

COMPUESTOS PEPTÍDICOS Y USOS TERAPÉUTICOS DE LOS MISMOS

Solicitud Relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Israel No. 260555 presentada el 11 de julio de 2018, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Declaración de listado de secuencias

10 El archivo ASCII, titulado 77809 Sequence Listing.txt, creado el 7 de julio de 2019, que comprende 8.069.120 bytes, presentado al mismo tiempo que la presentación de esta solicitud se incorpora aquí por referencia.

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a composiciones y métodos para usarlas para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

15 Existe una necesidad insatisfecha de nuevas composiciones que puedan servir para atenuar la respuesta al estrés celular e inmunitario en el tejido normal, de una manera que sea específica, segura y eficaz, reduciendo así la gravedad de las enfermedades degenerativas asociadas al estrés y la inflamación inducida por estrés.

20 El péptido LPPLPYP (SEQ ID NO: 2, también conocido como Stressin-1 e IPL344) es un péptido corto de 7 aminoácidos que protege a las células de varios tipos de las presiones proapoptóticas y activa el sistema de señalización Akt. La estructura de IPL344 se asemeja a los sitios de unión de las proteínas adaptadoras. Se ha propuesto que tiene un mecanismo de acción que comprende imitar tales proteínas y activar procesos de protección celular a través de Akt y posiblemente otras vías.

25 Las publicaciones de solicitud de patente internacional números: WO 2006/021954 y WO2012/160563 divulgan el uso del péptido LPPLPYP (SEQ ID NO: 2) para tratar enfermedades tales como ELA.

Resumen de la invención

30 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido aislado que no tiene más de diez aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$ (SEQ ID NO: 17),

- (i) en el que X_1 es prolina, o un análogo o derivado de la misma;
- (ii) en el que X_2 es prolina, o un análogo de la misma;
- (iii) en el que X_3 se selecciona del grupo de alanina, valina, leucina, cisteína, isoleucina, metionina y un derivado o análogo de los mismos;
- 5 (iv) en el que X_4 se selecciona del grupo que consiste en alanina, valina, serina y un derivado o análogo de las mismas;
- (v) en el que X_5 es cualquier aminoácido;
- (vi) en el que X_6 prolina o un análogo o derivado de la misma; y
- (vii) en el que el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o timo
- 10 inducida por dexametasona en un ratón.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido aislado que no tiene más de seis aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (SEQ ID NO: 1),

- (i) en el que X_1 es prolina o un análogo o derivado de la misma;
- 15 (ii) en el que X_2 es prolina o un análogo o derivado de la misma;
- (iii) en el que X_3 se selecciona del grupo de alanina, valina, leucina, cisteína, isoleucina, metionina y un derivado o análogo de los mismos;
- (iv) en el que X_4 se selecciona del grupo que consiste en alanina, valina, serina, prolina y un derivado o análogo de las mismas;
- 20 (v) en el que X_5 es cualquier aminoácido; y
- (vi) en el que el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso de bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido aislado de cinco aminoácidos que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula

25 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (SEQ ID NO: 5), en el que

- (i) X_1 y X_3 son cualquier aminoácido;
- (ii) X_2 es prolina o un análogo o derivado de la misma;
- (iii) X_4 no es prolina;

(iv) el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso de bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido aislado que tiene siete aminoácidos que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la
5 fórmula $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$ (SEQ ID NO: 6), en el que

(i) X_1 , X_5 y X_6 son cualquier aminoácido;

(ii) X_2 , X_3 y X_7 es prolina o un análogo o derivado de la misma;

(iii) X_4 no es prolina; y

10 (iv) el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso de bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27 como agente activo y portador fisiológicamente aceptable.

15 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el derivado de prolina se selecciona del grupo que consiste en N-metil prolina, alfa-metil prolina y ácido α -aminobutírico.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido tiene una longitud de 6 aminoácidos.

20 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido comprende un aminoácido que está unido al terminal N de X_1 , el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en alanina, valina, leucina, cisteína, isoleucina, metionina y un derivado o análogo del mismo.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el aminoácido que está unido al terminal N de X_1 es leucina o un derivado o análogo de la misma.

25 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el aminoácido que está unido al terminal N de X_1 es un D-aminoácido.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido tiene 7 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el X_4 es alanina o un análogo o derivado de la misma.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el X₅ se selecciona del grupo que consiste en tirosina, fenilalanina, triptófano y un derivado o análogo del mismo.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, X₅ es tirosina.

5 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido aislado consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 18.

10 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 18.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido aislado tiene 5 aminoácidos.

15 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el X₄ se selecciona del grupo que consiste en alanina, prolina, un derivado o análogo de alanina y un derivado o análogo de prolina.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el derivado o análogo de prolina se selecciona del grupo que consiste en N-metil prolina, alfa-metil prolina y ácido α -aminobutírico.

20 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 3.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido aislado consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 18.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, X₃ es leucina.

25 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, X₁ y/o X₃ son D aminoácidos.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido es un péptido encadenado.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido es un péptido cíclico.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el orden de la secuencia se invierte y todos los aminoácidos son del tipo D.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido se une a una fracción de penetración celular.

- 5 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el resto que penetra en las células se une a un terminal N del péptido.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el péptido se utiliza en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o degenerativas.

- 10 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la enfermedad asociada con la apoptosis es una enfermedad inflamatoria o degenerativa.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad autoinmunitaria.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la enfermedad degenerativa es una enfermedad neurodegenerativa.

- 15 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la enfermedad asociada con la apoptosis se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinitis pigmentosa, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio.

- 20 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de realizaciones de la invención, a continuación, se describen métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, prevalecerá la especificación de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean
25 necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

- Algunas realizaciones de la invención se describen aquí, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles que se muestran son a modo de ejemplo y con el propósito de una
30 discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción

tomada con los dibujos pone de manifiesto para los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

5 FIG. 1 es un gráfico que ilustra el efecto de péptidos ejemplares sobre el peso del bazo, el número de células del bazo, el peso del timo y el número de células del timo.

Los péptidos utilizados en la selección fueron los siguientes:

PPLPY - SEQ ID NO: 3

LPPLAYP - SEQ ID NO: 4

PLPYP - SEQ ID NO: 9

10 PPL - SEQ ID NO: 10

PLP - SEQ ID NO: 11

PYP - SEQ ID NO: 12

LPGLPYP - SEQ ID NO: 13

LPPLGYP - SEQ ID NO: 14

15 LAPLPYP - SEQ ID NO: 15

LPALPYP - SEQ ID NO: 16

La FIG. 2 es un gráfico que ilustra el efecto de péptidos ejemplares sobre el peso del bazo, el número de células del bazo, el peso del timo y el número de células del timo.

Los péptidos utilizados en la selección fueron los siguientes:

20 LPPLPYP - SEQ ID NO: 2 (control)

PPLAYP - SEQ ID NO: 18

LPPLPY- SEQ ID NO: 7

LPPLAYP - SEQ ID NO: 4

PPLPY-NH₂ - SEQ ID NO: 19

25 PPLPY - SEQ ID NO: 3

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a composiciones y métodos para usarlas para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

5 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de diversas formas.

