

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 462**

51 Int. Cl.:

C07K 7/00 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03735223 .4**

96 Fecha de presentación: **11.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1511764**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2005**

54

Título: **Péptido útil para inhibir la actividad del receptor de prosta-glandina F2 α**

30

Prioridad:

11.06.2002 US 387424 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

21.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

21.12.2012

73

Titular/es:

**THERATECHNOLOGIES INC. (50.0%)
2310 BOULEVARD ALFRED NOBEL
SAINT-LAURENT, QUEBEC H4S 2A4, CA y
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL (50.0%)**

72

Inventor/es:

PERI, KRISHNA, G.;
POLYAK, FELIX;
LUBELL, WILLIAM;
THOUIN, ERYK y
CHEMTOB, SYLVAIN

74

Agente/Representante:

PERAL CERDÁ, David

ES 2 393 462 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

PÉPTIDO ÚTIL PARA INHIBIR LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE PROSTAGLANDINA F_{2α}

5

Campo de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a un péptido inhibidor del receptor de prostaglandina F_{2α} (FP). Además, la invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen dicho inhibidor del receptor FP para su uso en métodos de tratamiento de parto prematuro y dismenorrea.

10

Antecedentes

Las prostaglandinas se derivan de la oxigenación de ácido araquidónico por prostaglandina sintasas. Las prostaglandinas median una amplia variedad de acciones fisiológicas, tales como vasomotricidad, ciclo sueño-vigilia, secreción intestinal, lipólisis, filtración glomerular, desgranulación de mastocitos, neurotransmisión, agregación plaquetaria, luteólisis, contracción miometrial y parto, inflamación y artritis, conducto arterioso persistente, diferenciación y crecimiento celular (Coleman, R.A., Smith, W.L. y Narumiya, S. 1994. Pharmacol. Rev. 46: 205-229; Gotztl, E.J., An, S. y Smith, W.L. 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 receptores de siete hélices transmembrana similares a rodopsina. Estos receptores se acoplan a proteínas G heterotriméricas compuestas por subunidades α, β y γ que, tras la activación, provocan alteraciones en el calcio celular, inician la hidrólisis de fosfoinosítidos o la promoción o represión de la síntesis de adenosina monofosfato cíclico (Strader C. D. *et al.*, 1994 Ann. Rev. Biochem. 63: 101-132).

15
20
25

De los cinco receptores prostanoides farmacológicamente distintos para PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2α} y TxA₂ y sus muchas isoformas, el receptor para PGE_{2α}, también denominado receptor FP, muestra una distribución tisular limitada, se expresa de manera predominante en cuerpos lúteos, miometrio uterino, malla trabecular del ojo y en menor medida en músculo liso vascular. La iniciación del parto está marcada por un gran aumento en los niveles de PGF_{2α} y un aumento en la

30

contractilidad uterina. El uso extendido de análogos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para inducir el parto en la industria veterinaria señala el papel principal de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y su receptor en parto. Esto se ve subrayado por el hecho de que los ratones que carecen del receptor FP no experimentan el parto (Sugimoto *et al.*, Science, 277: 81-83, 1997).

5 Frente a los costes crecientes acarreados como resultado de nacimientos prematuros y complicaciones asociadas al neonato, tales como hemorragia intraventricular, displasia broncopulmonar y leucomalacia periventricular que conducen a parálisis cerebral, la prolongación de la gestación deteniendo el parto prematuro es una terapia preventiva eficaz. El éxito relativo de fármacos antiinflamatorios no

10 esteroideos como terapia a corto plazo hacia la prevención del parto prematuro se basa en sus acciones inhibitoras tras la síntesis de prostaglandinas, particularmente PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$. Sin embargo, la inhibición de la primera está asociada con graves complicaciones para el feto tales como el cierre del conducto arterioso, insuficiencia renal e hipertensión pulmonar. Por tanto, hay una necesidad terapéutica

15 de hallar antagonistas del receptor FP para tratar el parto prematuro.

A otro nivel, se ha atribuido a $\text{PGF}_{2\alpha}$ un papel fundamental en la dismenorrea, un estado que afecta al 5%-7% de las mujeres premenopáusicas. Un aumento premenstrual en los niveles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que da como resultado espasmos miométriales

20 subyace en la patogenia de este trastorno. La falta de antagonistas del receptor FP eficaces para la terapia prolongada dificultó los avances en la prevención del parto prematuro y las secuelas asociadas, y la provisión de tales antagonistas es el objeto de esta solicitud.

25 El receptor FP humano es una glicoproteína de membrana integral de 45 kDa, que consiste en 359 aminoácidos y comparte sólo el 47% de identidad de secuencia con el receptor EP_1 , y en menor medida con otros receptores prostanoideos (Abramovitz *et al.* 1994. J. Biol. Chem. 269: 2632-2636). La unión de $\text{PGF}_{2\alpha}$ al receptor FP está seguida por la activación del complejo $\text{G}_{\alpha\beta\gamma}$, el aumento de la

30 unión a GTP por la subunidad G_α , la estimulación de la actividad fosfolipasa $\text{C}\beta$, la liberación de inositol fosfatos, el aumento del calcio intracelular y los fenómenos de transducción de señales posteriores que conducen en última instancia a la contracción del músculo liso (Coleman, R.A. *et al.* 1994. Pharmacol. Rev. 46: 205-

229). Puesto que el ligando natural, $\text{PGF}_{2\alpha}$ y los compuestos basados en ligandos tienen reactividad cruzada con otros receptores prostanoideos y hasta la fecha, no se han dado a conocer antagonistas del receptor FP selectivos y eficaces, es de relevancia terapéutica inmediata en el parto pretérmino y la dismenorrea proporcionar antagonistas de FP, tal como se realiza en esta presente invención.

La modificación del ligando natural del receptor FP, $\text{PGF}_{2\alpha}$, produjo agonistas potentes y selectivos del receptor, sin embargo no se dieron a conocer antagonistas selectivos y potentes por estos enfoques. Se ha mostrado que dos compuestos, floretina (Kitanaka J *et al* 1993 J Neurochem 60: 704-708) y AL8810 (Griffin BW *et al* 1999. J. Pharmacol. Exp. Ther. 290 (3): 1278-1284) tienen actividad antagonista frente al receptor FP. La floretina, que también mostró que tiene efectos antagonistas sobre el transporte de glucosa (Lefevre PG 1961. Pharmacol Rev 13: 39-70) es un antagonista débil del receptor FP (CI_{50} de 20 μM) y no selectivo con respecto a PGE_2 . Se muestra que AL8810, un derivado de 11-fluoro-15(2-indanilo) de $\text{PGF}_{2\alpha}$, es un agonista parcial débil del receptor FP, aunque se encuentra que antagoniza selectivamente el receptor FP en presencia de un fluprostenol, un agonista completo del receptor FP (Griffin BW *et al* 1999. J. Pharmacol. Exp. Ther. 290 (3): 1278-1284).

20

El documento WO 00/017348 describe un agonista o antagonista de receptores de proteínas G que se une específicamente a los elementos estructurales extracelulares de yuxtamembrana del receptor acoplado a proteínas G de una manera diferente a la del ligando natural, agonista o antagonista que altera la transducción de una señal intracelular.

