(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 395 087**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/06	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
C07K 14/545	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2005** **E 05741261 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **14.02.2007** **EP 1751175**

(54) Título: **Antagonistas del receptor de interleuquina-1, composiciones y métodos de tratamiento**

(30) Prioridad:

05.05.2004 US 839751

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2013

(73) Titular/es:

VALORISATION-RECHERCHE, SOCIÉTÉ EN COMMANDITE (50.0%)
5160 BOULEVARD DÉCARIE BUREAU 770
MONTREAL QC H3X 2H9, CA y
VALORISATION HSJ, SOCIÉTÉ EN COMMANDITE (50.0%)

(72) Inventor/es:

CHEMTOB, SYLVAIN;
QUINIOU, CHRISTIANE;
LUBELL, WILLIAM D.;
BEAUCHAMP, MARTIN y
HANSFORD, KARL A.

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 395 087 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 del receptor de interleuquina-1, composiciones y métodos de tratamiento

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a antagonistas del receptor de IL-1 y a métodos para modular la actividad de los receptores de IL-1 con los mismos. Más específicamente, la presente invención se refiere a antagonistas peptídicos no competitivos del receptor de IL-1 (IL1R/IL1RAcP), a su identificación y a sus usos terapéuticos. Más particularmente, la presente invención se refiere a antagonistas peptídicos para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con IL-1 tales como artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria del intestino. La presente invención tiene aplicación en el campo de la bioquímica y la química médica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN:

Las citoquinas son términos genéricos para designar proteínas semejantes a hormonas biológicamente activas (interleuquinas, interferones, factor de necrosis tumoral, factores de crecimiento) que median sus efectos a través de una superfamilia de receptores. Las citoquinas y sus receptores constituyen una red de control potente por la que las células señalizan y coordinan la proliferación y la diferenciación celular, la muerte y la supervivencia celular. Las citoquinas pueden ser específicamente péptidos de bajo peso molecular que tienen una actividad biológica muy potente. Su mecanismo de acción es generalmente autocrino y paracrino y actúan finalmente regulando la expresión génica.

La familia de la interleuquina-1 (IL-1) de hormonas polipeptídicas representa una clase importante de citoquinas que son expresadas por una variedad de tipos celulares incluyendo monocitos (que es la fuente predominante de IL-1), fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, osteoclastos, astrocitos, células epiteliales, células T, células B y numerosas células cancerosas. Esta familia de citoquinas consiste en más de 7 moléculas distintas pero estructuralmente relacionadas incluyendo IL-1α, IL-1β e IL-18, que inducen una respuesta biológica, e IL-1ra, un antagonista del receptor producido naturalmente (Kumar *et al*. 2000).

Los genes de IL-1α e IL-1β están localizados en el cromosoma 2. Cada gen contiene siete exones y son homólogos en una región del sexto exón. Tanto IL-1α como IL-1β se producen inicialmente como precursores de 31 kDa pero son procesados por proteasas para producir las proteínas maduras de 17,5 kDa. Los receptores de IL-1 reconocen las formas α y β y ambas formas tienen propiedades biológicas similares. IL-1α es la forma predominante en ratones mientras que IL-1β es la citoquina predominante en el ser humano. Las propiedades biológicas de IL-1 son numerosas e incluyen mediar muchas respuestas inmunológicas e inflamatorias a la infección y lesión.

A pesar de sus efectos normalmente beneficiosos en la respuesta de un organismo a la infección y lesión, se han puesto de manifiesto circunstancias en las que las acciones de IL-1 son perjudiciales. Por ejemplo, la producción o respuesta inapropiada a IL-1 se ha mostrado en muchas enfermedades inflamatorias agudas o crónicas tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), osteoartritis, psoriasis, choque séptico, encefalitis y síndrome del distrés respiratorio. Se ha mostrado que IL-1 juega un papel en varias enfermedades adicionales incluyendo enfermedad de Alzheimer, leucomalacia periventricular, meningitis, ictus y varias enfermedades autoinmunes.

La interleuquina-1 (IL-1) juega un papel principal aguas arriba en la regulación de la inflamación estimulando la generación de mediadores inflamatorios como IL-6, prostaglandina E_2 (PGE_2; mediante la inducción de la expresión de COX-2 y PGE sintasa (mPGES) y de sí mismo, aumentando por lo tanto el proceso de la inflamación. Otra actividad biológica de IL-1 es inducir la proliferación y activación de numerosos tipos celulares como las células T (Cullinan *et al*. 1998; Dunne y O'Neill 2003). IL-1 también puede incrementar el nivel de colagenasa en una articulación artrítica y se ha implicado en los estadios agudo y crónico de la inmunopatología en la artritis reumatoide. IL-1 puede ser responsable de alterar la función de las células endoteliales, dirigir la quimiotaxis de los linfocitos y leucocitos en el tejido sinovial e inducir la secreción de colagenasa latente por los condrocitos y fibroblastos. IL-1 se considera, junto con TNF, el prototipo de citoquinas inflamatorias. Sin embargo, los efectos de IL-1 no están limitados a la inflamación y esta citoquina también juega un papel en la formación y remodelado del hueso, secreción de insulina e inducción de la fiebre.

Como una citoquina pro-inflamatoria importante, IL-1 es una diana potencialmente potente para la intervención terapéutica en enfermedades como lesión del cartílago articular tal como en la artritis. La osteoartritis y la artritis reumatoide son la segunda causa después de la enfermedad cardiaca de las incapacidades laborales en América del Norte y su predominancia se incrementa dramáticamente con la edad (Hallegua y Weisman 2002).

Se han clonado y caracterizado dos receptores distintos de IL-1: IL-1RI (Sims *et al*. 1989), que genera los efectos biológicos de IL-1; e IL-1RII. Además, se ha identificado una proteína receptora auxiliar (IL-1RAcP) que es la posible subunidad de transducción de la señal del complejo del receptor. El IL-1R de tipo I se encentra principalmente en las células T, queratinocitos, fibroblastos, condrocitos, sinovicitos y células epiteliales. Con el fin de generar un efecto

biológico, IL-1R tiene que unirse a IL-1 y posteriormente a IL-1RAcP para desencadenar la transducción de la señal. La parte extracelular de IL-1R contiene tres dominios semejantes a Ig que se unen a IL-1 (Vigers *et al*. 1997; Vigers *et al*. 2000). A diferencia de la subunidad del receptor de IL-1R y según estudios que implican anticuerpos frente a las partes extracelulares de la proteína auxiliar de IL-1R, la última no interacciona con la citoquina (Cullinan *et al*. 1998; Laye *et al*. 1998; Malinowsky *et al*. 1998; Casadio *et al*. 2001).

El primer evento en la transducción de la señal, después de la unión de IL-1, es la formación de un complejo IL-1R/IL-1RAcp que da lugar al reclutamiento de IRAK (quinasa asociada al receptor de IL-1) en el complejo y a una cascada de fosforilación por quinasas, lo que causa la activación de factores transcripcionales incluyendo NFκB y AP-1. El complejo IL-1R/IL-1RacP también puede reclutar y activar quinasas como PI3K y Akt y también puede dar lugar a la activación de la ruta de señalización PLC/PKC (Daun y Fenton, 2000).

Dos aplicaciones clínicas importantes de los antagonistas de IL-1R son el tratamiento de la artritis y de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Los tratamientos disponibles para estas patologías están limitados actualmente. Frecuentemente resultan en toxicidad y efectos secundarios. La demanda en el mundo médico de terapias más seguras y más dirigidas es por lo tanto considerable.

Las estrategias actuales en el campo de las terapias de IBD y artritis reumatoide incluyen el desarrollo de receptores solubles, anticuerpos monoclonales dirigidos frente a IL-1R y TNFR, miméticos de citoquinas, técnicas antisentido e inhibidores de quinasas (Vigers *et al*. 1997; Vigers *et al*. 2000; Hallegua y Weisman 2002; Bouma y Strober 2003). En el caso particular de IL-1, un mimético natural soluble del receptor IL-1Ra, Anakinra (nombre genérico Kineret™) fue desarrollado por Amgen para el tratamiento de artritis reumatoide gravemente activa para reemplazar el metotrexato (un inhibidor de la enzima dihidrofolato (ácido fólico) reductasa). En el caso de otro receptor de citoquina pro-inflamatoria importante, TNFR, también se han desarrollado dos antagonistas, etanercept (Enbrel™, Amgen) e infliximab (Remicade™, Schering-Ploug).

J. Biol. Chem., 1996, No. 48, 30517-30523, describe un péptido de 15-mer con la estructura Ac-FEWTPGWYQJYALPL-NH_2, en el que J representa el aminoácido no natural ácido 2-azetidina-1-carboxílico, que se une selectivamente al receptor de IL-1 de tipo 1 para mostrar actividad antagonista del receptor de IL-1.

Los antagonistas de la técnica anterior son bien competitivos (por ejemplo, receptores solubles, anticuerpos, miméticos de citoquinas), lo más habitualmente con una producción costosa o difíciles de aplicar *in vivo* (por ejemplo, antisentido). Debido a que el ligando supera con creces la concentración del receptor, la concentración del inhibidor competitivo necesaria para inhibir la interacción de IL-1 con su receptor nativo es frecuentemente sustancial.

Por lo tanto, permanece una necesidad de terapias nuevas que puedan regular a la baja la actividad mediada por IL-1.

La presente invención busca abordar estas necesidades y otras necesidades.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere así a antagonistas del receptor de IL-1 extracelulares, no competitivos, eficaces y selectivos que superan uno o más de los inconvenientes de los antagonistas del receptor de IL-1 de la técnica anterior.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere al contenido de la reivindicación 1, opcionalmente en la que el péptido está modificado químicamente en su extremo N y/o C-terminal para aumentar la estabilidad en el suero.

La presente invención también describe el uso de antagonistas no competitivos y selectivos de la presente invención en el tratamiento de enfermedades asociadas con IL-1.

En una realización, los compuestos de la presente invención son péptidos que inhiben la actividad biológica de IL-1R e inhiben la actividad de la citoquina evitando la señalización a través del receptor. Así, la inhibición de los eventos mediados por IL-1 da lugar, por ejemplo, a respuestas anti-inflamatorias, que son beneficiosas para la profilaxis o tratamiento de una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas y agudas tales como artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria del intestino, entre otras enfermedades inflamatorias y enfermedades y afecciones asociadas con la función de IL-1.

Diseñados para buscar dianas extracelulares, a diferencia de determinados candidatos a fármaco conocidos que tienen como diana las regiones intracelulares de los receptores de IL-1, los antagonistas de la presente invención no necesitan una permeabilización previa u otra disrupción de las membranas celulares para poder acceder a la célula diana con el fin de producir una respuesta farmacológica.

Como funcionan como antagonistas no competitivos, es necesaria una cantidad más pequeña de los antagonistas de la presente invención para inhibir el receptor diana, comparado con los inhibidores competitivos.

Los péptidos y derivados peptídicos de la presente invención interaccionan con un dominio extracelular específico del complejo de receptor IL-1R/IL-1RacP de manera que inhiben la actividad del receptor. De manera importante, los péptidos y derivados peptídicos de la presente invención no interaccionan con el sitio de unión de IL-1 en la subunidad de IL-1R y así se consideran antagonistas peptídicos no competitivos.

La Tabla 1 muestra antagonistas de la presente invención derivados de la secuencia API-101 siguiente: APRYTVELA (SEQ ID NO: 1) todos con D-aminoácidos excepto cuando se indica (el asterisco en la SEQ ID NO: 39 indica que el residuo (R) es un L-aminoácido, véase la Tabla 1).

Tabla 1: LISTA DE NÚMEROS DE SECUENCIA

SEQ ID NO : 1	API-101	APRYTVELA
SEQ ID NO : 2	API-101.1	AARYTVELA
SEQ ID NO : 3	API-101.2	APAYTVELA
SEQ ID NO : 4	API-101.3	APRATVELA
SEQ ID NO : 5	API-101.4	APRYAVELA
SEQ ID NO : 6	API-101.5	APRYTAELA
SEQ ID NO : 7	API-101.6	APRYTVALA
SEQ ID NO : 8	API-101.7	APRYTVEAA
SEQ ID NO : 9	API-101.9	PRYTVELA
SEQ ID NO : 10	API-101.10	RYTVELA
SEQ ID NO : 11	API-101.11	YTVELA
SEQ ID NO : 12	API-101.12	TVELA
SEQ ID NO : 13	API-101.101	XYTVELA (X=Citrulina)
SEQ ID NO : 14	API-101.102	XYTVQLA (X=Citrulina)
SEQ ID NO : 15	API-101.103	RYTVQLA
SEQ ID NO : 16	API-101.104	RFTVELA
SEQ ID NO : 17	API-101.105	RYSVELA
SEQ ID NO : 18	API-101.106	RYVVELA
SEQ ID NO : 19	API-101.107	RYTPELA
SEQ ID NO : 20	API-101.108	RYTVEL
SEQ ID NO : 21	API-101.113	RYTPEL
SEQ ID NO : 22	API-101.114	KYTPELA
SEQ ID NO : 23	API-101.115	XYTPELA (X=Ornitina)
SEQ ID NO : 24	API-101.116	RWTPELA
SEQ ID NO : 25	API-101.117	RYTPDLA
SEQ ID NO : 26	API-101.118	RYTPQLA
SEQ ID NO : 27	API-101.119	RYTPEFA
SEQ ID NO : 28	API-101.120	RYTPEMA
SEQ ID NO : 29	API-101.121	XRYTPELA (X=Acetil)
SEQ ID NO : 30	API-101.122	RYTPEPA
SEQ ID NO : 31	API-101.123	RYTPALA
SEQ ID NO : 32	API-101.126	XYTPEL (X=Ornitina)
SEQ ID NO : 33	API-101.127	RFVPELA
SEQ ID NO : 34	API-101.128	RWTPEL
SEQ ID NO : 35	API-101.129	RYTPEV
SEQ ID NO : 36	API-101.132	RFTPEL
SEQ ID NO : 37	API-101.133	KYTPEL
SEQ ID NO : 38	API-101.134	XYTPEL (X=Citrulina)
SEQ ID NO : 39	API-101.135	*RYTPEL

Sin estar limitado a una teoría particular, los antagonistas del receptor de IL-1 pueden estimular o estabilizar una conformación particular del receptor de IL-1, lo que resulta en la inhibición del actividad del receptor. Los péptidos y derivados peptídicos de la presente invención inhiben la señalización intracelular dependiente de IL-1 de una manera no competitiva. Estos péptidos evitan eficazmente la activación de los dominios intracelulares del receptor responsables de la señalización del receptor de IL-1. Se evitan de esta manera los eventos de transducción celular posteriores que dan lugar a la expresión de moléculas (por ejemplo, moléculas inflamatorias como citoquinas, receptores de citoquinas, prostaglandinas, secreción de colagenasa...etc) responsables en parte de la expresión de la enfermedad.

Estos compuestos incluyen compuestos líder y compuestos derivados construidos de manera que tienen una estructura o forma molecular igual o similar que los compuestos líder, pero se pueden diferenciar de los compuestos líder bien respecto a la susceptibilidad a la hidrólisis o a la proteolisis o respecto a sus propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada para el receptor). La presente invención también se refiere a compuestos y composiciones que son útiles para el tratamiento o prevención de afecciones, enfermedades o trastornos asociados con la producción de IL-1 o respuesta a IL-1 inapropiada.

En otra realización, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria y un vehículo fisiológicamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas pueden estar en una variedad de formas incluyendo formas de dosificación oral, cremas tópicas, supositorios, pulverizador e inhalador nasal, así como disoluciones inyectables e infundibles. Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas son muy conocidos en la técnica y se puede hacer referencia a Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Eaton, Pa., EEUU.

Los péptidos y derivados peptídicos de la presente invención pueden usarse para prevenir y reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con IL-1, y pueden usarse para aliviar u obviar la afección. La administración del agente terapéutico puede ser en cualquier forma farmacéuticamente aceptable en un vehículo adecuado y en una dosis terapéuticamente aceptable.

A la vista de la importancia de la función de IL-1 y/o del receptor IL-1R/IL1RacP en numerosas rutas y afecciones en los animales, la presente invención tiene un impacto amplio en la identificación, validación y tratamiento de afecciones o enfermedades asociadas con la respuesta a IL-1 (por ejemplo, sobreexpresión o señalización anormal de IL-1 a través de IL-1R/IL1-RacP).

La presente invención también se refiere a agonistas del receptor extracelulares no competitivos, eficaces y selectivos. Además, la invención describe el uso de los agonistas no competitivos y selectivos de la presente invención en el tratamiento de enfermedades asociadas con interleuquinas en las que la interleuquina-1 (IL) presenta ya una actividad inflamatoria u otra actividad, incrementando uno o más de un agonista de la presente invención la actividad de la IL que tiene la actividad anti-inflamatoria mencionada anteriormente u otra actividad. En una realización relacionada, ventajosamente los agonistas de la presente invención se sintetizan de una manera sencilla. Los ejemplos no limitativos de agonistas según la presente invención incluyen los péptidos TTI-101.101 (SEQ ID NO: 13) y TTI-101.102 (SEQ ID NO: 14). En la presente memoria, también se describen los peptidomiméticos TTI-101-137 y TTI-101-142 (Figuras 29 y 30, respectivamente).

Los ejemplos no limitativos de receptores de citoquinas para los que los agonistas de la presente invención pueden encontrar un uso terapéutico incluyen:

(1) Factor derivado del epitelio pigmentario. PEDF es sintetizado por las células epiteliales del pigmento retiniano y es un factor anti-angiogénico en la retina. También protege a las neuronas del estrés oxidativo y la exotoxicidad del glutamato. Un agonista de la presente invención tendría así un potencial terapéutico en el caso de la neovascularización anormal en la retina y en el crecimiento tumoral (por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de los prematuros y cáncer; Barnstable *et al*. 2004).

(2) Receptor de IL-4: IL-4 es un citoquina anti-inflamatoria que puede inhibir la producción de moléculas inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF alfa por los monocitos y TNF-alfa por las células T en el sitio de la inflamación. IL-4 también inhibe el crecimiento de carcinomas de colon y mamarios. También actúa como una citoquina anti-inflamatoria en la artritis reumatoide por una acción protectora en los condrocitos y la inhibición de la producción de mediadores inflamatorios (Schuerwegh, *et al*).

(3) La familia de las citoquinas IL-10: Toda esta familia tiene un efecto beneficioso en el sitio de la inflamación y su efecto anti-inflamatorio se ha descrito en el caso de la cicatrización de heridas, enfermedad inflamatoria del intestino y psoriasis. IL-10 disminuye la producción de factores pro-inflamatorios como IL-2, TNF-alfa e IFN-gamma en las células Th1. Disminuye el crecimiento tumoral inhibiendo la infiltración de los macrófagos en el sitio del tumor (Li *et al*. 2004; Asadullah *et al*. 2004).

En la presente memoria se describe un compuesto aislado seleccionado del grupo que consiste en: a) un péptido, o péptido aislado, que se une a IL-1R, o tiene una actividad antagonista de IL-1R (por ejemplo, actividad antagonista de IL-1R/IL-1RacP), en el que el péptido o péptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos RYTPELA, en la que R, Y, T, P, E, L y A se refieren a sus aminoácidos correspondientes y en el que dicho péptido puede unirse a IL-1R o tiene una actividad antagonista de IL-1R (por ejemplo, actividad antagonista de IL-1R/IL-1RacP); y b) un derivado de (a) en el que el derivado incorpora de una a cuatro adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, y en el que el derivado compite con dicho péptido de (a) para la unión a IL-1R o mantiene su actividad antagonista de IL-1R (por ejemplo,

actividad antagonista de IL-1R/IL-1RacP). En una realización particular, dicho derivado incorpora tres, dos o una adición, deleción o sustitución de aminoácidos.

En la presente memoria también se describe un péptido, o péptido aislado, que antagoniza la actividad biológica de IL-1R en el que el péptido, o péptido aislado, comprende la secuencia caracterizada por la fórmula general: RYTPELX, en la que R, Y, T, P, E y L se refieren a sus aminoácidos correspondientes y en la que X se selecciona de no aminoácido y alanina (A). En la presente memoria se describen además derivados de esta fórmula general, en los que el derivado incorpora una, dos o tres modificaciones de aminoácidos seleccionadas de una adición, deleción o sustitución de aminoácidos en la parte RYTPEL del péptido RYTPELX y en el que el derivado mantiene su actividad antagonista de IL-1R (por ejemplo, actividad antagonista de IL-1R/IL-1RacP). Generalmente, la sustitución de un aminoácido se hace con un aminoácido similar o conservado, véase más adelante.

El derivado comprende dos o menos modificaciones de aminoácidos seleccionadas de una adición, deleción o sustitución de aminoácidos en la parte RYTPEL del péptido. El péptido, péptido aislado o derivado de éste puede seleccionarse del grupo que consiste en: 101-113, 101-103, 101-114, 101-117, 101.10, 101.106, 101.116, 101.108, 101.135, 101.128, 101.9, 101.105, 101.129, 101.11, 101.12 y 101.132 como se define en la Tabla 1. Los compuestos antagonistas pueden seleccionarse del grupo que consiste en: 101-113, 101-103, 101-114, 101-117 y 101.10, como se define en la Tabla 1.

En la presente memoria se describe un compuesto aislado que tiene una actividad antagonista de IL-1R/IL1RacP, seleccionándose dicho compuesto del grupo que consiste en: a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos RYTPELX, en la que R, Y, T, P, E y L se refieren a sus aminoácidos correspondientes y X se selecciona de no aminoácido y alanina (A); y un derivado de (a) en el que el derivado incorpora una, dos o tres modificaciones de aminoácidos seleccionadas de una adición, deleción o sustitución de aminoácidos en la parte RYTPEL del péptido y en el que el derivado mantiene su actividad antagonista de IL-1R/IL1RacP. En la presente memoria también se describen dichos derivados que tienen sólo una o sólo dos de dichas modificaciones. Los ejemplos de dichos antagonistas comprenden los péptidos 101-113, 101-103, 101-114, 101-117, 101.10, 101.106, 101.116, 101.108, 101.135, 101.128, 101.9, 101.105, 101.129, 101.11, 101.12 y 101.132 y más péptidos 101-113, 101-103, 101-114, 101-117 y 101.10, como se define en la Tabla 1.

En la presente memoria se describe un péptido que antagoniza la actividad biológica de IL-1R, en el que el péptido comprende la secuencia caracterizada por la fórmula general:

$X\text{-}aa_1\text{-}aa_2\text{-}aa_3\text{-}aa_4\text{-}aa_5$ Fórmula I

en la que X, aa_1, aa_2, aa_3, aa_4 y aa_5 se seleccionan independientemente y en la que:

X se selecciona de $A_1P_2R_3Y_4$, $A_1A_2R_3Y_4$, $A_1P_2A_3Y_4$, $A_1P_2R_3A_4$, $P_2R_3Y_4$, R_3Y_4, Z_3Y_4, R_3F_4 e Y_4, en el que A, P, R, Y y F se refieren a sus aminoácidos correspondientes, los números se refieren a las posiciones del aminoácido en la secuencia $A_1P_2R_3Y_4$, y en el que Z es citrulina;

A_1 se selecciona del grupo que consiste en: alanina, leucina, valina, metionina y ϕ, en el que ϕ define un alfa-aminoácido que posee una cadena lateral hidrofóbica tal como, pero no limitada a: nor-leucina, iso-leucina, terc-leucina, ciclohexilalanina, alilglicina.

P_2 se selecciona del grupo que consiste en: prolina, alanina, ácido aminoisobutírico (Aib), N-Metil-L-alanina (MeAla), trans-4-Hidroxiprolina, ácido dietiltiazolidin carboxílico (Dtc), y Ω, en el que Ω define una aminoácido que produce restricción conformacional (Hanessian, S *et al*. 1997; Halab *et al*., 2000; Cluzeau y Lubell, 2004; Feng y Lubell 2001); los ejemplos no limitativos de éstos incluyen: ácido azetidin-2-carboxílico, ácido pipecólico, ácido isonipecótico, ácido 4-(aminometil)benzoico, ácido 2-aminobenzoico, ácido nipecótico.

R_3 se selecciona del grupo que consiste en: de histidina, lisina, alanina, ornitina, citrulina, 2-piridilalanina, 3-piridilalanina, 4-piridilalanina y sucedáneos de arginina tales como pero no limitados a 4-amidinofenilacetilo, 4-amidinofenilpropionilo, 4-amidinofenilglicilo, 4-amidinofenilmetilglicilo, 4-guanidinofenilacetilo, 4-guanidinofenilpropionilo, 4-guanidinofenilgilicilo, 4-guanidinofenilmetilglicilo (Masic y Kikelij, 2001; Feng y Lubell, 2001).

Y_4 se selecciona del grupo que consiste en: sin residuo, fenilalanina, triptófano, alanina y Σ, en el que Σ, define un alfa-aminoácido que posee una cadena lateral hidrofóbica Σ, o una cadena lateral aromática, los ejemplos incluyen pero no están limitados a: nor-leucina, iso-leucina, terc-leucina, ciclohexilalanina, alilglicina, naftilalanina, piridilalanina, histidina, tirosina.

aa_1 se selecciona del grupo que consiste en: treonina, serina, valina y η, en el que η define un aminoácido hidrofílico neutro, los ejemplos incluyen pero no están limitados a, hidroxivalina, beta,beta-dialquilserinas, como se describe en Dettwiler y Lubell, 2004, homoserina, alotreonina, hidroxiprolina.

aa_2 se selecciona del grupo que consiste en: isoleucina, leucina, valina, prolina, metionina, ácido pipecólico, ácido azetidina-2-carboxílico, hidroxiprolina, ácido tiazolidina-a-carboxílico y ϕ, en el que ϕ define un alfa-aminoácido que posee una cadena lateral hidrofóbica (véase anteriormente).

aa_3 se selecciona del grupo que consiste en: ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, serina, histidina, homoserina, beta-leucina, beta-fenilalanina, ácido alfa amino adípico, y ψ, en el que ψ define un alfa-aminoácido ácido 3-amino-5-fenilpentanoico que posee una cadena lateral hidrofóbica, una amina aromática, una amina alifática y una arilalquil amina primaria. Los ejemplos incluyen pero no están limitados a bencilamina, feniletilamina, 2,2-difeniletilamina, 4-fenil-bencilamina.

aa_4 se selecciona de: alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y Λ, en el que Λ define un aminoácido alifático neutro. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, nor-leucina, iso-leucina, terc-leucina, ciclohexilalanina, alilglicina; una amina alifática de uno a 10 carbonos tal como pero no limitada a metil amina, iso-butilamina, iso-valerilamina, ciclohexilamina; una amina aromática o arilalquilamina tal como pero no limitada a anilina, naftilamina, bencilamina, cinamilamina y feniletilamina.

En otra realización específica, la presente invención se refiere a un antagonista peptídico o derivado de éste, según la presente invención, en el que el antagonista se purifica.

En la presente memoria se describe un péptido o derivado de éste, que antagoniza la actividad biológica de IL-1R, en el que el péptido o derivado de éste comprende la secuencia caracterizada por una de las fórmulas generales:

G_1-X-aa_1-aa_2-aa_3-aa_4-aa_5- Fórmula II

-X-aa_1-aa_2-aa_3-aa_4-aa_5-G_2 Fórmula III

G_1-X-aa_1-aa_2-aa_3-aa_4-aa_5-G_2 Fórmula IV

en las que:

G_1 está unido al extremo amino del péptido y se selecciona del grupo que consiste en: sin residuo, hidrógeno, un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada de uno a ocho carbonos, un grupo acilo (RCO) (tal como acetilo, metilo, etilo...), propianoílo, butanoílo, iso-propianoílo, iso-butanoílo, o una amina terciaria (un grupo dialquilamino o monoalquilamino).

G_2 está unido al extremo carboxi del péptido y se selecciona del grupo que consiste en: sin residuo, hidrógeno, NH_2, una amina alifática de uno a diez carbonos (tal como pero no limitada a metil amina), iso-butilamina, iso-valerilamina, ciclohexilamina, una amina aromática o arilaquilamina (tal como pero no limitada a anilina, naftilamina, bencilamina, cinamilamina, feniletilamina) y/o una amina terciaria (un grupo dialquilamino o monoalquilamino).

Los péptidos IL-1R/RacP o derivados de éstos según la presente invención tienen un tamaño entre 5 y 25 aminoácidos, más particularmente entre 5 y 16 aminoácidos, más particularmente entre 5 y 10 aminoácidos y aún más particularmente entre 5 y 9 aminoácidos.

En la presente memoria se describe un peptidomimético derivado de las fórmulas I y IV que antagoniza la actividad biológica de IL-1R. Los peptidomiméticos pueden definirse por las estructuras representadas en las figuras 20 y 21.

En la presente memoria se describe un antagonista peptidomimético de la secuencia general

R_1-aa_1-aa_2-aa_3-aa_4-aa_5-aa_6-aa_7-R_2

en el que R_1, aa_1, aa_2, aa_3, aa_4 ,aa_5, aa_6, aa_7 y R_2 se seleccionan independientemente.