10 Los enlaces peptídicos se encuentran casi exclusivamente en una conformación trans con un ángulo de torsión omega cercano a 180 °, mientras que solo se observa una porción muy limitada en la conformación cis, con un ángulo omega de alrededor de 0 °. La barrera energética entre las configuraciones trans/cis es de aproximadamente 20 [kcal/mol] y el isómero trans se ve favorecido energéticamente por ~ 2,5 [kcal/mol]. Entre los 20 aminoácidos canónicos, la prolina juega una función especial. El enlace peptídico de prolina con el residuo de aminoácido anterior (Xaa-Pro, Xaa denota cualquier aminoácido) carece del hidrógeno de amida, por lo que este enlace peptídico no puede actuar como donante de enlace de hidrógeno y la barrera de energía, así como la brecha energética se reduce significativamente a ~ 13 y ~ 0.5 [kcal/mol] respectivamente [2], desplazando el equilibrio trans/cis hacia la configuración cis. Los grandes cambios en el ángulo omega asociados con el proceso de isomerización de prolina trans/cis (0 a 180) están modulados por interacciones intra e intermoleculares, y tienen una influencia dramática en la relación de actividad estructural de la cadena polipeptídica. Por tanto, la isomerización de prolina está emergiendo como un componente crítico en el control de la actividad de muchos procesos biológicos. Esto es específicamente relevante para péptidos cortos en los que la configuración cis podría ocupar más del 30 % de la población conformacional, dependiendo del residuo anterior.

25 Se sabe además que el efecto de prolina de conformación múltiple se manifiesta en residuos de prolina localizados como el segundo residuo del terminal N del péptido (penúltima prolina). El truncamiento del primer residuo terminal N en el péptido que contiene la penúltima prolina generalmente da como resultado un cambio conformacional del péptido. En un conjunto de datos de 58 péptidos se encontró que casi el 80 % de los péptidos mostraban este efecto [Glover, M.S., et al., 2014 J Am Soc Mass Spectrom. 26 (3): pág. 444-5].

30 El péptido multiprolina LPPLPYP (SEQ ID NO: 2), también conocido como IPL344 y Stressin-1) es un péptido corto de 7 aminoácidos que protege a las células de varios tipos de presiones

proapoptóticas y activa el sistema de señalización Akt. Es un candidato para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

5 Considerando la delicada naturaleza conformacional de las prolinas, los presentes inventores se propusieron determinar si la configuración trans prolina domina la funcionalidad de los cuatro residuos de prolina del péptido LPPLPYP (SEQ ID NO: 2). Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que la sustitución de la penúltima prolina por una alanina dio como resultado un péptido (SEQ ID NO: 4) que redujo significativamente la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón (Figura 1). En marcado contraste, la sustitución de la penúltima prolina por una glicina resultó en un péptido que carecía de esta actividad.

10 Si bien redujeron aún más la presente invención a la práctica, los presentes inventores encontraron que la eliminación del primer y último aminoácido de la SEQ ID NO: 2, también dio como resultado un péptido (que tiene una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 3) que redujo significativamente la cantidad de pérdida de peso de bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón.

15 Los presentes inventores concluyen que los péptidos cortos basados en las SEQ ID NO: 3 y 4 son prometedores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

20 Aunque redujeron aún más la presente invención a la práctica, los presentes inventores encontraron que un péptido adicional (SEQ ID NO: 18) que se ajustaba a la fórmula como se establece en la SEQ ID NO: 17 mostraba una mejora significativa en la reducción de la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o timo inducida por dexametasona en ratones (ver Figura 2).

25 Los presentes inventores demostraron además que los péptidos ejemplares que caen bajo cualquiera de las fórmulas generales descritas muestran una mejora significativa en comparación con el péptido base (SEQ ID NO: 2) para reducir la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o timo inducida por dexametasona en ratones.

30 El término "péptido", como se usa en este documento, se refiere a un polímero de aminoácidos naturales o sintéticos, que abarca péptidos nativos (ya sea productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, péptidos sintetizados sintéticamente), así como peptoides y semipeptoides que son análogos de polipéptidos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean incluso más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células.

La presente invención también cubre derivados (con modificación y/o adición de una función química a la cadena lateral de aminoácidos, sin un cambio químico en la estructura peptídica) y análogos (con modificación y/o adición de una función química dentro de la estructura principal peptídica, por ejemplo, una modificación terminal N o terminal C, una modificación de enlace peptídico, una modificación de aminoácido no definida como “derivado”), complejos con otras especies tales como un ion metálico (por ejemplo, cobre, zinc, manganeso, magnesio, y otros).

Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificación del terminal N, modificación del terminal C, modificación del enlace polipeptídico, que incluyen, entre otros, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S = O, O = C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S = C-NH, CH = CH o CF = CH, modificaciones de la estructura principal y modificación del residuo. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), que se incorpora como referencia como si se expusiera completamente en este documento. A continuación, se proporcionan más detalles a este respecto.

Los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido pueden estar sustituidos, por ejemplo, por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-), enlaces éster (-C(R)HCOOC(R)-N-), enlaces cecetometileno (-CO-CH₂-), enlaces α -aza (-NH-N(R)-CO-), en el que R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-), enlaces tioamida (-CS-NH-), enlaces dobles olefínicos (-CH = CH-), enlaces retroamida (-NH-CO-), derivados polipeptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), en el que R es la cadena lateral “normal”, presentada naturalmente en el átomo de carbono.

Estas modificaciones pueden ocurrir en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo.

Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, pueden sustituirse por ácidos sintéticos no naturales tales como el análogo Fenilglicina, TIC, naftilelanina (NoI), derivados metilados en el anillo de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr.

La prolina puede reemplazarse por ácidos sintéticos no naturales tales como los derivados N-metil prolina, alfa-metil prolina y el análogo ácido α -aminobutírico.

Otros aminoácidos no naturales se resumen en la Tabla 2, a continuación.

Además de lo anterior, los polipéptidos de la presente invención también pueden incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácidos (por ejemplo, ácidos grasos, carbohidratos complejos, etc.).

5 Como se usa en la presente memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones siguiente, se entiende que el término “aminoácido” o “aminoácidos” incluye los 20 aminoácidos de origen natural; aquellos aminoácidos frecuentemente modificados post-traduccionalmente in vivo, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales que incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, el término “aminoácido” incluye tanto D- como L-
10 aminoácidos (estereoisómeros).

Las Tablas 1 y 2 a continuación enumeran los aminoácidos naturales (Tabla 1) y los aminoácidos no convencionales o modificados (Tabla 2) que se pueden usar con la presente invención.