25

Por tanto, hay una necesidad de proporcionar antagonistas altamente selectivos y potentes frente al receptor FP con vistas a desarrollar formulaciones terapéuticas para detener el parto prematuro y la dismenorrea. De la manera más importante, las realizaciones de la presente invención contienen inhibidores del receptor FP, y la demostración de la acción inhibidora de dichos péptidos sobre la actividad biológica del receptor FP. Las realizaciones a modo de ejemplo incluyen la utilidad de los inhibidores peptídicos para reducir la intensidad de la contracción uterina,

30

siendo dicha contracción un mecanismo central implicado en la iniciación y progresión del parto así como el dolor menstrual.

Sumario de la invención

- 5 La invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia ilgh(cit)dyk (SEQ ID NO: 32).

Esta invención también incluye sales farmacéuticamente aceptables, imidas, ésteres y amidas biohidrolizables de las mismas.

10

En una realización preferida, el péptido inhibe sustancialmente el receptor FP.

En una realización preferida, el receptor FP procede de un mamífero.

- 15 En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

En una realización preferida, se mide la inhibición del receptor FP según la contracción microvascular de retina porcina frente a prostaglandina $F_{2\alpha}$, siendo la inhibición al menos el 50% de la producida por el ligando en ausencia del péptido.

20

En una realización preferida, el péptido tiene una inhibición del receptor FP medida según la contracción microvascular de retina porcina frente a prostaglandina $F_{2\alpha}$, siendo la inhibición al menos el 50% de la producida por el ligando en ausencia del péptido.

25

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de SEQ ID NO 32, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.

- 30 En una realización preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido es de 0,1-100 mg/kg de peso corporal.

En una realización preferida, el péptido se usa solo o en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, para inhibir el receptor FP.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se usa para la preparación de un medicamento para detener el parto pretérmino.

- 5 En una realización preferida, la composición farmacéutica se usa para la preparación de un medicamento para el tratamiento de dismenorrea.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación gráfica de la respuesta a la dosis de THG113 sobre la contracción microvascular de retina porcina. La figura 1A representa la inhibición dependiente de la dosis de la contracción producida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ mediante THG113. La figura 1B representa la determinación de la CI_{50} de THG113 en este ensayo.

15 La figura 2 representa la caracterización bioquímica de THG113. La figura 2A representa la unión específica de $[^{125}\text{I}]$ -THG113 a células que expresan el receptor hFP. La figura 2B representa el desplazamiento de $[^3\text{H}]$ - $\text{PGF}_{2\alpha}$ unido por $\text{PGF}_{2\alpha}$ o THG113 en el ensayo de células FP/293 completas. La figura 2C representa el desplazamiento de $[^{125}\text{I}]$ -THG113 unido por THG113 en el ensayo de células FP/293 completas. La figura 2D representa la hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células FP/293. La figura 2E representa la hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células FP/293 en respuesta a dosis incrementales de THG113 en presencia de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 1 μM . La figura 2F es un histograma de los efectos de THG113 sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos inducida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células FP/293.

La figura 3 representa el efecto de THG113 sobre la contractilidad de tiras de útero de ratón inmediatamente tras el alumbramiento. La figura 3A es un polígrafo que graba las respuestas contráctiles. Las flechas señalan el tiempo de adición de THG113 o $\text{PGF}_{2\alpha}$. Las figuras 3B Y 3C muestran un histograma de cambios temporales en la tensión basal (parte superior) e inducida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM).

Las figuras 4A y 4B representan el efecto tocolítico de THG113 en un modelo de ratón de parto pretérmino relacionado con infección.

La figura 5 muestra las curvas de dosis-respuesta de la contractilidad microvascular, la figura 5A frente a $\text{PGF}_{2\alpha}$ en presencia/ausencia de THG113 y sus derivados (10 μM) en un ensayo con copa ocular porcina. Todos los compuestos inhibieron las respuestas inducidas por $\text{PGF}_{2\alpha}$ incluso a altas concentraciones del agonista. La figura 5B, la respuesta inhibitoria de dosis crecientes de THG113 y sus derivados en la contractilidad ocular porcina inducida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ 1 μM .

10

Las figuras 6A-F muestran el efecto de THG113.31 sobre las propiedades contráctiles (duración y tensión media de la contracción) de tiras de útero obtenidas de ratonas que recientemente dieron a luz en respuesta a $\text{PGF}_{2\alpha}$ 1 μM en el ensayo de baño de órganos.

15

La figura 7 muestra el efecto tocolítico de THG113.31 en un modelo de endotoxina de parto pretérmino de ratón. La figura 7A muestra el tiempo medio (h) de alumbramiento tras la administración de LPS. La figura 7B muestra el porcentaje de animales que dieron a luz a las 15, 24, 48 y 72 h tras la administración de LPS.

20

Descripción detallada de la invención

Con vistas a proporcionar antagonistas específicos del receptor FP, se realizó una selección de bibliotecas de D-péptidos cortos en ensayos *ex vivo* de contracción microvascular. Basándose en esta selección, se seleccionó un péptido, THG 113 (SEQ ID NO.1, tabla 4). Con el fin de identificar un análogo más potente de THG113, se realizaron diferentes sustituciones de aminoácidos y se determinaron los efectos biológicos de estas sustituciones en ensayos de contractilidad microvascular. A partir de estos experimentos, se identificaron varios análogos potentes de THG113.

30

La invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia ilgh(cit)dyk (SEQ ID NO 32).

Esta invención también incluye sales farmacéuticamente aceptables, imidas, ésteres y amidas biohidrolizables de las mismas.

En una realización preferida, el péptido inhibe sustancialmente el receptor FP.

5

En una realización preferida, el receptor FP procede de un mamífero.

En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

10 En una realización preferida, se mide la inhibición del receptor FP según la contracción microvascular de retina porcina frente a prostaglandina $F_{2\alpha}$, siendo la inhibición al menos el 50% de la producida por el ligando en ausencia del inhibidor.

15 En una realización preferida, el péptido tiene una inhibición del receptor FP medida según la contracción microvascular de retina porcina frente a prostaglandina $F_{2\alpha}$, siendo la inhibición al menos el 50% de la producida por el ligando en ausencia del inhibidor.

20 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de SEQ ID NO 32, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido es de 0,1-100 mg/kg de peso corporal.

25

En una realización preferida, el péptido se usa solo o en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, para inhibir el receptor FP.

30 En una realización preferida, la composición farmacéutica se usa para la preparación de un medicamento para detener el parto pretérmino.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se usa para la preparación de un medicamento para el tratamiento de dismenorrea.

Cualquier unión amida en el péptido puede reemplazarse por un resto cetometileno, hidroxietilo, etilamida/amida reducida, tioamida o restos de amida invertida, por ejemplo (-C=O)-CH₂-), (-CHOH)-CH₂-), (CH₂-CH₂-), (-C=S)-NH-) o (-NH-(-C=O) para (-C=O)-NH-).

5

La presente invención se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan para ilustrar la invención más que para limitar su alcance.

- 10 Los siguientes ejemplos ilustran la potencia y eficacia farmacológica del antagonismo de THG113 sobre el receptor FP y sus respuestas bioquímicas y fisiológicas.

