad biológica en células 4-3.6. El compuesto D3 permaneció totalmente activo en ensayos tróficos incluso después de 1 hora de exposición a tripsina o pepsina, mientras que NGF perdió toda su actividad en minutos en las mismas condiciones.

55 *D3 induce la diferenciación de cultivos primarios de DRG fetales y neuronas septales fetales*

60 El efecto de D3 sobre la diferenciación celular mediada por TrkA se evaluó usando dos ensayos independientes: el análisis morfométrico de neuronas disociadas de DRG y la inducción de la actividad ChAT den cultivos de neuronas septales. En el primero de estos ensayos, los datos indican que los cultivos neuronales de DRG experimentan crecimiento de neuritas en respuesta a D3, y que D3 potencia el efecto de NGF (Figura 1). En el segundo ensayo, se descubrió que la actividad ChAT aumentaba en respuesta a NGF (Tabla 6, filas 1 y 2) y a D3 solo (Tabla 6, filas 3-5), mientras que el control de C59 no tenía ningún efecto (Tabla 6, fila 6). Los aumentos en la actividad ChAT en respuesta a D3 2 μM solo fueron comparables a NGF 10 pM exógeno. Además, las combinaciones de D3 2 μM + NGF 10 pM aumentaron notablemente la actividad ChAT, y fueron más eficaces que NGF 400 pM (Tabla 6, filas 8-10).

D3 mejora o estabiliza los supuestos homodímeros de TrkA·TrkA

Basándose en los datos anteriores, era de esperar que D3 indujera o estabilizara las interacciones TrkA·TrkA. Esta hipótesis se estudió bioquímicamente en células 4-3.6 expuestas a ligandos, seguido de entrecruzamiento químico en la superficie celular (Figura 2).

Se observó el doblete esperado coherente con los monómeros de TrkA indicados previamente de p110 y p140 en todas las muestras (Figura 2, flecha gruesa). Se vieron bandas de ~300 kDa, coherentes con el peso molecular de homodímeros de TrkA·TrkA (Figura 2, flecha fina) en muestras de células tratadas con ligandos de TrkA NGF 1 nM, NGF 10 pM o NGF 10 pM + D3 10 μ M, y también se detectaron (aunque mucho más débilmente) en células tratadas con D3 10 μ M solo. La intensidad de la banda de M_r 300 kDa, que se suponía que eran dímeros de TrkA, se analizó densitométricamente a partir de 4 experimentos independientes estandarizados a NGF 1 nM (100%). Hubo un aumento coherente en los dímeros después del tratamiento con D3 solo ($21 \pm 4\%$) o NGF 10 pM solo ($52 \pm 6\%$), que fue mayor después del tratamiento con NGF 10 pM + D3 10 μ M ($77 \pm 7\%$). Las células de control formaron entrecruzamientos en ausencia de ligando o las células expuestas a ligando pero sin entrecruzamiento no tenían supuestos dímeros.

Los homodímeros de TrkA son estables a la desnaturalización con SDS debido al entrecruzamiento covalente. Dado que la eficacia del entrecruzamiento químico es ~1-4% de las reservas totales de TrkA, se excluyó la caracterización bioquímica adicional de los complejos aparte del hecho de que contienen TrkA. Los complejos pueden contener NGF entrecruzado. Sin embargo, es poco probable que las bandas comprendan p75 porque las inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-p75 no revelaron ningún material en el M_r de homodímeros de TrkA. Además, no se vio sistemáticamente material de M_r 215 kDa que comprendiera heterodímeros de p75-TrkA.

Actividad biológica de ejemplos de realizaciones preferidas

Son ejemplos de algunas realizaciones preferidas que mimetizan la actividad neurotrófica de tipo NGF (Tabla 7) los agentes denominados D3, D53b-d, D21, P23 y P58. Estos agentes, ensayados a 10 μ M, producen supervivencia significativa en células que expresan TrkA, pero no en células que no expresan receptores de neurotrofina. Además, estos agentes muestran un efecto sinérgico con concentraciones subóptimas de NGF (10 pM). NGF a 10 pM produce una supervivencia de $32 \pm 6\%$ en comparación con NGF 1 nM que, en las células TrkA se estandariza a una supervivencia de 100%. NGF a 10 pM más las realizaciones indicadas aumenta significativamente la supervivencia celular.

Son ejemplos de algunas realizaciones preferidas que mimetizan la actividad neurotrófica de tipo NT-3 (Tabla 8) los agentes denominados P27 y P23. Estos agentes, ensayados a 10 μ M, producen una supervivencia significativa de células que expresan TrkC, pero no de células que no expresan receptores de neurotrofinas. Además, estos agentes muestran un efecto sinérgico con concentraciones subóptimas de NT-3 (10 pM). NT-3 a 10 pM produce una supervivencia de $29 \pm 1\%$ en comparación con NT-3 1 nM que, en las células TrkC se estandariza a una supervivencia de 100%. NT-3 a 10 pM más las realizaciones indicadas aumenta significativamente la supervivencia celular. Debe tenerse en cuenta que P23 aumenta la supervivencia de células que expresan TrkA y TrkC, por lo tanto se comporta como NT-3 que es un ligando de los dos receptores.

Son ejemplos de algunas realizaciones preferidas que antagonizan la actividad neurotrófica de NGF (Tabla 9) los agentes denominados P42 y P43. Aunque estas realizaciones solas no afectan a la supervivencia celular (Tabla 9, filas 4 y 5), reducen la supervivencia producida por NGF (Tabla 9, filas 6-9). NGF a 1 nM (Tabla 9, fila 2) produce una supervivencia de 100% y este efecto se reduce por P42 y P43 respectivamente a una supervivencia de 68% y 55%. Por lo tanto, estas realizaciones son antagonistas para la actividad neurotrófica de NGF.

Discusión

Una pequeña molécula peptidomimética con giro β proteolíticamente estable agonista del receptor de neurotrofina TrkA. Se demostró que D3 se une a TrkA, compite por la unión del agonista de TrkA mAb 5C3, potencia selectivamente la protección trófica de líneas celulares que expresan TrkA y cultivos primarios neuronales e induce la diferenciación de cultivos neuronales primarios. Estos resultados indican que un pequeño peptidomimético con giro β puede activar un receptor de neurotrofina de tipo tirosina quinasa que normalmente se une a un ligando proteico relativamente grande.

Se han obtenido avances recientes en el mimetismo de ligandos como resultado de la selección de grandes bibliotecas de fagos o péptidos, productos naturales o bibliotecas químicas. Sin embargo, la mayoría de los ligandos descritos son antagonistas o requieren de otra manera la dimerización de péptidos relativamente grandes, tienen un eje doble de simetría que hace que se parezcan a un dímero o son poco solubles en tampones fisiológicos. Por el contrario, D3 es un peptidomimético pequeño, no simétrico, proteolíticamente estable y muy soluble en agua que se une al dominio extracelular de TrkA.

