

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 470**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61P 15/06 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99944181 .9**
96 Fecha de presentación: **15.09.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1114151**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2001**

54 Título: **ANTAGONISTAS DE UN RECEPTOR ACOPLADO A LA PROTEINA G.**

30 Prioridad:
17.09.1998 US 154627

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
**HOPITAL SAINTE-JUSTINE
3175 COTE SAINTE-CATHERINE
MONTREAL, QUEBEC H3T 1C5, CA**

72 Inventor/es:
**CHEMTOB, Sylvain y
PERI, Krishna, G.**

74 Agente: **Curell Aguila, Marcelino**

ES 2 369 470 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

Antagonistas de un receptor acoplado a la proteína G.

5 **Antecedentes de la invención**(a) Campo de la invención

10 La invención se refiere al desarrollo de un antagonista de un receptor acoplado a la proteína G, que se une al receptor acoplado a la proteína G desde el lado extracelular, de una forma distinta a la del ligando natural.

(b) Descripción de la técnica anterior

15 Las prostaglandinas provienen de la oxigenación del ácido araquidónico mediante las prostaglandina sintetasas. Las prostaglandinas median una amplia variedad de acciones fisiológicas tales como vasomotricidad, ciclo sueño/vigilia, secreción intestinal, lipólisis, filtración glomerular, desgranulación de los mastocitos, neurotransmisión, agregación plaquetaria, luteólisis, contracción del miometrio y parto, inflamación y artritis, conducto arterial persistente, crecimiento y diferenciación celular (Coleman, R.A. *et al.*, 1994, *Pharmacol. Rev.* 46:205-229; Goetzl, E.J. *et al.*, 1995, *FASEB J.* 9: 1051-10585). Los prostanoides median sus acciones a través de la unión a distintos receptores, que pertenecen a la superfamilia de la rodopsina, como siete receptores helicoidales transmembranosos. Estos receptores se unen a las proteínas G heterotriméricas que comprenden subunidades α , β y γ que, después de su activación, provocan alteraciones en el calcio celular, inician la hidrólisis fosfoinosítida o la promoción o la represión de la síntesis del monofosfato cíclico de adenosina (Strader C.D. *et al.*, 1994, *Ann. Rev. Biochem.* 63:101-132).

25 De los cinco receptores prostanoides farmacológicamente distintos para PGE_2 , PGI_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$ y TxA_2 y sus muchas isoformas, el receptor para $PGF_{2\alpha}$, también denominado receptor FP, muestra una limitada distribución tisular, que se expresa predominantemente en los corpora lutea, miometrio uterino, red trabecular ocular, y, en menor medida, en el músculo liso vascular. La iniciación del parto es marcada por el gran aumento en los niveles de $PGF_{2\alpha}$ y el aumento de la contractibilidad uterina. La utilización muy extendida de los análogos de $PGF_{2\alpha}$ para inducir el parto en la industria veterinaria apunta al papel principal de $PGF_{2\alpha}$ y de su receptor en el parto. Esto es subrayado por el hecho de que los ratones a los que les falta el receptor FP no experimentan el parto (Sugimoto *et al.*, 1997, *Science* 277:81-83). En vista del aumento de los costes producido como resultado de los nacimientos prematuros y de las complicaciones asociadas para el neonato, tales como hemorragia intraventricular, displasia broncopulmonar y leucomalacia periventricular, que conducen a la parálisis cerebral, la prolongación de la gestación deteniendo el parto prematuro constituye una terapia preventiva efectiva. El éxito relativo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos como terapia a corto plazo para la prevención del parto prematuro, se basa en sus acciones inhibitorias sobre la síntesis de prostaglandinas, particularmente PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$. Sin embargo, la inhibición de PGE_2 se asocia a complicaciones graves en el feto, tales como el cierre del conducto arterial, fallo renal e hipertensión pulmonar.

40 A otro nivel, a la $PGF_{2\alpha}$ se le ha atribuido un papel importante en la dismenorrea, una situación que afecta a un 5-7% de las mujeres premenopáusicas. En la patogénesis de esta alteración, subyace un aumento premenstrual en los niveles de $PGF_{2\alpha}$, lo que produce espasmos miometriales. La falta de antagonistas efectivos del receptor FP durante la terapia prolongada, ha impedido avances en la prevención del parto prematuro y en las secuelas asociadas, constituyendo el objeto de la presente solicitud el diseño de dichos antagonistas.

45 El receptor humano FP es una glicoproteína integral de membrana de 45 kDa, formado por 359 aminoácidos y que sólo comparte una identidad secuencial del 47% con el receptor EP_1 , y, en menor grado, con otros receptores prostanoides (Abramovitz *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269:2632-2636). La unión de $PGF_{2\alpha}$ al receptor FP, es seguida por la activación del complejo $G_{\alpha\beta\gamma}$, el aumento de la unión de GTP por la subunidad G_{α} , la estimulación de la actividad de la fosfolipasa $C\beta$, la liberación de inositol fosfatos, el aumento del calcio intracelular y el fenómeno subsiguiente de transducción señalética, que conduce finalmente a la contracción de los músculos lisos (Coleman, R.A. *et al.*, 1994, *Pharmacol. Rev.* 46:205-229). El receptor FP es la única diana eficaz para el desarrollo de medicamentos terapéuticos, ya que algunas proteínas G_{α} catalizan las acciones de cientos de receptores unidos a proteínas G, por lo que las dianas por debajo del receptor se utilizan esencialmente poco.

55 Los antagonistas de los receptores FP dirigidos al sitio de unión del ligando, podrían utilizarse de forma limitada, ya que los inhibidores basados en el ligando muestran reactividad cruzada con otros receptores prostanoides. Su eficacia se verá comprometida en vista del gran aumento en las concentraciones de $PGF_{2\alpha}$ en el miometrio al comienzo del parto y en la menstruación. La intensa actividad basal de los receptores en ausencia del ligando, limita la utilización de inhibidores basados en el ligando.

Sería muy deseable proporcionar un antagonista de los receptores FP, que no exhibiera reacción cruzada con otros receptores prostanoides y que fuera efectivo incluso en presencia de ligandos en exceso.

65 Otras técnicas anteriores importantes incluyen (1) el documento WO 95/00551; (2) el documento WO 96/23225; (3) el documento WO 93/09104, (4) la patente US nº 5.688.938; (5) Kitanaka J *et al.*, *J. Neurochem.*, febrero 1993;

60(2): 704-8, PMID: 809348; (6) Sugimoto Y *et al.*, Science, 1 agosto 1997; 277(5326); 681-3, PMID: 9235889; y (7) Griffin BW *et al.*, J Pharmacol Exp Ther., septiembre 1999; 290 (3): 1278-84, PMID: 10454504.