15 Respuesta a la dosis de THG113 sobre la contracción microvascular de retina porcina (sólo para referencia)

- Con el fin de observar si THG113 podría inhibir la función del receptor FP en un sistema *ex vivo*, se eligió el modelo de copa ocular porcina, un ensayo *ex vivo* de constricción vascular en retinas porcinas que se describió y validó previamente (Li *et al.* 1996 J Pharmacol Exp Ther. 278(1):370-7). Puesto que las densidades del receptor FP en la vasculatura de recién nacidos son mínimas debido a la regulación por disminución mediante altos niveles de prostaglandinas circulantes en el periodo perinatal, se trataron los cerdos recién nacidos con un bloqueante de prostaglandina sintasa, ibuprofeno (30 mg/kg de peso corporal/8 h durante 24 h) para aumentar la densidad de los receptores así como sus efectos vasomotores.
- 25 Al inhibir las prostaglandinas circulantes, se ha podido mostrar la potente inhibición de la síntesis de segundos mensajeros mediada por el receptor FP así como la constricción vascular mediada por FP en este modelo de copa ocular.

- 30 Para preparar las copas oculares, se realizó una incisión circular a 3-4 mm de manera posterior a la ora serrata para retirar el segmento interior y el cuerpo vítreo con mínima manipulación de la retina. Se fijó la copa ocular restante con pasadores a una base de cera en un baño de tejido de 20 ml que contenía 20 ml de tampón de Krebs (pH 7,35-7,45) y se equilibró con el 21% de oxígeno y el 5% de dióxido de carbono a 37°C. Se permitió que se estabilizaran las preparaciones du-

rante 30 min. Se añadieron péptidos a 100 μM y se continuó con la incubación durante 20 min. antes de la adición de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Se construyeron las curvas de concentración-respuesta acumulativas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o los antagonistas (de 10^{-10} a 10^{-5} M). Para evaluar la reversibilidad de los antagonistas, se lavaron meticulosamente las copas oculares (lo que eliminaría por lavado el péptido) con medio de incubación y se determinaron las curvas de concentración-respuesta response para $\text{PGF}_{2\alpha}$. Se registró el diámetro del vaso exterior con una videocámara montada sobre un microscopio de disección (Zeiss M 400) y se cuantificaron las respuestas mediante un analizador de imágenes digitales (Sigma Scan Software, Jandel Scientific, Corte Madera, CA). Se registró el diámetro vascular antes y 5 min. después de la aplicación tópica del agonista. Se repitió cada medición tres veces y mostró una variabilidad $<1\%$.

Tal como se muestra en la figura 1, hubo una inhibición dependiente de la dosis de la contracción producida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ (0,1 μM , concentración fisiológica) mediante THG113, y a THG113 100 μM ni siquiera niveles suprafisiológicos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produjeron una respuesta contráctil (figura 1A). La CI_{50} calculada de THG113 en este ensayo es de 340 nM (figura 1B).

Se evaluó la selectividad de THG113 frente al receptor FP midiendo las respuestas contráctiles microvasculares frente a varios receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (entre paréntesis) para $\text{PGF}_{2\alpha}$ (FP), PGE_2 (EP_1), TxA_2 (TP), fenilefrina (alfa-1-adrenérgico), endotelina (ET_A), angiotensina II (AT_1) y acetilcolina (subtipos no caracterizados) en presencia de THG113 0,1 mM; se usó BHQ para mostrar que las dinámicas de Ca^{2+} intracelular permanecían inalteradas mediante THG113 (tabla 3). A una concentración 0,1 μM de los agonistas, la inhibición de THG113 era selectiva sólo para el receptor FP.

30

Tabla 3**Selectividad de la inhibición de THG113 frente al receptor FP**

Agonista	% de inhibición	
	10^{-6} M	10^{-7} M

PGF _{2α} (FP)	90,4	85
17-fenil-trinor-PGE2 (EP ₁)	16,7	<1
U46619 (TP)	<1	
C-PAF	<1	<1
Fenilefrina (α ₁ -AR)	<1	
Urotensina	<1	
Endotelina (ET _A)	<1	
Angiotensina II	<1	
Acetilcolina	<1	
BHQ (inhibidor Ca ²⁺ -ATPasa de SR)	<1	

Caracterización bioquímica de THG113 (sólo para referencia)

- La caracterización bioquímica de THG113 se muestra en la figura 2. Se produjo [¹²⁵I]-THG113 marcando el residuo de tirosina con [¹²⁵I] usando el método de la lactoperoxidasa (Thorell *et al.* 1971 Biochim. Biophys. Acta 28, 251(3): 363-369).
- 5 Se incubaron células HEK293 que expresaban de manera ectópica el receptor FP humano clonado, FP/293, (10⁵) con [¹²⁵I]-THG113 (10⁶ cpm) durante 1 h; se separaron los ligandos unidos y no unidos mediante filtración sobre filtros de fibra de vidrio. Se contó la radioactividad sobre los filtros mediante espectrofotometría de centelleo. Para un método detallado de la unión y el desplazamiento de ligandos,
- 10 véase Li *et al.* (1996). Se observó una unión muy poco específica de [¹²⁵I]-THG113 a células HEK293 parentales y una unión 27 veces más específica a células FP/293 (figura 2A), lo que sugiere que THG113 se une específicamente a la proteína FP humana. Usando células FP/293 clonadas en ensayos de unión (véase
- 15 Li *et al.* para un método de ensayo de desplazamiento de ligandos), se investigó la unión específica de THG113 a la proteína FP. Se desplazó completamente la unión de [³H]PGF_{2α} por PGF_{2α} frío (figura 2B), pero se detectó un escaso desplazamiento de [³H]PGF_{2α} por THG113 (figura 2C).
- 20 Se marcaron las células FP/293 con [³H]-mioinositol durante 24 h y se estimularon con PGF_{2α} (figura 2D) o THG113 (figura 2E) en presencia de PGF_{2α} 100 nM durante 30 min. Se recogieron los fosfoinosítidos mediante cromatografía de intercambio aniónico con formiato de amonio 1 M/ácido fórmico 0,1 N. Se obtuvo una

respuesta a la dosis sigmoidea de la hidrólisis IP frente a $\text{PGF}_{2\alpha}$ con una CE_{50} de 20 nM (D). THG113 inhibió de manera dependiente de la dosis la hidrólisis de fosfoinosítidos estimulada por $\text{PGF}_{2\alpha}$ (E y F).

5 Efecto de THG113 sobre la contractilidad de tiras de útero de ratón inmediatamente tras el alumbramiento (sólo para referencia)

Se disecaron tiras de miometrio (1 cm) de ratonas preñadas inmediatamente tras el alumbramiento (cuando el útero está todavía no quiescente) y se suspendieron en baños de órganos que contenían 10 ml de tampón de KREB burbujeado con el
10 90% de oxígeno. Se registraron las respuestas contráctiles usando transductores de presión conectados a un polígrafo Gould. Las flechas señalan el tiempo de adición de THG113 o $\text{PGF}_{2\alpha}$. Tal como se muestra en el panel de la izquierda, se disminuyeron tanto las respuestas espontáneas así como las contráctiles inducidas por $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM) en el plazo de 20 min. tras la adición de THG113 100 μM .
15 El panel de la derecha muestra los cambios temporales en la tensión basal (parte superior) e inducida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM).