Los estudios de unión y competición de ligandos demuestran la interacción selectiva de D3 con el dominio extracelular de TrkA, en lugar de con el dominio catalítico. Por lo tanto, la solubilidad en agua y la dirección extracelular de D3 significan que no se requieren disolventes orgánicos tóxicos para atravesar la membrana celular.

ES 2 273 849 T3

¿Cuál es el papel de las concentraciones pM de NGF?

Dadas las bajas concentraciones usadas en sinergia con D3, es poco probable que el efecto de NGF esté mediado por acoplamiento con el receptor de baja afinidad p75. Se postula que NGF actúa aumentando las interacciones TrkA·TrkA mientras que D3 estabiliza los homodímeros o reduce el porcentaje de separación de homodímeros de receptores induciendo cambios conformacionales.

En la presente invención, los datos biológicos mostrados son con bajas concentraciones μM de D3, que son óptimas. Como es de esperar por la afinidad estimada para las interacciones TrkA·D3, las concentraciones de D3 menores producen menos eficacia. Debe destacarse que aunque la afinidad de NGF·TrkA es $\sim 10^{-11}$ M, la actividad óptima requiere concentraciones de NGF 2 nM. Por lo tanto, D3 es óptimo a concentraciones que se aproximan a su K_d mientras que NGF es óptimo a concentraciones ~ 100 veces mayores que su K_d . Se interpreta que esta diferencia significa que D3 es más estable en solución, y esta noción se confirma por la resistencia de D3 a la proteólisis.

15 *Sitios de unión a ligando*

D3 bloquea competitivamente la unión del mAb 5C3 pero no bloquea a NGF. Además, la actividad agonista óptima del mAb 5C3 se inhibía por D3 de una manera dependiente de la dosis, mientras que aumentaba el efecto antagonista de NGF. Es poco probable que D3 no bloquee NGF debido a las diferencias de afinidad, porque las interacciones NGF·TrkA-ECD y 5C3·TrkA-ECD están en el intervalo nM.

Dos factores pueden ser responsables de este resultado. En primer lugar, tanto el mAb 5C3 como D3 se acoplan sobre un epítipo único y continuo dentro del dominio IgG-C2 de TrkA, mientras que NGF se une a un epítipo discontinuo dentro de los dominios IgG-C1 e IgG-C2 de TrkA (Perez *et al.*, 1995) y otros dominios. Esto facilitaría el bloqueo del mAb 5C3 por D3 mientras que NGF puede unirse a través de su segundo sitio de acoplamiento. En segundo lugar, el mAb 5C3 y NGF se unen a TrkA en sitios parcialmente solapantes pero no idénticos (LeSauteur *et al.*, 1996). Por lo tanto, los datos sugieren que D3 se une a TrkA en un epítipo solapante al “punto caliente” del agonista mAb 5C3 del dominio IgG-C2 de TrkA, cerca del sitio de acoplamiento de NGF. Estas observaciones pueden explicar la sinergia de D3 con NGF y el bloqueo del mAb 5C3. El sitio de acoplamiento se denomina “punto caliente” porque define un sitio funcional donde los ligandos que se unen al sitio pueden activar una función. Esta función puede ser agonista (parcial) o antagonista (parcial).

El hecho de que D3 sea bioactivo y se seleccionara a partir de un grupo relativamente pequeño de compuestos basados en giro β tiene amplias implicaciones para muchas iniciativas de investigación que implican interacciones proteína-proteína. Particularmente, estas nociones pueden aplicarse a todos los miembros de la familia de ligandos de neurotrofina y sus receptores porque funcionan de una manera comparable a TrkA·NGF.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un peptidomimético de molécula pequeña que se une y activa a TrkA. En la presente invención, se descubre que un híbrido de un péptido y una molécula orgánica pequeña diseñada para albergar restos aminoacídicos clave en una conformación de giro dentro de una región flanqueante pequeña ofrece un medio para transformar un péptido en una molécula orgánica pequeña activa. Por lo tanto, D3 representa la validación del concepto de peptidomimético para la familia Trk de receptores de tipo tirosina quinasa. Este ligando peptidomimético de molécula pequeña de TrkA que tiene actividad neurotrófica puede usarse para tratar trastornos neurodegenerativos, dolor, neoplasias y otras patologías (revisado en Saragovi y Burgess, 1999) en los que intervienen receptores Trk.

TABLA 1

D3 y D3-biotina se unen a TrkA

La unión de biotina-D3 a células B 104 (p75+ TrkA-) o células 4-3.6 (p75+ TrkA+) se cuantificó por análisis FACSscan. Los ligandos son control-biotina (un péptido biotinilado inactivo) (fila 2), D3-biotina (fila 3) o D3-biotina con un exceso molar de 10 veces de D3 (fila 4). Todos los ligandos se siguieron con avidina-FITC como marcador fluorescente. Los datos mostrados son fluorescencia de canal medio (MCF) de histogramas con forma de campana, 5.000 sucesos adquiridos. Se promedian los datos de MCF \pm sem de 3 experimentos independientes.

Ligando	MCF	
	B104	4-3.6
sin tratar	10 \pm 3	13 \pm 2
control-biotina 20 μM	11 \pm 1	10 \pm 3
D3-biotina 20 μM	10 \pm 4	53 \pm 4
D3-bio 20 μM + D3 200 μM	11 \pm 2	17 \pm 7

ES 2 273 849 T3

TABLA 2

D3 bloquea específicamente la unión del mAb 5C3 a TrkA de la superficie celular

Se analizaron células 4-3.6 por FACScan para comprobar la unión del mAb anti-TrkA 5C3 o el mAb anti-p75 MC192. Las células expuestas a IgG de ratón primario de control con o sin D3 40 μ M producen una tinción de fondo idéntica. Para cada condición, se adquirieron 5.000 células. El porcentaje de uniones máximas se calculó a partir de la MCF de histogramas con forma de campana, usando la fórmula $(\text{ENSAYO}_{\text{MCF}} - \text{fondo}_{\text{MCF}}) * 100 / (\text{MÁXIMO}_{\text{MCF}} - \text{fondo}_{\text{MCF}})$. Se promedian los valores de MCF \pm sem de 3 experimentos independientes.

	mAb (1 nM)	Competidor	Dosis (μ M)	% Unión máxima
1	5C3	ninguno	0	100 \pm 0
2	5C3	D3	0,20	95 \pm 4
3	5C3	D3	1	80 + 3
4	5C3	D3	5	53 \pm 5
5	5C3	D3	40	33 + 4
6	5C3	C59 de control	40	97 \pm 6
7	MC192	ninguno	0	100 \pm 0
8	MC192	D3	40	101 \pm 2

TABLA 3

D3 inhibe las interacciones 5C3-TrkA in vitro

Se midió la unión del mAb 5C3 (a 2 nM constante) a TrkA-ECD purificado inmovilizado en placas ELISA en ausencia o presencia de competidores. El fondo (<2%) fue la densidad óptica de los pocillos con todos los reactivos excepto Trk-ECD inmovilizado. Se promedian los datos de 3 experimentos, cada experimento n = 4.