Tabla 1

<i>Aminoácido</i>	<i>Abreviatura de tres letras</i>	<i>Símbolo de una letra</i>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L

Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Cualquier aminoácido como se indicó anteriormente	Xaa	X

Tabla 2

<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>
ornitina	Orn	hidroxiprolina	Hyp
Ácido α -aminobutírico	Abu	aminonorbornil-carboxilato	Norb
D-alanina	Dala	aminociclopropano-carboxilato	Cpro
D-arginina	Darg	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-asparagina	Dasn	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
Ácido D-aspártico	Dasp	N-(carbetilmetil)glicina	Nasp

D-cisteína	Dcys	N-(tiometil)glicina	Ncys
D-glutamina	Dgln	N-(2-carbamiletil)glicina	Ngln
Ácido D-glutámico	Dglu	N-(2-carbetiletil)glicina	Nglu
D-histidina	Dhis	N-(imidazoliletil)glicina	Nhis
D-isoleucina	Dile	N-(1-metilpropil)glicina	Nile
D-leucina	Dleu	N-(2-metilpropil)glicina	Nleu
D-lisina	Dlys	N-(4-aminobutil)glicina	Nlys
D-metionina	Dmet	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
D-ornitina	Dorn	N-(3-aminopropil)glicina	Norn
D-fenilalanina	Dphe	N-benzilglicina	Nphe
D-prolina	Dpro	N-(hidroximetil)glicina	Nser
D-serina	Dser	N-(1-hidroxietil)glicina	Ntr
D-treonina	Dtr	N-(3-indoliletil)glicina	Nhtrp
D-triptofano	Dtrp	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Ntyr
D-tirosina	Dtyr	N-(1-metiletil)glicina	Nval
D-valina	Dval	N-metilglicina	Nmgly
D-N-metilalanina	Dnmala	L-N-metilalanina	Nmala
D-N-metilarginina	Dnmarg	L-N-metilarginina	Nmarg
D-N-metilasparagina	Dnmasn	L-N-metilasparagina	Nmasn
D-N-metilasparatato	Dnmasp	Ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
D-N-metilcisteína	Dnmcys	L-N-metilcisteína	Nmcys
D-N-metilglutamina	Dnmgln	L-N-metilglutamina	Nmgln
D-N-metilglutamato	Dnmglu	Ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
D-N-metilhistidina	Dnmhis	L-N-metilhistidina	Nmhis

D-N-metilsoleucina	Dnmile	L-N-metilsoleucina	Nmile
D-N-metilleucina	Dnmleu	L-N-metilleucina	Nmleu
D-N-metillisina	Dnmlys	L-N-metillisina	Nmlys
D-N-metilmetionina	Dnmmet	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-N-metilornitina	Dnmorn	L-N-metilornithina	Nmorn
D-N-metilfenilalanina	Dnmphe	L-N-metilphenilalanina	Nmphe
D-N-metilprolina	Dnmpro	L-N-metilprolina	Nmpro
D-N-metilserina	Dnmser	L-N-metilserina	Nmser
D-N-metiltreonina	Dnmtr	L-N-metiltreonina	Nmtr
D-N-metilriptofano	Dnmtrp	L-N-metilriptofano	Nmtrp
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	L-N-metiltirosina	Nmtyr
D-N-metilvalina	Dnmval	L-N-metilvalina	Nmval
L-norleucina	Nle	L-N-metilnorleucina	Nmnle
L-norvalina	Nva	L-N-metilnorvalina	Nmnva
L-etilglicina	Etg	L-N-metil-etilglicina	Nmetg
L-t-butilglicina	Tbug	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
L-homofenilalanina	Hphe	L-N-metil-homofenilalanina	Nmhphe
α -naftilalanina	Anap	N-metil- α -naftilalanina	Nmanap
penicillamina	Pen	N-metilpenicillamina	Nmpen
Ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
ciclohexilalanina	Chexa	N-metil-ciclohexilalanina	Nmchexa
ciclopentilalanina	Cpen	N-metil-ciclopentilalanina	Nmcpen

α -amino- α -metilbutirato	Aabu	N-metil- α -amino- α -metilbutirato	Nmaabu
Ácido α -aminoisobutírico	Aib	N-metil- α -aminoisobutirato	Nmaib
D- α -metilarginina	Dmarg	L- α -metilarginina	Marg
D- α -metilasparagina	Dmasn	L- α -metilasparagina	Masn
D- α -metilaspartato	Dmasp	L- α -metilaspartato	Masp
D- α -metilcisteina	Dmcys	L- α -metilcisteina	Mcys
D- α -metilglutamina	Dmgln	L- α -metilglutamina	Mgln
Ácido D- α -metilglutámico	Dmglu	L- α -metilglutamato	Mglu
D- α -metilhistidina	Dmhis	L- α -metilhistidina	Mhis
D- α -metilisoleucina	Dmile	L- α -metilisoleucina	Mile
D- α -metilleucina	Dmleu	L- α -metilleucina	Mleu
D- α -metillisina	Dmlys	L- α -metillisina	Mlys
D- α -metilmetionina	Dmmet	L- α -metilmetionina	Mmet
D- α -metilornitina	Dmorn	L- α -metilornitina	Morn
D- α -metilfenilalanina	Dmphe	L- α -metilfenilalanina	Mphe
D- α -metilprolina	Dmpro	L- α -metilprolina	Mpro
D- α -metilserina	Dmser	L- α -metilserina	Mser
D- α -metiltreonina	Dmtr	L- α -metiltreonina	Mtr
D- α -metiltryptofan	Dmtrp	L- α -metiltryptofan	Mtrp
D- α -metiltirosina	Dmtyr	L- α -metiltirosina	Mtyr
D- α -metilvalina	Dmval	L- α -metilvalina	Mval

N-ciclobutilglicina	Ncbut	L- α -metilnorvalina	Mnva
N-cicloheptilglicina	Nchep	L- α -metiletilglicina	Metg
N-ciclohexilglicina	Nchex	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
N-ciclodecilglicina	Ncdec	L- α -metil-homofenilalanina	Mhphe
N-ciclododecilglicina	Ncdod	α -metil- α -naftilalanina	Manap
N-ciclooctilglicina	Ncoct	α -metilpenicillamina	Mpen
N-ciclopropilglicina	Ncpro	α -metil- γ -aminobutirato	Mgabu
N-cicloundecilglicina	Ncund	α -metil-ciclohexilalanina	Mchexa
N-(2-aminoetil)glicina	Naeg	α -metil-ciclopentilalanina	Mcpen
N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm	N-(N-(2,2-dipfeniletil) carbamilmetil-glicina	Nnbhm
N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe	N-(N-(3,3-difenilpropil) carbamilmetil-glicina	Nnbhe
1-carboxi-1-(2,2-difenil etilamino)ciclopropano	Nmbc	Ácido 1,2,3,4- tetrahidroisoquinolina-3- carboxílico	Tic
fosfoserina	pSer	fosfotreonina	pTr
fosfotirosina	pTyr	O-metil-tirosina	
Ácido 2-aminoadípico		hidroxilisina	

Tabla 2 Cont.

Los aminoácidos de los péptidos de la presente invención se pueden sustituir de forma conservadora o no conservadora.

- 5 El término “sustitución conservadora”, como se usa en este documento, se refiere a la sustitución de un aminoácido presente en la secuencia nativa en el péptido con un amino

natural o no natural o un peptidomimético que tiene propiedades estéricas similares. Cuando la cadena lateral del aminoácido nativo que se va a reemplazar es polar o hidrófoba, la sustitución conservadora debe ser con un aminoácido de origen natural, un aminoácido de origen no natural o con una fracción peptidomimética que también sea polar o hidrófobo (además de tener las mismas propiedades estéricas que la cadena lateral del aminoácido reemplazado).

Como los aminoácidos de origen natural se agrupan típicamente de acuerdo con sus propiedades, las sustituciones conservadoras por aminoácidos de origen natural se pueden determinar fácilmente teniendo en cuenta el hecho de que, de acuerdo con la invención, se considera el reemplazo de aminoácidos cargados por aminoácidos no cargados estéricamente similares como sustituciones conservadoras.

Para producir sustituciones conservadoras por aminoácidos no naturales, también es posible utilizar análogos de aminoácidos (aminoácidos sintéticos) bien conocidos en la técnica. Un peptidomimético del aminoácido de origen natural está bien documentado en la literatura conocida por el médico experto.

Cuando se afectan sustituciones conservadoras, el aminoácido de sustitución debe tener el mismo grupo funcional o uno similar en la cadena lateral como el aminoácido original.