Efecto tocolítico de THG113 en un modelo de ratón de parto pretérmino relacionado con infección (compuestos 1-31 sólo para referencia)

20 Se adquirieron ratonas CD-1 preñadas de manera programada (la gestación media era de 19,2 días) y en el día 17, se implantaron quirúrgicamente bombas Alzet que contenían THG113 en solución salina en el lomo de los animales. Estas bombas administran de manera continua el inhibidor a 1 mg/día. Se inyectó lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* (50 μg por vía i.p. dos veces a intervalos de 3 h) en el día
25 15. Los animales tratados con solución salina dieron a luz en el plazo de 15 h desde la administración de LPS, mientras que el tratamiento con THG113 retrasó el parto en el 60% de animales pasadas 15 h; el tiempo medio de alumbramiento en los animales tratados con THG113 fue de 36 h (figura 5).

30 Efectos de derivados de THG113 en el ensayo de contracción microvascular porcina (compuestos 1-31 sólo para referencia)

Los efectos de derivados de THG113 sobre la contracción microvascular de retina porcina se muestran en la tabla 4. La inhibición en porcentaje (%) indica la con-

tracción de microvasos oculares porcinos en respuesta a $\text{PGF}_{2\alpha}$ 100 nM en presencia de péptido 0,1 mM, en relación con la misma en ausencia del péptido, expresado como porcentaje.

5 **Tabla 4**

Efectos de los inhibidores del receptor FP en el ensayo de contracción microvascular porcina

N.º de compuesto	Nombre del péptido	Secuencia (de N a C)	% de inhibición
1	THG113	ilghrdyk	80
2	THG113.1	ghrdyk	37
3	THG113.2	ilgardyk	10
4	THG113.3	ilghadyk	38
5	THG113.4	ilghrayk	0
6	THG113.5	ilgHrayk	65
7	THG113.6	ilghRdek	0
8	THG113.7	ilghrDyk	36
9	THG113.8	ilahradyk	76
10	THG113.9	ilAhradyk	53
11	THG113.10	ilghrdyw	23
12	THG113.11	ilghrdek	0
13	THG113.12	ilgfrdyk	87
14	THG113.13	ilghreyk	43
15	THG113.14	ilghkdyk	63
16	THG113.15	ilghrnyk	60
17	THG113.16	ilghrdy	13
18	THG113.17	ilphrdyk	45
19	THG113.18	ilhradyk	13
20	THG113.19	ilghqdyk	70
21	THG113.20	ilghrsyk	25
22	THG113.21	ilghrdy - amida	50
23	THG113.22	ilghrdyk - amida	54
24	THG113.23	ilgwradyk	83

25	THG113.24	i l g y r d y k	49
26	THG113.25	i l g -(cha)- r d y k	94
27	THG113.26	i l g (cha) q d y k	21
28	THG113.27	i l g (cha) r n y k	54
29	THG113.28	k y d r h g l l	47
30	THG113.29	i l g h - (3PA) - q d y k	>85
31	THG113.30	i l g h -(4PA)-d y k	>85
32	THG113.31	i l g h (cit) d y k	>85

Letras minúsculas: D-aminoácidos; letras mayúsculas: L-aminoácidos; cha: D-ciclohexilalanina; PA: L-piridilalanina; cit: D-citulina.

5 Dosis-respuesta de contractilidad microvascular frente a $PGF_{2\alpha}$ en presencia y ausencia de inhibidores (compuestos 1-31 sólo para referencia)

Se determinaron las curvas dosis-respuesta de contractilidad microvascular frente a $PGF_{2\alpha}$ en presencia/ausencia de THG113 y sus derivados (10 μ M) en el ensayo de copa ocular porcina (Li *et al.* 1996) (figura 6A). Todos los compuestos inhibieron las respuestas inducidas por $PGF_{2\alpha}$ incluso a altas concentraciones del agonista. La respuesta inhibidora de la dosis creciente de THG113 y sus derivados en la contractilidad ocular porcina inducida por $PGF_{2\alpha}$ 1 μ M se muestra en la figura 6B. Ambos derivados, 113.29 y 113.31, eran más potentes que el péptido original (CI_{50} : 27 y 13 nM respectivamente).

15

Efecto de THG113.31 sobre las propiedades contráctiles de tiras de útero

Se observó una reducción dependiente de la dosis de las respuestas contráctiles uterinas (duración de la contracción y fuerza media de la contracción), inducida por el agonista de FP natural, $PGF_{2\alpha}$, en tiras de útero obtenidas de ratonas que recientemente dieron a luz en respuesta a $PGF_{2\alpha}$ 1 μ M en un ensayo de baño de órganos (figura 7). Estos datos confirmaron que THG113.31, como el compuesto líder original fue eficaz en la disminución de la contractilidad en el miometrio en el estado de parto activo. Se obtuvieron reducciones de magnitud similar en tiras de miometrio obtenidas de animales bovinos y ovinos. Estos datos subrayan la eficacia

25

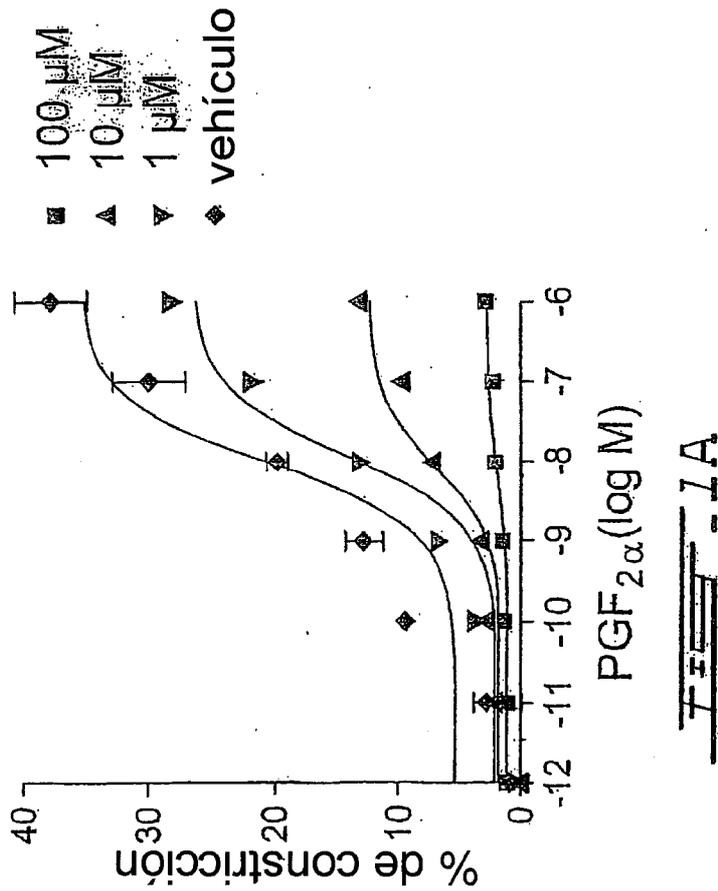
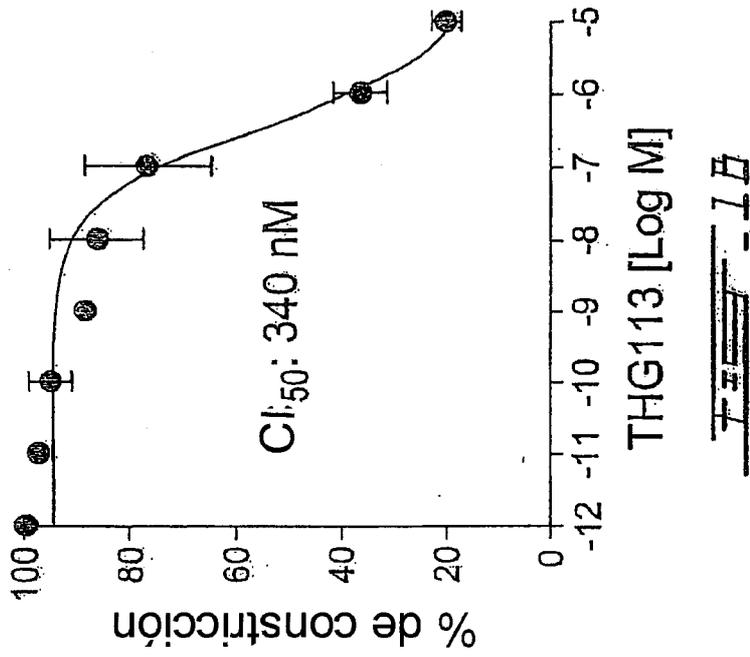
cia de la inhibición de THG113 en miometrios de varias especies relacionadas de manera distante y la importancia universal del receptor FP en la contractilidad miometrial.