R_1 se selecciona del grupo que consiste en sin residuo, hidrógeno, un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada de uno a ocho carbonos, un grupo acilo (RCO-), en el que R es un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada de uno a ocho carbonos. Los ejemplos no limitativos de R incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, iso-propilo e iso-butilo.

aa_1 se selecciona del grupo que consiste en sin residuo, arginina, lisina, omitina, citrulina, un grupo omega-amino acilo de dos a ocho carbonos, un grupo omega guanidinil acilo de dos a seis carbonos, un sucedáneo de arginina, tal como pero no limitado a 4-amidinofenilacetilo, 4-amidinofenilpropionilo, 4-amidinofenilglicilo, 4-amidinofenilmetilglicilo, 4-guanidinofenilacetilo, 4-guanidinofenilpropionilo, 4-guanidinofenilgilicilo, 4-guanidinofenilmetilglicilo.

aa_2 se selecciona del grupo que consiste en sin residuo, tirosina, fenilalanina, naftilalanina, histidina, 4-hidroxifenilglicina, triptófano, fenilglicina, piridilalanina, homoserina, 3,4-dihidroxifenilalanina y 4-clorofenilalanina.

aa_3 se selecciona del grupo que consiste en sin residuo, treonina, serina, beta-hidroxivalina, alo-treonina, valina, terc-butilleucina, leucina, prolina, ácido pipecólico, ácido azetidina-2-carboxílico, hidroxiprolina y alanina.

aa_4 se selecciona del grupo que consiste en sin residuo, valina, prolina, ácido pipecólico, ácido azetidina-2-carboxílico, hidroxiprolina, ácido tiazolidina-4-carboxílico y ácido 2,2-dimetiltiazolidina-4-carboxílico.

En otra realización, aa_3-aa_4, conjuntamente, pueden consistir en 3-amino-indolizidin-2-ona del ácido 9-carboxílico, 3-amino pirrolizidin-2-ona del ácido 8-carboxílico, 3-amino quinolizidin-2-ona del ácido 10-carboxílico, 8-amino indolizidin-9-ona del ácido 2-carboxílico, un dipéptido sucedáneo o mimético de giro beta tal como pero no limitado a los ejemplos revisados en Hanessian *et al*.

aa_5 se selecciona del grupo que consiste en sin residuo, alanina, ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico, asparagina, histidina, homoserina, beta-leucina, beta-fenilalanina y ácido alfa-amino adípico.

aa_6 se selecciona del grupo que consiste en sin residuo, alanina, valina, leucina, fenilalanina, triptófano, una amina alifática de uno a diez carbonos, tal como pero no limitada a metil amina, iso-butilamina, iso-valerilamina, ciclohexilamina, una amina aromática o arilalquilamina tal como pero no limitada a anilina, naftilamina, bencilamina, cinamilamina o feniletilamina.

aa_7 se selecciona del grupo que consiste en sin residuo, alanina, valina, leucina, fenilalanina, triptófano, una amina alifática de uno a diez carbonos, tal como pero no limitada a metil amina, iso-butilamina, iso-valerilamina, ciclohexilamina, una amina aromática o arilalquilamina tal como pero no limitada a anilina, naftilamina, bencilamina, cinamilamina o feniletilamina.

R_2 se selecciona del grupo que consiste en sin residuo, hidrógeno, NH_2, una amina alifática de uno a diez carbonos, tal como pero no limitada a metil amina, iso-butilamina, iso-valerilamina, ciclohexilamina, una amina aromática y una arilalquilamina tal como pero no limitada a anilina, naftilamina, bencilamina, cinamilamina, feniletilamina.

Debe indicarse que las configuraciones estereoquímicas de los centros quirales de los residuos en la secuencia general R_1-aa_1-aa_2-aa_3-aa_4-aa_5-aa_6-aa_7-R_2 pueden ser configuraciones R y S, D y L. Los péptidos pueden consistir en todos los isómeros D. Las olefinas pueden tener geometría cis y trans. Los residuos de aminoácidos en la secuencia general R_1-aa_1-aa_2-aa_3-aa_4-aa_5-aa_6-aa_7-R_2 también pueden ser su equivalente aza-aminoácido en el que el alfa-carbono quiral se reemplaza por nitrógeno tal como pero no limitado a aza-alanina, aza-tirosina, aza-fenilalanina.

Tomando como base la descripción de la presente memoria, un experto en la técnica puede derivar fácilmente peptidomiméticos que tienen actividad antagonista frente al receptor de IL-1, identificar más compuestos que inhiben el receptor IL-1R/IL-1RacP o mejorar los ejemplificados en la presente memoria. Los peptidomiméticos descritos son menos susceptibles a la degradación por proteasas endógenas y por lo tanto tienen una vida media más larga *in vivo*.

El peptidomimético que tiene actividad antagonista frente al receptor de IL-1 puede seleccionarse del grupo que consiste en TTI-101.140, TTI-101.141, TTI-101.125, TTI-101.110, TTI-101.111, TTI-101.136 y TTI-101.143 como se define en las figuras.

Los compuestos de la presente invención son útiles *in vitro* como herramientas únicas para la comprensión del papel biológico de IL-1 así como los varios factores que se piensa que influyen y pueden ser influidos por la producción de IL-1 y su unión al receptor IL-1R/IL-1RacP. Los antagonistas de la presente invención también son útiles en el desarrollo de otros compuestos que se unen al receptor de IL-1 porque los antagonistas peptídicos de la presente invención proporcionan una información importante acerca de la relación entre la estructura y la actividad que facilitará dicho desarrollo.

Los antagonistas de la presente invención también pueden usarse en ensayos como sondas para determinar la expresión del receptor IL-1R en la superficie de las células. Dichos ensayos pueden ser útiles, por ejemplo, para determinar el grado de respuesta inflamatoria celular a la infección o lesión tisular. Típicamente, las células en estudio se exponen a los péptidos de la presente invención, de manera que se les permite unirse a los receptores presentes en la superficie celular y las células que han reaccionado se visualizan (por ejemplo, después de lavado, separación de las células, cromatografía de afinidad, inmunohistoquímica, autorradiografía, etc).

Los compuestos pueden usarse como inhibidores competitivos en ensayos para cribar, o para caracterizar, nuevos antagonistas peptídicos de receptores similares. En dichos ensayos, así como en ensayos para determinar la expresión de IL-1R, los péptidos de la presente invención pueden usarse sin modificación o pueden marcarse (es decir, unirse covalentemente o no covalentemente a un resto que directamente o indirectamente proporciona una señal detectable).

Los ejemplos de marcadores incluyen marcadores radiactivos tales como ^{125}I, ^{14}C y ^{3}H, enzimas tales como fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano (Pat. US 3.645.090), ligandos tales como biotina, avidina, compuestos luminiscentes incluyendo marcadores bioluminiscentes, fosforescentes, quimioluminiscentes o fluorescentes (Pat. US 3.940.475).

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse a un sujeto para inhibir completamente o parcialmente los efectos de IL-1α o IL-1β en la respuesta de IL-1R *in vivo*. Así, los péptidos de la presente invención son útiles en el tratamiento terapéutico de trastornos relacionados con IL-1. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar síntomas relacionados con la producción inapropiada de IL-1 o la respuesta inapropiada a IL-1 (por ejemplo, artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria del intestino).

Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de los términos usados en la especificación y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que debe proporcionarse a dichos términos, se proporcionan a continuación en la presente memoria varias definiciones.

DEFINICIONES

A no ser que se defina otra cosa, los términos y nomenclatura científica y tecnológica usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las definiciones comúnmente entendidas de los términos de biología molecular pueden encontrarse por ejemplo en Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2a ed. (Singleton *et al*., 1994, John Wiley & Sons, Nueva York, NY). The Harper Collins Dictionary of Biology (Hale & Marham, 1991, Harper Perennial, Nueva York, NY), Rieger *et al*., Glossary of genetics: Classical and molecular, 5ª edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1991; Alberts *et al*., Molecular Biology of the Cell, 4ª edición, Garland science, Nueva York, 2002; y, Lewin, Genes VII, Oxford University Press, Nueva York, 2000. Generalmente, los procedimientos de los cultivos celulares, infección, métodos de biología molecular y semejantes son métodos comunes usados en la técnica. Dichas técnicas estándar pueden encontrarse en manuales de referencia tales como por ejemplo Sambrook *et al*. (2000, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratories); y Ausubel *et al*. (1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

Tal y como se usa en la presente memoria, los veinte aminoácidos naturales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) tales como aminoácidos D,D disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen pero no están limitados a citrulina, ornitina, norvalina, 4-(*E*)-butenil-4(*R*)-metil-N-metiltreonina (MeBmt), N-metil-leucina (MeLeu), ácido aminoisobutírico, estatina, N-metil-alanina (MeAla).

El término aminas aromáticas tal y como se usa en la presente memoria se entiende que es una molécula que tiene un anillo de 6 a 10 átomos de carbono y los ejemplos incluyen pero no están limitados a fenilmetilamina, feniletilamina, fenilpropilamina y una amina que comprende una cadena hidrocarbonada saturada o insaturada.

El término arilalquilamina tal y como se usa en la presente memoria se entiende que es una amina que comprende una cadena hidrocarbonada saturada o insaturada. Una arilalquilamina primaria está compuesta por un anillo de 6 a 10 átomos de carbono y los ejemplos incluyen pero no están limitados a fenilo, tolilo, alcoxifenilo, alcoxicarbonilfenilo y halofenilo.

El término "arilo" tal y como se usa en la presente memoria se entiende que es fenilo, 1-naftilo y 2-naftilo. El término "arilo sustituido" tal y como se usa en la presente memoria se entiende que es fenilo, 1-naftilo y 2-naftilo que tiene un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en fenilo, heteroarilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio inferior, halo, hidroxi, trifluorometilo, amino, -NH(alquilo inferior), y -N(alquilo inferior)$_2$ así como que es fenilo, 1-naftilo y 2-naftilo mono, di y trisustituido que comprende sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en metilo, metoxi, metiltio, halo, hidroxi y amino.

El término "alquilo" tal y como se usa en la presente memoria se entiende que es radicales con cadena lineal o ramificada que tienen hasta ocho átomos de carbono. El término "alquilo inferior" tal y como se usa en la presente memoria se entiende que es radicales lineales o ramificados que tienen hasta cuatro átomos de carbono y es un subgrupo preferido `para el término "alquilo".

El término "alquilo sustituido" tal y como se usa en la presente memoria se entiende que es dichos radicales con cadena lineal o ramificada que tienen hasta 8 átomos de carbono en los que uno o más, preferiblemente uno, dos o tres átomos de hidrógeno se han reemplazado por un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidroxi, amino, ciano, halógeno, trifluorometilo, -NH(alquilo inferior), -N(alquilo inferior)$_2$, alcoxi inferior, alquiltio inferior y carboxi, arilo y heteroarilo.

A no ser que se indique otra cosa "IL-1" se refiere a una o ambas de IL-1α e IL-1β. El término "IL" se refiere a la familia amplia de interleuquinas.

Como se ha mencionado anteriormente, tal y como se usa en la presente memoria, los veinte L-aminoácidos naturales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. En la notación de polipéptidos usada en la presente memoria, la dirección hacia la izquierda es la dirección amino terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxi terminal, según el uso y convención estándar. Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "péptidos" y "polipéptidos" se refieren a macromoléculas que comprenden una multiplicidad de amino o imino ácidos (o sus equivalentes) en unión peptídica, en el que los polipéptidos pueden comprender o carecer de modificaciones posteriores a la traducción. Por lo tanto, el término péptidos incluye los péptidos antagonistas con D-aminoácidos del receptor de IL-1 y otras formas modificadas de los péptidos, siempre que la modificación no altere su capacidad para modular la actividad del receptor de IL-1. Todos los péptidos antagonistas de la presente invención comparten la capacidad de modular la actividad del receptor de IL-1. Los ejemplos no limitativos de modificaciones incluyen acetilación, glicosilación y biotinilación N-terminal. Las versiones particularmente modificadas de los péptidos según la presente invención se describen adicionalmente más adelante.

El término "D-péptido inverso" se refiere en la presente memoria a péptidos que contienen D-aminoácidos, dispuestos en una secuencia inversa respecto a un péptido que contiene L-aminoácidos. Así, el residuo C-terminal de un péptido con L-aminoácidos se vuelve N-terminal para el péptido con D-aminoácidos y así sucesivamente. Los D-péptidos inversos pueden retener frecuentemente la misma conformación terciaria y por lo tanto la misma actividad, que los péptidos con L-aminoácidos, pero son más estables a la degradación enzimática *in vitro* e *in vivo* y tienen así una mayor eficacia terapéutica que el péptido original (Brady y Dodson 1994; Jameson *et al*. 1994).

Tal y como se usa en la presente memoria, la designación "derivado funcional" indica, en el contexto de un derivado funcional de una secuencia de aminoácidos, una molécula que retiene una actividad biológica (bien función o estructural) que es sustancialmente similar a la de la secuencia original. Este derivado o equivalente funcional puede ser un derivado natural o puede prepararse sintéticamente. Dichos derivados incluyen secuencias de aminoácidos que tienen sustituciones, deleciones o adiciones de uno o más aminoácidos, siempre que la actividad biológica de la proteína se conserve (por ejemplo, actúa como un antagonista no competitivo del receptor de IL-1). El aminoácido que sustituye tiene generalmente propiedades químico-físicas que son similares a las del aminoácido sustituido. Las propiedades químico-físicas similares incluyen similitudes en carga, volumen, hidrofobicidad, hidrofilicidad y semejantes. El término "derivados funcionales" se pretende que incluya "segmentos", "variantes, "análogos" o "derivados químicos" del contenido de la presente invención.

Los términos "actividad biológica" o "actividad de IL-1R/IL-1RacP" o "actividad del receptor" se refieren a cualquier actividad biológica detectable del gen o proteína IL-1 o IL-1R/IL-1RacP. Puede incluir actividad biológica específica de las proteínas IL-1R/IL-1RacP en la señalización celular. Esto incluye la medida de la producción de PGE_2, ensayos de proliferación y cambios en la expresión de genes y proteínas (por ejemplo, IL-6, IL-1, enzimas COX). Sin embargo, las actividades de IL-1R/IL-1RacP no están limitadas a estas importantes actividades biológicas. La actividad biológica también incluye por ejemplo la unión simple al receptor IL-1R con compuestos, sustratos, proteínas de interacción y semejantes. Por ejemplo, la medición del efecto de un compuesto de ensayo en su capacidad de inhibir o incrementar (por ejemplo, modular) la respuesta de IL-1 o la unión o interacción con IL-1R, se considera en la presente memoria como una medición de una actividad biológica de IL-1R según la presente invención. Ampliamente, la unión intra o intermolecular de las subunidades del receptor (por ejemplo, IL-1R e IL-1RacP) en ausencia frente a presencia del péptido o derivado peptídico de la invención es otro ejemplo más de una actividad biológica según la invención. La actividad biológica de IL-1R/IL-1RacP también incluye cualquier medida bioquímica de este receptor, cambios conformacionales, estado de fosforilación, cualquier efecto aguas abajo de la señalización del receptor tal como fosforilación de proteínas (o cualquier otra modificación posterior a la traducción, por ejemplo, ubiquitinación, sumoilación, palmitoilación, prenilación, etc), efecto de quinasa o cualquier otra característica de la proteína que pueda medirse con técnicas conocidas en la técnica. Finalmente, la actividad biológica de IL-1R/IL-1RacP incluye un cambio detectable en la arquitectura celular, proliferación celular u otro fenotipo celular que está modulado por la acción de un ligando (es decir, IL-1) en el receptor predeterminado.

El término "variante" se refiere en la presente memoria a una proteína que es sustancialmente similar en estructura y actividad biológica a la proteína, para mantener al menos una de sus actividades biológicas. Así, siempre que estas dos moléculas posean una actividad común y puedan sustituirse entre sí, se consideran variantes tal y como se usa este término en la presente memoria, incluso si la composición, o estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una molécula no es idéntica a la encontrada en la otra, o si la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos no es idéntica. Aunque la presente invención se refiere a secuencias peptídicas y sus derivados, debe entenderse que podrían diseñarse secuencias de ácido nucleico para expresar antagonistas peptídicos de la presente invención que consisten en aminoácidos codificados genéticamente. Los vectores de expresión, secuencias reguladoras (por ejemplo, promotores), secuencias líder y métodos para generar las mismas e introducirlas en las células son muy conocidos en la técnica. Así,

en una realización, dichos péptidos antagonistas de la presente invención se expresan en células por tecnología recombinante. En una realización, las células son células procariotas y sirven para producir y purificar dichos péptidos. En otra realización, las células eucariotas son células eucariotas específicas en las que se necesita modular la actividad de IL-1.

Los derivados funcionales de la presente invención pueden sintetizarse químicamente o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Todos estos métodos son muy conocidos en la técnica.

El término "sujeto" o "paciente" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, lo más preferiblemente un ser humano que es el objeto de tratamiento, observación o experimentación.

Los términos "inhibir", "reducir" o "prevención", o cualquier variación de estos términos, cuando se usan en las reivindicaciones y/o especificación incluyen cualquier disminución mensurable o inhibición completa de la actividad del receptor para conseguir un resultado deseado. Por ejemplo, se dice que un péptido inhibe la actividad de IL-1 cuando se mide una disminución en la producción de PGE_2 después de un tratamiento con los péptidos o derivados peptídicos de la presente invención comparado con la ausencia de estos péptidos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "purificado" se refiere a una molécula (por ejemplo, receptor de IL-1, péptidos, derivados peptídicos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, proteínas, etc.) que se ha separado de un componente de la composición en la que estaba presente originalmente. Así, por ejemplo, un "receptor de IL-1 purificado" se ha purificado hasta un nivel no encontrado en la naturaleza. Una molécula "sustancialmente pura" es una molécula que carece de la mayor parte de otros componentes (por ejemplo, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% sin contaminantes). Por el contrario, el término "crudo" significa moléculas que no se han separado de los componentes de la composición original en la que estaba presente. Por lo tanto, los términos "separar" o "purificar" se refieren a métodos por los que uno o más componentes de la muestra biológica se separan de uno o más de los demás componentes de la muestra. Los componentes de la muestra incluyen ácidos nucleicos en una disolución generalmente acuosa que puede incluir otros componentes, tales como proteínas, carbohidratos o lípidos. Una etapa de separación o purificación separa preferiblemente al menos aproximadamente 70% (por ejemplo 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100%), más preferiblemente al menos aproximadamente 90% (por ejemplo, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100%) e, incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 95% (por ejemplo, 95, 96, 97, 98, 99, 100%) de los demás componentes presentes en la muestra del componente deseado. Por motivos de brevedad, las unidades (por ejemplo, 66, 67...81, 82, ...91, 92%...) no se han expresado sistemáticamente pero se consideran, sin embargo, en el alcance de la presente invención.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio vehicular que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos del compuesto y que no es tóxico para el huésped (por ejemplo, paciente) al que se administra.

"Cantidad terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz" se refiere en la presente memoria a la cantidad de composición de la presente invención suficiente para inducir un efecto deseado. Dicho resultado puede ser la mejoría o reducción de los signos, síntomas o causas de la enfermedad o cualquier otra alteración deseada del sistema fisiológico diana. Por ejemplo, en el caso de las enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis y enfermedad inflamatoria del intestino) un resultado típico implicará una disminución de las respuestas inflamatorias e inmunológicas.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "molécula", "compuesto", "agente" o "ligando" se usan indistintamente y ampliamente para referirse a moléculas o compuestos naturales, sintéticos o semi-sintéticos. Por lo tanto, el término "molécula" indica por ejemplo compuestos químicos, macromoléculas, extractos de células o tejidos (de plantas o animales) y semejantes. Los ejemplos no limitativos de moléculas incluyen péptidos, anticuerpos, carbohidratos y agentes farmacéuticos. Los agentes pueden seleccionarse y cribarse por una variedad de medios incluyendo cribado aleatorio, selección racional y por diseño racional usando por ejemplo métodos de modelado de proteínas o ligandos tales como modelado informático. Los términos "seleccionado racionalmente" o "diseñado racionalmente" se pretende que definan compuestos que se han elegido tomando como base la configuración de dominios de interacción de la presente invención o la configuración de péptidos antagonistas de la presente invención. Como entenderá el experto en la técnica, las macromoléculas que tienen modificaciones no naturales también están en el alcance del término "molécula". Por ejemplo, los peptidomiméticos, muy conocidos en la industria farmacéutica y referidos generalmente como análogos peptídicos pueden generarse por modelado como se ha mencionado anteriormente. De manera similar, en una realización preferida, los polipéptidos de la presente invención se modifican para aumentar su estabilidad. Debe entenderse que en la mayor parte de los casos esta modificación no debería alterar la actividad biológica del dominio de interacción. Las moléculas identificadas según las enseñanzas de la presente invención tienen un valor terapéutico en enfermedades o afecciones en las que la fisiología u homeostasis de la célula y/o tejido está comprometida por un defecto en la producción o respuesta de IL-1. Los ejemplos no limitativos de dichas enfermedades o afecciones incluyen enfermedades inflamatorias agudas y crónicas tales como artritis reumatoide,

enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), osteoartritis, psoriasis, choque séptico, encefalitis y síndrome de distrés respiratorio, la enfermedad de Alzheimer, leucomalacia periventricular, meningitis, ictus y varias enfermedades autoinmunes. Debe entenderse que los compuestos se describen en la presente memoria indistintamente como "API-X" "TTI-X" o simplemente por el número del compuesto (por ejemplo, "101.10", "API-101.10" o "TTI-101.10").

Tal y como se usa en la presente memoria, "antagonistas", "antagonistas peptídicos" o "antagonistas de IL-1R/IL-1RacP" se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir (completamente o parcialmente) una actividad biológica de IL-1 o IL-1R/IL-1RacP. Los términos "antagonistas", "antagonistas peptídicos" o "antagonistas de IL-1R/IL-1RacP" también incluyen potenciadores de compuestos conocidos con propiedades antagonistas.

En la presente memoria, las terminologías "mímico", "mimético", "peptidomimético" y semejantes se usan en la presente memoria indistintamente.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa conjuntamente con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "una" pero también es consistente con el significado de "una o más", "al menos una", y "una o más de una".

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método que se está empleando para determinar el valor.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a no ser que se indique explícitamente que se refiere sólo a las alternativas o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción apoye una definición que se refiera sólo a alternativas y "y/o".

Tal y como se usa en esta especificación y reivindicación o reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluye" o "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o etapas del método adicionales, no expresadas.

El término "péptido corto" se pretende que signifique una secuencia de aproximadamente 6-25 aminoácidos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "purificado" se refiere a un compuesto o compuestos que se han separado de un componente de la composición en la que estaba contenido originalmente. Así, por ejemplo, un "péptido purificado" o una "composición de péptidos purificada" se ha purificado hasta un nivel no encontrado en la naturaleza. Un compuesto "sustancialmente puro" es un compuesto que carece de la mayor parte de los demás componentes (por ejemplo, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 100% sin contaminantes). Por el contrario, el término "crudo" significa compuestos que no se han separado de los componentes de la composición original en la que estaban presentes. Por motivos de brevedad, las unidades (por ejemplo, 66, 67...81, 82,...91, 92%...) no se han expresado específicamente pero se consideran sin embargo en el alcance de la presente invención.

Un "péptido aislado" o "compuesto aislado" se purifica de su estado natural *in vivo*, o estado en el que está presente con otros componentes en un estadio temprano (de la síntesis, por ejemplo).

Se contempla que cualquier realización discutida en esta especificación puede implementarse respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones y kits de la invención pueden usarse para conseguir los métodos de la invención.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se proporcionan sólo como ilustración, ya que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Habiendo descrito así generalmente la invención, se hará referencia a los dibujos adjuntos, que muestran sólo como ilustración una realización ilustrativa de ésta y en los que:

La **Figura 1** muestra un ensayo de proliferación en células de carcinoma (A549) en presencia de IL-1β (10 ng/ml). Las células se preincubaron con péptido anti-IL-1R API-101 (SEQ ID NO: 1) a diferentes concentraciones y se trataron con IL-1β a 10 ng/ml durante 24 horas. Se añadió ^{3}H-timidina. Después de 24 horas, las células se recogieron, se lisaron y se contó la ^{3}H-timidina.

La **Figura 2** muestra la actividad inhibidora de péptidos anti-IL-1R en la síntesis de PGE_2 inducida por IL-1 por células del endotelio microvascular. Las células se preincubaron 45 minutos con péptidos y se incubaron con IL-1β recombinante humana a una concentración de 10 ng/ml. La síntesis de PGE_2 se determinó en el medio de crecimiento.

La **Figura 3** muestra una curva de respuesta a la dosis de la síntesis de PGE_2 con péptido API-101 (SEQ ID NO: 1) en células del endotelio microvascular en presencia de 10 ng/ml de IL-1β.

La **Figura 4** muestra una curva de respuesta a la dosis de vasodilatación de microvasos piales en presencia de 100 ng/ml de IL-1β y los péptidos anti-IL-1R API 101 (SEQ ID NO: 1) y API-108.

La **Figura 5** muestra la síntesis de PGE_2 *in vitro* en presencia de IL-1β (10 ng/ml) y péptidos con escaneo de alanina (10-6M) en células del endotelio microvascular de cerdo (A) y en condrocitos humanos (B).

La **Figura 6** muestra la reversión *ex vivo* de la vasodilatación de microvasos piales inducida por IL-1β (100 ng/ml) con los péptidos con escaneo de alanina más activos API-101 (SEQ ID NO: 1).

La **Figura 7** muestra una representación del esquema de optimización seguido para los péptidos API.

La **Figura 8** muestra un ensayo de proliferación realizado en fibroblastos de pulmón humano (WI-38) en presencia de IL-1β (10 ng/ml) y derivados truncados de API-101 (SEQ ID NO: 1).

La **Figura 9** muestra la citotoxicidad de derivados de péptidos API-101 (10^{-5}M, ensayo MTT) en células WI-38 (A); y células del endotelio microvascular de cerebro (B).

La **Figura 10** muestra curvas de respuesta a la dosis de vasodilatación de la aorta de rata inducida por IL-1β (75 ng/ml) en presencia de derivados de API-101: API-101.10 (SEQ ID NO: 10) y API-101.12 (SEQ ID NO: 12) usando un intervalo de concentración de 10^{-5}M a 10^{-10}M para ambos péptidos.

La **Figura 11** muestra los efectos *in vivo* de hipotensión sistémica y síntesis de PGE_2 en suero inducidas por IL-1β por la administración sistémica de péptidos API-101 en ratas. (A) Disminución de la Presión Sanguínea Media (MBP) en presencia de IL-1β y/o péptido 101.10 (10^{-5}M). (B) Incremento de la modulación de la síntesis de PGE_2 en suero en presencia de IL-1β y péptido 101.10 (10^{-5}M).

La **Figura 12** muestra el efecto de la inyección entérica de API-101.10 en la hipotensión y síntesis de PGE_2 inducidas por IL-1β en ratas. A) Disminución de la Presión Sanguínea Media (MBP) en presencia de IL-1β y/o péptido 101.10. B) Incremento de la modulación de la síntesis de PGE_2 en suero en presencia de IL-1β y péptido 101.10.

La **Figura 13** muestra las secuencias de los derivados del péptido API-101.10 diseñados para optimización adicional.

La **Figura 14** muestra el efecto del péptido API-101.10 (sistémico) en un modelo de rata de Enfermedad Inflamatoria del Intestino (macroscopía). (A) Disolución Salina, (B) TNBS + Disolución Salina, y (C), TNBS + API-101.10 (2,2 mg/kg/día).

La **Figura 15** muestra la caracterización de los derivados del péptido 101.10 por inhibición del péptido *in vitro* (se muestran CI_{50} y eficacia máxima (Emax)) de la síntesis de PGE_2 inducida por IL-1β en células del endotelio de microvasos y fibroblastos humanos WI-38.

La **Figura 16** muestra el efecto terapéutico de API-101.10 en un modelo de rata de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por TNBS (histología). (A) Disolución Salina, (B) TNBS (120 mg/ml + Disolución Salina. (C), TNBS + API-101.10 (1,1 mg/kg/día).

La **Figura 17** muestra la caracterización (actividad inhibidora de la producción de PGE_2 inducida por IL-1β) de los derivados de API 101 en células endoteliales porcinas y condrocitos.

La **Figura 18** muestra la caracterización (CI_{50} y eficacia máxima) de los derivados de API-101.

La **Figura 19** muestra ensayos de respuesta a la dosis para la síntesis de PGE_2 inducida por IL-1 en células del endotelio microvascular porcino en presencia de varios peptidomiméticos.

La **Figura 20** muestra la estructura del peptidomimético API-101.109 ("C2099"ry(HyVal)pela y API-1001-111.

La **Figura 21** muestra la estructura del peptidomimético API-101.110.

La **Figura 22** muestra la evaluación macroscópica de lesión colónica en respuesta a inyecciones intraperitoneales de los péptidos 101.10, 101.107 y 101.113 en un modelo de rata de Enfermedad Inflamatoria del Intestino.