La frase “sustituciones no conservadoras” como se usa en este documento se refiere a la sustitución del aminoácido presente en la secuencia original por otro aminoácido natural o no natural, que tiene diferentes propiedades electroquímicas y/o estéricas. Por tanto, la cadena lateral del aminoácido sustituyente puede ser significativamente más grande (o más pequeña) que la cadena lateral del aminoácido nativo sustituido y/o puede tener grupos funcionales con propiedades electrónicas significativamente diferentes a las del aminoácido sustituido. Ejemplos de sustituciones no conservadoras de este tipo incluyen la sustitución de fenilalanina o ciclohexilmetilglicina por alanina, isoleucina por glicina o $\text{-NH-CH-[(CH}_2\text{)}_5\text{-COOH]-CO}$ por ácido aspártico. Aquellas sustituciones no conservadoras que caen dentro del alcance de la presente invención son aquellas que aún constituyen un péptido que tiene propiedades antibacterianas.

Como se mencionó, los terminales N y C de los péptidos de la presente invención pueden estar protegidos por grupos funcionales. Los grupos funcionales adecuados se describen en Green and Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Capítulos 5 y 7, 1991, cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia. Los grupos protectores

preferidos son aquellos que facilitan el transporte del compuesto unido a ellos al interior de una célula, por ejemplo, reduciendo la hidrofilia y aumentando la lipofilia de los compuestos.

Estas fracciones se pueden escindir in vivo, ya sea por hidrólisis o enzimáticamente, dentro de la célula. Los grupos protectores de hidroxilo incluyen grupos protectores de ésteres, carbonatos y carbamato. Los grupos protectores de amina incluyen grupos alcoxi y ariloxycarbonilo, como se describió anteriormente para los grupos protectores de terminal N. Los grupos protectores de ácido carboxílico incluyen ésteres alifáticos, bencílicos y arílicos, como se describió anteriormente para los grupos protectores de terminal C. En una realización, el grupo ácido carboxílico en la cadena lateral de uno o más residuos de ácido glutámico o ácido aspártico en un péptido de la presente invención está protegido, preferiblemente con un éster de metilo, etilo, bencilo o bencilo sustituido.

Los ejemplos de grupos protectores de terminal N incluyen grupos acilo (-CO-R1) y grupos alcoxicarbonilo o ariloxycarbonilo (-CO-O-R1), en los que R1 es un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, aromático o aromático sustituido. Ejemplos específicos de grupos acilo incluyen acetilo, (etil)-CO-, n-propil-CO-, iso-propil-CO-, n-butil-CO-, sec-butil-CO-, t-butil-CO-, hexilo, lauroilo, palmitoilo, miristoilo, estearilo, fenil-CO-oleoilo, fenil-CO- sustituido, bencilo-CO- y (bencilo sustituido)-CO-. Ejemplos de grupos alcoxicarbonilo y ariloxycarbonilo incluyen CH₃-O-CO-, (etil)-O-CO-, n-propil-O-CO-, isopropil-O-CO-, n-butil-O-CO-, sec-butil-O-CO-, t-butil-O-CO-, fenil-O-CO-, fenil-O-CO- sustituido y bencil-O-CO-, (bencilo sustituido)-O-CO-. Adamantano, naftaleno, miristoleilo, **tulueno**, bifenilo, cinamoilo, nitrobenzoilo, toluoilo, furoilo, benzoilo, ciclohexano, norbornano, Z-caproico. Para facilitar la acilación de N, pueden estar presentes de uno a cuatro residuos de glicina en el terminal N de la molécula.

El grupo carboxilo en el terminal C del compuesto puede protegerse, por ejemplo, por una amida (es decir, el grupo hidroxilo en el terminal C se reemplaza con NH₂, -NHR₂ y -NR₂R₃) o éster (es decir, el grupo hidroxilo en el terminal C se reemplaza con -OR₂). R₂ y R₃ son independientemente un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido. Además, tomados junto con el átomo de nitrógeno, R₂ y R₃ pueden formar un anillo heterocíclico de C₄ a C₈ con aproximadamente 0 - 2 heteroátomos adicionales tales como nitrógeno, oxígeno o azufre. Los ejemplos de anillos heterocíclicos adecuados incluyen piperidinilo, pirrolidinilo, morfolino, tiomorfolino o piperazinilo. Ejemplos de grupos protectores de terminal C incluyen -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -NH(etilo), -N(etilo)₂, -N(metilo) (etilo), -NH (bencilo), -N(alquilo C₁ C₄) (bencilo), -NH(fenilo), -N(alquilo C₁ C₄)

(fenilo), -OCH₃, -O-(etilo), -O-(n-propilo), -O-(n-butilo), -O-(isopropilo), -O-(sec butilo), -O-(t-butilo), -O-bencilo y -O-fenilo.

5 Los péptidos de la presente invención también pueden comprender fracciones que no son aminoácidos, tales como, por ejemplo, fracciones hidrófobas (varios hidrocarburos lineales, ramificados, cíclicos, policíclicos o heterocíclicos y derivados de hidrocarburos) unidos a los péptidos; agentes no penetrantes de péptidos; varios grupos protectores, especialmente cuando el compuesto es lineal, que se unen a los terminales del compuesto para disminuir la degradación. Se pueden incluir grupos químicos (no aminoácidos) presentes en el compuesto para mejorar diversas propiedades fisiológicas tales como; disminución de la degradación o
10 eliminación; disminución de la repulsión por diversas bombas celulares, mejora las actividades inmunogénicas, mejora varios modos de administración (como la unión de varias secuencias que permiten la penetración a través de varias barreras, a través del intestino, etc.); mayor especificidad, mayor afinidad, menor toxicidad y similares.

15 La unión del componente de secuencia de aminoácidos de los péptidos de la invención a otros agentes que no son aminoácidos puede ser mediante enlace covalente, por complejión no covalente, por ejemplo, por complejión a un polímero hidrófobo, que puede degradarse o escindirse produciendo un compuesto capaz de liberación sostenida; atrapando la parte de aminoácido del péptido en liposomas o micelas para producir el péptido final de la invención. La asociación puede ser mediante el atrapamiento de la secuencia de aminoácidos dentro del
20 otro componente (liposoma, micela) o la impregnación de la secuencia de aminoácidos dentro de un polímero para producir el péptido final de la invención.

De acuerdo con una realización particular, el péptido se une a una fracción que penetra en las células.

25 Como se usa en este documento, el término “fracción que penetra en las células” se refiere a una fracción (por ejemplo, un lípido, tal como ácido palmítico) que potencia la translocación de un péptido unido a través de una membrana celular. En una realización particular, la fracción que penetra en las células no es una fracción peptídica. La fracción puede estar unido al terminal N o al terminal C.

30 Los péptidos de la invención pueden ser lineales o cíclicos (la ciclación puede mejorar la estabilidad). La ciclación puede tener lugar por cualquier medio conocido en la técnica. Cuando el compuesto se compone predominantemente de aminoácidos, la ciclación puede ser a través de terminal N a C, terminal N a cadena lateral y terminal N a estructura principal, terminal C a cadena lateral, terminal C a estructura principal, cadena lateral a estructura principal y cadena

lateral a cadena lateral, así como ciclación de estructura principal a estructura principal. La ciclación del péptido también puede tener lugar a través de fracciones orgánicas no aminoácidos comprendidos en el péptido.