Sumario de la invención

5 Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un antagonista de los receptores FP, que no presente reacciones de cruzamiento con otros receptores prostanoideos.

10 Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar inhibidores de los receptores FP mediante una nueva estrategia para hacer diana en los dominios extracelulares de la proteína receptora.

15 Según la presente invención, se proporciona un antagonista del receptor FP prostaglandínico, que comprende una secuencia aminoácida del receptor FP prostaglandínico seleccionada de entre el grupo constituido por: ilghrdyk (PCP-8; SEC ID n°:1); wedrfyll (PCP-10; SEC ID n°:2); YQDRFYLL (PCP-14; SEC ID n°:3); ILGHRDYK (PCP-13; SEC ID n°: 13); ILAHRDYK (PCP-13.7; SEC ID n°:4); ILaHRDYK (PCP13.8; SEC ID n°:14); ILGFRDYK (PCP-13.11; SEC ID n°:5); ILGHKDYK (PCP-13.13; SEC ID n°:6); ILGHRNYK (PCP-13.14; SEC ID n°:7); ILGHQDYK (PCP-13.18; SEC ID n°:8); ILGHRDY-amida (PCP-13.20; SEC ID n°:9); ILGHRDYK-amida (PCP-13.21; SEC ID n°:15); ILGWRDYK (PCP-13.22; SEC ID n°:10); SNVLSIF (PCP-15; SEC ID n°:12) y ILGXRDYK (PCP-13.24; SEC ID n°:11), en las que X es ciclohexil alanina, indicando las letras minúsculas L-aminoácidos y las mayúsculas, D-aminoácidos.

20 Asimismo, según la presente invención, se proporciona un péptido que posee actividad antagonista del receptor FP prostaglandínico, estando formado dicho péptido por una secuencia variante de SEC ID n°:1, o SEC ID n°:2, en la que uno o dos residuos de aminoácidos están sustituidos o eliminados, donde dicha secuencia variante contiene L- y/o D-aminoácidos, y donde el grupo C-terminal de dicho péptido es un grupo CO₂H o un grupo CONH₂.

25 Según la presente invención, se proporciona asimismo el antagonista del receptor FP prostaglandínico o el péptido de la presente invención, para utilizarlos en la prevención de la aparición prematura de un feto.

30 Preferentemente, el antagonista o el péptido utilizados se unen específicamente a la cara extracelular del receptor, impidiendo, por lo tanto, las contracciones uterinas.

35 Asimismo, según la presente invención, se proporciona un antagonista del receptor FP prostaglandínico o el péptido de la presente invención, para utilizarlos en la prevención y/o tratamiento de la dismenorrea.

Preferentemente, el antagonista o el péptido que se utilizan se unen específicamente a la cara extracelular del receptor, para impedir la transducción de una señal, reduciendo, por tanto, el dolor asociado con las contracciones.

40 Asimismo, según la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, por lo menos, un antagonista del receptor FP prostaglandínico, o, por lo menos, un péptido según la presente invención, asociado con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 Asimismo, según la presente invención, se proporciona un procedimiento para identificar un compuesto como un antagonista del receptor FP prostaglandínico o como el péptido según la presente invención, que puede unirse a los elementos extracelulares de dicho receptor, que comprende las etapas que consisten en:

- a) el cultivo de células que expresen dicho receptor o la identificación de tejidos animales *ex vivo* en los que de dicho receptor dependen consecuencias fisiológicas;
- 50 b) la puesta en contacto de dichas células o tejidos con dicho compuesto a una concentración de entre 10⁻¹⁰ y 10⁻³ M, para ser examinados con respecto a la actividad antagonista en dicho receptor; y
- c) la medición de una respuesta que altere la transducción de una señal que dé lugar a consecuencias fisiológicas que se seleccionan de entre aumentos en el calcio celular, hidrólisis fosfoinosítida, el crecimiento y/o la diferenciación celular, la alteración de la expresión génica, y la contracción o relajamiento del músculo liso, donde dicha respuesta indica actividad antagonista.

60 Asimismo, según la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar la actividad del antagonista o del péptido de la presente invención, como un antagonista del receptor FP prostaglandínico que puede unirse a los elementos extracelulares de dicho receptor, que comprende las etapas que consisten en:

- a) el cultivo de células que expresen dicho receptor o la identificación de tejidos animales *ex vivo* en los que de dicho receptor dependen consecuencias fisiológicas;
- 65 b) la puesta en contacto de dichas células o tejidos con dicho antagonista o péptido a una concentración de entre 10⁻¹⁰ y 10⁻³ M, para ser examinados con respecto a la actividad antagonista en dicho receptor; y

c) la medición de una respuesta que altere la transducción de una señal que dé lugar a consecuencias fisiológicas que se seleccionan de entre aumentos en el calcio celular, hidrólisis fosfoinosítida, el crecimiento y/o la diferenciación celular, la alteración de la expresión génica, y la contracción o relajamiento del músculo liso.

5 Asimismo, según la presente invención se proporciona la utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista del receptor FP prostaglandínico o del péptido de la presente invención, para la preparación de un medicamento con el fin de prevenir el parto prematuro.

10 Asimismo, según la presente invención, se proporciona la utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista del receptor FP prostaglandínico o del péptido de la presente invención, para la preparación de un medicamento con el fin de prevenir y/o tratar la dismenorrea.

15 En el contexto de la presente invención, a continuación, se definen los términos siguientes:

La expresión "un antagonista del receptor acoplado a la proteína G", hace referencia a cualquier compuesto natural o sintético, péptido, proteína, anticuerpo, moléculas peptidomiméticas o moléculas químicas pequeñas, de manera no limitativa, hasta el punto de que puede unirse específicamente a los elementos estructurales extracelulares del receptor unido a la proteína G, para alterar la transducción de una señal. Más preferentemente, el antagonista no muestra reacción cruzada con otros receptores prostanoideos.

20 La expresión "derivados funcionales" del antagonista del receptor unido a la proteína G, hace referencia a los compuestos miméticos y/o compuestos no relacionados estructuralmente con respecto al antagonista del receptor acoplado a la proteína G, que pueden unirse también específicamente a elementos estructurales extracelulares del receptor unido a la proteína G, para alterar la transducción de una señal.