La **Figura 23** muestra el efecto de los péptidos 101.10, 101.107 y 101.113 inyectados intraperitonealmente en la infiltración de neutrófilos en tejidos (ensayo MPO) en un modelo de rata de Enfermedad Inflamatoria del Intestino (48:00).

La **Figura 24** muestra la evaluación histológica y puntuación de lesión tisular en respuesta a inyecciones intraperitoneales de los péptidos 101.10, 101.107 y 101.113 en un modelo de rata de Enfermedad Inflamatoria del Intestino inducida por TNBS.

La **Figura 25** muestra las fotografías de secciones histológicas de tejidos colónicos tratados con TNBS y TTI-101.10 y 101.107. Panel A) Control (sin tratar); B) Animales tratados con TNBS; C) Animales tratados con TNBS e inyecciones intraperitoneales del péptido 101.10 (1,0 mg/kg/d); D) Animales tratados con intraperitoneales del péptido 101.107 (0,2 mg/kg/d).

La **Figura 26** muestra las estructuras y resultados de la caracterización de derivados mímicos de TTI-101.110.

La **Figura 27** muestra las estructuras de derivados mímicos de TTI-101.125.

La **Figura 28** muestra las estructuras de otros derivados mímicos de TTI-101.125.

La **Figura 29** muestra las estructuras y resultados de la caracterización de derivados mímicos de TTI-101.125.

La **Figura 30** muestra las estructuras y resultados de la caracterización de otros derivados mímicos de TTI-101.125.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Un objetivo de la presente invención es describir una familia de péptidos capaces de inhibir la función biológica de la proteína auxiliar del receptor de IL-1 y que por lo tanto podría ser útil en numerosas afecciones patológicas.

Para propósitos de claridad de la descripción, y no como limitación, la descripción detallada se divide en las subsecciones siguientes:

I. *Ensayos para identificar péptidos de la presente invención*

II. *Preparación de péptidos*

III. *Derivados peptídicos y peptidomiméticos*

IV. *Ensayos para identificar peptidomiméticos*

V. *Composiciones farmacéuticas*

I. *Ensayos para identificar péptidos de la presente invención*

En la presente memoria se presentan métodos para ensayar la capacidad de los compuestos candidatos para inhibir la actividad del receptor de IL-1. Debe entenderse que la invención no está limitada a éstos. De hecho, otros ensayos muy conocidos en la técnica pueden usarse con el fin de identificar agonistas o antagonistas no competitivos, extracelulares de la presente invención.

Generalmente, los cribados de un antagonista de IL-1R/IL-1RacP (es decir, compuestos candidatos o de ensayo o agentes como péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) pueden estar basados en ensayos que miden una actividad biológica de IL-1R/IL-1RacP. Los ensayos de la presente invención emplean bien un receptor de IL-1 natural o recombinante. Los ensayos de cribado con una fracción celular o sin células para antagonistas de la actividad de IL-1 pueden usar receptor de IL-1 purificado *in situ* o recombinante purificado. Los ensayos basados en células pueden emplear células que expresan el receptor de IL-1 de forma natural o que contienen receptor de IL-1 recombinante. En todos los casos, la actividad biológica del receptor de IL-1 puede medirse directamente o indirectamente; así pueden identificarse los inhibidores o activadores de la actividad del receptor de IL-1. Los inhibidores o activadores en sí mismos pueden modificarse adicionalmente por técnicas de química combinatoria estándar para proporcionar análogos mejorados de los compuestos identificados originalmente.

En una realización, un ensayo es un ensayo basado en células en el que una célula que expresa un complejo de receptor IL-1R/IL-1RacP o una parte biológicamente activa de éste, bien de origen natural o recombinante, se pone en contacto con un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad biológica del receptor IL-1R/IL-1RacP, por ejemplo, la modulación de la producción de PGE_2, ensayos de proliferación, unión de IL-1R a un equivalente de unión (IL-1RacP) o cualquier otra actividad biológica mensurable del receptor de IL-1.

En una realización alternativa, la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad del complejo de receptor IL-1R/IL-1RacP puede conseguirse determinando la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de un efector aguas abajo de una molécula diana del receptor IL-1R/IL-1RacP. Por ejemplo, puede determinarse la actividad del compuesto de ensayo sobre la molécula efectora. Los ejemplos no limitativos de dicho efector aguas abajo, incluyen quinasa activada por el receptor de interleuquina (IRAK); TRAF, activación de NI-KB (por ejemplo, p65), proteínas quinasa activadas por mutágenos (MAPK). Otros ejemplos de moléculas efectoras que podrían ensayarse para definir la actividad moduladora (agonista o antagonista) de los compuestos de la presente invención se describen en Sims *et al*. 2002; y Kashiwamura *et al*. 2002.

En más de una realización de los métodos de ensayo anteriores de la presente invención, puede ser deseable inmovilizar bien IL-1, IL-1R, IL-1RacP o un péptido de interacción de la presente invención para facilitar la separación de las formas en complejo de las que no han formado complejo de una o las dos proteínas que interaccionan, así como para lograr la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de ensayo a la proteína IL-1R o la interacción de la proteína IL-1R con una molécula diana (por ejemplo, IL-1RacP) en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede conseguirse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactantes. Los ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de micro-centrífuga. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o las dos proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, pueden adsorberse proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/IL-1R o proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/IL-1RacP a lechos de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que se combinan entonces con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y bien la proteína diana no adsorbida o la proteína IL-1R y la mezcla se incuba en condiciones que dan lugar a la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, los lechos o pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido y la formación del complejo se determina bien directamente o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz, y el nivel de unión o actividad de IL-1R determinarse usando técnicas estándar.

También pueden usarse otras técnicas para inmovilizar proteínas en matrices (que son muy conocidas en la técnica) en los ensayos de cribado de la invención. Por ejemplo, puede inmovilizarse bien una proteína IL-1R o una molécula que interaccione con IL-1R (por ejemplo, IL-1, IL-1RacP) utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. La proteína IL-1R o la molécula que interacciona con IL-1R biotinilada puede prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL) e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, anticuerpos reactivos con la proteína IL-1R o la molécula que interacciona con IL-1R, pero que no interfieren con la unión de la proteína IL-1R con su molécula de interacción con IL-1R, pueden derivatizarse en los pocillos de la placa y atraparse la diana o la proteína IL-1R no unida en los pocillos por conjugación con el anticuerpo. Los métodos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos de GST inmovilizados, incluyen la inmunodetección de los complejos usando anticuerpos reactivos con la proteína IL-1R o la molécula diana, así como ensayos unidos a enzima que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con el receptor IL-1R o la molécula que interacciona con IL-1R.

Debe entenderse que lo modelos experimentales *in vivo* tal como se describen y ejemplifican en la presente memoria también pueden usarse para realizar un ensayo *in vitro*.

Ensayos *in vitro*

En una realización, los péptidos candidatos se ensayan para su capacidad de activar o inhibir la capacidad del receptor de IL-1 para modular la proliferación celular con el método de la incorporación de timidina tritiada. En otras realizaciones adicionales, los péptidos candidatos se ensayan para su capacidad de inhibir la capacidad del receptor de IL-1 para modular la proliferación celular usando, por ejemplo, los ensayos descritos en (Baker *et al*. 1995; Cheviron, Grillon *et al*. 1996); (Elliott *et al*. 1999; Hu *et al*. 1999).

En otra realización, los péptidos candidatos se ensayan para su capacidad de modular el estado de fosforilación de IL-1R o una parte de éste, o una proteína diana aguas arriba o aguas abajo en la ruta de IL-1R/IL-1RacP, usando por ejemplo un ensayo de quinasa *in vitro*.

En otras realizaciones, los péptidos candidatos dirigidos a IL-1R se ensayan para los niveles de PGE_2, expresión de IL-6 o colagenasa o cualquier otra molécula que tenga un nivel que se modifica después de la estimulación con IL-1 en células que expresan IL-1R/IL-1RacP, tales como condrocitos y fibroblastos.

Ensayos *in vivo*

Los ensayos descritos anteriormente pueden usarse como cribados iniciales o primarios para detectar compuestos líder prometedores para un desarrollo adicional. Los péptidos líder se ensayarán adicionalmente en cribados diferentes

adicionales. Por lo tanto, esta invención también incluye cribados de IL-1R secundarios que pueden implicar varios ensayos que utilizan líneas celulares de mamíferos que expresan estos receptores u otros ensayos.

Los cribados terciarios pueden implicar el estudio de los inhibidores identificados en modelos animales para síntomas clínicos. De acuerdo con esto, está en el alcance de esta invención usar adicionalmente un péptido identificado como se describe en la presente memoria en un modelo animal apropiado tal como una rata o un ratón. Por ejemplo, puede usarse un péptido en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, un agente identificado como se describe en la presente memoria puede usarse en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Además, esta invención se refiere a los usos de nuevos agentes identificados por los ensayos de cribado descritos anteriormente para tratamiento (por ejemplo, tratamientos de diferentes tipos de trastornos asociados con una desrregulación o disfunción del receptor de IL-1), como se describe en la presente memoria. Los modelos animales no limitativos que pueden usarse en dichos ensayos incluyen: artritis inducida con colágeno en la rata, modelo animal de IBD aguda, crecimiento tumoral en ratón inmunosuprimido, sensibilización de las vías aéreas en ratones recién nacidos y cualquier otro modelo animal conocido incluyendo animales transgénicos.

II. Preparación de péptidos

El péptido o derivados peptídicos de la presente invención se obtienen por cualquier método de síntesis peptídica conocido para los expertos en la técnica, incluyendo técnicas sintéticas (por ejemplo, síntesis en fase sólida exclusiva, síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis en disolución clásica) y recombinantes. Por ejemplo, los péptidos o derivados peptídicos pueden obtenerse por síntesis peptídica en fase sólida, que brevemente, consiste en acoplar el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal a una resina (por ejemplo, resina de benzhidrilamina, resina clorometilada, resina de hidroximetilo) y añadir sucesivamente aminoácidos N-alfa protegidos. Los grupos protectores pueden ser cualquier grupo conocido en la técnica. Antes de añadir cada nuevo aminoácido a la cadena en crecimiento, se elimina el grupo protector del aminoácido previo añadido a la cadena. Dicha síntesis en fase sólida se ha descrito, por ejemplo, por Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Vale *et al*., 1981, Science, 213: 1394-1397, en las Patentes US Nos. 4.305.872 y 4.316.891, Bodonsky *et al*., 1966, Chem. Ind. (Londres), 38: 1597; Pietta y Marshall, 1970, Chem. Comm. 650. El acoplamiento de los aminoácidos a resinas apropiadas también es muy conocido en la técnica y se ha descrito en la Patente US No. 4.244.946. (Revisado en Houver-Weyl, Methods of Organic Chemistry. Vol. E22a. Synthesis of Peptides and peptidomimetics, Murray Goodman, Editor jefe, Thieme. Stuttgart. Nueva York 2002).

Durante cualquier proceso de la preparación del compuesto de la presente invención, puede ser necesario y/o deseable proteger los grupos reactivos sensibles en cualquiera de las moléculas implicadas. Esto puede conseguirse mediante grupos protectores convencionales tales como los descritos en Protective Groups in Organic Synthesis por T.W. Greene y P.G.M. Wuts, 1991, John Wiley and Sons, Nueva York; y Peptides: chemistry and Biology por Sewald y Jakubke, 2002, Wiley-VCH, Wheinheim p. 142. Por ejemplo, los grupos protectores de alfa amino incluyen los grupos protectores de tipo acilo (por ejemplo, trifluoroacetilo, formilo, acetilo), grupos protectores de uretano alifático (por ejemplo, t-butiloxicarbonilo (BOC), ciclohexiloxicarbonilo), grupos protectores de tipo uretano aromático (por ejemplo, fluorenil-9-metoxi-carbonilo (Fmoc), benciloxicarbonilo (Cbz), derivados de Cbz) y grupos protectores de tipo alquilo (por ejemplo, trifenil metilo, bencilo). Los grupos protectores de la cadena lateral de los aminoácidos incluyen bencilo (para Thr y Ser), Cbz (Tyr, Thr, Ser, Arg, Lys), metil etilo, ciclohexilo (Asp, His), Boc (Arg, His, Cys) etc. Los grupos protectores pueden eliminarse en una etapa posterior conveniente usando métodos conocidos en la técnica.

En una realización, los péptidos de esta invención, incluyendo los análogos y otras variantes modificadas, pueden sintetizarse generalmente según el protocolo FMOC en una fase orgánica con grupos protectores. Pueden purificarse con un rendimiento de 70% con HPLC en una columna C18 y eluirse con un gradiente de acetonitrilo de 10-60%. Su peso molecular puede verificarse por espectrometría de masas (Revisado en Fields, G.B. "Solid-Phase Peptide Synthesis". Methods in Enzymology, Vol. 289, Academic Press, 1997).

Alternativamente, los péptidos de esta invención que consisten en aminoácidos genéticamente codificados pueden prepararse en sistemas recombinantes usando secuencias de polinucleótido que codifican los péptidos. Se entiende que un péptido de esta invención puede contener más de una de las modificaciones descritas anteriormente en el mismo péptido. También están incluidos en esta invención complejos de sal farmacéuticamente aceptables de los péptidos de esta invención o sus derivados.

La purificación del péptido o derivados peptídicos sintetizados se realiza por métodos estándar, incluyendo cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, exclusión por tamaño, afinidad), centrifugación, precipitación o cualquier técnica estándar para la purificación de péptidos y derivados peptídicos. En una realización, se emplea cromatografía en capa fina. En otra realización, se emplea HPLC en fase reversa. Pueden usarse en la presente invención otras técnicas de purificación muy conocidas en la técnica y adecuadas para el aislamiento y purificación de péptidos.

Cuando los procesos para la preparación de los compuestos según la presente invención dan lugar a mezclas de estereoisómeros, estos isómeros pueden separarse por técnicas convencionales tales como cromatografía preparativa. Los compuestos pueden prepararse en forma racémica, o los enantiómeros individuales pueden prepararse bien por síntesis enantioespecífica o por resolución. Los compuestos pueden resolverse, por ejemplo, en sus componentes enantiómeros por técnicas estándar tales como la formación de parejas diastereoisoméricas por formación de sal con un ácido ópticamente activo seguido de cristalización fraccionada y regeneración de la base libre. Los compuestos también pueden resolverse por formación de ésteres o amidas diastereoméricas, seguido de la eliminación del auxiliar quiral. Alternativamente, los compuestos pueden resolverse usando una columna de HPLC quiral.

III. Derivados peptídicos y peptidomiméticos

Los análogos peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Los tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o peptidomiméticos (Fauchere, J. 1986, Adv. Drug Res. 15: 29; Evans *et al*., 1987, J. Med. Chem. 30: 1229). Los miméticos de péptidos que están relacionados estructuralmente con péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o aumentado. Generalmente, los peptidomiméticos son similares estructuralmente al polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica) tal como polipéptidos de unión a receptor naturales pero tienen una o más uniones peptídicas reemplazadas opcionalmente por uniones como $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2-CH_2-$, -CH=CH- (cis y trans), $-CH_2SO-$, $-CH(OH)CH_2-$, $-COCH_2-$ etc., por métodos muy conocidos en la técnica (Spatola A.F., Peptide Backbone Modifications, Vega Data, marzo 1983, 1(3): 267; Spatola *et al*., Life Sci., 1986, 38: 1243-1249; Hudson D. *et al*., Int. J. Pept. Res. 1979., 14: 177-185; Weinstein. B., 1983, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Weinstein Eds, Marcel Dekker, Nueva York). Dichos miméticos de péptidos pueden tener ventajas significativas sobre los polipéptidos naturales incluyendo una producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas aumentadas (por ejemplo, vida media, absorción, potencia, eficiencia, etc), antigenicidad reducida y otras.

Aunque los péptidos son eficaces para inhibir IL-1 de tipo salvaje *in vitro*, su eficacia *in vivo* podría estar comprometida por la presencia de proteasas. Las proteasas séricas tienen requerimientos específicos de sustrato. El sustrato debe tener L-aminoácidos y uniones peptídicas para la escisión. Además, las exopeptidasas, que representan el componente más importante de la actividad proteasa en el suero, actúan habitualmente en el primer enlace peptídico del péptido y requieren un N-terminal libre (Powell *et al*. 1993). A la vista de esto, frecuentemente es ventajoso utilizar versiones modificadas de péptidos también denominadas análogos o derivados peptídicos. Los péptidos modificados retienen las características estructurales de los péptidos con L-aminoácidos originales que confieren la actividad biológica respecto a IL-1, pero ventajosamente no son susceptibles fácilmente a escisión por proteasas y/o exopeptidasas.

La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse para generar péptidos más estables. Así, un derivado peptídico de la presente invención puede ser un péptido todo L, todo D o mezcla de D y L. En una realización preferida, los péptidos consisten en todo D-aminoácidos. La presencia de un D-aminoácido N-terminal o C-terminal incrementa la estabilidad *in vivo* de un péptido ya que las peptidasas no pueden utilizar un D-aminoácido como sustrato (Powell *et al*. 1993). Los D-péptidos inversos son péptidos que contienen D-aminoácidos, dispuestos en una secuencia inversa respecto a un péptido que contiene L-aminoácidos. Así, el residuo C-terminal de un péptido con L-aminoácidos se vuelve N-terminal para el péptido con D-aminoácidos, y así sucesivamente. Los D-péptidos inversos retienen la misma conformación terciaria y por lo tanto la misma actividad, que los péptidos con L-aminoácidos, pero son más estables a la degradación enzimática *in vitro* e *in vivo* y así tienen una mayor eficacia terapéutica que el péptido original (Brady y Dodson 1994; Jameson *et al*. 1994). Además del D-péptido inverso, se pueden generar péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de la secuencia consenso sustancialmente idéntica por métodos muy conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, Ann. Rev. Biochem., 1992., 61: 387), por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro que ciclan el péptido. Los péptidos cíclicos no tienen extremos C o N libres. Así, no son susceptibles a la proteolisis por exopeptidasas, aunque por supuesto son susceptibles a endopeptidasas, que no escinden en los extremos del péptido. Así, las secuencias de aminoácidos de los péptidos con D-aminoácidos N-terminales o C-terminales y de los péptidos cíclicos son habitualmente idénticas a las secuencias de los péptidos a los que corresponden, excepto por la presencia de residuos de D-aminoácidos N-terminales o C-terminales, o su estructura circular, respectivamente.

Un derivado cíclico que contiene un puente disulfuro intramolecular puede prepararse por síntesis en fase sólida convencional mientras se incorporan residuos de cisteína u homocisteína protegidos en S adecuados en las posiciones seleccionadas para la ciclación tal como el extremo amino y carboxi (SahM *et al*., 1996., J. Pharm. Pharmacol. 48: 197). Después de finalizar el ensamblaje de la cadena, la ciclación puede realizarse bien (1) por eliminación selectiva del grupo protector de S con una oxidación posterior en soporte de las dos funciones SH libres correspondientes, para formar enlaces S-S, seguido de la eliminación convencional del producto del soporte y el procedimiento de purificación

apropiado; o (2) por la eliminación del péptido del soporte junto con la desprotección completa de la cadena lateral, seguido de oxidación de las funciones SH libres en una disolución acuosa altamente diluida.

El derivado cíclico que contiene un enlace amida intramolecular puede prepararse por síntesis en fase sólida convencional a la vez que incorpora derivados de aminoácidos con cadena lateral protegida en amino y carboxilo adecuados, en la posición seleccionada para la ciclación. Los derivados cíclicos que contienen enlaces S-alquilo intramoleculares pueden prepararse por fases sólidas convencionales a la vez que incorporan un residuo de aminoácido con una cadena lateral protegida en amino adecuada y un residuo de cisteína u homocisteína protegido en S adecuado en la posición seleccionada para la ciclación.

La sustitución de aminoácidos no naturales para aminoácidos naturales en una subsecuencia de los péptidos también puede conferir resistencia a la proteolisis. Dicha sustitución puede, por ejemplo, conferir resistencia a la proteolisis por exopeptidasas que actúan en el extremo N. Dichas sustituciones se han descrito y estas sustituciones no afectan a la actividad biológica. Los ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen aminoácidos α,α-disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácidos lácticos, C-α-metil aminoácidos y β-metil aminoácidos. Los análogos de aminoácidos útiles en la presente invención pueden incluir pero no están limitados a β-alanina, norvalina, norleucina, ácido 4-aminobutírico, ornitina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, ciclohexilalanina, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, fenilglicina, o-fosfoserina, N-acetil serina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina y otros aminoácidos no convencionales. Además, la síntesis de los péptidos con aminoácidos no naturales es rutinaria y conocida en la técnica.

Otra estrategia eficaz más para conferir resistencia a peptidasas que actúan en los residuos N-terminales o C-terminales de un péptido es añadir grupos químicos en el extremo del péptido, de manera que el péptido modificado no es ya sustrato para la peptidasa. Una de dichas modificaciones químicas es la glicosilación de los péptidos en uno o los dos extremos. Se ha mostrado que determinadas modificaciones químicas, en particular la glicosilación N-terminal, incrementan la estabilidad de los péptidos en el suero humano (Powell *et al*. 1993). Otras modificaciones químicas que aumentan la estabilidad en el suero incluyen, pero no están limitadas a, la adición de un grupo alquilo N-terminal, que consiste en un alquilo inferior de 1 a 20 carbonos, tal como un grupo acetilo, y/o la adición de un grupo amida o amida sustituido C-terminal. En particular, la presente invención incluye péptidos modificados que consisten en péptidos que presentan un grupo acetilo N-terminal y/o un grupo amida C-terminal.

Otros tipos de derivados peptídicos contienen restos químicos adicionales que normalmente no forman parte del péptido, siempre que el derivado retenga la actividad funcional deseada del péptido. Los ejemplos de dichos derivados incluyen (i) derivados N-acilo del amino terminal o de otro grupo amino libre, en el que el grupo acilo puede ser un grupo alcanoílo (por ejemplo, acetilo, hexanoílo, octanoílo), un grupo aroílo (por ejemplo, benzoílo) o un grupo bloqueante tal como F-moc (fluorenilmetil-O-CO-); (ii) ésteres del grupo carboxi terminal o de otro grupo carboxi o hidroxilo libre; (iii) amida del grupo carboxi terminal o de otro grupo carboxilo libre producida por reacción con amoniaco o con una amina adecuada; (iv) derivados fosforilados; (v) derivados conjugados con un anticuerpo u otro ligando biológico y otros tipos de derivados.

Las secuencias peptídicas más largas que resultan de la adición de residuos extra de aminoácidos a los péptidos deberían tener la misma actividad biológica (inhibir la activación del receptor de IL-1) que los péptidos descritos anteriormente. Sin embargo, se admitirá que algunos polipéptidos largos pueden asumir una configuración que enmascara la secuencia eficaz, evitando de esta manera la unión a IL-1R. Estos derivados podrían actuar como antagonistas competitivos y de esta manera se excluyen de la invención.

Otros derivados son péptidos duales que consisten en dos del mismo o dos péptidos diferentes unidos covalentemente entre sí bien directamente o mediante un espaciador, tal como una cadena corta de residuos de alanina o por un sitio potencial para proteolisis (por ejemplo, por catepsina, véanse la Patente US No. 5.126.249 y la Patente Europea No. 495.049). Los péptidos multiméricos consisten en polímeros de moléculas formados a partir del mismo péptido o de péptidos diferentes o derivados de éstos.

Las proteínas quiméricas o de fusión comprenden un péptido unido en su extremo amino o carboxi terminal, o ambos, a una secuencia de aminoácidos de una proteína diferente. Dicha proteína quimérica o de fusión puede producirse por expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica la proteína. Dicha proteína quimérica o de fusión puede contener al menos 6 aminoácidos de un péptido y tiene una actividad funcional equivalente o mayor a la del péptido.

Los derivados peptídicos pueden prepararse alterando las secuencias de aminoácidos por sustituciones, adiciones o deleciones que proporcionan moléculas funcionalmente equivalentes, o moléculas con funciones aumentadas o disminuidas, según se desee.

Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos en una secuencia pueden sustituirse por otro aminoácido con una polaridad similar, que actúa como un equivalente funcional, lo que resulta en una alteración silenciosa. La sustitución

para un aminoácido en la secuencia puede seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen leucina, isoleucina, alanina, fenilalanina, valina, prolina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares no cargados incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido glutámico y ácido aspártico. El aminoácido glicina se incluye a veces en la familia de los aminoácidos no polares y a veces en la familia de los aminoácidos no cargados (neutros).

En la presente memoria se describen péptidos antagonistas que comprenden las secuencias TTI-101.140, TTI-101.141, TTI-101.125, TTI-101.110, TTI-101.111, TTI-101.136 y TTI-101.143.

IV. Ensayos para identificar peptidomiméticos

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos no peptídicos generados para replicar la geometría del núcleo y la presentación del farmacóforo (peptidomiméticos) de los péptidos identificados por los métodos descritos en la presente memoria poseen frecuentemente atributos de mayor estabilidad metabólica, mayor potencia, mayor duración de la acción y mejor biodisponibilidad.

Los compuestos peptidomiméticos descritos pueden obtenerse usando cualquiera de las numerosas estrategias en métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase sólida o en fase de disolución espacialmente dirigidas; métodos de biblioteca sintética que requieren desconvolución; el método de la biblioteca "un lecho un compuesto"; y métodos de biblioteca sintética usando selección por cromatografía de afinidad. La estrategia de la biblioteca biológica está limitada a bibliotecas de péptidos, mientras que las otras cuatro estrategias son aplicables a bibliotecas de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas de compuestos (Lam, Anticancer Drug Des. 12: 145, 1997). Los ejemplos de los métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo en: DeWitt *et al*. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6909; Erb *et al*. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 11422; Zuckermann *et al*. (1994) J. Med. Chem. 37: 2678; Cho *et al*. (1993) Science 261: 1303; Carell *et al*. (1994) Angew. Chem. Int. Ed Engl. 33: 2059; e ibid 2061; y en Gallop *et al*. (1994) Med. Chem. 37: 1233. Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (por ejemplo, Houghten (1992) Biotechniques 13: 412-421) o en lechos (Lam (1991) Nature 354: 82-84), chips (Fodor (1993) Nature 364: 555-556), bacterias o esporas (Ladner USP 5.223.409), plásmidos (Cull *et al*. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990); Science 249: 386-390). Los ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo en: De Witt *et al*. (1993) *supra*; Erb *et al*. (1994) *supra*; Zuckermann *et al*. (1994) *supra*; Cho *et al*. (1993) *supra*; Carrell *et al*. (1994) *supra*, o luciferasa, y el marcador enzimático puede detectarse por la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

Una vez que se identifica un péptido de la presente invención, éste puede aislarse y purificarse por cualquiera de los diferentes métodos estándar incluyendo pro no limitado a solubilidad diferencial (es decir, precipitación), centrifugación, cromatografía (afinidad, intercambio iónico, exclusión por tamaño y semejantes) o por cualquier otra técnica estándar usada para la purificación de péptidos, peptidomiméticos o proteínas. Las propiedades funcionales de un péptido de interés identificado pueden evaluarse usando cualquier ensayo funcional conocido en la técnica. En una realización, se usan ensayos para evaluar la función aguas abajo del receptor en la señalización intracelular (por ejemplo, síntesis de PGE_2).

Los compuestos peptidomiméticos descritos en la presente memoria pueden obtenerse con el proceso de tres fases siguiente: 1) escanear los péptidos de la presente invención para identificar las regiones de estructura secundaria necesarias para el reconocimiento y actividad frente al receptor de IL-1; 2) usar sucedáneos dipeptídicos conformacionalmente constreñidos para refinar la geometría del núcleo y proporcionar plataformas orgánicas correspondientes a estos sucedáneos; y 3) usar las mejores plataformas orgánicas para presentar farmacóforos orgánicos en bibliotecas de candidatos diseñadas para mimetizar la actividad deseada del péptido nativo. Con más detalle, las tres fases son como sigue: En la fase 1, los líderes peptídicos se escanean y su estructura se resume para identificar los requerimientos para su actividad. Se sintetiza una serie de análogos peptídicos del original. En la fase 2, los mejores análogos peptídicos se investigan usando los sucedáneos dipeptídicos conformacionalmente constreñidos. Se usan los aminoácidos indolizidin-2-ona, indolizidin-9-ona y quinolizidinona (I^2aa, I^9aa y Qaa, respectivamente) como plataformas para estudiar la geometría del núcleo de los mejores candidatos peptídicos. Éstas y plataformas relacionadas (Revisado en Halab, Li; Gosselin, F; Lubell, WD; Biopolymers (Peptide Science) Vol 55, 101-122, 2000; Hanessian, S.J. McNaughton-Smith G; Lombart, H-G.; Lubell, WD. Tetrahedron Vol. 53, 12789-12854, 1997) pueden introducirse en regiones específicas del péptido con el fin de orientar los farmacóforos en diferentes direcciones. La evaluación biológica de estos análogos identifica líderes mejorados que mimetizan los requerimientos geométricos para actividad. En la fase 3, las plataformas de los líderes más activos se usan para presentar sucedáneos orgánicos de los farmacóforos responsables de la actividad del péptido nativo. Los farmacóforos y andamios se combinan en un formato

de síntesis paralela. Por supuesto, la derivatización de los péptidos y las diferentes fases, por lo tanto, puede hacerse por otros medios y métodos conocidos en la técnica.