	Competidor añadido	Concentración (μ M)	% Unión \pm sem
1	-	-	100 \pm 3
2	D3	0,05	100 \pm 14
3	D3	0,2	89 \pm 8
4	D3	1	64 \pm 10
5	D3	5	43 \pm 12
6	D3	20	38 \pm 7
7	D3	40	31 \pm 4
8	C59	40	96 \pm 9

ES 2 273 849 T3

TABLA 4

D3 protege a las neuronas primarias que expresan TrkA de la apoptosis, y potencia NGF

5 Se trataron cultivos neuronales primarios dependientes de NGF de DRG de embrión de rata con los ligandos indicados durante un total de 8 días. La supervivencia celular se midió por ensayos MTT. Se calculó la protección con respecto a la concentración óptima de NGF (1 nM, protección 100%) restando la D.O. de las células no tratadas. Se muestra la D.O. de un experimento, media \pm sem, n = 4. Se promedió el porcentaje de protección de 3 experimentos.

	Tratamiento	Densidad Óptica	% Protección
10	1 sin tratamiento	256 \pm 15	0 \pm 2
15	2 NGF1 nM	823 \pm 28	100 \pm 4
	3 NGF 20 pM	316 \pm 11	9 \pm 1
	4 NGF 500 pM	535 \pm 19	68 \pm 3
20	5 D3 10 μ M	405 \pm 22	38 \pm 2
	6 Control C59 10 μ M	271 \pm 8	0 \pm 11
25	7 D3 10 μ M + NGF 20 pM	471 \pm 28	48 \pm 3
	8 D3 10 μ M + NGF 500 pM	603 \pm 26	84 \pm 3
30	9 D3 10 μ M + NGF 1 nM	977 \pm 38	120 \pm 7

TABLA 5

D3 potencia a NGF para proteger líneas celulares que expresan TrkA de la apoptosis por unión al dominio IgC2 del receptor

35 Se trataron células 4-3.6 o células HEK 293 que expresaban el receptor quimérico TrkB/TrkA IgG-C2 con los ligandos indicados durante un total de 72 horas. La supervivencia se midió por ensayos MTT. El porcentaje de protección se calculó como en la Tabla 4. Se muestra la D.O. de un experimento, media \pm sem, n = 4. Se promedió el porcentaje de protección de 6 (células 4-3.6) o 3 (quimera 293-IgG-C2) experimentos independientes.

		Células 4-3.6		Quimera HEK 293- TrkB/TrkA	
	Tratamiento	Densidad Óptica	% Protección	Densidad Óptica	% Protección
45	1 sin tratamiento	64 \pm 7	0 \pm 2	32 \pm 55	0 \pm 4
50	2 NGF 1 nM	412 \pm 24	100 \pm 6	350 \pm 12	100 \pm 4
	3 NGF 10 pM	205 \pm 19	40 \pm 5	88 \pm 8	18 \pm 5
55	4 D3 10 μ M	95 \pm 9	8 \pm 2	69 \pm 7	9 \pm 3
	5 C59 10 μ M	76 \pm 4	2 \pm 1	30 \pm 7	-1 \pm 2
60	6 D3 10 μ M + NGF 10 pM	255 \pm 14	55 \pm 3	165 \pm 11	42 \pm 5
65	7 C59 10 μ M + NGF 10 pM	209 \pm 17	41 \pm 4	90 \pm 9	21 \pm 6

ES 2 273 849 T3

TABLA 6

D3 induce la síntesis de ChAT

5 Se trataron cultivos neuronales septales como se indica durante un total de 8 días. Se midió la actividad ChAT (pmol Ach/min/pocillo \pm sem) en el día 8. Media \pm sem. Se promedian los datos de 3 experimentos independientes, cada experimento n = 4.

Tratamiento	Actividad ChAT Aumento en veces	
1 NGF 10 pM	0,42 \pm 0,07	1,4
2 NGF 400 pM	0,72 \pm 0,10	2,41
3 D3 0,2 μ M	0,37 \pm 0,05	1,23
4 D3 2 μ M	0,44 \pm 0,02	1,47
5 D3 20 μ M	0,48 \pm 0,06	1,56
6 C59 de control 20 μ M	0,30 \pm 0,05	1
7 sin tratamiento	0,31 \pm 0,07	1
8 D3 0,2 μ M + NGF 10 pM	0,60 \pm 0,04	2,00
9 D3 2 μ M + NGF 10 pM	0,76 \pm 0,03	2,53
10 D3 20 μ M + NGF 10 pM	0,79 \pm 0,04	2,63

TABLA 7

Actividad agonista de TrkA de ejemplos de realizaciones preferidas

40 Se trataron fibroblastos NIH3T3 transfectados y que expresaban receptores TrkA o TrkC, o controles de tipo silvestre no transfectados (NIH wt) con los ligandos indicados durante un total de 72 horas. Las células que expresan TrkA responden óptimamente a NGF. Las células que expresan TrkC responden óptimamente a NT-3. Se realizaron ensayos con agentes solos o en presencia de concentraciones subóptimas de NGF (10 pM). La supervivencia se midió por ensayos MTT. El porcentaje de protección se calculó como en la Tabla 4. Se muestra la D.O. de un experimento, media \pm sem, n = 4. Cada experimento se repitió 3 veces o más.