5 Efecto tocolítico de THG113.31 en un modelo de endotoxina de parto pretérmino de ratón

Se administró LPS de *E. coli* (50 µg dos veces separadas por tres horas, por vía i.p.) a ratonas CD-1 (peso promedio: 50 g) en el día 15 de gestación. Cuatro horas después de que se administrase LPS, se implantaron quirúrgicamente bombas osmóticas Alzet que suministraron 0,1, 0,4 ó 0,8 mg/kg/día del fármaco en los lomos de los animales. La gestación normal en esta cepa es de 19,2 días. Se representan gráficamente los resultados como tiempo medio (h) de alumbramiento tras la administración de LPS (figura 8A) y el porcentaje de animales que dieron a luz a las 15, 24, 48, 72 h tras la administración de LPS (figura 8B). Todos los animales tratados con solución salina dieron a luz en el plazo de 15 h tras la administración de LPS, mientras que menos del 30% y el 15% de los animales a los que se les administraron 0,1 mg y 0,8 mg, dieron a luz respectivamente. Hubo un retraso dependiente de la dosis en el alumbramiento. Sin embargo, las diferencias en el retraso entre las dosis de 0,4 y 0,8 mg no fueron estadísticamente significativas. A dosis de 0,4 y 0,8 mg, menos del 50-60% de los animales dieron a luz a las 48 h tras la administración de LPS. Estos datos enfatizan que THG113.31 es un potente tocolítico en un modelo animal en el que se imitó la componente infecciosa del parto pretérmino humano.

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en la secuencia ilgh(cit)dyk, en el que todos los aminoácidos son D-aminoácidos y (cit) es D-citrulina.
5
2. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicho péptido es de 0,1-100 mg/kg de peso corporal.
4. Péptido según la reivindicación 1, solo o en combinación con un portador
15 farmacéuticamente aceptable, para su uso en medicina y/o medicina veterinaria.
5. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, para la preparación de un medicamento para detener el parto pretérmino.
- 20 6. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de dismenorrea.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, para su uso en un método de detención del parto pretérmino que comprende administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición.
25
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, para su uso en un método para tratar dismenorrea que comprende administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición.
30
9. Péptido según la reivindicación 1, inhibiendo sustancialmente dicho péptido inhibe sustancialmente el receptor FP.