Las relaciones estructura función determinadas a partir de los péptidos, o derivados peptídicos, de la presente invención pueden usarse para refinar y preparar estructuras moleculares análogas que tienen propiedades similares o mejores.

En conclusión, los péptidos y derivados peptídicos de la presente invención son funcionalmente activos (es decir, capaces de presentar una o más de las actividades funcionales identificadas asociadas con un péptido de la presente invención). Por ejemplo, dichos péptidos y derivados peptídicos que inhiben una propiedad deseada (por ejemplo, unión de IL-1RacP a una proteína o ligando correspondiente) pueden usarse como inhibidores de dicha propiedad y sus correlatos fisiológicos. Los péptidos y derivados de los péptidos de la presente invención pueden ensayarse para la inhibición de la señalización celular a través del receptor IL-1R/IL-1RacP por cualquier ensayo funcional conocido en la técnica (por ejemplo, síntesis de PGE_2).

V. Composiciones farmacéuticas

Los péptidos y derivados peptídicos de la presente invención interaccionan con e inhiben la actividad del receptor de IL-1. A la vista de la importancia de la función de IL-1 y/o del receptor IL-1R/IL-1RacP en numerosas rutas y afecciones en animales, los péptidos y derivados peptídicos de la presente invención son útiles en el tratamiento de afecciones o enfermedades asociadas con la respuesta a IL-1 (por ejemplo, sobreexpresión o señalización anormal de IL-1 a través de IL-1R/IL-1RacP).

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un péptido o derivado peptídico. En una realización, se proporciona una cantidad eficaz de una composición terapéutica que comprende un péptido o derivado peptídico de éste y un vehículo farmacéutico adecuado para uso en la inhibición de la actividad biológica de IL-1R/IL-1RacP para prevenir, mejorar los síntomas o tratar un trastorno, enfermedad o afección relacionada con la señalización anormal a través de IL-1R/IL-1RacP (por ejemplo, sobreestimulación del receptor IL-1R/IL-1RacP mediante la sobreproducción del ligando de IL-1R/IL-1RacP o mediante un receptor constitutivamente activo o cualquier otro defecto). En una realización, el trastomo, enfermedad o afección que se va a tratar está en un animal. En otra realización, el trastorno, enfermedad o afección que se va a tratar está en un mamífero y preferiblemente un ser humano.

Los péptidos y derivados peptídicos de la presente invención se usan en el tratamiento, profilaxis o mejora de los síntomas en cualquier enfermedad, afección o trastorno en la que la inhibición de la actividad biológica de IL-1R/IL-1RacP pueda ser beneficiosa. Las enfermedades, afecciones o trastornos para las que los péptidos o derivados peptídicos de la presente invención pueden ser beneficiosos incluyen, pero no están limitados a, los ejemplos siguientes: inflamación crónica y aguda de enfermedades como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, choque séptico, osteoartritis, psoriasis, encefalitis, glomerulonefritis, síndrome de distrés respiratorio y síndrome de Reiter. Otras afecciones incluyen, lupus eritematoso sistémico, escleroderma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria de las articulaciones, caquexia en determinadas leucemias, enfermedad de Alzheimer, numerosos tipos de cánceres, diabetes mellitus juvenil, hipertensión pulmonar, ictus, leucopenia periventricular y meningitis.

La composición en el alcance de la presente invención debería contener el agente activo (por ejemplo, el péptido o derivado peptídico) en una cantidad eficaz para conseguir el efecto terapéutico deseado evitando efectos secundarios adversos. Las preparaciones y sales del agente activo farmacéuticamente aceptables están en el alcance de la presente invención y son muy conocidas en la técnica. Para la administración de los antagonistas polipeptídicos y semejantes, la cantidad administrada debería elegirse de manera que se eviten efectos secundarios adversos. La cantidad de la composición terapéutica o farmacéutica que es eficaz en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza y gravedad de la enfermedad, del sitio diana de acción, del peso del paciente, dietas especiales que el paciente está siguiendo, medicaciones simultáneas que se están usando, la ruta de administración y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica. La dosificación se adaptará por el médico según factores convencionales tales como el grado de la enfermedad y los diferentes parámetros del paciente. Típicamente, se administrarán al sujeto 0,001 a 100 mg/kg/día. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de las curvas de respuesta a la dosis obtenidas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales. Por ejemplo, con el fin de obtener una dosis eficaz en mg/kg para seres humanos tomando como base los datos generados en estudios en ratas, la dosificación eficaz en mg/kg en la rata se divide por seis.

Varios sistemas de administración son conocidos y pueden usarse para administrar los péptidos o derivados peptídicos o una composición farmacéutica de la presente invención. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por cualquier ruta adecuada incluyendo, inyección intravenosa o intramuscular, inyección intraventricular o intratecal (para la administración en el sistema nervioso central), por ruta oral, tópica, subcutánea, subconjuntival, o por la rutas intranasal, intradérmica, sublingual, vaginal, rectal o epidural.

Otro sistema de administración muy conocido en la técnica puede usarse para la administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, por ejemplo, mediante disoluciones acuosas, encapsulación en micropartículas o microcápsulas.

En otra realización más, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase Smolen y Ball, Controlled Drug Bioavailability, Drug product design and performance, 1984, John Wiley & Sons; Ranade y Hollinger, Drug Delivery Systems, pharmacology and toxicology series, 2003, 2ª edición, CRRC Press), en otra realización, puede usarse una bomba (Saudek *et al*., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574).

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse por el uso de anticuerpos monoclonales como vehículos individuales a los que se acoplan las moléculas del compuesto. Los compuestos de la presente invención también pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada del fármaco, los ejemplos no limitativos incluyen: ácido poliláctico, poliortoésteres, copolímeros en bloque anfipáticos entrecruzados e hidrogeles, ácido polihidroxi butírico y polidihidropiranos.

Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un péptido o derivado peptídico combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término vehículo se refiere a diluyentes, adyuvantes, excipientes tales como un material de relleno o un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un acondicionador de flujo de sílice, un agente estabilizante o vehículos con los que se administra el péptido o derivado peptídico. Dichos vehículos farmacéuticos incluyen líquidos estériles tales como agua y aceites incluyendo aceite mineral, aceite vegetal (por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de colza), aceite animal o aceite de origen sintético. El glicerol acuoso o disoluciones de dextrosa así como disoluciones salinas también pueden emplearse como vehículos líquidos de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Por supuesto, la elección del vehículo depende de la naturaleza del péptido o derivado peptídico, de su solubilidad y de otras propiedades fisiológicas así como del sitio diana de administración y aplicación. Por ejemplo, los vehículos que pueden penetrar la barrera hemato-encefálica se usan para el tratamiento, profilaxis o mejora de los síntomas de enfermedades o afecciones (por ejemplo, inflamación) en el sistema nervioso central. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy por Alfonso R. Gennaro, 2003, 21ª edición, Mack Publishing Company.

Los materiales farmacéuticamente adecuados adicionales que pueden incorporarse en las preparaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen potenciadores de la absorción, reguladores del pH y tampones, ajustadores de la osmolaridad, conservantes, estabilizantes, antioxidantes, tensioactivos, espesantes, emoliente, agentes dispersantes, agentes saporíferos, agentes colorantes y agentes humectantes.

Los ejemplos de excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, agua, glucosa, sacarosa, lactosa, glicol, etanol, monoestearato de glicerol, gelatina, arroz, harina de almidón, tiza, estearato de sodio, malta, cloruro de sodio y semejantes. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar la forma de disoluciones, cápsulas, comprimidos, cremas, geles, polvos, formulaciones de liberación sostenida y semejantes. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos (véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy por Alfonso R. Gennaro, 2003, 21ª edición, Mack Publishing Company). Dichas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición terapéutica, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporciona la forma para administración apropiada en el sujeto. Las formulaciones se diseñan de manera que se adecuen al modo de administración y el sitio diana de la acción (por ejemplo, un órgano o tipo celular particular).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las que forman con grupos amino libres y las que reaccionan con grupos carboxilo libres. Las sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos y de amonio no tóxicas usadas comúnmente en la industria farmacéutica incluyen sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario, amoniaco y protamina cinc, que se preparan por métodos muy conocidos en la técnica. El término también incluye sales de adición a ácido no tóxicas, que se preparan generalmente haciendo reaccionar los compuestos de la presente invención con ácidos orgánicos o inorgánicos adecuados. Las sales representativas incluyen las sales hidrobromuro, hidrocloruro, valerato, oxalato, oleato, laureato, borato, benzoato, sulfato, bisulfato, acetato, fosfato, tisolato, citrato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, napsilato y semejantes.

Los ejemplos de materiales de relleno o aglutinantes que pueden usarse según la presente invención incluyen acacia, ácido algínico, fosfato de calcio (dibásico), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, dextrina, dextratos, sacarosa, tilosa, almidón pregelatinizado, sulfato de calcio, amilosa, glicina, bentonita, maltosa, sorbitol, etilcelulosa, fosfato de hidrógeno disodio, fosfato de disodio, pirosulfito de disodio, alcohol polivinílico, gelatina, glucosa, goma de guar, glucosa líquida, azúcar comprimible, silicato

de magnesio y aluminio, maltodextrina, óxido de polietileno, polimetacrilatos, povidona, alginato de sodio, tragacanto, celulosa microcristalina, almidón y zeína. Otro material de relleno o aglutinante más preferido consiste en celulosa microcristalina.

Los ejemplos de agentes disgregantes que pueden usarse incluyen ácido algínico, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilcelulosa (poco sustituida), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa de sodio, crospovidona, metilcelulosa, polacrilin potasio, povidona, alginato de sodio, glicolato sódico de almidón, almidón, disulfito de disodio, edatamil disodio, edetato de disodio, disodiometilendiaminotetraacetato (EDTA), polivinilpirolidinas entrecruzadas, almidón pregelatinizado, carboximetil almidón, carboximetil almidón de sodio, celulosa microcristalina.

Los ejemplos de lubricantes incluyen estearato de calcio, aceite de colza, palmitoestearato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado (tipo I), óxido de magnesio, estearato de magnesio, aceite mineral, poloxámero, polietilen glicol, lauril sulfato de sodio, estearato fumarato de sodio, ácido esteárico, talco y, estearato de cinc, behapato de glicerilo, lauril sulfato de magnesio, ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, benzoato de sodio/acetato de sodio (en combinación), DL leucina.

Los ejemplos de acondicionadores del flujo de sílice incluyen dióxido de silicio coloidal, silicato de magnesio y aluminio y goma guar. Otro acondicionadore de flujo de sílice más preferido consiste en dióxido de silicio.

Los ejemplos de agentes estabilizantes incluyen acacia, albúmina, alcohol polivinílico, ácido algínico, bentonita, fosfato de dicalcio, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, dióxido de silicio coloidal, ciclodextrinas, monoestearato de glicerilo, hidroxipropil metilcelulosa, trisilicato de magnesio, silicato de magnesio y aluminio, propilen glicol, alginato de propilen glicol, alginato de sodio, cera de carnauba, goma de xantano, almidón, estearato(s), ácido esteárico, monoglicérido esteárico y alcohol estearílico.

La presente invención también proporciona modificaciones de los péptidos o derivados peptídicos de manera que son más estables una vez administrados a un sujeto (es decir, una vez administrado tiene una vida media más larga o un periodo de eficacia más largo comparado con la forma no modificada). Dichas modificaciones son muy conocidas para los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención (por ejemplo, derivatización con polietilen glicol. a.k.a. PEGilación, microencapsulación, etc).

Los antagonistas de IL-1R/IL-1RacP de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes activos útiles para el tratamiento, profilaxis o mejora de los síntomas de una enfermedad o afección asociada con IL-1, IL-1R/IL-1RacP. Así, las composiciones y métodos de la presente invención pueden usarse en combinación con otros agentes que presentan la capacidad de modular la actividad de IL-1 (por ejemplo, la síntesis, liberación y/o unión a IL-1R/IL-1RacP) o de reducir los síntomas de una enfermedad asociada con IL-1 (por ejemplo, artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria del intestino). Los ejemplos de dichos agentes incluyen pero no están limitados a fármacos antirreumáticos tales como cloroquina, auranofina (Ridaura™), dexametasona, aurotiomalato de sodio, metotrexato (véase Lee *et al*., 1988, Proc. Int. Acad. Sci. 85: 1204), probucol (véase Ku *et al*., 1988, Am. J. Cardiol. 62: 778), pentoxifilina (por ejemplo, Sullivan *et al*., 1988, Infect. Immun. 56: 1722), disulfiram (véase Marx 1988, Science, 239: 257), antioxidantes tales como ácido nordihidroguaiarético (Iee *et al*., 1988, Int. J. Immunopharm., 10: 385), Trampa de IL-1 (véase, por ejemplo, 2003, Curr. Opin. Inv. Drugs, 4(5): 593-597), Anakinra (Kineret™, Solicitud PCT WO 00236152), leflunomida, corticosteroides (Medrol™, Deltasona™, Orasona™) así como otros agentes tales como los descritos en Bender y Lee (1989) Annual Reports in Medicinal Chemistry, capítulo 20: Pharmacological Modulation of IL-1: 185-193). También pueden usarse otros fármacos en combinación con los compuestos de la presente invención como fármacos anti-inflamatorios tales como Fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (NSAIDS, por ejemplo, Rofecoxib (VIOXX™), Celecoxib (Celebrex™), Valdecoxib (Bextra™), Aspirina™, advil™), fármacos anti-TNFα (Infliximab, etanercept, adalimumab), inhibidores de colagenasa y otros. Por supuesto, también puede usarse una combinación de dos o más péptidos y derivados y su combinación con uno o más fármacos, en todas las combinaciones (por ejemplo, uno o más péptidos con uno o más fármacos, etc.).

La presente invención se ilustra con más detalle con los ejemplos no limitativos siguientes. Los ejemplos se proporcionan sólo para ilustración y no debe considerarse que limitan el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

EFECTO DEL PÉPTIDO API-101

Un ejemplo de la eficacia de los compuestos y métodos de la presente invención se representa por los resultados obtenidos con el péptido identificado API-101 (SEQ ID NO 1: APRYTVELA).

Todos los péptidos descritos en los ejemplos siguientes se han sintetizado según el protocolo FMOC de síntesis en fase sólida en una fase orgánica con grupos protectores. Se han purificado con un rendimiento del 70% con HPLC en una columna C18 y se han eluido con un gradiente de acetonitrilo de 10-60%. Su peso molecular se ha verificado por espectrometría de masas. Por supuesto, como se ha aludido anteriormente, cuando se usan aminoácidos naturales, éstos pueden obtenerse por técnicas de ingeniería genética como se conoce en la técnica.

El efecto proliferativo de IL-1 se midió en células de carcinoma A549 en presencia del péptido API-101 (SEQ ID NO: 1) y de IL-1 (10 ng/ml) usando el método de la incorporación de timidina tritiada. Las células A549 se pre-incubaron (45 min.) con diferentes concentraciones de los péptidos antes de la estimulación con IL-1β (10 ng/ml) (37^0C) durante 24 h; se omitió el suero fetal de ternera 24 h antes de la estimulación con IL-1β para evitar los efectos proliferativos por otros agentes mitóticos. Se añadió ^{3}H-timidina (1 μCi/ml) durante 24 h, después de lo cual las células se lavaron tres veces con 10% TCA frío y se lisaron con 0,1 N NaOH/0,1% Tritón X-100. La radiactividad se midió con un contador de centelleo. Los experimentos se repitieron 3 veces en duplicado. Como se observa en la Figura 1, el péptido suprimió completamente la inhibición por IL-1 de la proliferación con una CI_{50} de 10^{-6}M.

Es muy conocido en la técnica que IL-1 induce la síntesis de la prostaglandina E_2 (PGE_2) en células endoteliales y/o condrocitos *in vitro*. Por lo tanto, los condrocitos humanos y las células del endotelio microvascular de cerebro de lechones se pre-incubaron 45-60 minutos a 37^0C con péptido API-101 (10^{-6}M) y se añadió IL-1 humana (10 ng/ml) en el medio de crecimiento. Después de 24 horas de incubación, el medio de crecimiento se recogió y se evaporó. La medida de PGE_2 se determinó por ensayo RIA con un kit comercial (Cederlane).

La Figura 2 muestra que la síntesis de PGE_2 inducida por IL-1 (10 ng/ml) disminuyó de manera importante más del 50% con API-101 (SEQ ID NO: 1) a una concentración de 10^{-6}M con una CI_{50} de 10^{-6}M (Figura 3).

Caracterización *ex vivo*

En otro experimento, se realizaron estudios de vasomotricidad en vasos piales de lechón para evaluar adicionalmente el efecto particular de API-101 (SEQ ID NO: 1) en el efecto vasodilatador de IL-1β.

La respuesta vasomotora *ex vivo* en vasos cerebrales se realizó como se ha descrito (Li *et al*., 1996; Hou *et al*., 2000; Hou *et al*., 2001; Hou *et al*., 2003). Los cerebros se extirparon de lechones Yorkshire. Secciones de corteza exponiendo los vasos piales se fijaron a una base de cera de un baño de 20 ml que contiene tampón Krebs (pH 7,4) equilibrado con 95% O_2, 5% CO_2 y mantenido a 37^0C. Los microvasos se visualizaron y registraron usando una cámara de vídeo montada en un microscopio de disección. El diámetro vascular se midió un analizador de imágenes digital. El diámetro vascular se registró antes y después de la aplicación tópica del agente pre-constrictor, U46619 (10^{-7} M). Después de la estabilización de la preparación, el ligando (IL-1β, 75 ng/ml) se añadió hasta que se detectó una vasodilatación estable. Los péptidos se añadieron posteriormente a diferentes concentraciones de 10^{-10} a 10^{-5} M. La reversión de la vasodilatación se visualizó y midió como se ha descrito previamente (Hou *et al*. 2000; Hou *et al*. 2001; Hou *et al*. 2003); se realizaron medidas en triplicado en 2 animales.

Como se observa en la figura 4, API-101 (SEQ ID NO: 1) pudo evitar la vasodilatación inducida por IL-1β (75 ng/ml) con una CI_{50} de 182 nM.

En resumen, estos resultados muestran que tomando el receptor IL-1R/IL-1RacP como diana, API-101 (SEQ ID NO: 1) fue eficaz en la inhibición de la respuesta biológica de IL-1.

EJEMPLO 2

EFECTO DE LOS DERIVADOS DE API-101 OBTENIDOS POR ESCANEO DE ALANINA

Habiendo demostrado un efecto significativo del antagonista API-101 (SEQ ID NO: 1), se realizaron experimentos para proporcionar datos de relaciones estructura función para API-101 y derivados, para identificar las regiones más importantes para la actividad. Por lo tanto, se realizaron mutaciones por escaneo de alanina en API-101 (SEQ ID NO: 1) (véase la Figura 17 para la secuencia de los péptidos). Por supuesto, podrían haberse usado otros aminoácidos en lugar de la alanina para realizar el experimento de escaneo.

Caracterización *in vitro*

Una tabla con el resumen de los resultados dependiendo de las mutaciones realizadas se muestra en la Figura 17.

Las eficacias y las actividades inhibidoras de los péptidos mutados se determinaron midiendo la inhibición de la síntesis de PGE_2 inducida por IL-1 (véase el protocolo experimental anterior en el Ejemplo 1). API-101.1 (SEQ ID NO: 2) tuvo una eficacia sólo ligeramente mejorada en las células endoteliales y en condrocitos comparado con el péptido parental API-101 (SEQ ID NO: 1). Por otra parte, API-101. 5 (SEQ ID NO: 6), -101.6 (SEQ ID NO: 7), y -101.7 (SEQ ID NO: 8)

perdieron casi toda la actividad en ambos tipos de células lo que sugiere que la región VELA diana es importante para la actividad del péptido. La Figura 5 muestra una representación gráfica de los péptidos más eficaces de la serie. Todos los péptidos se ensayaron a concentración 10^{-6} M.

Caracterización *ex vivo*

También se realizaron estudios de vasomotricidad en péptidos con escaneo de alanina API-101 (véase el ejemplo 1 para el protocolo experimental). La Figura 6 muestra que API-101 (SEQ ID NO: 1), -101.1, -101.3 y -101.6 (SEQ ID NOs: 2, 4 y 7, respectivamente) todos revirtieron la vasodilatación inducida por IL-1β (75 ng/ml) y que API-101.1 (SEQ ID NO: 2) mostró una actividad inhibidora ligeramente incrementada sobre API-101 y suprimió el 70% de la vasodilatación.

Globalmente, las mutaciones o sustituciones no incrementaron significativamente las actividades de los derivados peptídicos sobre la de API-101 (SEQ ID NO: 1), pero se obtuvo información acerca de una región importante para la actividad del péptido.

EJEMPLO 3

EFECTO DE LA OPTIMIZACIÓN ADICIONAL DE API-101 SOBRE LA MEJORA DE SU ACTIVIDAD

Para mejorar adicionalmente la actividad y para validar las conclusiones del escaneo de alanina obtenidas en la región en API-101 importante para su actividad, los aminoácidos desde el extremo N-terminal del péptido se truncaron gradualmente. La Figura 7 muestra la secuencia de los nuevos péptidos así como el patrón general de optimización empleado para API-101.

Caracterización *in vitro*:

IL-1β induce la proliferación de células fibroblásticas humanas. Los péptidos truncados se ensayaron para proliferación inducida por IL-1β de WI-38 (fibroblastos de pulmón humano) con el protocolo de captación de timidina tritiada (véase el protocolo del ejemplo 1).

Respecto a API-101 (SEQ ID NO: 1) que suprimió el 65% de la proliferación inducida por IL-1R; API-101.10 (SEQ ID NO: 10) y API-101.11 (SEQ ID NO: 11) suprimieron el 100% de la proliferación inducida por IL-1β (Figura 8).

También se realizó la determinación de la síntesis de PGE_2 inducida por IL-1 en los derivados truncados de API-101. La Figura 18 muestra un resumen de la potencia así como de la eficacia de los diferentes péptidos. API-101.10 (SEQ ID NO: 10) fue el péptido truncado más eficaz y potente con una CI_{50} 0,2 nM y 1,2 nM en células WI-38 y endoteliales comparado con API-101 (790 nM y 220 nM). API-101.11 (SEQ ID NO: 11) y 12 (SEQ ID NO: 12) mostraron una disminución en la potencia y eficacia, lo que indicó que el truncamiento del péptido después de la arginina influía en la potencia y la eficacia de éste.

Citotoxicidad

También se determinó la citotoxicidad de los últimos derivados de API-101 en dos tipos de células: WI-38 y células del endotelio microvascular de cerebro. La viabilidad celular se ensayó como se ha descrito previamente (Beauchamp *et al*. 2001; Brault *et al*. 2003). Las células endoteliales y fibroblásticas se incubaron con péptidos a varias concentraciones a 37^0C durante 24 h. Se añadió MTT (bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) en PBS al medio de crecimiento a una concentración final de 500 μg/ml. Las células con MTT se incubaron durante 2 h a 37^0C. El medio de crecimiento se aspiró y se añadieron 200 μl de una disolución 24:1 de isopropanol:HCl 1N en cada pocillo para lisar las células. Las células viables transforman el producto MTT (mediante la mitocondria) en un producto colorimétricamente mensurable (azul) denominado formazán. La producción de formazán (y la viabilidad celular) se determinó midiendo la densidad óptica de 100 μl de lisado a 600 nm.

Las células no mostraron ninguna toxicidad cuando se expusieron a 10^{-5} M de los péptidos durante 24 horas como se muestra en la figura 9.

Caracterización *ex vivo*

También se realizaron experimentos de vasomotricidad para evaluar el efecto de API-101.10 (SEQ ID NO: 10) (el péptido que ha mostrado la mejor actividad *in vitro*) en la vasodilatación inducida por IL-1 (para el protocolo, véase el Ejemplo 1). API-101.10 (SEQ ID NO: 10) mostró la mejor CI_{50} a 10,8 nM y fue 100 veces más potente que API-101 (182 nM) (Figura 18). Los péptidos 101.9 (SEQ ID NO: 9), 101.11 (SEQ ID NO: 11) y 101.12 (SEQ ID NO: 12) mostraron una CI_{50} mejor que API-101 (SEQ ID NO: 1) (Figura 18 y Figura 10). El intervalo de concentración para los péptidos en la Figura 10 fue de 10^{-10} M a 10^{-5} M. Así, en los experimentos *ex vivo*, API-101.11 (SEQ ID NO: 11) y API-101.12 (SEQ ID NO: 12) mostraron actividades inhibidoras significativamente mejoradas comparados con el péptido parental.

Caracterización *in vivo*

Efectos sistémicos de los antagonistas peptídicos de IL-1R/IL-1RacP

Los derivados de API-101, API-101.10 (SEQ ID NO: 10) (y otros) se ensayaron para evaluar si podían revertir las acciones fisiológicas del ligando natural *in vivo* inyectando el derivado a través de la yugular o directamente en el estómago (para verificar la estabilidad del péptido a través del tracto digestivo). Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley (300 g) con isoflurano (2,5-4%). El ligando natural (IL-1β) o vehículo (disolución salina) se inyectó a través de la vena yugular (5 μg/kg). Se extrajo sangre de la arteria carótida para las medidas posteriores de PGE_2 antes y 10 min después de cada inyección. Los péptidos se administraron (dosificación basada en los valores de CI_{50} y un volumen de distribución equivalente al espacio extracelular) bien en la vena yugular o directamente en el estómago (5 veces la dosis usada por ruta intravenosa, (iv)). Se monitorizaron continuamente la presión sanguínea arterial y el ritmo cardiaco (Gould) mientras que la temperatura y los gases sanguíneos (Radiometer) se midieron para análisis rutinario como se ha descrito previamente (Li *et al*. 1997; Hardy *et al*. 1999; Najarian *et al*. 2000). Los experimentos se repitieron 3 veces.

Se observó una hipotensión severa inducida por IL-1β cuando se administró a las ratas por cualquiera de las rutas mencionadas anteriormente. Los péptidos siguientes constituyen antagonistas ejemplares que fueron capaces de evitar la hipotensión *in vivo*:

1. API-101.10 (SEQ ID NO: 10): Cuando se administró por inyección en la yugular después de la inyección de IL-1β (5 μg/kg) evitó la hipotensión un 95% a una concentración de 10^{-8} M (es decir, mitigando la hipotensión inducida por iL-1). Otros derivados como API-101.9 (SEQ ID NO: 9) también fueron capaces de evitar este efecto biológico de IL-1β pero fueron menos eficaces que los péptidos API-101.10 (SEQ ID NO: 10), 101.101 (SEQ ID NO: 13) o los peptidomiméticos, 101.109, 101.111 y 11.112 (Figura 20) pero significativamente mejores que el control de disolución salina (figura 11 A). Esto demuestra claramente que los péptidos tienen un efecto hipertensor *in vivo* en animales, revirtiendo el efecto de IL-1β.

2. Cuando se administró directamente en el estómago, a una concentración de 10^{-5} M, el péptido redujo la hipotensión de IL-1β un 60%. Este resultado demostró que la administración entérica del péptido 101.10 (SEQ ID NO: 10) mantenía todavía un efecto principal en la hipotensión inducida por IL-1β (Figura 12A) y puede mantener así la eficacia y estabilidad a lo largo del tracto digestivo.

Otra manera de evaluar el efecto de los antagonistas del receptor de IL-1 de la presente invención en la actividad de IL-1R *in vivo* es midiendo los niveles de PGE_2 en el suero de ratas.

Si el antagonista del receptor IL-1R de la presente invención puede evitar la hipotensión *in vivo* debería ser capaz de evitar también la síntesis de PGE_2. PGE_2 se midió por lo tanto en el suero de las ratas usadas para los experimentos mencionados anteriormente (por ejemplo, medida de la variación de la Presión Sanguínea Arterial). Los ejemplos de resultados obtenidos con los péptidos derivados truncados de API-101 se describen a continuación.

Una vez más, se mostró que API-101.10 (SEQ ID NO: 10) era el más eficaz de los derivados de API-101 ensayados para evitar la síntesis de PGE_2 (60%) cuando el péptido se inyectó en la yugular. Se obtuvo una inhibición mayor cuando el péptido se inyectó directamente en el estómago (Figuras 11 B y 12B).

Optimización adicional de API-101.10

API-101.10 (SEQ ID NO: 10) se identificó como el mejor derivado peptídico a partir del último ciclo de optimización. Así, el truncamiento de API-101 de 9 a 7 aminoácidos desde el N-terminal podía mejorar la potencia sin comprometer la eficacia *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

La Figura 15 muestra las siguientes mutaciones que se realizaron en API-101.10 (SEQ ID NO: 10). La arginina de API-101.10 (SEQ ID NO: 10) se reemplazó por citrulina - para cambiar de una guanidina a un grupo urea cerca del N-terminal. También se realizaron otras mutaciones (por ejemplo, E a Q en API-101.102, SEQ ID NO: 14 y 101.13, SEQ ID NO: 15) y un péptido truncado en el C-terminal (API-101.108, SEQ ID NO: 20) para mejorar la potencia y eficacia de los péptidos.