25 La expresión "peptidomimético suyo" hace referencia a cualquier entidad química, compuestos miméticos y/o compuestos no relacionados estructuralmente con respecto al antagonista del receptor unido a la proteína G, que pueden unirse también específicamente a los elementos estructurales extracelulares del receptor acoplado a la proteína G, para alterar la transducción de una señal.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1 representa los efectos inhibitorios de PCP-8 y PCP-10 sobre la función del receptor FP después de la estimulación con $\text{PGF}_{2\alpha}$, según la forma de realización de la presente invención.

la figura 2A representa los efectos de PCP-8 y PCP-10 sobre el diámetro de los microvasos retinianos del cerdo, después de la estimulación con $\text{PGF}_{2\alpha}$ o con tromboxano A_2 mimético, U46619;

40 la figura 2B representa la respuesta a la dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre el diámetro de los microvasos del cerdo tratados previamente con PCP-8 o PCP-10;

45 la figura 2C representa los efectos del tromboxano A_2 mimético, U46619, sobre el diámetro de los microvasos del cerdo tratado previamente con PCP-8 y PCP-10;

la figura 3A representa los efectos de PCP-10 sobre las contracciones espontáneas del músculo liso uterino;

50 la figura 3B representa la respuesta a la dosis de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ en presencia/ausencia de PCP-8 y PCP-10, sobre la contracción del músculo liso uterino; y

la figura 4 representa la inversión del tono basal del miometrio bovino incluso en presencia del ligando del receptor FP, $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Descripción detallada de la invención

55 Según la presente invención, se proporciona un nuevo tipo de antagonistas de receptores acoplados a la proteína G, que se unen a la superficie molecular extracelular, impidiendo, por lo tanto, la transducción señalética.

60 Asimismo, se proporciona una nueva estrategia para hacer diana en las ramificaciones extracelulares del receptor, que contribuyen a la integridad funcional o estructural de éste. Los antagonistas se unen, por tanto, a elementos consanguíneos en la superficie extracelular del receptor, bloqueando la función de éste, e interfiriendo con la iniciación de su señal o con la transducción.

65 La selectividad de los antagonistas con respecto al receptor FP, se demuestra mostrando la ausencia de sus efectos sobre un receptor prostanoide relacionado para el tromboxano A_2 que se conoce como receptor TP, implicado asimismo en la contracción del músculo liso.

Preparación de los inhibidores

Síntesis química de PCP-8 y PCP-10:

5 La totalidad de los péptidos que presenten 8 aminoácidos de largo, como PCP-8 y PCP-10, se sintetizaron utilizando la química F-moc y el procedimiento Merrifield en fase sólida, cuyos péptidos se purificaron mediante HPLC, ensayando su pureza mediante espectroscopía de masas.

10 Según la presente invención, se utilizó una nueva estrategia para utilizar péptidos derivados de los dominios extracelulares del receptor $F_{2\alpha}$ prostaglandínico, FP, para inhibir la transducción señalética y las consecuencias funcionales del receptor FP. Este procedimiento podría generalizarse a todos los receptores acoplados a la proteína G. Se encontró que los péptidos derivados de la primera y segunda ramificaciones extracelulares del receptor FP, eran efectivos para inhibir al receptor FP.

15 La presente invención podrá entenderse fácilmente haciendo referencia a los ejemplos siguientes, proporcionados a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo I

20 Efectos de los péptidos PCP-8 y PCP-10 sobre la hidrólisis fosfoinosítida ligando-inducida en las células de mamíferos que sobreexpresan el receptor FP.

25 Tanto PCP-8 como PCP-10 se examinaron en las células HEK293 que expresan el receptor FP humano. Con este propósito, las células HEK293 que expresaban de forma estable el receptor FP humano, se sembraron en placas de 12 pocillos, en medio DMEM que contenía suero fetal bovino al 10%, penicilina (10 U/ml), y estreptomycin (10 µg/ml), cultivándose en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5% a 37°C. Después de que los pocillos alcanzaran una confluencia del 80%, las células se marcaron por la noche con 2 µCi/ml de [³H]-*inositol*. Al día siguiente, las células se lavaron una vez con PBS, y se incubaron en 0,5 ml de tampón de Krebs que contenía 10 mM de LiCl y que indicaba concentraciones de péptidos PCP durante 30 minutos. Se añadió PGF_{2α} a 1 µM a las células y se llevó a cabo la incubación durante otros 30 minutos. Las células se solubilizaron con 0,1 N NaOH durante 10 minutos, y se neutralizaron con 0,1 N de ácido fórmico. Los lisados se recuperaron y 1 ml de metanol y de cloroformo se añadieron secuencialmente, sometiéndose brevemente a un movimiento en remolino. Después de centrifugación para separar las fases, los fosfatos de inositol se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico, tal como se describe seguidamente (Berridge, M.J. *et al.*, 1983, *Biochem, J*, 212: 473-482).

35 Brevemente, se descargó el medio y la síntesis de IP₃ se detuvo añadiendo 0,6 ml de metanol enfriado en hielo. Las células se rasparon y se recuperaron en tubos de ensayo de polipropileno. Se añadieron agua destilada (0,5 ml) y cloroformo (0,6 ml), sometiéndose vigorosamente a un movimiento en remolino durante 2 minutos. Se separaron las fases mediante centrifugación a 6.000 x g durante 10 minutos. La fase acuosa se aplicó a columnas de intercambio aniónico AG-1X-8™ (en forma de Formato) (volumen del lecho, 1 ml), eluyéndose inositol libre con 10 ml de agua, seguido por 60 mM de formato amónico en ácido fórmico 0,1 M. Se eluyeron a continuación los fosfatos de inositol con 5 ml de formato amónico 1,2 M en ácido fórmico 0,1 M. Después de añadir 3 volúmenes de un cóctel de centelleo (Optiphase HiSafe III), se llevó a cabo el conteo de los eluidos mediante espectrofotometría de centelleo.

45 Los resultados de estos experimentos son representados en la figura 1. Los datos se expresan como estimulación un cierto número de veces de la síntesis del fosfato de inositol mediante 1 µM de PGF_{2α}, comparada con los controles no estimulados. Tanto PCP-8 como PCP-10 a 100 µM, inhibieron de forma potente la síntesis del fosfato de inositol iniciada por la acción de PGF_{2α} sobre el receptor FP. Las concentraciones inhibitorias máximas medias para PCP-8 y PCP-10 fueron ligeramente menores que 100 µM.

Ejemplo II

55 Ensayo de los péptidos PCP en el modelo de espacio ocular porcino del ensayo de vasomotricidad *ex vivo*

60 Con el fin de apreciar si los péptidos podrían inhibir la función de FP utilizando un modelo *ex vivo*, se seleccionó el modelo de espacio ocular porcino, un ensayo *ex vivo* de la constricción vascular de las retinas porcinas, que se describieron y validaron previamente (Li *et al.*, 1996, *J. Pharmacol. Expt. Therapeut.* 278: 370-377; Li *et al.*, 1997 *Am. J. Physiol.* 273: R1283-90; Abran *et al.*, 1997 *Am. J. Physiol.* 272: R995-1001). Ya que las densidades del receptor FP en la vascularización del neonato son mínimas debido a la regulación a la baja por los altos niveles de prostaglandinas circulantes en el período perinatal, los cerdos recién nacidos se trataron con un bloqueante de la prostaglandina sintetasa, el ibuprofeno (30 mg/kg de peso corporal/8 h durante 24 horas), para aumentar la densidad de los receptores, así como sus efectos vasomotores. Inhibiendo las prostaglandinas circulantes, se pudo mostrar una potente inhibición de la síntesis del segundo mensajero mediada por el receptor FP, así como la constricción vascular mediada por FP en este modo de espacio ocular.