		NIH-TrkA	NIH-TrkC	NIH wt
	Tratamiento	% Protección	% Protección	% Protección
50	1 sin tratamiento	0 \pm 4	0 \pm 2	0 \pm 5
	2 NGF 1 nM	100 \pm 2	5 \pm 6	5 \pm 12
	3 NGF 10 pM	32 \pm 6	2 \pm 4	5 \pm 7
55	6 D3 10 μ M	8 \pm 4	3 \pm 3	-3 \pm 5
	7 D3 10 μ M + NGF 10 pM	51 \pm 5	6 \pm 2	0 \pm 3
60	10 D53b-d 10 μ M	11 \pm 4	4 \pm 2	3 \pm 5
	11 D53b-d 10 μ M + NGF 10 pM	45 \pm 4	3 \pm 1	-4 \pm 6
	12 D21 10 μ M	16 \pm 3	6 \pm 4	3 \pm 2
65	13 D21 10 μ M + NGF 10 pM	60 \pm 5	5 \pm 1	3 \pm 3

ES 2 273 849 T3

14	P23 10 μ M	15 \pm 2	8 \pm 2	0 \pm 3
15	P23 10 μ M + NGF 10 pM	52 \pm 3	11 \pm 5	1 \pm 3
16	P58 10 μ M	21 \pm 7	6 \pm 5	-1 \pm 3
17	P58 10 μ M + NGF 10 pM	43 \pm 6	5 \pm 3	4 \pm 2

TABLA 8

Actividad agonista de TrkC de ejemplos de realizaciones preferidas

Se trataron fibroblastos NIH3T3 transfectados y que expresaban receptores TrkA o TrkC, o controles de tipo silvestre no transfectados (NIH wt), con los ligandos indicados durante un total de 72 horas. Las células que expresan TrkA responden óptimamente a NGF y en un menor grado a NT-3. Las células que expresan TrkC responden óptimamente a NT-3. Los ensayos se realizaron con agentes solos o en presencia de concentraciones subóptimas de NT-3 (10 pM). La supervivencia se midió por ensayos MTT. El porcentaje de protección se calculó como en la Tabla 4. Se muestra la D.O. de un experimento, media \pm sem, n = 4. Cada experimento se repitió 3 veces o más.

	NIH-TrkA	NIH-TrkC	NIH wt
Tratamiento	% Protección	% Protección	% Protección
1 sin tratamiento	0 \pm 4	0 \pm 2	0 \pm 5
2 NT-3 1 nM	17 \pm 3	100 \pm 2	-2 \pm 5
3 NT-3 10 pM	3 \pm 2	29 \pm 1	1 \pm 4
4 P27 10 μ M	5 \pm 2	13 \pm 3	-2 \pm 4
5 P27 10 μ M + NT-3 10 pM	4 \pm 1	62 \pm 6	5 \pm 4
6 P23 10 μ M	15 \pm 2	8 \pm 2	0 \pm 3
7 P23 10 μ M + NT-3 10 pM	21 \pm 3	51 \pm 7	1 \pm 3

TABLA 9

Actividad antagonista de TrkA de ejemplos de realizaciones preferidas

Se trataron fibroblastos NIH3T3 transfectados y que expresaban TrkA con los ligandos indicados durante un total de 72 horas. Las células que expresan TrkA responden óptimamente a NGF 1 nM y subóptimamente a NGF 10 nM. La supervivencia se midió por ensayos MTT. El porcentaje de protección se calculó como en la Tabla 4. Se muestra la D.O. de un experimento, media \pm sem, n = 4. Cada experimento se repitió 3 veces o más. Nd: no realizado.

	NIH- TrkA	NIH wt
Tratamiento	% Protección	% Protección
1 sin tratamiento	0 \pm 5	0 \pm 4
2 NGF 1 nM	100 \pm 4	4 \pm 6
3 NGF 10 pM	28 \pm 5	3 \pm 5
4 P42 10 μ M	5 \pm 2	0 \pm 3
5 P43 10 μ M	4 \pm 3	2 \pm 4
6 NGF 1 nM + P42 10 μ M	68 \pm 5	nd
7 NGF 10 pM + P42 10 μ M	9 \pm 4	nd
8 NGF 1 nM + P43 10 μ M	55 \pm 7	nd
9 NGF 10 pM + P43 10 μ M	12 \pm 3	nd

Consideraciones Adicionales

La naturaleza molecular de las interacciones NT-3/TrkC es importante por las siguientes razones. Muchas interacciones proteína-proteína se producen por medio del contacto en algunas regiones clave, “puntos calientes”, en lugar de interacciones generalizadas a lo largo de la superficie de la proteína entera. Éstas generalmente implican 10-30 cadenas laterales de contacto en porciones discontinuas de cada secuencia primaria. Sin embargo, se requiere una fracción relativamente pequeña de estas cadenas laterales para una unión fuerte en la superficie de contacto. Las pequeñas moléculas que interaccionan con los puntos calientes pueden interferir con las interacciones normales proteína-proteína haciendo viable el concepto de mimetismo de hormonas.

Ciertos resultados previos proporcionan pruebas de que las regiones de giro de la neurotrofina NGF son puntos calientes para la interacción NGF/TrkA (LeSauter *et al*, 1995). NGF es una proteína de 22 kDa que existe y funciona como un dímero. Está muy conservada entre especies. El NT-3 maduro comparte 50 aminoácidos idénticos con NGF, principalmente centrados en regiones que promueven la estructura terciaria común (por ejemplo, los seis restos de Cys del nudo de cisteína están conservados). La región de la superficie de contacto del dímero está compuesta de cadenas β que mantienen la conformación y disposición de motivos estructurales; estos restos nucleares hidrófobos están muy conservados entre todas las neurotrofinas. Por el contrario, las regiones de giro son muy variables y parecen determinar la especificidad de unión al receptor.

Las fuertes similitudes estructurales entre NGF y NT-3 (en el heterodímero BDNF) indican que las regiones de giro de NT-3 destacadas en la Fig. 4 son importantes en el acoplamiento de NT-3 con TrkC. Además, miméticos de las regiones de giro de NT-3 también pueden unirse a TrkA y p75 (como lo hace NT-3).

A continuación se proporcionan los datos de estudios de proteínas quiméricas. Una quimera de NT-3 que expresa los restos 1-66 y 115-122 de NGF (numeración de acuerdo con NGF) gana la función de tipo NGF, con una retención completa de la actividad de NT-3. Estos descubrimientos implican que las secuencias que confieren propiedades de tipo NT-3 están contenidas dentro de la región que corresponde a los restos 67-114 de NGF. Otra quimera de NT-3 estudiada contenía las secuencias de NGF en el extremo N y en la región 3 del bucle β (aproximadamente restos 91-98). Este recombinante tenía una función NGF mejorada y una actividad de NT-3 disminuida con respecto al NT-3 de tipo silvestre. Estos datos implican que se puede atribuir una contribución importante a la unión y actividad de NT-3 al bucle β 3. Esto es coherente con los estudios de la primera quimera porque el bucle β 3 está dentro de la región que corresponde a los restos 67-114 que se descubrió que contenían regiones clave para la unión. Otro estudio de proteínas quiméricas NT-3/NGF descubrió que el bucle β 3 era una región crítica para determinar especificidad, y que los restos proximales Arg y Tyr pueden mejorar la unión.