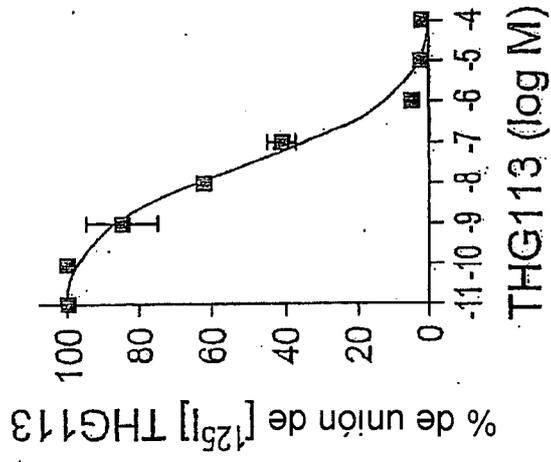


Fig. 2A

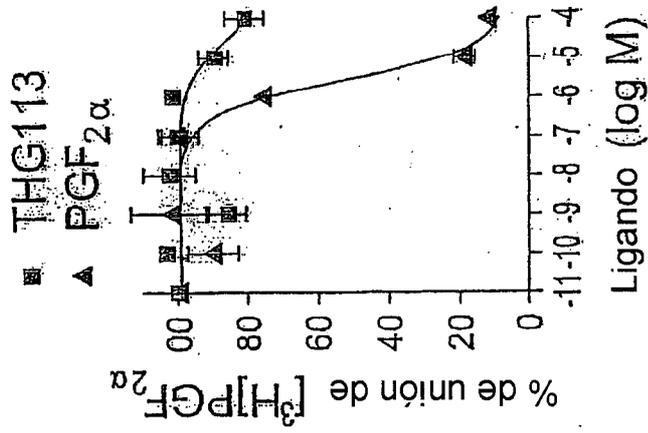


Fig. 2B

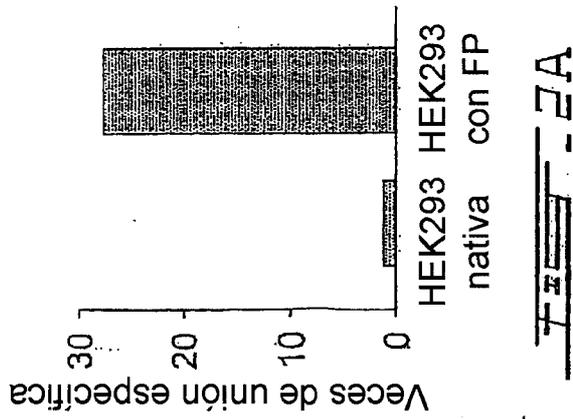
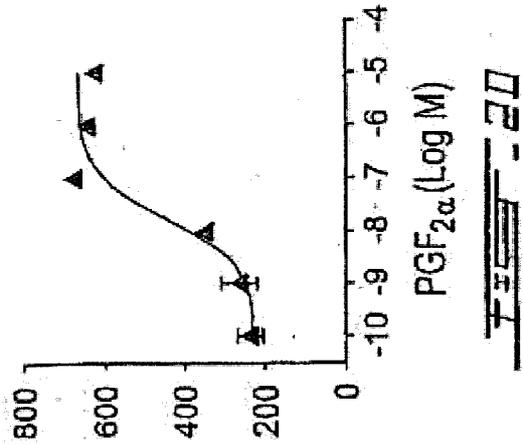
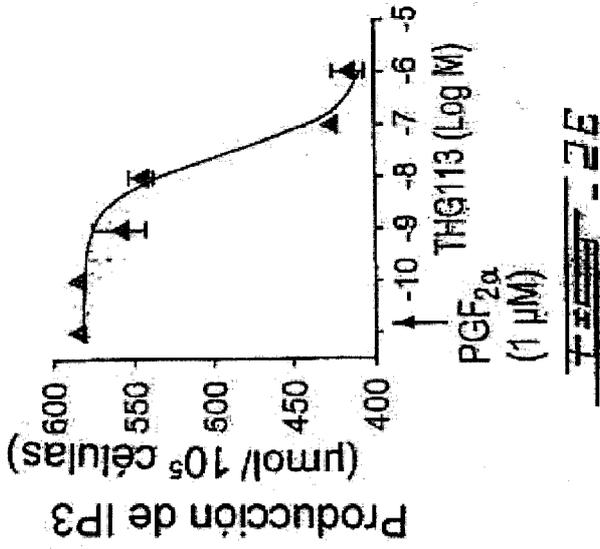
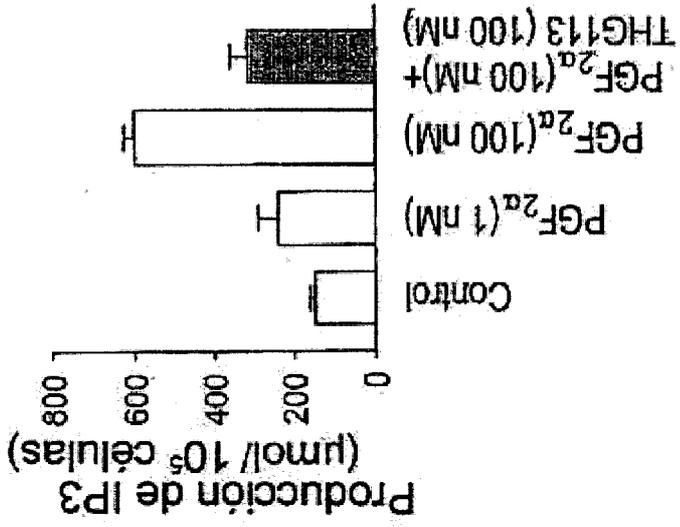
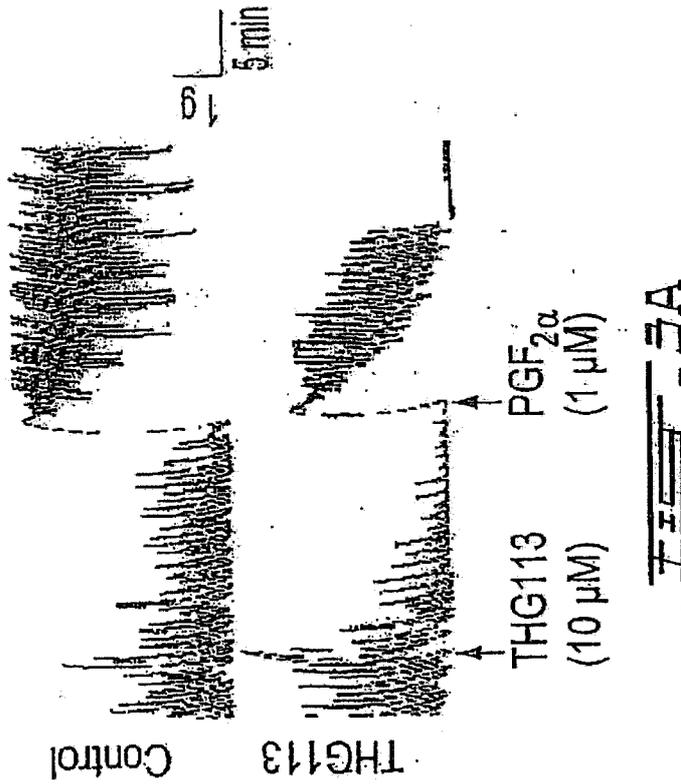
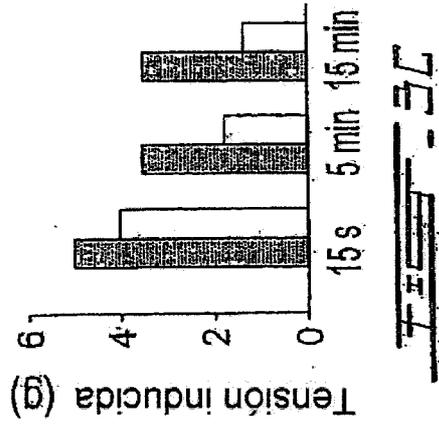
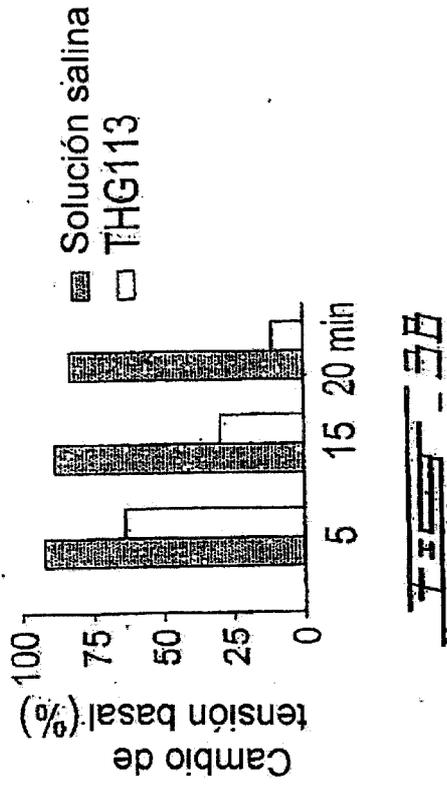