5 Para preparar el espacio ocular, se llevó a cabo una incisión circular de 3-4 mm por detrás de la *ora serrata* para eliminar el segmento interior y el cuerpo vítreo con una mínima manipulación de la retina. Los espacios oculares restantes se fijaron con alfileres a una base de cera, en un baño tisular de 20 ml, que contenía 20 ml del tampón de Krebs (pH 7,35-7,45), inhibidores de la proteasa, leupetina y aprotinina (10 µg/ml cada una), y que se equilibró con oxígeno al 21% y dióxido de carbono al 5%, a 37°C. Se dejó que las preparaciones se estabilizaran durante 30 minutos. Se añadieron los péptidos a 100 µM y se continuó la incubación durante 30 minutos, antes de añadir PGF_{2α}.

10 Las respuestas-concentración acumulativas de PGF_{2α} y las curvas del TxA₂, mimético U46619, (10⁻¹⁰ a 10⁻⁵ M) se construyeron separadamente. Para verificar la reversibilidad de los antagonistas, los espacios oculares se lavaron completamente (lo que arrastró al péptido) con medio de incubación y determinando las curvas de concentración-respuesta para PGF_{2α}. Se grabó el diámetro externo del vaso con una videocámara montada sobre un microscopio de disección (Zeiss M400TM), cuantificándose las respuestas mediante un analizador digital de la imagen (Sigma Scan Software, Jandel Scientific, Corte Madera, CA). El diámetro vascular se grabó 10 minutos antes y 10 minutos después de la aplicación tópica del agente. Cada medición se repitió tres veces y mostró una variabilidad < al 1%.

15 Los resultados son representados en la figura 2. El péptido PCP-10 no tuvo efecto sobre el tono basal (diámetro del microvaso) del vaso (figura 2A; recuadros a la izquierda). La adición de 1 µM de PGF_{2α} constriñó de forma potente el vaso en ausencia del péptido (recuadro superior medio), mientras que la presencia de PCP-10 a 100 µM inhibió notablemente la vasoconstricción mediada por PGF_{2α} (recuadro inferior medio).

20 El péptido no ejerció efecto sobre la vasoconstricción realizada por 1 µM del mimético TxA₂, U46619, (recuadros a la derecha), actuando sobre otro receptor prostanoide relacionado con la constricción, principalmente el receptor TP. Se obtuvieron resultados similares también para PCP-8. En la figura 2B se presenta una respuesta a la dosis de PGF_{2α} sobre el diámetro vascular, en presencia/ausencia de los péptidos PCP-8 y PCP-10. Ambos péptidos anularon las respuestas vasomotoras incluso a concentraciones de PFG_{2α} que excedían 1 µM, que sugerían, tal como se esperaba, que los péptidos pueden actuar de una forma no competitiva. Sin embargo, los péptidos no ejercieron efecto sobre la vasoconstricción producida por el tromboxano A₂ (figura 2C).

25 De modo similar, un péptido derivado de la primera ramificación extracelular del receptor FP, PCP-15, inhibió la constricción inducida por PGF_{2α} (10⁻⁷M) (88,1% sobre el control no tratado; Tabla 1).

Ejemplo III

35 Ensayo de variantes peptídicas de PCP-8 en el modelo de espacio ocular porcino de un ensayo *ex vivo* de vasomotricidad

40 Para entender los requerimientos estructurales de PCP-8 en su acción inhibitoria sobre la vasoconstricción inducida por PGF_{2α}, en la secuencia de PCP-8 se reemplazaron diversos aminoácidos con otros aminoácidos D- o L-, sintetizándose químicamente los péptidos resultantes y ensayándolos en el modelo del espacio ocular porcino del ensayo *ex vivo* de vasomotricidad. Estas variantes peptídicas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

45 Secuencias aminoácidas de las variantes peptídicas de PCP-8 y su potencia inhibitoria en el modelo de espacio ocular porcino de un ensayo *ex vivo* de vasomotricidad

Péptido PCP	% de respuesta vasomotora (de máxima constricción) ¹	% de inhibición de la máxima respuesta ²	Secuencia peptídica	SEC ID n°:
8	50,0	50,0	ilghrdyk	1
10	20,0	80,0	wedrfyll	2
14	36,0	64,0	YQDRFYLL	3
13	20,0	80,0	ILGHRDYK	13
13,7	23,8	76,2	ILAHRDYK	4
13,8	46,8	53,2	ILaHRDYK	14
13,11	13,0	87,0	ILGFRDYK	5
13,13	36,9	63,1	ILGNKDYK	6
13,14	40,3	59,7	ILGHRNYK	7
13,18	30,0	70,0	ILGHQDYK	8
13,20	49,6	50,4	ILGHRDY-amida	9
13,21	46,2	53,8	ILGHRDYK-amida	15
13,22	16,6	83,4	ILGWRDYK	10
13,24	6,2	93,8	ILGXRDYK	11
15	11,9	88,1	SNVLSIF	12

¹⁾ El porcentaje de la respuesta vasomotora en presencia de 100 μM del péptido, se calcula como un cambio porcentual en el diámetro vascular promedio producido por 10^{-7} M $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el espacio ocular en presencia del péptido, comparado con la constricción máxima observada en ausencia del péptido.

5 ²⁾ La inhibición porcentual producida por cada péptido se calcula como $(100 - \text{respuesta vasomotora por ciento})$.

Las letras minúsculas indican L-aminoácidos y las letras mayúsculas indican D-aminoácidos. I=isoleucina; L=leucina; G=glicina; H=histidina; R=arginina; D= ácido aspártico; Y=tirosina; K=lisina; A=alanina; W= triptófano; E= ácido glutámico; F=fenilalanina; Q=glutamina; N=asparagina; P=prolina; S=serina; X= ciclohexil alanina. Los péptidos se disolvieron en DMSO recién preparado, justo antes del experimento como unas existencias de 10 mM y se añadieron a los espacios oculares 30 minutos antes de la adición de 10^{-7} M $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Se sintetizaron un total de 25 variantes de PCP-8 y en la Tabla 1 se presentan los péptidos potentes o eficaces. Estos péptidos incorporan cambios de L- a D- aminoácidos, deleciones, variaciones sutiles en aromaticidad, estatus de donador de enlaces de hidrógeno, opuesto a las interacciones iónicas y a la hidrofobicidad. Estos péptidos se examinaron a unas concentraciones de 100 μM en el ensayo de vasomotricidad retinal porcina, presentándose los resultados en la Tabla 1, de la forma siguiente:

1. La conversión de todos los L-aminoácidos de PCP-8 a los D-aminoácidos (PCP-13), aumentó en gran medida la potencia inhibitoria. La eliminación de la secuencia dipéptida hidrofóbica N-terminal de PCP-8 (PCP-11) o de PCP-10 (PCP-12), dio lugar a una reducción significativa en la acción inhibitoria de los péptidos.