La Figura 15 muestra una caracterización *in vitro* de estos péptidos. La medida de PGE_2 se realizó con células del endotelio microvascular de cerebro de lechones y fibroblastos humanos WI-38. Algunas de las mutaciones fueron ventajosas y proporcionaron incrementos importantes en la potencia. Por ejemplo: API-101.103 (SEQ ID NO: 15) y 101.107 (SEQ ID NO: 19) mostraron una potencia más de 1.000 veces mejor con CI_{50} de 0,05 pM y 0,1 pM en células humanas WI-38.

Para estos péptidos recién derivados, se realizaron experimentos *ex vivo*. Los tejidos de cerebro se incubaron con los péptidos e IL-1β y se midió GMPc con un kit comercial (Amersham bioscience, sistema de ensayo de GMPc biotrack™). API-101.10 (SEQ ID NO: 10) inhibió ya el 85% de la producción de GMPc inducida por IL-1β (10^{-6} M) y API-101.103 (SEQ ID NO: 15) y 101.106 (SEQ ID NO: 18) inhibieron más del 90% de la producción de GMPc (resultados no mostrados). Parece así que la eliminación de la carga negativa del glutamato y la eliminación de la treonina pueden mejorar la potencia del antagonista. Debe indicarse que se mostró que la actividad de API-101.10 (SEQ ID NO: 10) era superior a la del fármaco de Amgen Kineret™ (datos no mostrados).

Conjuntamente, la presente invención demuestra claramente que API-101 es un antagonista potente y eficaz del receptor de IL-1. Además, demuestra claramente que empezando a partir de API-101 (SEQ ID NO: 1), los inventores pueden obtener, de una manera sistemática, antagonistas incluso más potentes y eficaces (como se muestra por una comparación de la CI_{50} de API-101 y la de los derivados de la serie 101.100). La presente invención proporciona por lo tanto los medios para identificar nuevos antagonistas del receptor IL-1R/IL-1RacP y su uso para tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con un defecto en la ruta que implica a IL-1R/IL-1RacP.

EJEMPLO 4

EFICACIA DE API-101 EN UN MODELO DE RATA DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA DEL INTESTINO (IBD)

IBD es una inflamación crónica del tracto gastrointestinal con una incidencia alta en la población humana. El presente experimento se hizo con el fin de verificar si el péptido API-101.10 (SEQ ID NO: 10) podía evitar otro proceso inflamatorio más en un modelo animal de IBD inducida con el ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS). TNBS causa una respuesta T_H-1 mediada por IL-12 caracterizada por la infiltración transmural de neutrófilos y macrófagos, úlceras con fisuras y fibrosis submucosal característica de la inflamación intestinal aguda y la enfermedad de Crohn (Bouma y Strober 2003).

Modelo de enfermedad inflamatoria del intestino:

La inflamación del colon se indujo por administración intra-rectal/colon del hapteno ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) en ratas Sprague-Dawley macho (175-200 g) (Bouma, Nature Rev, 2003; Morris, Gastroenterology, 1989). Los animales se anestesiaron con isoflurano y TNBS disuelto en 50% etanol (vol/vol). Se administraron 120 mg(ml (TNBS) en el colon (volumen total de 0,25 ml por rata) usando un tubo de polietileno (PE50). La cánula se insertó a 8 cm del ano y se mantuvo en ese lugar durante al menos 15 min después de la administración de TNBS con el fin de evitar la expulsión de la disolución. Dos horas antes de la administración de TNBS, el derivado de API-101, API-101.10 (SEQ ID NO: 10), (1,1 mg/kg) ó disolución salina al 0,9% se administró por vía intravenosa a través de la vena caudal (volumen total de 0,3 ml). API-101.10 (2,2 mg/kg, 6 veces la dosis usada para los experimentos de presión sanguínea basado en t½=2-3 h para varios péptidos) o disolución salina al 0,9% se infundieron continuamente usando bombas cebadas alzet intraperitoneales. A un tercer grupo (control) no se le inyectó TNBS. Seis días después de la administración de TNBS, las ratas se sacrificaron por inhalación de CO_2. Se eligió el día 6 como punto final porque alrededor del día 7 empieza la regeneración tisular espontánea y esto puede enmascarar el efecto terapéutico del péptido o derivado peptídico ensayado. El colon se extirpó y se examinó macroscópicamente (adhesiones, úlceras, decoloración y hemorragia) e histológicamente (infiltración de neutrófilos, lesión epitelial, alteración de las criptas y úlceras) (Anthony *et al*. 1995; Padol *et al*. 2000; Dieleman, LA, *et al*. 1997; Torres MI *et al*. 1999). Se estudiaron dos animales por grupo.

Se cortaron secciones histológicas transversales a 4-6 cm de la región anal próxima y se tiñeron con el método de hematoxilina/eosina.

El modelo de TNBS de enfermedad inflamatoria del intestino reproduce las características inflamatorias y lesiones tisulares de la enfermedad de Crohn (por ejemplo, en los seres humanos). Como se muestra en la Figura 14 A y B, morfológicamente, el colon de los animales a los que se inyectó TNBS presentaba engrosamiento, edema y decoloración de la pared intestinal lo que indica una inflamación significativa. Las características macroscópicas de los colones de los animales pre-tratados con API-101.10 (SEQ ID NO: 10) se asemejan a las de los animales control (Figura 14 C). Las características histológicas consistieron en infiltración de neutrófilos en la capa epitelial y las criptas (véase la Figura 16 B), lesión en el revestimiento epitelial así como pérdida de criptas (Figura 16 B). El pre-tratamiento de los animales con API-101.10 (SEQ ID NO: 10) evitó el daño en el colon inducido por TNBS. En la Figura 16, se puede apreciar que la organización e integridad de las criptas en el colon tratado con API-101.10 (SEQ ID NO: 10) se conserva incluso si todavía hay algo de inflamación (se usó la mitad de la dosis de API-101.10 comparada con el experimento del análisis macroscópico). Las lesiones en el revestimiento epitelial mostradas en la Figura 16 B se evitan completamente en los animales tratados con API-101.10 (SEQ ID NO: 10) (Figura 16 C). Por lo tanto, los antagonistas de IL-1R de la presente invención también son extremadamente eficaces en un modelo animal de enfermedad inflamatoria del intestino.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

PEPTIDOMIMÉTICOS API-101.109, API-101.110

Los peptidomiméticos se sintetizaron y se cribaron *in vitro*. Los peptidomiméticos se obtienen de API-101.10 (SEQ ID NO: 10) o API-101.107 (SEQ ID NO: 19) y las estructuras primarias son: para API-101.109 RY(HyVal)PELA (figura 20) y para API-101.110 RY(I^2aa)ELA (Figura 21) en los que HyVal es beta-Hidroxivalina e I^2aa es aminoácido indolizidin-2-ona (ácido 2-oxo-3-amino-azabiciclo[4.3.0]nonano-9-carboxílico). Estos peptidomiméticos también son D-péptidos.

Metodología:

Preparación del soporte sólido

Se lavó la resina de hidrocloruro de benzhidrilamina (2 g, Advanced Chemtech, Lote # 11988, 100-200 mesh, carga 1,2 mmoles/g) durante un min tres veces con 10 ml/g de cada uno de los reactivos siguientes: 5% DIEA/CH_2Cl_2; CH_2Cl_2; DMF. La resina se trató con una disolución de ácido *N*-(Fmoc)aminocaproico (1,27 g, 3,6 mmoles, 150% en moles), TBTU (1,27 g, 3,96 mmoles, 165% en moles), DIEA (690 μL, 3,96 mmoles, 165% en moles) y HOBt (535 mg, 3,96 mmoles, 165% en moles) en DMF (20 ml, 10 ml/g de resina) y se agitó durante 1 h cuando se observó un ensayo de Kaiser negativo. La resina se lavó con 10 ml/g de las disoluciones siguientes en una secuencia alternante: DMF (3 x 1 min) y alcohol isopropílico (3 x 1 min). La resina se trató con piperidina en DMF (20% v/v, 20 ml, 1 x 2 min, 1 x 3 min, 1 x 10 min), seguido de una secuencia alternante de 10 ml/g de DMF (3 x 1 min) y alcohol isopropílico (3 x 1 min). La resina se agitó con una disolución de ácido 4-[(*R*,*S*)-α-1-(9H-fluoren-9-il)-metoxi-formamido]-2,4-dimetoxibencil]-fenoxiacético (conector de Knorr, 1,94 g, 3,6 mmoles, 150% en moles), TBTU (1,27 g, 3,96 mmoles, 165% en moles) y DIEA (690 μL, 3,96 mmoles, 165% en moles) en DMF (20 ml) durante 1 h. La resina se lavó secuencialmente con 10 ml/g de las disoluciones siguientes: DMF (3 x 2 min), alcohol isopropílico (3 x 2 min) y CH_2Cl_2 (3 x 2 min). El secado de la resina bajo vacío alto toda la noche rindió 3,66 g de resina.

Determinación de la carga

Se mezclaron piperidina (20 g) y DMF (20 g). A una cantidad de esta disolución (20 ml, 18,08 g) en un vial de muestra se añadió resina seca (20 mg) y la suspensión se agitó suavemente pasando una corriente de argón. Después de 50 min, se dejó que la resina se asentara. Una alicuota de la disolución (1 ml) se diluyó 50 veces con etanol y se midió la absorbancia a 301 nm [(N-(9-fluorenil-metil)piperidina UV λ_{max} 267 nm (ε 17.500), 290 (5.800) y 301 (7.800)]. Dos determinaciones independientes (promediadas) proporcionaron A_{301} = 0,0785. La ecuación siguiente: [c (mmoles/g) = (DO x 50 x 10^2)/7.800] proporcionó c = 0,50 mmoles/g (Meienhofer *et al*. 1979).

Síntesis de Péptidos

Los aminoácidos se obtuvieron de Advanced Chemtech (Louisville, KY) y se usaron como los derivados siguientes: *N*-Fmoc-D-Ala-OH•H_2O, *N*-Fmoc-D-Leu-OH, *N*-Fmoc-D-Glu(O-*t*-Bu)-OH, *N*-Fmoc-D-Pro-OH, *N*-Fmoc-D-Tyr(O-*t*-Bu), *N*-Fmoc-D-Arg(Pmc)-OH. Se preparó (*R*)-β-hidroxi-*N*-(Fmoc)valina a partir de (*R*)-β-hidroxi-*N*-(Boc)valina (Dettwiler *et al*. 2003) por eliminación del grupo Boc (1:1 TFA (ácido trifluoroacético)/CH_2Cl_2), protección con Fmoc-OSu y $NaHCO_3$ en acetona acuosa (Capatsanis *et al*. 1983), seguido de purificación por cromatografía en gel de sílice (1:1:98 MeOH/HOAc/$CHCl_3$) y liofilización de acetonitrilo acuoso (rendimiento 78%). Se preparó ácido (3*R*,6*R*,9*R*)-2-Oxo-3-[*N*-(Fmoc)amino]-1-azabiciclo[4.3.0]-nonano-9-carboxílico a partir de 2-oxo-3-amino-1-azabiciclo[4.3.0]-nonano-9-carboxilato de (3*R*,6*R*,9*R*)-metilo (a su vez preparado (Lombart *et al*. 1996) a partir de ácido D-glutámico) por protección Fmoc con Fmoc-OSu y $NaHCO_3$ en acetona acuosa (Capatsanis *et al*. 1983), seguido de hidrólisis selectiva del éster metílico (Pascal *et al*. 1998). La síntesis peptídica se realizó en una escala de 0,1 mmoles (200 mg de resina) y se llevó a cabo por desprotección con piperidina en DMF (10 ml/g de resina, 20% v/v, 1 x 2 min, 1 x 3 min, 1 x 10 min) seguido de lavado con DMF (10 ml/g de resina, 5 x 1 min). El aminoácido protegido con Fmoc (0,5 mmoles, 500% en moles) disuelto en una disolución de TBTU en DMF (0,25 M, 2 ml) se añadió a la resina. Después de agitar la resina (5 min), se añadió DIEA (0,6 mmoles, 600% en moles) y la agitación continuó durante 1 h. La resina se lavó con DMF (10 ml/g de resina, 5 x 1 min) y la eficacia del acoplamiento se determinó usando el ensayo de Kaiser. La resina se agitó usando un aparato vórtex mecánico durante las secuencias de acoplamiento, lavado y desprotección. El análisis por Rp-HPLC se realizó en una columna Alltech C18 (dimensiones 250 mm x 4,6 mm) usando mezclas acetonitrilo/agua/TFA, en las que el disolvente A = agua/0,1% TFA y el disolvente B = MeCN/0,1% TFA (véase a continuación). La velocidad de caudal fue 0,5 ml/min y la detección se realizó a 214 nm.

Peptidomimético API-101.109 (KH-C29099)

La escisión de la resina (180 mg) con desprotección simultánea de la cadena lateral se realizó tratando la resina con 20 ml/g de una mezcla que contiene TFA (82,5%), tioanisol (5%), agua (5%), fenol (5%) y trietil silano (2,5%) y agitando con un aparato vórtex mecánico durante 1 h a temperatura ambiente. La filtración, lavado con TFA (2 x 1 ml) y precipitación en Et_2O a 0^0C posteriores proporcionaron el péptido. El aislamiento del péptido crudo como la sal dihidrocloruro por liofilización de una disolución de HCl (1 M) proporcionó un polvo blanco (18 mg) que se mostró que era ≥90% puro por

rp-HPLC (RT = 14,6 min) usando un eluyente de 5-40% B en A durante 20 min. LRMS calcd para $C_{39}H_{64}N_{11}O_{11}$ (MH^+) 862, encontrado 862.

Peptidomimético API-101.110 (KH-C50110)

La escisión de la resina (22 mg) con desprotección simultánea de la cadena lateral se realizó tratando la resina con 20 ml/g de una mezcla que contiene TFA (82,5%), tioanisol (5%), agua (5%), fenol (5%) y trietil silano (2,5%) y agitando con un aparato vórtex mecánico durante 1 h a temperatura ambiente. La filtración, lavado con TFA (2 x 1 ml) y precipitación en Et_2O a 0^0C posteriores proporcionaron el péptido. El aislamiento del péptido crudo como la sal dihidrocloruro por liofilización de una disolución de HCl (1 M) proporcionó un polvo blanco (5,7 mg) que se mostró que era ≥85% puro por rp-HPLC (RT = 19,8 min) usando un eluyente de 5-40% B en A durante 20 min. LRMS calcd para $C_{38}H_{60}N_{11}O_{10}$ (MH^+) 830, encontrado 830.

Resultados:

El ensayo de la síntesis de PGE_2 inducida por IL-1 en células endoteliales se usó como un ensayo de cribado para los peptidomiméticos. El compuesto peptidomimético API-101.110 (Figura 21) tuvo una potencia de 0,2 pM de CI_{50}, que es 10 veces mayor que la de API-101.107 (SEQ ID NO: 19) con el doble de eficacia que el último. El compuesto API-101.109 (Figura 20) también mostró una potencia mejorada en la inhibición de PGE_2 (CI_{50}) (Figura 19) pero su K_D es demasiado alta para ser un fármaco eficaz.

EJEMPLO 6

EFICACIA DE API-101.10, API-101.107 Y API-101.113 EN UN MODELO DE RATA DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA DEL INTESTINO (IBD)

Se realizaron experimentos adicionales con el fin de verificar si los péptidos líder TTI-101.10, denominado previamente API-101.10 (SEQ ID NO: 10), TTI-101.107 y TTI-101.113 (también denominados 101.107 y 101.113, respectivamente; o API-101.107 y API-101.113, respectivamente) podían evitar las características inflamatorias en el modelo animal de IBD descrito en el Ejemplo 4. La inflamación del colon se indujo por administración intra-rectal/colon del hapteno ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) como se ha descrito en el Ejemplo 4. Dos horas antes de la administración de TNBS, los péptidos, peptidomiméticos o disolución salina al 0,9% se administraron por vía intravenosa (iv) a través de la vena caudal (varias concentraciones de mg/kg/d) (volumen total de 0,3 ml). Para la infusión continua, API-101.10 (u otros péptidos o peptidomiméticos) (2,2 mg/kg, 4 veces la dosis usada para los experimento de presión sanguínea basado en t½ = 2-3 h de varios péptidos) o disolución salina al 0.9% se infundieron continuamente usando bombas cebadas alzet intraperitoneales. A un tercer grupo (control) no se le inyectó TNBS. Para la administración intermitente, quince minutos después de la administración de TNBS, se administraron 101.10 (0,25-1 mg/kg), 101.107 (0,2 mg/kg), 101.113 (0,05-1 mg/kg) por inyección intraperitoneal (ip) intermitente. Además, estos antagonistas de IL-1R se proporcionaron dos veces al día (BID); Remicade® (anti-TNFα) (10 mg/kg) y dexametasona (0,75 mg/kg) se administraron por vía intraperitoneal pero sólo una vez al día (qd). La administración intrarrectal (ir) de 101.10, 101.113 (1 y 2,5 mg/kg) y 5-ASA (50 mg/kg) se hizo una hora después de la administración de TNBS y dos veces al día, excepto para 5-ASA que se hizo una vez al día. Finalmente, 101.10 (1-5 mg/kg) también se administró oralmente por sonda nasogástrica (po), dos veces al día. Cuarenta y ocho horas después de la administración de TNBS, las ratas se sacrificaron por inhalación de CO_2. El colon se extirpó y se evaluó macroscópicamente (adhesiones, úlceras, decoloración y hemorragia) e histológicamente (infiltración de neutrófilos, lesión epitelial, alteración de la criptas y úlceras). Se estudiaron uno a siete animales por grupo según los tratamientos. La actividad mieloperoxidasa (MPO) se midió en lisados de tejidos.

Resultados:

Como se ha mencionado previamente, el modelo animal de TNBS es un modelo *in vivo* válido para enfermedad inflamatoria en los seres humanos y, más particularmente, de enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) ya que reproduce las características inflamatorias y lesiones tisulares de la enfermedad de Crohn. Como se muestra en la Tabla 2, las inyecciones intraperitoneales continuas e intermitentes de antagonistas de la presente invención (por ejemplo, péptidos, derivados peptídicos y peptidomiméticos) a diferentes dosificaciones evitó los daños tisulares debidos a la inflamación tales como formación de úlceras, pérdida de criptas y lesión en el revestimiento del epitelio.

Los animales que recibieron bombas osmóticas intraperitoneales (infusión continua) que contienen 101.10 y 101.107 demostraron reducciones importantes de la actividad MPO, puntuación macroscópica e histológica, superior o equivalente en eficacia a Kineret (Tabla 2). La administración intermitente de 101.10, 101.107 (sólo una concentración) y 101.113 reveló una eficacia dependiente de la dosis de una administración dos veces al día que sobrepasa la observada con los agentes utilizados actualmente para IBD, concretamente dexametasona, Remicade® y 5-ASA. La observación macroscópica de lesiones colónicas se puntuó (4 observadores ciegos) y los animales tratados con los péptidos (BID)

presentaron menos adhesiones y úlceras (menos del 50% comparado con los animales tratados con TNBS). Los animales también parecían considerablemente más vigorosos.

Tabla 2: Resumen de los resultados *in vivo*

Tratamiento	dosis (mg/kg/d)	n=	MPO (% de TNBS+Disolución salina)	evaluación macroscópica (puntuación media)	evaluación histológica (puntuación media)
TNBS + Disolución salina	120 mg/ml	6	100	2/2	5/5
Infusión continua (ip)					
TNBS + 101.10	0,25	2	34	nd	2
TNBS + 101.10	0,75	2	54	nd	4,4 (n=1)
TNBS + 101.10	2,2	3	46±22	nd	2(2)
TNBS + 101.10	4,0	2	82	nd	2
TNBS + 101.107	0,5	2	37	nd	1,5
TNBS + Kineret	8,0	2	63	nd	2
Inyección intermitente (ip)					
TNBS + 101.10	0,25 - BID	2	85	0,87	2,25
TNBS + 101.10	0,50 - BID	2	126	0,87	3
TNBS + 101.10	1,0 - BID	6	47±9	0,8±0,1	1,25 (1-2,8)**
TNBS + 101.10	1,0 - qd	2	67	1,63	5
TNBS + 101.10 (12 h después de TNBS)	1,0 - BID	7	123±18*	1,1±0,1	2,6
TNBS + 101.107	0,2 - BID	2	112	1,37†	2,5
TNBS + 101.113	0,05 - BID	1	57	1,25†	nd
TNBS + 101.113	0,2 - BID	2	112	1,13†	2,6
TNBS + 101.113	0,5 - BID	1	45	0,75†	nd
TNBS + 101.113	1,0 - BID	1	67	1,75	nd
TNBS + Disolución salina	120 mg/ml	6	100	2/2	5/5
Inyección intermitente (ip)					
TNBS + Remicade	10,0 -qd	3	88±41	0,5	2,5 (1-3,75)**
TNBS + Dexametasona	0,75 - qd	2	60	0,87	3
Administración intrarrectal					
TNBS + 101.10 + PEG-400	1,0 - BID	2	110	1,25†	3,2
TNBS + 101.10	2,5 - BID	6	111±25	1,4±0,1	nd
TNBS + 101.10 + PEG-400	2,5 - BID	2	59	1,17†	3,9

TNBS + 101.113	1,0 - BID	1	31	1,5	nd
TNBS + 101.113	2,5 - BID	1	20	1,75	nd
TNBS + 5-ASA	50,0 - qd	2	49	1,5	3,3
Administración oral					
TNBS + 101.10	5,0 - BID	1	65	0,75	2,25
TNBS + 101.10 + PEG-400	1,0 - BID	2	167	1,0	3,5
TNBS + 101.10 + PEG-400	2,5 - BID	2	176	1,25	3,5
TNBS + 101.10 + PEG-400	5,0 - BID	2	57	1,5	3,6

nd: no determinado

* Nota: la infiltración de leucocitos ya ha ocurrido ** Intervalo

† Los animales eran considerablemente más vigorosos

TABLA 3: Sistema de Puntuación de Lesiones Histológicas

	Puntuación
Sin lesión	1
Úlcera pequeña (< 5 criptas)	2
Úlcera media (5-10 criptas)	3
Úlcera grande (10-20 criptas)	4
Denudación importante (>20 criptas)	5

(adaptado de Peterson *et al*., Dig Dis Sci, 2000)

La Figura 22 muestra una representación gráfica de la puntuación macroscópica de cada péptido para una concentración particular y la lista de las características evaluadas. Además, como puede verse en la Figura 23, los animales tratados con inyecciones intermitentes de los péptidos presentaron 20 a 50% menos infiltraciones de neutrófilos (ensayo de mieloperoxidasa) comparado con el control TNBS. El examen de las secciones histológicas reveló que los animales tratados con los péptidos presentaron menos características de lesión colónica inducida por la inflamación. El sistema de puntuación de lesión histológica usado se muestra en la Tabla 3 y los resultados se esquematizan en la Figura 24. Por supuesto, podrían usarse y adaptarse otros sistemas de puntuación por el experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Por lo tanto, se puede apreciar la reducción en la cantidad de úlceras y lesión en el revestimiento del epitelio en el Panel C y D de la Figura 25, comparado con el Panel B que representa el tejido inflamado. Además, la administración de los agentes de las presentes invenciones (por ejemplo, péptido) 12 horas después de la inducción con TNBS también resultó en la reducción de la inflamación colónica. El mantenimiento de la alta actividad mieloperoxidasa se debe al hecho de que la infiltración de neutrófilos había ocurrido ya antes del tratamiento.

Con el fin de demostrar que los péptidos de la presente invención pueden administrarse por otros medios y que reducen la inflamación generada con TNBS, API-101.10 y API-101.113 se inyectaron por vía intrarrectal. El nivel de inflamación se ensayó macroscópicamente e histológicamente como anteriormente. Como puede verse en la Tabla 2, API-101.10 a 2,5 mg/kg/d redujo sustancialmente (50%) la actividad MPO y evitó parcialmente los daños tisulares colónicos.

API-101.10 también se administró por otros medios: sonda nasogástrica (dos veces al día) para demostrar la estabilidad del péptido a través del tracto digestivo. A la concentración de 5,0 mg/kg/d, API-101.10 reduce sustancialmente las características inflamatorias así como la actividad MPO, validando de esta manera la estabilidad de los compuestos de la presente invención.

EJEMPLO 7

DERIVADOS Y MÍMICOS DEL PÉPTIDO TTI-101.107

Usando TTI-101.107 (SEQ ID NO: 19 y Figura 15; CI_{50} de 1,2 pM) como péptido líder, se diseñaron, sintetizaron y ensayaron varias series de análogos para establecer la importancia de cada residuo.

Estructura frente a actividad:

Como puede verse en la Tabla 4, cuando la D-arginina terminal se acetiló para proporcionar el compuesto TTI-101.121 (SEQ ID NO:29), la actividad del péptido se perdió completamente. Por otra parte, el residuo de arginina puede reemplazarse con ornitina o lisina y el péptido resultante mantiene su actividad (TTI-101.114, SEQ ID NO: 22; y TTI-101.115, SEQ ID NO: 23). Parece así que el grupo guanidina de la arginina (como con ornitina) puede ser importante para la actividad del péptido.

A partir de los datos obtenidos por los reemplazos en los residuos de D-Treonina y D-valina mostrados previamente anteriormente (véanse las Figuras 15 y 19) usando los péptidos TTI-101.105 (SEQ ID NO:17) y 101.106 (SEQ ID NO:18), y el peptidomimético TTI-101.109, se planteó la hipótesis de un potencial para una región de giro acerca de estos residuos y se generaron dos mímicos peptídicos introduciendo los dos aminoácidos (3R,6R,9R;TTI-101.110) y (3S,6S,9S; TTI-101.112)-indolizadin-2-ona (R- y S-I2aa). Estos peptidomiméticos mostrados en la Figura 26, mimetizan giros beta de tipo II y tipo II', respectivamente. El peptidomimético TTI-101.110 presentó una actividad de 10 pM (Figura 26), comparable a la del péptido 101.107 del que se obtiene.

La importancia de la posición del glutamato se abordó usando TTO-101.117 (SEQ ID NO:25), TTI-101.118 (SEQ ID NO:26) y TTI-101.123 (SEQ ID NO:31), en los que el glutamato se reemplaza con aspartato, asparagina y alanina, respectivamente. Los resultados muestran (Tabla 4) que la eliminación del carboxilato o carboxamida es perjudicial para la función del péptido.

Para examinar los residuos D-leucinil-D-alanina C-terminales se generó una serie de derivados con deleciones y sustituciones: TTI-101.113 (SEQ ID NO:21),; TTI-101.119 (SEQ ID NO:27) y TTI-101.120 (SEQ ID NO:28). La deleción del residuo D-alanina da lugar al hexapéptido TTI-101.113 ((SEQ ID NO:21) Tabla 4) que tiene una actividad 7-30 pM. La modificación del residuo de leucina resultó en pérdida del intervalo de actividad.

Tomando como base los datos mostrados anteriormente, se sintetizaron dos compuestos miméticos más (véase la Figura 26): TTI-101.124 (ry[R-I2aa]el que mostró una CI_{50} de 2,4 μM y una eficacia de 100%; Figura 26) y TTI-101.125 ((D-orn)y[R-I2aa]ela que mostró una CI_{50} de 90 pM y 100% de eficacia; Figura 26).

Derivados del péptido 101.113

Tomando como base los péptidos líder (101.107 rytpela (SEQ ID NO:19), 101.10 rytvela (SEQ ID NO:10) y 101.113 rytpel (SEQ ID NO:21), se preparó otra serie de análogos para examinar adicionalmente la relación estructura-actividad (relación estructura-función) de los péptidos y derivados.

Explorando la importancia del aminoácido básico terminal arginina, una serie de análogos ha mostrado que la actividad disminuía relativamente cuando la parte guanidina se reemplazaba con una amina básica. De hecho, los compuestos TTI-101.126 (SEQ ID NO:32), TTI-101.133 (SEQ ID NO:37) y TTI-101.134 (SEQ ID NO:38) presentaron poca o nada de actividad (Tabla 5). Cuando se invirtió la estereoquímica como en TTI-101.135 (SEQ ID NO:39), en la que la arginina "R" es un L-aminoácido, al contrario que un D-aminoácido en SEQ ID NO: 21, la actividad disminuyó pero no se perdió completamente (Tabla 5).

Como se muestra adicionalmente en la Tabla 5, la actividad del péptido 101.113 también disminuyó relativamente cuando el residuo aromático tirosina, con su grupo fenólico, se reemplazó con el residuo aromático fenilalanina (101.132; SEQ ID NO: 36) o triptófano (101.128; SEQ ID NO: 34). La eliminación del grupo hidroxilo en TTI-101.127 (SEQ ID NO:33) suprimió completamente la actividad del péptido, pero el reemplazo de tirosina con triptófano disminuyó, pero mantuvo, la actividad.