Ciertos experimentos de mutagénesis revelan restos dispersos de NT-3 que contribuyen a la unión. De esta manera, se observa alguna pérdida de afinidad y pérdida de actividad de NT-3/TrkC tras la sustitución de seis restos de NT-3 por los restos correspondientes en NGF (S73D, F86Y, K88R, F101W, A107S y V111A). Estos aminoácidos son discontinuos en la secuencia primaria, pero están próximos al bucle β 3 en la neurotrofina dimérica plegada. Próximo al bucle β 3 de NT-3 hay una arginina que está conservada entre NGF y NT-3, pero parece jugar un papel diferente en cada neurotrofina. Se observó una pérdida significativa de bioactividad de NT-3 en un mutante NT-3 R103A; sin embargo, no se observó ninguna pérdida de actividad de NGF en un mutante NGF R103A. Esto indica diferencias en la forma en la que estas neurotrofinas se unen a sus receptores. Además, adyacente a R103 hay una fenilalanina (F104) en NGF y un triptófano (W104) en NT-3. Estos restos hidrófobos están expuestos al disolvente y su sustitución también reduce la bioactividad, lo que sugiere un papel en la unión o en la estabilización de una conformación activa.

Parece ser que el extremo N de las neurotrofinas puede jugar un papel importante en la unión a sus receptores. Esta región es una diana más difícil de mimetizar porque el extremo N de NT-3 (y de NGF) está “desestructurado” en solución y en estado sólido. La creación de modelos indica que el extremo N se compone de dos subdominios que comprenden los restos 1-8 y los restos 9-11. Los restos 1-8 son flexibles, pero los restos 9-11 son rígidos y mantienen una interacción electrostática entre E(11) y E(118). Por consiguiente, un plegamiento largo localiza los restos 1-8 cerca del bucle 2/bucle 3.

Las interacciones NGF/p75 y NT-3/p75 están mediadas al menos parcialmente por el bucle β 1 de la neurotrofina que se caracteriza por aminoácidos cargados positivamente. También pueden implicar aminoácidos R114 y K115. En general, estos restos son discontinuos con la secuencia primaria del bucle 1, pero en la estructura tridimensional quedan próximos al mismo.

Basándose en los datos anteriores, es apropiado incorporar específicamente uno o más de los restos encontrados en las neurotrofinas en posiciones 1-11; 29-34; 42-48; y 91-98. Éstas serán las dianas primarias para el descubrimiento principal.

La Tabla 10 proporciona alineaciones de secuencia.

TABLA 10

5 Alineación de secuencias de aminoácidos de neurotrofinas maduras en regiones que se prevé que estén implicadas en la unión y especificidad del receptor

		region/dominio																			
		extremo N					bucle β 1														
NGF	ratón	S	S	T	H	P	V	F	H	T	A	T	D	I	K	G	K	E	V	T	
	rata	S	S	T	H	P	V	F	H	T	A	T	D	I	K	G	K	E	V	T	
	humano	S	S	S		H	P	I	F	H	T	A	T	D	I	K	G	K	E	V	M
NT-3	rata	Y	A	E	H	K	S	H	S	A	I	D	I	R	G	H	Q	V	T		
	humano	Y	A	E	H	K	S	H	S	A	I	D	I	R	G	H	Q	V	T		
BDNF	humano	H	S	D	P	A	R	R	G	E	T	A	V	D	M	S	G	G	T	H	S

		region/dominio																							
		bucle β 2					bucle β 3																		
		E	V	N	I	N	N	S	V	F	R	Q	L	T	T	D	E	K	Q	A	A	W	R	F	
		E	V	N	I	N	N	S	V	F	K	Q	L	T	T	D	D	K	Q	A	A	W	R	F	
		E	V	N	I	N	N	S	V	F	K	Q	L	T	M	D	G	K	Q	A	A	W	R	F	
		E	I	K	T	G	N	S	P	V	K	Q	L	T	S	E	N	N	K	L	V	G	W	R	W
		E	I	K	T	G	N	S	P	V	K	Q	L	T	S	E	N	N	K	L	V	G	W	R	W
		E	K	V	P	V	S	K	G	Q	R	A	L	T	M	D	S	K	K	R	I	G	W	R	F

30 **Abreviaturas**

- | | |
|---|--|
| BDNF, Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro | Fmoc, fluoreniloxycarbonilo |
| 35 BOC, terc-butoxicarbonilo | MCF, fluorescencia de canal medio |
| ChAT, Acetil Colina Transferasa | MTT, Bromuro de 3(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio |
| 40 DMF, dimetilformamida | NGF, factor de crecimiento nervioso |
| DRG: ganglios de la raíz dorsal | NT-3, neurotrofina-3 |
| ELISA: ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima | RIA: radioinmunoensayo |
| 45 FACScan, Explorador de Células Activadas por Fluorescencia | TFA, ácido trifluoroacético |
| FITC, isotiocianato de fluoresceína | Trt, tritilo. |

50 **Bibliografía**

55 **Beglova, N, LeSauter, L, Saragovi, H, and Gehring, KB (1998)** Solution structure and internal motion of a bioactive peptide derived from Nerve Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **273**:23652-23658.

Feng, Y, Wang, Z, Jin, S, and Burgess, K (1998) SNAr Cyclizations To Form Cyclic Peptidomimetics of beta-Turns. *J. Am. Chem. Soc.* **120**:10768-9.

60 **LeSauter, L, Maliartchouk, S, Jeune, HL, Quirton, R, and Saragovi, HU (1996)** Potent Human p140-TrkA Agonists Derived from an Anti-receptor Antibody. *J. Neurosci.* **16**:1308-16.

LeSauter, L, Wei, L, Gibbs, B, and Saragovi, HU (1995) Small Peptide Mimics of Nerve Growth Factor Bind TrkA Receptors and Affect Biological Responses. *J. Biol. Chem.* **270**:6564-9.

65 **Perez, P, Coll, PM, Hempstead, BL, Martin-Zanca, D, and Chao, MV (1995)** NGF Binding to the Trk Tyrosine Kinase Receptor Requires the Extracellular immunoglobulin-like Domains. *Mol. Cell. Neurosci.* **6**:97-105.

ES 2 273 849 T3

Saragovi, HU, and Burgess, K (1999) Small molecule and protein-based neurotrophic ligands: agonists and antagonists as therapeutic agents. *Expert Opinion in Therapeutic Patents* **9**:737-751.

5 **Saragovi, HU, Zheng, WH, Maliartchouk, S, DiGugliemo, GM, Mawal, YR, Kamen, A, Woo, SB, Cuello, AC, Debeir, T, and Neet, KE (1998)** A TrkA selective, fast internalizing Nerve Growth Factor-antibody complex induces trophic but not neuritogenic signals. *J. Biol. Chem.* **274**:34933-34940.