2. El cambio de glicina a alanina (13.7) no altera la actividad de PCP-13, mientras que el cambio a prolina (13.16), L-alanina (13.8), o la deleción del residuo (13.17) dio lugar completamente a la pérdida de la actividad. La Glicina constituye un importante residuo de enlace que separa el motivo HRD de la secuencia hidrofóbica IL.

3. El motivo HRD es importante para la actividad de PCP-13. Las sustituciones de la alanina (13.1-13.3) o el cambio a la configuración L- (13.4-13.6) dio lugar a la pérdida de la actividad inhibitoria de PCP-13. La aromaticidad de His es más importante que la carga positiva, ya que el cambio de H a F (13.11) o W (13.22) o X (13.24), pero no a Y (13.23), no dio lugar a una reducción significativa de la potencia inhibitoria del péptido. La longitud de la cadena lateral parece ser más crítica en caso del residuo D que de R; el cambio de D a E (13.12) dio lugar a la pérdida de la mitad de la actividad inhibitoria, mientras que el cambio de R a K (13.13) o a Q (13.18), afectó moderadamente la actividad de PCP-13. El cambio de D a N (13.14) dio lugar a una pérdida moderada de actividad, mientras que una sustitución de serina (13.19) condujo a una drástica pérdida de la actividad de PCP-13.

4. La deleción de la lisina terminal (13.15) o la sustitución con W (13.9), dio lugar a una pérdida completa de la actividad; sin embargo, la conversión del carboxilato terminal a una amida (13.20 & 13.21), dio lugar a una ganancia moderada de actividad en el péptido inhibitor. La sustitución del residuo aromático Y, con E (13.10) abolió completamente la potencia inhibitoria de PCP-13.

De este modo, la estructura de PCP-13 en la configuración D, parece estar formada por un anclaje hidrofóbico N-terminal separado espacialmente del motivo HRD central por un residuo de glicina, dando lugar a su vez, posiblemente, a una conformación del péptido activo; Las interacciones aromáticas e hidrofóbicas del extremo carboxilo pueden también añadirse a la potencia de PCP-13.

Ejemplo IV

Ensayo de los péptidos PCP en tiras de tejido uterino porcino del ensayo *ex vivo* de contracción basal

En experimentos *ex vivo* que utilizaban tiras de tejido uterino porcino, los péptidos pudieron prevenir tanto la contracción basal como la inducida por $\text{PGF}_{2\alpha}$.

De un matadero local se obtuvieron tejidos uterinos de cerdas adultas que no estaban preñadas, y se transportaron, conservándolos en hielo, al laboratorio. Las tiras de tejido del miometrio uterino de aproximadamente 1 cm de longitud, se dispusieron en baños para órganos que contenían tampón de Krebs equilibrado con oxígeno al 21% a 37°C, tal como hemos descrito (Potvin, W. *et al.*, 1990, *Br. J. Pharmacol.* 100:341-347; Varma, D.R. y Chemtob, S., 1993, *J. Pharmacol. Expt. Ther.* 265:1096-1104). Se registraron las contracciones mediante transductores de fuerza en un polígrafo Grass. Se incubaron las tiras con o sin 100 μM de péptidos durante 30 minutos, antes de añadir $\text{PGF}_{2\alpha}$ en incrementos escalonados (10^{-9} a 10^{-6} M). Los datos se expresaron como aumento, sobre el nivel basal, del porcentaje de la tensión promedio (g).

En la figura 3A, se muestra un gráfico de las contracciones uterinas espontáneas (que es conocido que dependen de los prostanoides, principalmente $\text{PGF}_{2\alpha}$), en ausencia y presencia de 100 μM PCP-8. La adición del péptido a las tiras del tejido redujo la fuerza de la contracción basal. En la figura 3B, se muestra una respuesta a la dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la contractibilidad uterina en presencia o ausencia de los péptidos PCP-8 y PCP-10. En todas las

concentraciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que se examinaron, se observó una reducción en las concentraciones uterinas de más del 60% (PCP-8) y del 80% (PCP-10). De este modo, estos dos péptidos redujeron tanto las contracciones espontáneas, como las inducidas por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en las tiras del tejido uterino.

5 Ejemplo V

Ensayo de los péptidos PCP en tiras de tejido uterino bovino del ensayo *ex vivo* basal de contracción

De un matadero local, se obtuvieron tejidos uterinos de animales bovinos adultos que no estaban preñados, y se transportaron, conservándolos en hielo, al laboratorio. Las tiras de tejido del miometrio uterino de aproximadamente 1 cm de longitud, se dispusieron en baños para órganos que contenían tampón de Krebs equilibrado con oxígeno al 21% a 37°C, tal como se ha descrito anteriormente. Se registraron las contracciones en un polígrafo Grass mediante transductores de fuerza. Se incubaron las tiras con o sin 100 μM de péptidos, antes de añadir $\text{PGF}_{2\alpha}$ en incrementos escalonados (10^{-8} a 10^{-6} M). Los datos se expresaron como cambio en el nivel basal, de la tensión promedio (g). Los resultados se muestran en la figura 4. La aplicación del péptido PCP-10 a 100 μM invirtió el tono basal (estado de contracción) del músculo uterino. La adición de $\text{PGF}_{2\alpha}$ hasta 10 μM no afectó a la relajación producida por PCP-10, sugiriendo que los efectos de los péptidos PCP son independientes del ligando, lo que también se mostró en los resultados previos.

Aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a su forma de realización específica, debe apreciarse que pueden introducirse modificaciones adicionales, y la presente solicitud está concebida para comprender cualesquier variaciones, usos o adaptaciones de la invención, siguiendo, en general, los principios de la invención, e incluyendo dichas desviaciones de la presente exposición como evidentes en la práctica habitualmente conocida dentro de la técnica a la que la invención pertenece y que puedan aplicarse a las características esenciales mencionadas anteriormente en la presente memoria, sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> HÔPITAL SAINTE-JUSTINE
CHEMTOB, Sylvain
PERI, Krishna G.