Los presentes inventores también conciben péptidos encadenados.

- 5 El término “péptido encadenado” como se usa en este documento se refiere a un péptido que tiene un número seleccionado de aminoácidos estándar o no estándar, y que además tiene al menos dos fracciones capaces de experimentar una reacción para promover la formación de enlaces carbono-carbono, que se ha puesto en contacto con un reactivo para generar al menos un entrecruzador entre las al menos dos fracciones, que modula, por ejemplo, la estabilidad
10 del péptido.

- El término “encadenado”, como se usa en este documento, introduce en un péptido al menos dos fracciones capaces de experimentar reacción para promover la formación de enlaces carbono-carbono que pueden ponerse en contacto con un reactivo para generar al menos un entrecruzador entre las al menos dos fracciones. El encadenado proporciona una restricción a
15 una estructura secundaria, como una estructura de hélice alfa. La longitud y la geometría del entrecruzador se pueden optimizar para mejorar el rendimiento del contenido de estructura secundaria deseado. La restricción proporcionada puede, por ejemplo, evitar que la estructura secundaria se despliegue y/o puede reforzar la forma de la estructura secundaria. Una estructura secundaria que no puede desplegarse es, por ejemplo, más estable.

- 20 Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar bioquímicamente mediante el uso de técnicas estándar en fase sólida. Estos métodos incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, métodos de síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos, síntesis de solución clásica. Los procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Solid
25 Phase Polypeptide Syntheses (2ª edición, Pierce Chemical Company, 1984).

La síntesis de péptidos a gran escala está descrita por Andersson Biopolymers 2000; 55 (3): 227-50.

- Los péptidos sintéticos se pueden purificar mediante cromatografía líquida preparativa de alta resolución [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and
30 Co. N.Y.] y cuya composición puede confirmarse mediante secuenciación de aminoácidos.

También pueden usarse técnicas recombinantes para generar los péptidos de la presente invención. Para producir un péptido de la presente invención usando tecnología recombinante,

un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención se liga en un vector de expresión de ácido nucleico, que comprende la secuencia de polinucleótidos bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora en cis (por ejemplo, secuencia promotora) adecuada para dirigir la transcripción constitutiva, específica de tejido o inducible de los polipéptidos de la presente invención en las células huésped.

Además de ser sintetizados en células huésped, los péptidos de la presente invención también pueden sintetizarse usando sistemas de expresión in vitro. Estos métodos son bien conocidos en la técnica y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

Los péptidos descritos en el presente documento son capaces de reducir la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón, por ejemplo, después de la inyección (IP) con 100 µg de dexametasona.

En otra realización, los péptidos descritos en este documento son capaces de interferir y bloquear la secreción de TNF-α e IL-6 por las células de macrófagos en respuesta a activadores innatos tales como lipopolisacáridos (LPS) y oligonucleótidos CpG.

Adicional o alternativamente, los péptidos descritos en este documento son capaces de reducir, prevenir o inhibir la apoptosis en células eucariotas. Independientemente del mecanismo por el cual los péptidos de la invención median las respuestas al estrés, y sin desear vincularse a ninguna teoría o mecanismo de acción, se postula que los péptidos pueden ser capaces de unirse a p53 evitando así que p53 se una a ADN dañado. El péptido puede ensayarse analizando su capacidad para inhibir la respuesta a la hipertermia de la estirpe celular L12 (que carece de actividad p53 endógena y ha sido transfectada de manera estable con el gen p53 o un vector de control. En estas células, la actividad p53 induce la detención del crecimiento y supervivencia celular en lugar de apoptosis en respuesta a la hipertermia (como se describe en el documento WO2012/160563, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia).

Métodos para medir la apoptosis: La apoptosis es un proceso activo de autodestrucción de la célula, dirigido por genes, y se asocia con cambios morfológicos y bioquímicos característicos. La condensación nuclear y citoplásmica y la fragmentación de la célula moribunda en cuerpos apoptóticos unidos a la membrana son características típicas de la apoptosis. Otra característica de la muerte celular apoptótica es la degradación del ADN cromosómico en fragmentos oligonucleosomales después de la activación de nucleasas específicas.

Al “inhibir la apoptosis” o “inhibir la actividad apoptótica” se entiende cualquier disminución en el número de células que sufren apoptosis en relación con un control no tratado (es decir, células no expuestas a los péptidos de la invención). Preferiblemente, la disminución es de al menos un 25 %, más preferiblemente la disminución es de al menos un 50 % y lo más preferiblemente la disminución es de al menos una vez.

Uno de los primeros enfoques fue, además de la observación de que las células apoptóticas se encogen y tienen una mayor granularidad intracelular, teñir con fluorocromos específicos de ADN (por ejemplo, yoduro de propidio [PI], bromuro de etidio [EtBr]). Tan pronto como se induce un golpe letal, el ADN comienza a cambiar su perfil. El ADN apoptótico no solo consta de ADN fragmentado (visualizado como bandas más cortas, llamado escalera de ADN, en un gel de agarosa) sino que también se digiere parcialmente en nucleótidos individuales, de modo que los fluorocromos, como PI o EtBr, tienen menos ADN para teñir (Nicoletti et al. al., 1991). Esto se observa típicamente por un desplazamiento hacia la izquierda, llamado pico sub-G1, en el canal de detección de fluorocromo específico en el FACScan™ (de Becton Dickinson, EE. UU.).

Otro método es el marcado final mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) de las roturas de la cadena de ADN (TUNEL). El método TUNEL detecta roturas de cadenas de ADN en células que sufren apoptosis. La TdT es una enzima que cataliza la adición de trifosfato de desoxirribonucleótido a los extremos 3'-OH del ADN de cadena sencilla o de cadena doble. A diferencia de las células normales, los núcleos de las células apoptóticas incorporan nucleótidos exógenos (dUTP) -DIG en presencia de TdT. Un fragmento de anticuerpo anti-DIG con un fluorocromo conjugado permite la visualización de células apoptóticas. Un aumento de células apoptóticas provoca un mayor número de fragmentos de ADN y, en consecuencia, una fluorescencia más brillante. Una ventaja de este método es la especificidad muy alta (Gavrieli et al., 1992). Una desventaja de este método es que es caro y solo se puede utilizar para un pequeño conjunto de muestras, porque requiere mucho tiempo. Por lo tanto, no es aplicable a grandes programas de detección.

La pérdida de la polaridad de la membrana celular y la presentación de mayores cantidades de fosfatidil serina (PS) en el exterior de la membrana celular durante la fase inicial de la apoptosis ha llevado a un nuevo enfoque. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con alta afinidad por la PS. La integridad de la membrana celular se mantiene en las fases temprana e intermedia de la apoptosis. Las células apoptóticas tempranas e intermedias muestran un aumento de la unión de Anexina-FITC y son principalmente negativas para la tinción con PI. Los estadios apoptóticos tardíos y las células

necróticas se vuelven doble positivas, debido a la presentación de PS en la superficie y la tinción de PI de los ácidos nucleicos intracelulares debido a la desintegración de la membrana. Este método también es costoso y requiere mucha mano de obra.

5 Otros métodos para medir la apoptosis in vivo e in vitro se divulgan en las Patentes de Estados Unidos No. 6,726,895 y 6,723,567.