10 **Yangbo Feng, Burgess, K. (1999)** Solid phase S_NAr Macrocyclizations To Give Turn-Extended-Turn Peptidomimetics. *Chem. Eur. J.*, 5(11), 3261- 3272.

10 **Zhicheng Wang et al. (1999)** Conformations of Peptidomimetics Formed by S_NAr Macrocyclizations: 13- to 16-Membered Ring Systems. *Chem. Eur. J.*, 5(11), 3273-3278.

15 **Yangbo Feng et al. (1999)** Stereochemical Implications on Diversity in β -Turn Peptidomimetic Libraries. *J. Org. Chem.* 64(25), 9175-9177.

20

25

30

35

40

45

50

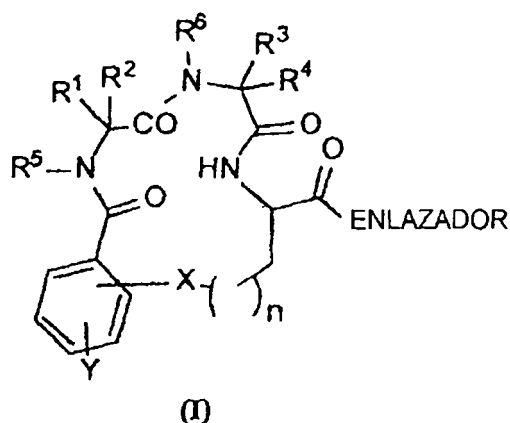
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica agonista o antagonista de receptores de neurotrofinas que comprende una cantidad agonista de receptores de neurotrofinas aceptable de un compuesto cíclico peptidomimético con giro β que mimetiza a una neurotrofina y que tiene la fórmula (I):



o un dímero del mismo,

donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan entre sustituyentes de cadena lateral hidrógeno, alquilo o arilo que se encuentran en un aminoácido natural o no natural; o

R^1 y R^2 o R^3 y R^4 junto con el átomo de carbono al que están unidos pueden formar un grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo,

Y es hidrógeno o uno o dos sustituyentes seleccionados entre nitro, amino, halo, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo o naftilo, estando dicho grupo alquilo, fenilo o naftilo sin sustituir o sustituido con nitro o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, o Y es un grupo modificado que contiene biotina,

X es O, N, S, P, Se, C, NH o alquilenos de 1 a 6 átomos de carbono,

n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5, y

ENLAZADOR es un grupo de unión eficaz para formar un dímero del compuesto por reacción con un compuesto homo difuncional, llevando dicho enlazador un grupo seleccionado entre NH_2 , OH, SH, COOH, CH_3CO y CHO, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho compuesto tiene un anillo macrocíclico de 13 a 17 átomos de anillo.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde dicho compuesto tiene una o más cadenas laterales en dicho anillo macrocíclico, extendiéndose dichas una o más cadenas laterales desde los átomos de anillo de la cadena principal.

4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, donde dichas una o más cadenas laterales corresponden a restos encontrados dentro de los giros β de una neurotrofina.

5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicha neurotrofina es el factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT4/5) o factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicha neurotrofina se une a un receptor.

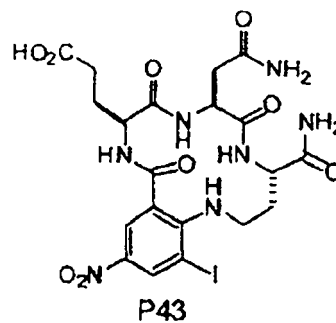
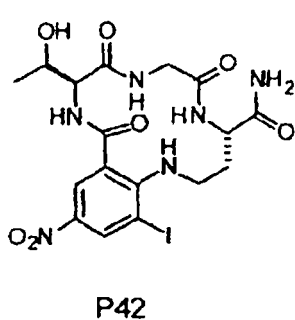
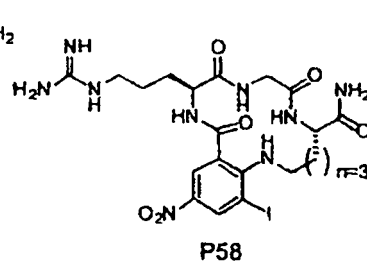
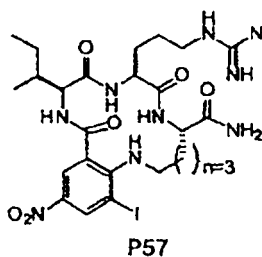
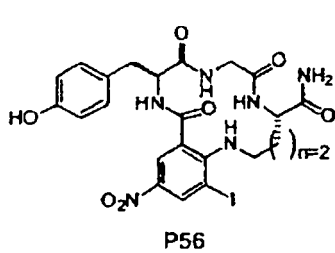
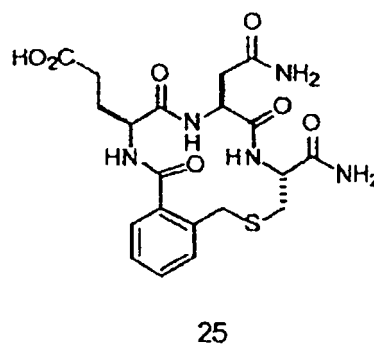
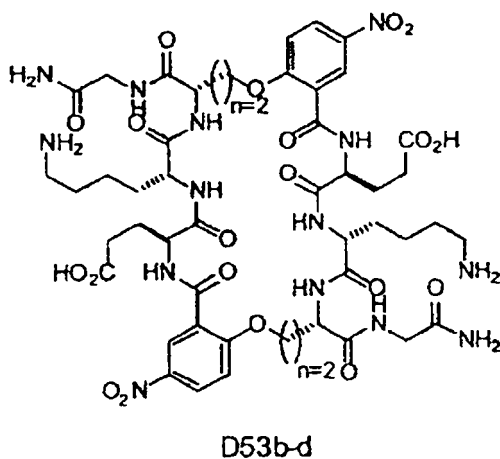
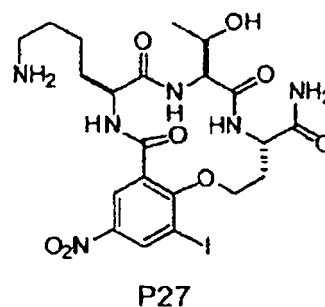
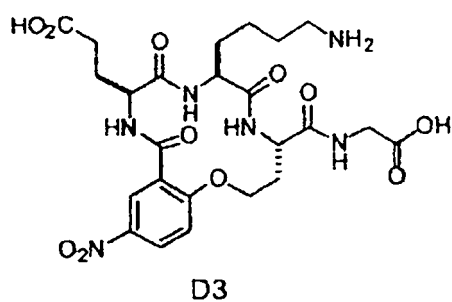
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho receptor de neurotrofina es TrkA, TrkB, TrkC o p75.