<120> ANTAGONISTAS DE UN RECEPTOR ACOPLADO A LA PROTEÍNA G

<130> 12667-16PCT FC/ld

<150> US 09/154.627
<151> 1998-09-17

<160> 12

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Péptidos del receptor FP

<400> 1
Ile Leu Gly His Arg Asp Tyr Lys
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Péptidos del receptor FP

<400> 2
Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Leu Leu
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT

<213> Péptidos del receptor FP
 <400> 3
 Tyr Gln Asp Arg Phe Tyr Leu Leu
 5 1 5
 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Péptidos del receptor FP
 <400> 4
 Ile Leu Ala His Arg Asp Tyr Lys
 15 1 5
 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Péptidos del receptor FP
 <400> 5
 Ile Leu Gly Phe Arg Asp Tyr Lys
 1 5
 25 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptidos del receptor FP
 30 <400> 6
 Ile Leu Gly His Lys Asp Tyr Lys
 1 5
 35 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptidos del receptor FP
 <400> 7
 40 Ile Leu Gly His Arg Asn Tyr Lys
 1 5
 <210> 8
 <211> 8
 45 <212> PRT
 <213> Péptidos del receptor FP
 <400> 8
 50 Ile Leu Gly His Gln Asp Tyr Lys
 1 5
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 55 <213> Péptidos del receptor FP
 <400> 9
 60 Ile Leu Gly His Arg Asp Tyr
 1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Péptidos del receptor FP
5
<400> 10
Ile Leu Gly Trp Arg Asp Tyr Lys
1 5

10 <210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Péptidos del receptor FP

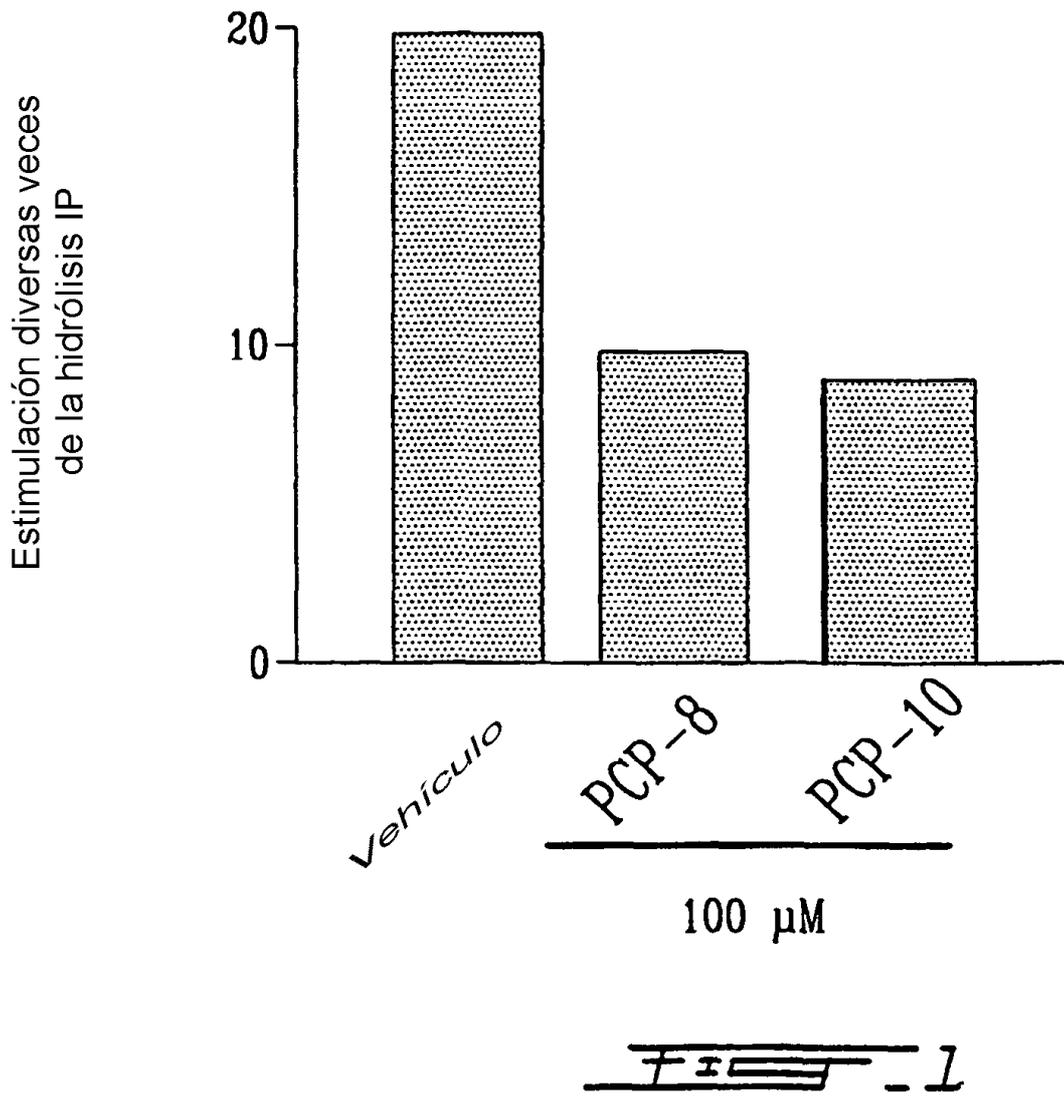
15 <400> 11
Ile Leu Gly Xaa Arg Asp Tyr Lys
1 5

20 <210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Péptidos del receptor FP