Por tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido aislado que no tiene más de seis aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (SEQ ID NO: 1),

- (i) en el que X_1 es prolina, o un análogo o derivado de la misma;
- 10 (ii) en el que X_2 es prolina, o un análogo o de la misma;
- (iii) en el que X_3 se selecciona del grupo de alanina, valina, leucina, cisteína, isoleucina, metionina y un derivado o análogo de los mismos;
- (iv) en el que X_4 se selecciona del grupo que consiste en alanina, valina, serina, prolina y un derivado o análogo de las mismas;
- 15 (v) en el que X_5 es cualquier aminoácido; y
- (vi) en el que el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso de bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón.

El péptido de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede tener cinco o seis aminoácidos de longitud.

- 20 Preferiblemente, los aminoácidos se seleccionan de manera que el enlace peptídico entre X_1 y X_2 (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso 90 % del tiempo) está en configuración cis, es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración cis; y el enlace peptídico entre X_3 y X_4 (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el
- 25 80 % del tiempo o incluso el 90 % del tiempo) está en la configuración trans - es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración trans.

Los métodos para probar la configuración cis/trans de un enlace peptídico son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, RMN.

- 30 En una realización, X_4 se selecciona del grupo que consiste en alanina, prolina, un derivado o análogo de alanina y un derivado o análogo de prolina.

De acuerdo con una realización particular, el derivado o análogo de prolina es

N-metil prolina, alfa-metil prolina o ácido α -aminobutírico.

En una realización, el péptido comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 3 (PPLPY).

- 5 En otra realización, el péptido consta de la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 3 (PPLPY).

En otra realización, el péptido consta de la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 7 (LPPLPY).

- 10 En una realización particular, X_1 y/o X_3 pueden ser D aminoácidos, tales como el péptido que se establece en la SEQ ID NO: 20 (d-LPPLPY).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido aislado que no tiene más de diez aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 (SEQ ID NO: 17),

- (i) en el que X_1 es prolina, o un análogo o derivado de la misma;
- 15 (ii) en el que X_2 es prolina, o un análogo o derivado de la misma;
- (iii) en el que X_3 se selecciona del grupo de alanina, valina, leucina, cisteína, isoleucina, metionina y un derivado o análogo de los mismos;
- (iv) en el que X_4 se selecciona del grupo que consiste en alanina, valina, serina y un derivado o análogo de las mismas;
- 20 (v) en el que X_5 es cualquier aminoácido;
- (vi) en el que X_6 es prolina o un análogo o derivado de la misma; y
- (vii) en el que el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso del bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón.

- 25 Preferiblemente, los aminoácidos se seleccionan de manera que el enlace peptídico entre X_1 y X_2 (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso 90 % del tiempo) está en configuración cis, es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración cis; y el enlace peptídico entre X_3 y X_4 (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso el 90 % del tiempo) está en la configuración trans, es decir, el

equilibrio se desplaza hacia una configuración trans; y el enlace peptídico entre X₅ y X₆ (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso el 90 % del tiempo) está en la configuración cis, es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración cis.

- 5 En una realización, el péptido de este aspecto del presente tiene una longitud de 6 aminoácidos.

Un ejemplo de dicho péptido es el que se establece en la SEQ ID NO: 18 (PPLAYP).

Los aminoácidos preferidos de origen no natural que pueden usarse para reemplazar la prolina incluyen, pero no se limitan a, N-metil prolina, alfa-metil prolina y ácido α -aminobutírico.

- 10 Los presentes inventores contemplan un aminoácido adicional unido al terminal N de X₁ de la SEQ ID NO: 17.

El aminoácido adicional se selecciona preferiblemente de modo que el enlace peptídico entre él y X₁ (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso 90 % del tiempo) está en la configuración cis, es decir,

- 15 el equilibrio se desplaza hacia una configuración cis.

Los aminoácidos candidatos incluyen, pero no se limitan a, alanina, valina, leucina, cisteína, isoleucina, metionina y un derivado o análogo de los mismos.

En una realización particular, el aminoácido adicional unido al terminal N de X₁ es leucina o un derivado o análogo de la misma.

- 20 En una realización adicional, el aminoácido adicional unido al terminal N de X₁ es un D-aminoácido.

Por tanto, los presentes inventores conciben péptidos que tienen 7 aminoácidos y que comprenden la fórmula como se establece en la SEQ ID NO: 17.

De acuerdo con una realización particular, X₄ es alanina o análogo o derivado de la misma.

- 25 De acuerdo con otra realización más, X₅ se selecciona del grupo que consiste en tirosina, fenilalanina, triptófano y un derivado o análogo de los mismos.

Un ejemplo de un aminoácido que se contempla para X₅ es la tirosina.

Un ejemplo de un aminoácido que se contempla para X₃ es la leucina.

El péptido de este aspecto de la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4 (LPPLAYP). Dicho péptido puede tener 7, 8, 9 o 10 aminoácidos.

5 El péptido de este aspecto de la presente invención puede consistir en una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4.

Para los péptidos de este aspecto de la presente invención, X_1 y/o X_3 y/o X_5 pueden ser D aminoácidos, tales como, por ejemplo, d-LPPLAYP (SEQ ID NO: 21).

10 Para cualquiera de los péptidos descritos en el presente documento, la presente invención también contempla péptidos retroinversos. Dichos péptidos son resistentes a las proteasas y constan de D-aminoácidos en orden inverso, lo que da como resultado una estructura principal peptídica alterada, pero orientación de cadenas laterales sin cambios.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona otro péptido aislado que tiene cinco aminoácidos que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 (SEQ ID NO: 5), en el que

15 (i) X_1 y X_3 son cualquier aminoácido;

(ii) X_2 es prolina o un análogo o derivado de la misma;

(iii) X_4 no es prolina;

(iv) el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso de bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón.

20 Preferiblemente, los aminoácidos se seleccionan de manera que el enlace peptídico entre X_1 - X_2 (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso el 90 % del tiempo) está en la configuración cis, es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración cis; y el enlace peptídico entre X_3 - X_4 (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso el 90 % del tiempo) está en la configuración trans, es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración trans.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un péptido aislado que tiene siete aminoácidos que consta de una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO: 6), en el que

30 (i) X_1 , X_5 y X_6 son cualquier aminoácido;

(ii) X₂, X₃ y X₇ es prolina o un análogo o derivado de la misma;

(iii) X₄ no es prolina; y

(iv) el péptido es capaz de reducir la cantidad de pérdida de peso de bazo y/o timo inducida por dexametasona en un ratón.

- 5 Preferiblemente, los aminoácidos se seleccionan de manera que el enlace peptídico entre X₁-X₂ (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso el 90 % del tiempo) está en la configuración cis, es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración cis; el enlace peptídico entre X₂-X₃ (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso el 90 % del tiempo) está en la configuración cis - es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración cis; el enlace peptídico entre X₆-X₇ (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso el 90 % del tiempo) está en la configuración cis - es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración cis; y el enlace peptídico entre X₄-X₅ (al menos el 50 % del tiempo, al menos el 60 % del tiempo, al menos el 70 % del tiempo, al menos el 80 % del tiempo o incluso el 90 % del tiempo) está en la configuración trans, es decir, el equilibrio se desplaza hacia una configuración trans.

Los péptidos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar una gran variedad de enfermedades, incluidas las asociadas con respuestas asociadas al estrés. Estos incluyen afecciones patológicas como enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, Accidente cerebrovascular, Parkinson y enfermedad de Alzheimer), infarto de miocardio, exposición a radiación o agentes quimioterapéuticos, inflamación, lesiones (por ejemplo, Quemaduras y lesiones del sistema nervioso central), envejecimiento celular, hipertermia, convulsiones, hipoxias (por ejemplo, isquemia y accidente cerebrovascular) y en tejidos y órganos trasplantados antes del trasplante.