El reemplazo de la leucina C-terminal con valina también causó una disminución en la actividad, lo que demuestra una importancia de la longitud del residuo hidrofóbico, como puede observarse en la Tabla 5 con TTI-101.129 (SEQ ID NO:35) (rytpev 400 nM; 50%).

Tomando como base el peptidomimético líder (TTI-101.125; Figura 26) se preparó otra serie de miméticos.

Usando residuos aza-aminoácido para reemplazar respectivamente los residuos de tirosina, leucina y alanina, se prepararon las series 101.136 a 101.140 y 101.141-101.144 (Figuras 27 y 28). Como los aza-aminoácidos pueden

mejorar la resistencia de los péptidos a la degradación enzimática, el mantenimiento de la actividad en determinados análogos ejemplifica un medio para incrementar la duración de su acción *in vivo*. Estas últimas modificaciones dieron lugar al desarrollo del compuesto TTI-101.140. Las Figuras 29 y 30 muestran la estructura y actividad de los peptidomiméticos 101.125, 101.136-101.144 y en particular la potencia y eficacia del mimético 101.140 que mostró una actividad incrementada.

Tabla 4: Proliferación y síntesis de PGE_2 inducidas por IL-1β en presencia de peptidomiméticos

Péptidos	**Secuencia**	**Proliferación en células TF-1 (humanas)**		**Síntesis de PGE2 en células endoteliales (porcinas)**	
		CI_{50}	Emax (%)	CI_{50}	Emax (%)
101.113	rytpel	30 pM	100	7,4 pM	80
101.114	kytpela	nd	nd	2 pM	50
101.115	[orn]ytpela	~1 pM	100	nd	nd
101.116	rwtpela	0,5 pM	75	13 pM	45
101.117	rytpdla	nd	nd	10 pM	100
101.118	rytpgla	nd	nd	nd	nd
101.119	rytpefa	nd	nd	nd	nd
101.120	rytpema	nd	nd	nd	nd
101.121	[Ac]rytpela	nd	nd	nd	nd
101.122	rytpepa	nd	nd	nd	nd
101.123	rytpala	nd	nd	nd	nd

Tabla 5: Caracterización de los derivados del péptido 101.113 en la proliferación de TF-1 inducida por IL-1β

Péptido	**Secuencia**	**CI50**	**Emax (%)**
101.113	rytpel	7 pM	70
101.126	[Orn]ytpel	*	0
101.127	rfvpela	nd	<30
101.128	rwtpel	3 nM	100
101.129	rytpev	400 nM	50
101.132	rftpel	4 nM	35
101.133	kytpel	nd	<10
101.134	[Cit]ytpel	10 μM	10
101.135	Rytpel	2 nM	63

* No pudo determinarse La "R" indica un L-aa

CONCLUSIONES

En resumen, la presente invención describe antagonistas eficaces y potentes del receptor IL-1R/IL-1RacP que pueden suprimir los efectos biológicos de la interleuquina-1 *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Estos péptidos fueron eficaces *in vitro* en

diferentes tipos celulares y frente a diferentes efectos biológicos (proliferación y síntesis de PGE_2), *ex vivo* por la supresión del efecto vasomotor de IL-1 en vasos piales y síntesis de PGE_2 en tejidos de muestra recientes. Además, estos derivados de API-101 también fueron muy eficaces *in vivo* cuando se administraron sistémicamente y directamente en el estómago. El último resultado obtenido con la administración en el estómago muestra que los péptidos de la presente invención tienen el potencial de ser activos cuando se administran oralmente. Esto se demostró de hecho cuando se usó una sonda nasogástrica. De forma más importante, en un modelo de rata establecido de Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD), API-101.10 pudo evitar los daños en el colon inducidos por inyección de TNBS en la rata. Tomando como base los resultados con otros derivados (de la serie 101.100), se ha demostrado que estos derivados peptídicos son agentes anti-inflamatorios potentes, como se demuestra por su papel en la prevención del daño en el colon inducido por inyección de TNBS en la rata.

La presente invención muestra que los péptidos de la presente invención tienen efectos claros en varias rutas que implican IL-1R/IL-1RacP. El potencial terapéutico y profiláctico de la presente invención tiene por lo tanto impactos amplios para los animales en general y más particularmente para los mamíferos y especialmente para los seres humanos.

Tomando como base la descripción de la presente memoria, los expertos en la técnica pueden desarrollar ensayos de cribado para péptidos y derivados peptídicos que son útiles para identificar más compuestos inhibidores del receptor IL-1R/IL-1RacP o para mejorar los ejemplificados en la presente memoria. Los ensayos de la presente invención pueden desarrollarse para formatos de cribado de rendimiento bajo, rendimiento alto o rendimiento ultra alto. Por supuesto, los ensayos de la presente invención incluyen ensayos que son susceptibles de automatización.

Así, mediante el trabajo con péptidos que poseen aminoácidos naturales, la presente invención demuestra que son compuestos potentes y eficaces en estudios *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, TTI-101.107 (SEQ ID NO: 19 y 113 [SEQ ID NO: 21]). Además, la presente invención proporciona una descripción inicial del farmacóforo y conformación necesarios para la actividad y los péptidos y miméticos derivados de esto.

Debe indicarse que la invención proporciona un líder hexapeptídico: TTI-101.113 (rytpel ([SEQ ID NO: 21] que tiene una actividad muy significativa (7,4 pM; 80% de eficacia). Se generaron mímicos o miméticos adicionales con aminoácido indolizadinona para reemplazar la región central D-treonina-d-valina(D-Pro) permitiendo de esta manera la identificación de los mímicos líder TTI-101.125 y TTI-101.140.

Por supuesto, la combinación de antagonistas de la presente invención o una combinación de éstos con fármacos conocidos podría incrementar más el potencial de desarrollo médico, clínico y farmacológico de la presente invención.

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente en la presente memoria mediante las realizaciones ilustrativas de ésta, un experto en la técnica apreciará que a partir de la lectura de esta descripción pueden hacerse varios cambios en la forma y detalle sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS

Anthony D., Savage F.*et al,* (1995)."The characterization of a rabbit model of inflammatory bowel disease." Int. J. Exp. Path 76 :215-224.

Asadullah K, Sabat R, Friedrich M, Volk HD, Sterry W. Interleukin-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis.Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2004 Jun;3(2):185-92

Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. Prog. Retin Eye Res. 2004. Sep 23(5) 561-77.

Baker, F. L., L. J. Sanger, *et al.* (1995). "Cell proliferation kinetics of normal and tumour tissue *in vitro*: quiescent reproductive cells and the cycling reproductive fraction." Cell Prolif **28**(1): 1-15.

Beauchamp, M. H., A. K. Martinez-Bermudez, *et al.* (2001). "Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy." J Appl Physiol **90**(6): 2279-88.

Bouma, G. y W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **3**(7): 521-33.

Brady, L. y G. Dodson (1994). "Drug design. Reflections on a peptide." Nature **368**(6473): 692-3.

Brault, S., A. K. Martinez-Bermudez, *et al.* (2003). "Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-Iso-prostaglandin F2alpha: possible role in ischemic brain injury." Stroke **34**(3): 776-82.

Casadio, R., E. Frigimelica, *et al.* (2001). "Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex." FEBS Lett **499**(1-2): 65-8.

Cheviron, N., C. Grillon, *et al.* (1996). "The antiproliferative activity of the tetrapeptide Acetyl-N-SerAspLysPro, an inhibitor of haematopoietic stem cell proliferation, is not mediated by a thymosin beta 4-like effect on actin assembly." Cell Prolif **29**(8): 437-46.

Cluzeau, J y Lubell WD. (2004. "Conformationally constrained dipeptide Surrogates with Aromatic Side-Chains: Synthesis of 4-Aryl Indolizidin-9-one Intermediate". J. Org.Chem. **69:** 1504-1512.

Cullinan, E. B., L. Kwee, *et al.* (1998). "IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor." J Immunol **161**(10): 5614-20.

Daun JM, Fenton, MJ. Interleukin-1/Toll receptor family members: receptor structure and sighanl transduction pathways. J. Interferon Cytokine Res. 2000 Oct, 20 (10);843-55.

Dettwiler, J. E. y Lubell, W. D.; *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 177-179.

Dieleman LA., Pena AS. *et al.* (1997). Role of Animal Models for the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease.Scand. J Gastroenterol. **32** Supl 223: 99-104.

Dietrich, E y Lubell WD. (2003). "Efficient Synthesis of Enantipure Pyrrolizidinone Amino Acid" J.Org. Chem. **68:** 6988-6996.

Dunne, A. y L. A. O'Neill (2003). "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense." Sci STKE **2003**(171): re3.

Elliott, K., D. Sakamuro, *et al.* (1999). "Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms." Oncogene **18**(24): 3564-73.

Feng Z, Lubell WD. (2001) "Mimicry of peptide Back-bone geometry and heteroatomic side-chain functionality: Synthesis of 7-[3-Azidopropyl]indolizidin-2-one amino acid as a constrained Ala-Lys dipeptide Surrogate" J. Org. Chem **66:** 1181-1185.

Gabay, C. (2000). "IL-1 inhibitors: novel agents in the treatment of rheumatoid arthritis." Expert Opin Investig Drugs **9**(1): 113-27.

Gosselin F y Lubell WD.(1998). "An olefination entry for the synthesis of enantiopure a,w-diamino-dicarboxylates and azabicyclo[X.Y.O]alkane amino acids."J.Org. Chem. **63:** 7463-71

Gosselin F y Lubell WD. (2000). "Rigid Dipeptide Surrogates: Suntheses of Enantiopure Quinolozidinone and Pyrroloazepinone Amino Acids from a Common Diaminodicarboxylate Precursor". J. Org. Chem. **65:** 2163-2171.

Halab, L. *et al.* (2000). "Design, synthesis and conformational Analysis of Azacycloalkane amino acids as conformationally constrianed probes for mimicry of peptide secondary structures." Biopolymers, Peptide Science **55:**101-22.

Hallegua, D. S. y M. H. Weisman (2002). "Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases." Ann Rheum Dis **61**(11): 960-7.

Hanessian S, McNaughton-Smith *et al.* (1997) "Design and synthesis of conformationally constrained amino acids as versatile scaffolds and peptide mimetics". Tetrahedron. **53:** 12789-12854.

Hardy, P., A. M. Nuyt, *et al.* (1999). "Developmentally increased cerebrovascular NO in newborn pigs curtails cerebral blood flow autoregulation." Pediatr Res **46**(4): 375-82.

Hou, X., F. Gobeil, Jr., *et al.* (2003). "Increased platelet-activating factor-induced periventricular brain microvascular constriction associated with immaturity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(4): R928-35.

Hou, X., F. Gobeil, Jr., *et al.* (2000). "Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F(2t)-isoprostane (8-iso-prostaglandin F(2alpha)) in immature pig periventricular brain microvessels." Stroke **31**(2): 516-24; discusión 525.

Hou, X., L. J. Roberts, 2 a , *et al.* (2001). "2,3-Dinor-5,6-dihydro-15-F(2t)-isoprostane: a bioactive prostanoid metabolite." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(2): R391-400.

Hu, Z. W., X. Y. Shi, *et al.* (1999). "alpha1-Adrenergic receptor stimulation of mitogenesis in human vascular smooth muscle cells: role of tyrosine protein kinases and calcium in activation of mitogen-activated protein kinase." J Pharmacol Exp Ther **290**(1): 28-37.

Jameson, B. A., J. M. McDonnell, *et al.* (1994). "A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis." Nature **368**(6473): 744-6.

Kashiwamura, S. Ueda, H. y Okamura, H. (2002) "Roles of interleukin-18 in tissue destruction and compensatory reactions. J Immunother 25 Supl , S4-11.

Kumar, S., P. C. McDonnell, *et al.* (2000). "Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family." J Biol Chem **275**(14): 10308-14.

Lapatsanis, L.; Milias, G.; Froussios, K.; Kolovos, M. *Synthesis,* **1983**, 671-673.

Laye, S., J. Lundkvist, *et al.* (1998). "Human/mouse interleukin-1 receptor/receptor accessory protein interactions in IL-1beta-induced NFkappaB activation." FEBS Lett **429**(3): 307-11.

Li, D. Y., P. Hardy, *et al.* (1997). "Key role for cyclooxygenase-2 in PGE2 and PGF2alpha receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn." Am J Physiol **273**(4 Pt 2): R1283-90.

Li MC, He SH.IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease.World J Gastroenterol. 2004 Mar 1;10(5):620-5.

Lombart, H.-G. y Lubell, W. D.; *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 9437-9446.

Malinowsky, D., J. Lundkvist, *et al.* (1998). "Interleukin-1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin-1 receptor." FEBS Lett **429**(3): 299-302.

MasicLP y Kikelj D. (2001).Tetrahedron **57:** 7073.

Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E. P.; Lambros, T. J.; Makofske, R. C.; Chang, C. D.; *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1979, *13*, 35-42.

Merrifield, R. B. (1964). "Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin." Biochemistry **14**: 1385-90.

Najarian, T., A. M. Marrache, *et al.* (2000). "Prolonged hypercapnia-evoked cerebral hyperemia via K(+) channel- and prostaglandin E(2)-dependent endothelial nitric oxide synthase induction." Circ Res **87**(12): 1149-56.

Padol I., Huang, JQ. *et al.* (2000).Therapeutic effects of the endothelin receptor antagonist Ro 48-5695 in the TNBS/DNBS rat model of colitis. Eur J of Gastroenterol Hepatol. **12**:257-265.

Pascal, R. y Sola, R.; Terahedron. Lett., 1998, *39*, 5031-5034.

PolyaK F, Lubell WD. (1998). "Rigid dipeptide mimics: synthesis of enantiopure enolization and alkylation of d-Oxo a,w-Di-[N-(9-(9-phenylfluorenyl))amino]azelate Esters." J.Org. Chem. **63:** 5937-5949.

Polyak, F, Lubell WD. "Mimicry of peptides back-bone geometry and heteroatomic side-chain functionality: Synthesis of Enantiopure Indolizidin-2-one Amino Acids possessing Alcohol, Acid and Amine Functional Groups" J.Org. Chem. **66:**1171-1180

Powell, M. F., T. Stewart, *et al.* (1993). "Peptide stability in drug development. II. Effect of single amino acid substitution and glycosylation on peptide reactivity in human serum." Pharm Res **10**(9): 1268-73.

Schuerwegh, AJ *et al.* Influence of pro-inflammatory (IL-1, IL-6, THF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (Il-4) cytokines on chondrocytes function.

Sims, J.E. "IL-1 and IL-18 receptors, and their extended families." Curren Opin in Immunology 2002. Feb 14(1)117-122.

Sims, J. E., R. B. Acres, *et al.* (1989). "Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8946-50.

Torres MI, Garcia-Martin M.,et al., (1999). Experimenta colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid. An ultrastructural and histochemical study. Digestive Diseases and Sciences. **44:** No.12: 2523-2529.

Vigers, G. P., L. J. Anderson, *et al.* (1997). "Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta." Nature **386**(6621): 190-4.

Vigers, G. P., D. J. Dripps, *et al.* (2000). "X-ray crystal structure of a small antagonist peptide bound to interleukin-1 receptor type 1." J Biol Chem **275**(47): 36927-33.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que tiene una longitud de 5 a 25 aminoácidos y que antagoniza de manera no competitiva la actividad biológica de IL-1R, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

APRYTVELA (SEQ ID NO: 1), AARYTVELA (SEQ ID NO: 2), APAYTVELA (SEQ ID NO: 3), APRATVELA (SEQ ID NO: 4), APRYAVELA (SEQ ID NO: 5), PRYTVELA (SEQ ID NO: 9), RYTVELA (SEQ ID NO: 10), YTVELA (SEQ ID NO: 11), TVELA (SEQ ID NO: 12), XYTVELA (X= Citrulina, SEQ ID NO: 13), XYTVOLA (X= Citrulina, SEQ ID NO: 14), RYTVOLA (SEQ ID NO: 15), RFTVELA (SEQ ID NO: 16), RYSVELA (SEQ ID NO: 17), RYWELA (SEQ ID NO: 18), RYTPELA (SEQ ID NO: 19), RYTVEL (SEQ ID NO: 20), RYTPEL (SEQ ID NO: 21), KYTPELA (SEQ ID NO: 22), XYTPELA (X= Ornitina, SEQ ID NO: 23), RWTPELA (SEQ ID NO: 24), RYTPDLA (SEQ ID NO: 25), RYTPOLA (SEQ ID NO: 26), RYTPEFA (SEQ ID NO: 27), RYTPEMA (SEQ ID NO: 28), RYTPEPA (SEQ ID NO: 30), RYTPALA (SEQ ID NO: 31), RFVPELA (SEQ ID NO: 33), RWTPEL (SEQ ID NO: 34), RYTPEV (SEQ ID NO: 35), RFTPEL (SEQ ID NO: 36), en el que dichas secuencias de SEQ ID NOs: 1-5, 9-28, 30, 31, 33-36 consisten en D-aminoácidos;

RYTPELA o RYTPEL, en el que dichas secuencias consisten en L-aminoácidos o una mezcla de D y L-aminoácidos; y RYTPEL (SEQ ID NO: 39), en el que R es un L-aminoácido e YTPEL son D-aminoácidos.

2. El péptido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos se selecciona de: RYTPEL (SEQ ID NO: 21), RYTVOLA (SEQ ID NO: 15), KYTPELA (SEQ ID NO: 22), RYTPDLA (SEQ ID NO: 25) y RYTVELA (SEQ ID NO: 10).

3. El péptido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos es la de: RYTVELA (SEQ ID NO: 10).

4. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que inhibe la producción de PGE_2 inducida por IL-1.

5. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que tiene una longitud de 5 a 16 aminoácidos.

6. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que tiene una longitud de 5 a 10 aminoácidos.

7. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que tiene una longitud de 5 a 9 aminoácidos.

8. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido no es fácilmente susceptible a escisión por proteasas y/o exopeptidasas.

9. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que está modificado químicamente en su N y/o C-terminal para aumentar la estabilidad en el suero.

10. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que está modificado químicamente por acetilación, glicosilación o biotinilación N-terminal.

11. Un método *in vitro* para inhibir la actividad del receptor de IL-1 en la superficie de las células usando el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

12. Un ensayo *in vitro* para cribar, o para caracterizar, antagonistas que afectan la actividad del receptor de IL-1 en la superficie de las células, usando dicho ensayo el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como un inhibidor competitivo.

13. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 que se formula para administración oral.

15. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en terapia.

16. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección, en la que dicha enfermedad o afección está asociada con una anormalidad en una ruta de transducción de la señal que implica la actividad de IL-1R/IL-1RacP.

17. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso según la reivindicación 16, en el que dicha enfermedad o afección es una enfermedad o afección relacionada con IL-1.

18. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso según la reivindicación 17, en el que dicha enfermedad o afección es una enfermedad o afección inflamatoria, por ejemplo una enfermedad o afección inflamatoria aguda o crónica.

19. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso según la reivindicación 18, en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de distrés respiratorio, enfermedad inflamatoria del intestino, osteoartritis, psoriasis y choque séptico.

20. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso según la reivindicación 16, en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, leucomalacia periventricular, meningitis, ictus, esclerosis múltiple, encefalitis y enfermedades autoinmunes.

21. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que la terapia, enfermedad o afección es en un paciente humano.

22. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20 que se administra oralmente.

23. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en un método de ensayo en un modelo animal.

24. Uso del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la fabricación de un medicamento para uso como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22.

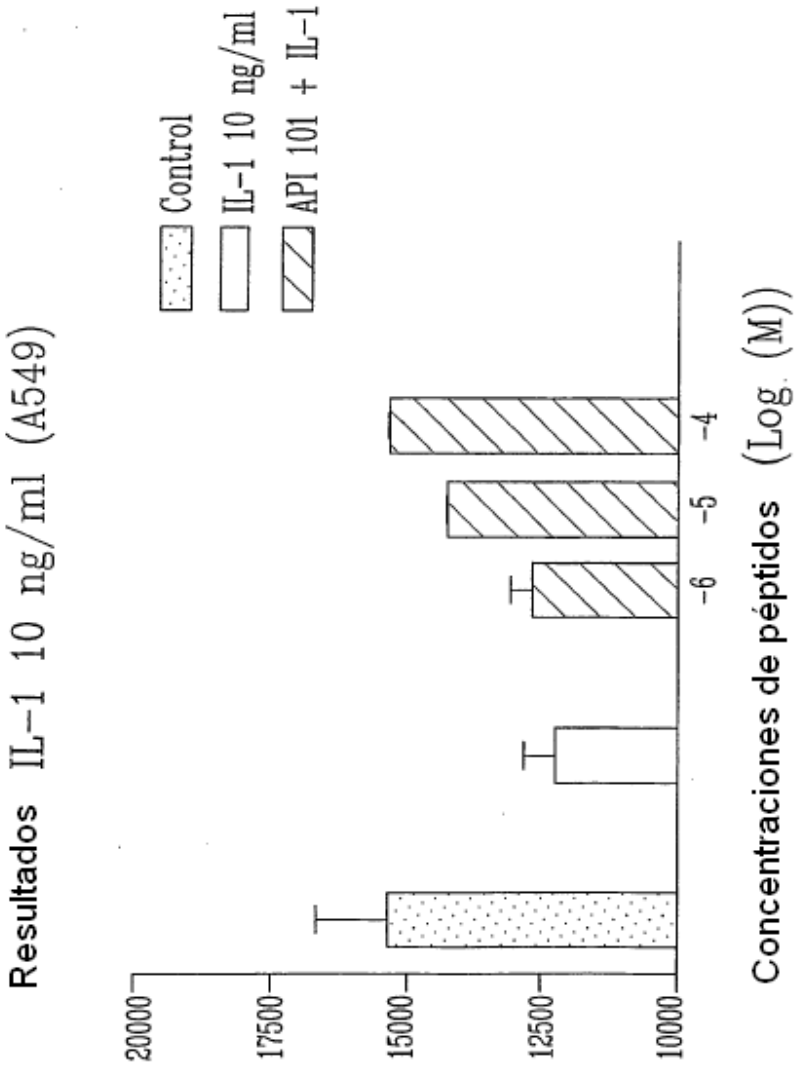

Resultados IL-1 10 ng/ml (A549)
Control
IL-1 10 ng/ml
API 101 + IL-1
20000
17500
15000
12500
10000
-6
-5
-4
Concentraciones de péptidos (Log (M))

Fig. 1

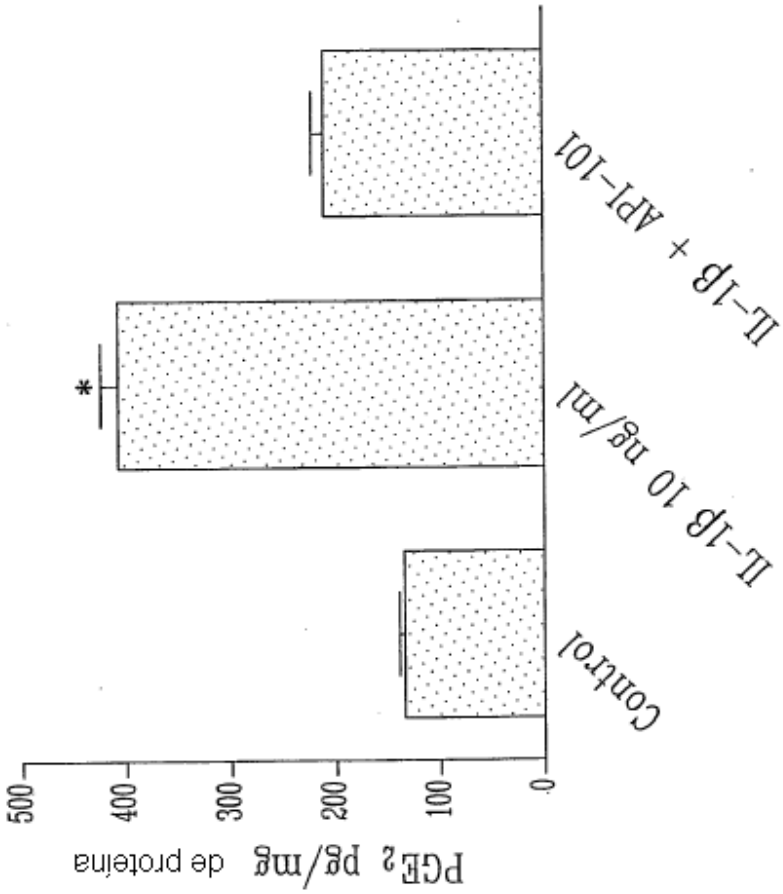

PGE2 pg/mg de proteína
500
400
300
200
100
0
*
Control
IL-1β 10 ng/ml
IL-1β + API-101

Figura 7

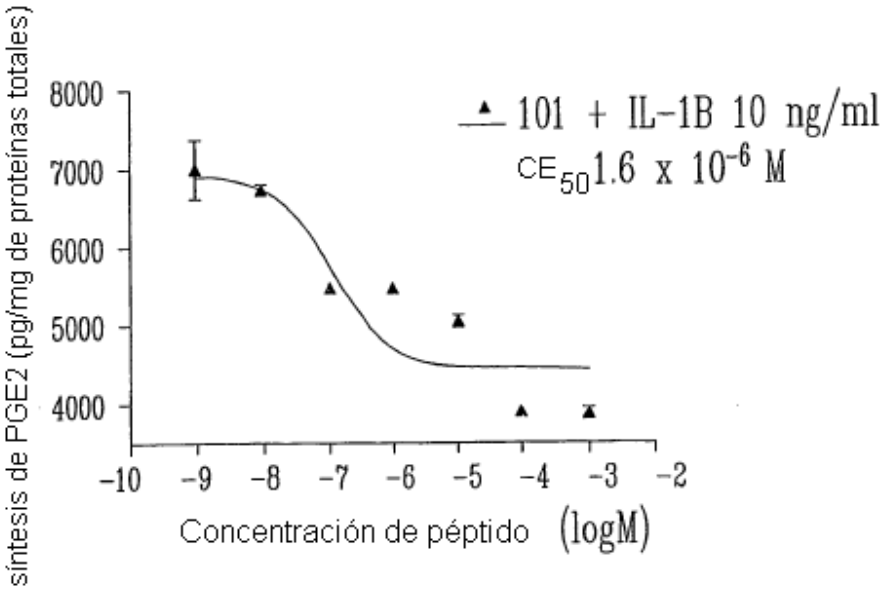

síntesis de PGE2 (pg/mg de proteínas totales)
8000
7000
6000
5000
4000
101 + IL-1B 10 ng/ml
CE50 1.6 x 10-6 M
-10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2
Concentración de péptido (logM)

FIG. 3

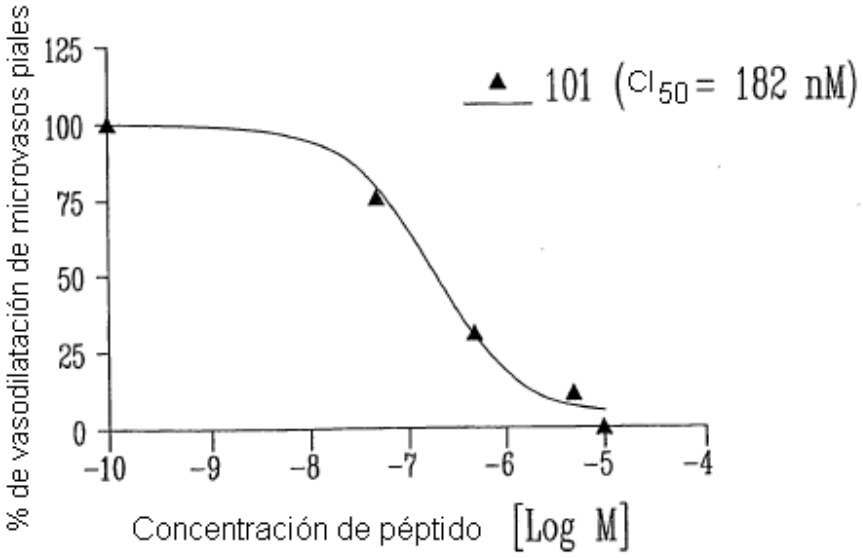

% de vasodilatación de microvasos piales
125
100
75
50
25
0
101 (CI50 = 182 nM)
-10 -9 -8 -7 -6 -5 -4
Concentración de péptido [Log M]

FIG. 4

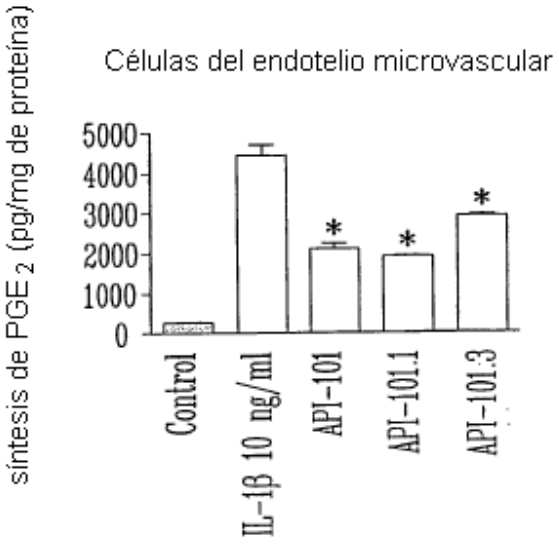

síntesis de PGE 2 (pg/mg de proteína)
Células del endotelio microvascular
5000
4000
3000
2000
1000
0
Control
IL-1β 10 ng/ml
API-101
API-101.1
API-101.3
*
*
*