25 <400> 12
Ser Asn Val Leu Cys Ser Ile Phe
1 5

REIVINDICACIONES

1. Antagonista del receptor FP prostaglandínico, que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor FP prostaglandínico seleccionado de entre el grupo constituido por: ilghrdyk (PCP-8; SEC ID n°:1); wedrfyll (PCP-10; SEC ID n°:2); YQDRFYLL (PCP-14; SEC ID n°:3); ILGHRDYK (PCP-13; SEC ID n°:13); ILAHRDYK (PCP-13.7; SEC ID n°:4); ILaHRDYK (PCP-13.8; SEC ID n°:14); ILGFRDYK (PCP-13.11; SEC ID n°:5); ILGHKDYK (PCP-13.13; SEC ID n°:6); ILGHRNYK (PCP-13.14; SEC ID n°:7); ILGHQDYK (PCP-13.18; SEC ID n°:8); ILGHRDY-amida (PCP-13.20; SEC ID n°:9); ILGHRDYK-amida (PCP-13.21; SEC ID n°:15); ILGWRDYK (PCP-13.22; SEC ID n°:10); SNVLCSIF (PCP-15; SEC ID n°:12) y ILGXRDYK (PCP-13.24; SEC ID n°:11), en el que X es la ciclohexil alanina, en el que las letras minúsculas indican L-aminoácidos y las letras mayúsculas D-aminoácidos.
2. Péptido que presenta actividad antagonista del receptor FP prostaglandínico, estando dicho péptido constituido por una secuencia variante de SEC ID n°:1, o SEC ID n°:2, en la que uno o dos residuos de aminoácidos están sustituidos o eliminados, en el que dicha secuencia variante contiene L- y/o D-aminoácidos, y en el que el grupo C-terminal de dicho péptido es un grupo CO₂H o un grupo CONH₂.
3. Antagonista del receptor FP prostaglandínico según la reivindicación 1 o péptido según la reivindicación 2, para su utilización en la prevención de un parto prematuro del feto.
4. Antagonista del receptor FP prostaglandínico según la reivindicación 1 o péptido según la reivindicación 2, para su utilización en la prevención y/o en el tratamiento de la dismenorrea.
5. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un antagonista del receptor FP prostaglandínico según la reivindicación 1 o por lo menos un péptido según la reivindicación 2, en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. Procedimiento para identificar un compuesto como un antagonista del receptor FP prostaglandínico según la reivindicación 1 o el péptido según la reivindicación 2 que puede unirse a los elementos extracelulares de dicho receptor, que comprende las etapas que consisten en:
- cultivar las células que expresan dicho receptor o identificar los tejidos animales *ex vivo* en los que las consecuencias fisiológicas dependen de dicho receptor;
 - poner en contacto dichos células o tejidos con dicho compuesto a una concentración de 10⁻¹⁰ a 10⁻³ M, para ser examinados con respecto a la actividad antagonista en dicho receptor; y
 - medir una respuesta para alterar la transducción de una señal que dé lugar a las consecuencias fisiológicas seleccionadas de entre el grupo constituido por aumentos en el calcio celular, hidrólisis de fosfoinosítida, crecimiento y/o diferenciación celular, expresión génica alterada, y contracción o dilatación del músculo liso, en el que dicha respuesta indica una actividad antagonista.
7. Procedimiento para determinar la actividad del antagonista según la reivindicación 1 o del péptido según la reivindicación 2 como un antagonista del receptor FP prostaglandínico que puede unirse a los elementos extracelulares de dicho receptor, que comprende las etapas que consisten en:
- cultivar las células que expresen dicho receptor o identificar los tejidos animales *ex vivo* en los que las consecuencias fisiológicas dependen de dicho receptor;
 - poner en contacto dichos células o tejidos con dicho antagonista o péptido a una concentración de 10⁻¹⁰ a 10⁻³ M, para ser examinados con respecto a la actividad antagonista en dicho receptor; y
 - medir una respuesta para alterar la transducción de una señal que dé lugar a las consecuencias fisiológicas seleccionadas de entre el grupo constituido por aumentos en el calcio celular, hidrólisis fosfoinosítida, crecimiento y/o diferenciación celular, expresión génica alterada, y contracción o dilatación del músculo liso.
8. Utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista del receptor FP prostaglandínico según la reivindicación 1 o del péptido según la reivindicación 2, para la preparación de un medicamento para la prevención del parto prematuro del feto.
9. Utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista del receptor FP prostaglandínico según la reivindicación 1 o del péptido según la reivindicación 2, para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la dismenorrea.