Fig. 2C





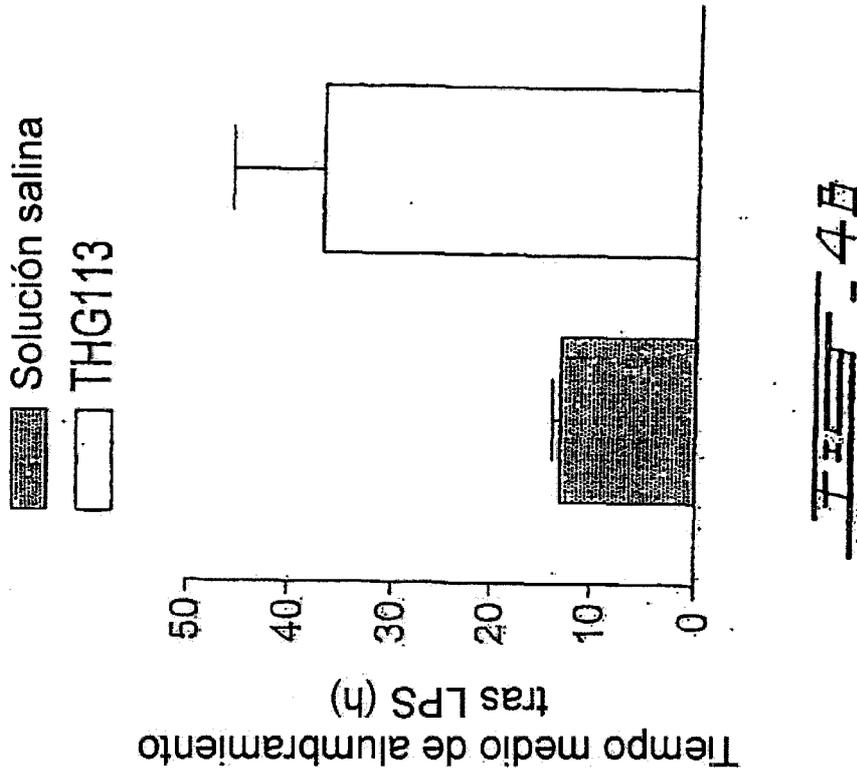


Fig. 4B

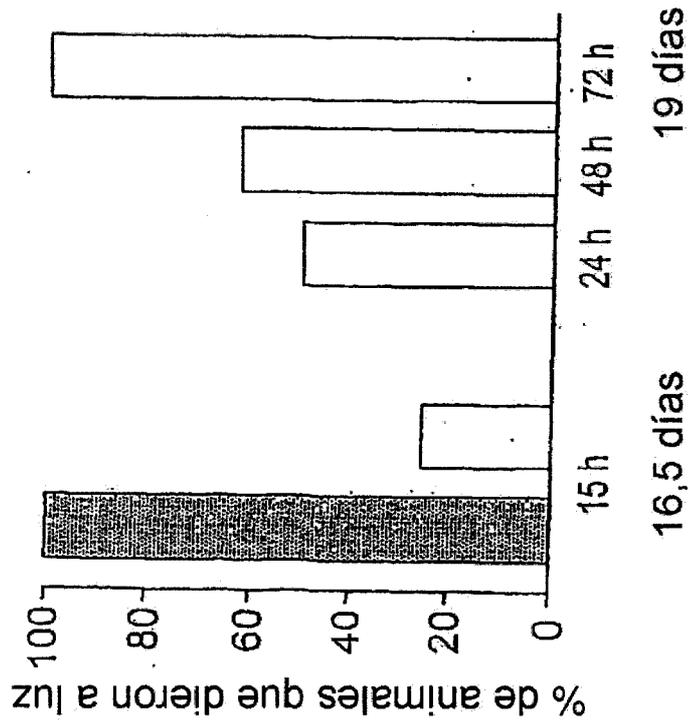


Fig. 4A

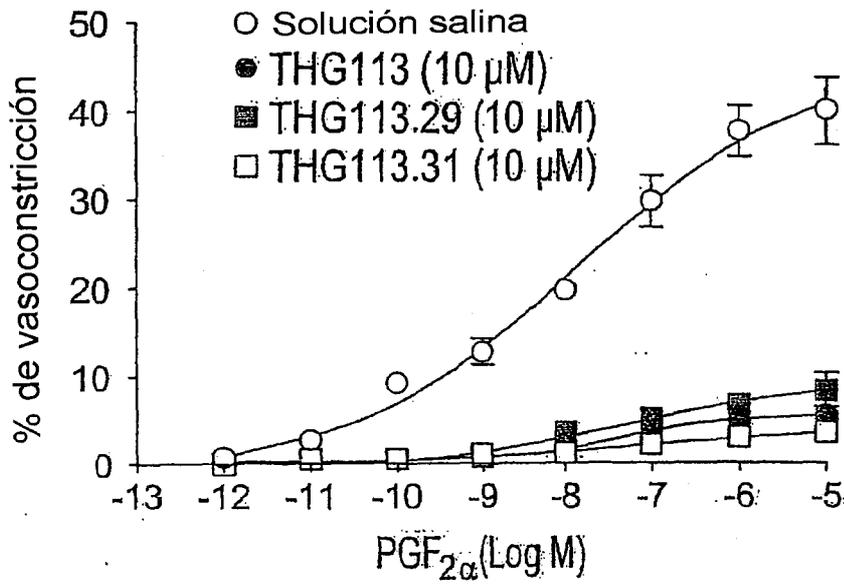


FIG. 5A

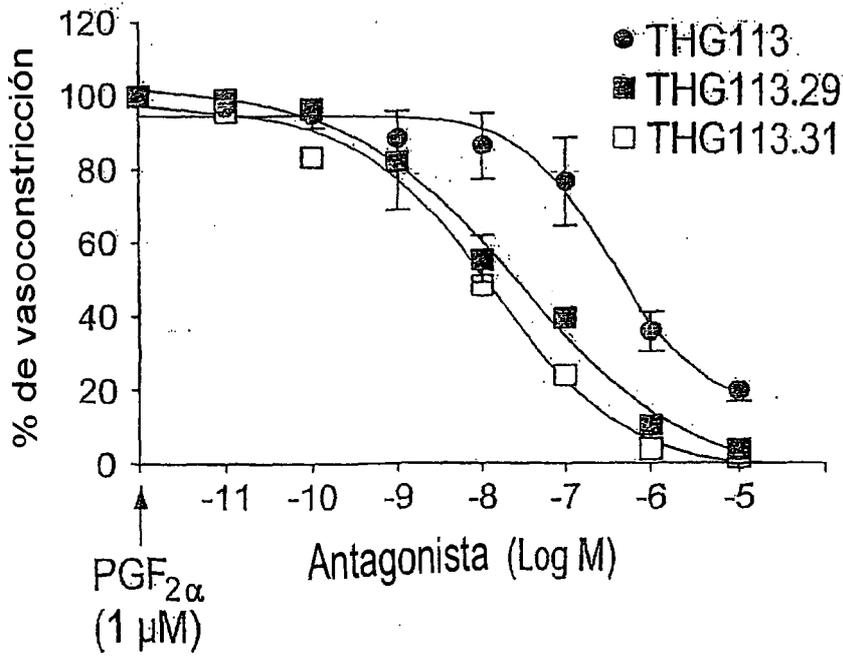