FIG. 5A

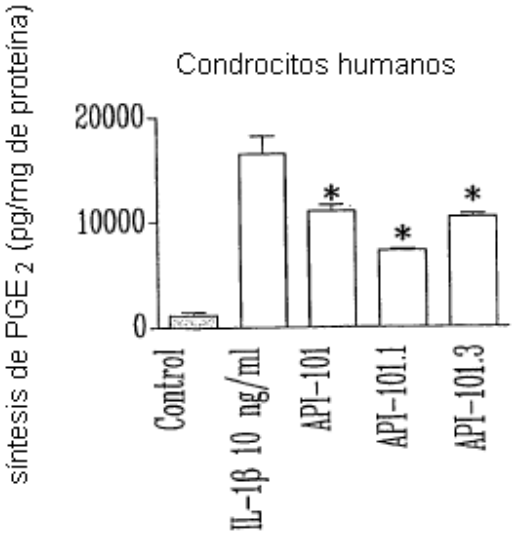

síntesis de PGE 2 (pg/mg de proteína)
Condrocitos humanos
20000
10000
0
Control
IL-1β 10 ng/ml
API-101
API-101.1
API-101.3
*
*
*

FIG. 5B

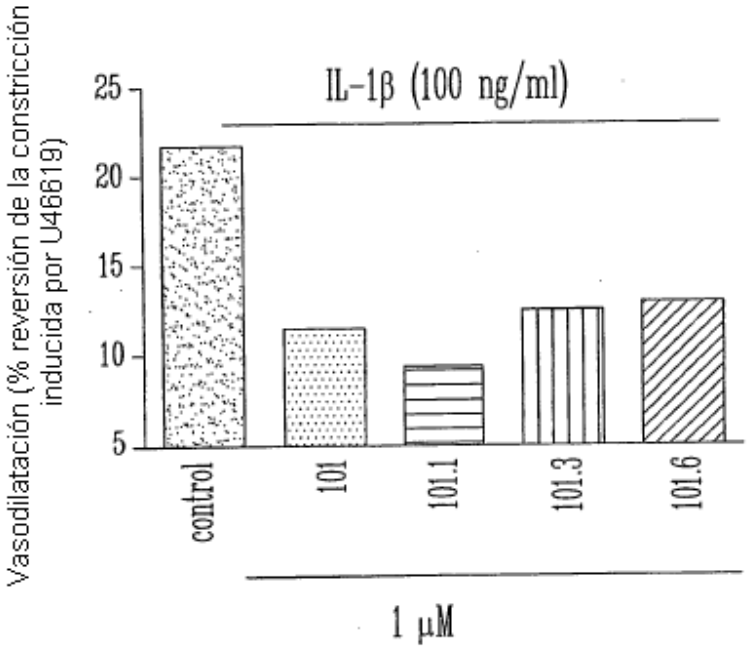

Vasodilatación (% reversión de la constricción inducida por U46619)
25
20
15
10
5
IL-1β (100 ng/ml)
control
101
101.1
101.3
101.6
1 μM

FIG. 6

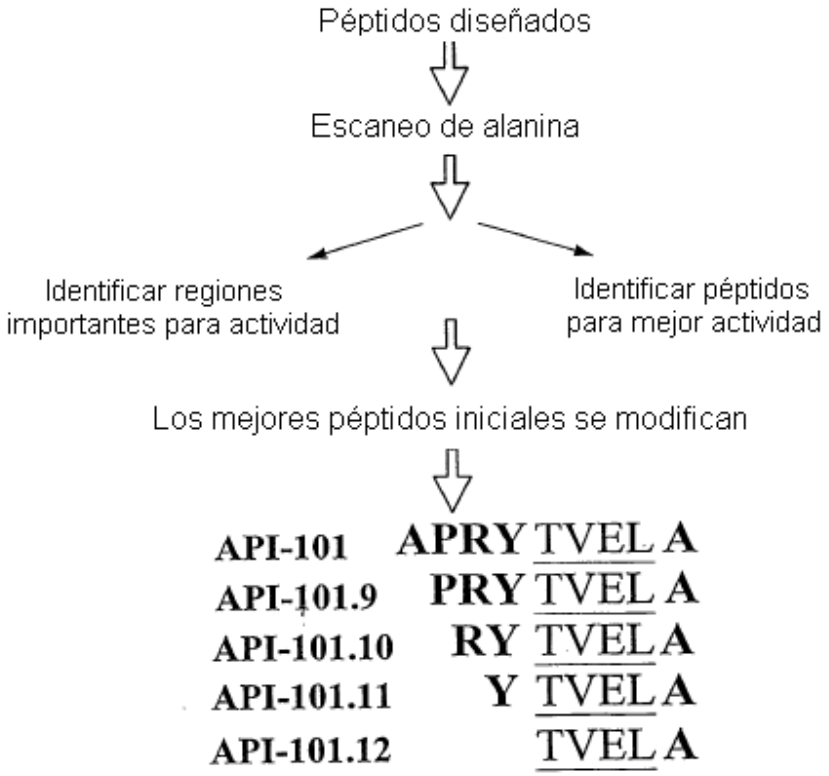

Péptidos diseñados
Escaneo de alanina
Identificar regiones importantes para actividad
Identificar péptidos para mejor actividad
Los mejores péptidos iniciales se modifican
API-101 APRY TVEL A
API-101.9 PRY TVEL A
API-101.10 RY TVEL A
API-101.11 Y TVEL A
API-101.12 TVEL A
TVEL = región importante para actividad

FIG. 7

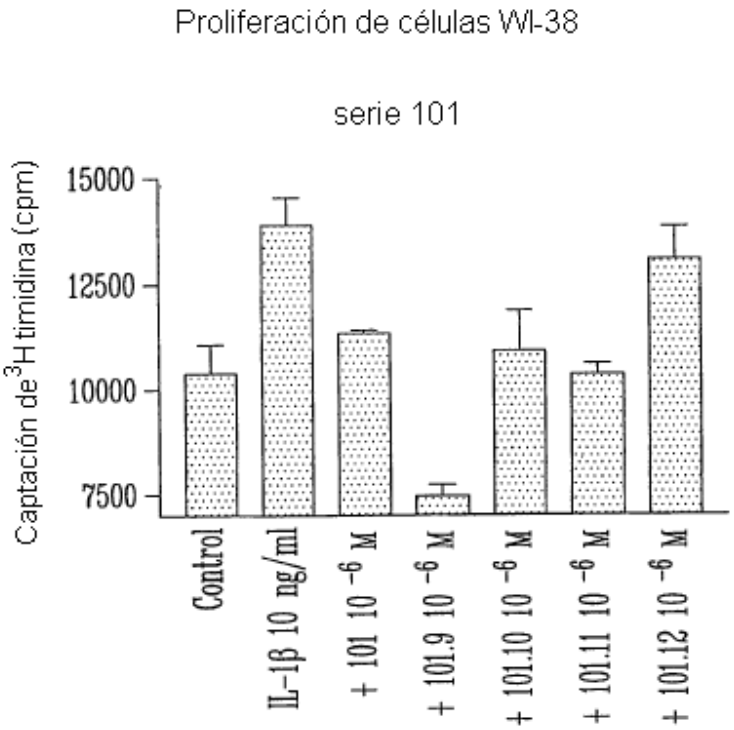

Proliferación de células WI-38
serie 101
Captación de 3H timidina (cpm)
15000
12500
10000
7500
Control
IL-1β 10 ng/ml
+ 101 10 −6 M
+ 101.9 10 −6 M
+ 101.10 10 −6 M
+ 101.11 10 −6 M
+ 101.12 10 −6 M

FIG. 8

Citotoxicidad de derivados de péptidos 101 (ensayo MTT)

Fibroblastos de pulmón humano WI-38

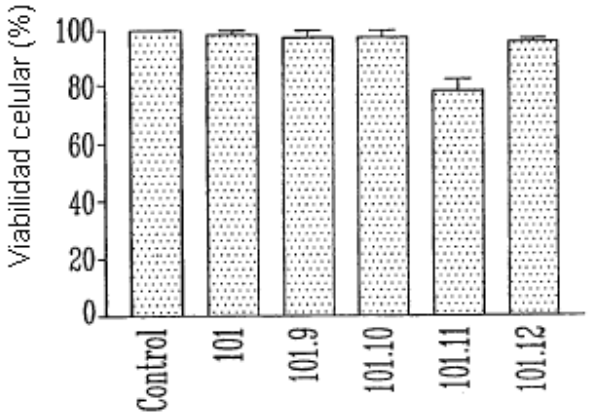


FIG. 9A

Citotoxicidad de derivados de péptidos 101 (ensayo MTT)

Células del endotelio microvascular de cerebro

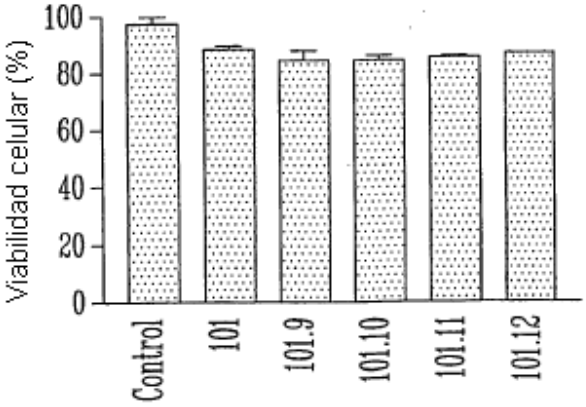


FIG. 9B

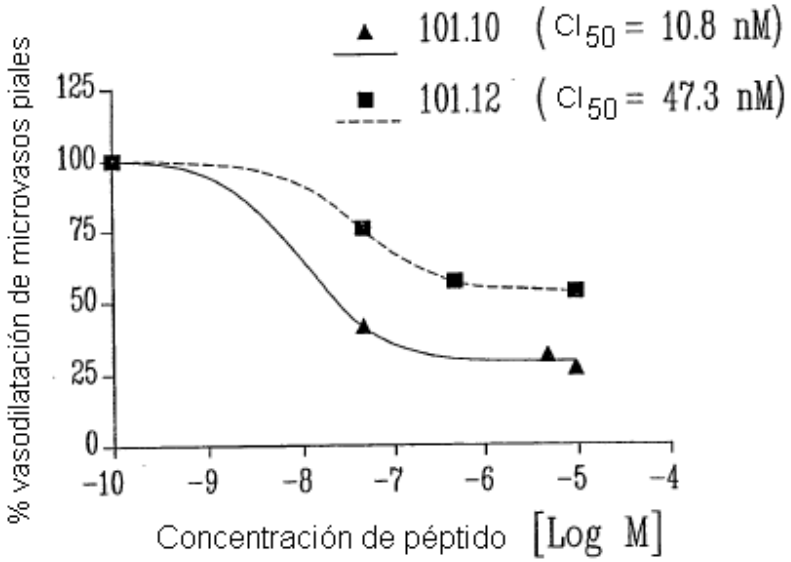

101.10 (CI_{50} = 10.8 nM)
101.12 (CI_{50} = 47.3 nM)
% vasodilatación de microvasos pialeS
125
100
75
50
25
0
−10
−9
−8
−7
−6
−5
−4
Concentración de péptido [Log M]

FIG. 10

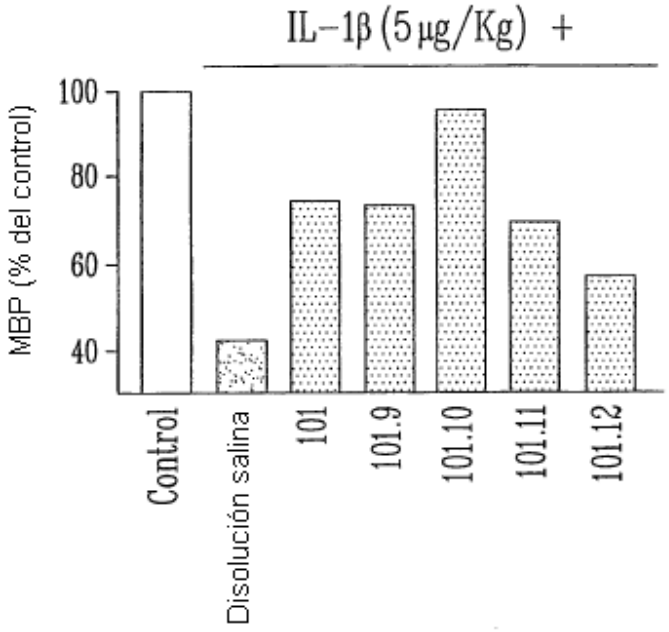


FIG. 11A

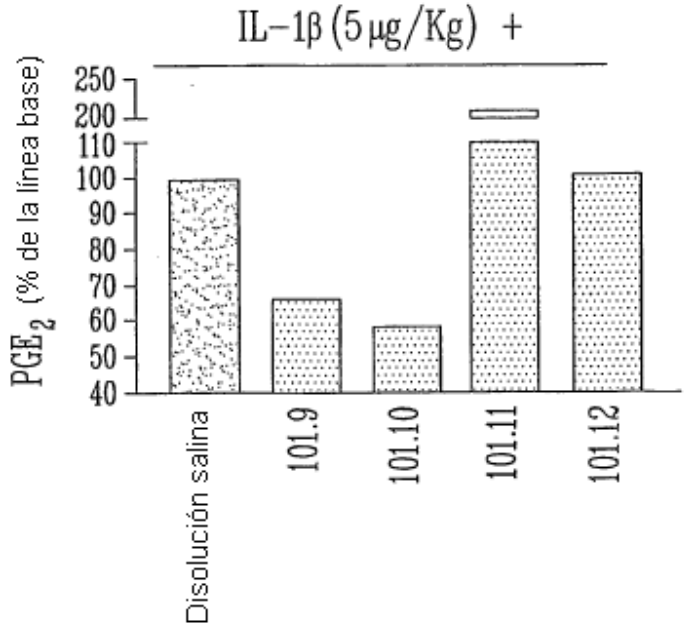


FIG. 11B

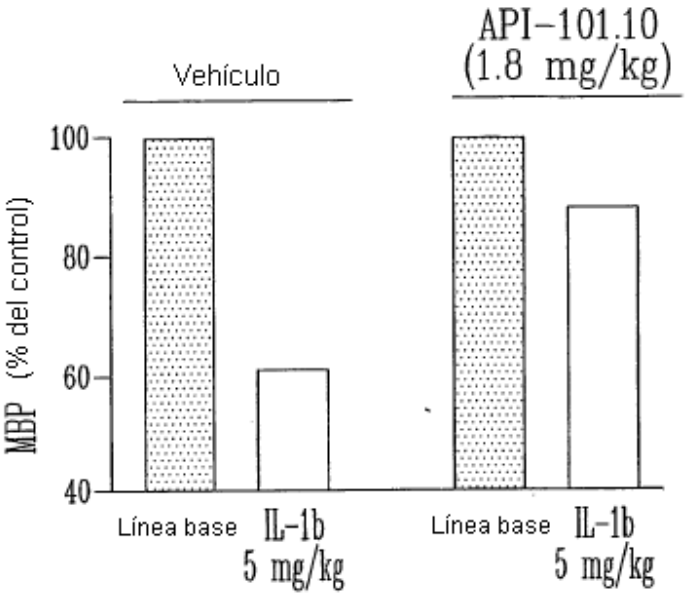


FIG. 12A

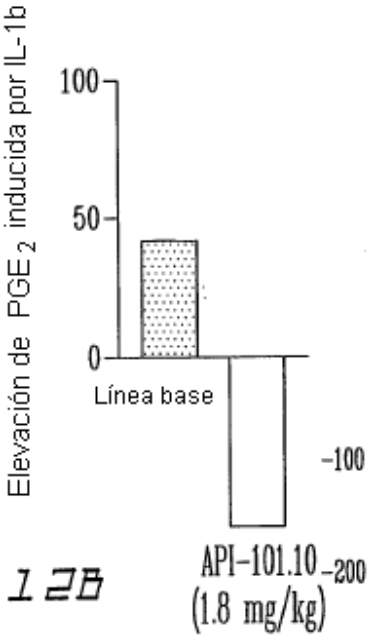


FIG. 12B

Optimización de los candidatos IL-1R

API–101.10	RYTVELA	
API–101.101	XYTVELA	(X = Citrulina)
API–101.102	XYTVQLA	(X = Citrulina)
API–101.103	RYTVQLA	
API–101.104	RFTVELA	
API–101.105	RYSVELA	
API–101.106	RYVVELA	
API–101.107	RYTPELA	
API–101.108	RYTVEL	

Fig. 13

Efecto de API-101.10 (sistémico) en un modelo de rata de Enfermedad Inflamatoria del Intestino (macroscopía)

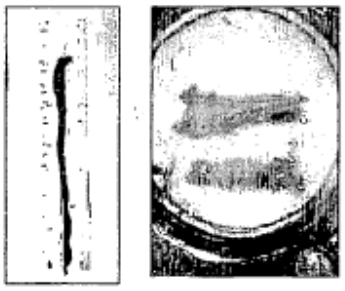


FIG. 14A

FIG. 14B

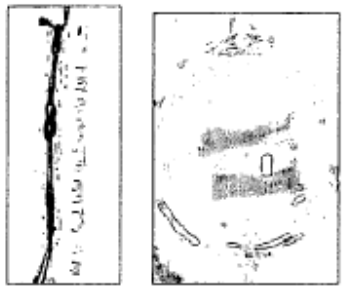


FIG. 14C

Caracterización de derivados del péptido 101.10

Inhibición *in vitro* por el péptido de la síntesis de PGE_2 por IL-1β

Péptido	Secuencia	Células endoteliales (porc.)		WI-38 (hum.)	
		CI_{50}	Emax (%)	CI_{50}	Emax (%)
101.10	RYTVELA	1.2 nM	90	0.2 nM	81
101.101	[Cit]YTVELA	0.8 μM	0	0.9 μM	45
101.102	[Cit]YTVQLA	0.2 μM	0	0.2 nM	46
101.103	RYTVQLA	6.3 pM	59	0.05 pM	52
101.104	RFTVELA	623 μM	25	0.4 μM	28
101.105	RYSVELA	0.3 μM	21	0.5 pM	53
101.106	RYVVELA	0.4 nM	55	1.4 nM	65
101.107	RYTPELA	13.1 pM	50	0.1 pM	57
101.108	RYTVEL	21.6 μM	34	0.6 μM	35

FIG. 15

Efecto de API-101.10 (sistémico) en un modelo de rata
de Enfermedad Inflamatoria del Intestino*
(histología)

Disolución salina

FIG. 16A

TNBS + Disolución salina

FIG. 16B

TNBS + API-101.10
(1.1 mg/kg/d)

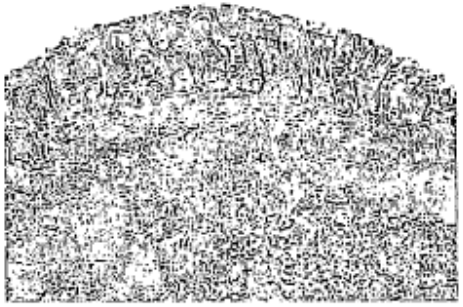


FIG. 16C

Péptido #	Secuencia del péptido	Eficacia respecto a la producción de PGE_2 inducida por IL-1β en presencia de péptidos (%)	
		CE (porcina)	Condrocitos
API-101	APRYTVELA	51	33
API-101.1	AARYTVELA	54	56
API-101.2	APAYTVELA	<25	<25
API-101.3	APRATVELA	40	37
API-101.4	APRYAVELA	<25	55
API-101.5	APRYTAELA	0	<25
API-101.6	APRYTVALA	0	0
API-101.7	APRYTVEAA	0	<25

FIG. 17

Caracterización de derivados del péptido 101

Péptido	Secuencia	Inhibición *in vitro* por el péptido de la síntesis de PGE_2 por IL-1β (CI_{50})				Inhibición *ex vivo* por el péptido de la vasodilatación por IL-1β de vasos piales porcinos (CI_{50}; Emax=100%)
		WI-38 (hum.)		EC (porc.)		
		CI_{50}	Emax (%)	CI_{50}	Emax (%)	
101	APRYTVELA	790 nM	100	220 nM	100	182 **nM**
101.9	PRYTVELA	1 μM	48	300 nM	81	<100 **nM**
101.10	RYTVELA	0.2 nM	81	1.2 nM	90	10.8 **nM**
101.11	YTVELA	6 μM	61	1.4 μM	75	23 **nM**
101.12	TVELA	ud	19	4.1 μM	85	47.3 **nM**

FIG. 18

Leyenda figura 19: producción de PGE_2 en células endoteliales estimuladas con IL-1β (10 ng/ml) en presencia de peptidomiméticos 101.109 y 101.110

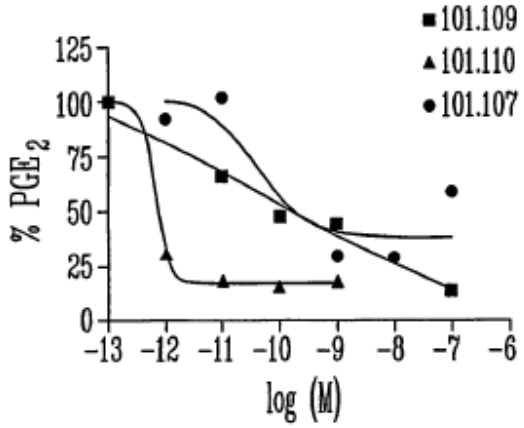


Fig. 19

101.107: CE_{50} = 43 pM, Emax = 60 %

101.109: CE_{50} = 49 pM, Emax = 84 %

101.110: CE_{50} = 0.2 pM, Emax = 82 %

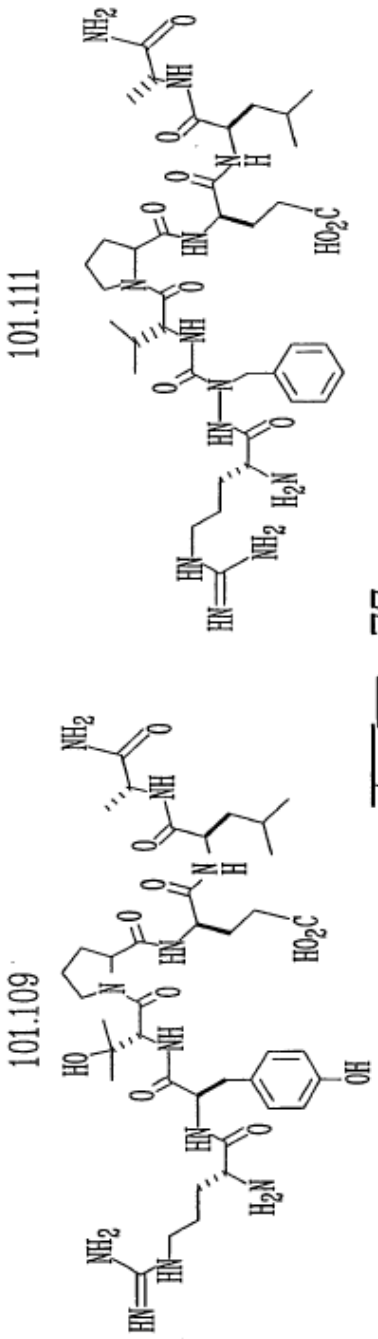


FIG - 20

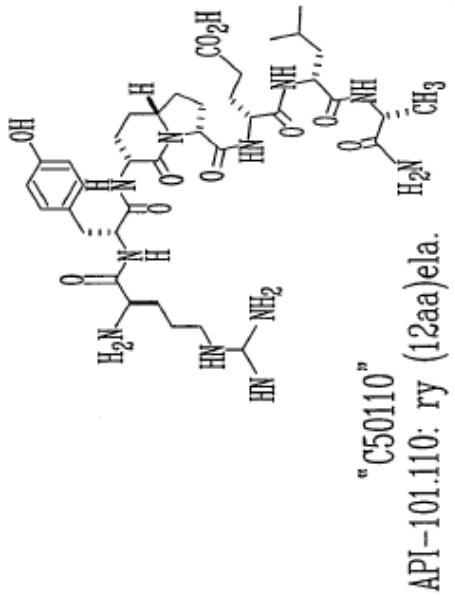


FIG - 21

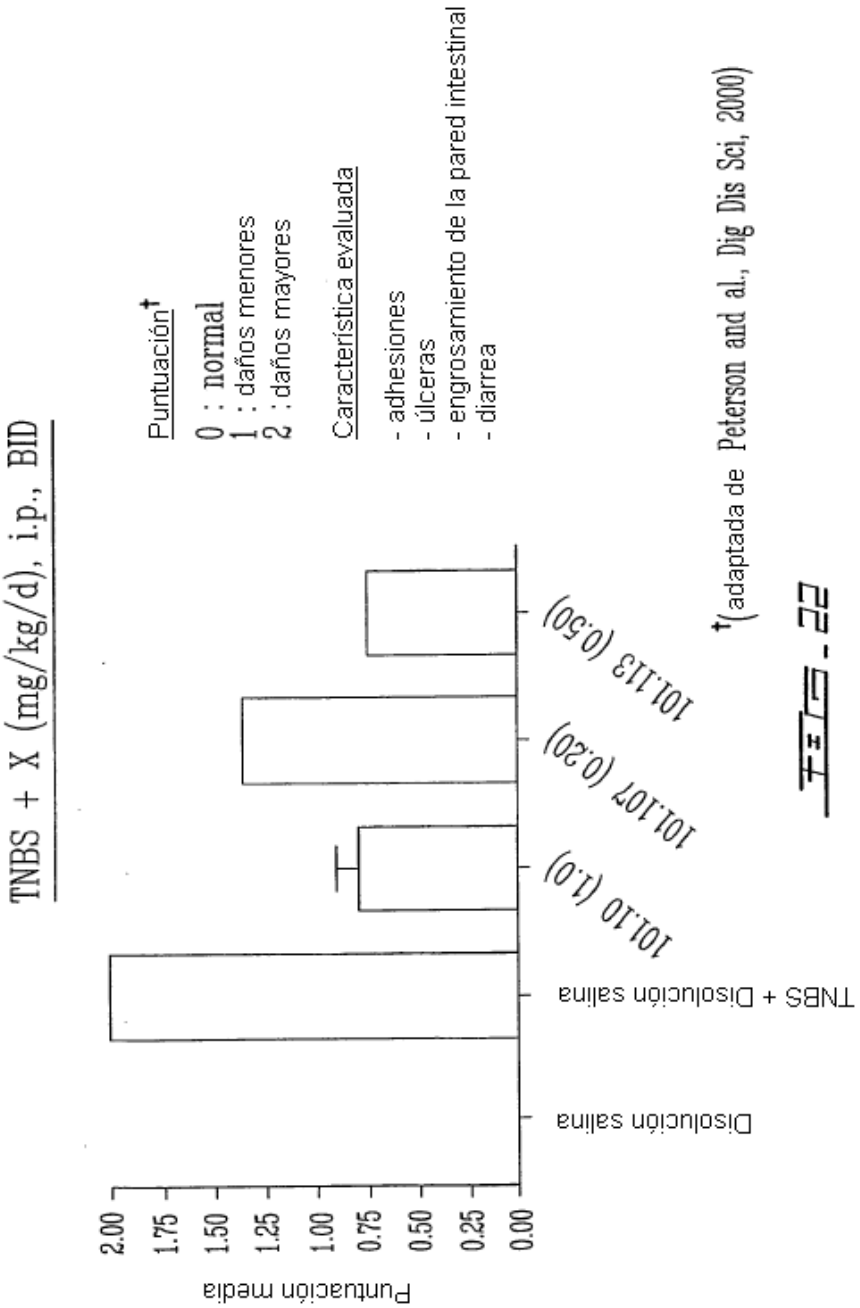

TNBS + X (mg/kg/d), i.p., BID
Puntuación†
0 : normal
1 : daños menores
2 : daños mayores
Característica evaluada
- adhesiones
- úlceras
- engrosamiento de la pared intestinal
- diarrea
Puntuación media
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Disolución salina
TNBS + Disolución salina
101.10 (1.0)
101.107 (0.20)
101.113 (0.50)
†(adaptada de Peterson and al., Dig Dis Sci, 2000)