U46619



PGF_{2α}



Basal



Salina

PCP-10

Figure - 2B

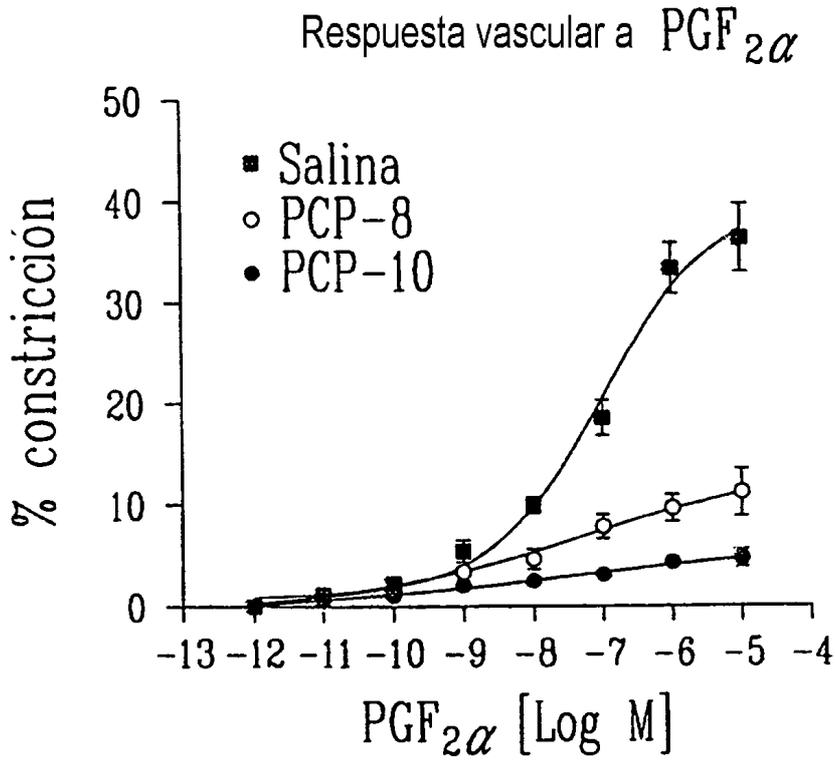


Fig. 2b

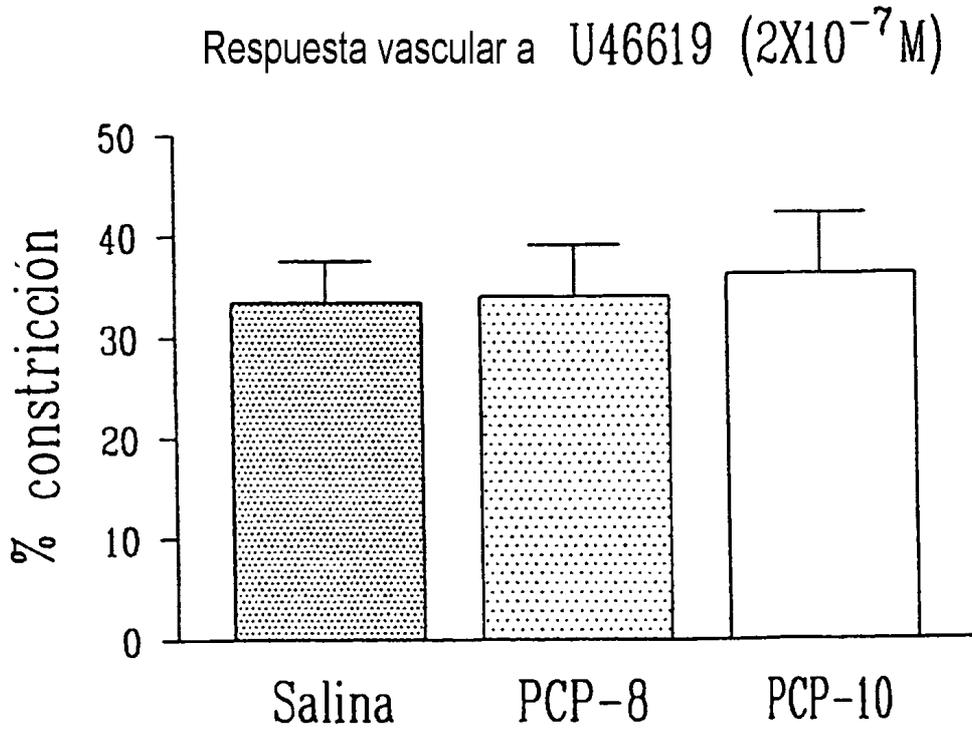


Fig. 2c

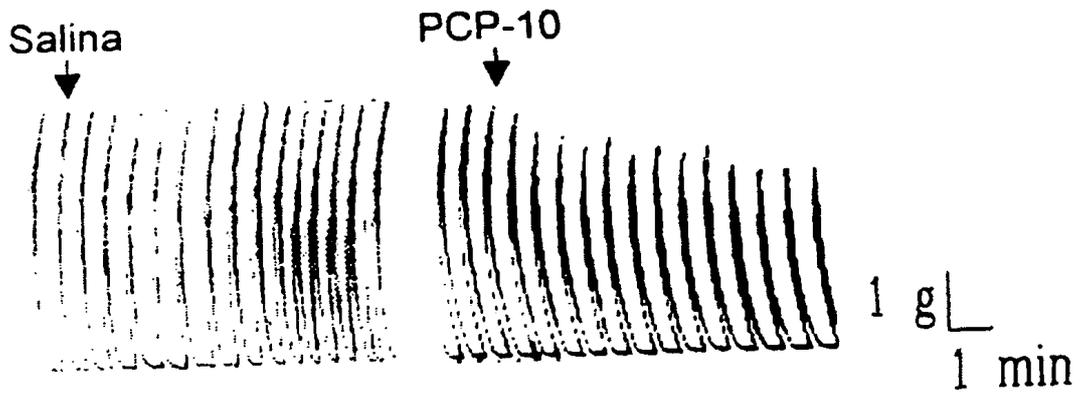


Fig. 3a

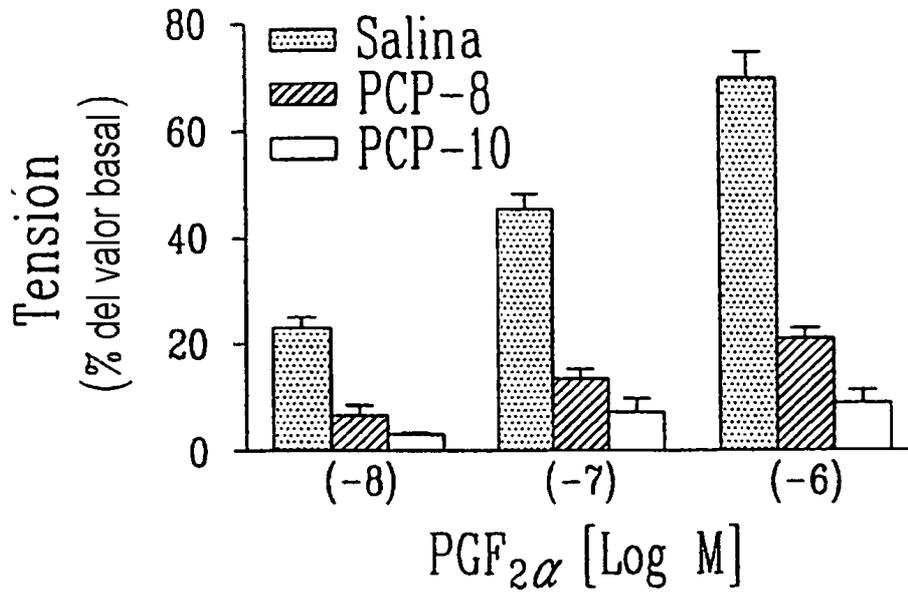


Fig. 3b

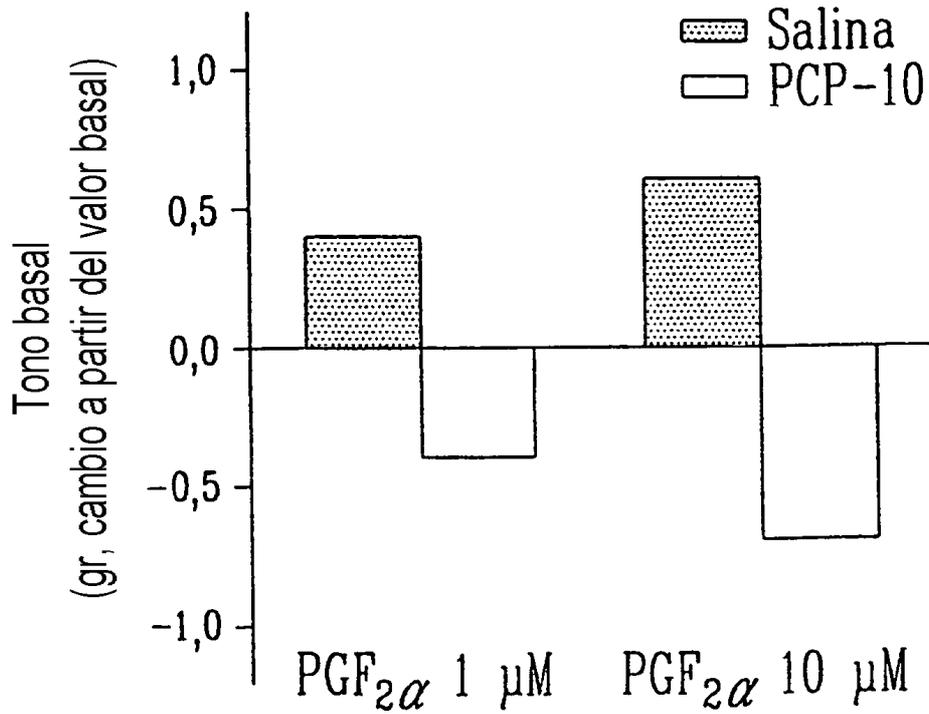


Fig. 4