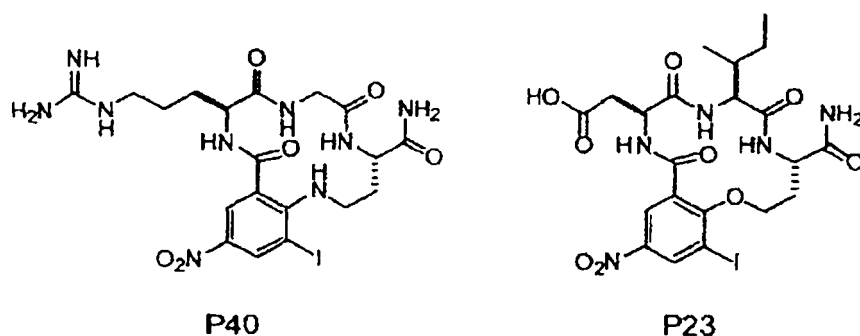
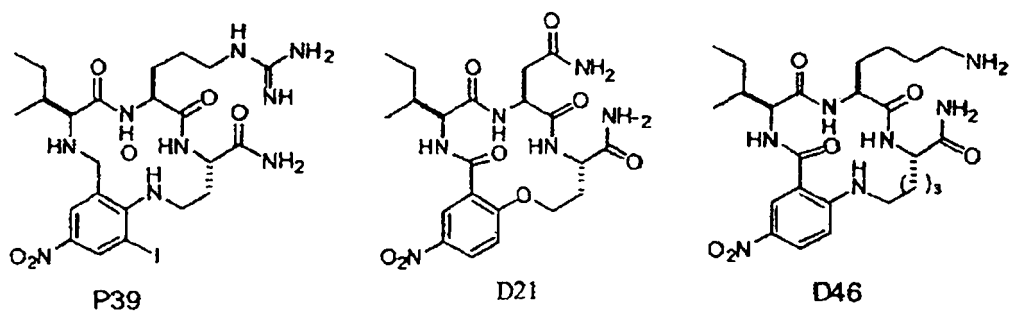
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde R^1 y R^3 se seleccionan entre cadenas laterales de lisina, ácido glutámico, tirosina, iso-leucina, asparagina y treonina, y R^2 , R^4 , R^5 y R^6 son hidrógeno.

9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde X es O, S o NH y R^1 , R^3 , R^5 y R^6 son hidrógeno.

10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho compuesto se selecciona entre

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



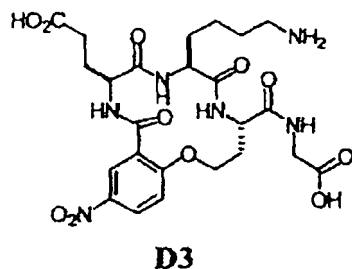


30 11. Uso de un compuesto cíclico peptidomimético con giro β de fórmula (I) como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 8, 9 y 10, en la evaluación de los requisitos estructurales de compuestos cíclicos peptidomiméticos con giro β que mimetizan una neurotrofina *in vitro*.

35 12. Uso de un compuesto cíclico peptidomimético con giro β que mimetiza a una neurotrofina y que tiene la fórmula (I) como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 8, 9 y 10, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno mediado por receptores de neurotrofinas.

40 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en el que el anillo macrocíclico que contiene X tiene de 13 a 17 átomos de anillo.

45 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, donde dicho compuesto es de fórmula:

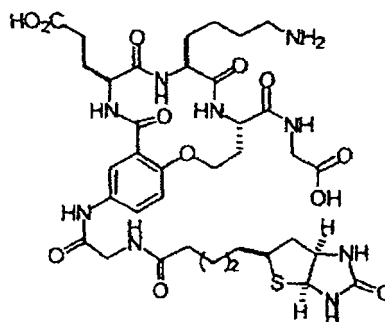


15. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, donde dicho compuesto es de fórmula:

5

10

15



D3-Biotina

20

16. Un método para seleccionar y/o evaluar los requisitos estructurales necesarios de agonistas y antagonistas para receptores de neurotrofinas que aprovecha un compuesto cíclico de fórmula (I) como se ha definido en las reivindicaciones 1 u 8, en competición con un compuesto de ensayo en investigación.

25

17. Uso de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido en las reivindicaciones 1 u 8, para identificar dominios de receptores funcionalmente importantes, en ensayos de unión.