FIG - 22

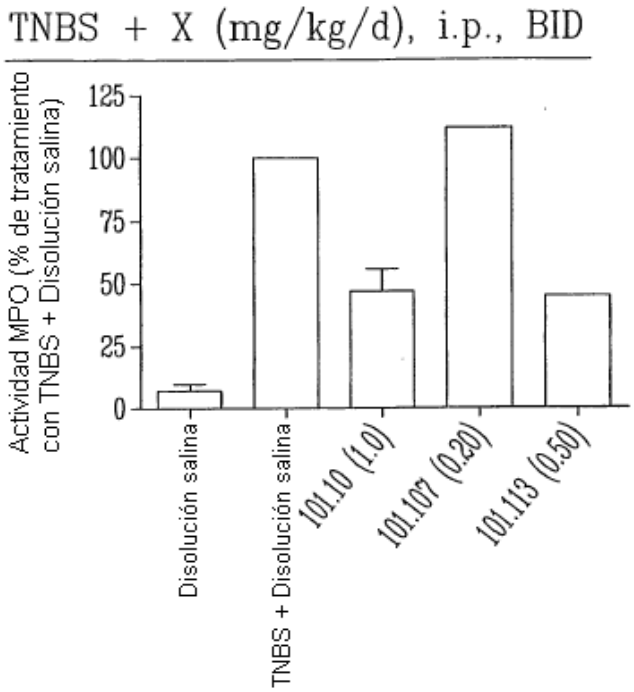
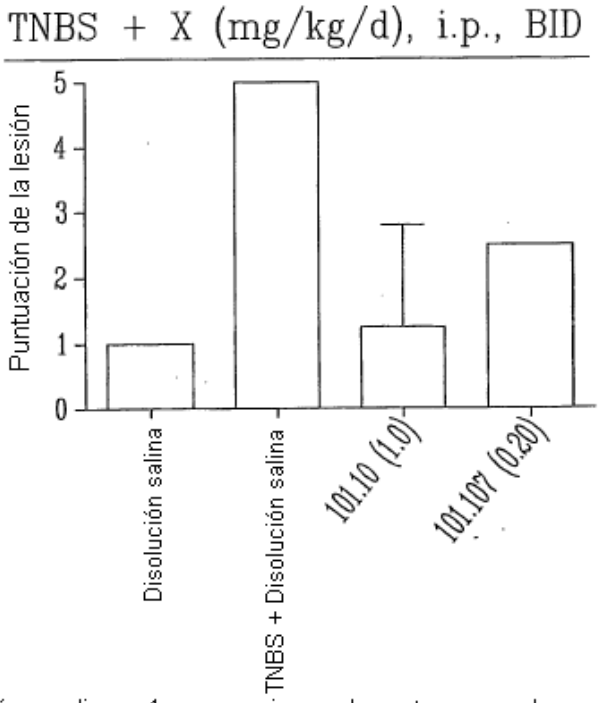


FIG. 23



*Puntuación media en 4 preparaciones de porta separadas

FIG. 24

Disolución salina

FIG. 25A

TNBS + Disolución salina

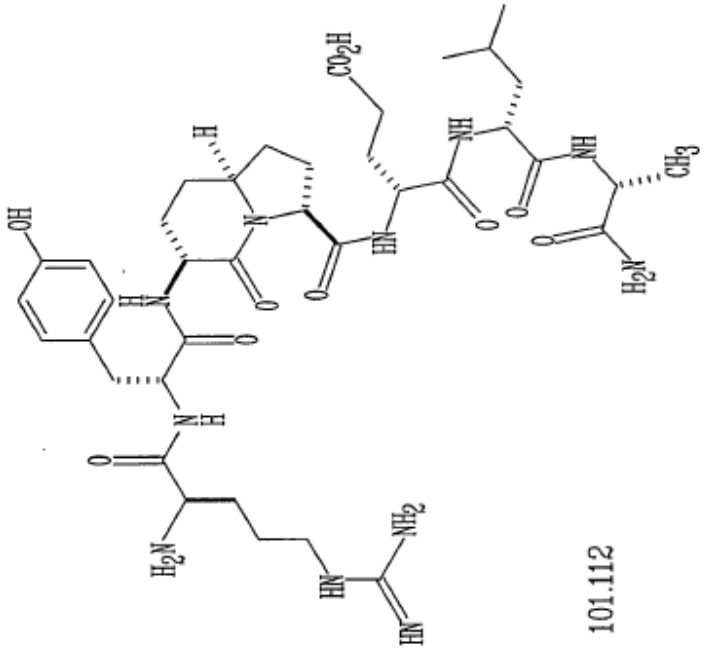
FIG. 25B

TNBS + 101.10 (1.0 mg/kg/d), i.p., BID

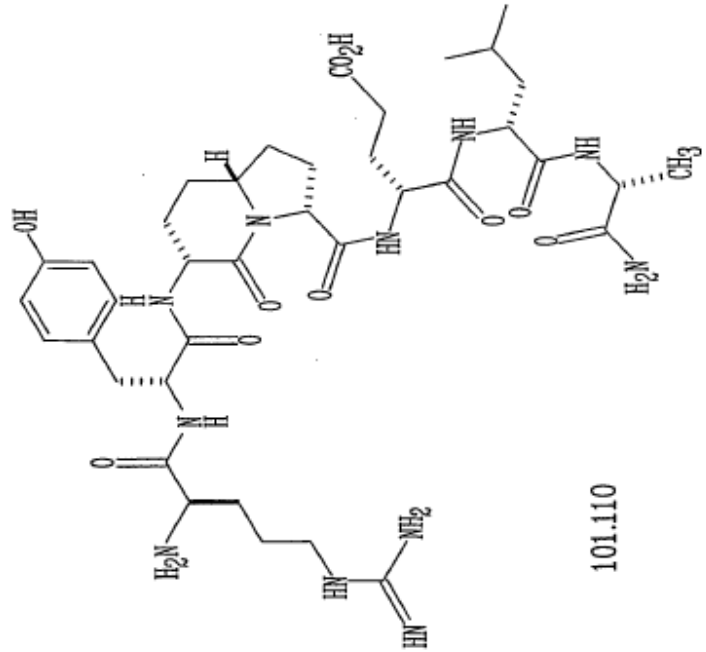
FIG. 25C

TNBS + 101.107 (0.2 mg/kg/d), i.p., BID

FIG. 25D



101.112

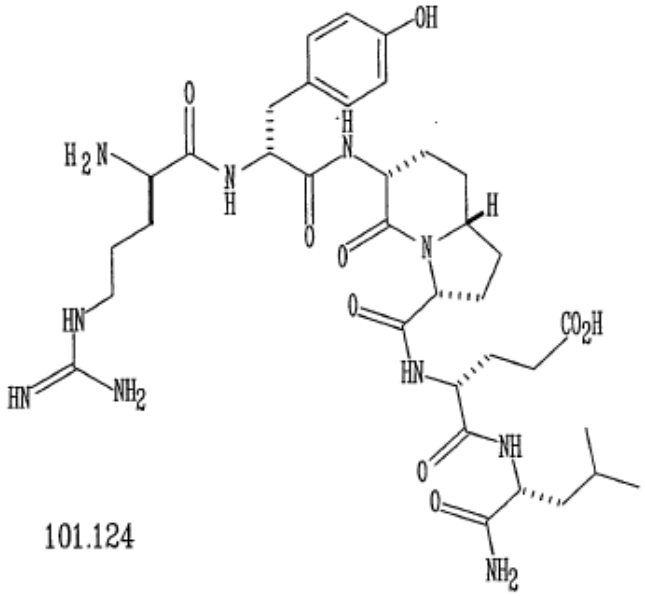


101.110

Resultados de peptidomiméticos

Péptido	CI_{50}	Eficacia
TTI-101.110	10 pM	90%
TTI-101.112	nd	<10%

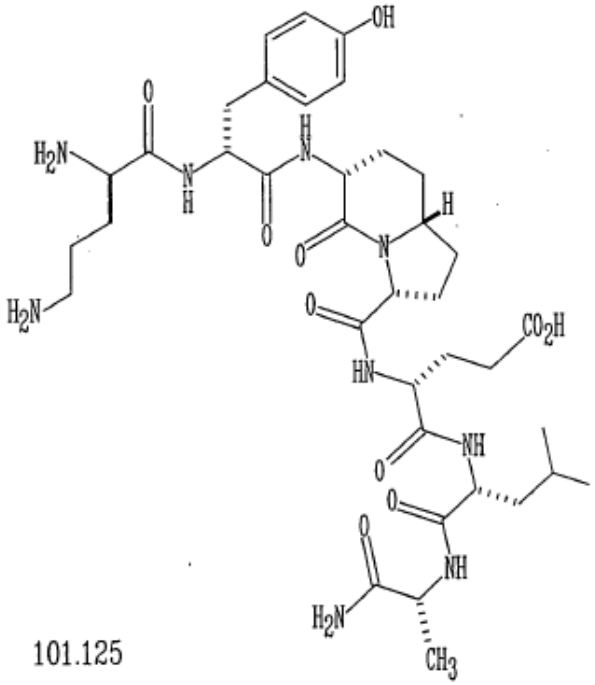
FIG. 26A



101.124

72162
TTI-101.124 ry[R-12aa]el (nd, nd: 2.4 µM, 100%)

Resultados de peptidomiméticos		
Péptido	CI_{50}	Eficacia
TTI-101.124	2.4 µM	---
TTI-101.125	90 pM	100%



101.125

1168
TTI-101.125 (D-orn)y[R-12aa]ela. (nd, nd: 90 pM, 100%)

FIG. 26B

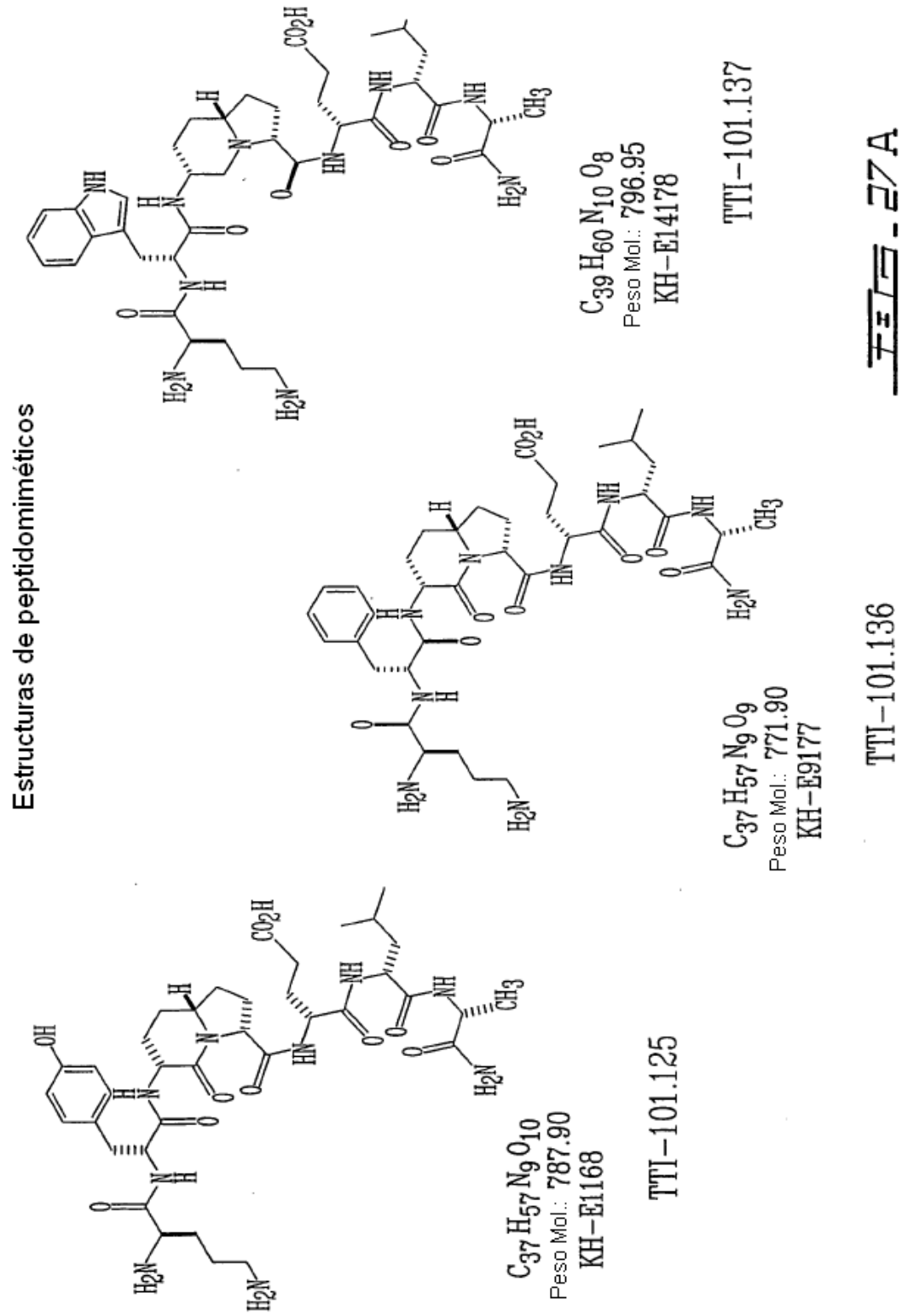
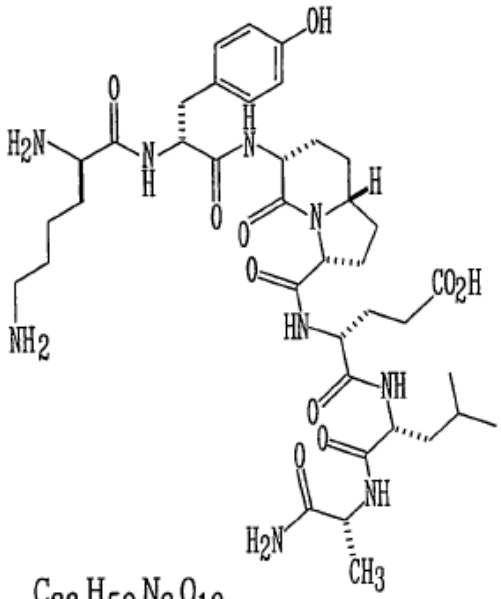

Estructuras de peptidomiméticos
$C_{39}H_{60}N_{10}O_8$
Peso Mol.: 796.95
KH-E14178
TTI-101.137
$C_{37}H_{57}N_9O_9$
Peso Mol.: 771.90
KH-E9177
TTI-101.136
$C_{37}H_{57}N_9O_{10}$
Peso Mol.: 787.90
KH-E1168
TTI-101.125

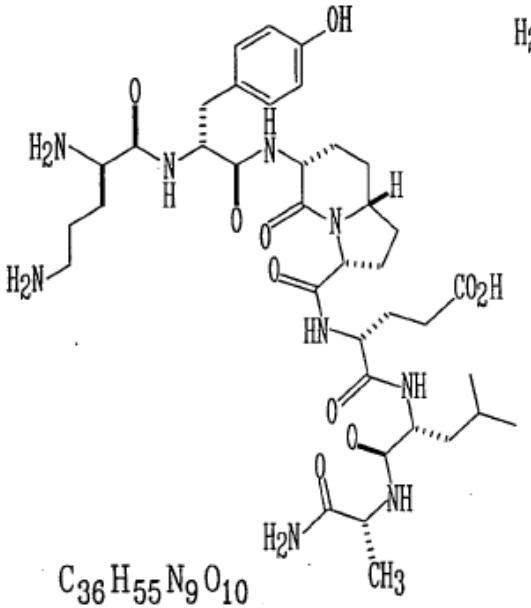
FIG. 27A

Estructuras de peptidomiméticos



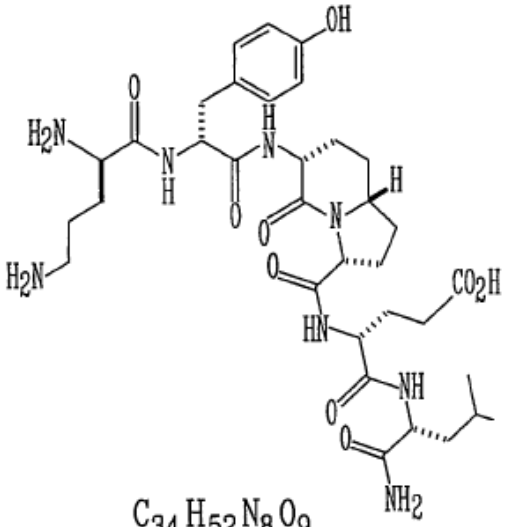
$C_{38}H_{59}N_9O_{10}$
Peso Mol.: 801.93
KH-E19179

TTI-101.138



$C_{36}H_{55}N_9O_{10}$
Peso Mol.: 773.88
KH-E24180

TTI-101.139

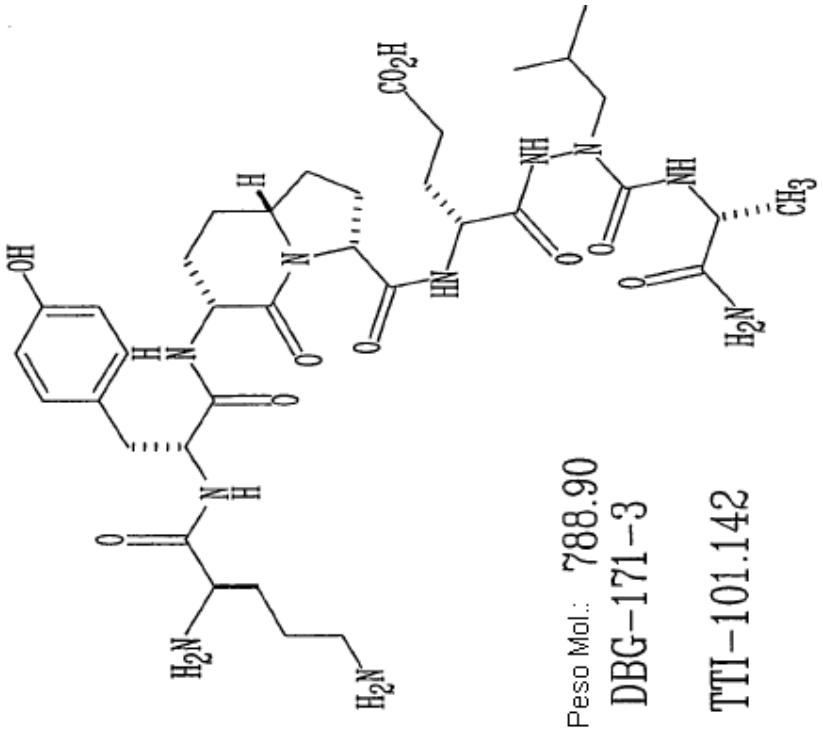


$C_{34}H_{52}N_8O_9$
Peso Mol.: 716.82
KH-E29181

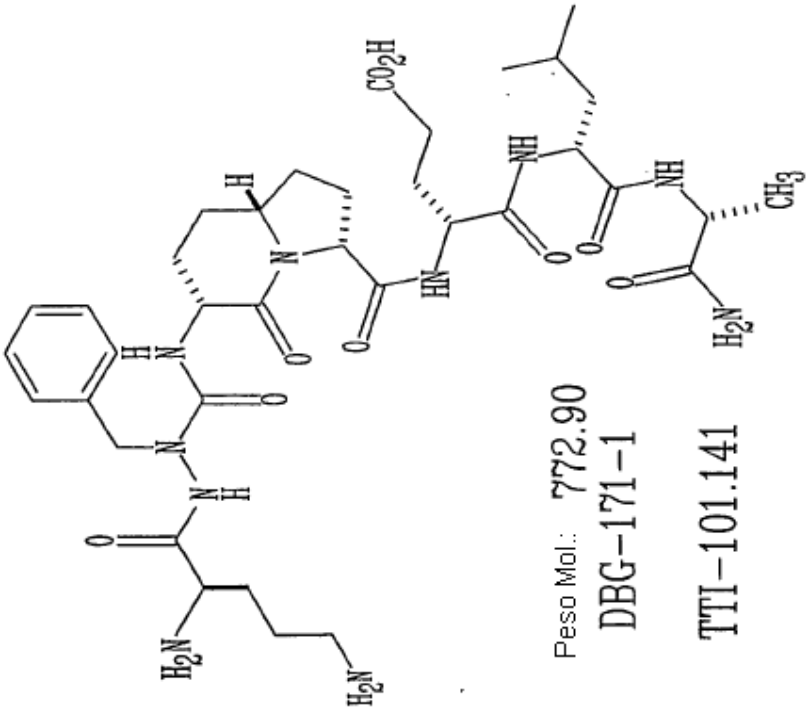
TTI-101.140

FIG. 27B

Estructuras de peptidomiméticos



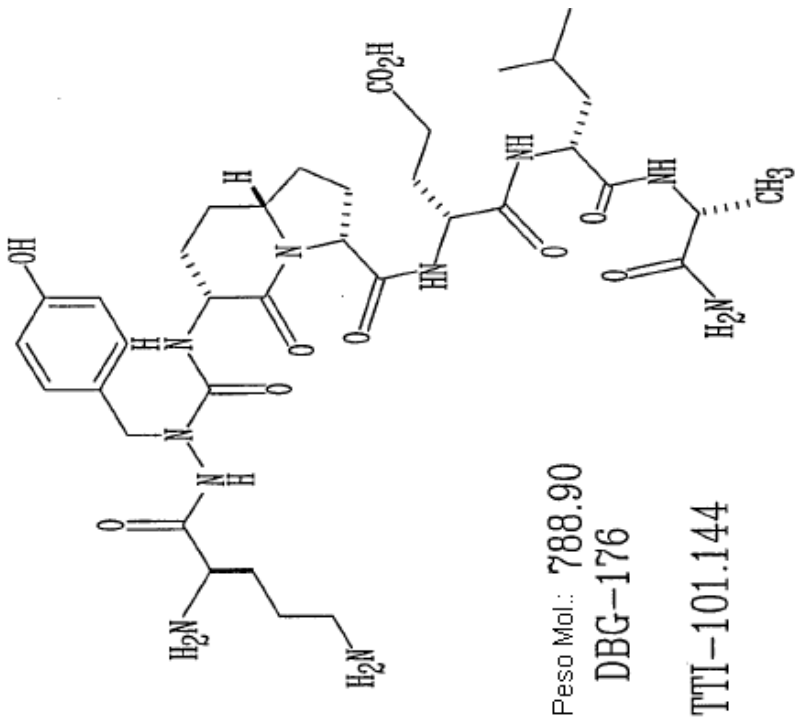
Peso Mol.: 788.90
DBG-171-3
TTI-101.142



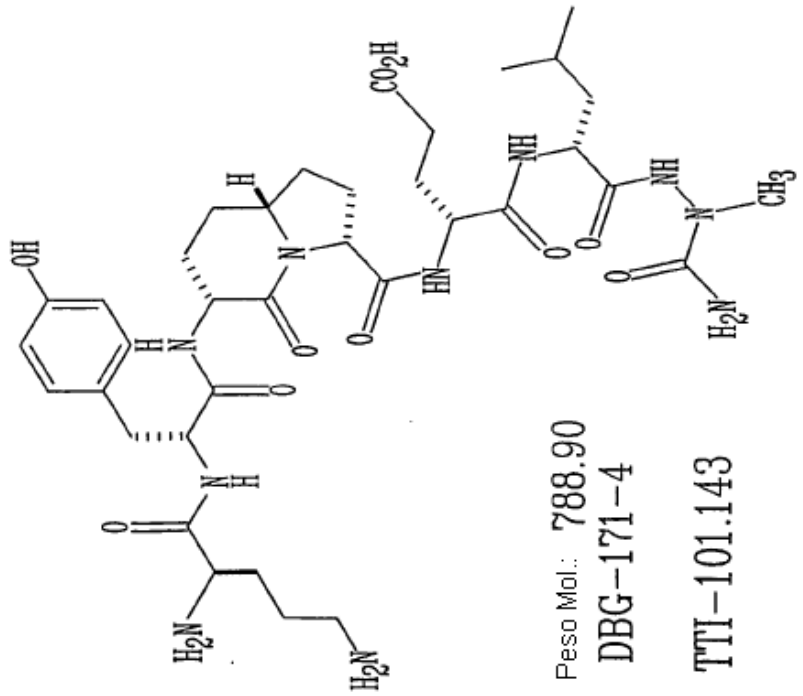
Peso Mol.: 772.90
DBG-171-1
TTI-101.141

FIG. 28A

Estructuras de peptidomiméticos



Peso Mol.: 788.90
DBG-176
TTI-101.144



Peso Mol.: 788.90
DBG-171-4
TTI-101.143

FIG. 2BB

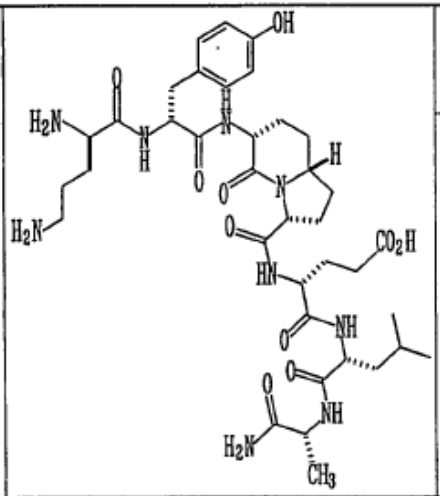
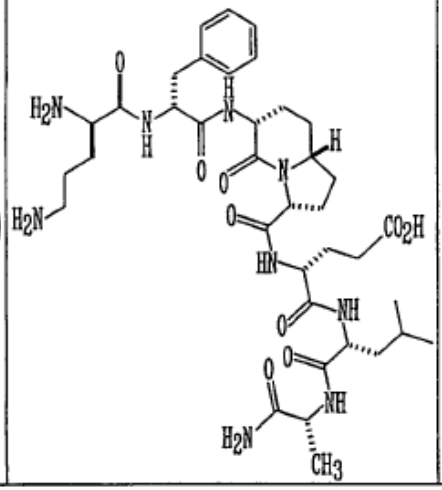
Peptidomiméticos	Estructuras	Proliferación de TF-1		Inhibición de la activación de NFkB	
		CI_{50}	E_{max} (%)	CI_{50}	E_{max} (%)
TTI-101.125 (KH-E1168) (mimético de referencia)		90 pM	100	no hecho	no hecho
TTI-101.136 (KH-E9177)		50 nM	60	30 nM	60

FIG. 29

Peptidomiméticos	Estructuras	Proliferación de TF-1		Inhibición de la activación de NFkB	
		CI_{50}	E_{max} (%)	CI_{50}	E_{max} (%)
TTI-101.137 (KH-E14178)		----	<5	agonista	
TTI-101.138 (KH-E19179)		>0,5 µM	20	----	----

Fig. 29 (Cont.)

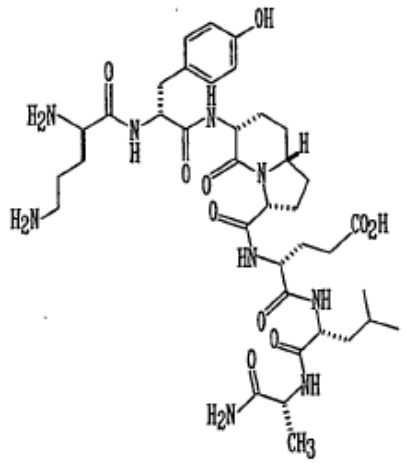
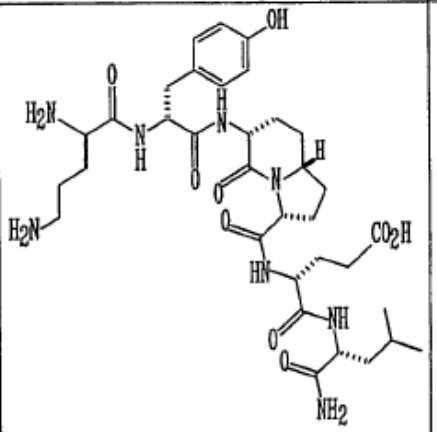
Peptidomiméticos	Estructuras	Proliferación de TF-1		Inhibición de la activación de NFkB	
		CI_{50}	E_{max} (%)	CI_{50}	E_{max} (%)
TTI-101.139 (KH-E24180)		----	20	----	----
TTI-101.140 (KH-E29181)		3 pM	70	1 pM	50

FIG. 29 (Cont.)

Peptidomimético	Estructura	Proliferación de TF-1		Inhibición de la activación de NFkB	
		CI_{50}	E_{max} (%)	CI_{50}	E_{max} (%)
TTI-101.141 (DBG171-1)	Peso Mol.: 772.90 DBG-171-1	1 pM	75	3 pM	70%
TTI-101.142 (DBG171-3)	Peso Mol.: 788.90 DBG-171-3	2 nM actividad agonista		4 nM actividad agonista	

FIG. 30

Peptidomimético	Estructura	Proliferación de TF-1		Inhibición de la activación de NFkB	
		CI_{50}	E_{max} (%)	CI_{50}	E_{max} (%)
TTI-101.143 (DBG171-4)	Peso Mol.: 788.90 DBG-171-4	50 nM	75	1 nM	60%
TTI-101.144 (DBG176)	Peso Mol.: 788.90 DBG-176	Eficacia sobre 5 longitudes		----	35%

Fig. 30 (Cont.)

Peptidomimético	Estructura	Proliferación de TF-1		Inhibición de la activación de NFkB	
		CI_{50}	E_{max} (%)	CI_{50}	E_{max} (%)
TTI-101.125 (KH-E1168) (mimético de referencia)		90 pM	100		

FIG. 30 (Cont.)