Estas condiciones también incluyen enfermedades autoinmunitarias, caracterizadas por un estado de inmunización de un individuo contra al menos uno de los constituyentes normales del cuerpo. Estos fenómenos se observan en particular en patologías que incluyen, pero no se limitan a, infecciones asociadas con LES (enfermedad de lupus eritematoso sistémico), síndrome de Gougerot-Sjogren (o enfermedad de Sjogren) y poliartritis reumatoide, así como patologías como sarcoidosis y osteopenia, espondiloartritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), hipertiroidismo, enfermedad de Addison, anemia hemolítica autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, síndrome de Goodpasture, enfermedad de

Graves, tiroiditis de Hashimoto, hemorragia púrpura idiopática, diabetes insulínica, miastenia, pénfigo vulgar, glomerulonefritis postestreptocócica, psoriasis y esterilidad espontánea, así como fenómenos inmediatos o tardíos observados durante el rechazo del injerto y la enfermedad del injerto contra el huésped. En una realización particular, los péptidos de la invención son útiles para el tratamiento de la esclerosis múltiple. En otra realización, los péptidos de la invención son útiles para el tratamiento de isquemia o infarto de miocardio.

Otras enfermedades contempladas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, degeneración secundaria después de un trauma, accidente cerebrovascular, intoxicación del SNC, glaucoma, degeneración macular, diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, uveítis autoinmunitaria, injerto contra enfermedad del huésped, rechazo del injerto, artritis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), psoriasis, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad por radiación, hipertermia, hipoxia, hígado tóxico fulminante, insuficiencia renal, infertilidad y muchos otros.

El fenómeno de rechazo del injerto es un estado de inmunización de un individuo contra componentes extraños (fluidos corporales como sangre, líquido cefalorraquídeo, etc., células, tejidos, órganos, anticuerpos, etc.) implantados deliberadamente en el paciente.

Como se usa en este documento, los términos “trastorno degenerativo” “enfermedad degenerativa” y “condición degenerativa” están dirigidos a cualquier trastorno, enfermedad o afección caracterizada por una proliferación celular inapropiada o muerte celular inapropiada o en algunos casos, ambas, o apoptosis aberrante o desregulada. Estas afecciones también incluyen afecciones en las que, aunque son apropiadas y reguladas a nivel de una sola célula, la apoptosis excesiva se asocia con disfunción o insuficiencia de órganos.

En una realización, los péptidos son útiles para prevenir la muerte celular en células o tejidos no malignos en un sujeto que tiene un trastorno neoplásico y se somete a quimioterapia y/o radioterapia para el tratamiento del cáncer.

Los términos “enfermedad inflamatoria” y “enfermedad inflamatoria”, como se usa en este documento, significa cualquier enfermedad o afección en la que una respuesta inflamatoria excesiva o no regulada conduce a síntomas inflamatorios excesivos, daño del tejido del huésped o pérdida de la función del tejido.

En una realización, la enfermedad o afección inflamatoria es una enfermedad autoinmunitaria.

En otra realización, la enfermedad o afección inflamatoria tiene una etiología asociada con la producción de al menos una citocina proinflamatoria seleccionada entre IL-6 y TNF- α .

5 En otra realización, la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, degeneración secundaria después de un traumatismo, accidente cerebrovascular, intoxicación del SNC, glaucoma, degeneración macular, infarto de miocardio, enfermedad por radiación, hipertermia, hipoxia, hígado tóxico fulminante, insuficiencia renal e infertilidad.

En otra realización más, la enfermedad incluye retinosis pigmentaria y degeneración macular.

En otra realización, la enfermedad incluye apoplejía o infarto de miocardio.

10 Los péptidos se pueden proporcionar per se o como parte de una composición farmacéutica, donde se mezclan con portadores o excipientes adecuados.

Como se usa en el presente documento, una “composición farmacéutica” se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados.

15 El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En la presente, el término “ingrediente activo” se refiere a los péptidos responsables del efecto biológico.

20 En adelante, las frases “portador fisiológicamente aceptable” y “portador farmacéuticamente aceptable” que pueden usarse indistintamente se refieren a un portador o diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante bajo estas frases.

25 La preparación de composiciones farmacéuticas que contienen péptidos o polipéptidos como ingredientes activos es bien conocida en la técnica. Normalmente, tales composiciones se preparan como procesables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas, que se pueden suspender o solubilizar antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar. El ingrediente terapéutico activo se mezcla con portadores inorgánicos y/u orgánicos, que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los portadores son excipientes (vehículos)

30 farmacéuticamente aceptables que comprenden sustancias más o menos inertes cuando se añaden a una composición farmacéutica para conferir una consistencia o forma adecuada a la composición. Los portadores adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa,

glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes y agentes tamponadores del pH, que mejoran la eficacia del ingrediente activo.

- 5 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los péptidos descritos en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, p. por ejemplo, determinando la IC₅₀ (la concentración que proporciona un 50 % de inhibición) y la LD₅₀ (dosis letal que causa la muerte en el 50 % de los animales probados) para un compuesto sujeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para uso en humanos. La dosis puede variar dependiendo de la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada. El médico puede elegir la formulación, la vía de administración y la dosis exactas en función del estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl et al., 1975).

- 15 La cantidad de agente activo usada en una composición de administración de la presente invención es una cantidad eficaz para lograr el propósito del agente activo particular para la indicación objetivo. La cantidad de agente activo en las composiciones es típicamente una cantidad farmacológica, biológica, terapéutica o químicamente eficaz. Sin embargo, la cantidad puede ser menor que esa cantidad cuando la composición se usa en una forma de unidad de dosificación porque la forma de unidad de dosificación puede contener una pluralidad de compuestos o agentes activos en una sola composición o puede contener una cantidad farmacológica, biológica, terapéutica o químicamente eficaz dividida. La cantidad efectiva total puede administrarse luego en unidades acumulativas que contienen, en total, una cantidad efectiva del agente activo.

- 25 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención es una cantidad que cuando se administra a un paciente es capaz de ejercer una actividad anti-apoptótica y/o antiinflamatoria. Los ensayos para detectar la actividad antiapoptótica del péptido de la invención incluyen, pero no se limitan a, teñir el ADN con fluorocromos específicos tales como yoduro de propidio y bromuro de etidio, ensayos de Anexina V, ensayos TUNEL y similares; En los Ejemplos siguientes se presentan algunos ejemplos no limitativos de tales ensayos. Los ensayos para detectar la actividad antiinflamatoria de los péptidos también son bien conocidos en la técnica.

Aunque una dosis apropiada de un péptido de la invención varía dependiendo de la vía de administración, la edad, el peso corporal, el sexo o las condiciones del paciente, y al final debe

ser determinada por el médico, la dosis adecuada para humanos adultos generalmente puede estar entre aproximadamente 0,2-2000 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 2-200 mg/kg.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más compuestos de la presente invención y uno o más excipientes o diluyentes. En una realización, uno o más de los compuestos o solvatos o sales de estos compuestos.

10 El término “sal farmacéuticamente aceptable” como se usa en este documento, se refiere a sales que son sustancialmente no tóxicas para los organismos vivos. Las sales farmacéuticamente aceptables típicas incluyen aquellas sales preparadas por reacción de los compuestos de la presente invención con un ácido orgánico o mineral farmacéuticamente aceptable. Estas sales también se conocen como sales de adición de ácido.