30

35

40

45

50

55

60

65

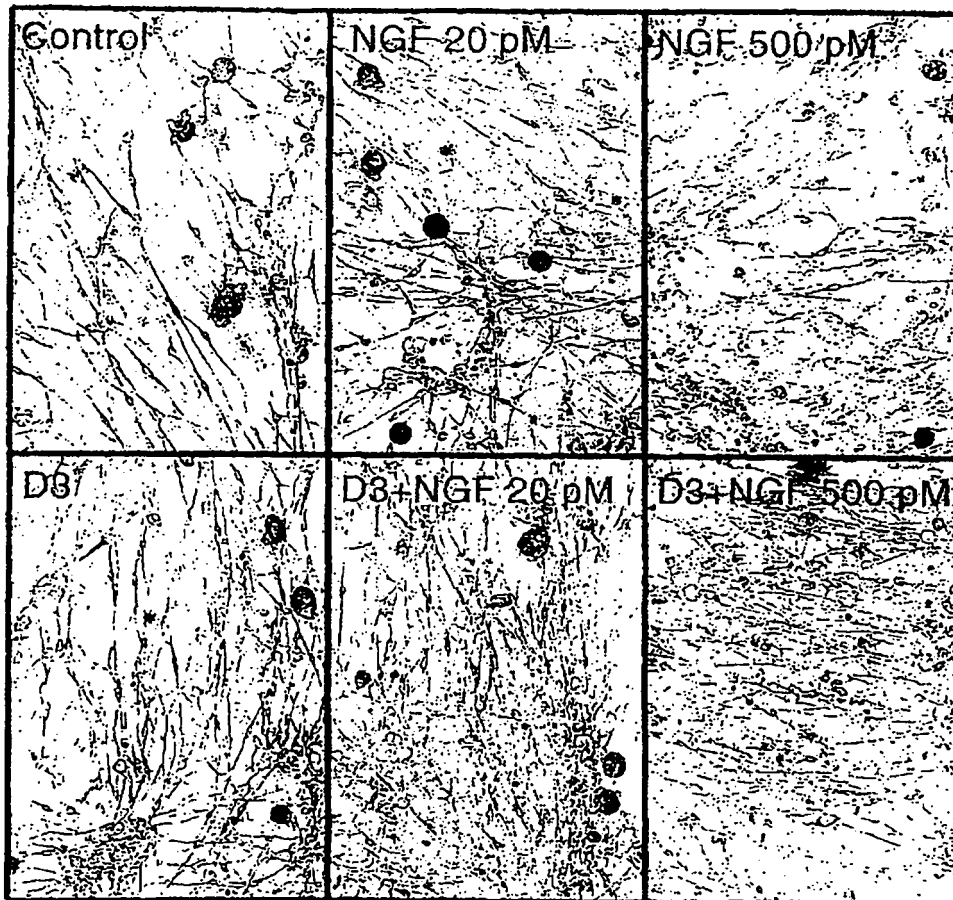
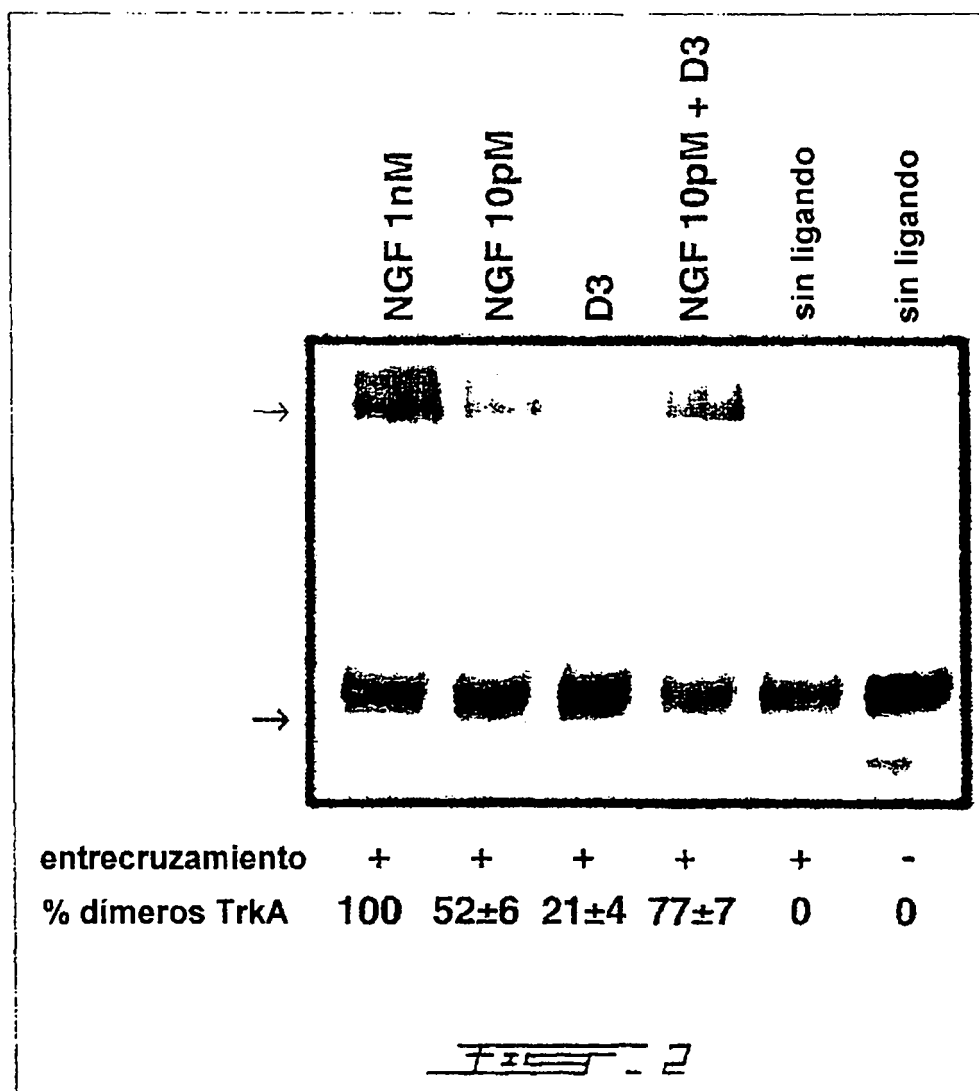


FIG. 1



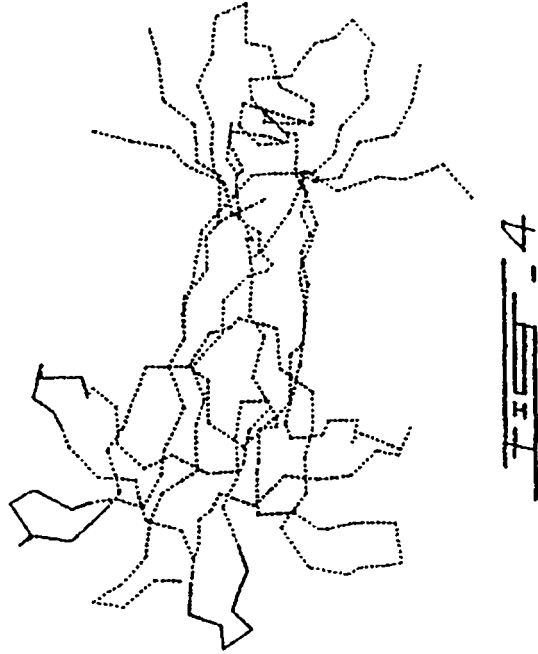


FIG. 4

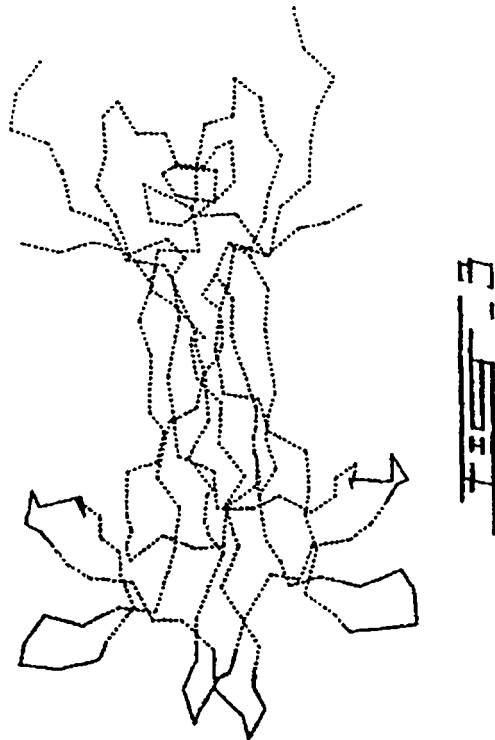


FIG. 3