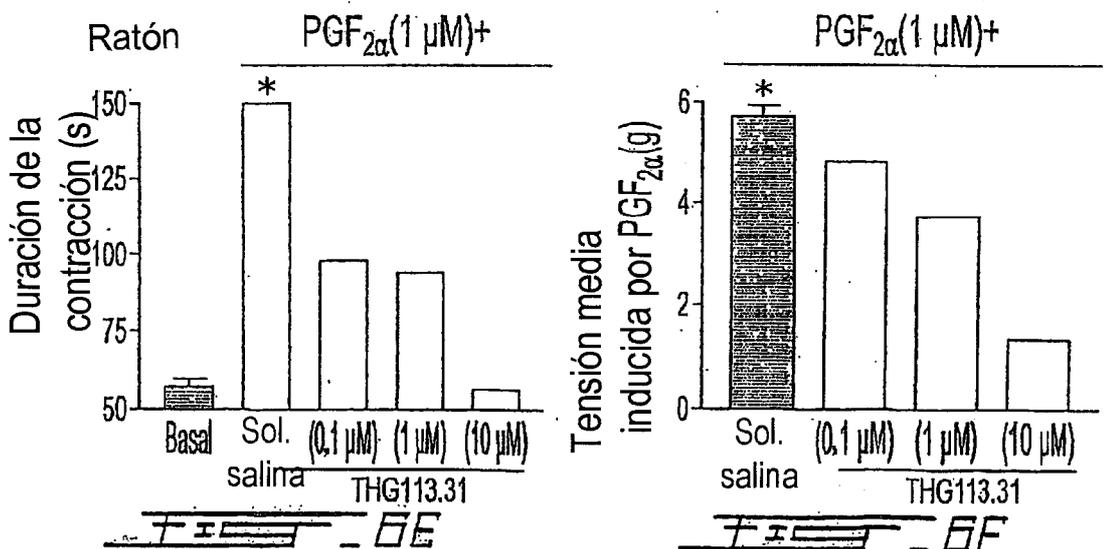
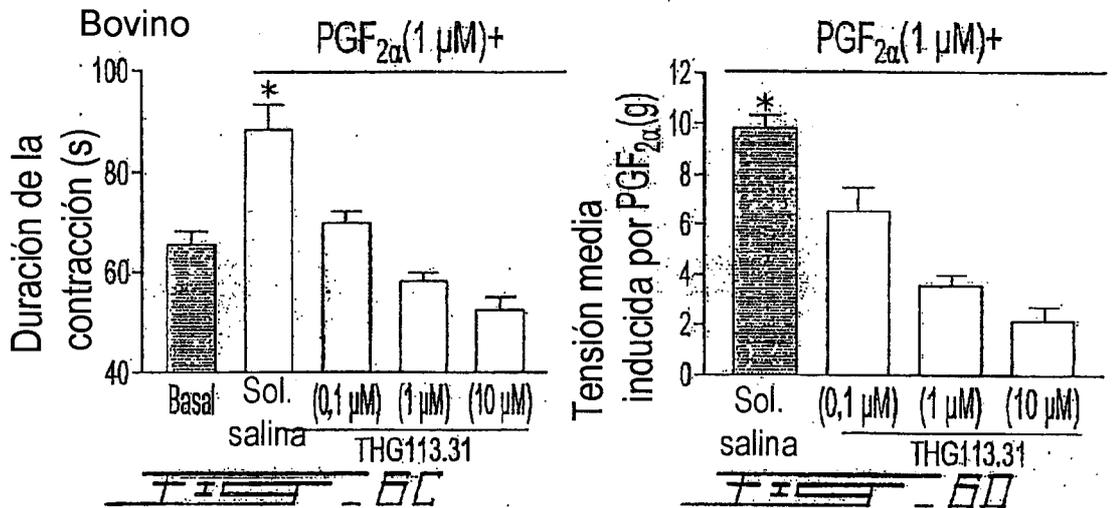
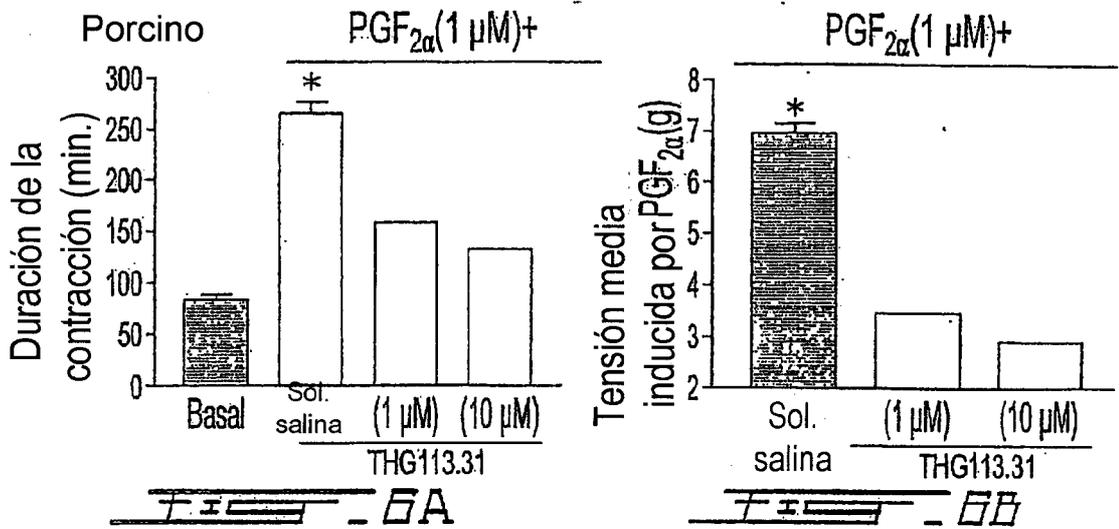


FIG. 5B



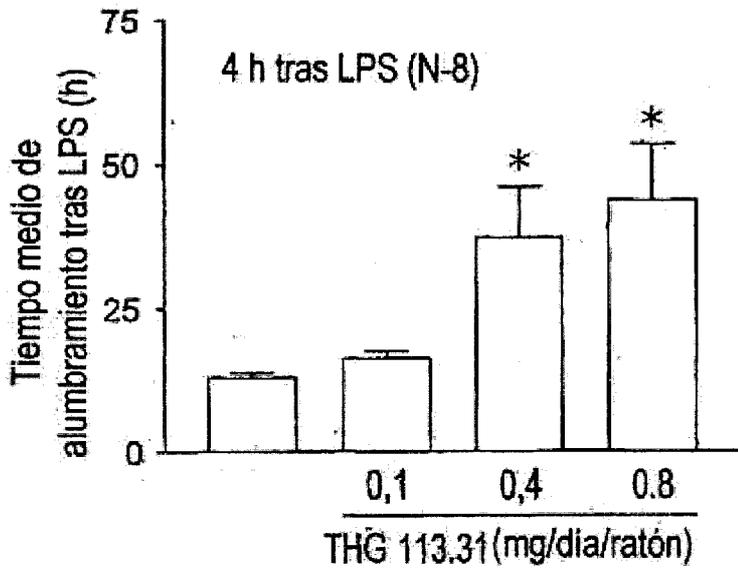


Fig. 7A

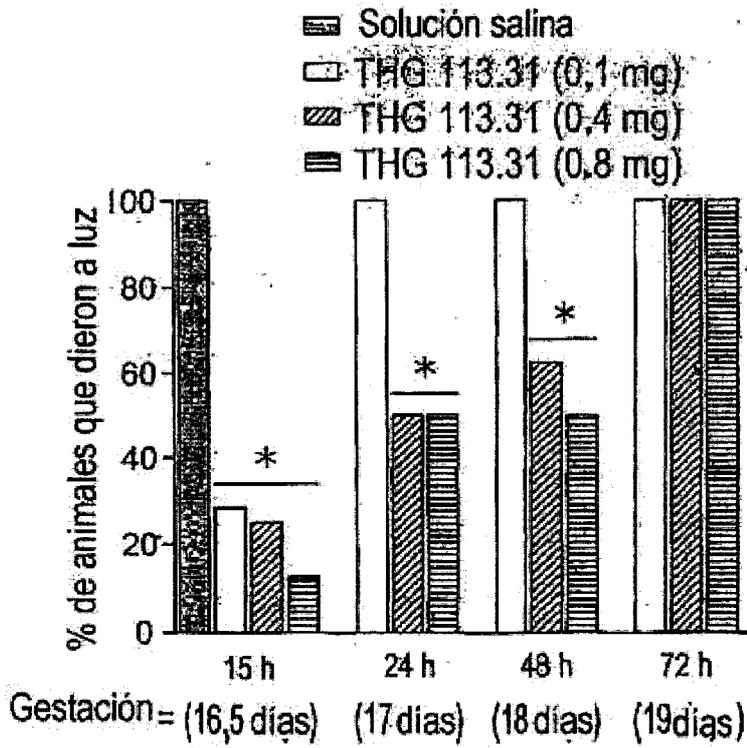


Fig. 7B