15 Las composiciones que comprenden los compuestos y agentes activos tienen utilidad en el suministro de agentes activos a sistemas biológicos seleccionados y en una biodisponibilidad aumentada o mejorada del agente activo en comparación con la administración del agente activo sin el agente de suministro. La administración se puede mejorar administrando más agente activo durante un período de tiempo, o administrando agente activo en un período de tiempo particular (como para efectuar una administración más rápida o retrasada) o durante un período de tiempo (como una administración sostenida).

20 Por tanto, las composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

25 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar local o sistémicamente por cualquier vía convencional y apropiada que incluye, pero no se limita a, oral, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratecal, tópica, rectal, bucal, inhalatoria o intranasal.

30 Para inyección, los compuestos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados a la barrera a permear. Tales penetrantes, por ejemplo, DMSO o polietilenglicol, son generalmente conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas, que se pueden usar por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste rápido hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste rápido pueden contener los ingredientes activos mezclados con cargas como lactosa, aglutinantes como almidones, lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores.

En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

Alternativamente, los compuestos de la presente invención pueden incorporarse en preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, por ejemplo. Además, las formulaciones que contienen estos compuestos pueden presentarse como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, como agentes de suspensión, como jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, tales como lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), tales como aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y alcohol etílico; y conservantes, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.

Para la administración por inhalación, los péptidos para uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación en aerosol en forma de aerosol desde un paquete presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contengan una mezcla en polvo del péptido y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también son útiles para aplicación tópica e intralesional. Como se usa en este documento, el término “tópico” significa “perteneciente a un área de superficie particular”, por ejemplo, piel y mucosas, y el agente tópico aplicado a un

- 5 área determinada de la superficie afectará solo el área en la que se aplica. Las formulaciones de péptidos/análogos de péptidos pueden administrarse tópicamente como gel, pomada, crema, emulsión, formulación de liberación sostenida que incluye un parche transdérmico, y pueden comprender liposomas y cualquier otro portador farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración del fármaco por vía tópica. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden comprender portadores o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de tales portadores o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato cálcico, fosfato cálcico, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.
- 10 Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, una hoja de metal o plástico, como un blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. El paquete o
- 15 dispensador también puede ser acomodado por un aviso asociado con el contenedor en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones, o administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser un etiquetado aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. Para
- 20 medicamentos recetados o un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un portador farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se indicó anteriormente.

Como se usa en este documento, el término “aproximadamente” se refiere a $\pm 10\%$.

- 25 Los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye, pero no se limita a”.

El término “compuesto por” significa “incluido y limitado a”.

- 30 El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicados.

Como se usa aquí, la forma singular “un”, “una” y “el” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluidas sus mezclas.

5 A lo largo de esta solicitud, se pueden presentar varias realizaciones de esta invención en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. De acuerdo con lo anterior, se debe considerar que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un
10 rango como de 1 a 6 tiene subrangos específicamente descritos como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

Siempre que se indique aquí un rango numérico, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccionario o integral) dentro del rango indicado. Las frases “rango/rangos entre” un
15 primer número de indicación y un segundo número de indicación y “rango/rangos de” un primer número de indicación “a” un segundo número de indicación se usan aquí indistintamente y están destinadas a incluir el primer y segundo número indicado y todos los numerales fraccionarios e integrales entre ellos.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea determinada, incluidos, entre otros, aquellos modos, medios, técnicas y procedimientos que se conocen o se desarrollan fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos de los profesionales de las artes química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

25 Como se usa en este documento, el término “tratar” incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

30 Se aprecia que ciertas características de la invención, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuadas en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el

contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención, como se delineó anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de forma no limitativa.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Estas técnicas se explican a fondo en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1 a 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se establece en la patente de EE.UU. No. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); Los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al.,

“Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan como referencia como si se establecieran completamente en este documento. Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se considera que los procedimientos de la misma son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para conveniencia del lector. Toda la información contenida en el mismo se incorpora aquí como referencia.

Ejemplo 1

La dexametasona es un medicamento corticosteroide que induce la apoptosis de las células inmunitarias y los tejidos linfomieloides. Se utilizaron ratones BALB/c para examinar la capacidad de los péptidos candidatos para rescatar células de linfocitos de la apoptosis. A los ratones se les inyectó IP 100 µg de dexametasona. Los ratones tratados con dexametasona recibieron inmediatamente después y 24 horas después del tratamiento con dexametasona una inyección intravenosa de péptidos candidatos (250 o 400 µg de péptido/ratón). Los ratones se sacrificaron 48 horas después del primer tratamiento. Se pesaron el bazo y el timo y se realizó el recuento celular completo de ambos órganos.

Los péptidos utilizados en la selección fueron los siguientes:

PPLPY - SEQ ID NO: 3

LPPLAYP - SEQ ID NO: 4

PLPYP - SEQ ID NO: 9

20 PPL - SEQ ID NO: 10

PLP - SEQ ID NO: 11

PYP - SEQ ID NO: 12

LPGLPYP - SEQ ID NO: 13

LPPLGYP - SEQ ID NO: 14

25 LAPLPYP - SEQ ID NO: 15

LPALPYP - SEQ ID NO: 16

Resultados:

La dexametasona indujo la pérdida de peso del bazo y el timo y la reducción del recuento de células del bazo de aproximadamente un 50 %. El recuento de células del timo se redujo en casi un 80 % en comparación con los ratones normales. Dos de los péptidos tuvieron un efecto significativo en la reducción de la pérdida de peso del bazo y del timo, así como en la reducción de la pérdida del recuento celular - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 (ver Figura 1). No hubo diferencia entre las 2 dosis de tratamiento (250 o 400 µg/ratón).

Ejemplo 2

Se utilizaron ratones BALB/c para examinar la capacidad de los péptidos candidatos para rescatar células de linfocitos de la apoptosis. A los ratones se les inyectó IP 100 µg de dexametasona. Los ratones tratados con dexametasona recibieron inmediatamente después y 24 horas después del tratamiento con dexametasona una inyección intravenosa de péptidos candidatos (200 µg de péptido/ratón). Los ratones se sacrificaron 48 horas después del primer tratamiento. Se pesaron el bazo y el timo y se realizó el recuento celular completo de ambos órganos.

Los péptidos utilizados en la selección fueron los siguientes:

LPPLPYP - SEQ ID NO: 2 (control)

PPLAYP - SEQ ID NO: 18

LPPLPY- SEQ ID NO: 7

LPPLAYP - SEQ ID NO: 4

PPLPY - SEQ ID NO: 3

PPLPY-NH₂ - SEQ ID NO: 19

Resultados

Los resultados se proporcionan en la Figura 2. Cada uno de los péptidos probados mostró una mejora con respecto al péptido de control (SEQ ID NO: 2).

Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. De acuerdo con lo anterior, se pretende abarcar todas estas alternativas, modificaciones y variaciones que caen dentro del espíritu y el amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan aquí en su totalidad como referencia en la memoria descriptiva, en la misma medida que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente para incorporarse aquí como referencia. Además, la cita o
5 identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que se utilicen títulos de sección, no se deben interpretar como necesariamente limitativos.

Además, el documento de prioridad de esta solicitud se incorpora aquí como referencia en su
10 totalidad.